

M. Bou. 2008

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur  
Université de Guelma  
Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière  
Département des Sciences de la Matière

19540105

Mémoire du Projet de fin d'étude  
Master 2



Spécialité : Chimie

Présenté par :

**Karkour Karima & Kaidi Radia**

---

---

Etude du métabolisme flavonique des parties aériennes  
du genre *Centaurea Omphalotricha*

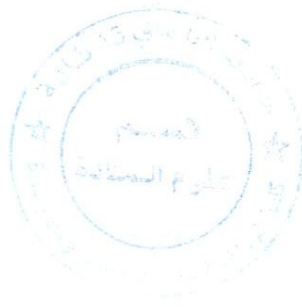
---

---

Sous la Direction de : Monsieur

**Kolli el-hadj**

Juin 2012





# Remerciement

*Tout d'abord on remercie le bon dieu qui nous a donné la force,  
le savoir et la patience pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier infiniment notre directeur de projet*

*M' kolli Elhadj qui nous a guidés,*

*orienté et aidé inconditionnellement pendant ce travail.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur*

*KHATMI DJ et membre de guérie*

*Tous nos enseignants du département des Sciences de la Matière.*

*Finalement on tient à remercier tous*

*ceux qui ont contribué de près*

*et de loin à notre formation.*



# SOMMAIRE

*Tableaux d'abréviation*

*Introduction générale*

## **CHPITER I**

### **I- FLAVONOIDES**

<i>I-1- Introduction</i> .....	3
<i>I-2- Définition des flavonoïdes</i> .....	3
<i>I-3- Classification des flavonoïdes</i> .....	4
<i>I-3-a- Flavones et flavonols</i> .....	4
<i>I-3-b- Flavanones et Dihydroflavanols</i> .....	5
<i>I-3-c- Flavon-3-Ols, Flavan-3-4-Diols et Anthocyanidols</i> .....	6
<i>I-3-d- Chalcones et Aurones</i> .....	7
<i>I-3-e- Isoflavones et neoflavones</i> .....	8
<i>I-4- La substitution de squelette flavonoïque</i> .....	10
<i>I-4-a- L'hydroxylation</i> .....	10
<i>I-4-b- La méthylation</i> .....	11
<i>I-4-b-1- O-méthylation</i> .....	11
<i>I-4-b-2- C-méthylation</i> .....	11
<i>I-4-c- La glycosylation</i> .....	12
<i>I-4-c-1- O-glycosylation</i> .....	12
<i>I-4-c-2- C- glycosylation</i> .....	13
<i>I-5- Biosyntheses</i> .....	14
<i>I-6- Propriétés et activités biologiques des flavonoïdes</i> .....	16

## **Chapitre II**

### **II- les méthodes de séparation, purification et d'analyse des flavonoïdes.**

<i>II-1- Les méthodes de séparation et purification des flavonoïdes</i> .....	17
---	----



## *LISTE DES FIGURES*

<i>N° des figures</i>	<i>Figure</i>	<i>Page</i>
1	<i>Squelette de base des flavonoides</i>	4
2	<i>2-Phenylchromane</i>	4
3	<i>4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone</i>	4
4	<i>flavanone</i>	4
5	<i>Flavone</i>	5
6	<i>Flavonol</i>	5
7	<i>Flavanone</i>	5
8	<i>Dihydroflavonol</i>	5
9	<i>Flavan-3-ols</i>	6
10	<i>Flavan-3,4-diols</i>	6
11	<i>Pélarгонidol</i>	6
12	<i>Chalcone</i>	7
13	<i>Aurone</i>	7
14	<i>Isoflavone</i>	8
15	<i>Neoflavone</i>	8
16	<i>Transfert enzymatique de Lutéoline à Chrysoïol.</i>	11
17	<i>Transfert enzymatique de Ouercétine à 3-Glucosyl quercétine</i>	12
18	<i>La biosynthèse des flavonoides (Bruneton,1999) .</i>	15
19	<i>Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique</i>	25
20	<i>Protocole d'extraction</i>	34
21	<i>Chromatogramme de la fraction Q avec d'autres fractions</i>	38



## LISTE DES TABLEAUX

<i>N° de tableau</i>	<i>Tableau</i>	<i>Page</i>
<b>01</b>	<i>Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques</i>	<b>23</b>
<b>02</b>	<i>Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques</i>	<b>24</b>
<b>03</b>	<i>Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes</i>	<b>25</b>
<b>04</b>	<i>Informations obtenues des séries spectrales UV-Vis.</i>	<b>28</b>
<b>05</b>	<i>Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.</i>	<b>29</b>
<b>06</b>	<i>Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.</i>	<b>29</b>
<b>07</b>	<i>Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne.</i>	<b>35</b>
<b>08</b>	<i>Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne.</i>	<b>35</b>
<b>09</b>	<i>Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne.</i>	<b>36</b>
<b>10</b>	<i>Regroupement final des fractions issues de la colonne.</i>	<b>37</b>
<b>11</b>	<i>Déplacement chimique <math>^{13}\text{C}</math> de composé M5.</i>	<b>39</b>
<b>12</b>	<i>Données de la série spectrale UV du composé M5.</i>	<b>42</b>
<b>13</b>	<i>Données de la RMN <math>^1\text{H}</math>.</i>	<b>44</b>
<b>14</b>	<i>Déplacement chimique <math>^{13}\text{C}</math> de composé M7-3.</i>	<b>45</b>

*SAM : S-adenosyl methionine*

*SAH : S-adenosyl homocysteine*

*DC6 : Polyamide*

*LH-20 : Sephadex*

*d : Doublet*

*dd : Doublet de doublets*

*SM : Spectrométrie de masse*

*IE : Impact électronique*

*IC : Ionisation chimique*

*Introduction*  
*générale*



usages traditionnels et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel.

Le but essentiel de ce travail porte sur l'isolement et purification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes contenus dans la phase butanolique de l'extrait du genre *Centaurea* basant principalement sur les différentes techniques de séparations chromatographiques tels que la chromatographie sur colonne et couche mince et nous essayerons de déterminer les composés isolés à l'aide des méthodes spectroscopique comme l'UV- Visible, RMN proton et carbone 13.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres principaux :

Le premier chapitre est consacré sur une étude bibliographique impliquant la structure, classification, substitutions, biosynthèse et activité biologique des flavonoïdes.

Le deuxième chapitre est également réservé aux techniques et méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement des structures des flavonoïdes.

Le troisième concerne la partie expérimentale qui porte sur l'étude chimique de l'espèce *Centaurea Omphalotricha* de point de vu extraction, séparation et purification de ses métabolites secondaires et nous terminons dans le quatrième chapitre par l'analyse structurale des composés obtenus suivi par une conclusion générale.

*Chapitre I :*  
*Les composés*  
*Flavonoïques*

## I- Flavonoïdes :

### I-1- Introduction :

Les flavonoïdes font partie d'une classe de composés naturels largement répandue chez les végétaux. Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plante, ainsi dans les aliments d'origine végétale (légumes, céréales, légumineuse, fruits, etc.) et les boissons (vin, thé, cacao, etc.) cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génériques et des conditions environnementales [8].

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [9].

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Ils forment une sous-classe des polyphénols. Ils ont été découverts par Albert Szent-Györgyi en 1936 qui a reçu pour cela le prix Nobel de physiologie ou médecine, en 1937. Dans les années 50, Jack Masquelier, de l'université de Bordeaux entreprend une étude des composés flavaniques de l'écorce de pin et des pépins de raisin et dépose des brevets sur la purification des procyanidines oligomères (ou pycnogénol) et leurs utilisations thérapeutiques[10].

### I-2- Définition :

Flavonoïdes (de flavus, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (*Fig. 1*) [11, 12].

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes (plus de 6500) possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (*Fig. 2*) [13].

---



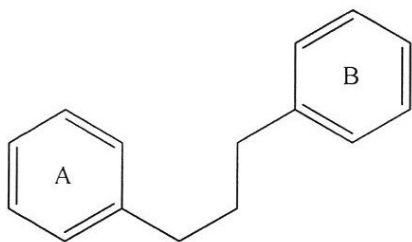


Fig. 1 : Squelette de base des flavonoïdes

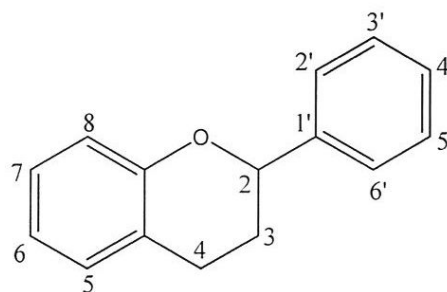


Fig. 2 : 2-Phenylchromane

### I-3- Classification des flavonoïdes :

#### I-3-a- Flavones et flavonols:

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone (Fig. 3) et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (Fig. 4). Cela étant, l'un d'entre eux peut être absent.

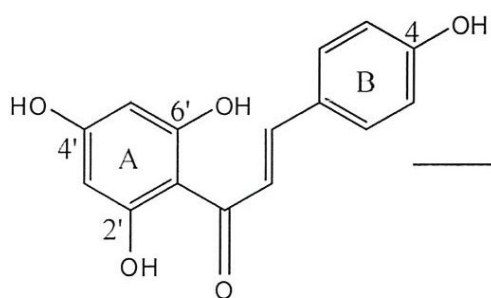


Fig. 3 : 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone

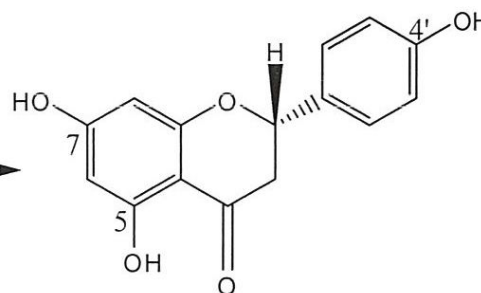
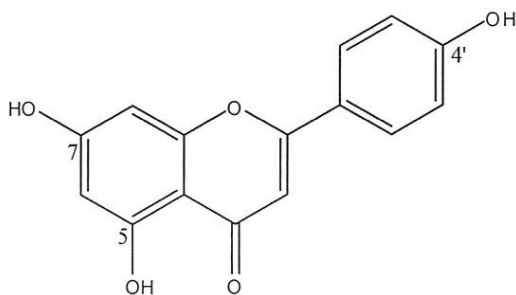


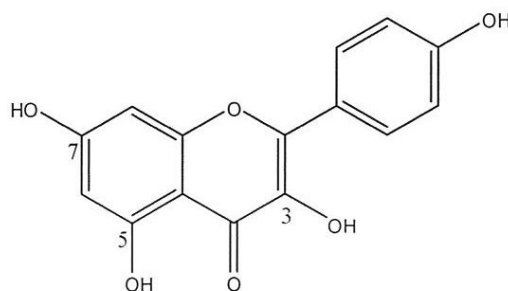
Fig. 4 : flavanone

Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols ( Fig. 5 et 6) est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre. D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3', 4', 5' trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent

être des méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. De plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3 [14].



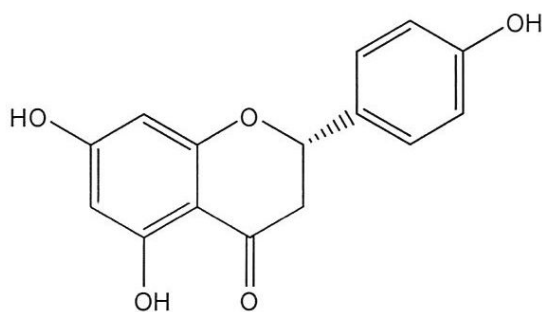
*Fig.5 : Flavone*



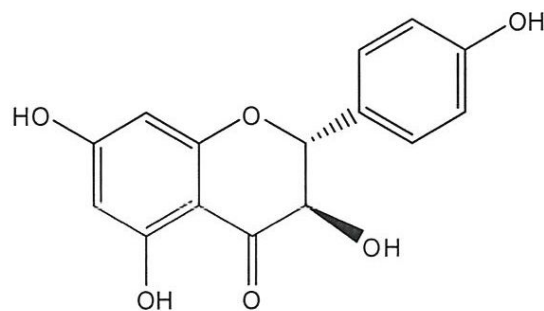
*Fig.6 : Flavonol*

### I-3-b- Flavanones et Dihydroflavonols:

Les flavanones (Fig. 7) et les dihydroflavonols (Fig. 8) sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols [14].



*Fig.7 : Flavanone*

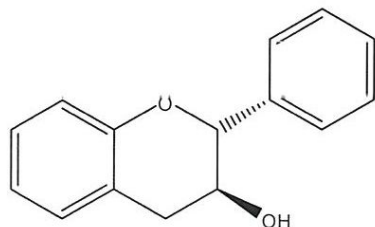


*Fig.8 : Dihydroflavonol*

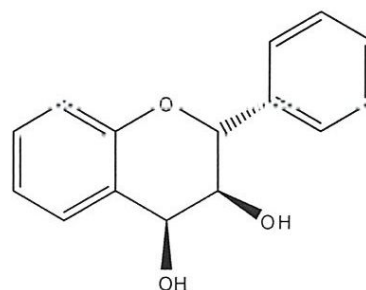
**I-3-c- Flavan-3-Ols, Flavan-3,4-Diols et Anthocyanidols :**

A la différence des flavonoïdes décrits au-dessus, ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols (*Fig. 9*) et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols (*Fig. 10*)).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés [14].

