

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

## Mémoire du Projet de fin d'études

2<sup>ème</sup> Année Master



**Département : Sciences de la matière.**

**Spécialité : Chimie physique.**

*Présenté par :*

**FERKOUS Henadi**

---

### **Etude par spectroscopie UV-visible, HPLC/MS et modélisation moléculaire de la dégradation forcée de l'héspéridine**

---

**Sous la Direction de :**

**Pr. AMIRA-GUEBAILIA HABIBA**

**Juin 2022**

## REMERCIEMENTS

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

*Nous remercions infiniment nos parents (ma mère et le deuxième père mon frère) qui nous ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de notre formation.*

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

*Nos remerciements sont aussi adressés à Dr. Karima BELGUIDOUM; enseignante au département de génie des procédés et Mme Pr. NOUAR. L, Mme Pr. MADI. F pour l'aide qu'elles nous ont apportée au cours de la réalisation de ce travail.*

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

*Nous tenons à remercier l'ingénieur de laboratoire de recherche de chimie computationnelle et nanostructure pour toute l'aide qu'elles nous ont apportée à chaque fois que nous en avons besoin.*

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

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

## Dédicace:

2022

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers mon mère (AZIZA) et au défunt dans mon cœur mon défunt père (LARB) et ma deuxième père mon frère et le tout dans ma vie (DJAKOUB)

A mes chères sœurs (MIMI) et leur petite famille, AMMA et KANTHER) et ma copine (LYDIA) pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mon cher frère (MEHAMMED) pour leur appui et leur encouragement.

Je dédie aussi ce travail à :

Mon mari (SOUFIAN)

Tous mes cousins, cousine (HADJER, SALMA et KHAWLA) et ma tante

Tous mes amis (SARA, RAYANE, SAFA, AMMA, HOURYA, CHAMA, HIND et BOUTHANNA), mes collègues et tous ceux qui m'estiment.



FERKOUS HANADI

## RESUME

L'objectif de ce travail est d'étudier la dégradation moléculaire forcée d'un polyphénol ; l'Hespéridine par l'exposition aux rayonnements solaire, ultraviolet et infrarouge. Un suivi spectrophotométrique de la variation de l'absorbance en fonction du temps nous permet de mettre en évidence les changements qui ont lieu au sein de la molécule en réponse à chacun des facteurs de stress. Une deuxième technique d'analyse qui est l'HPLC couplée à la spectrométrie du masse a été utilisée pour identifier les fragments susceptibles d'être formés lors de la dégradation de la molécule.

Pour confirmer les résultats obtenus expérimentalement, nous avons effectué des calculs théoriques par la méthode de DFT. L'énergie de chaque fragment obtenu par la spectrométrie de masse a été calculée pour comparer la stabilité de ces fragments.

Cette étude a montré que l'hésperidine pure ou contenu dans les jus d'orange, subit une dégradation suite à l'exposition aux rayonnements, c'est la raison pour laquelle une conservation adéquate lors du transport et le stockage est exigée.

Mots clé : Hésperidine, dégradation moléculaire, HPLC-MS, spectrophotométrie, UV, IR, RMN, DFT.

## **ABSTRACT**

The aim of this work is the study of the forced molecular degradation of a polyphenol; Hesperidin by exposure to solar, ultraviolet and infrared radiation. A spectrophotometric monitoring of the variation of absorbance as a function of time allows us to highlight the changes that occur within the molecule, in response to each of the stress factors. A second analysis technique, which is HPLC coupled to mass spectrometry, was used to identify the fragments, likely to be formed during the degradation of the molecule.

To confirm the results obtained experimentally, we performed theoretical calculations using the DFT method. The energy of each fragment obtained by mass spectrometry was calculated to compare the stability of these fragments.

This study showed that hesperidin, free or contained in orange juices, undergoes degradation, following exposure to radiation; this is why adequate preservation during transport and storage is required.

Keywords: Hesperidin, molecular degradation, HPLC-MS, spectrophotometry, UV, IR, NMR, DFT

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التحلل الجزيئي القسري لمادة البوليفينول. هيسبيريدين عن طريق التعرض للأشعة الشمسية والأشعة فوق البنفسجية والأشعة تحت الحمراء. تسمح لنا المراقبة الطيفية لتغير الامتصاص كدالة للوقت بإبراز التغييرات التي تحدث داخل الجزيء استجابةً لكل من عوامل الإجهاد. تم استخدام تقنية تحليل ثنائية ، وهي HPLC مقترنة بمطياف الكتلة ، لتحديد الأجزاء التي يحتمل أن تتشكل أثناء تحلل الجزيء.

لتأكيد النتائج التي تم الحصول عليها تجريبياً ، أجرينا حسابات نظرية باستخدام طريقة DFT تم حساب طاقة كل جزء تم الحصول عليه بواسطة مقياس الطيف الكتلي لمقارنة ثبات هذه الأجزاء.

أظهرت هذه الدراسة أن hesperidin النقي أو الموجود في عصير البرتقال يتعرض للتدهور بعد التعرض للإشعاع ، وهذا هو السبب في ضرورة الحفظ الكافي أثناء النقل والتخزين.

,الضوئي الطيف قياس, HPLC-MS, الجزئي لتحليل: Hesperidin, المفحاحة لكلمات الأشعة فوق البنفسجية, الأشعة تحت الحمراء, DFT, NMR.

### SOMMAIR:

Titre.	Page.
REMERCEIMENTS	
DEDICACE	
RESUME	
ABSTRACT	
	ملخص
SOMMAIRE	
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION GENERALE	1

<i>Chapitre 1: Les polyphénols.</i>	
<b>1.1. Définition.</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Biosynthèse des polyphénols.</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Structures chimiques et classification.</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1. Les composés non flavonoïdes.</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1.1. Les acides phénoliques.</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.2. Les stilbènes C6-C2-C6.</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.3. Les lignines (C6-C3) n.</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2. Les flavonoïdes C6-C3-C6.</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2.1. Flavonols.</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2.2. Flavanols ou flavan-3-ols.</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2.3. Anthocyanes.</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2.4. Isoflavones.</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2.5. Flavanones.</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Conclusion</b>	<b>20</b>
<i>Chapitre 2: Dégradation moléculaire.</i>	
<b>2.1. Aspects fondamentaux.</b>	<b>21</b>
<b>2.1.1. Spectre solaire.</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2. Différents types de rayonnements.</b>	<b>21</b>
<b>2.1.3. Les énergies et longueurs d'ondes de chaque rayonnement.</b>	<b>22</b>
<b>2.2. La molécule organique.</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1. Définition.</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2. Les énergies des liaisons dans un composé organique.</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3. Stabilité des molécules organique.</b>	<b>24</b>
<b>2.3. Dégradation moléculaire.</b>	<b>24</b>
<b>2.3.1. Dégradation moléculaire par les effets des environnements.</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2. Dégradation forcée d'une molécule.</b>	<b>25</b>
<b>2.3.3. La réaction de dégradation.</b>	<b>25</b>
<b>2.4. Analyse quantitative des principaux produits de dégradation.</b>	<b>26</b>
<b>2.5. Conclusion:</b>	<b>26</b>
<i>Chapitre 3: Matériels et Méthodes.</i>	
<b>3.1. Solvants, réactifs, matériels, et programmes.</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Méthodes.</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1. Analyse quantitative par spectrophotométrie de l'HESP dans solution pure de HESP et le jus naturel et le jus commerciale et l'identification des analyse.</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Suivi cinétique de la dégradation de l'HESP.</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1. Préparations des échantillons.</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2. Méthode de préparation et injection des standards.</b>	<b>31</b>
<b>3.3.3. Méthode de préparation et injection des échantillons.</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Étude par modélisation moléculaire.</b>	<b>32</b>



<b>3.4.1. La modélisation moléculaire.</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2. La méthode de calcul.</b>	<b>33</b>
<b>3.4.3. Logiciel utilisé.</b>	<b>34</b>
<b>3.4.3. Gaussian.</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Etude par HPLC couplée à la spectrométrie de masse de la dégradation de l'HESP</b>	<b>35</b>
<b>3.5.1. Mode opératoire</b>	<b>35</b>
<b>3.5.2. Préparations des échantillons</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2.1. Echantillon de jus à injecter en HPLC.</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2.2. Injection en HPLC.</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2.3. Analyse en HPLC</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.4. Phase mobile.</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.5. Phase stationnaire.</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.6. Injection.</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.7. Gradient.</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.8. Détection.</b>	<b>40</b>
<b>3.5.2.9. Ionisation à l'électrospray.</b>	<b>41</b>
<b>3.5.2.10. Analyseur.</b>	<b>41</b>
<b>3.6. Conclusion.</b>	<b>41</b>
<b><i>Chapitre 4: Résultats et Discussion.</i></b>	
<b>4.1. Étude spectrophotométrie.</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Caractéristiques de l'HESP.</b>	<b>42</b>
<b>4.1.1.1. Analyse qualitative par HPLC.</b>	<b>42</b>
<b>4.1.1.2. Spectre infrarouge de l'HESP.</b>	<b>42</b>
<b>4.1.1.3. Spectre de RMN du proton de l'HESP.</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2. Etude spectrophotométrique de la dégradation de l'HESP.</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2.1. Analyse par UV-visible d'une solution d' HESP pur.</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2.2. Droite d'étalonnage de l'HESP.</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2.3 Validation de la méthode d'analyse.</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2.4. Effet du rayonnement solaire sur une solution d'HESP.</b>	<b>48</b>
<b>4.1.2.5 Effet de l'exposition de la solution d'HESP au rayonnement UV.</b>	<b>52</b>
<b>4.1.3. Etude de la dégradation forcée de l'HESP dans un jus d'orange naturel.</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3.1. Analyse d'une solution de jus d'orange pressé à la main.</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3.2. Effet du rayonnement solaire sur l'HES contenu dans le jus d'orange.</b>	<b>55</b>
<b>4.1.3.3. Effet du rayonnement UV sur le jus naturel.</b>	<b>58</b>

<b>4.1.4. Etude de la dégradation de l'HESP contenu dans un jus commercial.</b>	<b>60</b>
<b>4.1.4.1. Effet de rayonnement solaire sur l'HESP contenu dans le jus commercial.</b>	<b>60</b>
<b>4.1.4.2 Effet de rayonnement UV sur l'HESP contenu dans le jus commercial.</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Etude de la dégradation forcée de l'hespéridine dans des échantillons de jus par LC-MS.</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1. Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse de quelques échantillons de jus.</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1.1. Echantillons de jus analysée par LC-masse.</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Modélisation moléculaire.</b>	<b>72</b>
<b>4.3.1. Comparaisons de la stabilité entre les fragmentations MS2.</b>	<b>72</b>
<b>4.3.3. Quelque fragmentation provoquée dans la structure de l'Hespéridine et leurs énergies.</b>	<b>73</b>
<b>4.4. Conclusion.</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSION GENERAL.</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCE.</b>	<b>10</b>

## **LISTE DES FIGURES:**

Numéro de figure	Titre de figure	page
<b>Chapitre 1: Les polyphénols.</b>		
<b>Figure.1.1</b>	Voies de biosynthèse des polyphénols via. a) L'acide shikimique. b) L'acétate et le malonate	<b>5</b>
<b>Figure.1.2.</b>	Différentes classes de polyphénols des végétaux.	<b>6</b>
<b>Figure.1.3.</b>	Structure des Acides hydroxybenzoïques.	<b>7</b>
<b>Figure.1.4.</b>	Structure des Acides hydroxycinnamiques.	<b>7</b>
<b>Figure.1.5.</b>	Trans(E) et cis (Z) resvératrol ( tri-hydroxy 3,5,4'stilbène).	<b>8</b>
<b>Figure.1.6.</b>	Structure d'une lignine.	<b>9</b>
<b>Figure.1.7.</b>	Structure de base des flavonoïdes.	<b>9</b>
<b>Figure.1.8.</b>	Structure de base des flavonols.	<b>10</b>
<b>Figure.1.9.</b>	Structure de base des flavan-3-ols.	<b>10</b>
<b>Figure.1.10.</b>	Structures chimiques des flavan-3-ols, catéchine, gallocatéchine épigallocatéchine (EGC ) épigallocatéchine gallate (EGCG).	<b>11</b>
<b>Figure.1.11.</b>	Structure des Anthocyanidines.	<b>12</b>
<b>Figure.1.12.</b>	Structure des Isoflavones.	<b>12</b>
<b>Figure.1.13.</b>	Structure des flavanones de configuration S.	<b>13</b>
<b>Figure.1.14.</b>	Structure des flavones de configuration R.	<b>13</b>
<b>Figure.1.15.</b>	L'effet de l'hydrolyse enzymatique sur l'Hespéridine.	<b>14</b>
<b>Figure.1.16</b>	Structure de l'hespéridine.	<b>14</b>
<b>Figure.1.17.</b>	Les agrumes.	<b>16</b>
<b>Chapitre 2: Dégradation moléculaire.</b>		
<b>Figure 2.1.</b>	Le spectre solaire [UV-Visible et IR] et ses effets.	<b>22</b>
<b>Figure 2.2.</b>	Réaction de dégradation..	<b>25</b>
<b>Chapitre 3: Matériels et Méthodes.</b>		
<b>Figure 3.1.</b>	Structure du HESP.	<b>30</b>
<b>Figure 3.2.</b>	échantillon exposé à l'effet du rayonnement UV.	<b>32</b>
<b>Figure 3.3.</b>	les échantillons exposés à l'effet du rayonnement solaire.	<b>32</b>
<b>Figure 3.4</b>	Structure de l' HESP tracée par HyperChem	<b>32</b>

	Professional.	
<b>Figure.3.5.</b>	Menu graphique du logiciel GaussianView 6.0.16.	<b>35</b>
<b>Figure .3.6.</b>	Principe de fonctionné de l'appareille d' HPLC.	<b>36</b>
<b>Figure.3.7.</b>	Protocole de préparation des échantillons de jus commerciaux (Roiuba) et naturel (pressé à la main) pour l'injection en HPLC.	<b>38</b>
<b>Figure.3.8.</b>	Gradient HPLC pour l'analyse d'HESP.	<b>40</b>
<b>Chapitre 4: Résultats et discussions.</b>		
<b>Figure 4.1.</b>	Chromatogramme HPLC de l'HESP (pic à 26.53min).	<b>42</b>
<b>Figure.4.2.</b>	Spectre infrarouge de l'HESP à l'état solide.	<b>43</b>
<b>Figure.4.3.</b>	Spectre de RMN du proton de l'HESP dans le DMSO.	<b>44</b>
<b>Figure.4.4.</b>	spectre UV-visible de l'HESP dans le MeOH.	<b>45</b>
<b>Figure 4.5.</b>	Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'HESP.	<b>46</b>
<b>Figure 4.6.</b>	Domaine de détection et de quantification le model.	<b>47</b>
<b>Figure 4.7.</b>	Courbe de changement de la température au cours du temps.	<b>49</b>
<b>Figure 4.8.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d'HASP sous l'effet de rayonnement solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>50</b>
<b>Figure 4.9.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement solaire au $\lambda=228$ nm.	<b>51</b>
<b>Figure 4.10.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement UV au $\lambda=330$ nm.	<b>53</b>
<b>Figure 4.11.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement UV à $\lambda=228$ nm.	<b>54</b>
<b>Figure 4.12.</b>	Spectre UV-visible d'un échantillon de jus d'orange naturel.	<b>54</b>
<b>Figure 4.13.</b>	Courbe de variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>56</b>
<b>Figure 4.14.</b>	Courbe de variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=228$ nm.	<b>57</b>
<b>Figure 4.15.</b>	Courbe d'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet de rayonnement UV au $\lambda=330$ nm.	<b>58</b>
<b>Figure 4.16.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet de rayonnement UV à $\lambda=228$ nm	<b>59</b>
<b>Figure 4.17.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus orange sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>61</b>

<b>Figure 4.18.</b>	Courbe de l'absorbance d'une solution de jus commercial en fonction du temps d'exposition au rayonnement UV à $\lambda=330$ nm.	<b>62</b>
<b>Figure 4.19.</b>	Spectre LC-MS de jus Ramy verre à 230nm.	<b>63</b>
<b>Figure 4.20.</b>	Fragments obtenus par MS-MS du pic majoritaire à $m/z=609$ a) Diglucose ou rutinose b) Hespérétine.	<b>64</b>
<b>Figure.4.21.</b>	Résultats d'analyse d'un échantillon de jus Ramy en bouteille en plastique à 230nm par un HPLC-Mass.	<b>65</b>
<b>Figure.4.22.</b>	Structure du complexe HESP plus $CH_3Na$ d'une structure moléculaire $C_{29}H_{35}O_{15}Na$ .	<b>66</b>
<b>Figure.4.23.</b>	Résultats d'analyse d'un échantillon de jus à 230nm par un HPLC-Masse avant exposition aux rayonnements.	<b>67</b>
<b>Figure 4.25.</b>	Structure du HESP moins deux sucres et un hydroxyle d'une structure moléculaire $C_{16}H_{22}O_5$ .	<b>68</b>
<b>Figure 4.24.</b>	Fragment à $m/z = 429$ g/mol de formule $C_{22}H_{21}O_9$ .	<b>68</b>
<b>Figure.4.26.</b>	Résultats d'analyse d'un échantillon de jus à 230nm par un HPLC-Masse après exposition aux rayonnements UV.	<b>69</b>
<b>Figure 4.27.</b>	Résultats d'analyse d'un échantillon de jus fruit à 230nm par un HPLC-Masse et un spectre UV-Visible bombardée par une lampe d'IR.	<b>71</b>

## LISTE DES TABLEAUX.

Numéro de figure	Titre de figure	Page
<b>Chapitre 1: Les polyphénols.</b>		
<b>Tableau.1.1.</b>	Carte d'identité de l' Hespéridine.	<b>15</b>
<b>Chapitre 2: Dégradation moléculaire.</b>		
<b>Tableau 2.1.</b>	Energies et longueur d'ondes des différents rayonnements solaires.	<b>23</b>
<b>Tableau 2.2.</b>	Energies des liaisons dans un composé organique.	<b>23</b>
<b>Chapitre 3: Matériels et Méthodes.</b>		
<b>Tableau .3.1.</b>	Matériels, solvants et réactifs et programmes.	<b>27</b>
<b>Tableau 3.2.</b>	Quelque caractéristique du HESP.	<b>30</b>
<b>Tableau .3.3.</b>	Paramètres de calcul.	<b>33</b>
<b>Tableau.3.4.</b>	Gradient HPLC pour l'analyse d'HESP.	<b>40</b>
<b>Chapitre N°4: Résultats et Discussion</b>		
<b>Tableau 4.1.</b>	Attribution des principales bandes du spectre infrarouge de l'HESP.	<b>43</b>
<b>Tableau 4.2.</b>	Interprétation du spectre RMN de l'HESP.	<b>44</b>
<b>Tableau 4.3.</b>	Données d'étalonnage de l'HESP pure à $\lambda = 330$ nm.	<b>46</b>
<b>Tableau 4.4.</b>	Quelques paramètres statistiques de la méthode d'analyse.	<b>48</b>
<b>Tableau 4.5.</b>	Variation de l'absorbance de l'HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire, à $\lambda=330$ .	<b>49</b>
<b>Tableau 4.6.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP en fonction du temps, sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=228$ nm.	<b>51</b>
<b>Tableau.4.7.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d' HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à $\lambda=330$ nm.	<b>52</b>
<b>Tableau 4.8.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution d' HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à $\lambda=228$ nm.	<b>53</b>
<b>Tableau 4.9.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>55</b>
<b>Tableau4.10.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus	<b>56</b>

	d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=228$ nm.	
<b>Tableau 4.11.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>58</b>
<b>Tableau 4.12.</b>	Résultat d'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet de rayonnement UV au $\lambda=228$ nm.	<b>59</b>
<b>Tableau 4.13.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus commercial en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire à $\lambda=330$ nm.	<b>61</b>
<b>Tableau 4.14.</b>	Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange commercial en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à $\lambda=330$ nm.	<b>62</b>
<b>Tableau 4.15.</b>	Energie des molécules nées à MS2.	<b>72</b>
<b>Tableau 4.16.</b>	Quelque fragment capable de se former dans les réactions de dégradation.	<b>73</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

$\lambda$ : Longueur d'onde.

«**MDL MOL (\*.MOL)**: molecule modeling molconverter

°C: degrés Celsius

$\mu$ l: microlitre.

**A**: Absorbance.

$\text{Å}$ : angström.

$A_{\text{moy}}$  : Absorbance moyenne.

**AMP**: adénosine monophosphate

**ATP**: adénosine triphosphate,  $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ .

**B3LYP**: Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr

**C**: la concentration massique.

**c**: la Concentration.

**c**: vitesse de la lumière

**cm**: centimètre

**COMT**: Catéchol-O-Méthyle Transférase).

**COVID-19**:coronavirus disease 2019.

**D.O**: densité optique.

**DFT**: Density Functional Theory.

**DMSO**: diméthyle sulfoxyde( $CH_3$ )<sub>2</sub>SO

**E**: énergie

**e**: erreur dans le point i

**FASEB**: Federation of American Societies of Experimental Biology



**FDA:** Food and Drug Administration

**GP:** génie procédés

**h:** constante de Plank

**H:** proton.

**H<sub>2</sub>O:** l'eau.

**HESP:** Hespéridine.

**HPLC:** High-performance liquid chromatography.

**HPLC-MS:** High *performance liquid chromatography* mass spectrometry.

**I:** intensité transmise.

**I<sub>0</sub>:** intensité incidente

**IR:** infrarouge.

**Kcal/mol:** kilocalories par mole

**km/s:** kilomètre par seconde.

**l:** la largeur (épaisseur) de cuve.

**LCCN:** laboratoire de recherche de chimie computationnelle et nanostructure.

**LD:** limite de détermination.

**LQ:** limite de quantification.

**m/z:** Rapport masse sur charge.

**M:** la masse molaire de la molécule moins un H

**M:** la masse molaire.

**m:** mètre.

**MeOH:** méthanol.

**min:** minute.

**MS:** spectrométrie de masse

**MS2:** la deuxième analyse par la spectrométrie de masse

**n.f:** nom féminine.

**n:** orbitale non liant.

**ng/l:** nanogramme par mol.

**nm:** nanomètre.

**P:** la pression.

**R<sup>2</sup>:** coefficient de corrélation.

**RH:** radicale +proton.

**RMN:** la résonance magnétique nucléaire.

**TFA:** l'acide trifluoroacétique  $\text{CF}_3\text{COOH}$

**t<sub>m</sub>:** temps mort.

**t<sub>r</sub>:** temps de rétention.

**UV:** Ultraviolet.

**U:** fréquence du rayonnement

**ε:** le coefficient d'extinction molaire.

**π\*:** orbitale pié anti liant.

**π:** orbitale pié liant.

**σ\*:** orbitale sigma anti liant.

**σ:** écart-type.

**σ:** orbitale sigma liant.

**a.u:** unité atomique

# *Introduction générale.*

Les plantes en général, et spécifiquement les agrumes sont capables de produire une grande diversité des produits qui ne participent pas à leur métabolisme de base (eau, protéines, sucres et minéraux), mais qui représentent plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols, les huiles essentielles... etc. Parmi ces métabolites, les polyphénols dont on connaît actuellement, plus de 8000 composés [1], représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires [2-3]. Ils sont aussi associés aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons telles que le thé et les jus [4- 7].

Les plus communs parmi les polyphénols sont les acides hydroxy-cinnamiques, les flavonoïdes et les anthocyanes. La plupart des flavonoïdes existant dans les plantes sont conjugués avec des sucres, pectines, des acides organiques ou sont sous forme de polymères. [8-9]. Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal. L'orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 1765) est l'une des plantes particulièrement riche en polyphénols, essentiellement les flavonoïdes, tel que l'héspéridine. L'héspéridine est le constituant majeur des écorces d'agrumes, qui sont caractérisés par diverses activités biologiques, telles que l'activité antioxydante, antivirale, antifongique et antibactérienne [10-13]. Ces diverses applications potentielles des substances bioactives des écorces d'agrumes en alimentation fonctionnelle, en pharmacie et en cosmétique ne sont possibles que si les molécules sont extraites tout en gardant leurs fonctionnalités et après extraction ou utilisation, conservées de manière adéquate. En effet, plusieurs études ont montré que ces molécules présentent une sensibilité à certaines conditions de processus telles que la température, la lumière ou la matrice alimentaire [14] et ont signalé que le traitement entraîne souvent des changements importants des teneurs en composés phénoliques [15].

L'Algérie est un pays très chaud, surtout en été, lorsque la température dans la ville de Reggane a atteint 47,3 degrés Celsius à quatre heures de l'après-midi, ce qui est la mesure la plus élevée enregistrée pour le mois d'août 2021 [16]. Les villes internes aussi sont concernées par des chaleurs caniculaires, en été, surtout lors des feux de forêt. Pour se rafraîchir, le grand public a tendance à consommer en plus de l'eau, des boissons fraîches comme les sodas et les jus de fruits.

Ce qui a retenu notre attention c'est la méthode de conservation des boissons commerciales. Sur l'emballage, il est mentionné que les boissons doivent être conservées dans un endroit frais à l'abri du soleil, mais la plupart des commerçants enfreignent les préconisations de conservation. En effet, et en plein saison estivale, on voit que ces boissons sont placées à l'extérieur des réfrigérateurs, exposées aux rayonnements solaire avant refroidissement. Ceci inclut, aussi bien les magasins d'alimentation générale que certains restaurants et fastfoods. Le transport même des boissons depuis leurs points de fabrication vers leurs points de vente, se fait selon des moyens non adéquats, on les voit dans des semi-remorques et des camions découverts, traversant plusieurs centaines de kilomètres, alors qu'elles devraient être livrées dans un moyen de transport frigorifique sous température dirigée. Ceci laisse supposer que même si les jus sont à base naturelle et contiennent des produits phytonaturels bénéfiques pour la santé, ces manœuvres pourraient entraver ces effets par la dénaturation de ces molécules et l'obtention de métabolites qui sont eux même inconnus et de ce fait, leur action sur l'organisme humain reste inconnue aussi.

L'objectif tracé pour cette étude est la mise en évidence de la dégradation de l'une des molécules du jus d'orange qui est l'héspéridine, sous l'effet des rayonnements solaire et ultraviolet. C'est ce qu'on appelle dégradation forcée, on a essayé de simuler le même phénomène qui se passe réellement quand les conditions de conservation et de transport ne sont pas respectées. Car on ne peut pas travailler sur de tels échantillons puisque l'on ignore les températures réelles et le temps d'exposition aux radiations, auxquelles les boissons ont été exposées.

Nous avons transféré le phénomène au laboratoire et essayer de simuler mais expérimentalement et approximativement les mêmes effets qui ont lieu réellement.

Pour ce faire, un suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Visible et une analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse de la molécule d'héspéridine libre en solution et dans deux échantillons de jus ; l'un commercial et le deuxième naturel pressé à la main, a été réalisé pour mettre en évidence et quantifier la dégradation de l'héspéridine, soumises à des facteurs de stress, à savoir une exposition aux rayonnements solaire et ultraviolet (monochromatique). Enfin une tentative d'identification des fragments les plus probables formés lors de la dégradation de l'héspéridine a été réalisée par la modélisation moléculaire au moyen de la DFT.

Les objectifs de cette étude se résument dans les points suivants.

Le travail expérimental qui a été réalisé en partie à l'université de Guelma, au laboratoire de méthodes physiques d'analyse de génie des procédés et au laboratoire de chimie appliquée (LCA) et dont une partie (HPLC- Mass) a été réalisée à l'étranger, a été précédé d'une recherche bibliographique et l'ensemble a produit un mémoire structuré comme suit.

Une introduction générale ou ont été élucidés principalement les objectifs de cette étude.

Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur les polyphénols en général, et l'Hespéridine en particulier (définition, classification et propriétés).

Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à la dégradation moléculaire et la dégradation moléculaire forcée.

Dans le troisième chapitre, sera présentée les méthodes d'analyse utilisées dans ce travail ainsi que les modes opératoires mis en œuvre.

La présentation et l'interprétation des différents résultats obtenus feront l'objet du quatrième chapitre.

Enfin, une conclusion générale achèvera ce travail et portera sur une lecture attentive et succincte des résultats obtenus et une présentation des perspectives envisagées.

*Chapitre 1:*  
*Les polyphénols.*

Ce chapitre consistera en une revue de la littérature concernant les polyphénols, leur définition, leurs structures chimiques et leur classification.

Actuellement, plus de 8000 polyphénols ont été identifiés [1]. Ce sont des métabolites secondaires des plantes, représentant les composés phytochimiques essentiels des légumes, des fruits et d'autres plantes. Les polyphénols sont associés non seulement aux effets bénéfiques de la santé humaine mais aussi aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons telles que le thé et les jus [2-5].

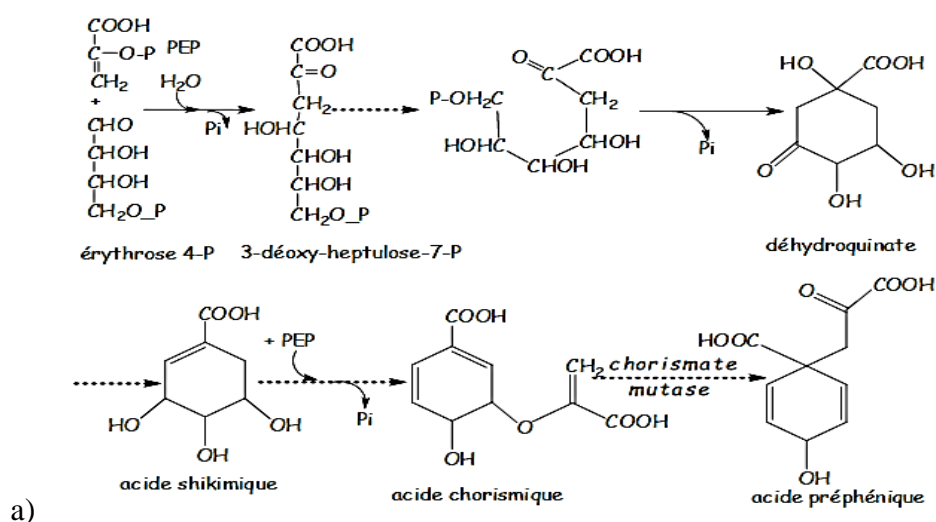
### 1.1. Définition

Les polyphénols sont caractérisés par au moins deux cycles phényle et un ou plusieurs groupements hydroxyle. Cette description comprend un grand nombre de composés hétérogènes, d'une complexité structurale plus ou moins accrue [6-7].

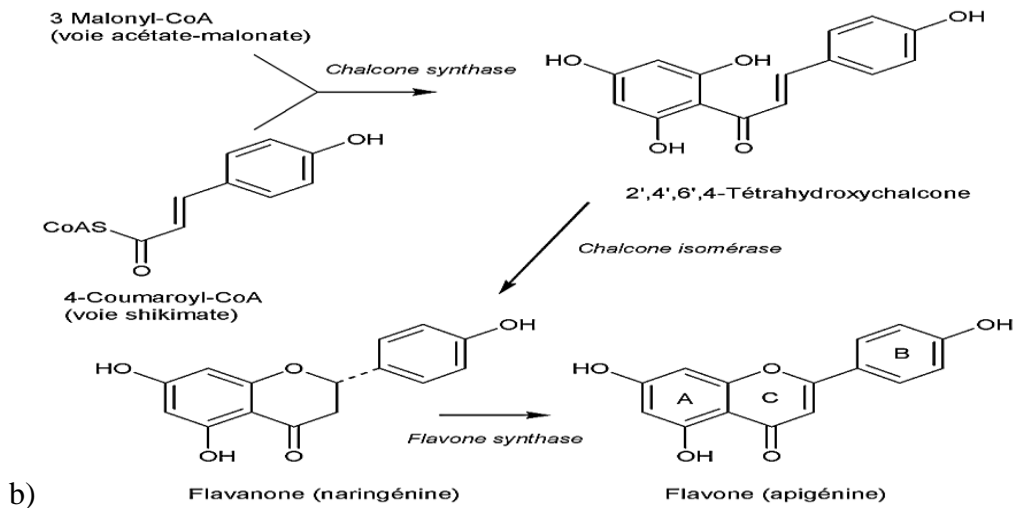
### 1.2. Biosynthèse des polyphénols

Deux voies principales existent pour la biosynthèse des composés polyphénoliques:

- La voie de l'acide shikimique qui peut conduire directement à des acides benzoïques substitués, ou via l'acide préphénique, à une variété de composés phénylpropane [8].
- La voie de l'acétate et du malonate qui conduit à des cycles aromatiques contenant des groupes hydroxyles, sur des atomes de carbone alterné tels que le cycle A des flavonoïdes [8]







**Figure 1.1:** Voies de biosynthèse des polyphénols via.

a) L'acide shikimique. b) L'acétate et le malonate.

### 1.3. Structures chimiques et classification

Les polyphénols sont des composés naturels synthétisés exclusivement par les plantes, avec des caractéristiques chimiques liées aux substances phénoliques et de fortes propriétés *anti-oxydantes*. Ces molécules sont principalement présentes dans les fruits, les légumes, le thé vert et les graines entières.

Les polyphénols peuvent être simplement classés en flavonoïdes et non flavonoïdes ou subdivisés en plusieurs sous-classes en fonction du nombre d'unités phénol dans leur structure moléculaire, leurs substituants et le type de liaison entre les unités phénols. Les polyphénols existent sous forme d'aglycones ou de glycosides [9].

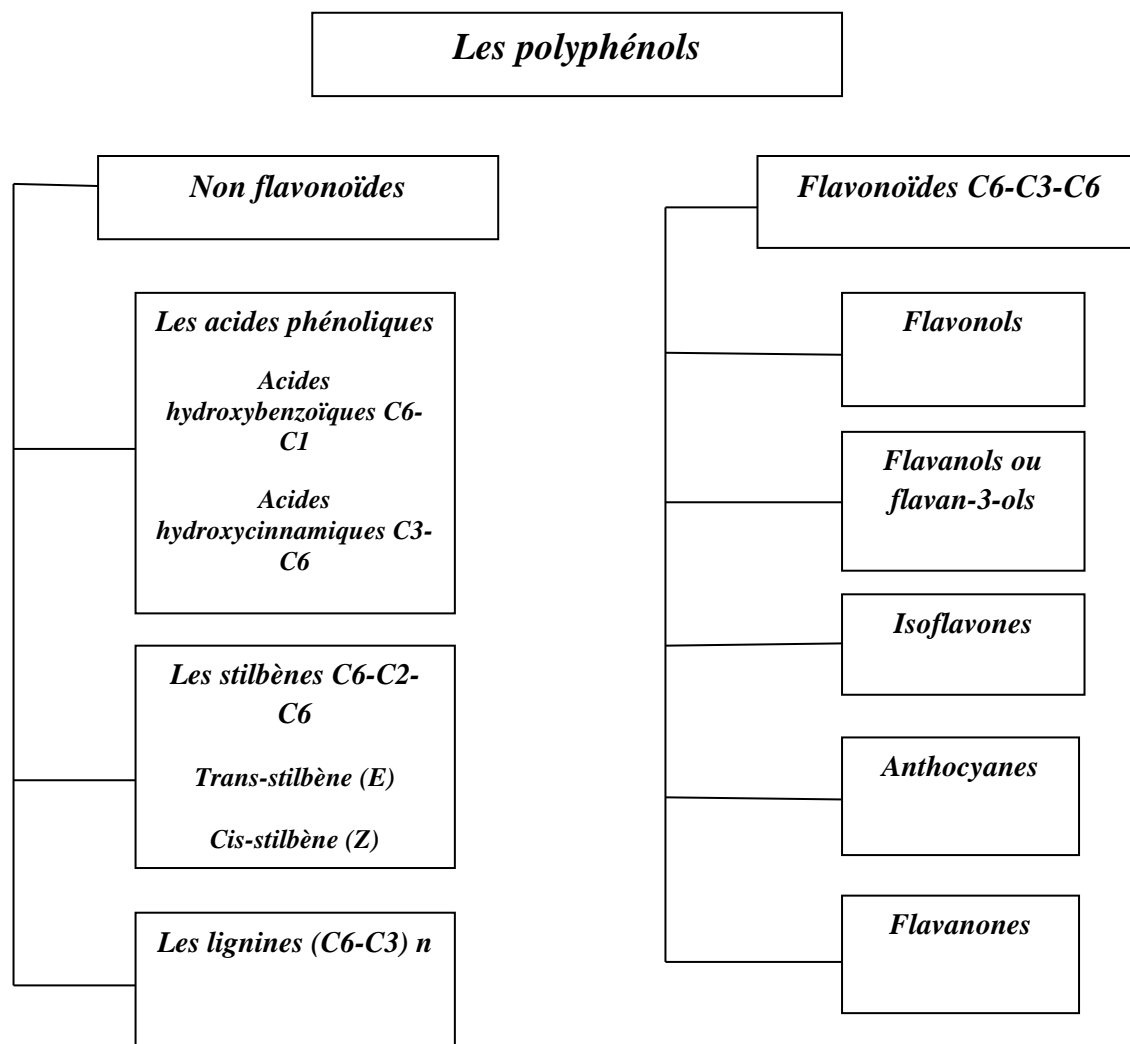


Figure 1.2: Différentes classes de polyphénols des végétaux.

### 1.3.1. Les composés non flavonoïdes

Bien que le squelette structural du polyphénol contienne plusieurs groupes hydroxyles sur des cycles aromatiques, la structure de base des non flavonoïdes est un seul cycle aromatique. Les composés non flavonoïdes comprennent les acides phénoliques, les stilbènes et les lignines. La classe principale de ce groupe est représentée par les acides phénoliques, principalement l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Ces molécules existent rarement sous leur forme libre, mais se trouvent le plus souvent en conjugaison avec d'autres polyphénols, du glucose, de l'acide quinique [7].

### 1.3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont dérivés d'acide benzoïque C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> ou dérivés de l'acide cinnamique C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>.

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

#### a) Acides hydroxybenzoïques C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>

Les acides hydroxybenzoïques dérivent de l'hydroxylation de l'acide benzoïque, ils ont une structure de base en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ces hydroxyles phénoliques peuvent ensuite être méthylés [10].

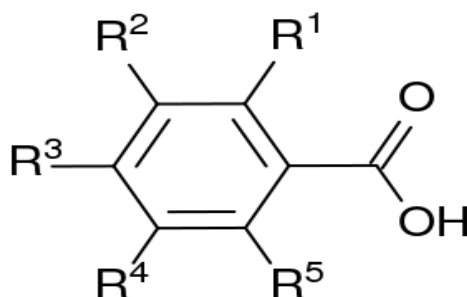


Figure 1.3: Structure des Acides hydroxybenzoïques.

#### b) Acides hydroxycinnamiques C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>

Les acides hydroxycinnamiques sont dérivés de l'acide cinnamique et ont une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles phénoliques OH de ces dérivés peuvent aussi être méthyles (-O-CH<sub>3</sub>) [10].

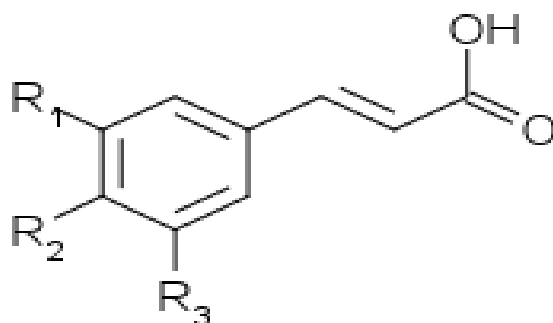
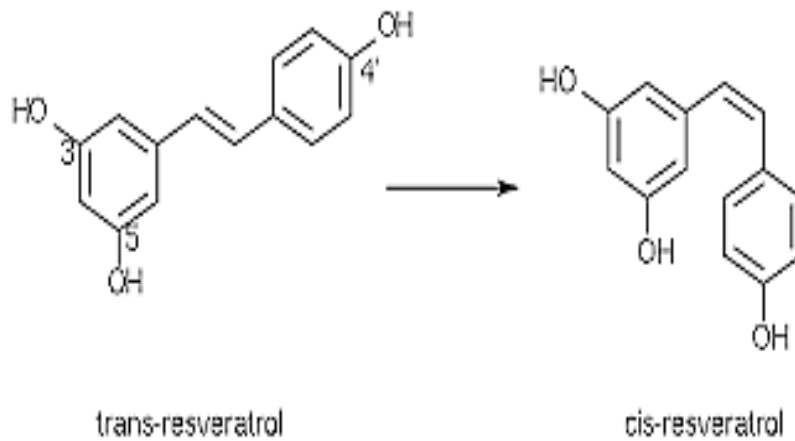


Figure 1.4: Structure des Acides hydroxycinnamiques.

### 1.3.1.2. Les stilbènes C6-C2-C6

Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire végétal, et qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. Les stilbènes (1,2-diphényléthylène) sont composés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un pont éthène pouvant exister sous deux formes: la forme *trans*(E) et la forme *cis* (Z), cette dernière étant obtenue par photo isomérisation ou par l'action de la chaleur. La forme *trans*-stilbène étant la forme la plus stable et bioactive, elle est retrouvée en général plus abondamment dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes [11]. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques. Les plus connus des stilbènes c'est le resvératrol.



**Figure 1.5:** Trans(E) et cis (Z) resvératrol( tri-hydroxy 3,5, 4' stilbène).

### 1.3.1.3. Les lignines (C6-C3) n

Les lignines sont des polymères fortement ramifiés, formés par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes, la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine.

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, et il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations [12].

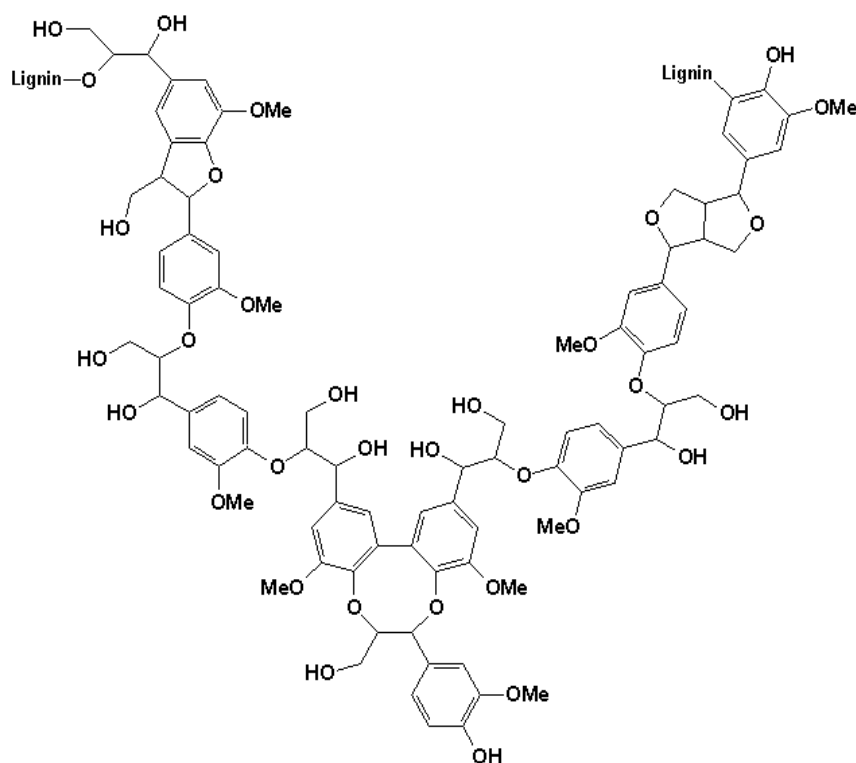


Figure 1.6: Structure d'une lignine.

### 1.3.2. Les flavonoïdes C6-C3-C6

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques contenant un squelette basique de diphenylpropane (C6-C3-C6). Plus de 4000 types des flavonoïdes existent et sont classés en, flavonols, flavan-3-ols (catéchines), isoflavones, flavonoïdes, anthocyanes et chalcones [13]. Les flavonoïdes se forment dans les plantes à partir les acides aminées aromatiques phénylalanines et tyrosine, et le malonate. La structure de base des flavonoïdes est le noyau flavane, qui se compose de 15 atomes de carbone disposés en trois anneaux (C6-C3-C6), qui sont étiquetés A, B et C. Les différentes classes de flavonoïdes diffèrent par le niveau d'oxydation et la substitution du cycle C, tandis que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent dans le modèle de substitution des cycles A et B[14].

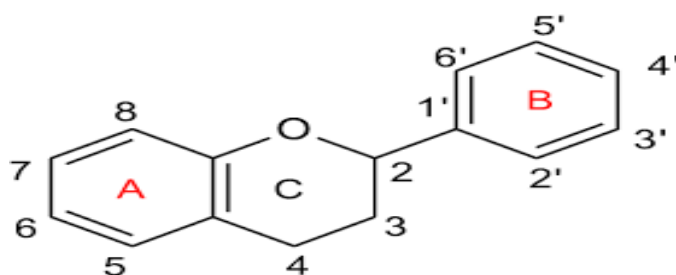


Figure 1.7: Structure de base des flavonoïdes.

### 1.3.2.1. Flavonols

Les flavonols comprennent un groupement carbonyle en position 4. Ce sont des blocs de construction de proanthocyanes. Les flavonols sont présents en abondance dans une variété de fruits et légumes. Les oignons, le chou frisé, la laitue, les tomates, les pommes, les raisins et les baies sont de riches sources de flavonols. La consommation de flavonols s'avère associée à un large éventail de bienfaits pour la santé humaine, notamment un potentiel antioxydant et un risque réduit de maladie vasculaire. Par rapport aux flavones, les flavonols ont un groupe hydroxyle en position 3 de Cycle C, qui peut également être glycosylé [15].

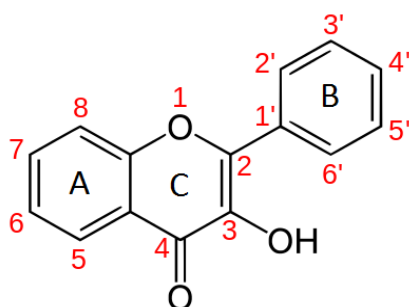


Figure 1.8: Structure de base des flavonols.

### 1.3.2.2. Flavanols ou flavan-3-ols

Les flavan-3-ols (parfois appelés flavanols) possèdent un squelette du 2-phényle-3,4-dihydro-2H-chromen-3-ol. Ces composés comprennent la catéchine, l'épicatéchine gallate, l'épigallocatechine, l'épigallocatechine gallate, les proanthocyanidines, les théaflavines et les théarubigines. Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4. Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondants dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins...etc.[17].

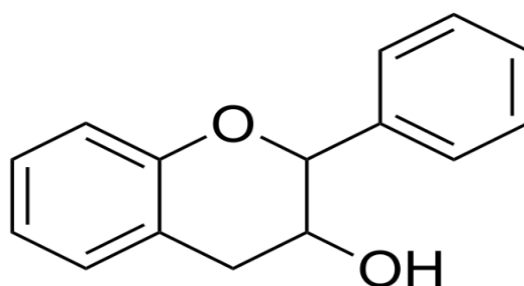
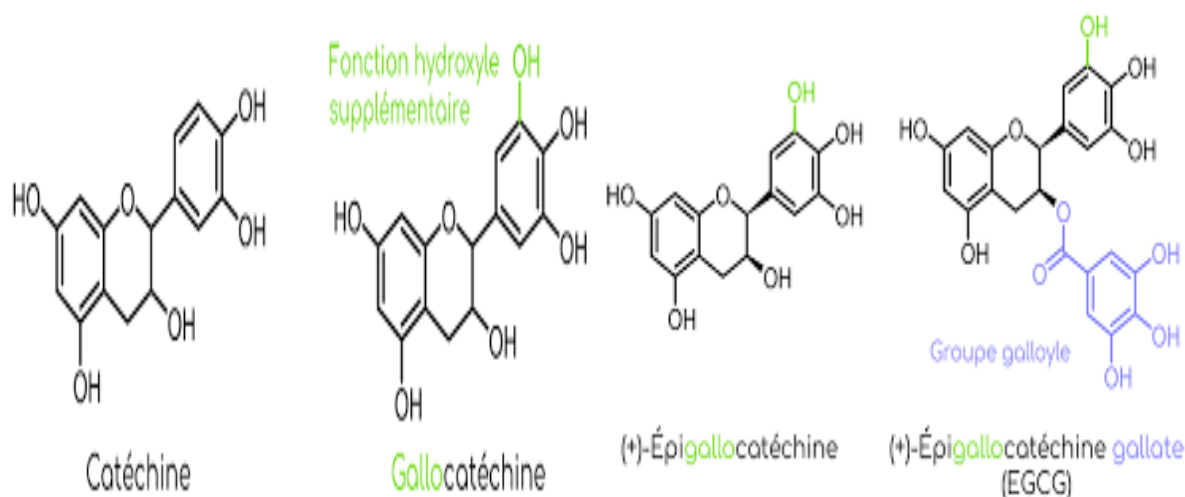


Figure 1.9: Structure de base des flavan-3-ols.



**Figure 1.10:** Structures chimiques des flavan-3-ols, catéchine, gallocatéchine épigallocatéchine (EGC) épigallocatéchine gallate (EGCG).

### 1.3.2.3. Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kuanos signifie bleu sombre) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces végétales. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Les anthocyanidines sont les principaux composants des pigments rouges, bleus et violets de la majorité des pétales de fleurs, fruits et légumes et certaines variétés spéciales de céréales, par exemple le riz noir. Les anthocyanidines dans les plantes existent principalement sous des formes glycosidiques qui sont communément appelées anthocyanes. La cyanidine, la delphinidine et la pélargonidine sont les anthocyanidines les plus répandues, avec plus de deux douzaines d'autres anthocyanidines monomères (un total de 31 anthocyanidines). En fait, 90 % des anthocyanes sont à base de cyanidine, delphinidine et pélargonidine et leurs dérivés méthyles. On connaît au total plus de 500 anthocyanes selon les modèles d'hydroxylation et de méthylation sur le cycle B et la glycosylation avec différentes unités de sucre. La couleur des anthocyanes dépendent du pH. Cependant, d'autres facteurs tels que le degré d'hydroxylation, la méthylation et la glycosylation peuvent également affecter la couleur des composés anthocyanes. Les anthocyanes sont chimiquement stables dans les solutions acides. [17].

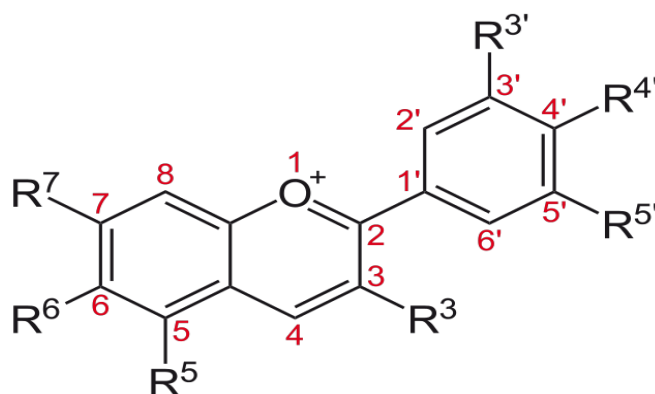


Figure 1.11: Structure des Anthocyanidines.

#### 1.3.2.4. Isoflavones

Les isoflavones sont caractérisées par la présence fixation du cycle B à la position C3 du cycle A plutôt que la position C2 comme les autres flavonoïdes. Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal. Les isoflavones possèdent des effets physiologiques sur les organismes vivants, ce sont des agents protecteurs contre le stress biotique (infection bactérienne). Les isoflavones sont également des constituants alimentaires importants dans la nutrition humaine [18].

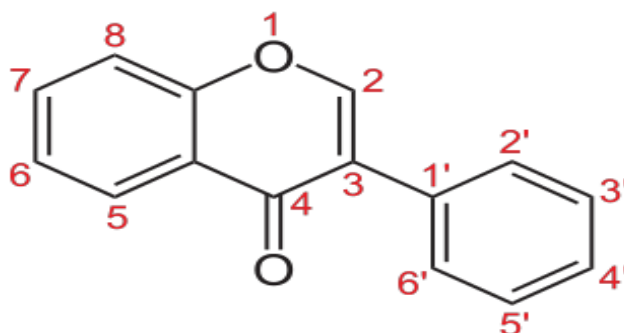


Figure 1.12: Structure des Isoflavones.

#### 1.3.2.5. Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison en position 2 et 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Les flavanones existent sous forme libre ou sous forme glycosylée. La principale source des flavanones reste les agrumes tels que les oranges (douces et amères), le citron, le pamplemousse, les mandarines et les. Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine qui est retrouvée dans le pamplemousse et



l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme L'hésperidine, qui est retrouvée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange [17].

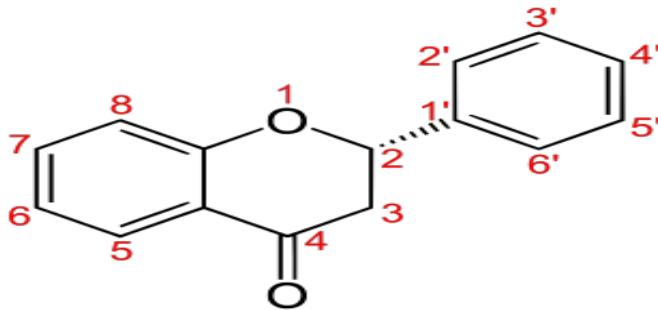


Figure 1.13: Structure des flavanones de configuration S.

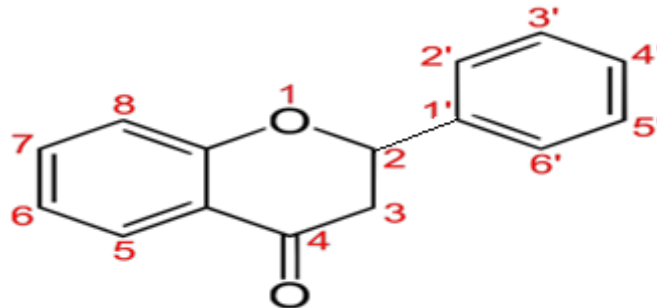


Figure 1.14: Structure des flavones de configuration R.