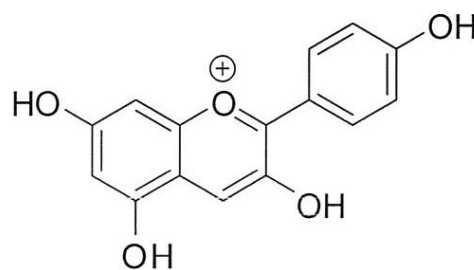


*Fig.9 : Flavan-3-ols*



*Fig.10: Flavan-3,4-diols*

L'anthocyanidols le plus fréquent et le pélargonidol (*Fig. 11*).



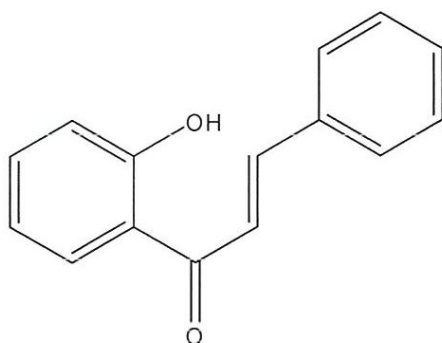
*Fig.11 : Pélargonidol*



Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélargonidol-3-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou kéraçyanine.

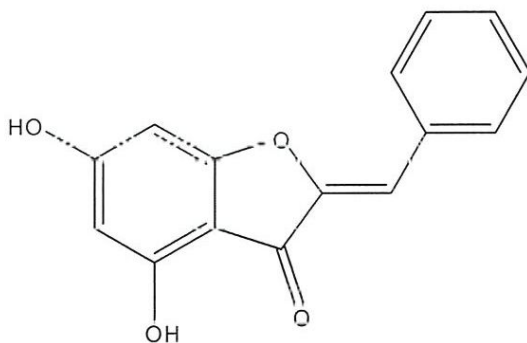
### I-3-d- Chalcones et Aurones :

Les chalcones (*Fig. 12*) diffèrent des autres types de flavonoïdes par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique,  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes [14].



*Fig.12 : Chalcone*

Les aurones (*Fig. 13*) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.



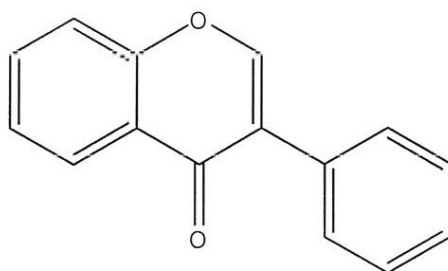
*Fig.13 : Aurone*

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes.

### I-3-e- Isoflavone et neoflavone:

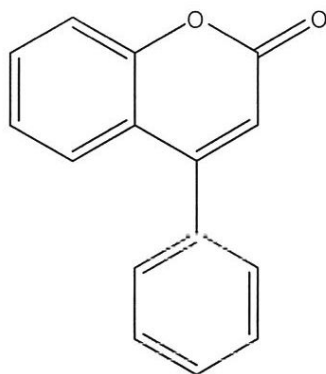
Les isoflavonoïdes (*Fig. 14*) sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses [15].

La structure des isoflavones ne diffère des autres flavonoïdes que par la présence du cycle B en position 3.



*Fig.14 : Isoflavone*

Les neoflavones (*Fig. 15*) sont caractérisées par la substitution entre le groupement carboxyle et le noyau B dans le squelette des flavones. [16].



*Fig.15: Neoflavone*

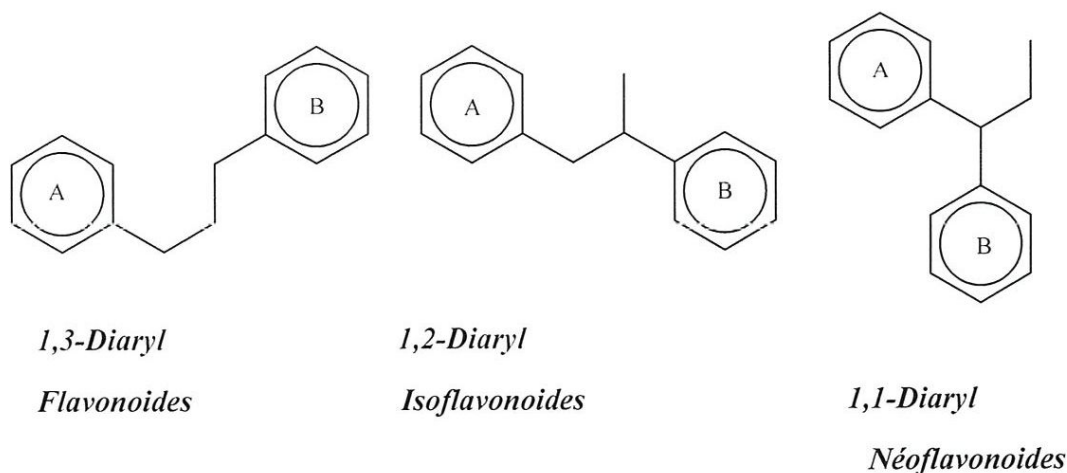
Les neoflavones sont des flavonoïdes rares, cette rareté est due à leur faible présence dans la nature contrairement au flavones et flavonols. [17].

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone [18].

- *Les aglycones :*

Les flavonoïdes aglycones sont des composés possédant quinze atomes de carbone et sont caractérisés par une structure commune. On distingue:



Ce sont des composés très variés, le noyau A est habituellement substitué en 5 et 7. Le noyau B, dans la majorité des cas, est substitué par une fonction oxygénée en para ou en méta et para [19-20]. Les aglycones sont généralement toxiques et peu solubles.

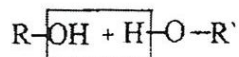


- *Les hétérosides :*

Les hétérosides résultent de la combinaison, avec élimination d'eau, du groupe réducteur d'un sucre avec l'aglycone [21]. Les hétérosides sont de deux types:

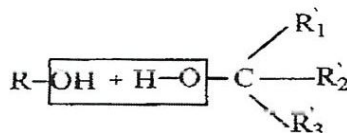
a) - *Les O-hétérosides*

La liaison entre l'aglycone et la partie osidique se fait par l'intermédiaire de l'hydroxyle en 7 chez les flavones et les flavanones et, en 3 chez les flavonols.



b) *Les C hétérosides*

La liaison s'établit entre le carbone anomérique de l'ose qui est généralement le glucose et le carbone 6 ou 8 de l'aglycone qui est le plus souvent une flavone.



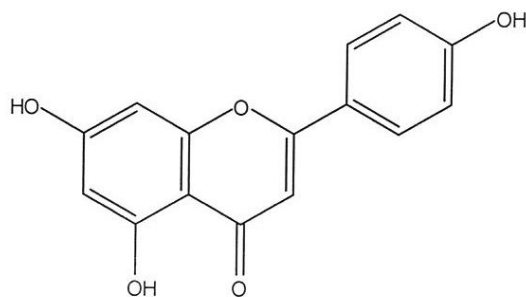
#### I-4- La substitution du squelette flavonique:

Les différents processus de substitution intervenant pour l'élaboration du squelette flavonique sont à l'origine de l'extraordinaire diversité structurale flavonique.

Le nombre, la nature et la position des substituants sur l'aglycone sont subordonnés au fonctionnement des systèmes enzymatiques.

##### I-4-a- L'hydroxylation:

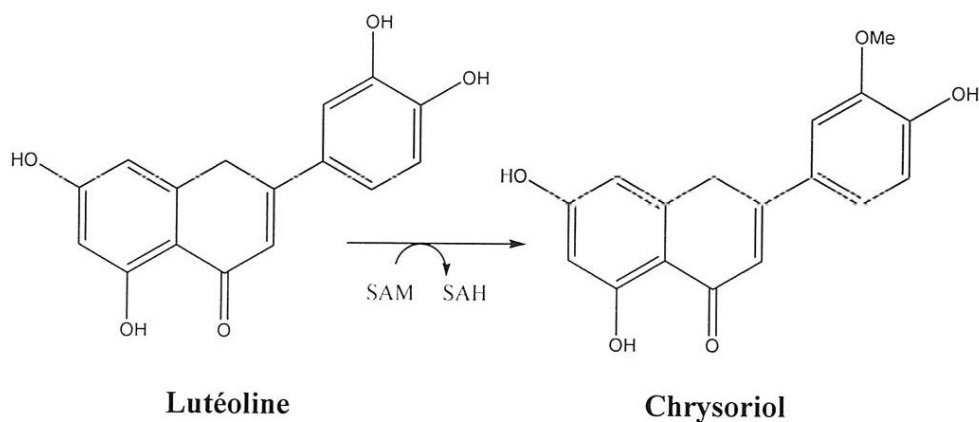
Les hydroxyles originels sont en position 5, 7 sur le noyau A et 4' sur le noyau B, tous les autres seront des extrahydroxyles.

*Apigénine***I-4-b- La méthylation:**

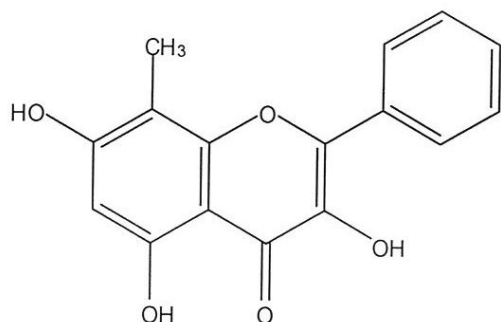
Il y a deux voies pour substituer le noyau flavonique:

**I-4-b-1- O-Méthylation:**

La méthylation des hydroxyles originels et des extrahydroxyles se fait sous l'action de l'enzyme O-Méthyl-transférase comme donneur du groupement méthyle (fig. 16) [22].

**Fig.16: Transfert enzymatique de Lutéoline à Chrysoïol.****I-4-b-2- C-Méthylation:**

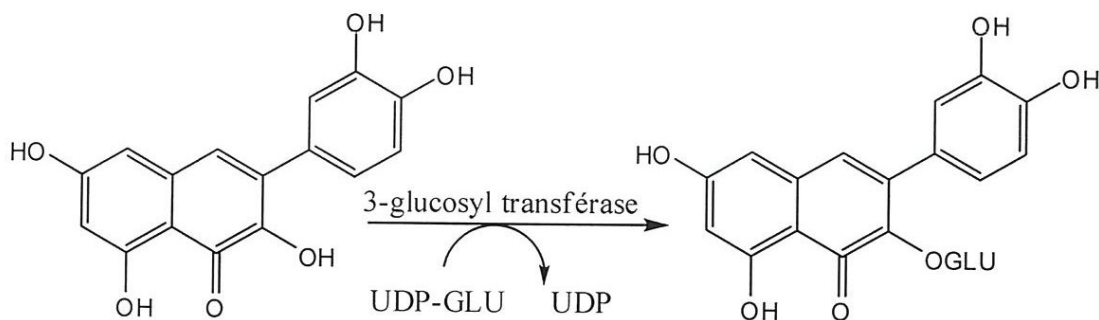
Le radical méthyle se lie au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. La C-méthylation se fait habituellement en C 6 et/ou C 8, parfois en d'autres positions (C-3 et C-7).

*8-C-méthyl galangine****I-4-c- La glycosylation:***

Il y a deux voies pour substituer la molécule du sucre sur le squelette d'aglycone.

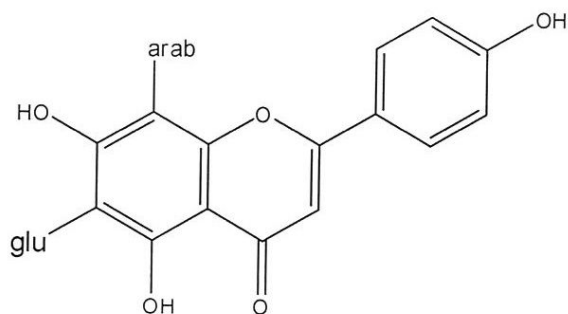
***I-4-C-1- O-glycosylation:***

Dans ce cas, la liaison s'effectue entre un OH phénolique et un OH alcoolique d'un sucre sous l'action de l'enzyme O-glycosyl-transférase et un donneur du sucre comme le UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose) (fig. 17) [23].

*Quercétine**3-Glucosyl quercétine**Fig. 17. Transfert enzymatique de Quercétine à 3-Glucosyl quercétine*

*I-4-C-2- C-glycosylation:*

La liaison s'effectue entre la molécule du sucre et le carbone de l'aglycone, cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [24].



*Schaftoside*

Si un deuxième sucre devait se rattacher à la molécule flavonique, il viendrait se lier soit avec un autre hydroxyle phénolique soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé, mais dans d'autres structures on peut avoir les deux cas [25].



### I-5 – Biosynthèse :

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C<sub>6</sub> (A et B), reliés par une chaîne en C<sub>3</sub>.

Leur biosynthèse (*Fig 6*) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6' - tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2*R*, 3*R*)- dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8): pélargonidol-3-glucoside (*Fig. 18*) [13].