### ➤ L'Hésperidine

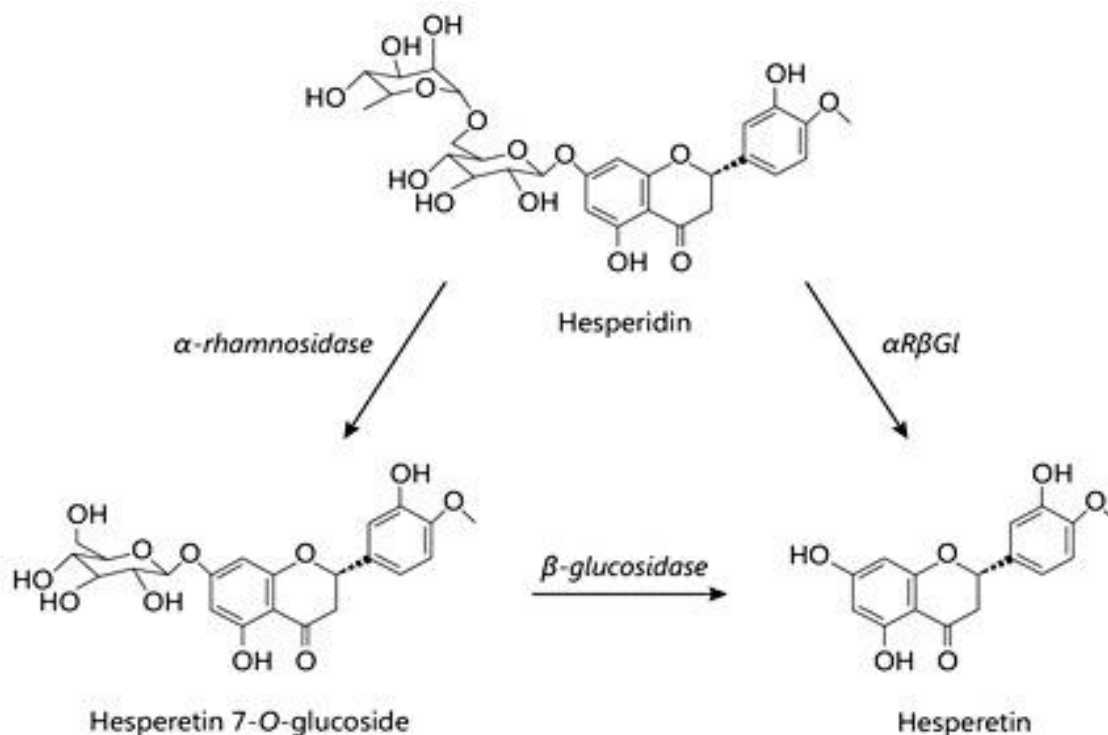
L'Hésperidine est un flavonoïde, plus précisément c'est un **hétéroside flavonoïque** (et même plus spécifiquement un rutinoside), constitué de deux parties.

Une partie osidique: le rutinose.

C'est un disaccharide constitué d'un alpha-L Rhamnose lié à un bêta-D glucose par une liaison alpha 1-6 glycosidique.

Une partie aglycone (ou génine): l'hésperétine.

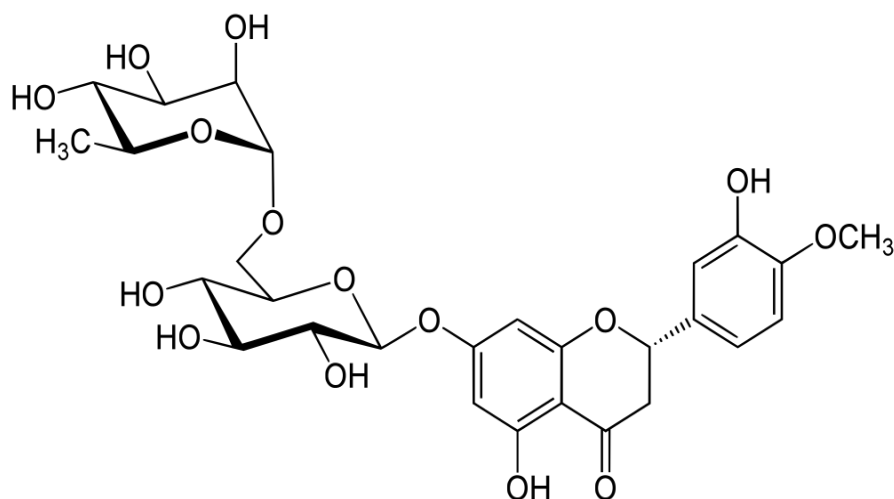
C'est une flavanone (= dihydro-flavone = flavone hydrogénée en 2 et en 3). C'est un dérivé du 2-phényl chromone (= benzo-gamma pyrone substituée en 2 par un phényle). Substitué en 5, en 7 ainsi qu'en 3' (sur le phényle) par des groupements hydroxyle et en 4' par un méthoxy.



**Figure 1.15:** L'effet de l'hydrolyse enzymatique sur l'Hespéridine.

Le rutinose est lié à l'Hespéretine par une liaison O-hétérosidique. Cette liaison engage l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du glucose et celui porté par l'hespéretol en 7. [19].

L'Hespéridine est connu pour être un des principaux composants et agent actif présent dans les espèces citruses de la famille des rutacées. [20].



**Figure 1.16:** Structure de l'Hespéridine.

**Tableau 1.1:** Carte d'identité de l' Hespéridine [19].

Identification	
<b>Nom UICPA</b>	(2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) -4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 6-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl) - $\beta$ -D-glucopyranoside
<b>Synonymes</b>	Cirantine; Hespéridoside; Hespéridine 7-O- <u>rutinoside</u>
<b>Apparence</b>	aiguilles
Propriétés chimiques	
<b><u>Formule</u></b>	$C_{28}H_{34}O_{15}$ [Isomères]
<b><u>Masse molaire</u></b>	610,560 6 $\pm$ 0,029 3 g/mol C 55,08 %, H 5,61%, O 39,31 %,
Propriétés physiques	
<b><u>T° fusion</u></b>	258 à 262°C  (ramollit à 250°C)
<b><u>Solubilité</u></b>	0,02 g.l-1 dans l'eau. Soluble dans la <u>pyridine</u> . Peu soluble dans le <u>méthanol</u> et l' <u>acide acétique glacial</u> chaud. Insoluble dans l' <u>acétone</u> , le <u>benzène</u> , le <u>chloroforme</u>

#### a) Les sources naturelles du Hespéridine

On retrouve un taux élevé d'hespéridine dans les agrumes en général, mais plus particulièrement dans les oranges, les citrons et citrons verts, la clémentine, le pamplemousse, pour n'en citer que quelques-uns [20].

La peau et les parties membraneuses de ces fruits ont les concentrations les plus élevées en hespéridine. Par conséquent, le jus d'orange contenant la pulpe est plus riche en flavonoïdes que celui sans pulpe [19].



**Figure 1.17:** Les agrumes.

### **a) Propriétés des flavonoïdes et de l'hespéridine**

La recherche scientifique a montré que ce flavonoïde naturel est particulièrement efficace en prévention aussi bien qu'en traitement face à des marqueurs de risques cardiovasculaires, chez les animaux, mais jusqu'à ce jour, aucune étude n'ait encore été menée sur les humains en ce qui concerne les effets de l'hespéridine sur le cœur [22], [23].

Il a été rapporté que l'hespéridine possède des activités anti-inflammatoires, analgésiques [24], anti-hypertensives, neuroprotectrices [25] et diurétiques [26]. Une autre application thérapeutique potentielle de l'hespéridine est l'activité anticancéreuse par la suppression de la prolifération cellulaire [27-30]. L'hespéridine aide également à normaliser la glycémie en modifiant l'activité des enzymes régulatrices du glucose et en abaissant les taux de lipides sériques induits des rats diabétiques [31-32]. L'hespéridine est utilisée depuis longtemps en phytothérapie. L'innocuité de l'hespéridine a été confirmée par la FASEB (Federation of American Societies of Experimental Biology) à la demande de la FDA (Food and Drug Administration). Les résultats des études de toxicité ont montré l'absence d'effets secondaires indésirables après ingestion orale de l'hespéridine, supérieure à 2 g/kg [33].

Récemment, l'hespéridine a été testée avec succès comme médicament pour la prévention et le traitement du **COVID-19** [34-36].

#### **• Activité antioxydante de l'hespéridine**

L'hespéridine est un flavonoïde, c'est à dire un agent au fort pouvoir anti-oxydant et anti-inflammatoire. De manière générale, les antioxydants ont la faculté de protéger

l'organisme des éléments polluants et toxiques (les fameux radicaux libres), et de favoriser le bon fonctionnement des cellules en général. Les antioxydants participent à prévenir les cancers, le vieillissement cellulaire et cutané, protègent le cœur [20]. L'hespéridine protège les cellules contre le stress oxydatif à l'origine de certains cancers, comme le cancer du foie par exemple [37]. Antioxydants puissants comme nous l'avons déjà évoqué, ces flavonoïdes naturels capturent les radicaux libres à l'origine de la dégradation générale des cellules, dont notamment l'élastine qui se trouve au niveau de la membrane des vaisseaux sanguins.

- **Propriétés antiradicalaires**

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :  $\text{ArO-H} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{ArO}\cdot + \text{RH}$  (réaction de piégeage).

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

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

Une Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.

- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5.
- A titre d'exemple ; la quercétine répond à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité anti-radicalaire efficace et importante.

- **Activité vasculoprotectrice**

L'action positive de l'hespéridine sur la circulation a été étudiée et a montré que grâce à une supplémentation dosée à raison de 500 mg par jour, la circulation sanguine est améliorée de pas moins de 24,5% contre une diminution de 6% chez les personnes ayant reçu le placebo [38-39]. Mais d'autre part, les personnes sensibles ou allergiques aux agrumes ou ayant connu des antécédents avec l'utilisation médicale de l'acide ascorbique ou le fructose doivent se tenir à l'écart de l'hespéridine, qui peut causer des réactions allergiques pouvant aller jusqu'à l'anaphylaxie ou des réactions allergiques plus bénignes accompagnées de démangeaisons, urticaire ou gonflement du visage [20].

L'hespéridine renforce la perméabilité des capillaires, c'est à dire des vaisseaux sanguins, et augmente leur résistance.

Lorsque cette élastine est fragilisée, les risques de lésions vasculaires, d'hématomes, de varices etc... Sont plus élevés. Cette action vasculoprotectrice de l'hespéridine s'avère bien entendu un atout majeur pour le bon fonctionnement du cœur [20].

- **Des propriétés veinotoniques**

L'hespéridine a une action inhibitrice des qui sont à l'origine des problèmes de circulation sanguine, de jambes lourdes ou encore d'œdèmes. La dégradation des catécholamines par les enzymes COMT s'en voit réduite, ce qui a pour effet de faire remonter le taux de catécholamines dans l'organisme.

Parmi ces dernières, notons l'adrénaline et la dopamine, qui participent à la vasoconstriction des vaisseaux et à un bon retour veineux. Ainsi les œdèmes et les douleurs associées diminuent, grâce notamment à l'action anti inflammatoire locale de l'hespéridine, et le tonus veineux s'en voit nettement amélioré.

La combinaison des effets vasculo-protecteurs et veinotoniques de l'hespéridine lui confèrent une action anti-hémorroïdaire particulièrement efficace.

Mais cette substance est également prescrite pour lutter contre les bouffées de chaleur ou encore le syndrome prémenstruel. [20].

### **Exemple de spécialité**

DAFLON® 500 mg dont la posologie est mentionnée en dessus [21].

### **Utilisation et posologie recommandée pour l'HESP**

Dans la très grande majorité des cas un traitement à base d'hespéridine est recommandé à raison de 500 mg par jour, à prendre au moment des repas.

Utilisée à des fins veinotoniques, l'hespéridine peut être prise par voie orale mais aussi par voie locale, en crème, généralement sous forme de cure de 3 mois [20].

#### **• Propriétés antivirales**

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

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

#### **• Propriétés antiallergiques**

Les effets antiallergiques des flavonoïdes sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique, la phosphodiesterase et l'ATPase  $Ca^{2+}$  dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $Ca^{2+}$  dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules.

En inactivant cette enzyme, la quercétine par exemple a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglicat de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [9].

#### **• Les propriétés physico-chimiques**

Les flavonoïdes (polyphénols) sont des acides faibles (dû aux phénols)

- Les flavonoïdes sont des solides (cristallisés ou amorphes) de coloration jaune plus ou moins intense selon les catégories.

- Les flavonoïdes en solutions alcalines donnent une coloration jaune qui disparaît par l'ajout d'un acide.
- Ils possèdent un spectre UV caractéristique au type de noyau ce qui permet leur identification [9].

#### **1.4. Conclusion**

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



*Chapitre 2:*  
*Dégradation*  
*moléculaire.*

Dans ce chapitre nous parlerons des facteurs humains et environnementaux causant la dégradation moléculaire qui a suscité notre intérêt dans ce travail et les méthodes d'analyse permettant de mettre en évidence, voire quantifier cette dégradation.

### **2.1. Aspects fondamentaux**

#### **2.1.1. Spectre solaire**

Le soleil émet des particules, appelées photons, en très grandes quantités. C'est le rayonnement solaire. Ces flux de photons qu'on appelle également radiations ou rayons, voyagent dans l'espace à la vitesse de 300 000 km/s (c'est la vitesse de la lumière) et atteignent la surface de la terre à différentes longueurs d'ondes [1].

#### **2.1.2. Différents types de rayonnements**

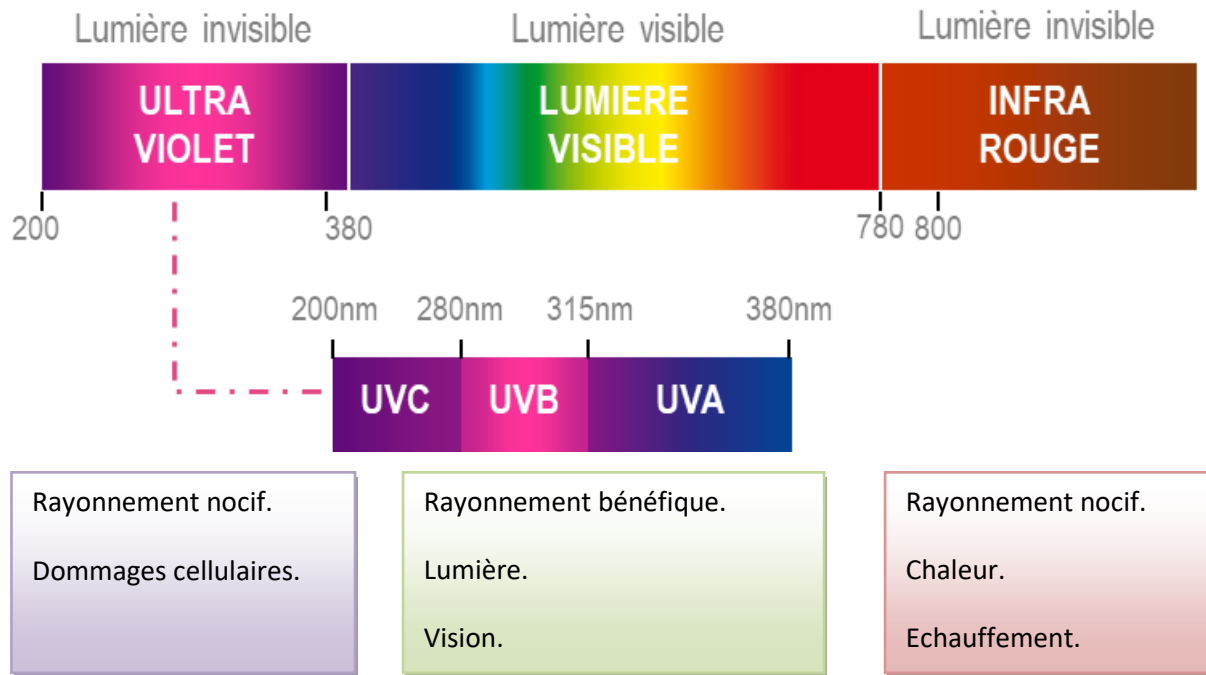
Les rayons de longueur d'ondes très courtes (les rayons x, gamma,), extrêmement dangereux, sont heureusement arrêtés dès les couches supérieures de l'atmosphère. Les rayons de longueur d'onde très longue (ondes radio) sont très faibles à la surface de terre.

Nous parviennent essentiellement sur terre:

Les UV (riches en énergie), qui ne sont pas visibles. Ils provoquent la dégradation des liants des peintures et de toute molécule organique. Ils ont également un effet bien connu sur notre épiderme qui est le coup de soleil.

La région du visible, comprise entre 400 et 800 nm. Elle est captée par l'œil humain et transmise au cerveau qui transforme cette énergie en de multiples sensations : les couleurs.

Les IR sont parfaitement perçus par notre sens du toucher et traduits en sensation de chaleur. En production intense, ils détruisent la matière organique comme la cuisson des aliments [1].



**Figure 2.1:** Le spectre solaire [UV-Visible et IR] et ses effets.

### 2.1.3. Les énergies et longueurs d'ondes de chaque rayonnement

L'énergie est calculée à partir de la relation de Planck-Einstein:

$$E = h\nu = hc/\lambda.$$

**E** = énergie.

**h** = constante de Planck.

**ν** = fréquence du rayonnement.

**c** = vitesse de la lumière.

**λ** = longueur d'onde.

En association avec l'oxygène de l'air et l'humidité atmosphérique, les UV vont commencer le travail de la destruction des macromolécules (liants) [1].

**Tableau 2.1:** Energies et longueur d'ondes des différents rayonnements solaires.

Rayonnement	Longueur d'onde	Energie (Kcal/mol)
Rayons X	0,1 à 400 Å	$2,85 \cdot 10^6$ à 712
UV (moyen- proche)	200 à 400 nm	71,2 à 142,4
Visible (violet-rouge)	400 à 760 nm	71,2 à 37,5
IR (proche)	0,76 à 2.5 nm	37,5 à 11,4
Microondes	0,05 à 100 cm	0,06 à $2,85 \cdot 10^{-6}$
Radio	1 à 1000 m	$2,85 \cdot 10^{-6}$ à $2,85 \cdot 10^{-9}$

## 2.2. La molécule organique

### 2.2.1. Définition

Les caractéristiques typiques des composés organiques sont : les liaisons carbone-carbone, les liaisons carbone-hydrogène, ainsi que les liaisons covalentes du carbone à l'oxygène et à l'azote. Une molécule organique peut bien être une biomolécule ou une molécule biologique [2].

### 2.2.2. Les énergies des liaisons dans un composé organique

**Tableau 2.2:** Energies des liaisons dans un composé organique.

Liaison chimique	Energie de liaison (kcal/mol) à 25 °C
C=C	145,8
O-H	110,6
C-H	98,7
C-C	83
C-O	87

On constate que se sont principalement les rayons UV, riches en énergie, qui sont responsables, malheureusement, de la dégradation des composés organiques comme les liants et les pigments organiques [1].

### 2.2.3. Stabilité des molécules organique

La stabilité de la matière organique apparaît comme un critère de qualité indispensable pour assurer l'innocuité d'un composé organique et sa valorisation ultérieure. La stabilité peut être décrite plus spécifiquement comme le degré de biodégradation au-delà duquel l'activité biologique est fortement ralentie et ne redémarre pas, même en présence de conditions favorables à cette activité [3].

Il-y-a plusieurs critères de stabilité moléculaire, il s'agit principalement d'indicateurs liés à la matière organique, la nature des atomes qui forment cette molécule, la nature des liaisons entre les atomes mais certains auteurs se sont également intéressés à la capacité d'échange cationique de la matière comme un critère plus important pour assurer la stabilité moléculaire.

### 2.3. Dégradation moléculaire

La plupart des composés organiques (et des matériaux correspondants) sont sensibles à leur environnement et sujets à la dégradation.

La dégradation d'une molécule est le changement, généralement non désiré, de ses propriétés physico-chimiques, sa structure influençant ainsi sa réactivité et son utilité. La dégradation d'une molécule est une réaction consistant à rompre une ou plusieurs liaisons à l'intérieur d'une molécule, ce qui brise souvent cette molécule en plusieurs molécules plus petites.

#### 2.3.1. Dégradation moléculaire par les effets des environnements

Des facteurs environnementaux plus ou moins agressifs attaque d'un produit chimique tel un acide concentré, dioxygène (oxydation), chaleur, radiation (photolyse), eau (hydrolyse), contrainte... etc. Ensemble, ces facteurs agissent souvent en synergie. La dégradation peut rendre le composé inutilisable [4].

### 2.3.2. Dégradation forcée d'une molécule

Une étude de dégradation forcée ou étude de stress, est un test de stabilité permettant de simuler l'évolution de comportement d'un produit chimique, pharmaceutique, d'un principe actif ou d'un composé phyto-naturel. L'objectif sera de mettre en évidence la stabilité de la molécule en question, une fois soumise à des facteurs de stress différents et d'observer les effets sur la pureté et la conformité de cette molécule.

Les études de dégradation forcée, ou études de stress sont d'un grand intérêt, elles consistent à faire subir à un produit donné des traitements agressifs par différents facteurs de stress (température, humidité, pH, lumière, etc.) plus drastiques que ceux employés lors des études en conditions de conservation long terme ou accélérées.

Les études de dégradation forcée sont réalisées pour répondre à plusieurs types d'objectifs intervenant aux différentes phases de développement [5].

-La mise au point et la validation de méthodes analytiques de dosage et de recherche d'impuretés (spécificité et caractère indicateur de stabilité),

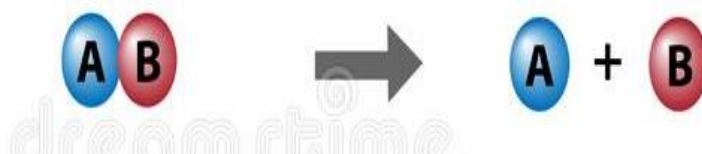
-La connaissance des voies de dégradation, conditions pour la conservation ou la manipulation future du produit.

-La formation spécifique d'impuretés de dégradation en vue de leur isolement et/ou de leur identification.

### 2.3.3. La réaction de dégradation

Une réaction de dégradation est une réaction chimique dans laquelle des liaisons sont rompues de manière à ce qu'une grosse molécule se décompose en entités plus petites. Son inverse est une réaction de synthèse (biosynthèse). Par exemple: le catabolisme est la réaction de destruction (décomposition, dégradation) du métabolisme.

Une réaction de dégradation est une réaction chimique avec un seul réactif qui forme deux ou plusieurs produits. La forme générale d'une réaction de décomposition est :



**Figure 2.2:** Réaction de dégradation.

Les réactions de dégradation sont courantes dans la vie quotidienne.

La plupart des réactions de dégradation-décomposition sont endothermiques. En d'autres termes, il faut plus d'énergie pour rompre les liaisons chimiques dans le réactif que ce qui est libéré lorsque de nouvelles liaisons chimiques se forment pour fabriquer les produits. Ces réactions absorbent l'énergie de leur environnement pour se poursuivre [6].

### 2.4. Analyse quantitative des principaux produits de dégradation

L'objectif de l'analyse quantitative est de déterminer quels sont les produits de dégradation majoritaires afin de pouvoir établir le mécanisme de dégradation mis en jeu.

Dans ce travail on utilise plusieurs méthodes d'analyse tel que:

- ✓ La chromatographie en phase liquide couplée au spectre de la masse (LC-MS).
- ✓ La spectrophotométrie.
- ✓ La spectroscopie IR.
- ✓ La spectroscopie RMN.

### 2.5. Conclusion

La dégradation moléculaire est un phénomène quotidien pour toute molécule présente dans cette vie soit avec une conséquence positive ou non donné d'autre composé moléculaire à partir ces fragmentations. La chimie nécessite ce branche spécifiquement pour suivre les matières consommées et sa qualité par plusieurs méthodes analytiques comme la chromatographie liquide à haute performance, spectrophotométrie, spectrométrie de masse la spectroscopie IR la spectroscopie RMN.

*Chapitre 3:*  
*Matériels et Méthodes.*






Dans ce chapitre nous allons présenter les modes opératoires, les réactifs et le matériel utilisés dans cette étude. Les méthodes analytiques mises en œuvre pour l'étude de la dégradation forcée de l'héspéridine dans des échantillons de jus étaient:






- le spectrophotomètre UV-Visible
- La chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectre du masse (HPLC-MS)
- Les programmes «GaussView 5.0, Gaussian 09W, HyperChem Professional» pour comparer les fragmentations obtenues par la spectrométrie de masse





### 3.1. Solvants, réactifs, matériels, et programmes

La conduite de ce travail a nécessité l'utilisation de différents matériels et produits d'importance variée et aussi des programmes.

**Tableau .3.1:** Matériels, solvants et réactifs et programmes.

Solvants et réactifs.		
<b>Hespéridine</b>		L'héspéridine est un produit phytonaturel isolé à partir de l'écorce d'orange [1].
<b>Jus d'orange naturel.</b>		Le jus d'orange naturel pressé à la main au laboratoire en utilisant des oranges fraîches.
<b>Jus d'orange commercial.</b>		Marque «Rouiba» 25 cl.

<p><b>Méthanol</b></p>		<p>Le méthanol est un solvant et une référence dans ce travail expérimental et été fourni par laboratoire de Chimie Appliquée.</p>
<p><b>Matériel</b></p>		
<p><b>spectrophotomètre UV-Visible: DR .6000/H ACH LANGE.</b></p>		<p>spectrophotomètre UV-Visible: pour le suivi cinétique de la dégradation de l'HESP soumis aux radiations. Lieu : Laboratoire pédagogique Département de génie procédés</p>
<p><b>Balance analytique.</b></p>		<p>Pour la pesée de la quantité d'HESP utilisée.</p>
<p><b>Micropipette</b></p>		<p>Micropipette: Mesurer le volume du solvant et solutions avec précision.</p>
<p><b>Lampe UV VL_6.L6W- 365nm Tube POWER: 12 W Made in France.</b></p>		<p>La lampe UV: utilisée pour irradier par des rayonnements ultraviolets les différentes solutions utilisées.</p>

Programme:		
<b>HyperChem Professional.</b>		Pour tracer les molécules et les fragments
<b>GaussView 5.0.</b>	<p>GaussView 5.0.9</p>  <p><b>GaussView 5.0</b>  <b>Web:</b> www.gaussian.com  <b>Email:</b> info@gaussian.com  <b>Voice:</b> 203-284-2501  <b>Fax:</b> 203-284-2521</p> <hr/>  <p><b>Gaussian, Inc.</b>          340 Quinnipiac St Bldg 40          Wallingford, CT 06492 USA</p> <p><small>Copyright (c) 2000-2008 Semichem, Inc.          Authors: Roy D. Dennington II, Todd A. Keith and John N. Millam</small></p>	Visualisation et lancement des calculs
<b>Gaussian 09W.</b>	 Gaussian 09W	Calculs, dans cette étude uniquement pour l'optimisation et détermination de l'énergie des fragments

### 3.2. Méthodes

#### 3.2.1. Analyse quantitative par spectrophotométrie de l'HESP dans solution pure de HESP et le jus naturel et le jus commerciale et l'identification des analyse

Le but de cette analyse est de déterminer la concentration et suivis la dégradation de ce composé organique (HESP) présent dans les différentes solutions concernées par cette étude sous l'effets de rayonnement solaire et UV dans la structure moléculaire, ainsi que quelques caractéristiques sont respectivement représentées "la **figure 3.2** et le **tableau 3.2** "est conclure dans la deuxième partie expérimentale où l'étude a-t-elle été menée caractéristique à partir un calcul avec les programmes et compressassions avec d'autre résultat du fragmentation du spectre de la masse .