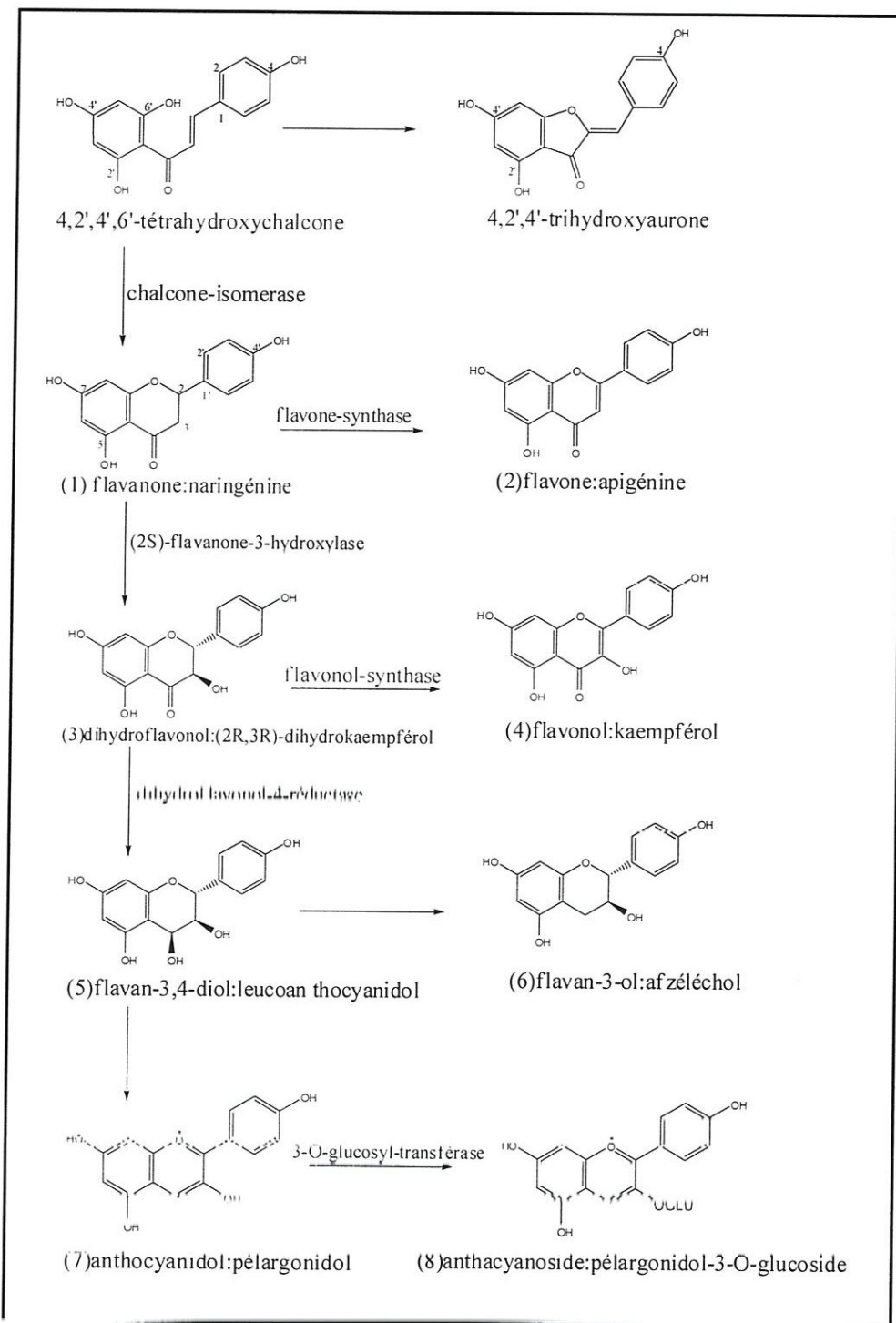


Fig .18 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruncton,1999) .

## I-6- Propriétés et activités biologiques des flavonoïdes :

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, ce qui assurent par ce biais, une étape fondamentale de sa reproduction [26].

On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (**Prix Nobel, 1937**), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) [27]

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées[28].

Des études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière de fruits frais et de légumes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et d'apparition de certains cancers [29]. Ces effets sont attribués, en partie, aux concentrations relativement importantes des flavonoïdes présents dans les fruits et les légumes.

Les flavonoïdes sont également reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités : anti-allergiques et antivirales [30-31], anti-inflammatoires [32-33].

Ces activités sont en général attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux.

*Chapitre II :*  
*Analyse*  
*structurale des*  
*flavonoïdes*



## ***II- les méthodes de séparation, purification et d'analyse des flavonoïdes :***

### ***II-1- Les méthodes de séparation et purification des flavonoïdes:***

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur la technique de chromatographie qui est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successives sur la phase stationnaires soit de leur solubilité différente dans chaque phase [34].

Le principe de séparation commence d'abord par l'extraction d'une quantité importante de plante macérée dans du méthanol ou de l'éthanol (solvant polaire) en présence ou non d'eau. Après filtration et concentration, l'extrait obtenu additionné d'eau distillée subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante menant ainsi à une séparation partielle en fonction de la polarité des constituants. En général, ce travail débute par le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, puis par l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier par le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés. Les phases organiques ainsi obtenues sont séchées, concentrées et soumises à la batterie chromatographique pour la séparation. Les techniques usuelles utilisées pour la séparation des flavonoïdes sont en général :

- Chromatographie sur colonne.
- Chromatographie préparative sur papier.
- Chromatographie préparative sur couche mince

### II-1-a- Chromatographie sur colonne :

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

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

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent la silice ou l'alumine, remplit une colonne de longueur et de section variables : l'échantillon en solution concentrée est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés [35].

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

Six facteurs dont dépend la séparation :

- L'adsorbant (gel de silice, polyamide SC6).
- Eluant (mélange de solvants).
- Dimension de la colonne.
- Remplissage de la colonne (remplissage par voie humide et remplissage par voie sèche).
- Dépôt des produits à analyser.
- La vitesse d'élution.

Le but de la chromatographie sur colonne est d'effectuer une première purification et de parfaire la sélectivité des produits isolés.

Le support chromatographique étant le polyamide SC6 "polycaprolactame" qui permet la séparation des produits phénoliques en général et les produits flavoniques en particulier, et cela par sa "fonction carbonyl- amide" qui donne lieu à de fortes liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles des composés flavoniques [36].

Avant la confection de la colonne, l'adsorbant est mis en suspension dans le solvant de base (toluène ou eau) sous agitation magnétique afin d'homogénéiser la bouillie formée avant de l'introduire dans la colonne (30 g de polyamide pour 1 g de l'extrait). Le choix de la taille de la colonne (longueur et diamètre) est fonction de la quantité de l'extrait brut à étudier. Ce dernier, est solubilisé dans un minimum de méthanol est introduit à l'aide d'une pipette pasteur sur les parois de la colonne confectionnée. Selon la nature des molécules flavoniques deux systèmes de solvants peuvent être utilisés: toluène enrichi de méthanol ou eau enrichie de méthanol.

La progression des différentes substances, suivie en lumière UV dicte les changements de la polarité du mélange éluant d'un gradient à un autre.

Les fractions collectées sont contrôlées par chromatographie sur couches minces, celles qui sont pures sont évaporées à sec et reprises dans du méthanol.

### ***II-1-b- Chromatographie préparative sur couche mince:***

La Chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption [37].

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon est déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont : La cuve chromatographique, la phase stationnaire (gel de silice, cellulose ou le polyamide), l'échantillon et l'éluant.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elles permettent un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse réalisée avec divers



solvants et différents adsorbants révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La Chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par Chromatographie sur colonne.

L'éluant est formé d'un solvant, le tableau suivant résume les systèmes de solvant les plus utilisés pour la séparation des flavonoïdes:

L'adsorbant utilisé est la cellulose ou le polyamide DC6 (support de choix) en solution dans l'éthanol (10 g de DC6 pour 50 ml d'éthanol pour 5 plaques de verre 20 x 20 cm).

On, dépose le produit le long de la plaque à l'aide d'un capillaire, on laisse sécher avant de plonger les plaques dans des cuves contenant un système de solvants qui peut varier selon la nature de l'adsorbant et les produits à séparer.

Les systèmes de solvant les plus utilisés sont:

S1: 4 / 3 / 3: toluène / méthyléthylcétone / méthanol.

S2: 60 / 26 / 7 / 7: toluène / ether de pétrole / méthyléthylcétone / méthanol.

S3: 13 / 3 / 3 / 1: eau / méthanol / méthyléthylcétone / acétylacétone.

S4: 18 / 1 / 1: méthanol / acide acétique / eau.

Après développement des chromatogrammes, les produits sont délimités sous lumière UV, grattés, élués dans le méthanol puis filtrés sous verre fritté. L'éluant obtenu est évaporé sous pression réduite suivis par une ultime filtration sur colonne

La technique CCM a pour avantage [38-39]:

- La rapidité avec une durée de développement de 30 mn à 3 h.
- Une grande sensibilité puisqu'on peut détecter des quantités de l'ordre de 1/ 100 µg.
- Une séparation plus nette pour les mélanges d'isomères.

### **II-1-c- Chromatographie préparative sur papier:**

La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle, comme en chromatographie sur couche mince. L'échantillon mis en solution est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité [40].

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires tels que les acides aminés, les glycosides flavonique [41] et les composés polyfonctionnels.

Le support utilisé généralement est le papier Whatman n° 3 (46 cm x 57 cm), les systèmes de solvants utilisés contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer la séparation et pour éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules [42].

Les solvants chromatographiques de bases sont:

- 1- AcOH: Acide acétique à différentes concentrations.
- 2- B.A.W: [4/1/5]: n-butanol/ Acide acétique/ Eau.
- 3- M.A.W [4/1/5]: Méthanol/ Acide acétique/ Eau.
- 4- T. B. A [3/1/1]: Tertiobutanol/ Acide acétique/ Eau.

Cette technique passe par les étapes suivantes:

- Une chromatographie descendante d'une durée de 8 à 16 heures et quelques fois à front perdu si les substances migrent lentement ou si les Rf sont très voisins.
- Les différentes bandes de produits présents dans le chromatogramme; sont délimitées sous lumière UV 366 nm, selon leur fluorescence [43].
- Les différentes bandes de papiers sont découpées puis broyées pour être éluées dans de l'éthanol chaud.
- Après filtration, la solution est évaporée à sec puis reprise dans du méthanol pour une éventuelle chromatographie sur couche mince.

Les avantages de cette technique sont [44]:

- La séparation d'une grande quantité de produit.



- Détacher le maximum d'acides phénols.

#### ***II-1-d- Purification sur colonne:***

Deux techniques sont utilisées:

- Filtration sur gel de sephadex LH-20; éluant: méthanol. Le LH-20 est un gel gonflant de manière différente d'un solvant à un autre, de ce fait on ne peut travailler en gradient ni changer de solvant une fois l'équilibre établi [40].
- Filtration sur polyamide SC6, éluant: toluène enrichi de méthanol (un gradient d'élution de polarité croissante).

#### ***II-2- Méthodes d'analyse des flavonoïdes :***

La fluorescence sous lumière UV, la valeur de R<sub>f</sub> dans différents systèmes de solvants, les résultats de la spectrométrie de masse (SM) avec différents modes d'ionisation: impact électronique (IE), ionisation chimique (IC), électrospray (ESI) et bombardement par des atomes accélérés (FAB), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) avec ses différentes expériences monodimensionnelles (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT) et bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC, COLOC, NOESY...) et la spectrophotométrie UV-Visible qui donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution, sont les techniques utilisées pour l'identification et la détermination des structures flavoniques.

##### ***II-2-a- La fluorescence sous lumière de Wood :***

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique.

**Le tableau 1** montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [45].

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5-OH Flavonol avec 3-OR, 5-OH, 4'-OH Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH libre en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

**Tableau 1 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures Flavoniques .**

**II-2-b- Facteur de retardement et comportement chromatographique :**

La valeur du  $R_f$  est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit après élution}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant après élution}}$$

Cette valeur varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique [46]. Le **tableau 2** montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$ .

Structure flavonique	R <sub>f</sub>
Augmentation des groupes hydroxyles	R <sub>f</sub> diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
Méthylation des groupements hydroxyles	R <sub>f</sub> augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
Glycosylation	R <sub>f</sub> diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

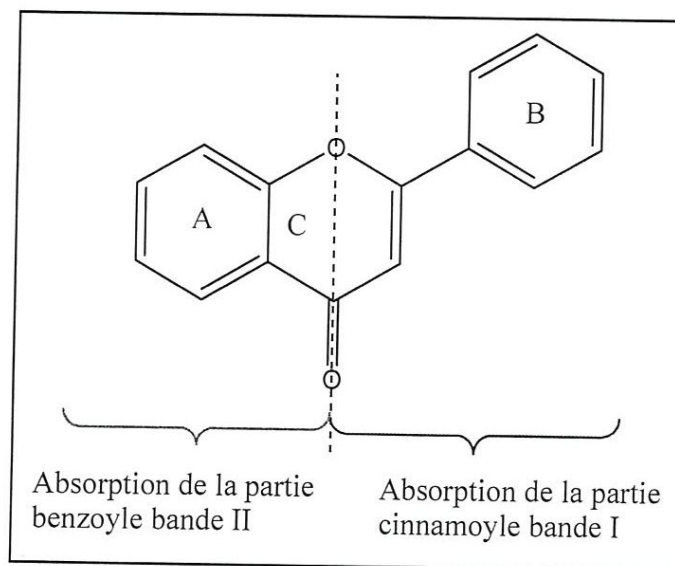
*Tableau 2 : La relation entre le R<sub>f</sub> et la structure flavonique.*

### II-2 -c-La spectrophotométrie UV-Visible :

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales, la bande **I** et la bande **II** [47].