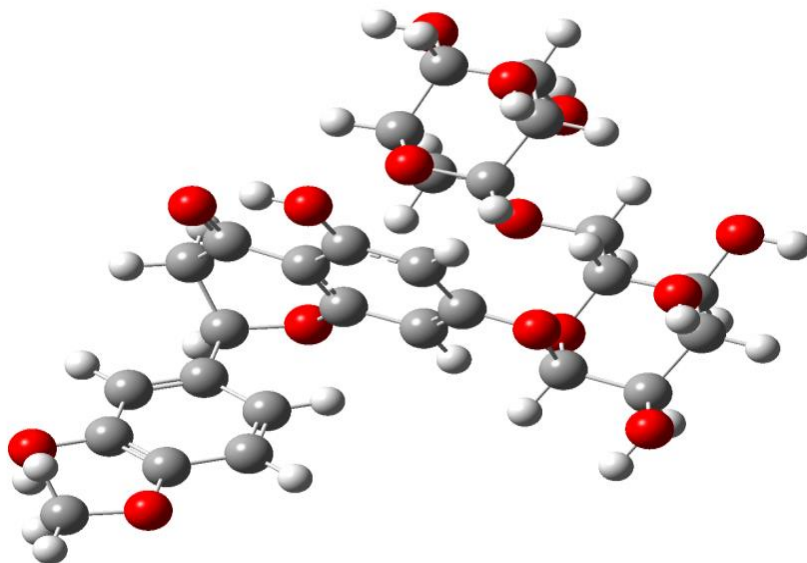


Figure 3.1: Structure du HESP.

Tableau 3.2: Quelques caractéristiques du HESP.

Formule brute.	Nom chimique.	Masse Molaire (g/mol).	Solubilité.	Aspect
$C_{28}H_{34}O_{15}$ .	(2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 6-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside.	610,56.	Soluble dans le méthanol.	Poudre de couleur beige

### 3.3. Suivi cinétique de la dégradation de l'HESP

#### 3.3.1. Préparations des échantillons

##### a) Solution d' HESP pur

La solution mère d'HESP a été préparée en introduisant une quantité de 30 mg d'HESP dans un erlenmeyer auquel 30 ml de méthanol ont été rajoutés, la solution a

été ensuite bien agitée pour homogénéiser. La concentration de la solution mère est de  $1,64 \times 10^{-3}$  mol/l.

**b) Solution de jus d'orange pressée à la main**

Nous avons pris deux oranges, les avons pressées manuellement et nous avons rajouté une quantité d'écorces d'orange émincées pour augmenter la concentration d'héspéridine dans l'extrait. Nous avons laissé macérer pendant 2 heures puis l'extrait est filtré dans un erlenmeyer.

**c) Solution de jus commercial**

Un volume du jus Rouiba (commercial) est transvasé dans un erlenmeyer, du méthanol a été rajouté pour diluer la solution.

**3.3.2. Méthode de préparation et injection des standards**

Le but de cette étape est de construire la courbe d'étalonnage du composé pur (Standard) qu'on veut doser ultérieurement, dans les différents échantillons.

La solution mère de concentration  $1,64 \times 10^{-3}$  a été sujette à des dilutions, effectuées selon la nécessité. Trois solutions filles de concentrations  $2 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-4}$  ont été obtenues et ont été injectées en triplicata (mesurer l'absorbance du chaque concentration trois fois) dans le Spectrophotomètre UV-Visible.

Le courbe étalon est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2007) qui donne la variation de l'absorbance ( $A_{moy}$ ) en fonction de la concentration. La teneur en HESP dans différents échantillons a été calculée en utilisant l'équation de régression de la meilleure ligne d'ajustement.

**3.3.3. Méthode de préparation et injection des échantillons**

Comme il est illustré par **la Figure .3.2** et **la Figure.3.3** , un volume précis de solution d'HESP a été exposé aux rayonnements solaires directs et aux rayonnements UV issus d'une lampe utilisée à cet effet.

Chaque 30 min, on relève un volume de 50  $\mu$ l de solution auquel on rajoute un volume de 1000  $\mu$ l de méthanol, et qu'on va analyser par spectrophotométrie alors que le reste de la solution est laissé sous l'effet du rayonnements solaire et UV.

Le spectrophotomètre est réglé à 330 nm pour la première mesure et à 228 nm pour la deuxième. La cuve contenant du méthanol (le blanc) est placée en premier et avant chaque

mesure, ensuite on place la deuxième cuve qui contient notre échantillon, l'absorbance est lue à partir d'un écran.



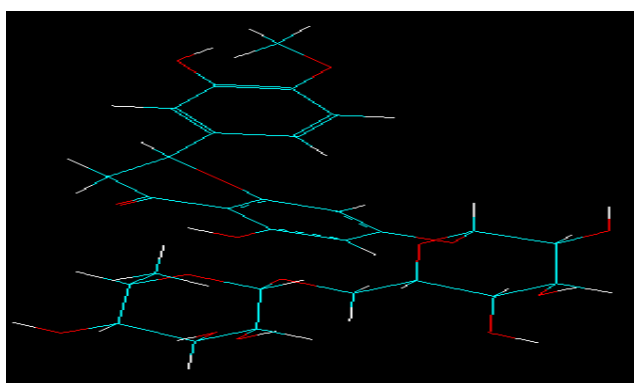
**Figure 3.2:** échantillon exposé à l'effet du rayonnement UV.



**Figure 3.3:** les échantillons exposés à l'effet du rayonnement solaire.

### 3.4. Étude par modélisation moléculaire

La structure de l' HESP est tracée en utilisant le programme HyperChem, l'image est enregistré dans un fichier de type «MDL MOL (\*.MOL)».



**Figure 3.4:** Structure de l' HESP tracée par HyperChem Professional.

Ce fichier est ensuite ouvert par GaussView 5.0 qui nous permet de lancer les calculs. Les paramètres suivants ont été choisis:

**Tableau .3.3:** Paramètres de calcul

Job Type.	Optimization.	
Method.	Method.	Ground state/DFT/Default spin/B3LYP.
	Basis.	6-31G.
	Charge.	0 (pour l'Hespéridine neuter)

L'enregistrement du fichier et le lancement du calcul se fait par Gauss view qui envoie une commande au Gaussian 09W pour qu'il commence le calcul.

La même procédure est appliquée aux calculs des fragments tout en changeant la charge selon le cas.

### 3.4.1. La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire a pour but de prévoir la structure et la réactivité des molécules. Les méthodes de la modélisation moléculaire comprennent: les méthodes quantiques, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire [2].

Dans ce travail, les calculs de modélisation (Hespéridine et fragments...) ont été effectués avec le logiciel GAUSSIAN 09.

Les structures obtenues ont été optimisées par la méthode DFT avec la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31G dans le vide. B3LYP fournit des résultats précis de la structure et des propriétés thermodynamiques des composés phénoliques. Les calculs incluent l'optimisation de la géométrie de l' HESP et ses fragments tout en déterminant l'énergie de la forme optimisée qui nous donnera une idée sur sa stabilité.

### 3.4.2. La méthode de calcul

La Théorie de la fonctionnelle de la densité DFT (Density Functional Theory) est une reformulation du problème quantique à N corps en un problème monocorps avec pour paramètre la densité électronique. Elle a été développée par Hohenberg, Kohn et Sham pour le calcul de la structure électronique de la matière dans le cadre de la théorie quantique non relativiste [3-4]. L'idée centrale de la DFT est que la seule densité électronique de l'état

fondamental du système détermine entièrement les valeurs moyennes des observables comme l'énergie, par exemple [5-6]. Aujourd'hui, la DFT constitue l'une des méthodes les plus utilisées pour les calculs quantiques de structures électroniques en chimie quantique et en physique de la matière condensée. La DFT a été étendue au domaine de la mécanique quantique dépendante du temps et au domaine relativiste [7].

### **3.4.3. Logiciel utilisé**

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

### **3.4.3. Gaussian:**

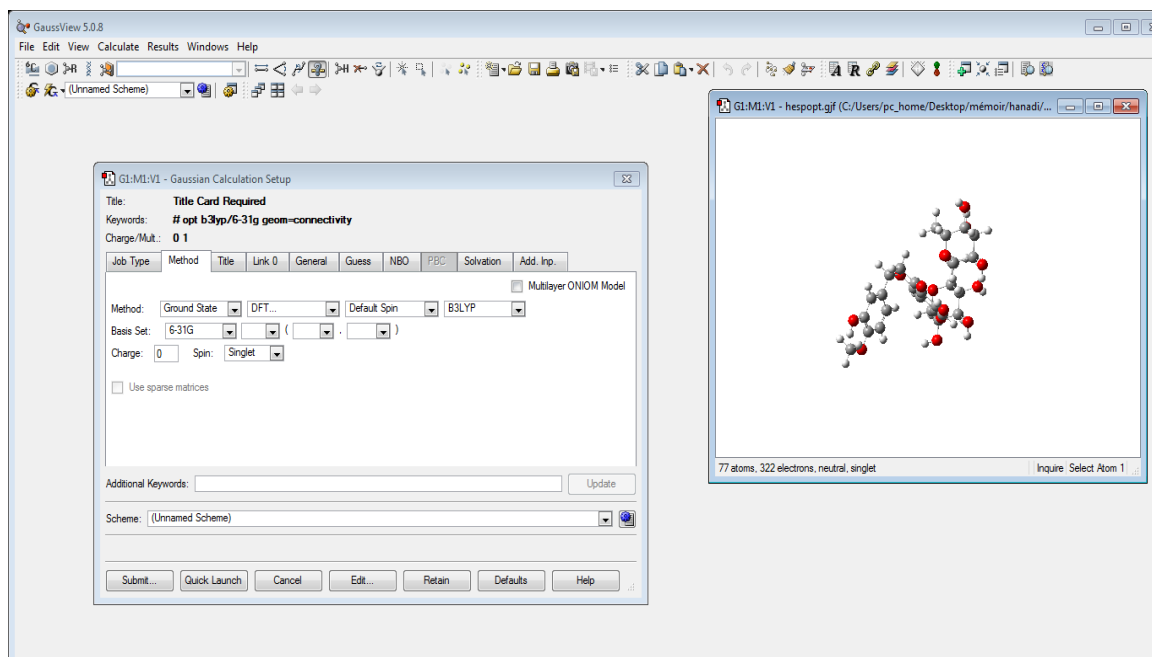
D'actualité dans le monde scientifique, le programme GAUSSIAN a permis de faire entrer la chimie quantique dans les laboratoires de chimie, de biochimie, de biotechnologie, de physique et de pharmacologie. De son histoire, ce logiciel est basé sur le travail de John Pople qui consistait à développer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

Ce programme a révolutionné les méthodes de travail: il a permis aux chercheurs de prévoir et de visualiser par le calcul et avec des images virtuelles l'évolution d'une réaction chimique sans passer par l'expérience [8].

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

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



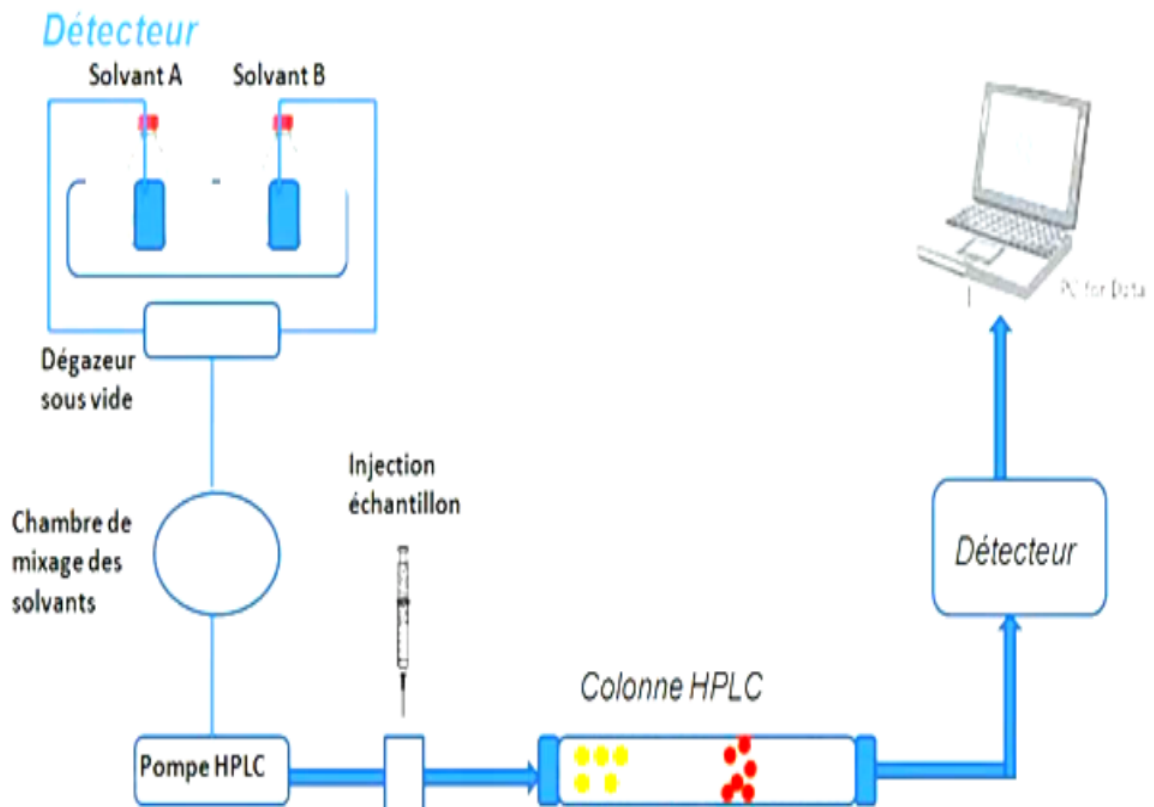


**Figure.3.5:** Menu graphique du logiciel GaussianView 6.0.16.

### 3.5. Etude par HPLC couplée à la spectrométrie de masse de la dégradation de l'HESP

#### 3.5.1. Mode opératoire

Pour l'HESP pure, on procède de la même manière que pour l'UV, on prépare une solution mère, des solutions filles et on injecte en HPLC-UV-visible pour tracer la courbe d'étalonnage qui donne la concentration en fonction des aires de pics.



**Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC**

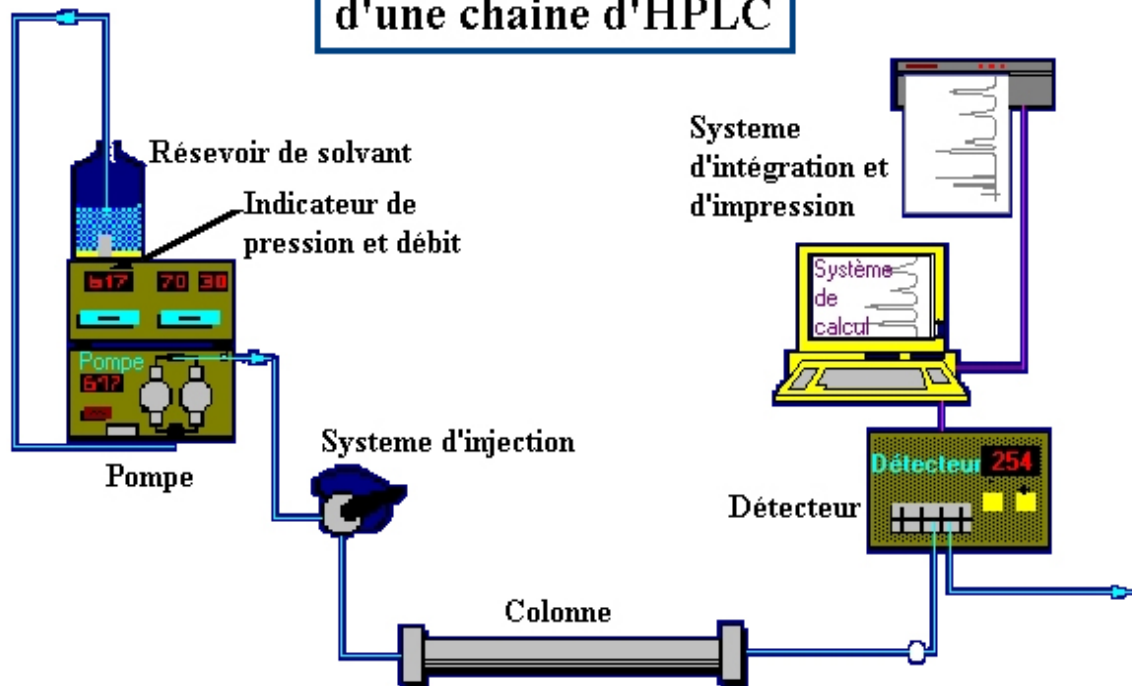


Figure .3.6: Principe de fonctionné de l'appareille d' HPLC.

### **3.5.2. Préparations des échantillons**

Un échantillon est constitué d'une matrice et des composés cibles, appelés analytes. La préparation d'échantillons est liée au niveau de concentration des analytes et à la matrice dans laquelle se trouvent les composés.

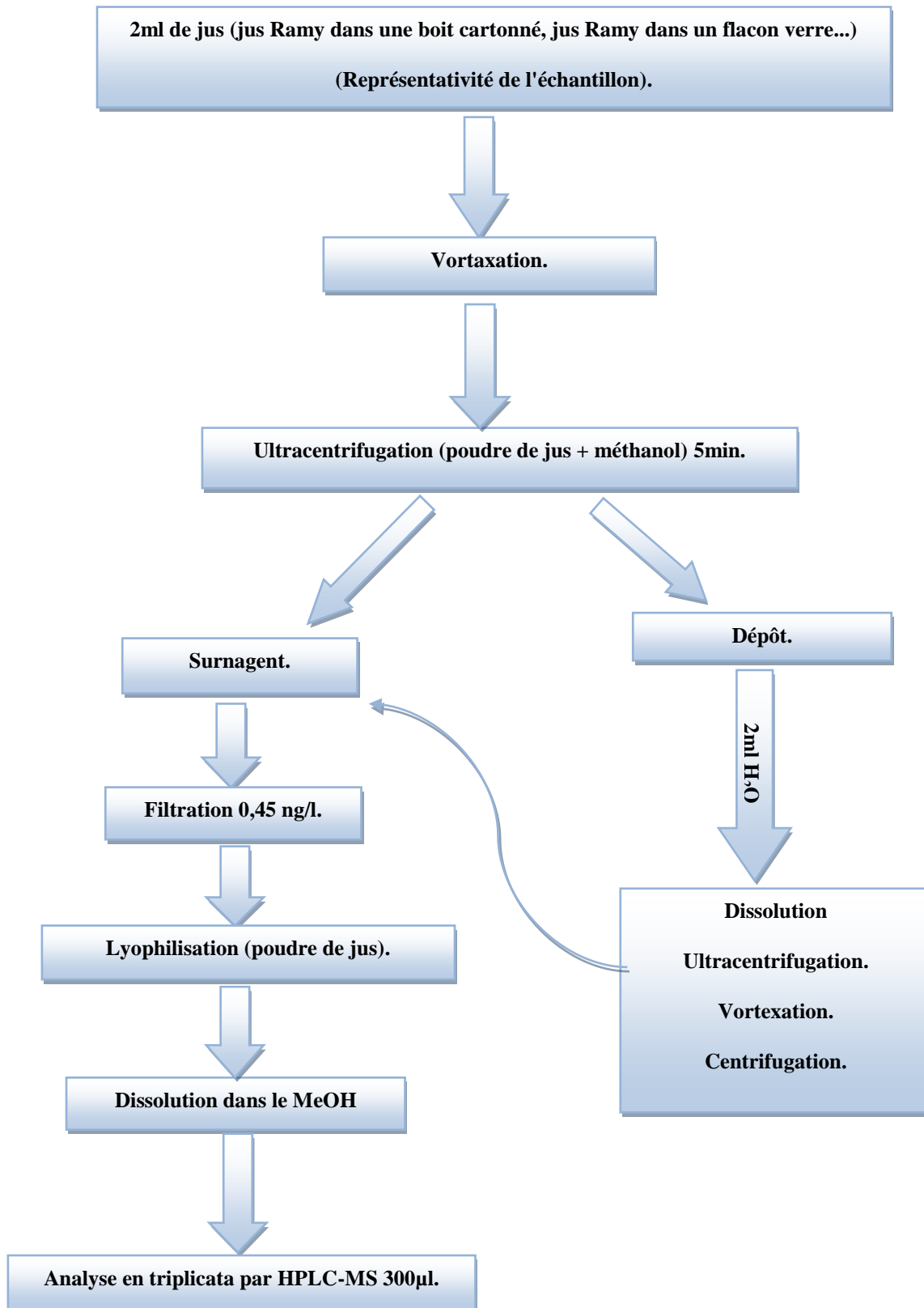
La préparation des extraits doit être compatible avec les techniques de séparation et de détection choisies.

#### **3.5.2.1. Echantillon de jus à injecter en HPLC**

Nous utilisons 2ml de jus commerciaux à base naturelle (jus Ramy en brique, jus Ramy en flacon en verre...), qu'on passe aux ultrasons pour dissoudre les molécules déposées puis on soumet le jus un vortex pendant 20 secondes puis une ultracentrifugation pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré alors que le dépôt est repris dans le méthanol et l'opération est répétée pour récupérer le maximum de métabolites. L'ensemble des surnageant est regroupé, c'est ce qui constitue notre échantillon. Qu'on doit filtrer pour éliminer les particules insolubles. Le filtrat obtenu est ensuite séché à l'aide d'un lyophilisateur qui va chasser l'eau et livrer à la fin, une poudre sèche mais qui devrait contenir tous les constituants du jus sauf l'eau. Le but de la lyophilisation est la possibilité de gérer la concentration massique et pouvoir quantifier les molécules en terme de (masse de principe actif/ masse d'échantillon de jus lyophilisé) et après on fait la conversion, car l'on sait cette masse lyophilisée a été obtenu à partir de quel volume réel de jus.

#### **3.5.2.2. Injection en HPLC**

La poudre lyophilisée est dissoute dans un volume de 2ml de méthanol, elle est ensuite filtrée 300µl sont injectés en HPLC



**Figure.3.7:** Protocole de préparation des échantillons de jus commerciaux (Roiuba) et naturel (pressé à la main) pour l'injection en HPLC.

### **3.5.2.3. Analyse en HPLC**

Pour cette analyse, le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min. La détection du composé étudié a été réalisée à 230 nm. La séparation a été réalisée en mode gradient et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 11,8 minutes.

### **3.5.2.4. Phase mobile**

Dans cette étude les solvants de la phase mobile utilisée dans le dosage du jus est:

**Solvant A:**eau+TFA

**Solvant B:** Acétonitrile

### **3.5.2.5. Phase stationnaire**

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée au C18. Ce matériau est contenu dans une colonne analytique 4,6 x 250 mm, 5-Micron (Agilent, USA).

### **3.5.2.6. Injection**

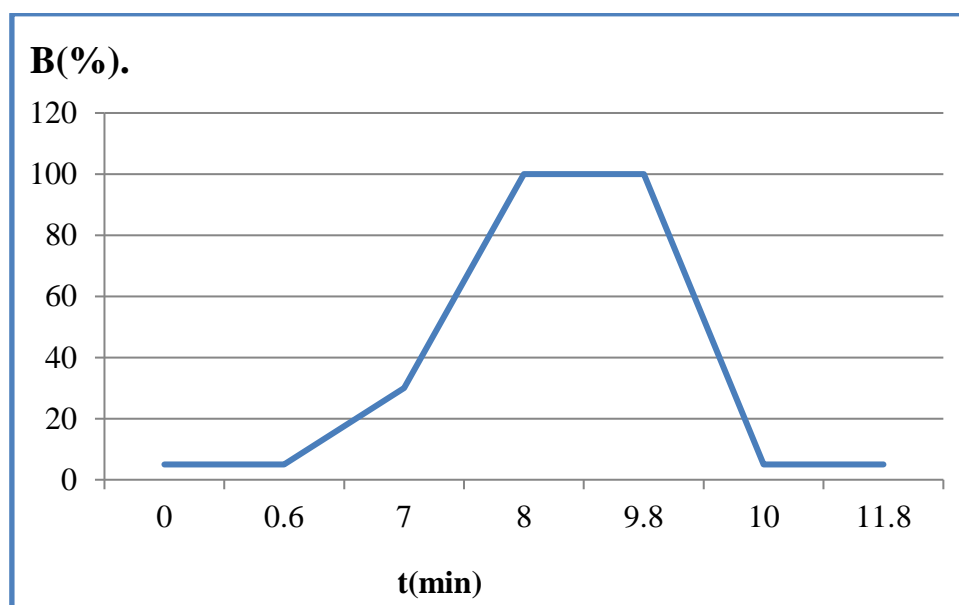
L'appareil HPLC-MS analytique est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 300µl. L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives.

### **3.5.2.7. Gradient**

Après plusieurs essais de séparation pour les différents échantillons de jus, nous avons constaté qu'une bonne séparation est obtenue pour un gradient établi sur 11,8 min avec un pourcentage initial de 95% du solvant A(Tableau).

**Tableau.3.4:** Gradient HPLC pour l'analyse d'HESP.

Temps (min).	Composition volumique du solvant A(%).	Composition volumique du solvant B(%).
0	95	5
0,6	95	5
7	70	30
8	0	100
9,8	0	100
10	95	5
11,8	95	5



**Figure.3.8:** Gradient HPLC pour l'analyse d'HESP.

### 3.5.2.8. Détection

Nous avons utilisé l'HPLC couplé à un spectromètre de masse (Agilent technologies, USA). Toute molécule qui sort de la colonne, passe par le détecteur où elle sera fragmenté et pour chaque pic on a un spectre de masse et si l'on veut, chaque pic sera encore fragmenté pour obtenir un spectre MS-MS, on se contente dans la plupart des cas de ré-fragmenter les pics majoritaires. En somme nous aurons un chromatogramme HPLC, en cliquant sur un pic déterminé on a son spectre UV-visible et son spectre de masse et des fois son MS-MS.

Le mode utilisé est négatif, c'est-à-dire la masse de chaque fragment sera [M-H].

### **3.5.2.9. Ionisation à l'électrospray**

Le mode d'ionisation utilisé est l'électrospray. Il s'agit d'une technique qui permet de désolvater et d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique.

### **3.5.2.10. Analyseur**

L'analyseur utilisé est à piégeage ionique ou trappe ionique. La technique consiste à produire les ions directement dans la trappe par impact électronique. Il n'y a pas de source séparée. Les ions sont produits par un flux d'électrons de courte durée et piégés dans la trappe au moyen de radiofréquences uniquement. Les ions sont expulsés de la trappe successivement d'après leurs masses croissantes. Cet analyseur est constitué d'une électrode hyperbolique ayant la forme d'un anneau (« ring electrode »), encadrée de deux autres électrodes hyperboliques, les calottes supérieure et inférieure (« cap electrodes »). Ces dernières sont électriquement reliées.

## **3.6. Conclusion**

Après le détail du matériel et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que la méthode d'analyse choisie pour notre étude est une méthode simple, efficace et adéquate. En fait l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier et de doser avec une grande précision l'HESP contenu dans l'orange et le spectrophotomètre UV-Visible a permis en mesurant l'absorbance d'évaluer son concentration (dégradation moléculaire). En revanche la modélisation moléculaire qui joue un rôle complémentaire de la chimie expérimentale a permis de représenter graphiquement la géométrie et la configuration de l'Hespéridine (HESP) et étudier la stabilité des différents fragments en déterminant leurs énergies.

***Chapitre 4:***  
***Résultats et discussion.***



## 4.1. Étude spectrophotométrie

Dans ce partie de chapitre, nous présentons et discutons les résultats du suivi spectrophotométrique, à deux longueurs d'ondes ( $\lambda=228\text{ nm}$  et  $\lambda=330$ ) de la dégradation de l'héspéridine (HESP) et de deux échantillons de jus d'orange, l'un naturel et l'autre commercial, soumis à l'influence de rayonnements solaire et UV, à des intervalles de temps différents. Nous commençons d'abord par les caractéristiques de la molécule étudiée.

### 4.1.1. Caractéristiques de l'HESP

#### 4.1.1.1. Analyse qualitative par HPLC

L'HESP utilisée dans cette étude a été analysée par HPLC, et comme le montre la Figure 4.1, un seul pic très majoritaire apparaît à 26.53 minutes avec des impuretés infimes, ce qui permet de confirmer la haute pureté de ce composé. On a utilisé un gradient binaire Acétonitrile/ eau pour cette analyse, selon la composition de la phase mobile indiquée dans la Figure 3.9. La phase stationnaire utilisée était de la silice greffée au C18, on est donc en mode inverse.

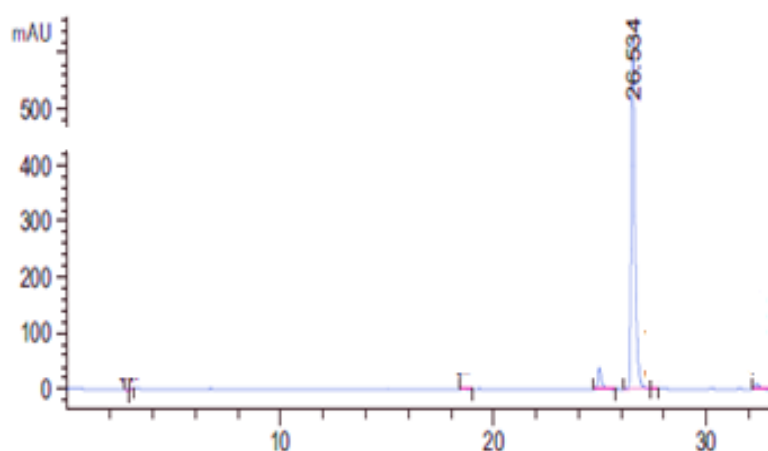


Figure 4.1: Chromatogramme HPLC de l'HESP (pic à 26.53 min).

#### 4.1.1.2. Spectre infrarouge de l'HESP:

Une analyse spectrale est nécessaire pour confirmer la structure de la molécule, ci-dessous, nous présentons le spectre infrarouge de l'HESP (Figure 4.2) et son interprétation est présentée dans le Tableau 4.1.

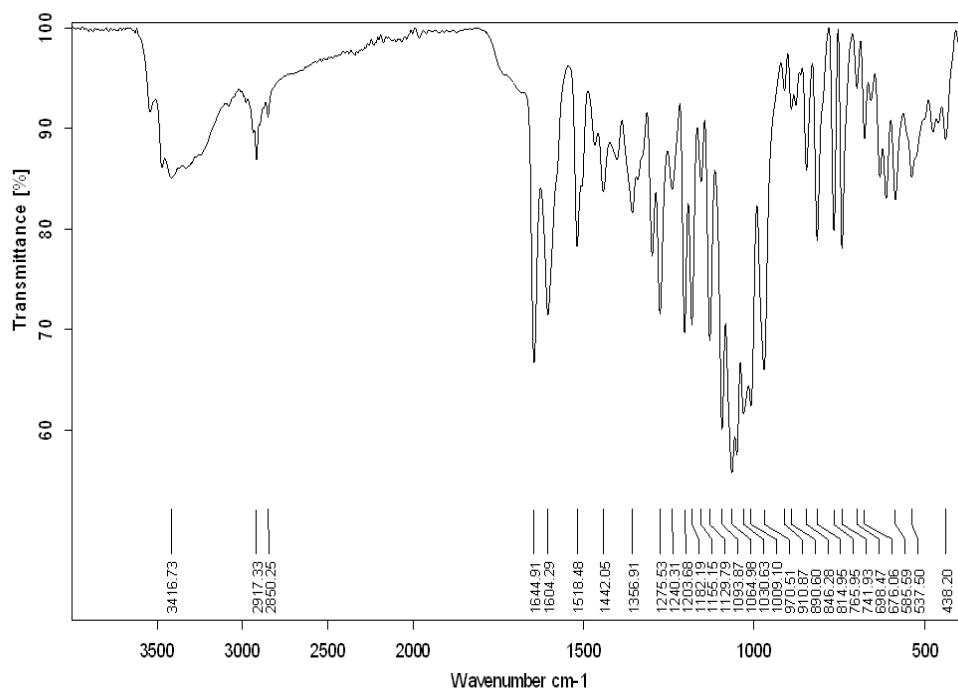


Figure 4.2: Spectre infrarouge de l’HESP à l’état solide.

Tableau 4.1: Attribution des principales bandes du spectre infrarouge de l’HESP.

Bandes IR	(3545-3400)	2917 2850	1644	1604 1518	1356	1182
Attribution	O-H	C-H	C=O	C=C Aromatique	C-O-C	C-C

#### 4.1.1.3. Spectre de RMN du proton de l’HESP:

L’HESP a été dissoute dans le DMSO-D6 (deuté) et analysé par un spectrographe RMN (Bruker, 400 ), au centre de recherche en analyses physico-chimiques (Bousmail, Alger). Le spectre obtenu est présenté en Figure 4.3 ci-dessous et son interprétation est présentée dans le Tableau 4.2. Il faut noter que la numérotation des protons adaptée dans l’interprétation est propre aux polyphénols.

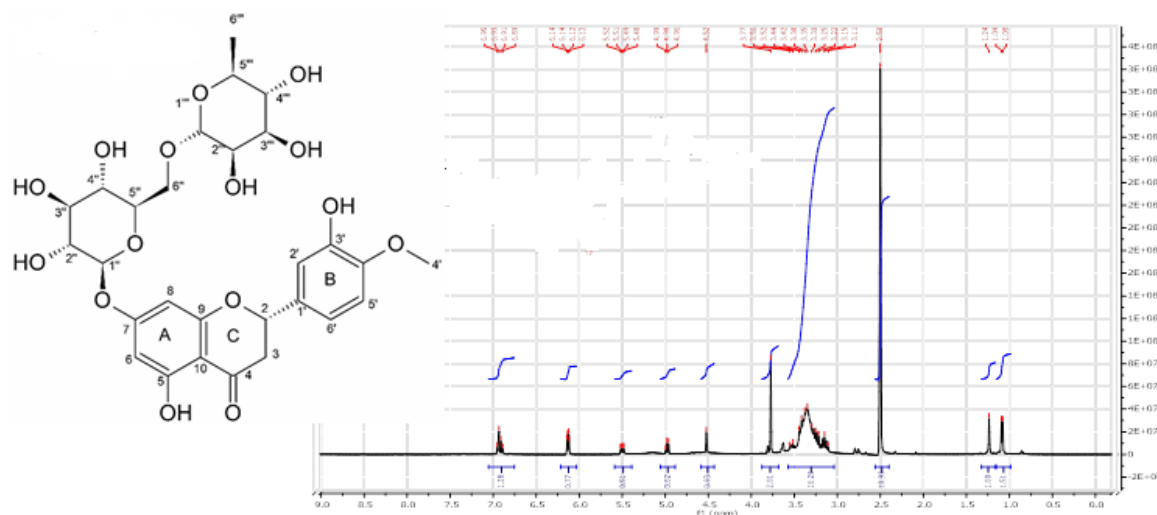


Figure.4.3: Spectre de RMN du proton de l'HESP dans le DMSO.

Tableau 4.2: Interprétation du spectre RMN de l'HESP.

Déplacement chimique en ppm	1,08 ; 1,09 ; 1,24	3,11- 3,54	3,77	4,52	4,98	5,5	6,124	6,148	6,91 (3H)
Attribution	6'''-H, CH3	4''-H, 4'''-H, 2''-H, 3''-H, 3- H, 5''-H', 3'''-H, 6''-H, 5''-H, 2'''-H, 6 ''-H	4'-H, OCH3	1'''-H	1''-H	2-H	6-H	8-H	6'-H 5'-H, 2'-H

## 4.1.2. Etude spectrophotométrique de la dégradation de l'HESP

### 4.1.2.1. Analyse par UV-Visible d'une solution d' HESP pur

La Figure 4.3 ci-dessous représente le spectre UV-visible d'une solution de l'HESP dans le méthanol à 19,6°C. On remarque la présence de deux bandes. La première est large et intense à [220nm-300nm] alors que la deuxième bande, plus étroite [330 nm-360 nm] est plus caractéristique des groupements phénoliques (l'HESP). Ce spectre est en concordance avec les résultats expérimentaux publiés [1].

En observant la formule chimique de l'HESP, on peut conclure que ces bandes pourraient être dues à des transitions électroniques du type: Transition  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  (C-C)  $n \rightarrow \sigma^*$  (O-CH<sub>3</sub>);  $n \rightarrow \pi^*$  (O=C) et  $\pi \rightarrow \pi^*$  (C=C).

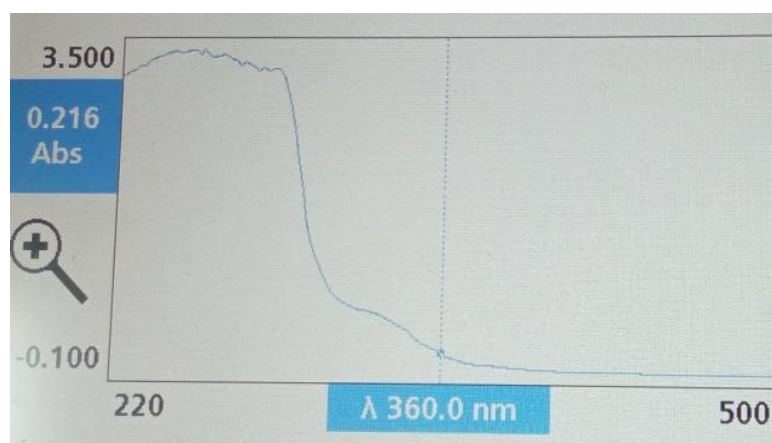


Figure 4.4. Spectre UV-visible de l'HESP dans le MeOH.

### 4.1.2.2. Droite d'étalonnage de l'HESP

Une solution mère de l'HESP à une concentration (C) de  $1,6 \times 10^{-3}$  mol/l a été préparée et des dilutions ont été faites pour obtenir trois solutions filles A, B et C, de concentrations respectives,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$  et  $6 \times 10^{-4}$  mol /l.

Les solutions ainsi préparées ont été analysées par un spectromètre UV-Visible (DR600, Génie des procédés). Leurs absorbances à  $\lambda=330$  nm sont présentées au Tableau 4.3 ci-dessous. Les analyses ont été faites en triplicata et l'absorbance moyenne ( $A_{moy}$ ) a été calculée. La courbe d'étalonnage  $A_{moy}=f(c)$  a ensuite été tracée.

Tableau 4.3: Données d'étalonnage de l'HESP pure à  $\lambda = 330$  nm.

Solution	Mère	A	B	C
Concentration mol/l	$1,64 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$
Absorbance	0,77	0,01	0,09	0,19
	0,77	0,01	0,09	0,19
	0,78	0,01	0,09	0,19
$A_{\text{moy}}$	0,77	0,01	0,09	0,19

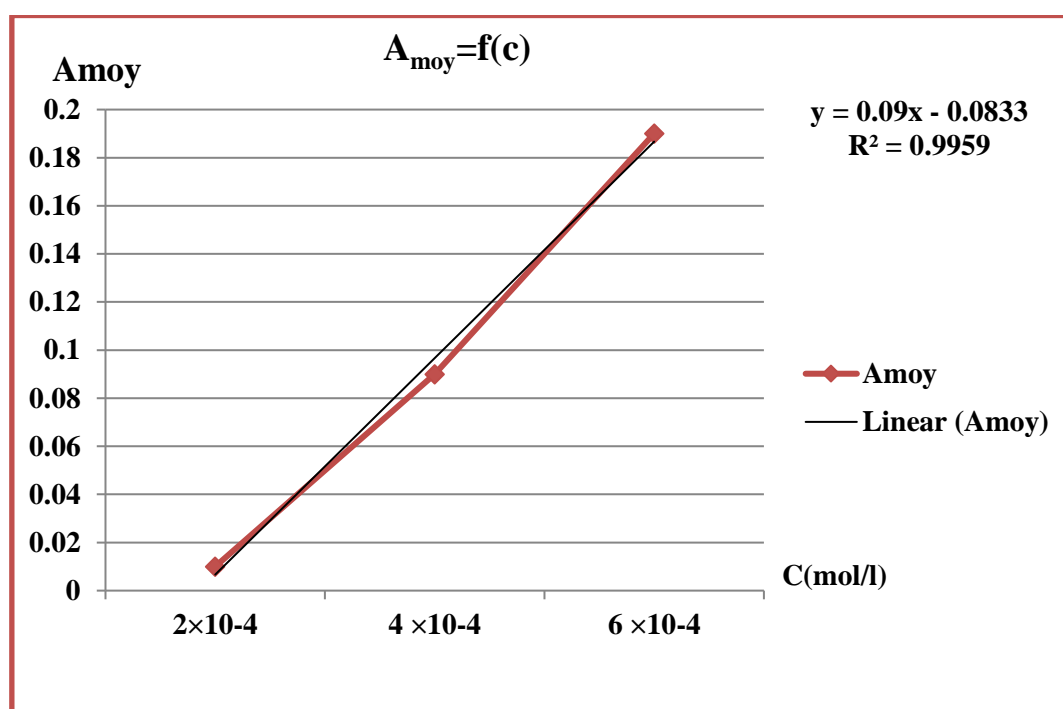


Figure 4.5: Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'HESP.

#### 4.1.2.3 Validation de la méthode d'analyse

##### a) Linéarité de la courbe d'étalonnage

Cette courbe est établie en utilisant le méthanol comme référence et les résultats sont exprimés en  $\text{mol.l}^{-1}$ . Un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,99$  ( $\approx 1$ ) a été obtenu (Figure 4.5). La courbe d'étalonnage tracée montre qu'il y a une relation fonctionnelle linéaire entre X (c) et Y ( $A_{\text{moy}}$ ).

**b) L'écart-type et la variance**

L'écart-type  $\sigma$  est la mesure de la dispersion d'une série de valeurs autour de leur moyenne.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{(y_1 - \bar{y})^2 + (y_2 - \bar{y})^2 + \dots + (y_n - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Avec n nombre d'échantillon pour chaque concentration injectée ici, n=3 et  $\bar{y} \equiv A_{moy}$ .

Le carré de cet écart-type est appelé **variance**.

**Var (y<sub>j</sub>)=σ<sup>2</sup>.**

**c) L'erreur résiduelle**

L'erreur résiduelle ou aussi appelée résidu e<sub>j</sub>, est déterminée par la formule:

$$e_j = y_j - \hat{y}$$

Le modèle est largement acceptable car e<sub>i</sub> est très faible, plus e<sub>i</sub> est proche de 0, plus la méthode d'analyse est adéquate.

**d) Limite de Détection (LD) et de quantification(LQ)**

**LD:** Correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Autrement dit, il s'agit de la limite en dessous de laquelle l'analyte est considéré comme « non détecté ». En d'autres termes, c'est la plus petite concentration fournissant un signal significativement différent du blanc

**LQ:** C'est le niveau de mesure auquel la précision de la mesure sera considérée comme satisfaisante pour une détermination quantitative; en d'autre termes, c'est la concentration qui peut être déterminée (détectée et quantifiée) avec un coefficient de variation et une justesse acceptable [2].



**Figure 4.6:** Domaine de détection et de quantification du modèle

La LD et la LQ sont déterminées comme suit:

$$LD = 3 * S_{blanc} / a$$

$$LQ = 10 * S_{blanc} / a$$

*S<sub>blanc</sub>*: Correspond à l'écart-type estimé de la réponse pour un blanc (solvant, référence ou zéro)

**a**: correspond à la pente de la droite d'étalonnage.

Les résultats des paramètres d'analyse sont présentés en Tableau.4.4.ci-dessous.

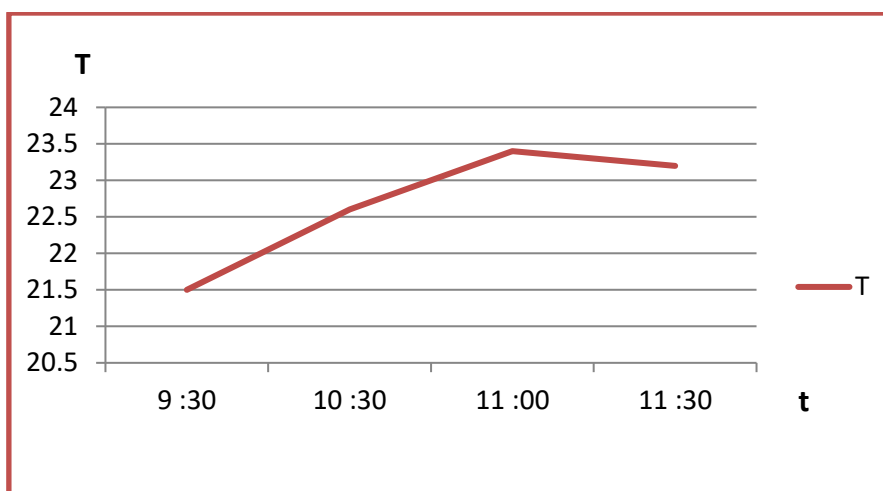
**Tableau4.4:** Quelques paramètres statistiques de la méthode d'analyse.

<i>Solution</i>	<i>Mère</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Concentration</b>	$1,64 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$
<b>Absorbance</b>	0,77	0,01	0,09	0,19
	0,77	0,01	0,09	0,19
	0,78	0,01	0,09	0,19
<b>A<sub>moy</sub></b>	0,77	0,01	0,09	0,19
<b><math>\sigma</math></b>	$7,07 \times 10^{-3}$	0	0	0
<b><math>\sigma^2</math></b>	$5 \times 10^{-5}$	0	0	0
<b><math>e_i</math></b>		0,1	0,18	0,28
<b>LD (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	0,09			
<b>LQ (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	0,27			

Le modèle est largement acceptable car  $e_i$  est très faible, plus  $e_i$  est proche de 0, plus la méthode d'analyse est adéquate. Une variance de zéro signifie que la moyenne des carrés des écarts par rapport à la moyenne est nulle et donc que la variable aléatoire est une constante. Par ailleurs, d'aussi faibles valeurs que 0.09  $\mu\text{mol/l}$  et 0.27  $\mu\text{mol/l}$  sont respectivement, détectable et quantifiable.

#### 4.1.2.4. Effet du rayonnement solaire sur une solution d'HESP

La solution d'HESP de concentration  $c=1,639.10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$  a été étudiée en mois de Mai. La température à l'extérieur du laboratoire est variable en raison de la météo et fluctuait dans l'intervalle présenté en Figure 4.7.



**Figure 4.7:** Courbe de changement de la température au cours du temps.

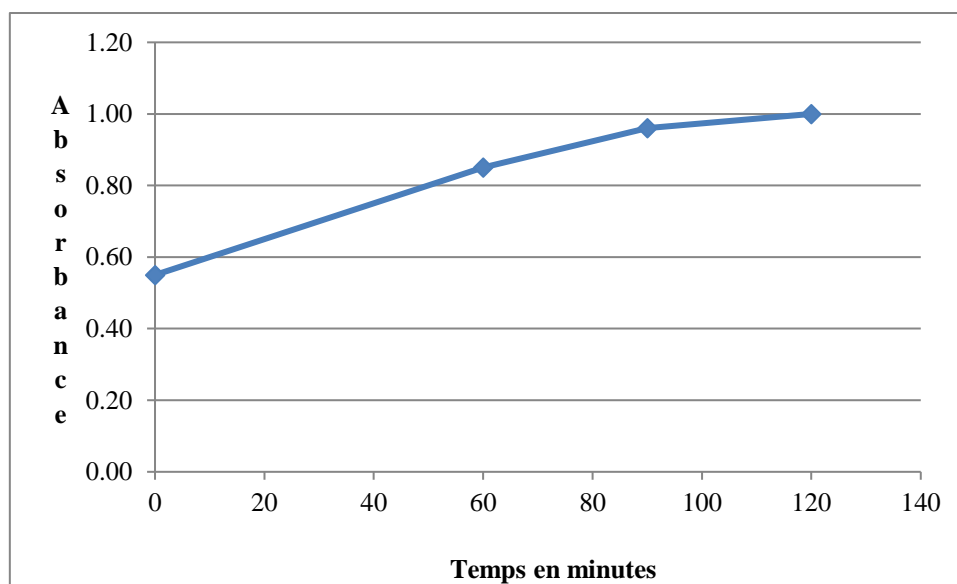
Les résultats d'exposition de la solution d'HESP au soleil, à l'extérieur du laboratoire sont présentés en Tableau 4.5 et Figure 4.8 pour la longueur d'onde de  $\lambda=330 \text{ nm}$  et Tableau 4.6 et Figure 4.9 pour la longueur d'onde de  $228 \text{ nm}$ .

$\lambda=330 \text{ nm}$

**Tableau 4.5:** Variation de l'absorbance de l'HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire, à  $\lambda=330$ .

temps (min)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	0,53	0,56	0,56	0,55
60	0,84	0,86	0,85	0,85
90	0,95	0,97	0,96	0,96
120	0,99	1,02	1,00	1,00





**Figure 4.8:** Variation de l'absorbance d'une solution de l'HESP sous l'effet de rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm.

La courbe de la Figure 4.8 représente l'absorbance de l'HESP pure en fonction du temps, sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm. On remarque que lors de la première heure d'exposition de la solution au rayonnement, on observe une augmentation de l'absorbance de 0,3 donc plus rapide que pendant la deuxième heure où on remarque une augmentation plus lente.

Cette augmentation de l'absorbance de l'HESP montre sa sensibilité au rayonnement solaire et la formation d'un chromophore qui absorbe plus intensément les rayonnements UV-Visible à cette longueur d'onde. En effet, selon la loi de Beer-Lambert, si on ne change pas la concentration de l'analyte, ni le trajet optique et qu'on observe un changement de l'absorbance, ceci indique forcément un changement du coefficient d'absorptivité molaire qui est une propriété intrinsèque à molécule à analyser, d'où l'HESP a été sujette à une quelconque modification de la structure qui a fait que son absorbance change.

#### $\lambda=228$ nm

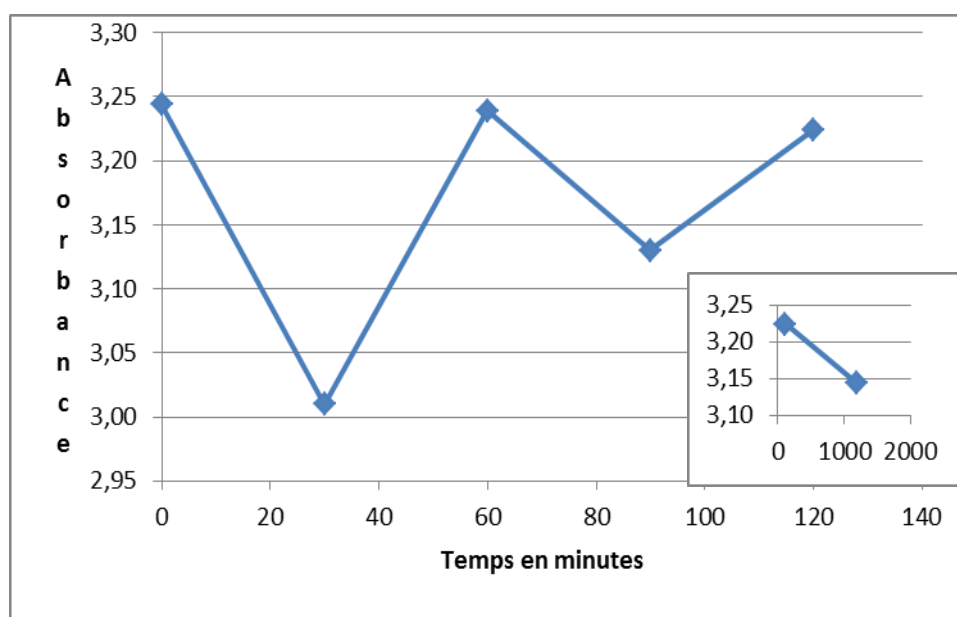
La même solution précédente est analysée à 228 nm. Les résultats représentés dans la courbe de la Figure 4.9, montrent que l'absorbance n'est pas une fonction monotone du temps, ce qui traduit une grande perturbation dans la structure de la molécule. Pour l'intervalle de temps de [0min -30 min] nous remarquons une diminution de l'absorbance de 0,23 qui traduit une dégradation de la molécule et surtout le chromophore qui absorbe à cette

longueur d'onde. Une plus faible diminution (de 0,11) est observée pour l'intervalle [60 - 90 min]. On observe une augmentation de l'absorbance entre [30min-60min] et entre [90 min-120 min]. La courbe en insert montre l'effet du stockage de la solution pendant 20 heures et l'analyse après qui montre une diminution progressive de l'absorbance

Tout ceci veut dire qu'il y a une réactivité dans la solution d'HESP sous l'effet de la température et le rayonnement solaire et des transitions électroniques s'en suivent ce qui explique l'allure de la courbe de la Figure 4.9.

**Tableau 4.6:** Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP en fonction du temps, sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=228\text{nm}$ .

Temps min	A1	A2	A3	A	Amoy
0	3,24	3,25	3,24	3,23	3,24
30	3,02	3,01	2,99	3,03	3,01
60	3,24	3,24	3,24	3,24	3,24
90	3,12	3,14	3,15	3,12	3,13
120	3,22	3,22	3,22	3,22	3,22
1200	3,14	3,14	3,14	3,14	3,14



**Figure 4.9:** Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement solaire au  $\lambda=228\text{nm}$ .

#### 4.1.2.5 Effet de l'exposition de la solution d'HESP au rayonnement UV

Une solution d'HESP de concentration  $c = 1,639.10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$  est exposée aux rayonnements provenant d'une lampe ultraviolet à l'intérieur du laboratoire où la température ambiante était de  $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ . Ceci pour ne prendre en considération que l'effet de la lampe UV-visible seule.

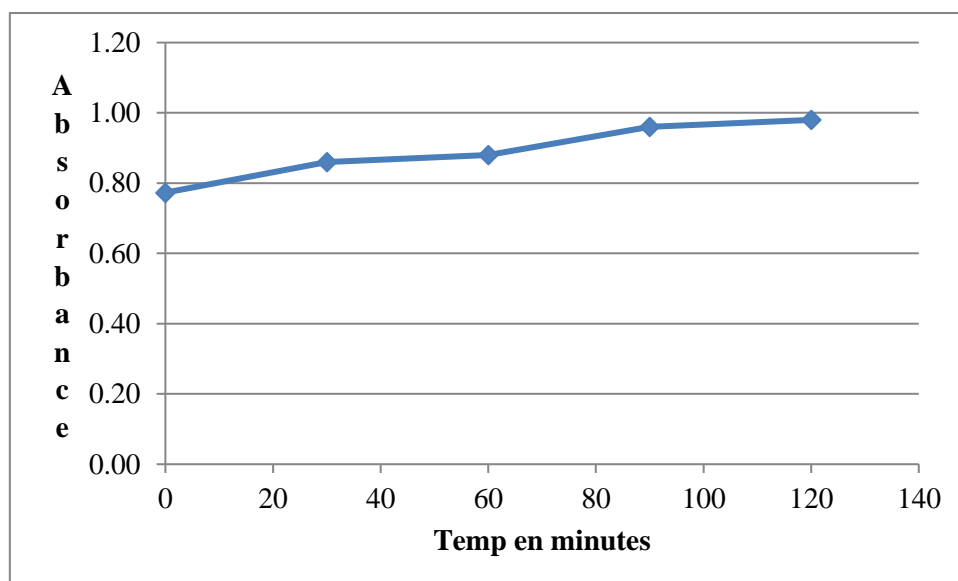
##### $\lambda=330 \text{ nm}$

A travers la courbe de la Figure 4.10 tracée à partir des données du Tableau 4.7, et qui représente l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement UV à  $\lambda=330\text{nm}$ , on observe, en général, une augmentation de l'absorbance avec le temps. Pendant les premières 30 min et de 60 à 90 minutes d'exposition de la solution de HESP au rayonnement UV, l'absorbance a augmenté de  $0,09 \pm 0,1$  alors que pour les intervalles [30-60] et [90-120min] l'augmentation est plus lente et correspond à  $\Delta A=0,02$  pour chaque demi-heure.