Ces deux bandes représentent les absorptions dans le proche UV, des chromophores composant le squelette flavonique. Ainsi, la bande **I** présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C (**Fig. 19**). La bande **II**, présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [37] (**Fig. 19**).





*Fig. 19: Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique*

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

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavones	320-350	250-270
Flavonols	352-385	250-280
Flavanones	300-330	245-275

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

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus courtes [48].

### II-2 -c-1-Addition de réactifs :

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH,  $AlCl_3$ ,  $AlCl_3+HCl$ , NaOAc et NaOAc +  $H_3BO_3$ . Ces réactifs réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de sels et de complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

#### a) *l'addition de $AlCl_3$ et $AlCl_3 + HCl$ :*

L'addition de  $AlCl_3$  à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et la fonction carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et la fonction carbonyle [49].

Ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I. L'addition de HCl dans ce même échantillon provoque la disparition des complexes instables (complexe formé entre deux hydroxyles) et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle). Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence de  $AlCl_3$  et bien évidemment un effet bathochrome moins important par rapport au spectre dans le méthanol pris comme référence.

#### b) *l'addition de NaOAc + $H_3BO_3$ :*

Le  $H_3BO_3$  est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence de systèmes ortho dihydroxyle sur le cycle B ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) à cause des complexes formés. l'effet qui observé est un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol [50].

#### c) *l'addition de NaOH et de NaOAc :*

##### ➤ NaOH :

L'addition du NaOH indique le nombre et la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement les OH des positions 7, 4 et 3 par un effet bathochromique de la bande I, accompagné ou non d'une augmentation d'intensité renseignant ainsi sur un 4'-OH libre ou substitué. Dans ce spectre, la présence d'un 7-OH libre est déduite de l'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm. Par contre la décomposition de l'échantillon après cinq minutes indique la présence simultanée d'un 3-OH et d'un 4'-OH libres.



➤ NaOAc :

Ce réactif sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui de la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des positions 3, 7 et 4' [50]. Le **tableau 4** donne les informations obtenues des spectres en présence de réactifs [43, 48, 49].

Réactifs	Déplacement (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
<b>MeOH</b>	310-350 330-360 350-385	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol(3-OR) Flavonol(3-OH)
<b>NaOMe (NaOH)</b>	Bande I +40 à 60 avec stabilité d'intensité		4'-OH
	Bande I +50 à 60 avec diminution d'intensité		3-OH et 4'OR
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4'-OR
	Apparition d'une 3ème bande entre BI et BII		7-OH
	Absence de bande entre 320-335		7-OR
	Transformation de bande I en une Inflexion.		5-OH (seul hydroxyle libre)
<b>AlCl<sub>3</sub>/ MeOH</b>	+20 à 15		5 OH
	+60		3-OH
<b>AlCl<sub>3</sub>+ HCl/ AlCl<sub>3</sub></b>	Bande I -30 à -40		Ortho di OH sur le noyau E
	Bande I -20 à -25		Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)

<b>AlCl<sub>3</sub>+ HCl/ MeOH</b>	Bande I +35 à 55	5-OH
	Bande I +17 à 20	5-OH (avec 6- oxygénation)
	Bande I +50 à 60	3-OH ou 3-OH et 5-OH
<b>NaOAc/ MeOH</b>	Bande II +5 à 20	7-OH
	Bande II déplacement très faible	7-OR
	Diminution d'intensité avec le temps	6,7; 7,8 ou 3',4'di OH
	Bande II le spectre se décompose avec le temps	5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3, 3',4'- tri OH
<b>NaOAc+ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Bonde I +12 à 36	3',4' di OH
	+5 à 10	6,7 ou 7,8 di OH

*Tableau 4 : Informations obtenues des séries spectrales UV-Vis.*

#### *II-2-d- La spectrométrie de masse :*

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [53, 54].

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures des substituants des noyaux A et B [55].

Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la FAB, et l'électro-spray.

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

**II-2-e- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :**

Très précise et très efficace, elle est couramment utilisée et permet entre autre :

- La localisation des protons de la molécule [55].
- De déterminer le nombre, la nature et la position des sucres [51,56].
- D'identifier les liaisons C-sucres et O-sucres.
- D'identifier les substituants acylés et leurs sites d'acylation.
- L'identification des substituants oxygénés.

Les tableaux 5 et 6 contiennent quelques déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A et du noyau B [57].

Protons du noyau A Nature du flavonoïde	(H-5)		(H-6)		(H-8)	
	$\delta$ , ppm	$J$ , Hz	$\delta$ , ppm	$J$ , Hz	$\delta$ , ppm	$J$ , Hz
5, 7 – OH			6,0-6,2	d 2,5	6,3-6,5	d 2,5
5-OH, 7-OR (R=Gluc.)			6,2-6,4	d 2,5	6,5-6,9	d 2,5
7-OR (R=H, sucre)	8,0	d 9	6,7-7,1	dd (9,0 ; 2,5)	6,7-7,0	d 2,5
5, 6, 7-OR R=H, sucre 5, 7, 8-OR			6,3	s	6,3	s

**Tableau 5 : Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.**

Protons du noyau B Nature du flavonoïde	(H-2',H-6')		(H-6',H-5')	
	$\delta$ , ppm	$J$ , Hz	$\delta$ , ppm	$J$ , Hz
Flavone (4'-OR)	7,7-7,9	d 8,5	-	-
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1	d 8,5	-	-

**Tableau 6 : Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.**



### III- Etudes phytochimique de l'espèce *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. Pubscens

#### III-1- Description botanique du genre *Centaurea* :

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, multiflores homomorphes ou dimorphes, celle de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque [58].

#### III-2- Description botanique de l'espèce :

Corps des bractées moyennes et appendices concolores, plante sahariennes et vivaces. Fleurs jaunes, plante glabre ; multicaule ; élancée (40-50 cm) et rigide. Feuilles lancéolées, entières ou lobulées à la base, coriaces et pétiolées, gros capitules (2 cm de large sur 3 de long), bractées avec 3-7 épines latérales courtes. Akènes jaune clair, de 3-4 mm, aigrette aussi longue ou plus longue que le corps [58].

#### III-3- Place dans la systématique :

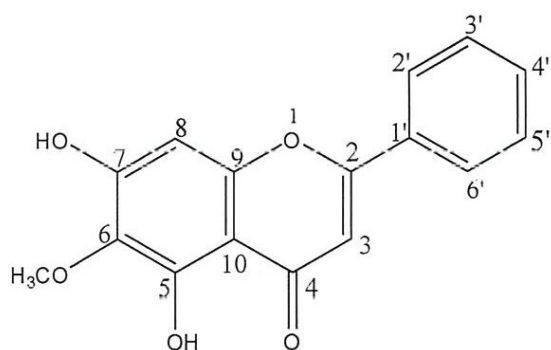
Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Compositae
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>Omphalotricha</i>

### III-4-Etude bibliographique:

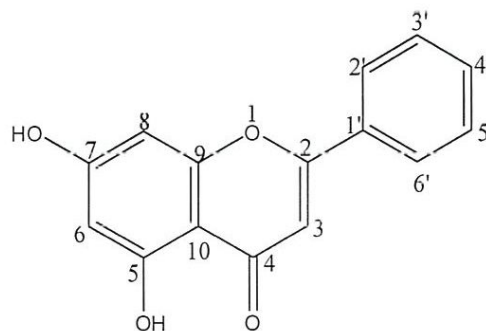
Les seuls travaux effectués sur les parties aériennes de l'espèce *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab ont montré que cette plante est très riche en composés phénoliques [59].

En effet l'étude de la phase dichlorométhane de l'extrait hydro-alcoolique de cette espèce a permis la séparation et la détermination structurale de :

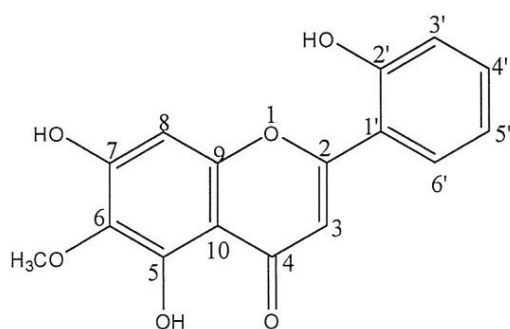
- ✓ quatre Flavones : *5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone* Oroxyline A, *5,7-dihydroxyflavone* Chryisine Ténaxine II et *5,7,2'-trihydroxyflavone* Un Flavonol : Quercétine
- ✓ Deux Triterpènes pentacycliques à squelette lupane et ursane : Lupéol et Taraxastérol respectivement
- ✓ Deux Stéroïdes :  $\beta$ -Sitostérol et Daucostérol .



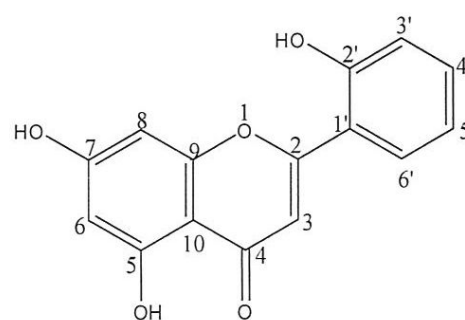
*5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone (oroxyline A)*



*5,7-dihydroxyflavone (chryisine)*

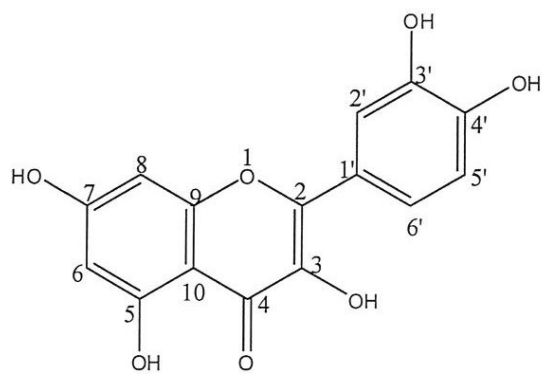
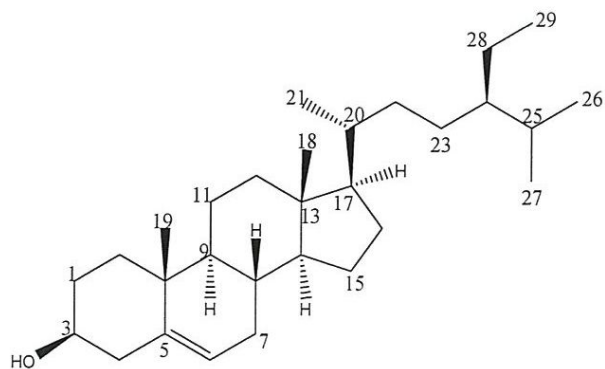
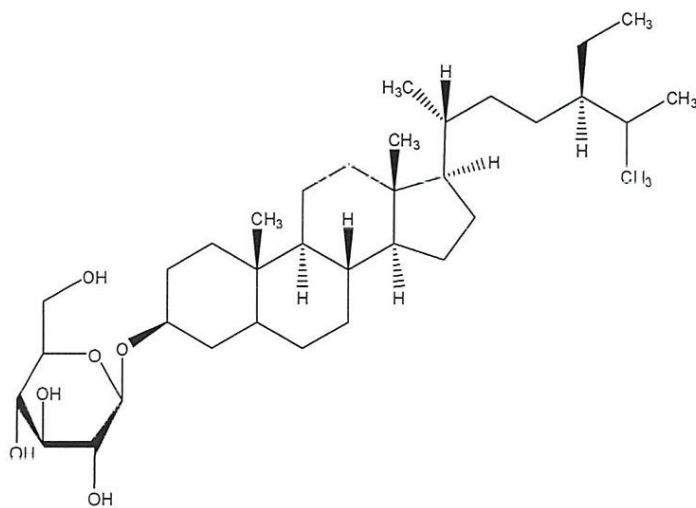
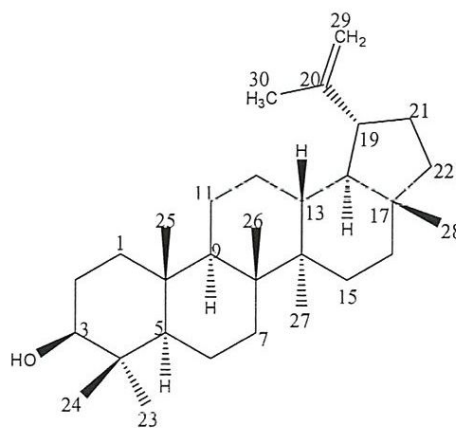
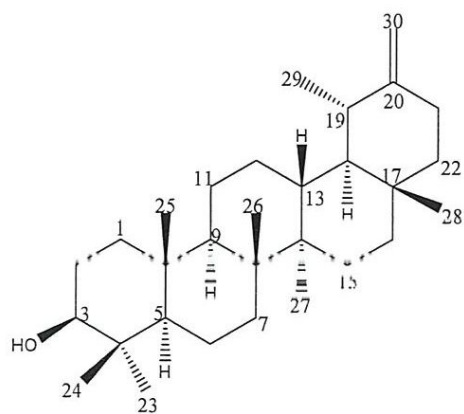


*5,7,2'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (Ténaxine II)*



*5,7,2'-trihydroxyflavone*



5,7,3',4'\_tétrahydroxyflavonol(*Quercétine*)24-éthylcholest-5-èn-3-ol( $\beta$ -*Sitostérol*) $\beta$ -*Sitostérol*-D(+)-glucopyranosyle(*Daucostérol*)*Lup*-20(29)-èn-3-ol(*Lupéol*)18 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -urs-20(30)-èn-3 $\beta$ -ol(*Taraxastérol*)

### III-5-Travaux personnels:

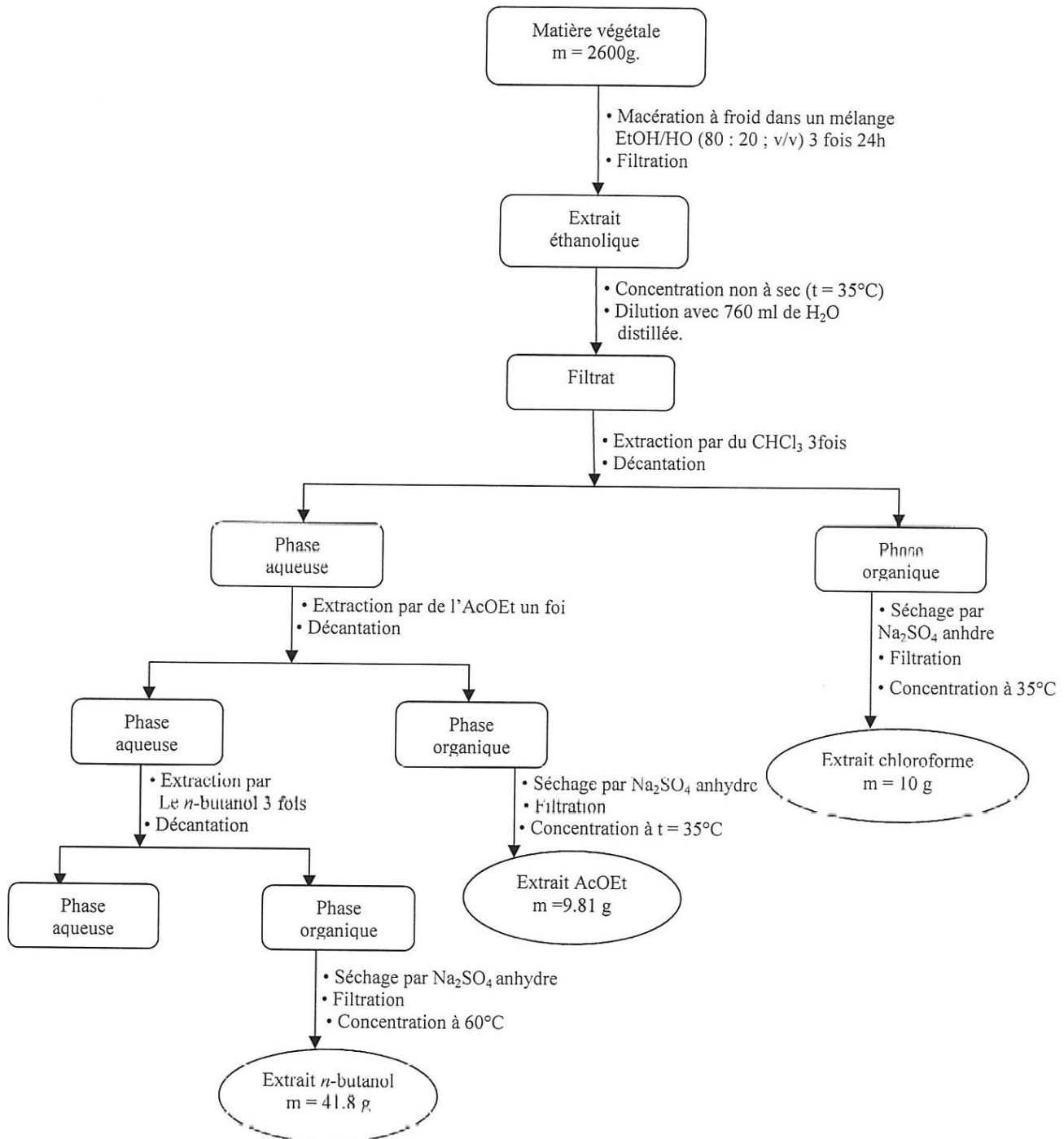
#### III-5-1- Extraction de la plante :

La plante a été récoltée au mois de Mai de l'année 2004, de la région de Béchar, après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes broyées sont pesées ( $m=2600$  g) et mises à macérer dans un mélange hydro alcoolique dans les proportions (80 :20).

Après filtration, concentration à une température n'excédant pas  $35^{\circ}\text{C}$ , L'extrait brut obtenu est dissout dans une quantité d'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche.

La solution obtenue est épuisé 3 fois par du chloroforme. La phase organique séchée par ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre), filtrée et concentrée à sec à une température n'excédant pas  $35^{\circ}\text{C}$ , donnant un extrait chloroformique de 10g. La phase aqueuse est reprise et épuisée successivement 3 fois avec l'acétate d'éthyle, puis cinq fois au n-butanol. Les deux phases organiques sont séchées au sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) filtrées et concentrées à sec pour donner 9.8 g pour l'extrait Acétate d'éthyle et 41,8 g de l'extrait Butanolique.

Le protocole d'extraction est résumé dans la Figure 20.



*Fig. 20 : Protocole d'extraction.*

**III-5-1-1- Etude d'une fraction de l'extrait Acétate d'éthyle (feuilles) :**

Les essais chromatographique menés sur cette fraction sur des plaques analytiques de gel de silice a permis de choisir le bon système d'élution de la colonne, en effet une masse de 420 mg a été dissoute dans le minimum de solvant (MeOH) puis elle a été mélangé avec un peu de silice puis séché sous vide jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène, cette poudre a été déposée sur une colonne de gel de silice (55 g) préparée dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis éluee ensuite par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  enrichi progressivement par l'acétate d'éthyle.

Le suivi de la séparation de la colonne et le rassemblement des fractions a été établi sur la base de leur apparition sous l'UV visible, les résultats finale sont récapitulés dans les tableaux suivants :

Solvant AcOEt(%)	0	10	20	25	30	50	MeOH Pur	H <sub>2</sub> O
Lot de fraction	0-2	3-18	19-42	43-74	75-106	107-138	139-140	141-142
Volume De chaque fraction (ml)	100	25	25	25	25	25	50	100

**Tableau 7 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne.**

N° de fraction	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
Pot de même composition	1-2	3-12	13-27	28-35	36-42	43-57	58-71	72-91	92-108	109-121	122-137	138-140	141-142

**Tableau 8 : Regroupement final des fractions issues de la colonne.**

**III-5-1-1-A- Etude de la sous-fraction M5:**

L'analyse de la sous-fraction M5 (11 mg) par une plaque analytique de gel de silice CCM, utilisant comme système d'élution le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (46 :04) a montrée que cette fraction renferme une seule tache majoritaire de coloration noir violette sous la lampe UV à 365 nm et de couleur jaune après révélation par l'acide sulfurique il s'agit d'un produit pur noté M5.



**III-5-1-1-B- Etude de la sous-fraction M7:**

La sous-fraction M7 (21.8 mg) est soumise à une chromatographie sur plaque préparatif de gel de silice (GF 254) éluée par le système :

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (100 :10 :01) a conduit d'isoler un composé pur de coloration noir violette sous la lampe UV à 365 nm et jaune après révélation par l'acide noté M7-3 (11.3 mg).

**III-5-1-2- Etude d'une fraction de l'extrait n-butanol (fleurs) :**

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur l'extrait brut de la phase n-butanol en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice 60 F254. La meilleure séparation a été obtenue avec le système:  $\text{CHCl}_3$  / MeOH dans les proportions (8 : 2). Cette analyse confirme également leur richesse en composés phénoliques en montrant sous lumière de Wood des spots de couleur jaunes, bleus et noir-violet.

10 g de l'extrait ont été déposés sur une colonne de gel de silice 60 préparée dans le chloroforme. L'éluion a été faite par du chloroforme avec un gradient de méthanol comme le montre le tableau 9.

<b>MeOH %</b>	0	2	5	10	15	20	100
<b>Lot de fraction</b>	1-20	21-36	37-43	44-61	62-65	66-68	.
<b>Volume de chaque fraction</b>	75	75	75	100	200	200	.

**Tableau 9 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne.**

Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV visible (254 et 365 nm), puis révélées par une solution d'acide sulfurique ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$  ; 80/16/4) et chauffées à 100 °C pendant 3min. Les pots de même composition sont rassemblés, donnant ainsi 24 fractions. Le tableau 10 rassemble les résultats de cette colonne.



<i>Fraction</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
pots de même composition	1-4	5-8	9-17	18-22	23	24	25	26-27
<i>Fraction</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>O</i>	<i>P</i>
pots de même composition	28-33	34-36	37-39	40-43	44-48	50-55	56-61	62
<i>Fraction</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>U</i>	<i>V</i>	<i>W</i>	<i>X</i>
pots de même composition	63	64	65	66	67	68	69	70

**Tableau 10 : Regroupement final des fractions issues de la colonne.**

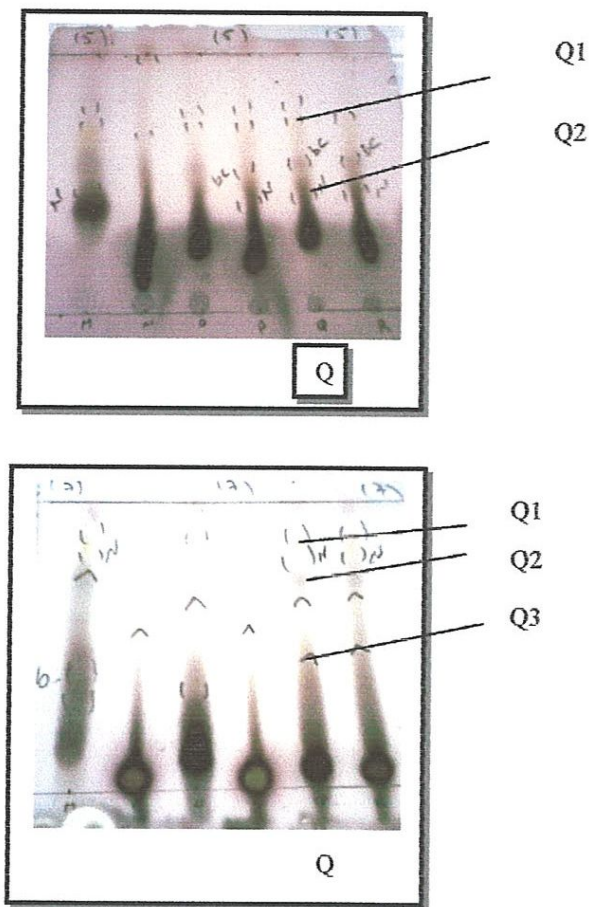
### III-5-1-2-A- Etude de la fraction Q :

Les tests préliminaires effectués sur cette fraction ont montré que ces deux systèmes :

S (I) :  $\text{CHCl}_3$ /méthyléthylcétone/ acétone, en proportion 15/3/1,2.

S (II) : méthyléthylcétone/  $\text{CHCl}_3$  / MeOH, en proportion 18/12/0,4.

Sont les meilleurs systèmes de séparation et montrent ainsi plusieurs taches dont deux sont bien séparées comme le montre la figure N°21.



**Fig. 21 : Chromatogramme de la fraction Q avec d'autres fractions**

Vu la couleur de leur fluorescence sous lumière UV à  $\lambda=365$  nm nous nous sommes intéressé à la tache de couleur noir violet.

Cette fraction a subit une séparation sur plaques préparatives de gel de silice en utilisant dans une première étape comme système (I) et dans la deuxième étape le système (II).

Cette étude a mené à la séparation de deux produits à l'état pur il s'agit de : Q1 et Q2

Le deuxième système S (II) a montré également une troisième bande de couleur toujours noir violet sous lumière UV par apport au premier système ce qui nous a poussé à augmenter le nombre d'éluion pour obtenir une troisième produit nommé Q3.