On traduit cette augmentation par l'excitation de la molécule par les rayonnements UV et conduisant à un changement d'un chromophore de la molécule de HESP par un autre qui absorbe plus fortement les rayonnements UV à cette longueur d'onde.

**Tableau.4.7:** Variation de l'absorbance d'une solution d' HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=330\text{nm}$ .

temps min	A1	A2	A3	Amoy
0	0,77	0,78	0,76	0,77
30	0,86	0,87	0,85	0,86
60	0,88	0,89	0,87	0,88
90	0,96	0,94	0,98	0,96
120	0,98	0,98	0,98	0,98



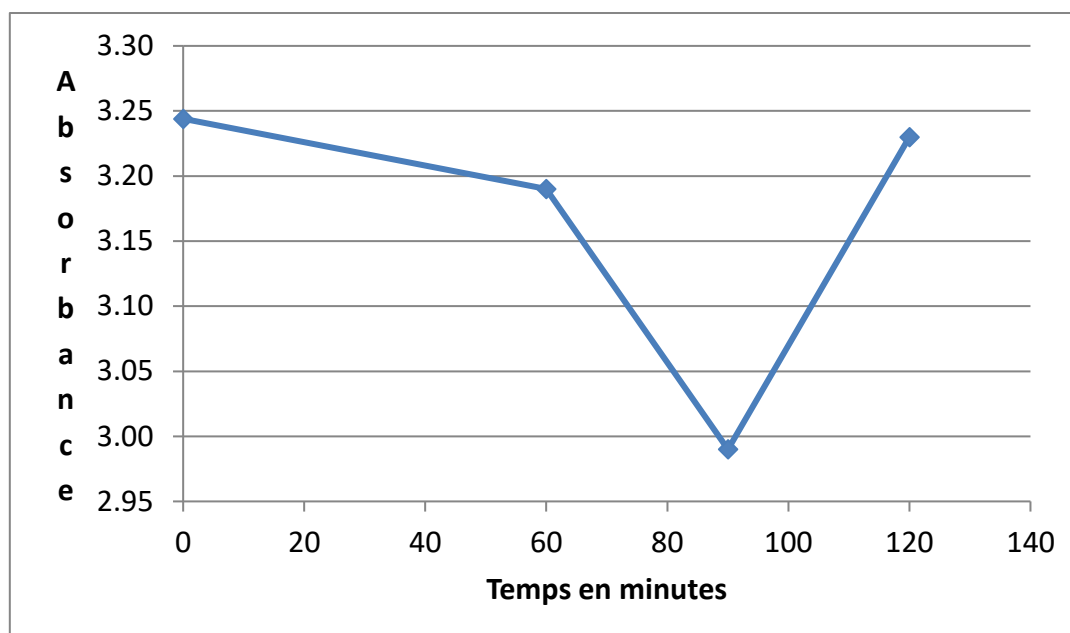
**Figure 4.10:** Variation de l'absorbance d'une solution de HESP sous l'effet de rayonnement UV au  $\lambda=330\text{nm}$ .

### $\lambda=228\text{ nm}$

Analysée à 228 nm, la solution d'HESP a été sujette à des modifications comme montré dans la Figure 4.11 qui représente la variation de l'absorbance d'une solution d'HESP en fonction du temps, sous l'effet du rayonnement UV. On observe une diminution lente (0.06) de l'absorbance pour l'intervalle [0-30min] indiquant le commencement de la dégradation de la molécule, une diminution plus aigüe (0.19) entre [60-90min] et une augmentation plus ou moins rapide de l'absorbance (0.24) pour la période 90-120min. Ceci peut se traduire par le fait que la réaction qui a eu lieu dans la première heure d'exposition aux UV, est réversible, donc la molécule d'HESP se reconstruit, comme ça peut être dû à la formation d'un nouveau chromophore absorbant plus intensément la lumière.

**Tableau 4.8:** Variation de l'absorbance d'une solution d' HESP en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=228\text{ nm}$ .

temps min	A1	A2	A3	A <sub>moy</sub>
0	3,24	3,23	3,25	3,24
60	3,19	3,18	3,17	3,18
90	2,99	2,99	3,00	2,99
120	3,23	3,24	3,22	3,23

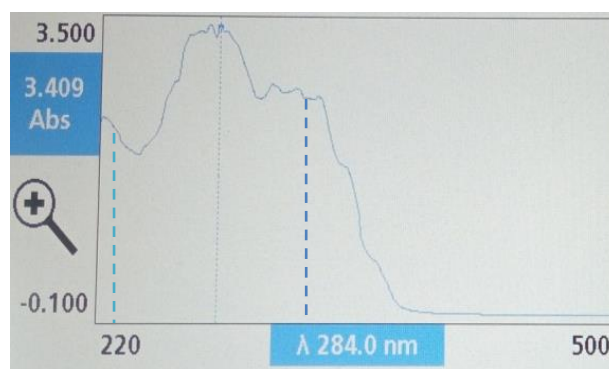


**Figure 4.11:** Variation de l'absorbance d'une solution d'HESP sous l'effet de rayonnement UV à  $\lambda=228\text{nm}$ .

### 4.1.3. Etude de la dégradation forcée de l'HESP dans un jus d'orange naturel

#### 4.1.3.1. Analyse d'une solution de jus d'orange pressé à la main

Le spectre UV-Vis d'une solution de jus d'orange naturel, pressé à la main (jus plus méthanol), à une température de  $19,6^{\circ}\text{C}$ , est représenté en Figure 4.12, on y identifie aisément les bandes correspondant à l'HESP ( $\lambda=228$  et  $\lambda=330$  nm). Lors des manipulations qui succèdent, on règle le spectrophotomètre à ces longueurs d'onde pour ne voir que la molécule d'HESP. Il s'agit donc de l'analyse quantitative d'un élément dans un mélange, suite à des perturbations dues à l'exposition aux rayonnements.



**Figure 4.12:** Spectre UV-visible d'un échantillon de jus d'orange naturel.

On a analysé la solution de jus d'orange naturel (pressé à la main) aux deux longueurs d'onde 330 nm et 228 nm, on a procédé de la même manière que pour l' HESP pure.

#### 4.1.3.2. Effet du rayonnement solaire sur l'HES contenu dans le jus d'orange

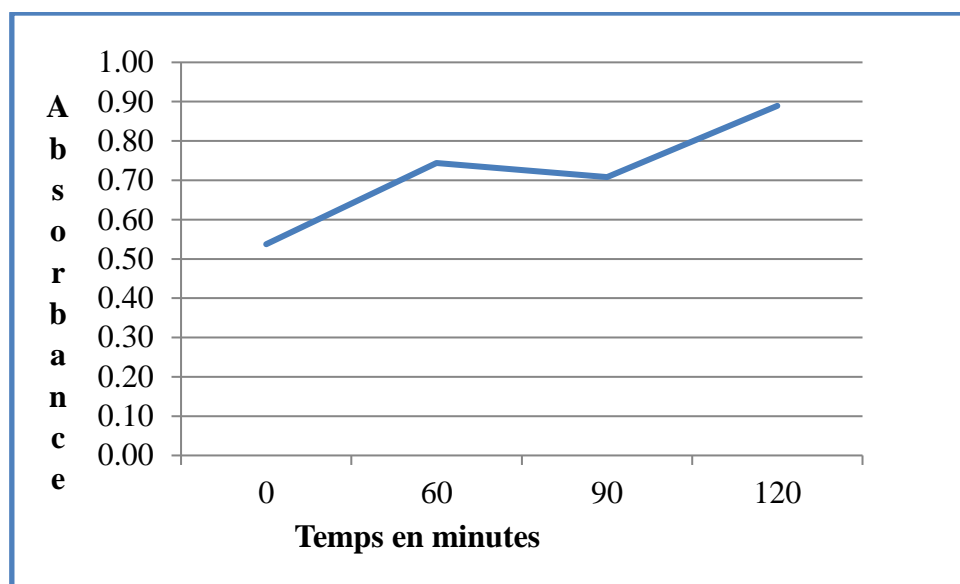
##### $\lambda=330$ nm:

La courbe de la Figure 4.13 représente les résultats de l'absorbance d'une solution de jus d'orange pressé à la main sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm, on remarque trois segments dans ce graphe correspondant à une augmentation de l'absorbance de 0,2 pour l'intervalle 0–60 min, une légère diminution de 0.03 pour 60-90min puis une augmentation de 0,18 pour l'intervalle 90-120 min (Tableau 4.9).

Comme on a expliqué plus haut, une diminution de l'absorbance est indicatrice d'une diminution de concentration de l'analyte qui explique la dégradation de la molécule, et une augmentation, veut dire ou bien la régénération de la même molécule ou d'un isomère proche ayant un chromophore qui absorbe à cette longueur d'onde. A l'effet du rayonnement auquel est exposé forcément la molécule, s'ajoute la synergie qui peut exister entre les molécules de jus, polyphénols et autres, il en découle un tas d'interactions physico-chimiques dont l'impact sur la santé humaine doit être pris en considération.

**Tableau 4.9: Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm.**

temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	0,54	0,54	0,54	0,54
60	0,75	0,74	0,74	0,74
90	0,71	0,71	0,71	0,71
120	0,89	0,89	0,89	0,89

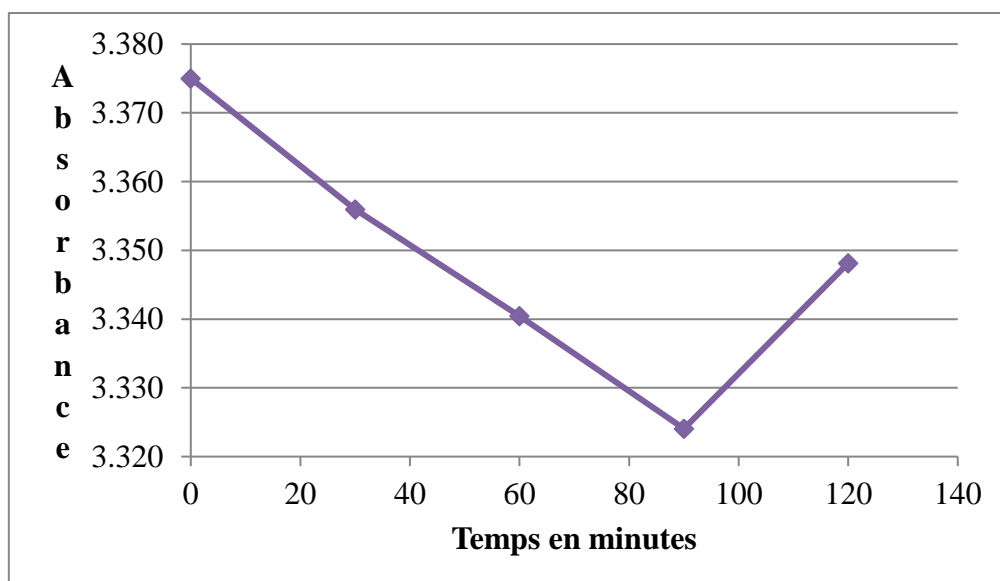


**Figure 4.13.:** Courbe de variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm.

$\lambda=228$  nm

**Tableau4.10:** Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=228$  nm.

temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	3,33	3,34	3,45	3,38
30	3,36	3,36	3,35	3,36
60	3,34	3,34	3,35	3,34
90	3,30	3,29	3,39	3,33
120	3,35	3,36	3,34	3,35



**Figure 4.14.:** Courbe de variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=228$  nm.

La courbe de la Figure 4.14 qui représente les résultats de la variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange pressé à la main sous l'effet de rayonnement solaire à  $\lambda=228$  nm, montre une diminution de la concentration de l'HESP pendant l'intervalle [0-90 min] puis une augmentation entre [90-120 min]. Ceci indique la stimulation de la réactivité de l'HESP sous l'effet des rayonnements solaires. Tout ce que l'on craint c'est la formation de radicaux libres par réaction photochimique des molécules contenus dans le jus qui deviendrait des pro-oxydants au lieu d'être, si elles avaient été conservées convenablement, des antioxydants potentiels.



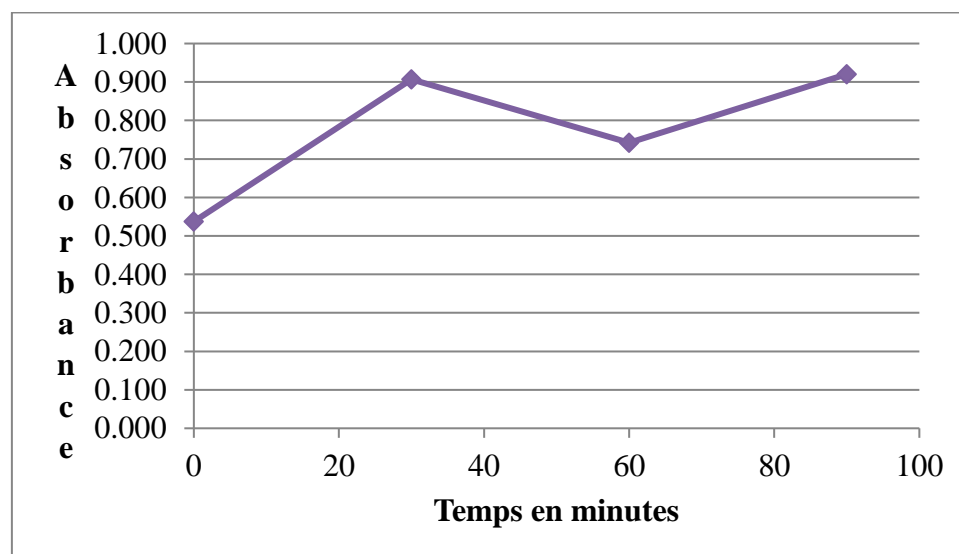
4.1.3.3. Effet du rayonnement UV sur le jus naturel

$T=19,6 \pm 1^\circ \text{C}$ .

$\lambda=330 \text{ nm}$ :

**Tableau 4.11:** Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV solaire à  $\lambda=330 \text{ nm}$ .

temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	0,54	0,54	0,54	0,54
30	0,91	0,91	0,90	0,91
60	0,77	0,77	0,69	0,74
90	0,92	0,92	0,92	0,92



**Figure 4.15:** Courbe d'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet de rayonnement UV au  $\lambda=330 \text{ nm}$ .

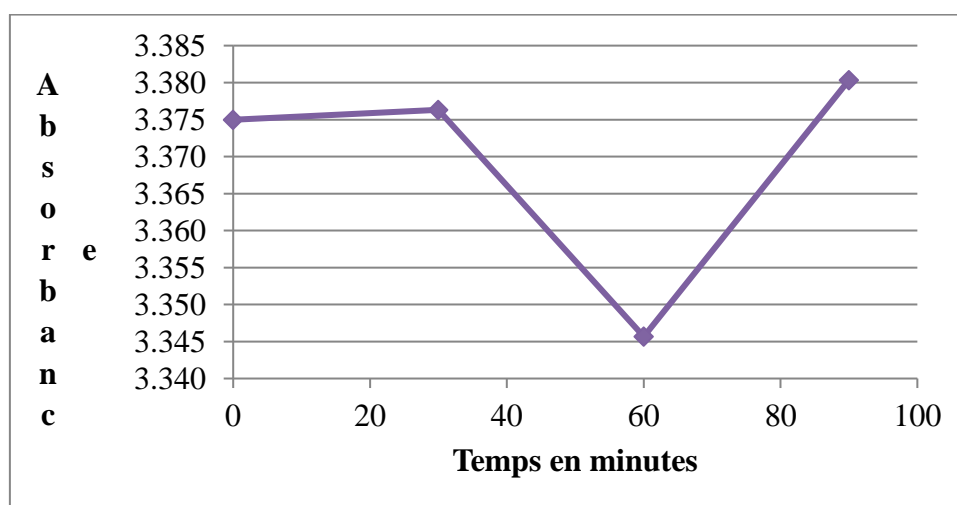
On remarque concernant les résultats d'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel, exposé à l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=330 \text{ nm}$ , une augmentation suffisamment claire de l'absorbance de 0,37 pour l'intervalle [0 min, 30min], dont on peut conclure une rapide réaction donnant lieu à un chromophore plus intense que celui de la molécule mère. Ça peut

être une transition électronique, ou un transfert de protons d'un polyphénol à un autre. La diminution de la concentration de l'HESP de  $11,11 \cdot 10^{-4}$  mol/l à  $9,22 \cdot 10^{-4}$  mol/l pendant l'intervalle, 30-60 min. La tendance au retour à la concentration initiale, peut signifier la régénération d'une partie de la molécule ou même la formation d'un autre chromophore qui absorbe à cette longueur d'onde, le problème, c'est que la décadence continue en continuant à exposer la molécule pendant encore 30 minutes, au rayonnement solaire, où on voit une augmentation de l'absorbance de 0,18, ce qui donne en final, une courbe en zigzag qui signifie une réactivité continue de la molécule qui est censée être chimiquement stable pour assurer son rôle d'antioxydant.

$\lambda=228$  nm

**Tableau 4.12:** Résultat d'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel en fonction du temps sous l'effet de rayonnement UV au  $\lambda=228$  nm.

temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	3,33	3,34	3,45	3,375
30	3,37	3,38	3,38	3,376
60	3,36	3,34	3,34	3,346
90	3,37	3,39	3,38	3,380



**Figure 4.16:** Variation en fonction du temps de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel sous l'effet de rayonnement UV à  $\lambda=228$  nm.

A partir de la courbe 4.16 qui représente les résultats d'un suivi cinétique de l'absorbance d'une solution de jus d'orange naturel exposé à l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=228$  nm on tire les informations suivantes:

[0min, 30min] les rayonnements UV n'influent que très peu sur le chromophore à 228 nm.

[30min, 60min] il y a une diminution de 0,03 en absorbance, donc en concentration de l'HESP d'où sa dégradation.

[60min, 90min] Une augmentation de la concentration, d'où une réactivité de la molécule donnant lieu à de nouveaux chromophores.

#### **4.1.4. Etude de la dégradation de l'HESP contenu dans un jus commercial**

On a exposé un échantillon de jus commercial (Rouiba) aux rayonnements solaire et UV, et nous avons mesuré l'absorbance à  $\lambda=330$  nm, toutes les 30 minutes. Les mesures ont été faites en triplicata et la moyenne des absorbances est tracée en fonction du temps.

##### **4.1.4.1. Effet de rayonnement solaire sur l'HESP contenu dans le jus commercial**

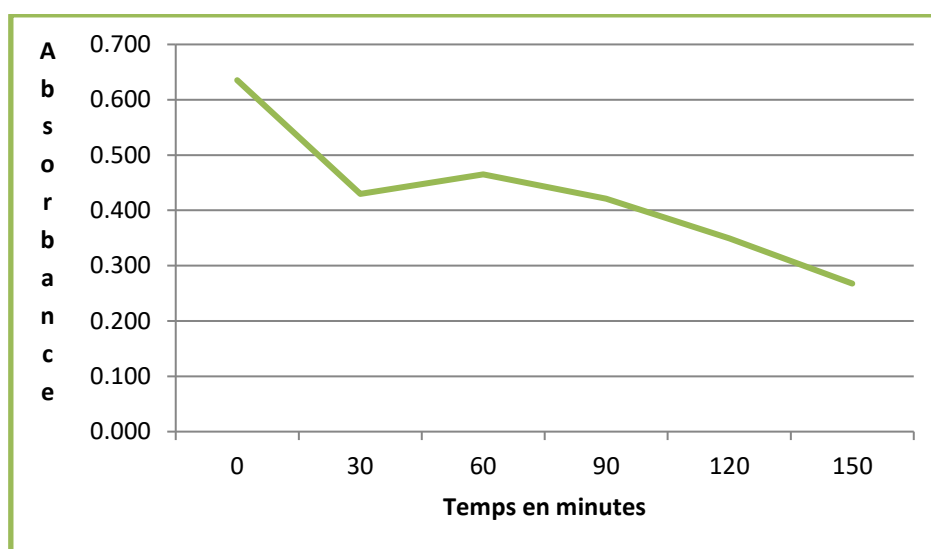
La température pour cette manipulation variait de  $22,3 \pm 1$  à  $23,1 \pm 1^\circ\text{C}$ .

La courbe de la Figure 4.17 montre une diminution plus grande de l'absorbance pendant les premières trente minutes puis une légère augmentation de 0,04 (Tableau 4.13) puis une redescente mais moins poussée que celle des premières 30 minutes.

L'allure de la courbe est complètement différente de celle obtenue pour le jus naturel, dans des conditions quasi similaires. Ceci est sans surprise, car les jus commerciaux et même s'ils sont à base naturelle, contiennent plusieurs additifs alimentaires, telles que les adoucissants, les conservateurs et les colorants, ce qui multiplie la diversité des métabolites contenu dans le jus et l'excitation aux rayonnements sera en faveur d'une réactivité accrue entre ces métabolites. D'où l'on voit diminuer la concentration de l'HESP qui entrerait en interaction avec les autres composants.

**Tableau 4.13:** Variation de l'absorbance d'une solution de jus commercial en fonction du temps sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm.

Temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>moy</sub>
0	0,64	0,63	0,64	0,64
30	0,43	0,43	0,43	0,43
60	0,47	0,48	0,45	0,47
90	0,45	0,41	0,40	0,42
120	0,35	0,35	0,35	0,35
150	0,27	0,27	0,27	0,27



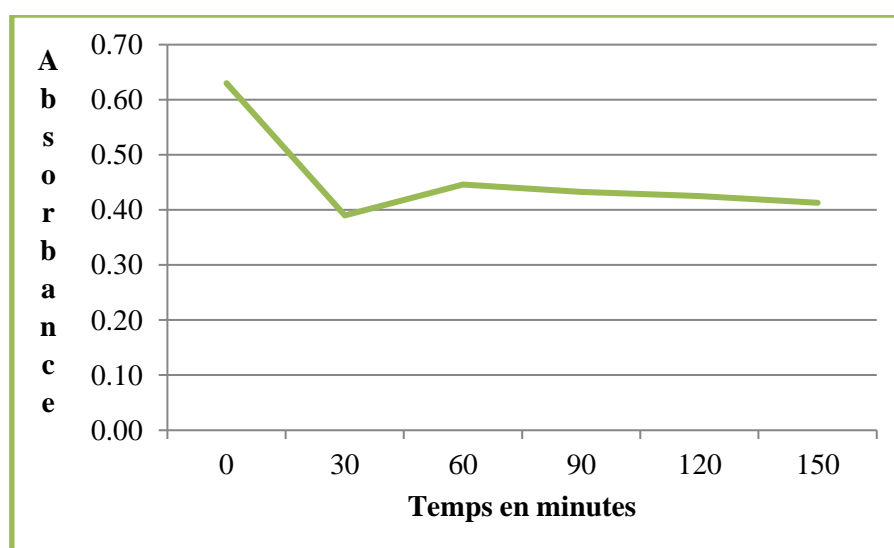
**Figure 4.17:** Variation de l'absorbance d'une solution de jus orange sous l'effet du rayonnement solaire à  $\lambda=330$  nm.

#### 4.1.4.2 Effet de rayonnement UV sur l'HESP contenu dans le jus commercial

La température toujours elle est variable  $T=22,4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tableau 4.14:** Variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange commercial en fonction du temps sous l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=330$  nm.

Temps min	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Amoy
0	0,64	0,63	0,64	0,63
30	0,39	0,40	0,39	0,39
60	0,45	0,44	0,45	0,45
90	0,43	0,44	0,43	0,43
120	0,43	0,43	0,43	0,43
150	0,41	0,41	0,42	0,41



**Figure 4.18:** Courbe de l'absorbance d'une solution de jus commercial en fonction du temps d'exposition au rayonnement UV à  $\lambda=330$  nm.

La courbe 4.18 représentant la variation de l'absorbance d'une solution de jus d'orange commercial sous l'effet du rayonnement UV à  $\lambda=330$  nm est très similaire à celle obtenue pour l'étude de la même solution exposée au rayonnement solaire ce qui confirme la sensibilité des molécules naturelles aux rayonnements.

## 4.2. Etude de la dégradation forcée de l'hespéridine dans des échantillons de jus par LC-MS

### 4.2.1. Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse de quelques échantillons de jus

Après exposition des échantillons de jus commerciaux aux rayonnements IR et UV pendant 3 à 4 heures, nous avons analysé les échantillons par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et nous avons comparé les teneurs en hespéridine avant et après exposition.

Des changements plus ou moins importants ont été constatés mais dans cette étude nous nous sommes intéressés au profil de fragmentation de l'hespéridine.

#### 4.2.1.1. Echantillons de jus analysée par LC-masse

- Ramy verre 230 nm

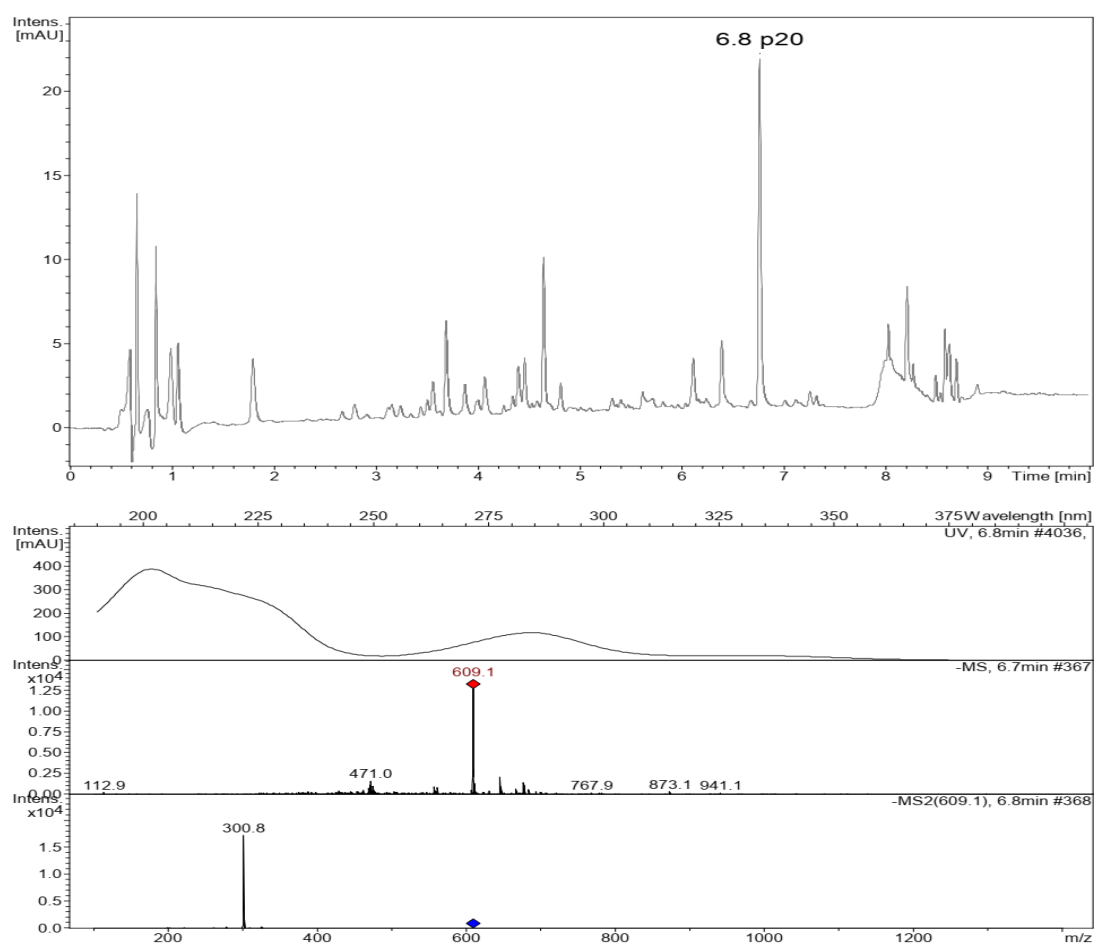
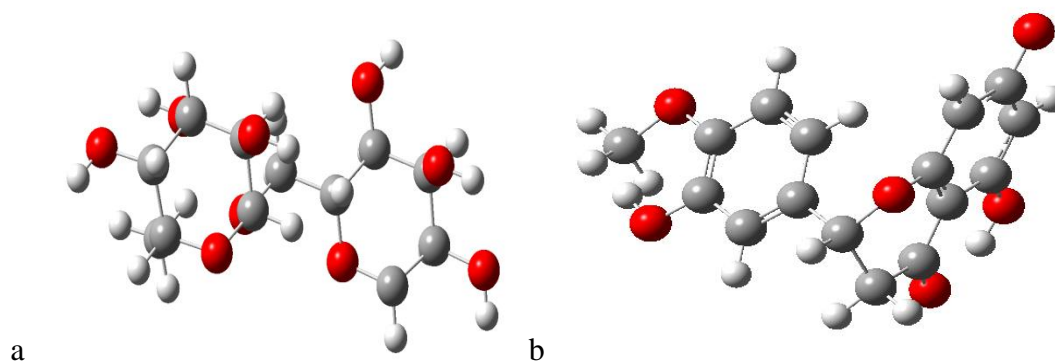


Figure 4 19: Spectre LC-MS de jus Ramy verre à 230nm.

Le chromatogramme HPLC montre la richesse des jus en molécules qui sont bien séparées selon leur affinité envers la phase mobile et la phase stationnaire. On est intéressé par un seul pic dans cette étude qui sort à un temps de rétention  $t_r = 6,8 \text{ min}$ , c'est le pic 20 qui représente l'HESP. Le couplage LC-Mass nous permet d'obtenir le spectre de masse de chaque pic (molécule).

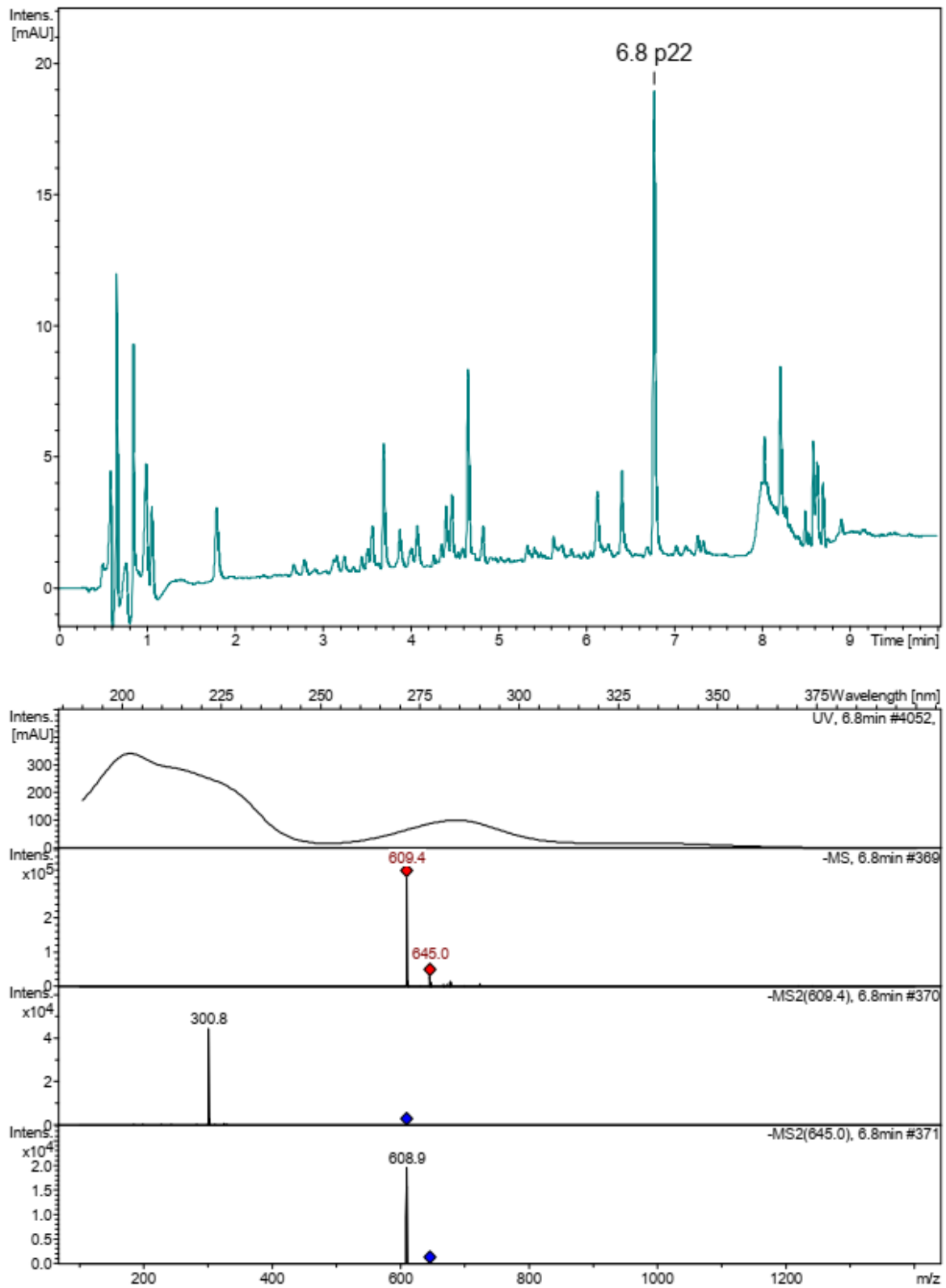
Dans le spectre du masse (MS) on remarque une pic de base à  $m/z=609,1\text{g/mol}$  compatible avec la masse molaire de l'HESP ( $M=610,56\pm 0,03\text{g/mol}$ ) de formule brute  $C_{28}H_{34}O_{15}$  et, le déficit de  $1 \text{ g/mol}$  est dû au fait qu'on travaille en mode négatif (M-H). Sur le spectre MS-MS du pic précédent ( $m/z=609,1$ ), on relève un seul pic à  $m/z = 300,8$  qui correspond à la rupture de la liaison glycosidique, le départ du rutinoside et l'obtention de l'aglycone Hespérétine de formule brute  $C_{16}H_{14}O_6$  et de masse molaire  $M=301,274 \text{ g/mol}$ .



**Figure 4.20:** Fragments obtenus par MS-MS du pic majoritaire à  $m/z=609$  a) Diglucose ou rutinose b) Hespérétine.

Le pic correspondant au diglucose n'apparaît pas sur le spectre car c'est une molécule neutre et ne peut pas être détectée par l'appareil. L'Hespérétine est obtenue sous forme de radical chargé positivement et donc perçue par le détecteur.

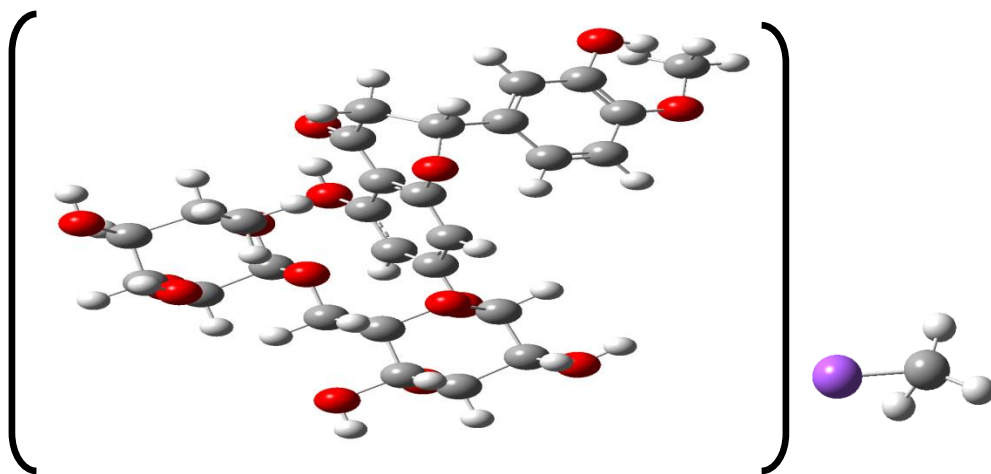
• Jus Ramy en bouteille en plastique



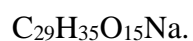
**Figure.4.21:** Résultats d'analyse d'un échantillon de jus Ramy en bouteille en plastique à 230nm par un HPLC-Mass.



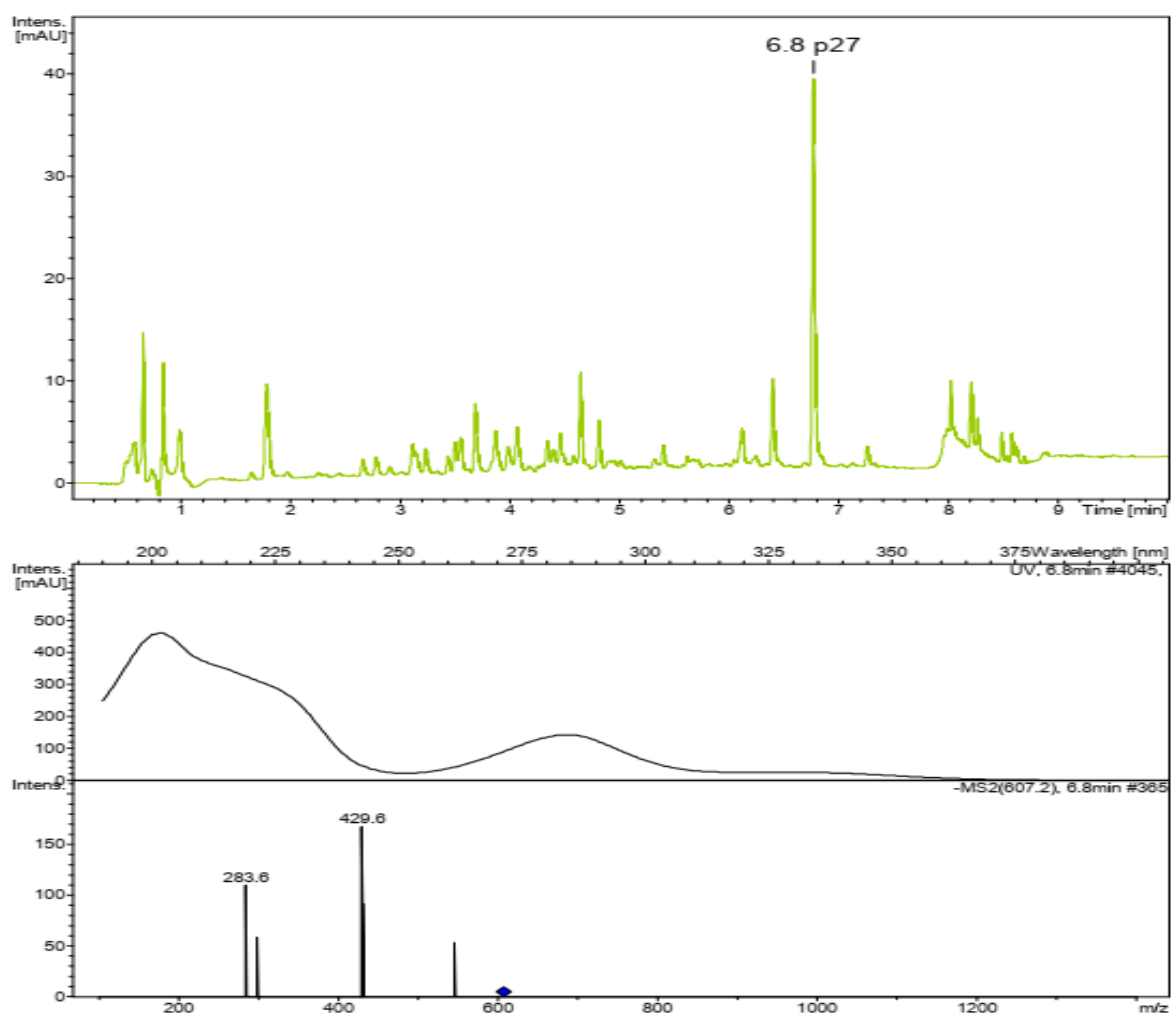
Ce spectre montre un pic à 609 qui correspond à l'Hespéridine et un pic à 645 correspondant à l'hespéridine dihydrate, c'est-à-dire (2 molécules d'H<sub>2</sub>O). La fragmentation par MS-MS a donné l'aglycone de masse 300 g/mol. La formation d'adduit est aussi possible :



**Figure.4.22:** Structure du complexe HESP plus CH<sub>3</sub>Na d'une structure moléculaire



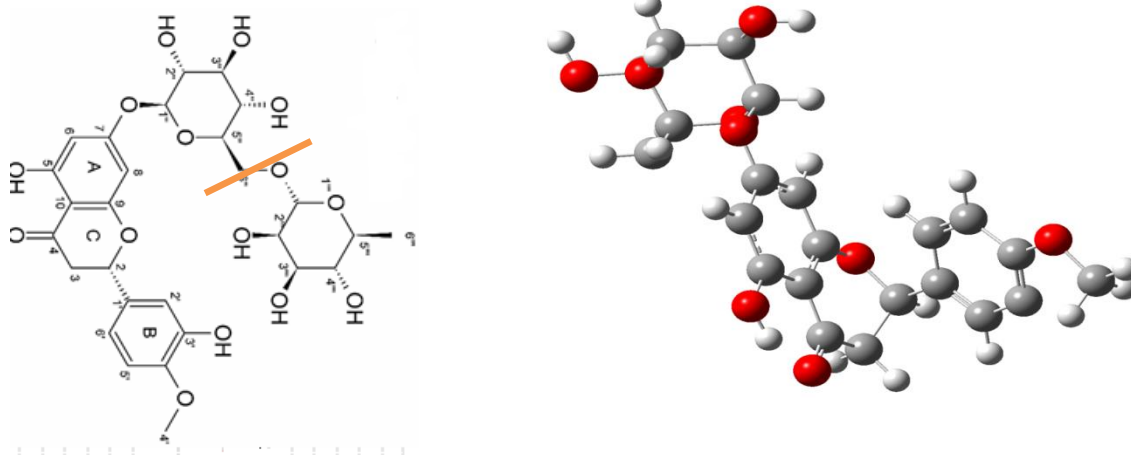
- Analyse de jus commercial (ifruit) à 230nm par HPLC-Masse avant exposition aux rayonnements.



**Figure.4.23:** Résultats d'analyse d'un échantillon de jus à 230nm par un HPLC-Masse avant exposition aux rayonnements.

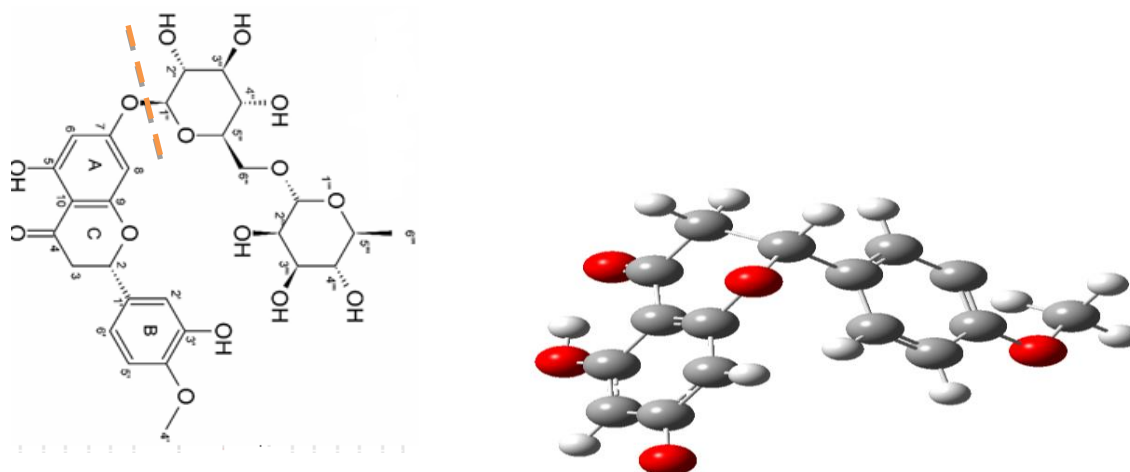
Dans la **Figure.4.23**. Qui représente les résultats d'analyse d'un échantillon de jus ifruit à 230nm par HPLC-Masse. Le pic à  $t_r = 6,8$  min (**pic 27**) représente l'HESP. Le spectre de masse (MS) donne une lecture d'une molécule du masse molaire  $m/z=607,2$  M<sup>-</sup> (M-3H).

Le spectre MS2 qui représente la fragmentation du pic à  $m/z=607,2$  g/mol, montre 5 pics, l'un à  $m/z = 429,6$  g/mol (M=430,409g/mol pour  $C_{22}H_{22}O_9$ ) qui correspond à la rupture d'un seul sucre (glucosyl) et donc l'obtention de l'hespérite-7-O-glycosyl (le CH<sub>2</sub> compris) duquel se fragmente un groupement hydroxyle.



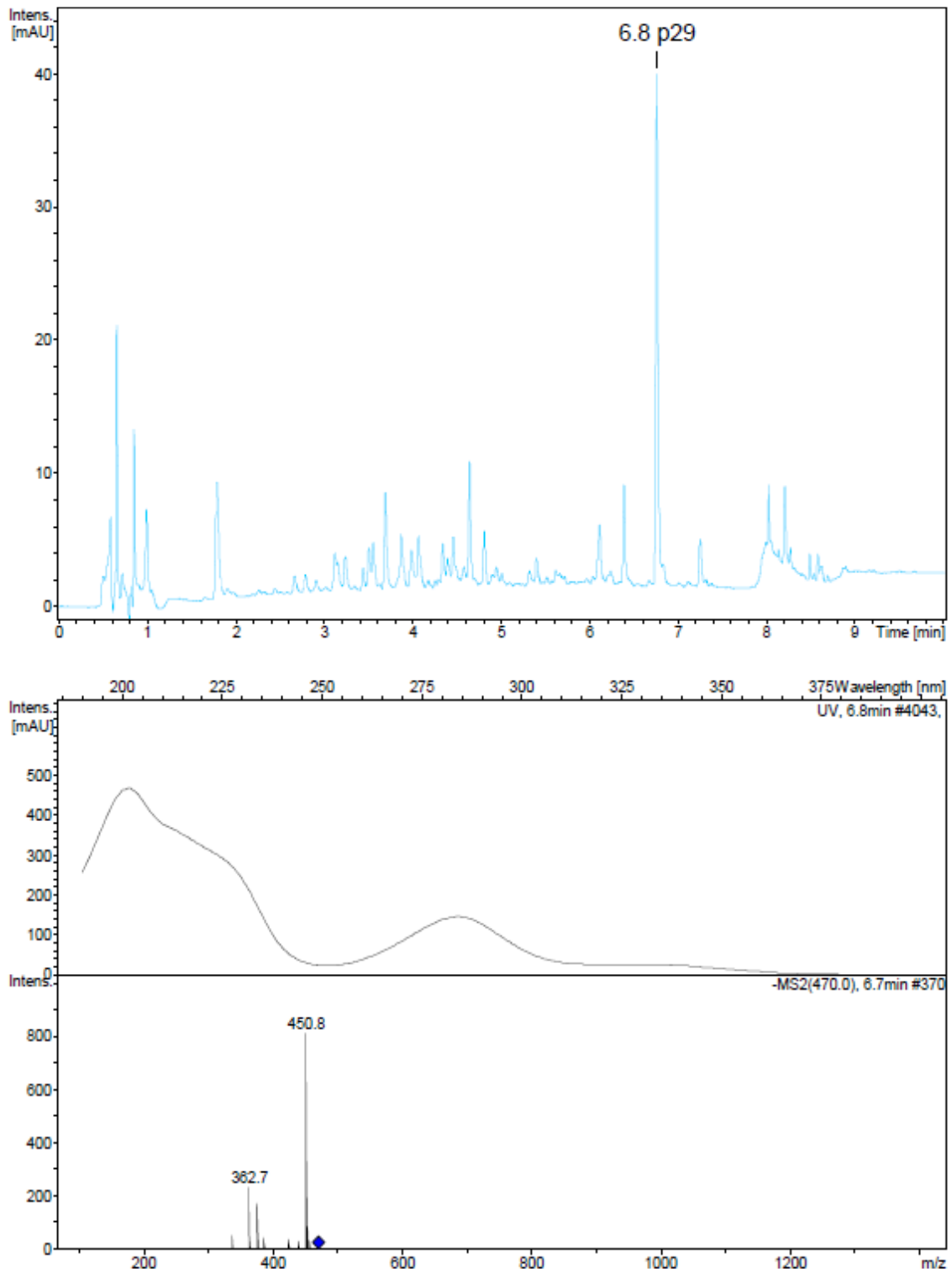
**Figure 4.24:** Fragment à  $m/z = 429$  g/mol de formule  $C_{22}H_{21}O_9$ .

Le deuxième pic à  $m/z = 283.6$  correspond à la fragmentation de l'HESP au niveau de la liaison glycosidique et départ du rutinoside (2 sucres liés par liaison  $-O-$  glucosyl) donnant lieu à l'Hespéritine, qui perd un OH partant avec le rutinose, le pic qui apparaît sur le spectre est de formule brute  $C_{16}H_{12}O_5$  ( $M = 284$ ).



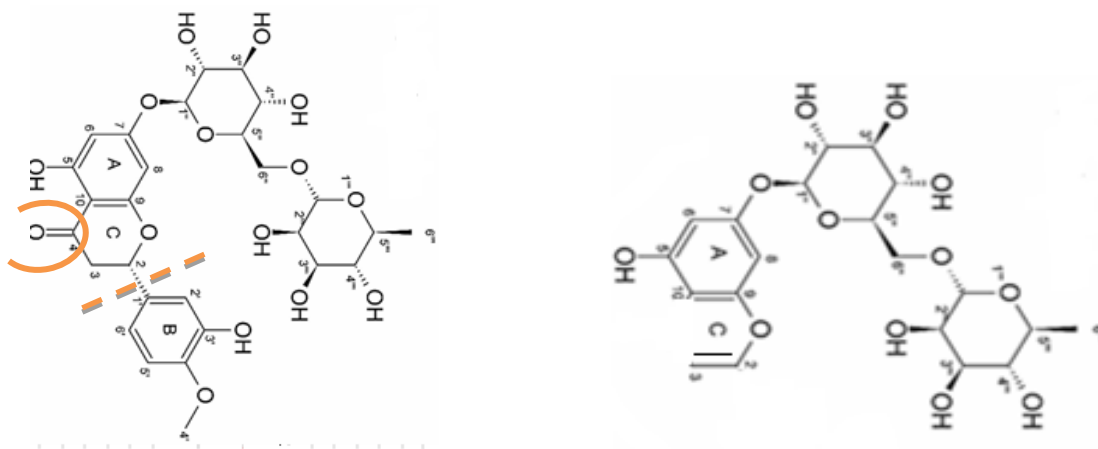
**Figure 4.25:** Fragment à  $m/z = 284$  g/mol de formule  $C_{16}H_{12}O_5$ .

- Analyse par LC-MS d'un Echantillon de jus commercial (ifruit ) après exposition aux UV.



**Figure.4.26:** Résultats d'analyse d'un échantillon de jus à 230nm par un HPLC-Masse après exposition aux rayonnements UV.

Ce spectre est celui d'un échantillon de jus qui montre un pic MS-MS à 470.

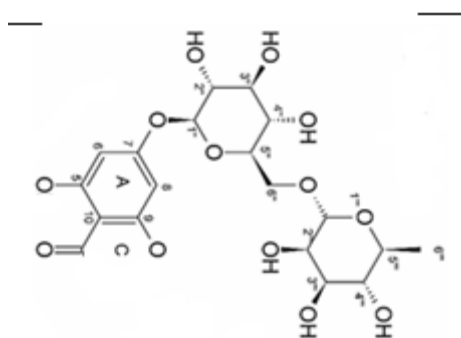


**Etape 1: M- B =499.**

**Etape 2: M-B-(C=O)= 469.**

C'est le pic à [471-H] après réarrangement.

Cette fragmentation est aussi possible vu les conditions sévères auxquelles on soumet la molécule:



**Pic à 417 (possibilité2).**

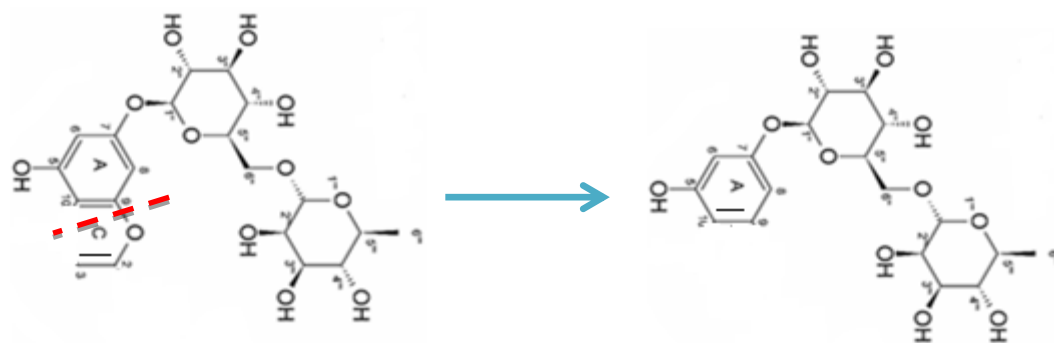
Etape 2 bis: départ du carbonyle : de masse 28 et apparition du pic à [471-H].

Chimiquement parlant, cette entité est très instable elle doit se réarranger pour donner une quinone par exemple, sur le cycle A.

**Le pic à 450,8 ≈ 451**

Résulte du départ d'un H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> de masse 19 de l'un des sucres par réaction de déshydratation.

Le pic à 427 résulte du départ de CH<sub>2</sub>-CH-O de masse =43 il est faible donc moins stable.



pic à 427 –H.

Le pic à 362, 3 résulte de la rupture aglycone- rutinose (masse 326 g/mol) et que le rutinose serait dihydraté ce qui donne une masse à  $m/Z=362$  g/mol.

• Analyse d'un jus commercial ( ifruit) après exposition aux radiations infrarouge

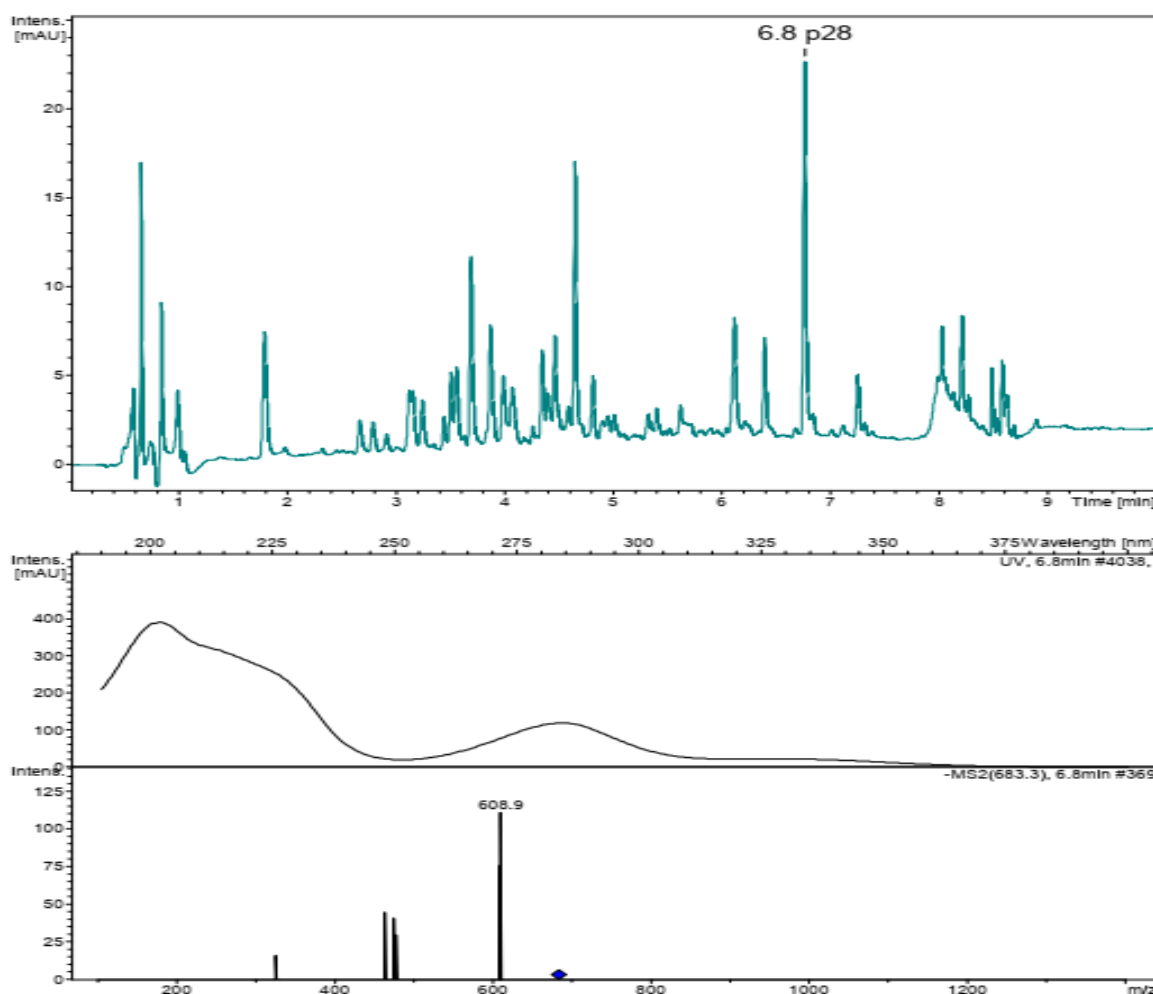


Figure 4.27: Résultats d'analyse d'un échantillon de jus ifruit à 230nm par un HPLC-Masse et un spectre UV-Visible bombardée par une lampe d'IR.

Ce spectre de LC-Mass est celui d'un échantillon de jus exposé aux rayonnements IR (lampe IR) pendant 4 heures. On y trouve un pic à 683,3 g/mol correspondant à un excès de masse de 74,3 g/mol, ce qui est plutôt proche d'un aryl, ce qui laisse supposer l'association de l'HESP avec un autre fragment qui existe déjà dans le jus ou provient d'une dégradation.

### 4.3. Modélisation moléculaire

Dans cette partie on va comparer les résultats des fragmentations données par LC-Mass à celles données par l'étude de la modalisation moléculaire. Ainsi, on a procédé à la fragmentation de l'hésperidine à différents niveaux, on a optimisé les structures obtenues et on a comparé les énergies

#### 4.3.1. Comparaisons de la stabilité entre les fragmentations MS2

L'Hésperidine dégradé à chaque expérience appliquer pour donné des fragments différents, chaque fragment (molécule née) par l'optimisation donné une énergie spécifique de-là.

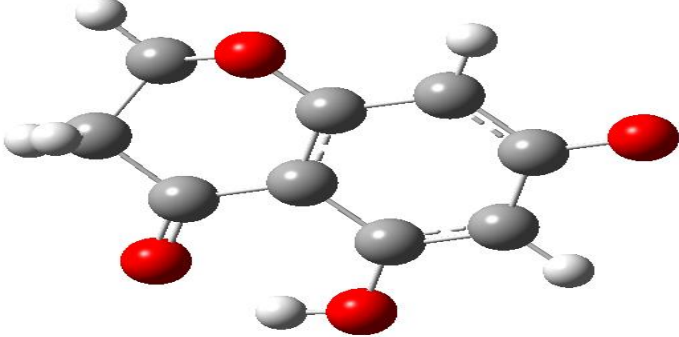
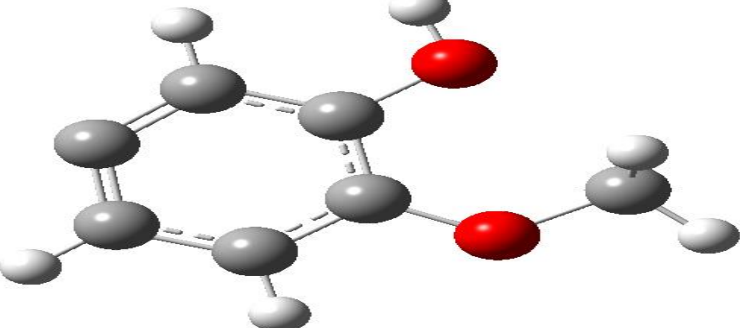
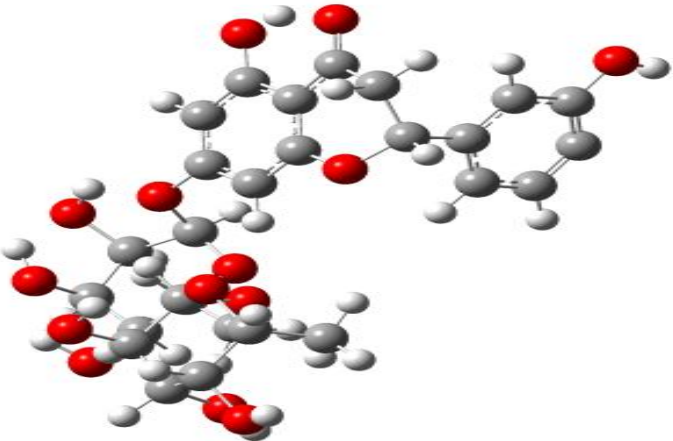
**Tableau 4.15:** Energie des molécules nées à MS2.

Structure moléculaire	Energies (a.u)
$C_{28}H_{34}O_{15}$ ( <i>Hésperidine</i> )	-2215,05
$C_{22}H_{22}O_9$ ( <i>Hésperidine dépourvu d'un sucre et un hydroxyle</i> ).	-1594,18
$C_{16}H_{14}O_6$ ( <i>Hésperitine, aglycone fragmentation du rétinose</i> )	-1068,51
$C_{16}H_{13}O_5$ . ( <i>Hésperitine moins un hydroxyle</i> ).	-992,57

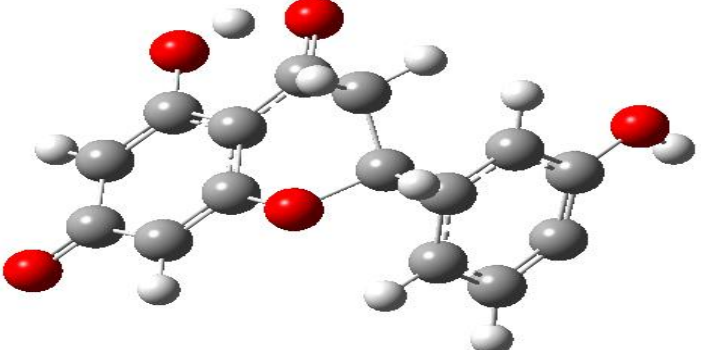
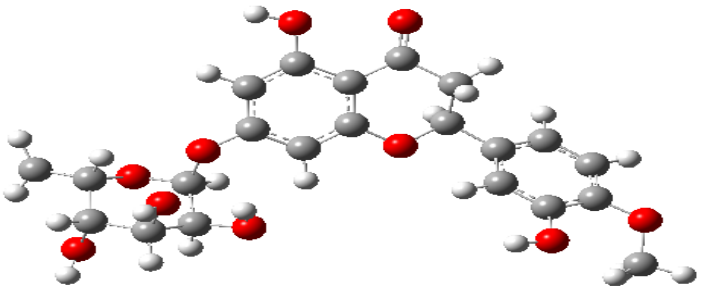
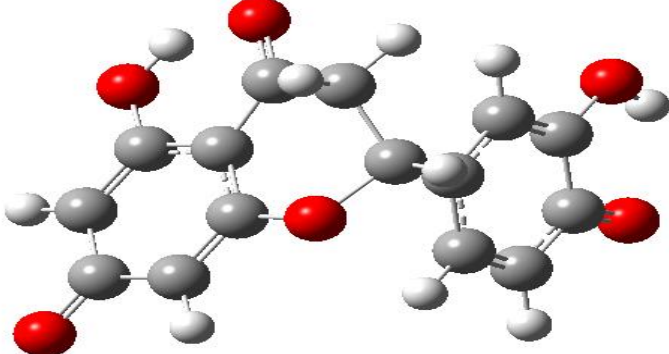
A partir ce tableaux qui présente les énergies des fragments issues de la HPLC-MS et HPLC-MS-MS, on remarque que le fragment le plus stable est celui de l'adduit [HESP CH<sub>3</sub>Na]. Ensuite le fragment formé par le départ d'une unité pyranose et un groupement OH, suivi de l'aglycone, Hésperétine, et enfin l'Hésperétine dépourvu d'un OH.

4.3.3. Quelque fragmentation provoquée dans la structure de l'Hespéridine et leurs énergies

Tableau 4.16: Quelque fragment capable de se former dans les réactions de dégradation

Nom des fragments.	Structure moléculaire.	Energie (a.u.).
Fragment formé par les deux cycles AC		-643,80
Fragment formé par le cycle B		-418,97
Hespéridine sans l'OCH3 En position 4'		-2088,98 Parmi les plus stables



<p><b>HESP moins deux sucre et OCH3</b></p>		<p><b>-948,3</b></p>
<p><b>HESP moins un sucre</b></p>		<p><b>-1595,46</b></p>
<p><b>HESP moins deux sucres et CH3</b></p>		<p><b>-1028,56</b></p>

#### 4.4. Conclusion

Cette étude est menée sur l'Hespéridine qui est un composé existant dans les jus des agrumes appartenant à la famille citrus, tels que l'orange. Nous avons soumis cette molécule à différents types de radiation, solaire, ultraviolets et infrarouge et nous avons suivi leur influence sur la stabilité de cette molécule.

Les résultats montrent que l'Hespéridine est une molécule sensible aux rayonnements et qu'elle peut subir des dégradations en donnant lieu à des fragments réactifs capable de former de nouveaux composés dont l'effet sur la santé humaine est à ne pas négliger.

*Conclusion générale.*

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence la dégradation de l'hespéridine une fois soumise à différents facteurs de stress, à savoir, les rayonnements solaire, Infrarouge et ultraviolets. Le choix accordé à cette molécule est justifié par son importance sur le plan biologique, surtout qu'elle a récemment été testée avec succès comme médicament anti-covid-19. Sans pour autant oublier qu'à chaque fois que l'on consomme du jus d'agrumes contenant du zeste, on consomme quelques dizaines de mg de ce métabolite secondaire flavonoïdique.

L'Etude cinétique de l'exposition de la molécule pure en solution ou contenue dans les jus a montré qu'il y a une variation de l'absorbance et donc de la concentration de l'hespéridine qui ne peut avoir lieu que si des interactions, excitation ou dégradation ont eu lieu et de nouveaux chromophores sont apparus.

L'étude par HPLC-mass nous a permis d'identifier le mécanisme de fragmentation de la molécule et identifier à partir des spectres de masse les fragments formés. Ces derniers dont l'étude de stabilité a été réalisé par modélisation moléculaire, montre que certains ont des énergies assez élevés et sont donc très réactifs, alors que d'autre sont plutôt stables.

Le fait qu'il y a réactivité au sein d'un jus censé être naturel et contient des molécules stables et bénéfiques pour la santé humaine laisse à se soucier.

Ce domaine de recherche est fascinant mais il faut de gros moyens pour vraiment cerner ce sujet. Comme perspectives:

Il faut isoler les molécules formées sous l'effet des rayonnements et les identifier.

Identifier les agrégats et les impuretés, même infimes, formés par la dégradation des métabolites secondaires, par des méthodes d'analyse appropriées dont la LC-MS fait partie.

Etude in vivo et in vitro sur l'animal et l'homme d'éventuels effets nocifs de ces composés de dégradation, sinon prouver leur innocuité.

*Référence.*

<b><i>Introduction:</i></b>	
[1]:	Dreosti I.E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. <i>Nutrition</i> , 16, 692-694.
[2]:	Akroum Souaad (2011) étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse doctorat université mantouri Constantine.
[3]:	Houchine Tayeb (2020) Activités biologiques des composés phénoliques des extraits du rhizome de <i>Scripus lacustris</i> et <i>Scripus holochoenus</i> P01
[4]:	Durbin M.L., Lundy K.E., Morrell P.L., Torres-Martinez C.L., Clegg M.T. (2003) .Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. <i>Mol.Phylogenet.Evol.</i> , 29, 507-518.
[5]:	Harborne J.B., Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. <i>Phytochemistry</i> , 55, 481-504.
[6]:	Brouillard R., Chassaing S., Fougèrouse A.(2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? <i>Phytochemistry</i> , 64, 1179-1186.
[7]:	Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? <i>Proc.Nutr.Soc.</i> , 62, 599-603.
[8]:	German J.B., Walzem R.L. (2000). The health benefits of wine. <i>Annu.Rev.Nutr.</i> , 20, 561-593.
[9]:	Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (2003). Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. <i>J.Agric.Food Chem.</i> , 51, 7989-7994.
[10]:	Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> . 46, 6, 2123-2129.
[11]:	Ma, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. <i>Ultrasonics Sonochemistry</i> . 16, 57-62.
[12]:	Huang, Y.S., Ho, S.C., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of citrus fruit peel. <i>Food Chemistry</i> . 119, 868-873.
[13]:	Ramful, D., Bahorunb, T., Bourdonc, E., Tarnusc, E., Aruoma, O.I., 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. <i>Toxicology</i> . 278, 75- 87.
[14]:	• Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. <i>Journal of Clinical Nutrition</i> . 79 (5), 727-747.
[15]:	M'HIRI Nouha « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires » p2.
[16]:	<a href="https://www.elbilad.net/national">https://www.elbilad.net/national</a> Visité le 09/06/2022.
<b><i>Chapitre 1: Les polyphénols</i></b>	
[1]:	Dreosti I.E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. <i>Nutrition</i> , 16, 692-694.
[2]:	Harborne J.B., Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. <i>Phytochemistry</i> , 55, 481-504.

[3]:	Durbin M.L., Lundy K.E., Morrell P.L., Torres-Martinez C.L., Clegg M.T. (2003) .Genes that determine flowercolor: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. <i>Mol.Phylogenet.Evol.</i> , 29, 507- 518.
[4]:	Brouillard R., Chassaing S., Fougerousse A.(2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? <i>Phytochemistry</i> , 64, 1179-1186.
[5]:	Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? <i>Proc.Nutr.Soc.</i> , 62, 599-603.
[6]:	Hennebelle, T. S. S. Polyphénols Végétaux, Sources, Utilisations et Potentiel Dans La Lutte Contre Le Stress Oxydatif. Springer-Verlag, pp. 1..
[7]:	Singla, RK., Dubey, A K., Garg, A., Sharma, RK., Fiorino, M., Ameen, SM., Haddad, MA., Al-Hiary. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures references. <i>Journal of AOAC International</i> . 2019, Vol. 102, No. 5, pp. 1-2
[8]:	Tsao, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. <i>Nutrients</i> . 2010, Vols. 1231-1246, 2, pp. 2-8.
[9]:	Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D.Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Elsevier, 2018. pp. 6-8.
[10]:	<a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide-ph%C3%A9nol">https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide-ph%C3%A9nol</a> 23/05/2022
[11]:	Parage, C. Génomique Fonctionnelle De La Biosynthèse Des Stilbènes. Université de STRASBOURG : HAL, 2013. pp.1-3.
[12]:	Hopkins, G. Physiologie Végétale. Boeck Supérieur, 2003. pp. 280.
[13]:	[ <a href="http://despace.univ-bba.dz.pdf">Http://despace.univ-bba.dz.pdf</a> –Tang and halli well, 2010-mémoire 2018, 2019. Le 23/05/2022.
[14]:	Pietta, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. <i>Journal of Natural Products</i> . 2000, Vol. 36, 7, pp. 1-2.
[15]:	Koffas, Zachary L. Fowler&Mattheos A. G. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. Springer. 2009, Vol. 799–808, 83,pp. 1-2.
[16]:	A. N. Panche, A. D. Diwan et S. R. Chandra. Flavonoids: An Overview. <i>Journal Of Nutritional Science</i> . 2016, Vol. 5, 47, pp. 2-3
[17]:	Borbulevych, O.Y., Jankun, J., Selman, S.H., Skrzypczak-Jankun, E. Lipoxygenase Interactions With Natural Flavonoid, Quercetin, Reveal A Complex With Protocatechuic Acid In Its X-Ray Structure At 2.1 Å Resolution. <i>Proteins: Structure, Function And Bioinformatics</i> . 2004, Vol. 54, pp. 13-19.
[18]:	Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., & Kubán, V. Current Trends In Isolation, Separation,Determination And Identification Of Isoflavones: A Review. <i>Journal of Separation Science</i> . 2008, Vol. 31, 2054–2067, pp. 1-2
[19]:	<a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Hesp%C3%A9ridine">https://fr.wikipedia.org/wiki/Hesp%C3%A9ridine</a> 24/05/2022
[20]:	<a href="https://holystrom.com/blogs/herbs/hesperidine">https://holystrom.com/blogs/herbs/hesperidine</a> 24/05/2022
[21]:	CHIHANI, I. (2020). TRAITEMENT PAR LES VEINOTONIQUES: CONSEILS A L'OFFICINE (Doctoral dissertation). 24/05/2022
[22]:	Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA. Hesperidin alleviates doxorubicin-

	induced cardiotoxicity in rats. <i>J Egypt Natl Canc Inst.</i> (2009)
[23]:	Selvaraj P, Pugalendi KV. Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. <i>Exp Toxicol Pathol.</i> (2012)
[24]:	E. M. Galati, M. T. Monforte, S. Kirjavainen, A. M. Forestieri, A. Trovato, M. M. Tripodo, Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): Antiinflammatory and analgesic activity. <i>Farmacologia</i> 40 (1994) 709–712. PMID: 7832973.
[25]:	I. O. Ishola, B. B. Azu, O. A. Adebayo, A. M. Ajayi, I. L. Omorodion, K. E. Edje, O. O. Adeyemi, Prevention and reversal of ketamine-induced experimental psychosis in mice by the neuroactive flavonoid, hesperidin: The role of oxidative and cholinergic mechanisms, <i>Brain Research Bulletin</i> 177(2021)239–251. <a href="https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.10.007">https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.10.007</a> .
[26]:	K. P. Devi, T. Rajavel, S. F. Nabavi, W. N. Setzer, A. Ahmadi, K. Mansouri, S. M. Nabavi, Hesperidin: A promising anticancer agent from nature, <i>Industrial Crops and Products</i> , 76 (2015) 582–589. <a href="https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.051">https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.051</a> .
[27]:	A. Hermawan, A. Khumaira, M. Ikawati, H. Putri, R. I. Jenie, S. M. Angraini, H. A. Muflikhasari, Identification of key genes of hesperidin in inhibition of breast cancer stem cells by functional network analysis, <i>Computational Biology and Chemistry</i> 90 (2021) 107427. <a href="https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107427">https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107427</a> .
[28]:	P. Patel, J. Shah, Protective effects of hesperidin through attenuation of Ki67 expression against DMBA-induced breast cancer in female rats, <i>Life Sciences</i> 285 (2021) 119957. <a href="https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119957">https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119957</a> .
[29]:	V. Aggarwal, H. S. Tuli, F. Thakral, P. Singhal, D. Aggarwal, S. Srivastava, A. Pandey, K. Sak, M. Varol, Md., Md. A. Khan, G. Sethi, Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements, <i>Experimental Biology and Medicine</i> , 245 (2020) 486–497. doi: 10.1177/1535370220903671.
[30]:	S. Kamaraj, P. Anandakumar, S. Jagan, G. Ramakrishnan, P. Periyasamy, S. Asokkumar, R. Subramanian, T. Devak, Hesperidin inhibits cell proliferation and induces mitochondrial-mediated apoptosis in human lung cancer cells through down regulation of $\beta$ -catenin/c-myc, <i>Biocatalysis and Agricultural Biotechnology</i> , 18(2019) 101065. <a href="https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101065">https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101065</a> .
[31]:	C. I. Chukwuma, M. G. Matsabisa, M. A. Ibrahim, O. L. Erukainure, M. H. Chabalala, Md. S. Islam, Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review, <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 235 (2019) 329–360. <a href="https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024">https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024</a> .
[32]:	J. Revathy, S. Srinivasan, S. H. S. Abdullah, U. Muruganathan, Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats, <i>Biomedicine</i>

	& Pharmacotherapy 97 (2018) 98–106. <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.102">http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.102</a> .
[33]:	R. R. Watson, V. R. Preedy, S. Zibadi, Chapter 58, editors. Polyphenols in Human Health and Disease. San Diego: Academic Press; (2014) 747–56. 10.1016/C2011-1-09286-X.
[34]:	Y. Usuf, A. Haggag, N. E. El-Ashmawy, K.M. Okasha, Is hesperidin essential for prophylaxis and treatment of COVID-19 Infection? Medical Hypotheses 144 (2020) 109957. <a href="https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109957">https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109957</a>
[35]:	F. J. Cheng, T. K. Huynh, C. S. Yang, D. W. Hu, Y. C. Shen, C. Y. Tu, Y. C. Wu, C. H. Tang, W. C. Huang, Y. Chen, C. Yi. Ho, Hesperidin Is a Potential Inhibitor against SARS-CoV-2 Infection, Nutrients 13(2021) 2800. <a href="https://doi.org/10.3390/nu13082800">https://doi.org/10.3390/nu13082800</a> .
[36]:	G. H. Attia, S. Y. Moemen, M. Youns, A. M. Ibrahim, R. Abdou, M. A. El Raey, Antiviral zinc oxide nanoparticles mediated by hesperidin and in silico comparison study between antiviral phenolics as anti-SARS-CoV-2, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 203 (2021) 111724. Doi: 10.1016 /j. colsurfb.2021.111724
[37]:	Bentli R, et Recep Bentli <sup>1</sup> , Osman Ciftci, Asli Cetin, Merve Unlu, Nese Basak, Mahmut Cay Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Eur Cytokine Netw. (2013)
[38]:	Stefano Rizza,* Ranganath Muniyappa,* Micaela Iantorno, Jeong-a Kim, Hui Chen, Philomena Pullikotil, Nicoletta Senese, Manfredi Tesaro, Davide Lauro, Carmine Cardillo, and Michael J. Quon
[39]:	Morand C, et Christine Morand, Claude Dubray, Dragan Milenkovic, Delphine Lioger, Jean François Martin, Augustin Scalbert, Andrzej Mazur Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. Am J Clin Nutr. (2011)
<b>Chapitre 2: Dégradation moléculaire.</b>	
[1]:	<a href="https://www.socol.ch/app/uploads/2017/01/la_degradation_des_molecules_organiques.pdf">https://www.socol.ch/app/uploads/2017/01/la_degradation_des_molecules_organiques.pdf</a> visité Le11/06/2022
[2]:	<a href="https://www.aquaportail.com/definition-11111-molecule-organique.html">https://www.aquaportail.com/definition-11111-molecule-organique.html</a> visité Le11/06/2022
[3]:	COOPER B.: « Stability (biodegradability) – Project Horizontal 7 WP4 Final Draft». 2004. p. 41
[4]:	<a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9gradation_d%27un_polym%C3%A8re">https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9gradation_d%27un_polym%C3%A8re</a> visité Le11/06/2022
[5]:	Ranjit, S., Zia ur, R., 2012. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. J., Pharm. Educ. Res. 3 (1).
<b>Chapitre 3: Matériels et Méthodes.</b>	
[1]:	Nadia Taieb, Recherche de métabolites secondaires à intérêt biologique dans les jus commerciaux à base naturelle, thèse de magister, 2010



[2]:	<a href="https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/molecular-modeling">https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/molecular-modeling</a> . Le 09/06/2022.
[3]:	Hartree, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. 1928, Vol. 24(01), 89, pp. 1-17.
[4]:	Roothaan, C. C. J. New Developments in Molecular Orbital Theory. Reviews of Modern Physics. 1951, Vol 23(2), pp. 69–89.
[5]:	Kohn, W., Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. Physical Review. 1965, Vol 140(4A), pp. A1133–A1138.
[6]:	Parr, R. G. Density Functional Theory of Atoms and Molecules. Horizons of Quantum Chemistry, 1980, Vol 3, pp. 5–15.
[7]:	Colas, C., Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, principes actifs utilisés en 71 phytothérapie équine. : Etude par spectrométrie de masse des harpagosides, des éléuthérosides et du cycloarténol, principes actifs utilisés en phytothérapie équine. Thèse de Doctorat, École Polytechnique-Chimie, PARIS, 2006, pp.130.
[8]:	Zohra, M. F. Etude Théorique De L'effet Des Méthylxanthines Sur Le Système Nerveux Central, Thèse de Magister, Université Des Sciences Et De La Technologie D'oran « Mohamed Boudiaf », Faculté Des Sciences De La Nature Et Vie. 2014, p. 34.
<b><i>Chapitre 4: Résultats et Discussion.</i></b>	
[1]	Hanane Messiad, Fatima Zahra Hamamdia, Karima Belguidoum, Nadjat Lemouar, Habiba Amira-Guebailia, Synthesis and spectroscopic characterization of charge transfer complexes of the donor hesperidin and $\pi$ -acceptors; 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4- benzoquinone and tetracyanoethylene, Journal of Molecular Structure 1264 (2022) 133216.
[2]	Jolivet, A. (2006, mars au juin . 27 au 23). présentation orale du stage de "Estimation des limites de détection et de quantification de divers éléments métalliques, dans différentes matrices, par spectrométrie d'émission plasma ICP-AES . deuxième année d'IUT.