*Chapitre IV :*  
*Résultats et*  
*discussions*

## IV-résultats et discussion :

### IV-1- interprétation du composé M5 :

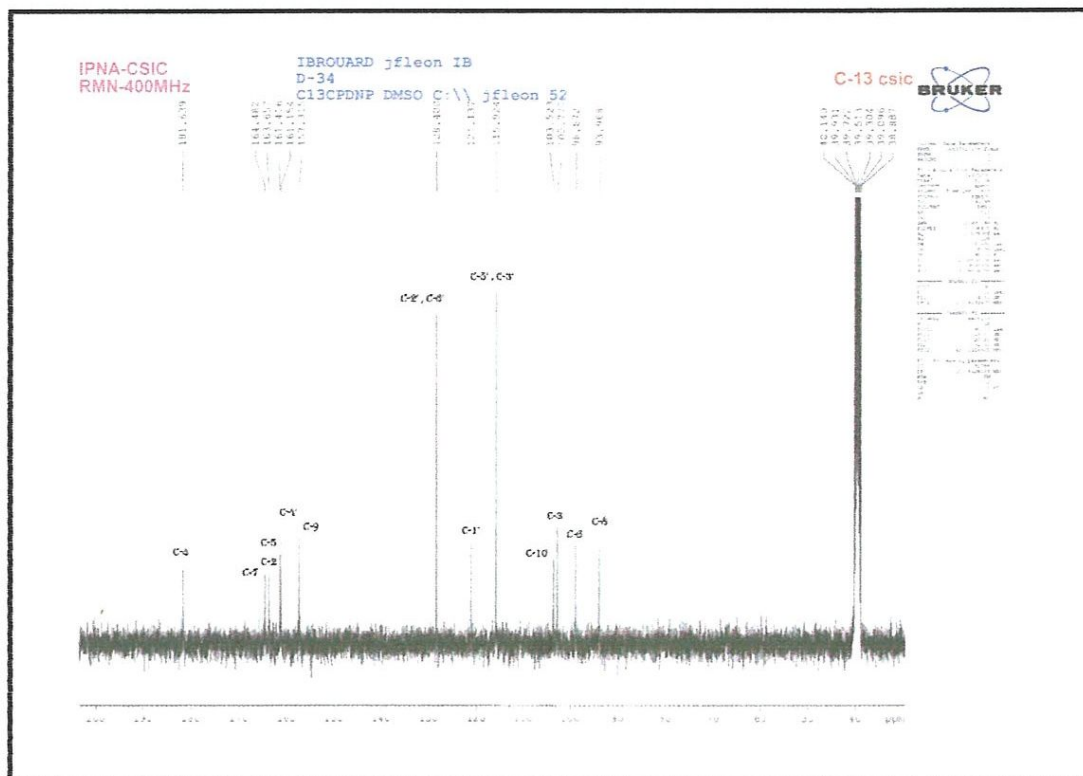
L'examen du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé (spectre I) montre la présence de quinze atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- huit carbones quaternaires dont:
  - un à  $\delta = 181.63$  ppm d'un carbonyle.
  - cinq à  $\delta = 164.48$ ,  $\delta = 163.65$ ,  $\delta = 161.41$ ,  $\delta = 161.15$  et  $\delta = 157.31$  ppm caractéristique d'un carbone oxygéné.
  - deux à  $\delta = 121.13$  ppm et  $\delta = 103.52$  ppm attribuable à un carbone hybridé  $\text{SP}^2$ .
- sept groupements CH dont:
  - deux carbones identiques à  $\delta = 128.4$  ppm.
  - deux carbones identiques à  $\delta = 115.92$  ppm.
  - Trois à  $\delta = 102.77$ ,  $\delta = 98.87$  et  $\delta = 93.96$  ppm.

Carbone C	Déplacement chimique $\delta$ (ppm)
C-2	163.65
C-3	102.77
C-4	181.63
C-5	161.41
C-6	98.87
C-7	164.48
C-8	93.96
C-9	157.31
C-10	103.52
C-1'	121.13
C-2', C-6'	128.40
C-3', C-5'	115.92
C-4'	161.15

*Tableau 11 : Déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  de composé M5.*



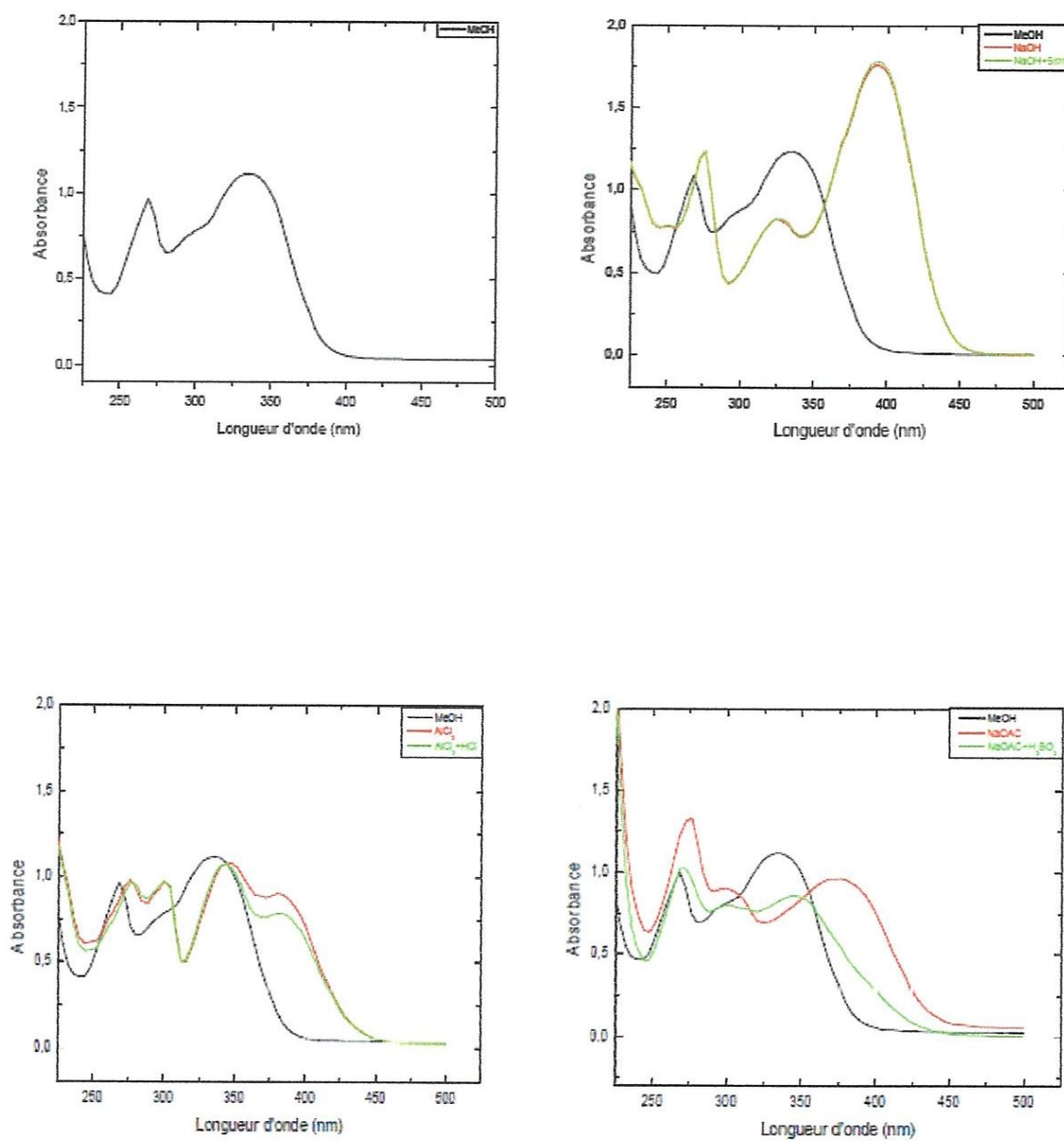


*Spectre I : RMN de  $^{13}\text{C}$  de composé M5*

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

L'étude de la série spectrale UV (spectre II) montre :

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



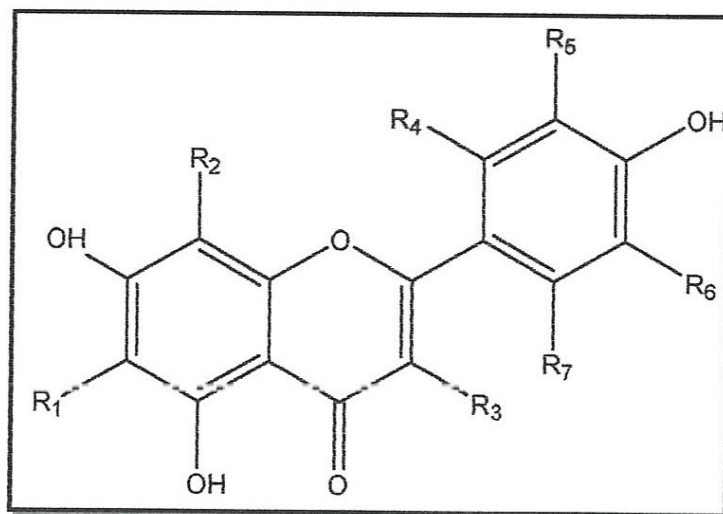
*Spectre II : Série spectrale UV du Composé M5*

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau 12.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	335	/	268	flavone
+NaOH	392	324	274	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl <sub>3</sub>	382	348 300	274	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH Sur le cycle B
+AlCl <sub>3</sub> /HCl	380	344 300	274	
+NaOAc	380	306	276	OH libre en 7
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338	/	269	/
Spectre stable avec NaOH après 5mn				

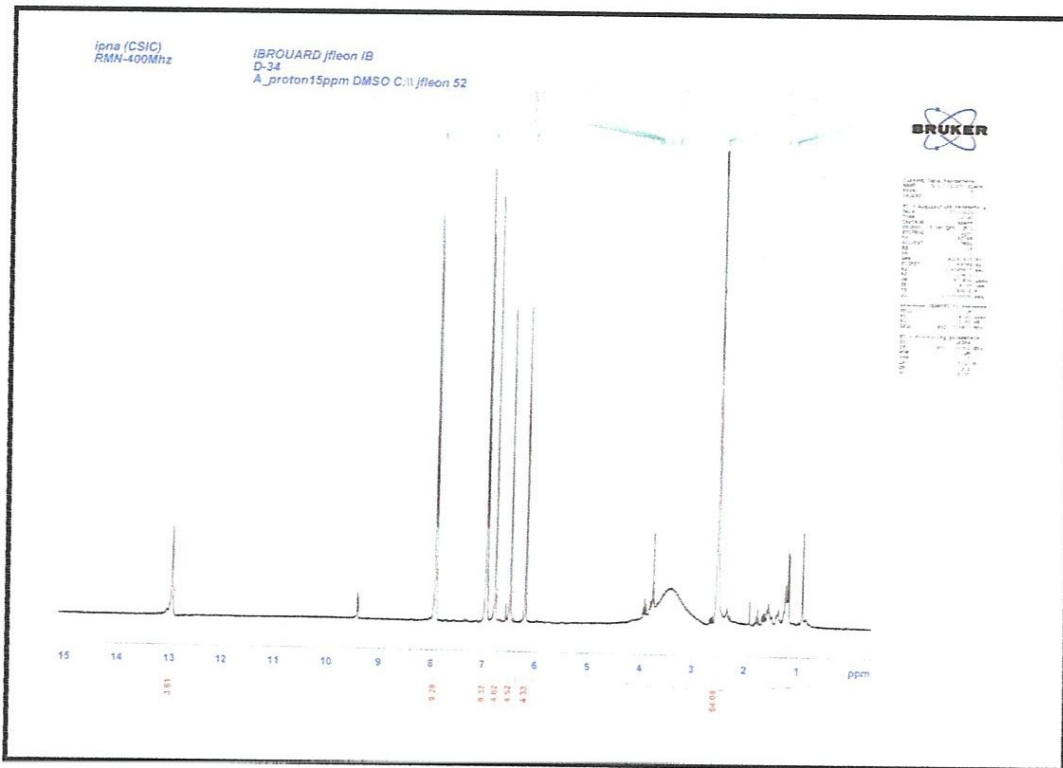
**Tableau 12 : Données de la série spectrale UV du composé M5.**

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :

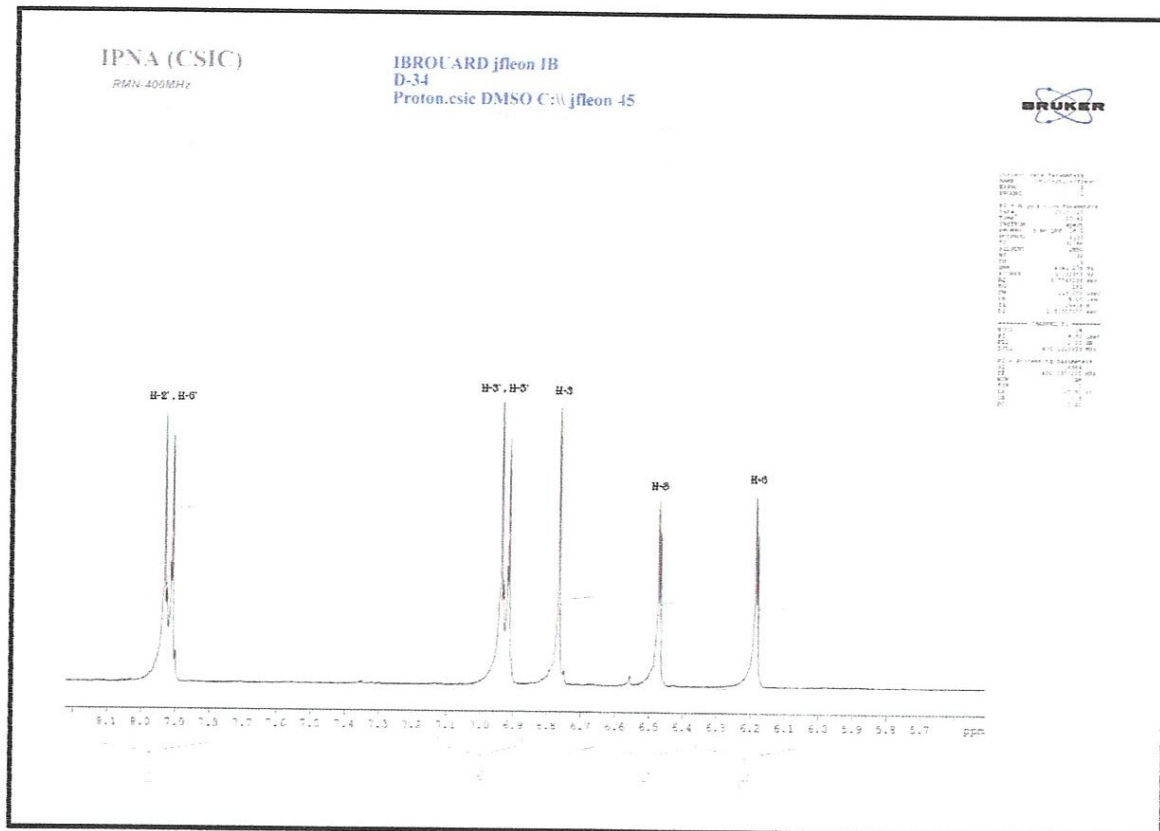


Avec R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> différents de OH

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H (spectre n° III) montre:



*Spectre III : RMN de <sup>1</sup>H de composé M5*



*Spectre III-1 : étalement RMN de <sup>1</sup>H de composé M5*



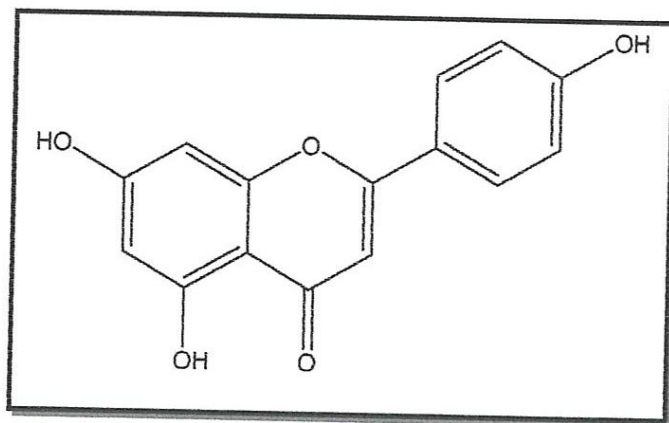
- Un singulet à  $\delta = 6.76$  ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H pour chacun, le premier à  $\delta = 6.46$  ppm, le second à  $\delta = 6.18$  ppm ( $J = 2.0$  Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.
- Le doublet de doublet qui apparaît à  $\delta = 6.92$  ppm avec les constantes de couplages  $J = 6.84$  Hz et  $J = 2.0$  Hz, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-3' et H-5', de même les constantes de couplages  $J = 6.84$  Hz et  $J = 2.0$  Hz du doublet de doublet qui apparaît à  $\delta = 7.91$  ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau 13

Déplacement Chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7.91	2H	dd (6.84 ; 2.0)	H-2' ; H6'
6.92	2H	dd (6.84 ; 2.0)	H-3' ; H-5'
6.76	1H	s	H 3
6.46	1H	d (2.0)	H-8
6.18	1H	d (2.0)	H-6

**Tableau 13 : Données de la RMN <sup>1</sup>H.**

Ces données complètent la structure précédente et montrent que les substituants inconnus précédemment sont des protons menant ainsi à la structure : 4', 5, 7-trihydroxyflavone connue sous le nom Apigénine.



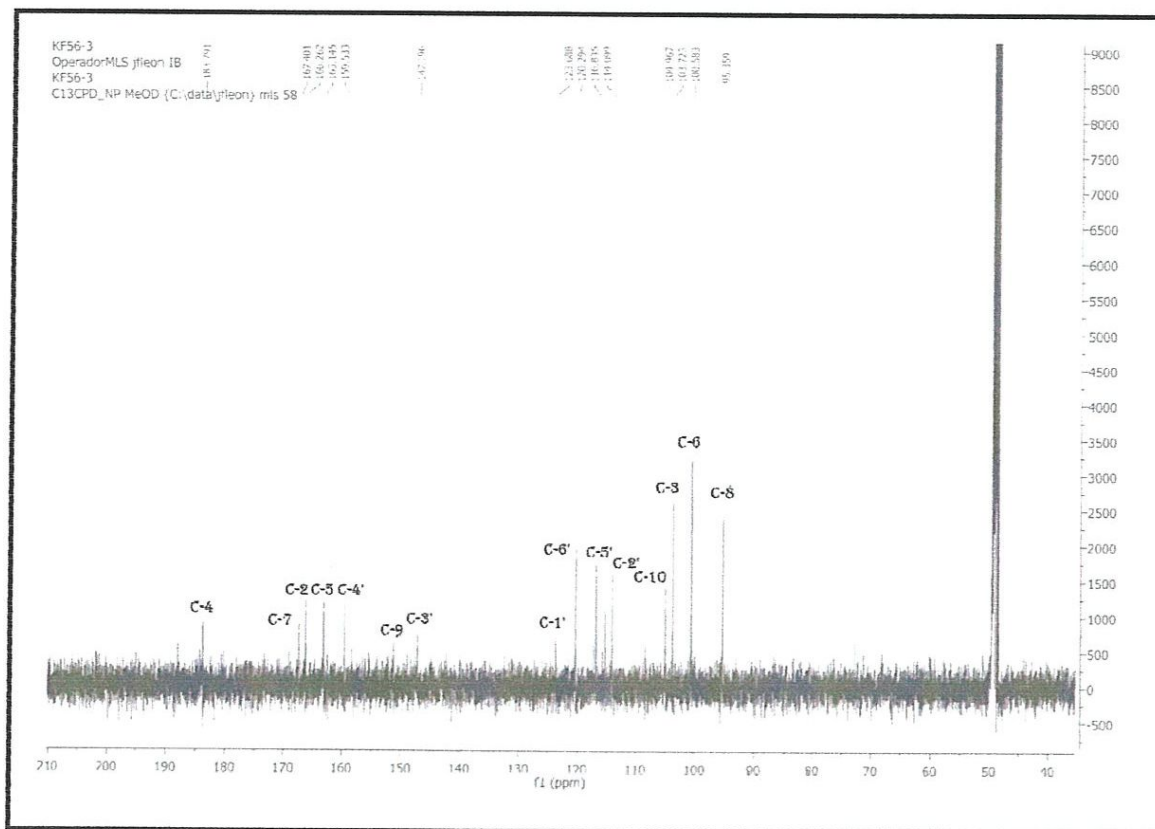
## IV-2- Interprétation du composé M7-3 :

L'examen du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé (spectre IV) montre la présence de quinze atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- neuf carbones quaternaires dont:
  - un à  $\delta = 183.79$  ppm d'un carbonyle.
  - six à  $\delta = 167.40$ ,  $\delta = 166.26$ ,  $\delta = 163.14$ ,  $\delta = 159.53$ ,  $\delta = 152.0$  et  $\delta = 147.19$  ppm caractéristique d'un carbone oxygéné.
  - deux à  $\delta = 123.68$  ppm et  $\delta = 104.96$  ppm attribuable à un carbone hybridé  $\text{SP}^2$ .
- six groupements CH à  $\delta = 120.29$ ,  $\delta = 116.83$ ,  $\delta = 114.09$ ,  $\delta = 103.72$ ,  $\delta = 100.58$  et  $\delta = 95.35$  ppm.

Carbone C	Déplacement chimique $\delta$ (ppm)
C-2	166.26
C-3	103.72
C-4	183.79
C-6	100.58
C-7	167.40
C-8	95.35
C-9	152.53
C-10	104.96
C-1'	123.68
C-2'	114.09
C-3'	147.19
C-4'	159.53
C-5'	116.83
C-6'	120.29

Tableau 14 : Déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  de composé M7-3.



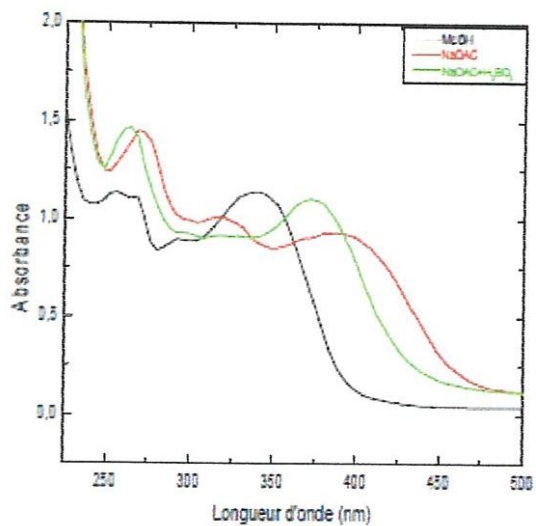
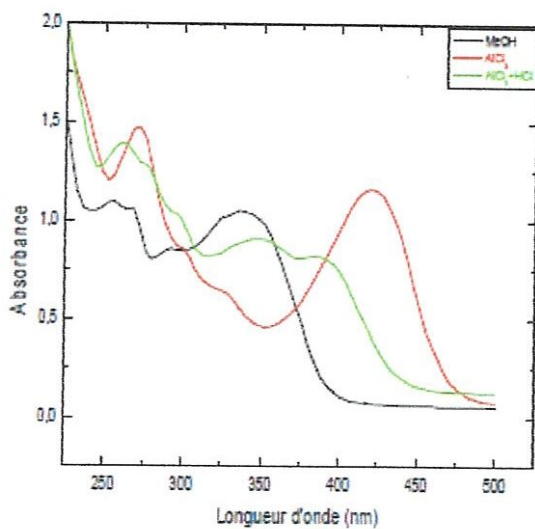
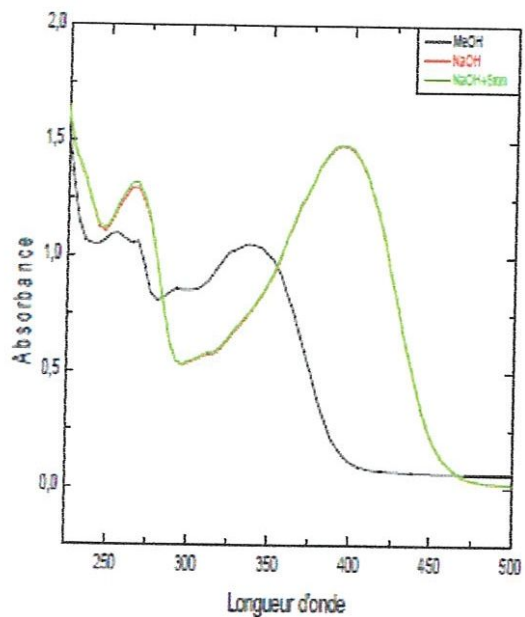
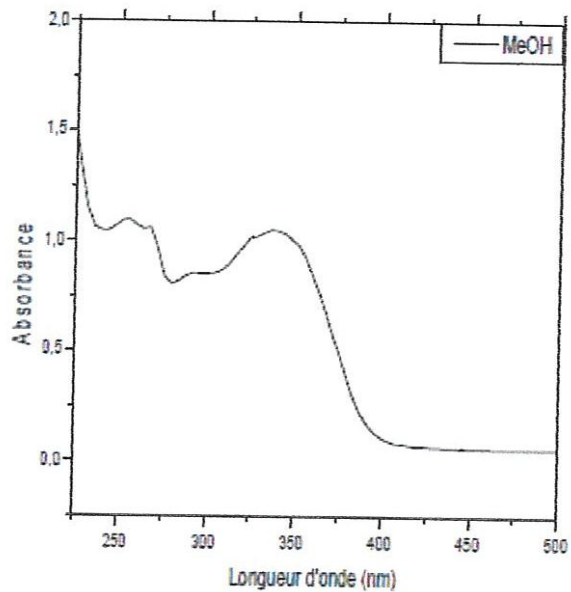
*Spectre IV : RMN de  $^{13}\text{C}$  de composé M7-3*

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

Les données de la série spectrale UV (spectre V, tableau 12) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 350 nm et la fluorescence violette sont en faveur d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 52$  nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 329 nm indique l'existence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = + 5$  nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.
- La comparaison du spectre en présence de NaOAc et ce même spectre après addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  montre un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 29$  nm) dans ce dernier est révélateur de la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = -37$  nm) du spectre enregistré dans le milieu ( $\text{AlCl}_3 / \text{HCl}$ ) comparativement à celui enregistré dans  $\text{AlCl}_3$ .

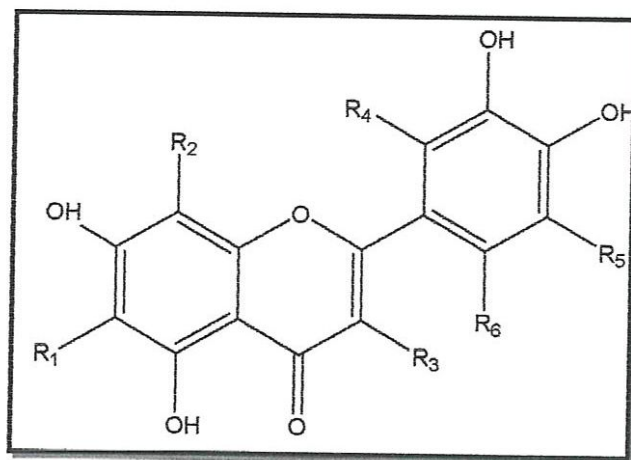
= +35 nm), indique la présence d'un OH libre en 5.



*Spectre V : Série spectrale UV du Composé M7-3*



Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



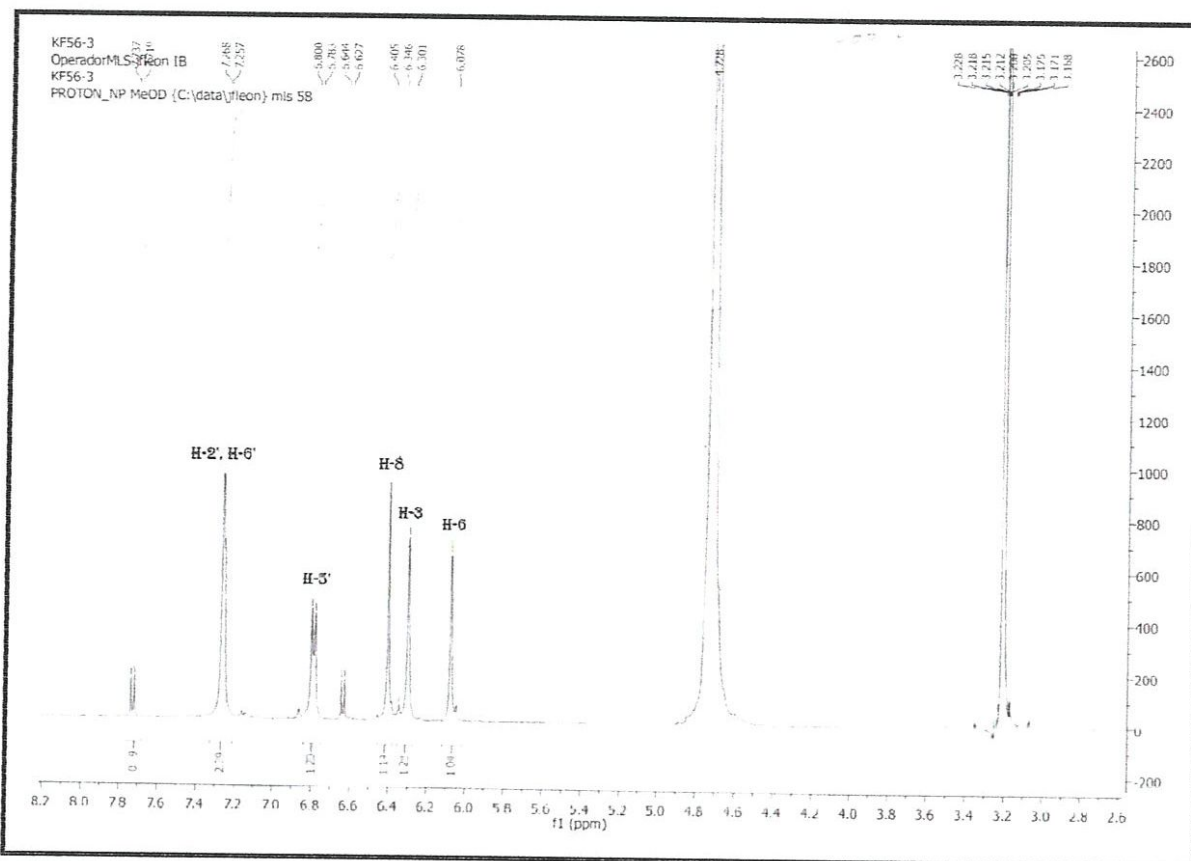
Avec R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> différents de OH et R<sub>3</sub> est un H ou un OR.

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

**Tableau 15 : Données de la série spectrale UV.**

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H montre (spectre VI) :

- Un singulet à  $\delta = 6,3$  ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui permet d'opter pour une structure de type flavone.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 7.26$  ppm attribuable à H-2', un autre signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 7.25$  ppm attribuable à H-6'.
- Le signal à  $\delta = 6.4$  ppm, d'intégration 1H attribuable à H-8.
- Le signal à  $\delta = 6.07$  ppm, d'intégration 1H attribuable à H-6
- Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ( $J = 6.8$  Hz) qui apparaît à  $\delta = 6.79$  ppm, est attribuable à H-5'.



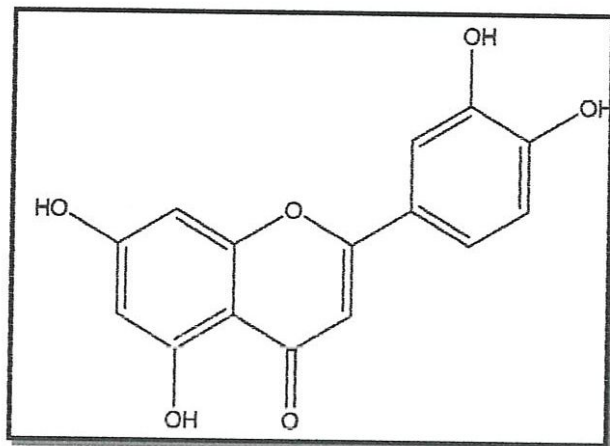
*Spectre VI : RMN de  $^1\text{H}$  de composé M7-3*

Les données relatives à la RMN  $^1\text{H}$  sont reportées sur le tableau 13.

Déplacement Chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7.26 ; 7.25	2H	dd (8.4; 2.0)	H-2' ; H6'
6.79	1H	d (8.4 ; 2.0)	H-5'
6.30	1H	s	H-3
6.40	1H	d (2.0)	H-8
6.07	1H	d (2.0)	H-6

*Tableau 16 : Données de la RMN  $^1\text{H}$*

Toutes ces données permettent de dire que le composé M7-3 correspond à :  
3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone connue sous le nom Lutéoline.



*Conclusion*  
*Générale*



**Références bibliographiques :**

- [1] Dibong Siegfried Didier, Mpondo Mpondo Emmanuel, Ngoye Alfred , Kwin Marie France, Betti Jean Lagarde , *Journal Of Applied Biosciences* **37**, 2496 – 2507.
- [2] Gurib-Fakim A. (2006) *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 1-93.
- [3] Pelt J.M. (2001) *Les nouveaux actifs naturels*, Marabout, Paris.
- [4] Thèse De Doctorat : Amélie Lhuillier : *Contribution A L'étude Phytochimique De Quatre Plantes Malgaches : Agauria Salicifolia Hook.F Ex Oliver, Agauria Polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa Trichophylla Baker (Monimiaceae) Et Embelia Concinna Baker (Myrsinaceae).*
- [5] Hostettmann.K, Marston.A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry reviews* (2002) **1**, 275-285
- [6] Hostettmann.K, Poterat.O & Wolfender.J-L. The potential of higher plants as a source of drugs. *Chimia* (1998) **52**, 10-17
- [7] Gaussen.H, Leroy. H. F. *Précis de botanique, végétaux supérieurs*, 2ème Ed. (1982), 426.
- \* [8] Lugasi A, Hovari J, Sagi K V, *Biol ; Acta. Biol. Szeged*; (2003)**47**, 119-125.
- [9] Justen.U, Knuthsen.P, Leth.T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1998**.
- [10] [www.fr.wikipedia.org/wiki/Flavonoïde](http://www.fr.wikipedia.org/wiki/Flavonoïde).
- [11] C. Duval, R. Duval, « *Dictionnaire de la Chimie et de ses Applications* », Edition.Tec & Doc Lavoisier, Paris, (1978).
- [12] W. Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J. **2007**. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, **2005**, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.
- [13] Bruneton, J ; **1999**. *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales*. Paris.
- [14] ABDELGHAFOUR MARFAK ; (2003) ; Biophysique ; Thèse de Doctorat ; *Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides*. Univ.Limoges ; Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie.
- [15] Stafford.H.A, *role of Flavonoids in symbiol and defuse functions in legume roots*, Bot.rev

(1997) **63**, 27-39.

[16] Eyton.W.B, Ollis.W.D, Sutherland.I.O, Gottlieb.O.R, Tavira magalhaes.M. *Proc. Tetrahedron*, (1965) **21**, 2683.

[17] Elhazimi.H. *Natural product*, (1995) 149-190.

[18] Mucsi.I, Pragai.B.M. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* **1985** **41**(7), 930-931.

[19] J. bruneton, *Eléments des phytochimie et de pharmacognasie* ,Edition loivoisier, paris(1987).

[20] P, Ribereau-Gayon, *les composes phénolique des végétaux*, paris (1968).

[21] J. L, Guignard, L. Cosson, M Henry, *Abrégé de phytochimie*, Edition Masson, Paris, New York, Barcelone Milan, Mexico, Sau Paulo (1985).

[22] M. Jay et ai, Z, *Naturforsh*, **1983**, 38 c, p. 413.

[23] A. Sutter et al, *Arch Biochem. Biophys*, **1975**, **170**, p. 847.

[24] J. Chopin, *Actualité de phytochimie fondamentale*, **1966**, p. 119, 2<sup>ème</sup> série, Editeur, Masson, - Paris.

[25] Z. Kham; B. G. Kolo; M. Aquilo; G. Glabai, *Pure Appl. Sei*, **1998**, **4**(3), p. 255-257.

[26] H. Halbwirth, F. Wurst, G. Forkmann, K. Stich, *Biosynthesis of yellow flower pigments belonging to flavonoids and related compounds*, in: R.M. Mohan (Ed.), *Research Advances in Phytochemistry*, vol. 1, Global Research Network, Kerala, **2000**, pp. 35-49.

[27]. Hollman, P.C.H., **2001**. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects, *J. Sci. Food Agric.* **81**, 842-852.

[28]. Fraga, C.G., Martino, V.S., Ferraro, G.E., Coussio, J.D., and Boveris, A. (1987). Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochem. Pharmacol* **36**, 717-720

[29] Markham, E. R. et Geiger, II. (1994), *RMN <sup>1</sup>H Spectroscopy of flavonoids and their glycosides*. in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *Flavonoids*, Harborne, J. B. (1993), Chapman and Hall, London.

[30] Van Hoof, L., Vanden Berghe, D.A., Hatfield, G.M, Vlietinck, A.J. (1984), Plant antiviral agents: V-3-Methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. *Planta Medica.*, **50**, 513-517.

[31] Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T.D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Azzam,S.,



- Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Berghe, D.V. and Vlietinck, A.J. (2002), Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med.*, **68**, 539-541.
- [32] Brasseur, T. (1989), Anti-inflammatory properties in flavonoids. *J. Pharm. Belg.*, **44**, 235-241.
- [33] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994), Pharmacological Evaluation of the anti-inflammatory activity of a *Citrus* Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 118-122.
- [34] Harborne, J.B., *The Flavonoids*, V.1, eds Chapman and Hall (1975).
- [35] Jurd, L. and Horwitz, R. (1962). *Spectral Properties of flavonoid Compounds In Geissman, T.A. The chemistry of flavonoid compounds*. 107- 155. Pergamon Press New-York.
- [36] R. A. Anderson and J. A. Sowers, *Phytochemistry*, 1968, **7**, p.293-301.
- [37] Markham, K.R., *Techniques of flavonoids identification*, eds academic press (1982).
- [38] K. Randerah, *Chromatographie sur couches minces*, 1971, editeur Gautier Villard.
- [39] G. Vernin, *La chromatographie en couche mince, Techniques et applications en chimie organiques*, 1970, Dunod, Paris.
- [40] A. Ismaili; M. Jay, *Phytochemistry*, 1989, **28**(11), p. 3035-3037.
- [41] K. R. Markham, *Flavones, flavonols and their glycosides*, in "*Methods in plant biochemistry*", (P. M. Dey and J. B. Harborne), 1989, p. 197-232. Academic press.
- [42] J. Loiseleur, *Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie biologique*, 1963, Tomel, fascicule 1; Editeurs Masson et Cie.
- [43] P. Ribireau-Gayon, *Les composés phénoliques des végétaux*, 1968, édition Dunod. Paris.
- [44] J. B. Harborne, *Phytochemical Methods*, 1973, Chapman and Hall.
- [45] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254.
- [46] Berthillier, A. (1972), *La chromatographie et ses applications*, Dunod Paris.
- [47] Jurd, L. and Horowitz, R. (1962), *Spectral properties of flavonoid compounds*, pergamon press, Oxford, 107-2055.

## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une plante endémique appartenant à la famille des Composées du genre *Centaurea*. Ce genre très réputé pour accumuler des métabolites secondaires de type lactones sesquiterpéniques et de type flavonique, Ces deux classes de substances naturelles sont connues pour leurs activités biologiques diverses notamment l'activité cytotoxique et antioxydante.

L'investigation phytochimique des extraits obtenus de cette plante utilisant les différentes méthodes de séparation chromatographique telles que la chromatographie sur colonne et couche mince de gel de silice ont permis l'isolement plusieurs produits à l'état pur et la détermination structurale d'entre eux de deux composés flavonique de type flavone il s'agit de l'apigénine et lutéoline.

Les composés identifiés ont été élucidés principalement à l'aide des techniques physicochimiques usuelles notamment la spectroscopie ultraviolette UV et la résonance magnétique nucléaire RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .