

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT des Sciences de la Nature
et de la Vie



N° :

DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : biodiversité et physiologie
végétale.

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique
Spécialité : biodiversité et physiologie végétale.

Par:

ELKALI Mohammed , BENATHMANE Fouad et
SALMOUNI Khaled

Intitulé

**Screening phytochimique et biologique
des plantes à flavonoïdes**

Soutenu devant le jury composé de:

Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de M'Sila	Présidente.
Dr. SMAILI Tahar	MCA	Université de M'Sila	Rapporteur.
Dr. KANFA Hanane	MAA	Université de M'Sila	Examineur.

Année universitaire : 2020 /2021

Remerciement

مصداقا لقوله تعالى:

(لئن شكرتم لأزيدنكم و لئن كفرتم إن عذابي لشديد)

Tout d'abord on remercie Allah tout puissant de nous avoir donné la volonté, et la patience pour réaliser ce mémoire.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire. Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous offrons nos remerciements et notre respect aux membres du jury , chacun a son nom :

Dr. BENDIF Hamdi MCA Université de M'Sila Présidente.

Dr. SMAILI Tahar MCA Université de M'Sila Rapporteur.

Dr. KANFA Hanane MAA Université de M'Sila Examineur.

**Dr. SMAILI Tahar d'avoir accepté d'encadrer ce travail, ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils constructifs, et son attention.*

**Dr. BENDIF Hamdi , pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

**Dr. KANFA Hanane d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

A toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire.

Khaled , Mohamed et Fouad



Dédicases

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien, leurs encouragements, leurs dévouements exemplaires et leurs énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir. Je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont fait.

A tous mes chers frères et mes soeurs.

Enfin, à tous les étudiants de la promotion : biodiversité et physiologie végétale 2020/2021

Mohammed

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien, leurs encouragements, leurs dévouements exemplaires et leurs énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir. Je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont fait.

A tous mes chers frères et mes soeurs.

Enfin, à tous les étudiants de la promotion : biodiversité et physiologie végétale 2020/2021

Khaled

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères qui existent, à ceux qui ont lutté pour me rendre heureux, à qui je m'efforce de réaliser leurs rêves, ma chère mère et mon cher père.

A tous mes chers frères et mes soeurs.

Et toutes mes amies De la promotion du Master

«biodiversité et physiologie végétale.» 2020-2021

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont Apporté leur soutien.

Fouad

Liste des abréviations

PAL : phénylalanine ammonialyase

CHS :chalcone synthase

CHI :chalcone-isomérase

FSI :flavone-synthétases

FHT : flavanone-3-hydroxylase

FLS :flavonol-synthase

CCM chromatographie sur couche mince

HPLC : chromatographie liquide haute performance

RMN : résonance magnétique nucléaire

CE : électrophorèse capillaire

MPLC : chromatographie liquide à moyenne pression

GC : chromatographie en phase gazeuse

HPLC-MS :Chromatographie liquide haute performance - spectrométrie de masse

CID : dissociation induite par collision

LC – RMN : chromatographie liquide haute performance - résonance magnétique nucléaire

CZE : électrophorèse de zone capillaire

CGE : électrophorèse sur gel capillaire

EOR : espèces oxygénées réactives

LOXs : lipo-oxygénases

PAF: Platelet Activating Factor

Gclc: glutamate-cystéine ligase

AST : aspartate aminotransférase

ALT : l'alanine aminotransférase

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

HSV : virus de l'herpès simplex

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Tableau 01 : Différentes classes de flavonoïdes	11
Tableau 02 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes.....	13
Tableau 03 : : les Plantes médicinales riches en flavonoïdes.....	14
Tableau 04 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV	17
Tableau 05 : : Maximum d'absorption UV des flavonoïdes. Action des réactifs sur l'allure du spectre UV-visible.....	20
Tableau 06 : Séparations Préparatives de Flavonoïdes par HPLC.....	26
Tableau 07 : Séparation des flavonoïdes par chromatographie liquide à moyenne pression.....	28
Tableau 08 : Séparation des flavonoïdes par chromatographie de partition Centrifuge.....	29
Tableau 09 : Systèmes de solvants pour la chromatographie en couche mince de flavonoïdes sur gel de silice.....	31
Tableau 10: Activité antivirale de divers flavonoïdes.....	47

Table des Figures

N°	Titre	page
1	Structure de polyphénols	04
2	classification des polyphénols	05
3	Structure de base des flavonoïdes	06
4	Structure des flavonols	08
5	Structure des flavones	08
6	Structure des flavanones	08
7	Structure des isoflavones	09
8	Structure des flavanols	09
9	Structure de base des anthocyanes	10
10	Principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes	16
11	Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique	18

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviation

Liste des tableaux

Table des figures

Introduction 01

Chapitre I : Les flavonoïdes

1- Généralités sur les métabolites secondaires et les composés phénoliques :

1.1- Les métabolites secondaires. 03

1.2- Les composés phénoliques.04

2- Les flavonoïdes

2.1- Définition06

2.2- Historique.....06

2.3- Classification structurelle07

2.3-1 Les flavonols07

2.3-2 - Les flavones08

2.3-3 - Les flavanones08

2.3-4 - Les isoflavones09

2.3-5 - Les flavanols09

2.3-6- Les anthocyanes.....09

2.4- Nomenclature des flavonoïdes11

TABLE DES MATIERES

2.5- Localisation et Distribution	12
2.5-1 Localisation.....	12
2.5-2 Distribution.....	12
3- Biosynthèse des flavonoïdes	15
4- Biodisponibilité des flavonoïdes	17
5- Caractéristiques physico-chimiques des flavonoïde.....	17
5.1- Caractéristiques chromatographiques	17
5.2- Caractéristiques spectrophotométriques.....	18
5.2-1- Spectre en présence de soude (NaOH)	18
5.2-2- Spectre en présence d'AlCl ₃ et AlCl ₃ +HCl	19
5.2-3- Spectre en présence de NaOAc et NaOAc+ H ₃ BO ₃	19
6- Propriétés physiologiques des flavonoïdes	20
6-1- Rôle attracteur chez les plantes	20
6-2- Rôle protecteur chez les plantes	21

Chapitre II : Séparation et quantification des flavonoïdes

1-introduction	23
2- extraction.....	23
3-Séparation préparative	24
3-1 . Purification préliminaire.....	24
3-2. Méthodes préparatives	24
3-2.1 Chromatographie liquide haute performance	25
3-2.2 Chromatographie liquide moyenne pression	26
3-2.3 Chromatographie de partition centrifuge	27
4- Méthodes d'analyse	29
4-1 Préparation des échantillons	29
4-2 Chromatographie en couche mince	30
4-3 Chromatographie liquide haute performance	32
4-4 Chromatographie liquide haute performance - spectrophotométrie ultraviolette.....	33
4-5 Chromatographie liquide haute performance - spectrométrie de masse	33
4-6 chromatographie liquide haute performance - résonance magnétique nucléaire.....	34
4-7 Electrophorèse capillaire.....	36

Chapitre III : Activités biologiques des flavonoïdes

1- Activité antioxydante	38
--------------------------------	----

TABLE DES MATIERES

2- Activités toxique et pro-oxydante	39
3- Activité anti-inflammatoire	39
4- Activité anti-ulcère	40
5- Effet sur le système cardiovasculaire	40
6- effets antiallergiques.....	41
7- Activité anticancéreuse.....	41
8- Activité hépatoprotectrice	44
9- Activité antivirale.....	45
10- Activitéantibactérienne	47
Conclusion	51
Bibliographie	52

Résumé

ملخص

Abstract

Introduction :

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant 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 composés, les polyphénols 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.

Ces dernières années, nous avons assisté à un grand regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes. Ces derniers ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Nous pouvons dire que ce sont notamment de grands antioxydants et antimicrobiens.

En effet, de nombreuses études ultérieures ont prouvé que les flavonoïdes étaient capables d'inhiber différents types de microorganismes : bactéries, levures, moisissures, protozoaires et même virus. Néanmoins il y avait une grande spécificité entre les molécules actives et les microorganismes visés ; d'où l'importance de bien choisir le flavonoïde approprié.

De même l'activité antioxydante a été attribuée à la majorité des flavonoïdes découverts. Ces derniers avaient la capacité de neutraliser différents types de radicaux libres.

Notre travail porte sur trois chapitres:

- La première traitant une étude généralisée sur les flavonoïdes : leur structure, classification, biosynthèse, ...etc.
- Le deuxième chapitre concerne Séparation et quantification des flavonoïdes
- Le troisième chapitre sera consacré aux Activités biologiques des flavonoïdes

Enfin, on va terminer cette étude par une conclusion générale.

Chapitre 01 :

Les flavonoïdes

Chapitre 01 : Les flavonoïdes

1- Généralités sur les métabolites secondaires et les composés phénoliques :

1.1- Les métabolites secondaires :

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leurs capacités à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils s'accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix *et al.*, 2005**).

Le terme métabolite secondaire est utilisé pour décrire une large gamme de composés chimiques dans les plantes qui ne sont pas impliqués dans les processus biochimique de la croissance et de la reproduction des plantes (**Patra & Saxena, 2010**). Ils ont un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement tel que la protection contre les pathogènes, herbivores, la concurrence entre les plantes et le stress abiotique comme dessiccation et radiation UV (**Greathead, 2003**). Plus de 200.000 structures de métabolites secondaires ont été identifiées (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires sont classés en trois groupes chimiques très variés :

Les polyphénols: constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétale plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 2009**). Ce sont des pigments généralement responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruit (jaune, orange, rouge). Ils sont présent partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Par ailleurs, les polyphénols font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Les

principales sources alimentaires sont les fruits, légumes et les céréales...etc (**Edeas, 2007**).

Les terpénoïdes: constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec près de 15.000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Ce sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbones. La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments caroténoïdes, des stérols, le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel), ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur gout (**Hopkins, 2003**).

Les alcaloïdes: figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine, l'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Ce sont des composés azotés au gout amer qui ont des propriétés chimiques basiques (alcalines) parmi les alcaloïdes on a morphine, coca, caféine (**Reven et al., 2000**).

1.2- Les composés phénoliques :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne Végétale (**Bruneton, 1993**) . Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes le plus représenté et largement distribué dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (**Šaponjac et al., 2016**).

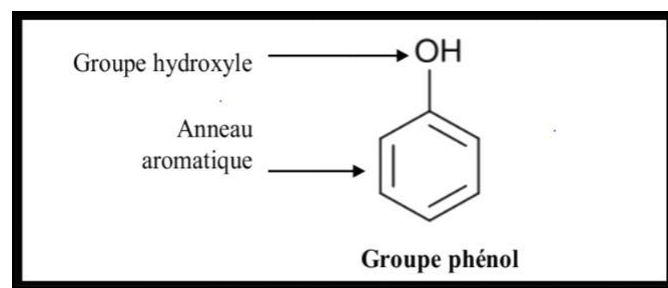


Figure 01 : Structure de polyphénols (**Boros et al., 2010**).

Chapitre 01 : Les flavonoïdes

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (Middleton *et al.*, 2000) . Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002).

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999).

les différents classe de composés phénolique sont représenté dans le **Figure 02** (Bruneton, 1999).

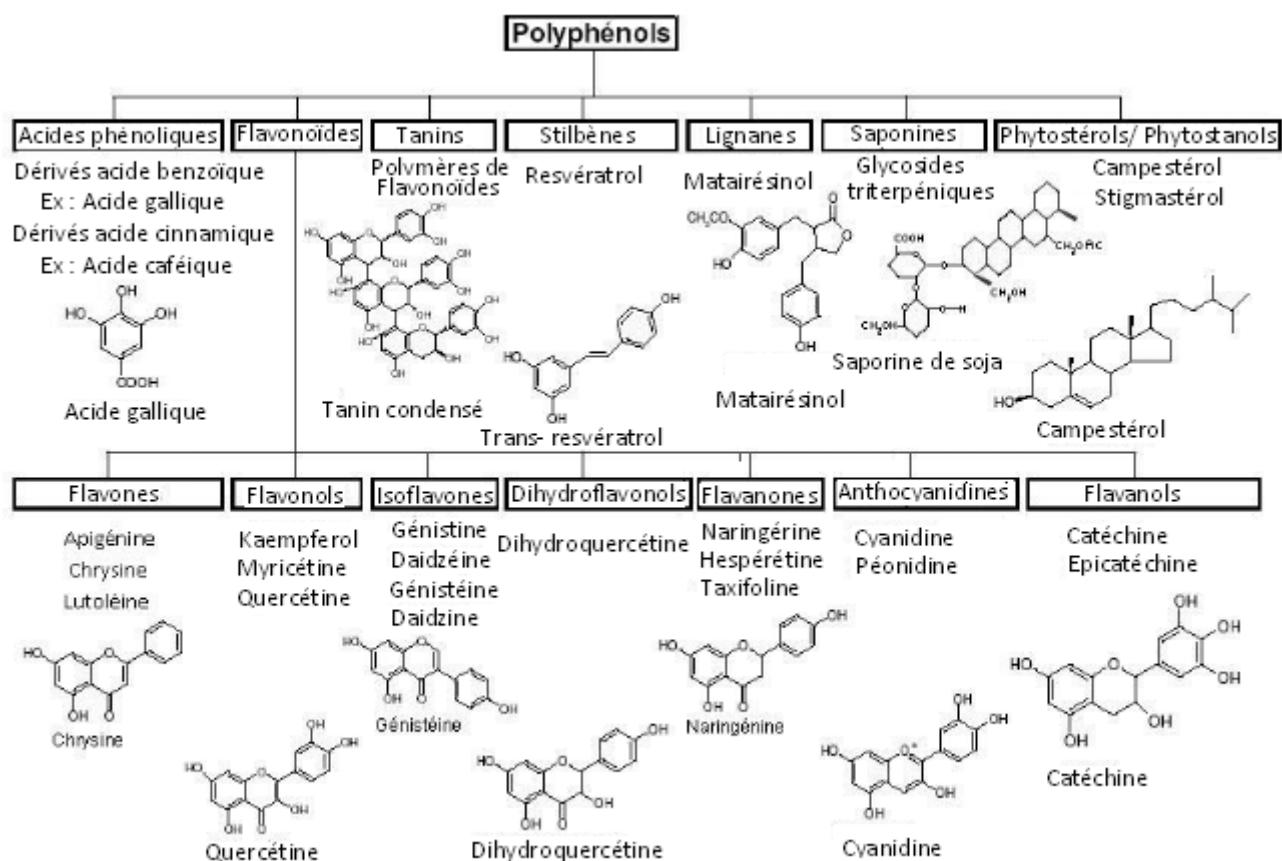


Figure 02:classification des polyphénols (Bruneton, 1999)

2-Les flavonoïdes :

2.1-Définition :

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", . Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. (**Bruneton, 1999 ;Harborne et Williams, 2000**).

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents (**Hernández, 2009**) et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (figure 3). Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (**Bruneton, 2009**). Ces molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. Ils sont localisés dans divers organe : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racine. Les aglycones sont plutôt présents sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons (**Iwashina, 2000**). La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une caractéristiques des flavonoïdes (**El Gharra, 2009**).

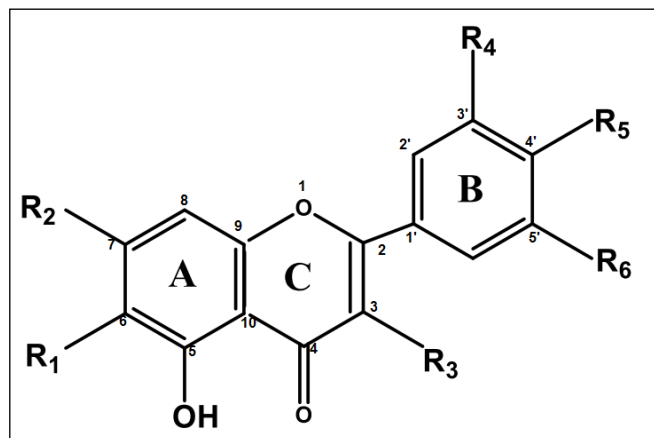


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes(**Hernández, 2009**)

2.2- Historique :

Il y a des siècles, les guérisseurs préparaient des médicaments composés de flavonoïdes et les administraient aux malades. Par exemple, dans la Grèce antique, Hippocrate recommandait la propolis aux personnes souffrant de plaies et d'ulcères (**Cushine et Lamb,**

2005). En Chine, la phytothérapie *Scutellaria baicalensis*, contenant de la baicaleine, la flavone responsable de son activité antimicrobienne, a longtemps été appliquée sur les plaies buccales infectées et les maladies parodontales (Cushine et Lamb, 2005). Les Européens utilisaient des plantes comme remèdes folkloriques traditionnels qui contiendraient des flavonoïdes ayant une activité thérapeutique (Jäger et Saaby, 2011). L'apigénine était la flavone confirmée comme constituant responsable de l'effet calmant des fleurs de camomille; la quercétine a fourni l'effet calmant nerveux de la bruyère; l'application combinée de quercétine et de kaempférol a produit un effet sédatif lorsque les fleurs de tilleul étaient utilisées (Jäger et Saaby, 2011). L'utilisation du thé a été documentée pour la première fois en 2700 avant JC, tandis qu'Eisai, un moine japonais, a enregistré ses effets thérapeutiques pour la première fois en 1211 (Principles, 2011). Des extraits de thé ont été consommés par des aventuriers européens du XVIe siècle pour soulager «la fièvre, les maux de tête, les maux d'estomac et les douleurs articulaires» (Principles, 2011). On pense que les antioxydants, les polyphénols, comme les catéchines et les flavones, sont les éléments du thé responsables de son potentiel thérapeutique (Principles, 2011). Dans les années 1930, Albert Szent-Györgyi a été le premier à isoler la rutine, un glycoside flavonoïde, des oranges, dont il a découvert qu'il donnait de la force aux parois capillaires par un moyen que la vitamine C ne pouvait pas; les flavonoïdes étaient à l'origine appelés vitamine P, mais en raison de la diversité des flavonoïdes présents dans la nature, ils ne pouvaient pas être étiquetés comme une seule vitamine (Kale et al., 2008; Principles, 2011).

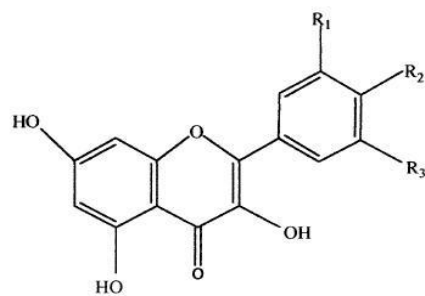
2.3- Classification structurelle :

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Hendrich, 2006).

2.3-1 Les flavonols :

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu et al., 2012).

Chapitre 01 : Les flavonoïdes

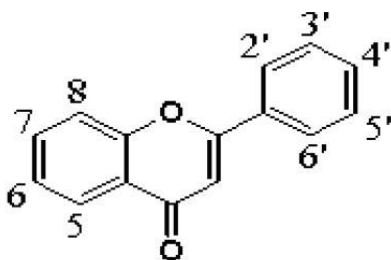


Composés	R1	R2	R3
Quercetin	H	OH	OH
Kaempferol	H	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH

Figure 04 : Structure des flavonols (O'connell et Fox, 2001).

2.3-2 Les flavones :

Les flavones sont abondantes chez les plantes supérieures sous les deux formes aglycones ou glycosylées. Certaines sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Ils ont des activités physiologiques remarquables, notamment des propriétés antimicrobiennes et antivirales (Stafford,1990).

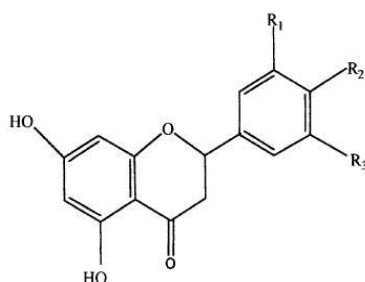


Composés	5	7	4'	3'
Apigenin	OH	OH	OH	--
Luteolin	OH	OH	OH	OH

Figure 05: Structure des flavones (yordi *et al.*, 2012).

2.3-3 Les flavanones :

Les Flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées (Wollenweber *et al.*, 2000). Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'héspéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron.

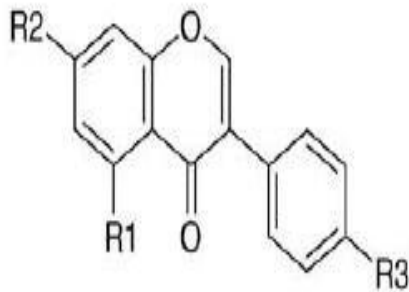


Composés	R1	R2	R3
Hesperetin	H	OCH ₃	OH
Naringenin	H	OH	H
Eriodictyol	H	OH	OH

Figure 06 : Structure des flavanones (O'connell et Fox, 2001).

2.3-4 Les isoflavones :

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses (**Iwashina, 2000**).



Composés	R1	R2	R3
Biochanin	OH	OH	OCH ₃
Sissotrin	OH	7-O-GLU	OCH ₃
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	7-O-GLU	OH
Formononetin	H	OH	OCH ₃
Ononin	H	7-O-Glu	OCH ₃
Daidzein	H	OH	H
Daidzin	H	7-O-Glu	OH

Figure 07: Structure des isoflavones (**Rijik et al., 2006**).

2.3-5 Les flavanols :

Les flavanols existent sous forme de monomères : l'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé restent les principales sources de ce composé. (**Castaneda-Ovando et al., 2009**).

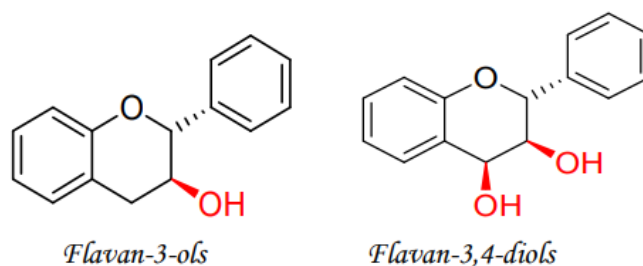
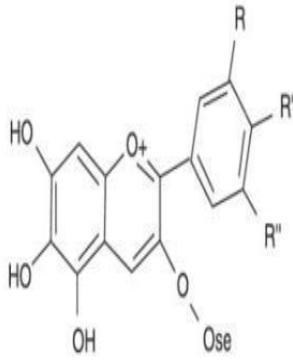


Figure 08 : Structure des flavanols (**Samouelian et al., 2009**).

2.3.6 Les anthocyanes :

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Leurs génines (anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium (cation flavylum). Une propriété importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques en témoignent (**Castaneda-Ovando et al., 2009**).

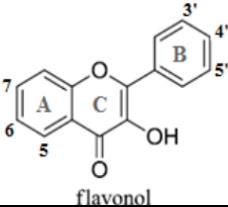
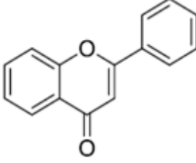
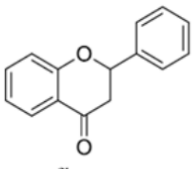
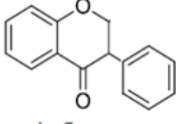
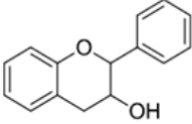
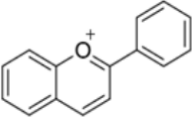
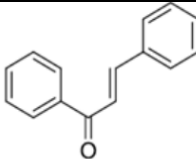
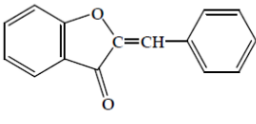
Chapitre 01 : Les flavonoïdes



Pigment	R	R'	R''	Couleur
Pélgargonidine	H	OH	H	Rouge
Cyanidine	H	OH	OH	Bleu
Delphinidine	OH	OH	OH	Pourpre
Péonidine	OCH ₃	OH	H	Rose
Pétunidine	OCH ₃	OH	OH	Pourpre
Malvidine	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mauve

Figure 09 : Structure de base des anthocyanes (Samouelian *et al.*, 2009).

Tableau 01 : Différentes classes de flavonoïdes d'après(Bruneton ,2009)

Structure des différentes classes de flavonoïdes	Exemples	Substitutions					
		5	6	7	3'	4'	5'
 <p>flavonol</p>	<p>Kaempférol Quercétine Myricétine</p>	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>flavone</p>	<p>Apigénine Chrysin Lutéoline</p>	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>flavanone</p>	<p>Hespéridine Naringénine</p>	OH	H	OH	OH	OMe	H
 <p>isoflavone</p>	<p>Daidézéine Génistéine</p>	OHH	OH	OH		OH	H
 <p>flavan-3-ol</p>	<p>Catéchine Gallocatéchine</p>	H	HO	H	HO	H	H
 <p>anthocyanine</p>	<p>Pélargonidine Cyanidine Delphinidine</p>	OHH	OH	H		OH	H
 <p>chalcone</p>							
 <p>Aurones</p>							

2.4- Nomenclature des flavonoïdes :

En plus de l'état d'oxydation et des substituants du cycle C, les flavonoïdes sont divisés en sous-classes basées sur la connexion du cycle B au cycle C (Beecher, 2003). Ils

sont également classés et identifiés individuellement sur la base des modèles d'hydroxylation et de conjugaison des cycles A, B et C (**Beecher, 2003**). Les flavonoïdes peuvent recevoir des noms triviaux, qui peuvent désigner leur classe ou leur source végétale; par exemple, le suffixe «etin» implique un flavonol, et le composé hypolaétine a été obtenu à partir de plantes du genre *Hypolaena* (**Cushine et Lamb, 2005**). Ils peuvent être nommés semi-systématiquement sur la base de noms triviaux, par exemple, la chalcone comme structure parente dans la 3,3', 4', 5,7-pentahydroxyflavone (**Cushine et Lamb, 2005**). Une troisième méthode peu pratique pour nommer les flavonoïdes consiste à leur attribuer des noms chimiques systématiques, comme 3,4-dihydro-2-phényl-2H-benzopyrane pour le flavane (**Cushine et Lamb, 2005**). La biosynthèse des diverses sous-classes de flavonoïdes se produit par une voie complexe catalysée par des enzymes spécifiques.

2.5 - Localisation et Distribution :

2.5.1- Localisation :

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (**Hutzler et al, 1998**).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet, 2000**).

2.5.2- Distribution :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (**Vogt, 2010**), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés

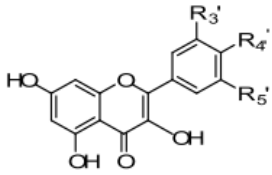
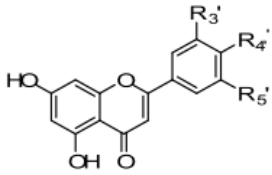
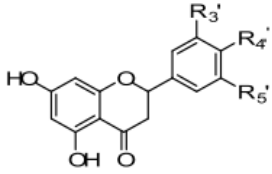
Chapitre 01 : Les flavonoïdes

comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Besle,2004).

Le monde animal est très concerné par les flavonoïdes dont Besle *et al*, 2004 ont isolé respectivement quinze et seize composés aromatiques à partir du lait de vache avec respectivement 6 et 5 composés importants dus principalement à la consommation des plantes par les herbivores(Besle,2004).

On trouve aussi la chryisine, la quercétine, de la galangine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (le bouleau, le sapin, le saule...) récoltés par les abeilles, ces insectes les fabriquent en modifiant la propolis par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent en oeuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches (Lahouel,2005). Le **tableau 02** représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments et le **tableau 03** représente Plantes médicinales riches en flavonoïdes.

Tableau 02 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (Erdman et al ,2007).

Flavonoïdes	exemples	aliment	Caractéristiques
Flavonols 	Quercétine Kaempférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques
Flavones 	Lutéoline Apigénine	Persil, céleri.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration
Flavanone 	Naringénine Eriodictyol	Fruits du genre Citrus.	Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.

Chapitre 01 : Les flavonoïdes

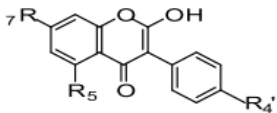
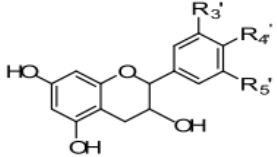
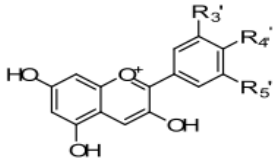
<p>Isoflavones</p> 	<p>Genisteine Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p>
<p>Flavan 3-ols</p> 	<p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatec -hine</p>	<p>Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.</p>	<p>Flavan 3ols ainsi que Flavan 3,4diols sont tout les deux impliqués dans Biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques</p>
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Cyanidine Delphénidine</p>	<p>Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>

tableau 03 : les Plantes médicinales riches en flavonoïdes. (Kumar et Pandey,2013)

Plant	Family	Flavonoid
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	Luteolin
<i>Acalypha indica</i>	Euphorbiaceae	Kaempferol glycosides
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Quercetin
<i>Andrographis paniculata</i>	Acanthaceae	5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone
<i>Bacopa moneirra</i>	Scrophulariaceae	Luteolin
<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	Quercetrin
<i>Butea monospermea</i>	Fabaceae	Genistein
<i>Bauhinia monandra</i>	Fabaceae	Quercetin-3-O-rutinoside
<i>Brysonima crassa</i>	Malphigaceae	(+)-catechin
<i>Calendula officinalis</i>	Compositae	isorhamnetin
<i>Cannabis sativa</i>	Compositae	Quercetin
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae	hesperidin
<i>Clerodendrum phlomidis</i>	Verbenaceae	Pectolinarigenin,
<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	kaempferol-3-neohesperidoside
<i>Glycyheriza glabra</i>	Leguminosae	Liquiritin,
<i>Mimosa pudica</i>	Mimosoideae	Isoquercetin
<i>Limnophila indica</i>	Scrophulariaceae	3,4-methlenedioxyflavone
<i>Mentha longifolia</i>	Lamiaceae	Luteolin-7-O-glycoside
<i>Momordica charantia</i>	Curcubitaceae	Luteolin
<i>Oroxylum indicum</i>	Bignoniaceaea	Chrysin
<i>Passiflora incarnate</i>	Passifloraceae	Vitexin
<i>Pongamia pinnata</i>	Fabaceae	Pongaflavonol
<i>Tephrosia purpurea</i>	Fabaceae	Purpurin
<i>Tilia cordata</i>	Tiliaceae	hyperoside

3- Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement distribués chez les angiospermes dont le métabolisme phénolique aboutit à un grand nombre d'édifices moléculaire caractérisant ainsi une diversité phénotypique. Malgré leur variabilité structurale, ces molécules dérivent toutes de la même voie de biosynthèse dont les étapes sont les mieux connues tant du point de vue biochimique que moléculaire. La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C6-C3-C6, décrit par une nomenclature spécifique.

La biosynthèse des flavonoïdes fait intervenir des voies communes : la voie shikimique grâce à la phénylalanine ammonialyase (PAL) (Vogt, 2009), et la voie acétate grâce à la chalcone synthase (CHS) (Dixon *et al.*, 1999). La PAL permet la synthèse d'acide p-coumarique et d'acide cinnamique. L'élaboration des composés phénoliques réside dans la condensation de trois unités de malonyl-CoA avec l'acide para-coumarique, conduisant aux deux noyaux aromatiques A et B reliés par l'hétérocycle C.

Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (Figure 10). La chalcone néoformée donne une flavanone (la naringénine), une transformation catalysée par une chalcone-isomérase (CHI) (Van Tunen AJ, 1990 ; Fowler *et al.*, 2009).

La naringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par action enzymatique : la flavone-synthétases (FSI) introduit une double liaison en 2,3 pour donner une flavone ; la flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une flavanone pour donner un dihydroflavonol qui est transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS). Ces molécules peuvent subir deux types de substitutions : les O-substitution et les C-substitutions qui sont soit de nature hydroxylique, méthoxylique ou osidique. (SAFFIDINE,2015).

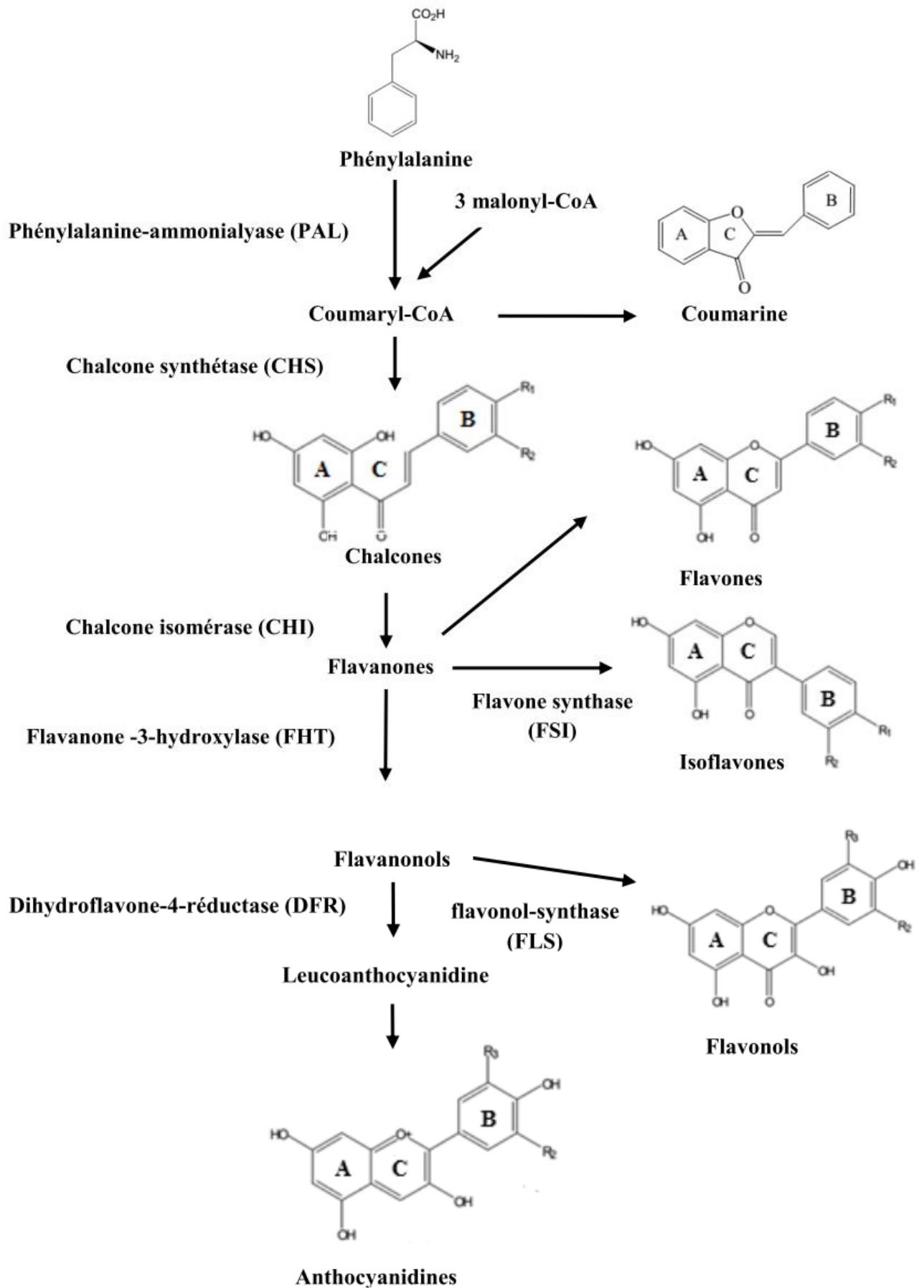


Figure 10 : Principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes(SAFFIDINE, 2015).

4-Biodisponibilité des flavonoïdes :

Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé. Les effets santé des flavonoïdes ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés (**Hollman et Katan, 1998 ; Walle, 2004**).

5- Caractéristiques physico-chimiques des flavonoïdes :

5.1- Caractéristiques chromatographiques :

Des indications significatives sur la structure chimiques des flavonoïdes peuvent être fournies par les valeurs des R_f dans un système de solvant donné. La couleur de la fluorescence sous lumière ultra- violette peut également orienter quant à la structure de la famille flavonique (**tableau 04**).

Tableau 04 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV(**Markham, 1982**)

Couleur des spots	Structures flavoniques
Noir- violette	Flavones -5, 6,7 Flavonol substitué en 3
Bleu	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5- OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Verte	Chalcones
Bleu verte	Flavanone sans 5-OH

5.2- Caractéristiques spectrophotométriques :

Les végétaux flavonoïdes pigments chromophores capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fonctions chimiques responsables de cette absorption sont constituées de liaisons riches en électrons délocalisés ou de la conjugaison de celles-ci. L'étude de ces propriétés chromatiques se fait par le biais de la spectrophotométrie UV-visible. Cette méthode physique simple et rapide très utilisée dans la détermination du squelette flavonique, ainsi que la position des substituants. L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV dans le méthanol et en présence de réactifs s'appuie sur les données de la littérature décrites par **Mabry *et al.* (1970)**, **Markham (1982)** et **Voirin (1983)**. En effet, le spectre d'absorption d'une structure flavonique présente deux bandes d'absorptions essentielles (**figure 11**) :

- La bande I située à entre 300 et 400 caractérise la forme cinnamoyle de la molécule.
- La bande II située à 240-285 nm est attribuée à sa forme benzoyle.

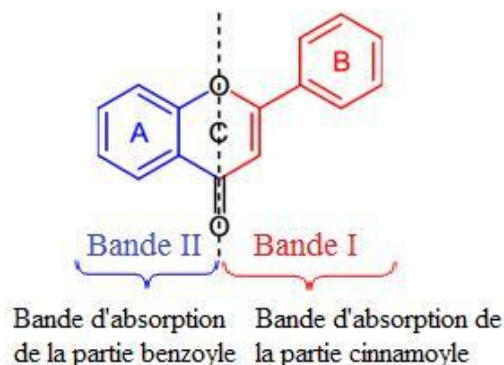


Figure 11 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

L'augmentation du nombre d'hydroxyle sur le noyau B se traduit par un effet bathochrome de la bande I ; il en est de même pour la bande I en relation avec le noyau A. De plus, la bande II apparaît sous forme d'un pic unique ou un pic accompagné d'un épaulement, selon que le noyau B est hydroxylé en position 3' ou dihydroxylé en position 3' et 4'. L'emploi de réactifs tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique ; permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonique (**tableau 05**).

5.2.1- Spectre en présence de soude (NaOH) :

La soude est une base forte qui permet de localiser les hydroxyles libres en position 7 et 4' en provoquant leur ionisation, ce qui provoque un déplacement bathochrome de la bande I et II. Le déplacement de la bande I accompagné de la stabilité de la densité optique,

confirme la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une troisième bande entre les bandes I et II, confirme la présence d'un OH libre en position 7 (**Bacon *et al.*, 1976**).

5.2.2- Spectre en présence d'AlCl₃ et AlCl₃+HCl :

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl₃) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes ortho di-hydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl, par contre, ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent par un déplacement hypsochrome de la bande I sur le spectre UV en présence d'AlCl₃ + HCl par rapport au spectre après addition d'AlCl₃ et un déplacement bathochrome de la bande I du spectre en présence d'AlCl₃ moins important par rapport au spectre dans le MeOH en cas d'oxygénation de la position (**tableau 05**). (**SAFFIDINE, 2015**).

5.2.3- Spectre en présence de NaOAc et NaOAc+ H₃BO₃ :

L'acétate de sodium (NaOAc) est un sel très basique qui ionise les hydroxyles en position 3',4' et 7 (**tableau 04**). Un effet bathochrome de 5 à 20nm confirme la présence d'un OH libre en position 7. En présence d'acétate de sodium, l'acide borique chélate les ortho dihydroxyle sur le cycle B (3',4') ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8), et provoque un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique. (**SAFFIDINE, 2015**).

Tableau 5 : Maximum d'absorption UV des flavonoïdes. Action des réactifs sur l'allure du spectre UV-visible(SAFFIDINE, 2015)

Spectre UV	Bande I	Bande II	Types de flavonoïdes
MeOH neutre	320-350	250-270	Flavones
	352-385	250-280	Flavonols
	300-330	245-275	Flavanones
	300-330	245-275	Isoflavones
	348-390	230-270	Chalcones
	380-430	230-270	Aurones
Spectres UV en présence de réactifs	Bande II	Bande I	Substitutions
NaOH/MeOH		+40 à 60 nm +50 à 60 nm	OH en 4' OH en 3 et 4'OR
		Bande III entre les bandes I et II	OH en 7
NaOAc/MeOH	+ 5 à 20 nm		OH en 7
NaOAc + H ₃ BO ₃ /MeOH		+12 à 36 nm +5 à 10 nm	Ortho di-OH 3',4' 6,7 ou 7,8 di OH
AlCl ₃ /MeOH		+60 nm +35 à 55 nm	OH en 3 OH en 5
AlCl ₃ +HCl/MeOH		-30 à -40 -20 à -25	Ortho di OH sur le noyau B Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)
		+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60	5-OH 5-OH 3-OH ou 3-OH et 5- OH

6- Propriétés physiologiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes comptent parmi les plus représentatifs des substances élaborées par les plantes à travers leurs métabolismes secondaires, ces substances possèdent des propriétés colorantes, aromatique, médicinales et cosmétologiques et confèrent à la plante des avantages adaptatifs. De nombreux principes actifs sont bénéfiques à l'homme et à l'animal.

6.1- Rôle attracteur chez les plantes :

Les flavonoïdes sont à l'origine des propriétés chromatiques des différents pigments qui sont accumulés dans la plupart des organes des végétaux. Les pigments responsables des couleurs vives et variées des fleurs, ont non seulement un effet esthétique, mais sont aussi responsables de l'attraction des pollinisateurs (oiseaux et insectes). Un tel constat a été mis en évidence par **Harborne *et al.* (1978)**, confirmant le rôle des anthocyanes dans le processus de pollinisation. D'autres auteurs soulignent l'importance des flavonoïdes dans la fertilité des plantes, il sont indispensables dans le développement des gamétophytes mâles (**Peggy E Pollak *et al.*, 1992**). Des mutations affectant l'enzyme clé chalcone synthétase qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques entraîne l'absence de pigments dans les anthères et une stérilité mâle.

6.2- Rôle protecteur chez les plantes :

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasites ou abiotiques. Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement comme le gel et la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium (**Morel, 2011**). Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, dans ce cas on parle de phytoalexines (**Figen Mert-Türk, 2002 ; Jeandet *et al.*, 2014**).

Vanetten *et al.* (1994) définissent les phytoalexines comme les composés synthétisés en réponse à une attaque et les phytoanticipines comme les composés présents avant toute attaque. Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour sa défense. Ce qui explique que certains de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), et les insectes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et promouvoir la formation de thylle et de cal, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

En raison de leur structure, les flavonoïdes présentent une zone d'absorption dans l'ultraviolet et leur synthèse est fortement stimulée chez certaines espèces par la lumière ultraviolette (**Schmelzer *et al.*, 1988 ; Shirley, 1996**). Ces composés s'accumulent en grandes quantités dans les tissus périphériques, ils font écran aux UV qui endommagent l'ADN (**Stapleton, 1992**) et protègent ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles.

Chapitre : 02

Séparation et quantification des flavonoïdes

Chapitre2 : Séparation et quantification des flavonoïdes :

1-introduction :

L'essentiel à l'étude des flavonoïdes est de disposer des moyens disponibles pour leur séparation (analytique et préparative) et isolement. L'importance de cet aspect de la recherche sur les flavonoïdes peut être vu dans le nombre d'articles de synthèse qui font référence à leur chromatographie.(**Mabry et al.,1970**).Cependant, les informations sont généralement réparties sur des chapitres de livres ou se trouvent dans des sections isolées consacrées à des classes individuelles de ces polyphénols.

Ce chapitre vise donc à présenter un bref résumé unifié des techniques générales, en référence aux différentes catégories de structure: flavones et flavonols (et leurs glycosides), les isoflavones, les flavanones, les chalcones, les anthocyanes et les proanthocyanidines. Dans les temps anciens, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur polyamide et l'électrophorèse sur papier était les principales techniques de séparation des composés phénoliques. Parmi ces méthodes, La CCM est toujours le cheval de bataille de l'analyse des flavonoïdes. Il est utilisé comme un outil rapide, simple et polyvalent méthode de suivi des polyphénols dans les extraits de plantes et dans les travaux de fractionnement. Cependant, la majorité des travaux publiés se réfèrent désormais à des applications qualitatives et quantitatives de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour l'analyse. Les flavonoïdes peuvent être séparés, quantifiés et identifiés en une seule opération en couplant HPLC à l'ultraviolet (UV), à la masse ou détecteurs de résonance magnétique nucléaire (RMN). Récemment, la technique de l'électrophorèse capillaire (CE) a attiré l'attention.

Une caractéristique qui présente un immense avantage pour l'analyse des flavonoïdes est la présence du phényle bague. Cet excellent chromophore est bien sûr actif contre les UV et explique pourquoi les flavonoïdes sont si faciles à détecter. Leurs spectres UV sont particulièrement informatifs, fournissant informations structurelles considérables permettant de distinguer le type de phénol et l'oxydation modèle.

2-Extraction :

Les flavonoïdes(en particulier les glycosides) peuvent être dégradés par l'action enzymatique lors de la récolte des plantes,le matériau est frais ou non séché. Il est donc conseillé d'utiliser des échantillons secs, lyophilisés ou congelés.

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

Lorsqu'une matière végétale sèche est utilisée, elle est généralement broyée en poudre. Pour l'extraction, le solvant est choisi en fonction du type de flavonoïde recherché. La polarité est un élément important considération ici. Flavonoïdes moins polaires (par exemple, isoflavones, flavanones, flavones méthylées, et les flavonols) sont extraits avec du chloroforme, du dichlorométhane, de l'éther diéthylique ou de l'acétate d'éthyle, tandis que les glycosides flavonoïdes et les aglycones plus polaires sont extraits avec des alcools ou mélanges alcool-eau. Les glycosides ont une hydrosolubilité accrue et une solution hydroalcoolique, les solutions conviennent. La majeure partie des extractions de matières contenant des flavonoïdes sont encore réalisée par simple extraction directe au solvant

La matière végétale en poudre peut également être extraite dans un appareil Soxhlet, d'abord avec de l'hexane,

par exemple, pour éliminer les lipides puis avec de l'acétate d'éthyle ou de l'éthanol pour obtenir des composés phénoliques.

Cette approche ne convient pas aux composés sensibles à la chaleur.

3-Séparation préparative :

3-1 . Purification préliminaire :

Une fois qu'un extrait végétal convenablement polaire est obtenu, un nettoyage préliminaire est avantageux. La méthode classique de séparation des composés phénoliques des extraits de plantes consiste à précipiter avec de l'acétate de plomb ou extraire en alcali ou carbonate, suivi d'une acidification. La procédure d'acétate de plomb est souvent insatisfaisant car certains phénoliques ne précipitent pas; d'autres composés peuvent coprecipiter et il n'est pas toujours facile d'éliminer les sels de plomb.

3-2. Méthodes préparatives :

L'un des problèmes majeurs de la séparation préparative des flavonoïdes est leur économe solubilité dans les solvants utilisés en chromatographie. De plus, les flavonoïdes deviennent moins soluble au fur et à mesure de leur purification. Une mauvaise solubilité dans la phase mobile utilisée pour une séparation chromatographique peut induire une précipitation en tête de colonne, conduisant à une mauvaise résolution, diminution du débit de solvant, voire blocage de la colonne.

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

D'autres complications peuvent également survenir. Par exemple, dans la séparation des anthocyanes et fractions riches en anthocyanes, il est conseillé d'éviter l'acétonitrile et l'acide formique – acétonitrile est difficile à évaporer et il existe un risque de formation d'ester avec l'acide formique.

Il n'y a pas de stratégie d'isolement unique pour la séparation des flavonoïdes et une ou plusieurs étapes peut être nécessaire pour leur isolement. Le choix de la méthode dépend de la polarité du composé et la quantité d'échantillon disponible. La plupart des méthodes de préparation disponibles sont décrits dans un volume d'Hostettmann et al. (**Hostettmann, K. et al., 1998**).

La chromatographie conventionnelle sur colonne ouverte est encore largement utilisée en raison de sa simplicité et sa valeur en tant qu'étape de séparation initiale.

Plusieurs méthodes de chromatographie liquide à pression préparative sont disponibles. Ceux-ci peuvent être classés en fonction de la pression employée pour la séparation:

- . LC haute pression (ou haute performance) (> 20 bar / 300 psi)
- . LC moyenne pression (5 à 20 bar / 75 à 300 psi)
- . LC basse pression (<5 bar / 75 psi)
- . Chromatographie flash (environ 2 bar / 30 psi)

3-2.1 Chromatographie liquide haute performance :

HPLC devient de loin la technique la plus populaire pour la séparation des flavonoïdes, à la fois aux échelles préparative et analytique. Améliorations de l'instrumentation, des matériaux d'emballage, et la technologie de la colonne est introduite tout le temps, ce qui rend la technique de plus en plus attirant.

La différence entre les méthodologies analytique et préparative est que l'analyse La HPLC ne repose pas sur la récupération d'un échantillon, tandis que la HPLC préparative est une purification et vise à isoler une substance pure d'un mélange.

Les séparations HPLC semi-préparatives (pour des échantillons de 1 à 100 mg) utilisent des colonnes de diamètre 8 à 20 mm, souvent emballé avec des particules de 10 µm (ou moins). Les grands échantillons peuvent être séparés par des installations préparatives (ou même à l'échelle du processus) mais les coûts deviennent en conséquence plus haute.

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

L'optimisation peut être effectuée sur des colonnes HPLC analytiques avant la transposition en un échelle semi-préparative.

Le but de ce chapitre n'est pas une description détaillée de la technique et de l'instrumentation mais pour montrer les applications de HPLC dans la séparation préparative des flavonoïdes. Un représentant des exemples sont donnés dans **le tableau 06**. Dans une revue de 1982 des techniques d'isolement pour flavonoïdes, HPLC préparative n'avait à ce moment pas été pleinement exploitée. Cependant, la situation est maintenant très différente et 80% de tous les isollements de flavonoïdes contiennent une étape HPLC. Environ 95% des applications HPLC rapportées sont sur des phases octadécylsilyle. Tout les deux des conditions isocratiques et de gradient sont utilisées.

3-2.2 Chromatographie liquide moyenne pression :

Le terme «chromatographie liquide à moyenne pression» (MPLC) couvre une large gamme de diamètres de colonne, différents matériaux de garnissage de granulométrie, différentes pressions et un certain nombre de systèmes disponibles dans le commerce. Dans sa forme la plus simple, MPLC est une colonne fermée (généralement verre) connecté à une source d'air comprimé ou à une pompe alternative. Il répond à l'exigence pour une méthode alternative simple à la chromatographie sur colonne ouverte ou à la chromatographie flash, avec à la fois une résolution plus élevée et des temps de séparation plus courts. Les colonnes MPLC ont une capacité de chargement - jusqu'à un rapport échantillon / matériau d'emballage de 1:25 - et sont idéales pour séparation des flavonoïdes (**Leutert, T. et von Arx, E., 1984**).

Tableau 06 : Séparations Préparatives de Flavonoïdes par HPLC

(Marston et Hostettmann, 2006).

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

Sample	Column	Eluent
Phenolics from <i>Picea abies</i>	Nucleosil 100-7C ₁₈ 250 × 21 mm	MeOH-H ₂ O, gradient
Chalcones from <i>Myrica serrata</i>	LiChrosorb Diol 7 μm, 250 × 16 mm	MeOH-H ₂ O, 55:45
	Nucleosil 100-7C ₁₈ 250 × 21 mm	MeOH-H ₂ O, 76:24
Flavones from <i>Tanacetum parthenium</i>	LiChrospher RP-18 250 × 25 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 3:7
Flavone glycosides from <i>Lysionotus pauciflorus</i>	LiChrosorb RP-18 250 × 10 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 1:4
Flavonoid glucuronides from <i>Malva sylvestris</i>	Spherisorb ODS-2 5 μm, 250 × 16 mm	CH ₃ CN-H ₂ O-THF-HOAc, 205:718:62:15
Flavonol galloyl-glycosides from <i>Acacia confusa</i>	Hyperprep ODS 250 × 10 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, gradient
Flavanones from <i>Greigia sphacelata</i>	LiChrospher Diol 5 μm, 250 × 4.6 mm	Hexane-EtOAc, 7:3
Prenylated flavonoids from <i>Anaxagorea luzonensis</i>	Asahipack ODP-90 10 μm, 300 × 28 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 45:55
Prenylated isoflavonoids from <i>Erythrina vogelii</i>	μBondapak C ₁₈ 10 μm, 100 × 25 mm	MeOH-H ₂ O, isocratic
Biflavones from <i>Cupressocyparis leylandii</i>	LiChrospher RP-18 7 μm, 250 × 10 mm	MeOH-H ₂ O, 72:28
Anthocyanin glycosides	Spherisorb ODS-2 10 μm, 250 × 10 mm	MeOH-5% HCOOH
Proanthocyanidins and flavans from <i>Prunus prostrata</i>	Eurospher 80 RP-18 7 μm, 250 × 16 mm	CH ₃ CN-H ₂ O (+0.1% TFA), 1:4, 3:17

Dans MPLC, les colonnes sont généralement remplies par l'utilisateur. Les tailles de particules de (25 à 200 μm) sont généralement préconisées (15 à 25, 25 à 40 ou 43 à 60 μm) sont les plages les plus courantes) et soit le conditionnement de boue ou le conditionnement à sec est possible. La résolution est augmentée pour une longue colonne de petit diamètre interne par rapport à une colonne plus courte de plus grand diamètre interne (avec la même quantité de phase stationnaire) (Zogg, G.C. et al., 1989). Le choix des systèmes de solvants peut être effectué efficacement par TLC (Nyiredy, S. et al. ; 1988) ou par HPLC analytique. La transposition en MPLC est simple et directe. (Schaufelberger, D. and Hostettmann, K., 1985).

3-2.3 Chromatographie de partition centrifuge :

Diverses techniques chromatographiques à contre-courant ont été utilisées avec succès pour la séparation des flavonoïdes. La chromatographie à contre-courant est une technique de séparation qui repose sur la répartition d'un échantillon entre deux solvants non miscibles, les proportions relatives de soluté passant dans chacune des deux phases déterminées par les

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

coefficients de partage de les composants du soluté. C'est une méthode tout liquide qui se caractérise par l'absence d'un support solide.

Il est donc évident qu'une telle technique est idéale pour les flavonoïdes, qui souffrent souvent de problèmes de rétention sur des supports solides tels que le gel de silice et le polyamide.

Distribution à contre-courant, chromatographie à contre-courant de gouttelettes et rotation locale

la chromatographie à contre-courant est maintenant rarement utilisée mais la CPC, également connue sous le nom de chromatographie à contre-courant, trouve une application étendue pour la séparation préparative de flavonoïdes.

Bien que la plupart des séparations CPC soient effectuées à une échelle préparative, les instruments analytiques.(**Schaufelberger, D.E.,1991**). Cependant, ceux-ci sont principalement utilisés pour trouver des conditions de séparation appropriées pour la mise à l'échelle.

Tableau 07 : Séparation des flavonoïdes par chromatographie liquide à moyenne pression.

(**Marston et Hostettmann, 2006**).

Sample	Column	Eluent
Chalcones from <i>Piper aduncum</i>	Silica gel 800 × 36 mm	Hexane–TBME–CH ₂ Cl ₂ –EtOH, 99:0.4:0.3:0.3
Flavonoids from <i>Sophora moorcroftiana</i>	RP-18 20 μm	MeOH–H ₂ O, 3:1
Flavonol glycosides from <i>Epilobium species</i>	RP-18 15–25 μm 460 × 26 mm	MeOH–H ₂ O, 35:65
Dihydroflavonoid glycosides from <i>Calluna vulgaris</i>	Polyamide SC-6 460 × 26 mm	Toluene–MeOH
	RP-18 20–40 μm 460 × 15 mm	MeOH–H ₂ O
Prenylflavonoid glycosides from <i>Epimedium koreanum</i>	RP-8 460 × 26 mm	MeOH–H ₂ O, 2:3
Prenylated isoflavonoids from <i>Erythrina vogelii</i>	RP-18 15–25 μm 500 × 40 mm	MeOH–H ₂ O, 58:42, 60:40
Biflavonoids from <i>Wikstoemia indica</i>	RP-18 300 × 35 mm	MeOH–H ₂ O, 55:45 → 95:5

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

Il existe de nombreux exemples de séparations préparatives de flavonoïdes, et certains sont énumérés dans le(**tableau 08**).

Tableau 08 : Séparation des flavonoïdes par chromatographie de partition centrifuge (**Marston et Hostettmann, 2006**).

Sample	Solvent System
Flavonoids from <i>Hippophae rhamnoides</i>	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 4:3:2
Flavonol glycosides from <i>Vernonia galamensis</i>	CHCl ₃ -MeOH- <i>n</i> -BuOH-H ₂ O, 7:6:3:4
Flavonol glycosides from <i>Picea abies</i>	CHCl ₃ -MeOH- <i>i</i> -PrOH-H ₂ O, 5:6:1:4
Flavonol glycosides from <i>Polypodium decumanum</i>	<i>n</i> -BuOH-EtOH-H ₂ O, 4:1.5:5 CHCl ₃ -MeOH- <i>n</i> -BuOH-H ₂ O, 10:10:1:6
Flavone C-glycosides from <i>Cecropia lyratiloba</i>	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 46:25:29 EtOAc- <i>n</i> -BuOH-MeOH-H ₂ O, 35:10:11:44
Biflavonoids from <i>Garcinia kola</i>	<i>n</i> -Hexane-EtOAc-MeOH-H ₂ O, 2:8:5:5
Isoflavones from <i>Astragalus membranaceus</i>	EtOAc-EtOH- <i>n</i> -BuOH-H ₂ O, 15:5:3:25 EtOAc-EtOH-H ₂ O, 5:1:5
Isoflavones from <i>Glycine max</i>	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 4:3:2 CHCl ₃ -MeOH- <i>n</i> -BuOH-H ₂ O, 8:6:1:4
Anthocyanidins from <i>Ricciocarpos natans</i>	<i>n</i> -Hexane-EtOAc- <i>n</i> -BuOH-HOAc-HCl 1%, 2:1:3:1:5
Proanthocyanidins from <i>Stryphnodendron adstringens</i>	EtOAc- <i>n</i> -PrOH-H ₂ O, 35:2:2
Proanthocyanidins from <i>Cassipourea gummiflua</i>	<i>n</i> -Hexane-EtOAc-MeOH-H ₂ O, 8:16:7:10
Anthocyanins from plants	<i>n</i> -BuOH-TBME-CH ₃ CN-H ₂ O, 2:2:1:5
Polyphenols from tea	<i>n</i> -Hexane-EtOAc-MeOH-H ₂ O, 3:10:3:10

4- Méthodes d'analyse :

La connaissance de la teneur en flavonoïdes des aliments à base de plantes est primordiale pour comprendre leur rôle dans la physiologie végétale et la santé humaine. Les méthodes analytiques sont également importantes pour identifier l'adultération de boissons, par exemple. Et les flavonoïdes sont des marqueurs indispensables pour fins chimiotaxonomiques.

Diverses méthodes analytiques existent pour les flavonoïdes. Celles-ci vont de TLC à CE. Avec le introduction de techniques HPLC avec trait d'union, le potentiel analytique a été considérablement élargi. La chromatographie en phase gazeuse (GC) est généralement peu pratique, en raison de la faible volatilité de nombreux composés flavonoïdes et la nécessité de préparer des dérivés. Cependant, Schmidt et al. (**Schmidt, T.J.,et al.,1993**). Ont rapporté la

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

séparation des flavones, des flavonols, des flavanones et des chalcones (avec substitution fréquente par des groupes méthyle) par GC.

Les aspects de quantification sont abordés dans le cadre des techniques individuelles.

4-1 Préparation des échantillons :

Le traitement initial de l'échantillon est une étape critique en chimie et biochimie analyses; c'est généralement l'étape la plus lente de l'analyse. Dans le cas d'échantillons d'aliments et de plantes, le nombre et la diversité des analyses sont très élevés et un prétraitement efficace est nécessaire pour obtenir des fractions phénoliques enrichies.

Les méthodes de préparation des échantillons doivent: **(Smith, R.M.,2003)**.

. Éliminez les éventuels interférents (pour les étapes de séparation ou de détection) du échantillon, augmentant ainsi la sélectivité de la méthode analytique.

. Augmentez la concentration de l'analyte et donc la sensibilité du test.

. Convertissez l'analyte en une forme plus appropriée pour la détection ou la séparation (si nécessaire).

. Fournir des méthodes robustes et reproductibles, indépendantes des variations du matrice d'échantillons.

Le but de la préparation des échantillons est que les composants d'intérêt doivent être extraits de matrices complexes avec le moins de temps et de consommation d'énergie, mais avec le plus haut rendement et reproductibilité. Les conditions doivent être suffisamment douces pour éviter l'oxydation, la dégradation thermique, et d'autres changements chimiques et biochimiques. Certaines procédures - CE, par exemple - nécessitent un prétraitement des échantillons plus rigoureux que d'autres. D'autre part, TLC nécessite un minimum absolu de préparation d'échantillons.

4-2 Chromatographie en couche mince :

La chromatographie sur papier et l'électrophorèse sur papier étaient autrefois largement utilisées pour l'analyse de flavonoïdes **(Harborne, J.B., 1989)**, mais maintenant la méthode de choix pour les analyses simples et peu coûteuses est TLC. Les avantages de cette technique sont bien connus: temps de séparation courts, possibilité de réactifs de détection, et la

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

possibilité d'analyser plusieurs échantillons en même temps. TLC est également parfaitement adapté pour le criblage préliminaire d'extraits de plantes avant l'analyse HPLC. Un excellent texte général sur la méthodologie TLC a été rédigé par Jork et al. (Jork, H. et al., 1994).

De plus samples informations sur l'utilisation du «réactif pour produits naturels» peuvent être trouvées dans un article de Brasseur et Angenot. (Brasseur, T. et Angenot, L., 1986).

Tableau 09 : Systèmes de solvants pour la chromatographie en couche mince de flavonoïdes sur gel de silice. (Marston et Hostettmann, 2006).

Sample	Eluent
Flavonoid aglycones	EtOAc- <i>i</i> -PrOH-H ₂ O, 100:17:13
	EtOAc-CHCl ₃ , 60:40
	CHCl ₃ -MeOH, 96:4
	Toluene-CHCl ₃ -MeCOMe, 8:5:7
	Toluene-HCOOEt-HCOOH, 5:4:1
	Toluene-EtOAc-HCOOH, 10:4:1
	Toluene-EtOAc-HCOOH, 58:33:9
	Toluene-EtCOMe-HCOOH, 18:5:1
	Toluene-dioxane-HOAc, 90:25:4
	Flavonoid glycosides
<i>n</i> -BuOH-HOAc-H ₂ O, 3:1:1	
EtOAc-MeOH-H ₂ O, 50:3:10	
EtOAc-MeOH-HCOOH-H ₂ O, 50:2:3:6	
EtOAc-EtOH-HCOOH-H ₂ O, 100:11:11:26	
EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 9:1:1	
EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 6:1:1	
EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 50:4:10	
EtOAc-HCOOH-HOAc-H ₂ O, 100:11:11:26	
EtOAc-HCOOH-HOAc-H ₂ O, 25:2:2:4	
THF-toluene-HCOOH-H ₂ O, 16:8:2:1	
CHCl ₃ -MeCOMe-HCOOH, 50:33:17	
CHCl ₃ -EtOAc-MeCOMe, 5:1:4	
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 65:45:12	
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 40:10:1	
MeCOMe-butanone-HCOOH, 10:7:1	
MeOH-butanone-H ₂ O, 8:1:1	

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

Flavonoïde glucuronides	EtOAc–Et ₂ O–dioxane–HCOOH–H ₂ O, 30:50:15:3:2 EtOAc–EtCOMe–HCOOH–H ₂ O, 60:35:3:2
Flavanone aglycones	CH ₂ Cl ₂ –HOAc–H ₂ O, 2:1:1
Flavanone glycosides	CHCl ₃ –HOAc, 100:4 CHCl ₃ –MeOH–HOAc, 90:5:5 <i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O, 4:1:5 (upper layer)
Chalcones	EtOAc–hexane, 1:1
Isoflavones	CHCl ₃ –MeOH, 92:8 CHCl ₃ –MeOH, 3:1
Isoflavone glycosides	<i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O, 4:1:5 (upper layer)
Dihydroflavonols	CHCl ₃ –MeOH–HOAc, 7:1:1
Biflavonoïdes	CHCl ₃ –MeCOMe–HCOOH, 75:16.5:8.5 Toluene–HCOOEt–HCOOH, 5:4:1
Anthocyanidins and anthocyanins	EtOAc–HCOOH–2 <i>M</i> HCl, 85:6:9 <i>n</i> -BuOH–HOAc–H ₂ O, 4:1:2 EtCOMe–HCOOEt–HCOOH–H ₂ O, 4:3:1:2 EtOAc–butanone–HCOOH–H ₂ O, 6:3:1:1
Proanthocyanidins	EtOAc–MeOH–H ₂ O, 79:11:10 EtOAc–HCOOH–HOAc–H ₂ O, 30:1.2:0.8:8

4-3 Chromatographie liquide haute performance :

La méthode de choix pour l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes est la HPLC. Depuis son introduction dans les années 1970, la HPLC a été utilisée pour toutes les classes de flavonoïdes et des centaines d'applications ont été publiées. De nombreuses critiques ont également été publiées, telles que ceux de Merken et Beecher, (**Merken, H.M. et Beecher, G.R.,2000**), et Cimpan et Gocan.(**Cimpan, G. et Gocan, S.,2002**).

Le but de ce chapitre n'est pas d'entrer dans la théorie de la HPLC, qui est couvert dans d'autres textes, mais pour décrire les applications de la méthode. Cette section se concentrer sur les applications analytiques car la HPLC semi-préparative a été décrite dans Section 1.3.2. La HPLC analytique est utilisée dans la détermination quantitative des constituants végétaux, dans le contrôle de la pureté des produits naturels et dans les recherches chimiotaxonomiques.

Pour la CLHP analytique d'une sous-classe donnée de flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, anthocyanes, etc.), la phase stationnaire, le solvant et le gradient doivent être optimisés.

4-4 Chromatographie liquide haute performance - spectrophotométrie ultraviolette :

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

La méthode de détection la plus fréquemment utilisée pour HPLC est la spectrophotométrie UV. Routine la détection en HPLC est généralement basée sur la mesure de l'absorption UV ou de l'absorption visible dans le cas des anthocyanes. Aucune longueur d'onde n'est idéale pour toutes les classes de flavonoïdes car ils affichent des maxima d'absorbance à des longueurs d'onde nettement différentes. Le plus commun la longueur d'onde utilisée pour la détection de routine a été de 280 nm, ce qui représente un compromis convenable.

Avec l'introduction de la technologie des barrettes de diodes dans les années 1980, une autre dimension est maintenant possible car couplé LC – UV avec détection par barrette de diodes (DAD) permet la chromatographie éluant à scanner pour les données spectrales UV-visible, qui sont stockées et peuvent être ultérieurement par rapport à une bibliothèque pour l'identification des pics. (George, S. et Maute, A.,1982). Cela augmente la puissance de l'analyse HPLC car avec les informations du spectre UV, il peut être possible d'identifier le sous-classe composée ou peut-être même le composé lui-même. Données spectrales UV de 175 flavonoïdes dans plusieurs solvants peuvent être trouvés, par exemple, dans un livre de Mabry et al. LC – UV with DAD permet l'enregistrement simultané de chromatogrammes à différentes longueurs d'onde.

4-5 Chromatographie liquide haute performance - spectrométrie de masse :

La HPLC-MS couplée est l'une des techniques les plus importantes de la dernière décennie du 20^e siècle. La combinaison offre la possibilité de profiter de la chromatographie comme méthode de séparation et MS comme outil d'identification. Le nombre incroyable d'applications et la chute rapide du prix (et de la taille) des instruments MS a fait que l'utilisation de la LC – MS est désormais extrêmement répandu. La SEP est l'une des méthodes d'analyse moléculaire les plus sensibles. Dû grâce à son pouvoir de séparation de masse élevé, de très bonnes sélectivités peuvent être obtenues. Cependant, le le couplage entre HPLC et MS n'a pas été simple depuis le fonctionnement normal conditions d'un spectromètre de masse (vide poussé, température élevée, fonctionnement en phase gazeuse, et faibles débits) sont diamétralement opposés à ceux utilisés en HPLC, à savoir en phase liquide fonctionnement, pressions élevées, débits élevés et températures relativement basses.

En LC – MS, il y a trois problèmes généraux: la quantité d'effluent de colonne qui doit être introduit dans le système de vide MS, la composition de l'éluant et le type de composés à

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

analyser. De nombreuses interfaces ont été développées pour faire face à ces (**Niessen, W.M.A.,1999**).

En général, la HPLC couplée à un réseau de diodes et à une détection par spectrométrie de masse fournit une méthode efficace d'identification rapide des flavonoïdes dans un mélange. Cette technique trouve désormais une large application.

Les deux ES et TSP sont des méthodes d'ionisation douce et ne produisent généralement pas beaucoup de fragments. Ceci est utile dans l'analyse quantitative ou la détermination de la masse moléculaire mais est de peu d'utilité dans l'élucidation de la structure. Dans ce cas, des méthodes de dissociation induite par collision (CID) ou de dissociation activée par collision peuvent être employées. (**Cole, R.B., Ed.,1997**). La fragmentation est induite dans l'une des régions à haute pression du passage ionique de la source à l'analyseur de masse. Les ions fragments produits par CID sont transportés de manière très efficace dans l'analyseur de masse, fournissant une méthode MS – MS simple. Avec LC – MS, une analyse sans CID et une avec CID peuvent être effectuées pour obtenir des fragments de tous les composants. La CID est effectuée pour améliorer la fragmentation des analytes soit à la source ES (CID dans la source), soit en conjonction avec la MS en tandem. En tandem MS, la première opération consiste à isoler un ion parent et la seconde consiste à déterminer le rapport masse / charge des ions produits formés après le CID de l'ion parent. La séquence d'isolement ionique et CID peut être répétée plusieurs fois dans MS_n. Le MS en tandem et le CID en source donnent des spectres de masse produit-ion très similaires.

L'application du tandem MS (LC – TSP MS – MS) peut être illustrée pour la caractérisation en ligne des flavonoïdes de *Gentianella cabrerae*. La LC – UV – MS du méthanol.

4-6 chromatographie liquide haute performance - résonance magnétique nucléaire :

Au début, la LC – RMN était peu utilisée en raison de son manque de sensibilité. Cependant, les progrès récents dans les gradients de champ d'impulsions et la suppression des solvants, l'amélioration de la technologie des sondes et la construction d'aimants à champ élevé ont donné une nouvelle impulsion à la technique. Alors que le couplage HPLC – RMN est relativement simple par rapport à la LC – MS, le principal problème de la LC – RMN est la difficulté à la présence des résonances beaucoup plus importantes de la phase mobile. Ce

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

problème est amplifié dans des conditions de fonctionnement typiques de HPLC en phase inversée, où plus d'un solvant protoné est utilisé et où les résonances changent de fréquence pendant l'analyse en mode gradient. De plus, le flux continu d'échantillon dans la bobine de détection complique la suppression du solvant. Ces problèmes ont maintenant été surmontés par le développement de techniques de suppression de solvant rapides, fiables et puissantes, telles que WET (suppression de l'eau améliorée par les effets T1), (**Smallcombe, S.H. et al.,1995**). qui produisent des spectres de haute qualité à la fois en mode d'écoulement et en mode d'écoulement arrêté. Ces techniques consistent en une combinaison de gradients de champ pulsé, d'impulsions de radiofréquence façonnées, d'impulsions laminaires décalées et de découplage sélectif ^{13}C , et sont beaucoup plus rapides que les techniques de présaturation classiques précédemment utilisées dans le domaine.

La combinaison de la HPLC avec la détection en ligne UV, MS et RMN s'est avérée être un outil très précieux pour l'analyse de produits naturels dans des extraits ou des mélanges.

Les flavonoïdes ne font pas exception. Les informations LC – RMN obtenues proviennent des spectres RMN ^1H de pics sélectionnés dans le chromatogramme HPLC. À partir de la LC-MS, la substitution du cycle A ou B peut être déduite du modèle de fragmentation, mais l'emplacement exact du substituant ne peut pas être déterminé. Cependant, pour un flavonoïde comme l'apigénine, où un seul groupe hydroxyle est situé sur le cycle B, la RMN ^1H donnera la position de substitution car chacune des trois possibilités de localisation du groupe hydroxyle donnera un motif de division unique. De nombreuses informations peuvent être obtenues sur la nature et les positions de liaison des sucres. Cependant, comme le D_2O est présent dans l'éluant, les signaux échangeables ne sont pas observés dans le spectre RMN.

Si le profilage complet du métabolite d'un extrait de plante doit être effectué, la LC – RMN peut être exécutée en mode en flux. Afin d'obtenir des spectres RMN adéquats de tous les constituants, la quantité d'échantillon injectée doit être augmentée - cela produit une surcharge par rapport aux conditions HPLC analytiques normales mais donne la possibilité de tester l'activité biologique (en conjonction avec une procédure de microfractionation).

Les applications de la LC – RMN pour l'identification en ligne des flavonoïdes sont encore rares, l'une des raisons étant probablement le coût élevé de l'appareil. Cependant, . La technique a été appliquée avec succès à l'analyse d'*Hypericum perforatum* (Guttiferae).

Chapitre 2 : Séparation et quantification des flavonoïdes

L'identification en ligne de la querce-étain, de plusieurs de ses glycosides et de la biflavonoïde I5, II8-biapigénine dans un extrait était possible. (Hansen, S.H. et al.,1999).

4-7 Electrophorèse capillaire :

CE est une technique analytique qui offre une efficacité de séparation élevée et des temps de fonctionnement courts. Par rapport à HPLC, cependant, CE présente généralement une sensibilité beaucoup plus faible, une tendance à surcharger avec des échantillons et des données quantitatives moins reproductibles. Contrairement à la HPLC, le développement de méthodes prend plus de temps en CE - impliquant des recherches sur les types, le pH et les concentrations d'électrolytes, les types et les concentrations de tensioactifs et de modificateurs organiques, les températures et les tensions appliquées. Plusieurs modes de CE sont disponibles: (a) électrophorèse de zone capillaire (CZE), (b) chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), (c) électrophorèse sur gel capillaire (CGE), (d) focalisation isoélectrique capillaire, (e) capillaire isotachoporesis, (f) électrochromatographie capillaire (CEC), et (g) CE non aqueux. Le mode CE le plus simple et le plus polyvalent est CZE, dans lequel la séparation est basée sur des différences dans le rapport charge-masse et les analytes migrent dans des zones discrètes à différentes vitesses. (Weston, A. et Brown, P.R.,1997).

Les applications de la CE pour l'analyse des composés phytochimiques ont été bien documentées. (Issaq, H.,1999).

Le CE est particulièrement adapté à la séparation des flavonoïdes car ils sont chargés négativement à des valeurs de pH plus élevées., (Suntornsuk, L.,2002)..Suntornsuk a passé en revue les aspects quantitatifs et la méthode de validation du CE pour les flavonoïdes. Par rapport à HPLC, CE peut fournir une méthode analytique alternative lorsqu'une efficacité plus élevée ou une résolution plus élevée est requise. Par exemple, alors que les analyses CCM et HPLC de la passiflore ne fournissent pas une séparation adéquate de tous les flavonoïdes identifiés, CE peut remplir les exigences nécessaires.(Marchart, E. et al.,2003).

Chapitre 03

Activités biologiques des flavonoïdes

Activités biologiques des flavonoïdes :

Comme cela a été démontré par de nombreux travaux, les flavonoïdes sont des molécules de défense contre les organismes pathogènes, leurs propriétés ont été exploitées pour leur un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes. On leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses. Ils ont également des actions positives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinso

1- Activité antioxydante :

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés antioxydantes des **flavonoïdes (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006 ; Dong *et al.*, 2010 ; Chae *et al.*, 2013)**, qui seraient attribuées à:

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR).
- leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne (**Cillard, 2006**). Certains flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques de transition responsables de la formation de ERO (**Pietra *et al.*, 2000 ; Halbwirth, 2010**) et ainsi, inhiber la réaction de la lipooxygénase.

Ils exercent leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes (**Ross, 2002**). En effet, ils sont capables de piéger les

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante leur permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier.

Les flavonoïdes jouent un rôle dans l'inhibition des lipo-oxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipo-oxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (**Mladinka et al., 2010**). Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, la double liaison C2-C3 est indispensable à cette activité. Les composés dont la liaison C2-C3 est saturée sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position méta d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase, enzyme clé du stress oxydatif (**Mladinka et al., 2010**).

2- Activités toxique et pro-oxydante :

Bien que les bienfaits des flavonoïdes sur la santé humaine soient reconnus actuellement, une revue critique des effets toxiques potentiels des flavonoïdes est nécessaire. Plusieurs études indiquent un effet mutagène et génotoxiques dans certains systèmes expérimentaux bactériens ou mammifères, effet lié à une activité pro-oxydante. De nombreuses études montrent à l'évidence que les activités biologiques des flavonoïdes sont doubles. Ils peuvent agir en tant qu'antimutagène/pro-mutagène, antioxydant/pro-oxydant. Tout dépend largement des quantités consommées et des conditions physiologiques de l'organisme. Un surdosage peut entraîner des dommages allant jusqu'à des mutations dans l'ADN. Certaines études récentes d'intervention chez l'homme montrent que les flavonoïdes, comme la quercétine semblent être antimutagènes *in vivo* (**Skibola et al., 2000**). Les flavonoïdes semblent donc être toxiques vis-à-vis des cellules tumorales mais plus ou moins toxiques vis-à-vis des cellules normales à des concentrations très élevées (**Matsuo, 2005**).

3 - Activité anti-inflammatoire :

Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (**Benavente-Garcia, 2008; Conforti et al., 2008**). Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

et les cytokines pro-inflammatoires. L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant ces mastocytes. De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Karima et al., 2017 ; Soro et al., 2015**).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase (**Gonzalez et al., 2007**). Une étude portant sur l'astragaline, la fisetine, le kaempferol, la myricétine, la quercétine et la rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de constater que toutes ces molécules, hormis l'astragaline, inhibaient la sécrétion de l'histamine (**Park et al., 2008**).

De même, dans la famille des stilbènes, le resvératrol a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (**Renaud, 2011**).

4 - Activité anti-ulcère :

Dans des expériences réalisées sur des rats, la quercétine et la naringénine ont montré un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production de mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotriènes (**Di Carlo et al., 1999**). D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes (**Izzo, 1996**). Une activité antibactérienne ciblant spécifiquement *Helicobacter pylori* a été observée (**Ramadan, 2009**).

5 - Effet sur le système cardiovasculaire :

Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation (**Duchnowicz et al., 2012**). Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et

Chpitre03 : activités biologique des flavonoide

de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS (**Mladinka et al., 2010, Liu et al., 2012**). Les flavonoïdes inhiberait l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et posséderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (**Mladinka et al., 2010**). Des pyrano-isoflavones possèdent une activité vaso-relaxante, (**Botta et al., 2009**).

6- effets antiallergiques :

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ces effets sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{+2} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes 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 (**Yamamura et al., 1998**).

En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur, de la libération d'histamine à partir des mastocytes, supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Formica et Regelson, 1995**).

7- Activité anticancéreuse :

Les facteurs alimentaires jouent un rôle important dans la prévention des cancers. Les fruits et légumes contenant des flavonoïdes ont été signalés comme chimiopréventifs contre le cancer agents (**Mishra et al., 2013**) .. La consommation d'oignons et / ou de pommes, deux sources principales du flavonol quercétine, est inversement associée à l'incidence du cancer de la prostate, du poumon, de l'estomac et du sein. De plus, les buveurs de vin modérés semblent également avoir un risque plus faible de développer un cancer du poumon, de l'endomètre, de l'œsophage, de l'estomac et du côlon (**Brusselmans et al., 2005**) La relation critique entre la consommation de fruits et légumes et la prévention du cancer a été soigneusement documentée. Il a été suggéré que des avantages majeurs pour la santé publique pourraient être

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

obtenus en augmentant considérablement la consommation de ces aliments (**Block et al.,1992**).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'effet des flavonoïdes sur les stades d'initiation et de promotion de la cancérogénicité, y compris des influences sur le développement et les activités hormonales (**Duthie et al.,2000**) . Les principaux mécanismes moléculaires d'action des flavonoïdes sont donnés comme suit:

- a. régulation à la baisse de la protéine p53 mutante,
- b. arrêt du cycle cellulaire,
- c. l'inhibition de la tyrosine kinase,
- d. inhibition des protéines de choc thermique,
- e. capacité de liaison aux récepteurs des œstrogènes,
- f. inhibition de l'expression des protéines Ras.

Les mutations de p53 sont parmi les anomalies génétiques les plus courantes dans les cancers humains. L'inhibition de l'expression de p53 peut conduire à arrêter les cellules cancéreuses dans la phase G2-M du cycle cellulaire. Les flavonoïdes régulent à la baisse l'expression de la protéine p53 mutante à des niveaux presque indétectables dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain (**Davis et Matthew,2000**) . Les tyrosine kinases sont une famille de protéines situées dans ou à proximité de la membrane cellulaire impliquées dans la transduction des signaux des facteurs de croissance vers le noyau. On pense que leur expression est impliquée dans l'oncogénèse via une capacité à passer outre le contrôle normal de la croissance régulatrice. On pense que les médicaments inhibant l'activité de la tyrosine kinase sont des agents antitumoraux possibles sans les effets secondaires cytotoxiques observés avec la chimiothérapie conventionnelle. La quercétine a été le premier composé inhibiteur de la tyrosine kinase testé dans un essai de phase I chez l'homme (**Ferry et al.,1996**). Les protéines de choc thermique forment un complexe avec le mutant p53, qui permet aux cellules tumorales de contourner les mécanismes normaux d'arrêt du cycle cellulaire. Les protéines de choc thermique permettent également d'améliorer la survie des

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

cellules cancéreuses sous différents stress corporels. Les flavonoïdes sont connus pour inhiber la production de protéines de choc thermique dans plusieurs lignées cellulaires malignes, y compris le cancer du sein, la leucémie et le cancer du côlon (**Davis et Matthew,2000**).

Récemment, il a été montré que l'épigallocate de flavanol-chin-3-gallate inhibait l'activité de l'acide gras synthase (FAS) et la lipogenèse dans les cellules cancéreuses de la prostate, un effet qui est fortement associé à l'arrêt de la croissance et à la mort cellulaire (**Brusselmans et al.,2003**). Contrairement à la plupart des tissus normaux, l'expression du SAF est nettement augmentée dans divers cancers humains. La régulation à la hausse du SAF survient tôt dans le développement de la tumeur et est encore renforcée dans les tumeurs plus avancées (**Swinnen et al.,2002**).

La quercétine est connue pour produire un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules lymphoïdes pro-liférantes. En plus de son activité antinéoplasique, la quercétine a exercé des effets inhibiteurs de croissance sur plusieurs lignées cellulaires de tumeurs malignes in vitro. Celles-ci comprenaient des cellules leucémiques P-388, des cellules cancéreuses gastriques (HGC-27, NUGC-2, NKN-7 et MKN-28), des cellules cancéreuses du côlon (COLON 320 DM), cellules cancéreuses du sein humaines, cellules squameuses et gliosarcomes humaines et cellules cancéreuses ovariennes (**Davis et Matthew,2000**). Markaverich et coll. (**Markaverich et al.,1988**) ont proposé que l'inhibition de la croissance des cellules tumorales par la quercétine puisse être due à son interaction avec les sites nucléaires de liaison des œstrogènes de type II (EBS). Il a été prouvé expérimentalement que l'augmentation de la transduction du signal dans les cellules cancéreuses du sein humaines est nettement réduite par la quercétine agissant comme un agent antiprolifératif (**Singhal et al.,1995**).

Barnes (**Barnes, 1995**) a étudié de manière approfondie les effets anticancéreux de la génistéine sur des modèles in vitro et in vivo. Dans une étude visant à déterminer les effets de la génistéine, de la daidzéine et de la biochanine A des isoflavones sur la carcinogénèse mammaire, la génistéine s'est avérée supprimer le développement d'un cancer mammaire induit chimiquement sans toxicités reproductives ou endocrinologiques. L'administration néonatale de génistéine (un flavonoïde) a montré un effet protecteur contre le développement ultérieur d'un cancer mammaire induit chez le rat (Lamartiniere *et al.*,1995). L'hespéridine, un glycoside de flavanone, est connue pour inhiber les cancers du côlon et mammaires induits par l'azoxyméthanol chez le rat (**Ren et al.,2003**). Les propriétés anticancéreuses des

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

flavonoïdes contenus dans les agrumes ont été examinées par Carroll et al. (**Carroll et al.,1998**) Plusieurs flavonols, flavones, flavanones et l'isoflavone biochanine A auraient une puissante activité antimutagène . Une (**Edenharder et al .,1993**) fonction carbonyle en C-4 du noyau flavone s'est avérée essentielle pour leur activité. Il a également été démontré que l'acide flavone-8-acétique avait des effets antitumoraux (**Thomsen et al.,1991**). Dans des études antérieures, il a été démontré que l'acide ellagique, la robinetine, la quercétine et la myricétine inhibent la tumorigénicité du BP-7, du 8-diol-9 et du 10-époxyde-2 sur la peau de souris (**Chang et al.,1985**).

Il a été démontré qu'une consommation plus élevée de phytoestrogènes, y compris les isoflavones et autres flavonoïdes, offre une protection contre le risque de cancer de la prostate (**Siess et al.,1996**). Il est bien connu qu'en raison du stress oxydatif, l'initiation du cancer peut avoir lieu et que de puissants antioxydants présentent donc un potentiel pour lutter contre la progression de la carcinogenèse. Le potentiel de l'antioxydant en tant qu'agent anticancéreux dépend de sa compétence en tant qu'inactivateur et inhibiteur des radicaux oxygène (**Kumar et al.,2013**). Par conséquent, une alimentation riche en piègeurs de radicaux diminuerait l'action anticancéreuse de certains radicaux (**Sawa et al.,1999**)

8- Activité hépatoprotectrice :

Plusieurs flavonoïdes tels que la catéchine, l'apigénine, la quercétine, la naringénine, la rutine et le venoru-ton sont rapportés pour leurs activités hapatoprotectrices (**Tapas et al.,2008**) différentes maladies chroniques telles que le diabète peuvent conduire au développement de manifestations cliniques hépatiques. On rapporte que l'expression de la sous-unité catalytique (Gclc) de glutamate-cystéine ligase (Gclc), le glutathion et les taux de ROS sont diminués dans le foie des souris diabétiques. Les anthocyanes ont attiré une attention croissante en raison de leur effet préventif contre diverses maladies. Zhu et coll. (**Zhu et al.,2012**) ont démontré que l'anthocyanine cyanidin-3-O- - glucoside (C3G) augmente l'expression hépatique de la Gclc en augmentant les niveaux d'AMPC pour activer la protéine kinase A (PKA), qui à son tour régule à la hausse la phosphorylation de la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPC (CREB) pour promouvoir la liaison CREB-ADN et augmenter la transcription de Gclc. Une expression accrue de Gclc entraîne une diminution des taux hépatiques de ROS et une signalisation proapop-totique. De plus, le traitement par la C3G diminue la peroxydation lipidique hépatique, inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires et protège contre le développement de la stéatose hépatique (**Zhu et al.,2012**).

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

La silymarine est un flavonoïdes ayant trois composants structuraux silibinine, silydianine et silychristine extraits des graines et des fruits du chardon-Marie *Silybum marianum* (Compositae). Il a été rapporté que la silymarine stimule l'activité enzymatique de l'ARN polymérase 1 dépendante de l'ADN et la biosynthèse ultérieure de l'ARN et des protéines, entraînant la biosynthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire conduisant à la régénération du foie uniquement dans les foies endommagés (**Sonnenbichler et Zetl,1986**) . La silymarine augmente la prolifération des hépatocytes en réponse à la mort cellulaire induite par la FB1 (fumonisine B1, une mycotoxine produite par *Fusarium verticillioides*) sans modulation de la prolifération cellulaire dans le foie normal. Les propriétés pharmacologiques de la silymarine impliquent la régulation de la perméabilité et de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'inhibition du leucotriène, le piégeage des ROS, la suppression de l'activité NF-B, la dépression des protéines kinases et la production de collagène (**He et al.,2004**). La silymarine a des applications cliniques dans le traitement de la cirrhose, des lésions ischémiques et de l'hépatite toxique induites par diverses toxines telles que l'acétaminophène et le champignon toxique (**Saller et al.,2001**)

Des activités hépatoprotectrices ont été observées chez des flavonoïdes isolés de *Laggera alata* contre des lésions induites par le tétrachlorure de carbone (CCl₄-) dans des hépatocytes de rats néonataux en culture primaire et chez des rats présentant des lésions hépatiques. Les flavonoïdes à une gamme de concentrations de 1 à 100 g / mL amélioreraient la viabilité cellulaire et inhibaient la fuite cellulaire de l'hépatocyte aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT) causée par CCl₄ (**Wu et al.,2006**). De même, dans une expérience in vivo, les flavonoïdes à des doses orales de 50, 100 et 200 mg / kg ont significativement réduit les niveaux d'AST, d'ALT, de protéines totales et d'albumine dans le sérum et les niveaux d'hydroxyproline et d'acide sialique dans le foie. Les examens histopathologiques ont également révélé l'amélioration du foie endommagé avec le traitement des flavonoïdes (**Wu et al.,2006**).

Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité et l'innocuité des flavonoïdes dans le traitement des dysfonctionnements hépatobiliaires et des troubles digestifs, tels que sensation de satiété, perte d'appétit, nausées et douleurs abdominales. On rapporte que les flavonoïdes d'*Equisetum arvense* ainsi que l'hirustrine et l'avicularine isolées de certaines autres sources fournissent une protection contre l'hépatotoxicité induite chimiquement dans les cellules HepG2 (**Spencer et al.,2009**).

9- Activité antivirale :

Les composés naturels sont une source importante pour la découverte et le développement de nouveaux médicaments antiviraux en raison de leur disponibilité et des faibles effets secondaires attendus. Les flavonoïdes naturels ayant une activité antivirale ont été reconnus depuis les années 1940 et de nombreux rapports sur l'activité antivirale de divers flavonoïdes sont disponibles. La recherche d'un médicament efficace contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est la nécessité d'une heure. La plupart des travaux liés aux composés antiviraux tournent autour de l'inhibition de diverses enzymes associées au cycle de vie des virus. Une relation structure-fonction entre les flavonoïdes et leur activité inhibitrice enzymatique a été observée. **(Gerdin et Srenso,1983)** ont démontré que le flavan-3-ol était plus efficace que les flavones et les flavonones dans l'inhibition sélective des infections par le VIH-1, le VIH-2 et des virus d'immunodéficience similaires. La baicaline, un flavonoïde isolé de *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae), inhibe l'infection et la réplication par le VIH-1. La baicaleine et d'autres flavonoïdes tels que la robustaflavone et l'hinokiflavone ont également été démontré qu'elle inhibait la transcriptase inverse du VIH-1 **(Cushnie et Lamb,2005)** . Une autre étude a révélé l'inhibition de l'entrée du VIH-1 dans les cellules exprimant les corécepteurs CD4 et chimiokine et l'antagonisme de la transcriptase inverse du VIH-1 par le flavone O-glycoside **(Li et al.,2000)**. Les catéchines sont également connues pour inhiber les ADN polymérase du VIH-1. Les flavonoïdes tels que la jardinine déméthylée A et la robinetine sont connus pour inhiber la protéinase du VIH-1 **(Cushnie et Lamb,2005)** . Il a également été rapporté que les flavonoïdes chrysin, acacétine et apigénine empêchent l'activation du VIH-1 via un nouveau mécanisme qui implique probablement l'inhibition de la transcription virale **(Critchfield et al.,1996)**.

Il a été démontré que diverses combinaisons de flavones et de flavonols présentent une synergie. Le kaempférol et la lutéoline présentent un effet synergique contre le virus de l'herpès simplex (HSV). Une synergie a également été rapportée entre les flavonoïdes et d'autres agents antiviraux. Il a été rapporté que la quercétine potentialise les effets de la 5-éthyl-2-dioxyuridine et de l'acyclovir contre l'infection par le HSV et la pseudorange **(Cushnie et Lamb,2005)** . Des études ont montré que les flavonols sont plus actifs que les flavones contre le virus de l'herpès simplex de type 1 et que l'ordre d'activité s'est avéré être la galangine, le kaempférol et la quercétine **(Cushnie et Lamb,2005)** .

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

Zandi et coll. (Zandi *et al.*, 2011) ont étudié les propriétés des virus antidengue de la quercétine, de l'hespérétine, de la naringine et de la daidzéine à différents stades de l'infection par DENV-2 (virus de la dengue de type 2) et du cycle de réplication. La quercétine s'est avérée la plus efficace contre DENV-2 dans les cellules Vero. De nombreux flavonoïdes, à savoir la dihydroquercétine, la dihydrofisetine, la leucocyanidine, le chlorure de pélagoni-din et la catéchine, présentent une activité contre plusieurs types de virus, dont le HSV, le virus respiratoire syncytial, le virus de la polio et le virus Sindbis (Gerdin et Srenso, 1983). L'inhibition de la polymérase virale et la liaison de l'acide nucléique viral ou des protéines de capsid virale ont été proposées comme mécanismes d'action antiviraux (Zandi *et al.*, 2011). La liste de certains flavonoïdes et leur efficacité contre les virus est donnée dans le tableau 10.

Tableau 10: Activité antivirale de divers flavonoïdes. (Kumar et Pandey, 2013).

Flavonoid	Virus
Quercetin	Rabies virus, herpes virus, parainfluenza virus, polio virus, mengo virus, and pseudorabies virus
Rutin	Parainfluenza virus, influenza virus, and potato virus
Apigenin	Immunodeficiency virus infection, Herpes simplex virus type, and Auzesky virus
Naringin	Respiratory syncytial virus
Luteolin	Auzesky virus
Morin	Potato virus
Galangin	Herpes simplex virus type

10- Activité antibactérienne :

Les flavonoïdes sont connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne; il ne devrait donc pas être surprenant qu'ils se soient avérés *in vitro* être des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de micro-organismes. Il a été rapporté que des extraits de plantes riches en flavonoïdes de différentes espèces possèdent une activité antibactérienne (Pandey *et al.*, 2010). Il a été démontré que plusieurs flavonoïdes, dont l'api-génine, la galangine, les glycosides de flavone et de flavonol, les isoflavones, les flavanones et les chalcones, possèdent une puissante activité antibactérienne

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

(**Cushnie et Lamb,2005**) .

Les flavonoïdes antibactériens pourraient avoir plusieurs cibles cellulaires, plutôt qu'un site d'action spécifique. L'une de leurs actions moléculaires est de former un complexe avec des protéines par le biais de forces non spécifiques telles que la liaison hydrogène et les effets hydrophobes, ainsi que par la formation de liaisons covalentes. Ainsi, leur mode d'action antimicrobienne peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes, les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire, etc. Les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes (**Cowan,1999**).

Les catéchines, la forme la plus réduite de l'unité C3 dans les composés flavonoïdes, ont fait l'objet de recherches approfondies en raison de leur activité antimicrobienne. Ces composés sont signalés pour leur activité antibactérienne *in vitro* contre *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* et d'autres bactéries (**Borris,1996**). Il a été démontré que les catéchines inactivent la toxine cholérique dans *Vibrio cholera* et inhibent les glucosyltransférases bactériennes isolées chez *S. mutans*, probablement en raison d'activités complexantes (**Nakahara et al.,1993**). La robinétine, la myricétine et la (-) - épigallocatechine sont connues pour inhiber la synthèse de l'ADN chez *Proteus vulgaris*. Mori et coll. (**Mori et al.,1987**) ont suggéré que l'anneau B des flavonoïdes peut s'intercaler ou former une liaison hydrogène avec l'empilement de bases d'acide nucléique et conduire en outre à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN chez les bactéries. Une autre étude a démontré une activité inhibitrice de la quercétine, de l'apigénine et de la 3,6,7,3,4-pentahydroxyflavone contre l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (**Ohemeng et al.,1993**).

La naringénine et la sophoraf lavanone G ont une activité antibactérienne intensive contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et les streptocoques. Une altération de la fluidité de la membrane dans les régions hydrophiles et hydrophobes peut être attribuée à cet effet qui suggère que ces flavonoïdes pourraient réduire la fluidité des couches externes et internes des membranes (**Tschiya et Iinuma,2000**). La corrélation entre l'activité antibactérienne et l'interférence membranaire soutient la théorie selon laquelle les flavonoïdes peuvent démontrer une activité antibactérienne en réduisant la fluidité membranaire des cellules bactériennes. La 5,7-dihydroxylation du cycle A et la 2,4-ou 2, 6-dihydroxylation du cycle B dans la structure des flavanones sont importantes pour l'activité anti-SARM (**Haraguchi et al.,1998**). Un groupe hydroxyle en position 5 dans les flavanones et les flavones est important pour leur activité contre le SARM. La substitution par les chaînes C8 et C10 peut également améliorer l'activité antistaphylococcique des flavonoïdes

Chpitre03 : activités biologique des flavonoïde

appartenant à la classe des flavan-3-ol (**Alcaraz et al .,2000**). Osawa et coll. ont montré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupes hydroxyle supplémentaires aux positions 7, 2 et 4 inhibaient la croissance de *S. mutans* et de *Streptococcus sobrinus* (**Osawa et al.,1992**).

Haraguchi et ses collègues ont(**Haraguchi et al.,1998**) étudié l'activité antibactérienne de deux flavonoïdes, les licochalcones A et C, isolés des racines de *Glycyrrhiza inflata* contre *S. aureus* et *Micrococcus luteus*. Ils ont observé que la licochalcone A inhibait l'incorporation de précurseurs radioactifs dans les macro-molécules (ADN, ARN et protéines). Cette activité était similaire au mode d'action des antibiotiques inhibant la chaîne respiratoire, car l'énergie est nécessaire pour l'absorption active de divers métabolites ainsi que pour la biosynthèse des macromolécules. Après des études supplémentaires, il a été suggéré que le site d'inhibition de ces flavonoïdes se situait entre la CoQ et le cytochrome dans la chaîne de transport d'électrons respiratoire bactérienne (**Haraguchi et al.,1998**) . Il existe de nombreux exemples qui confirment la prouesse des phytoconstituants dérivés de plantes comestibles et médicinales comme antibactériens puissants. agents (**Maurya et al.,2012**).

Conclusion

Conclusion

La prévention et la guérison des maladies à l'aide de composés phytochimiques, en particulier les flavonoïdes, sont bien connues. Les fruits et légumes sont des sources naturelles de flavonoïdes. La variété de flavonoïdes que l'on trouve dans la nature possède ses propres propriétés physiques, chimiques et physiologiques. La relation structure-fonction des flavonoïdes est la quintessence des principales activités biologiques. L'efficacité médicinale de nombreux flavonoïdes comme agents antibactériens, hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, anticancéreux et antiviraux est bien établie. Ces substances sont plus couramment utilisées dans les pays en développement. L'utilisation thérapeutique de nouveaux composés doit être validée à l'aide de tests biochimiques spécifiques. Grâce à l'utilisation de modifications génétiques, il est désormais possible de produire des flavonoïdes à grande échelle. D'autres réalisations fourniront de nouvelles informations et mèneront certainement à une nouvelle ère d'agents pharmaceutiques à base de flavonoïdes pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses et dégénératives.

Les références bibliographiques :

- 1- Alcaraz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomas, F., & Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, 205(2), 231-240.
- 2- Bacon, J. D., Mabry, T. J., & Mears, J. (1976). UV spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Rev Latinoam Quim*, 7, 83-6.
- 3- Barnes, S. (1995). Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *The Journal of nutrition*, 125(suppl_3), 777S-783S.
- 4- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3248S-3254S.
- 5- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(12), 4505-4515.
- 6- Besle, J. M., Lamaison, J. L., Pradel, P., Fraisse, D., Viala, D., & Martin, B. (2004). Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc. Rech. Rum*, 11, 67.
- 7- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and cancer*, 18(1), 1-29.
- 8- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilár, F., & Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7972-7980.
- 9- Borris, R. P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of ethnopharmacology*, 51(1-3), 29-38.
- 10- Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., de Lima, R. A., Torge, R., & Monache, G. D. (2009). Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current medicinal chemistry*, 16(26), 3414-3468.
- 11- Boudet .A. M .(2000). L'usine chimique. 9èmeconférence de l'université de tous les savoirs.France. p1-16.
- 12- Brassuer, T., & Angenot, L. (1986). Le mélange diphénylborate d' aminoéthanol—PEG 400: Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography A*, 351, 351-355.
- 13- Brown, P. R., & Weston, A. (1997). *HPLC and CE: Principles and Practice*. Academic Press.
- 14- Bruneton J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2ème Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. France.915 p
- 15- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie—plantes médicinales—3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp, 227-310.
- 16- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants.*, (Ed. 2).
- 17- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} édition. Edition Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris, p 261 , 308 , 571.cellular level. Phytother. Res. 22: 567–577.
- 18- Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2003). Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 106(6), 856-862.

Les références bibliographiques

- 19- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5636-5645.
- 20- Carroll, K. K. (1997). Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. *Flavonoids in health and disease*, 437-446.
- 21- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.
- 22- Chae, S. C., Lee, J. H., & Park, S. U. (2013). Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *Excli Journal*, 12, 226.
- 23- Chang, R. L., Huang, M. T., Wood, A. W., Wong, C. Q., Newmark, H. L., Yagi, H., ... & Conney, A. H. (1985). Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo [a] pyrene and (\pm)-7 β , 8 α -dihydroxy-9 α , 10 α -epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis*, 6(8), 1127-1133.
- 24- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- 25- Cimpan, G., & Gocan, S. (2002). Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 25(13-15), 2225-2292.
- 26- Cole, R.B., Ed.(1997). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York.
- 27- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., ... & Della Loggia, R. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.
- 28- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- 29- CRITCHFIELD, J. W., BUTERA, S. T., & FOLKS, T. M. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS research and human retroviruses*, 12(1), 39-46.
- 30- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- 31- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- 32- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- 33- Davis, W., Lamson, M. S., Matthew, S., & Brignall, N. D. (2000). Antioxidants and cancer III: quercetin. *Altern Med Rev*, 5(3), 196-208.
- 34- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- 35- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, AA et Capasso, F. (1999). Flavonoïdes : anciens et nouveaux aspects d'une classe de médicaments thérapeutiques naturels. *Sciences de la vie* , 65 (4), 337-353.
- 36- Dixon, R. A., & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science*, 4(10), 394-400.
- 37- Dong, W. A. N. G., Wei, T. A. N. G., Guang-Ming, Y. A. N. G., & Bao-Chang, C. A. I. (2010). Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities of flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8(6), 461-465.

Les références bibliographiques

- 38- Duchnowicz, P., Broncel, M., Podśędek, A., & Koter-Michalak, M. (2012). Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). *European journal of nutrition*, 51(4), 435-443.
- 39- Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, J. A. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition research reviews*, 13(1), 79-106.
- 40- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5(5), 264-270.
- 41- Edenharder, R. V., Von Petersdorff, I., & Rauscher, R. (1993). Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287(2), 261-274.
- 42- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2512-2518.
- 43- Erdman Jr, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Fols, J., ... & Burrowes, J. (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, 137(3), 718S-737S.
- 44- Ferry, D. R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D. W., deTakats, P. G., Anderson, D., ... & Kerr, D. J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical cancer research*, 2(4), 659-668.
- 45- Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- 46- Fowler, Z. L., & Koffas, M. A. (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 799-808.
- 47- George, S. et Maute, A. (1982). A photodiode array detection system: design, concept and implementation, *Chromatographia*, 15, 419.
- 48- Gerdin, B., & Svensjö, E. (1983). Inhibitory effect of the flavonoid O-(beta-hydroxyethyl)-rutin on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International journal of microcirculation, clinical and experimental*, 2(1), 39-46.
- 49- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2007). Propiedades antiinflamatorias de los flavonoides de la dieta. *Nutrición Hospitalaria*, 22(3), 287-293.
- 50- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- 51- Halbwirth, H. (2010). The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 595-621.
- 52- Hammiche, V., & Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of ethnopharmacology*, 105(3), 358-367.
- 53- Hansen, S. H., Jensen, A. G., Cornett, C., Bjørnsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., & Wilson, I. D. (1999). High-performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum* L. *Analytical Chemistry*, 71(22), 5235-5241.
- 54- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125-129.
- 55- Harborne, J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*, 1, 1-28.
- 56- Harborne, J. B., & Smith, D. M. (1978). Correlations between anthocyanin chemistry and pollination ecology in the Polemoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(2), 127-130.

Les références bibliographiques

- 57-Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- 58-Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- 59-He, Q., Kim, J., & Sharma, R. P. (2004). Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. *Toxicological Sciences*, 80(2), 335-342.
- 60-Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- 61-Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in plant science*, 14(3), 125-132.
- 62-Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Archives of toxicology. Supplement.= Archiv fur Toxikologie. Supplement*, 20, 237-248.
- 63-Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- 64-Hostettmann, K., Marston, A., & Hostettmann, M. (1998). Preparative chromatography techniques.
- 65-Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., ... & Schnitzler, J. P. (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 953-965.
- 66-Issaq, H. J. (1999). Capillary electrophoresis of natural products-II. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 20(15-16), 3190-3202.
- 67-Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.
- 68-IZZO, A. A. (1996). PAF and the digestive tract. A review. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(11), 1103-1111.
- 69-Jäger, A. K., & Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-1485.
- 70-Jeandet, P., Hébrard, C., Deville, M. A., Cordelier, S., Dorey, S., Aziz, A., & Crouzet, J. (2014). Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*, 19(11), 18033-18056.
- 71-Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., & Burns, D. T. (1990). Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv+ 464 pp. Price DM 148.00.
- 72-Kale, A., Gawande, S., & Kotwal, S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(5), 567-577.
- 73-Karima, S., Nadine, C., Fadila, B., & Maurice, J. (2017). Characterization and Distribution of Flavonoids from Flowers in Different Horticultural Types of Begonia. *Pharmacognosy Journal*, 9(6).
- 74-King, A. M. Y., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99(2), 213-218.
- 75-Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- 76-Kumar, S., Chashoo, G., Saxena, A. K., & Pandey, A. K. (2013). Parthenium hysterophorus: a probable source of anticancer, antioxidant and anti-HIV agents. *BioMed Research International*, 2013.

Les références bibliographiques

- 77- Lahouel, M. (2005). *Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine).
- 78- Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M., & Barnes, S. (1995). Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1), 120-123.
- 79- Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), 69-75.
- 80- Leutert, T., & Von Arx, E. (1984). Präparative mitteldruck-flüssigkeitschromatographie. *Journal of Chromatography A*, 292(2), 333-344.
- 81- Liu, H., Zhang, L., & Lu, S. (2012). Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, 17(4), 4281-4291.
- 82- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 477-485.
- 83- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In *The systematic identification of flavonoids* (pp. 35-40). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 84- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids. *The systematic identification of flavonoids*.
- 85- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- 86- Marchart, E., Krenn, L., & Kopp, B. (2003). Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta medica*, 69(05), 452-456.
- 87- Markaverich, B. M., Roberts, R. R., Alejandro, M. A., Johnson, G. A., Middleditch, B. S., & Clark, J. H. (1988). Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *Journal of steroid biochemistry*, 30(1-6), 71-78.
- 88- Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification* (Vol. 36). London: Academic press.
- 89- Marston, A., Slacanin, I., & Hostettmann, K. (1990). Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products. *Phytochemical analysis*, 1(1), 3-17.
- 90- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002, December). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (Vol. 51, No. 6, pp. 304-315). Elsevier Masson.
- 91- Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., & Kaneko, T. (2005). Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), 253-259.
- 92- Maurya, A., Chauhan, P., Mishra, A., & Pandey, AK (2012). Fonctionnalisation de surface de TiO₂ avec des extraits de plantes et leurs activités antimicrobiennes combinées contre *E. faecalis* et *E. coli*. *Journal of Research Updates in Polymer Science*, 1 (1), 43-51.
- 93- Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 577-599.
- 94- Mert-Türk, F. (2002). Phytoalexins: defence or just a response to stress. *Journal of cell and molecular biology*, 1(1), 1-6.
- 95- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.

Les références bibliographiques

- 96- Mishra, A., Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, 2013.
- 97- Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipký, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963-975.
- 98- Morel, S. (2011). *Etude phytochimique et évaluation biologique de Derris ferruginea Benth.(Fabaceae)* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
- 99- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26(8), 2231-2234.
- 100- Nakahara, K. O. I. C. H. I., Kawabata, S. H. I. G. E. T. A. D. A., Ono, H. I. R. O. Y. U. K. I., Ogura, K. Y. O. I. C. H. I., Tanaka, T. A. K. A. H. A. R. U., Ooshima, T. A. K. A. S. H. I., & Hamada, S. H. I. G. E. Y. U. K. I. (1993). Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutants *Streptococci*. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 968-973.
- 101- Niessen, W. M. A. (1999). State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), 179-197.
- 102- Nyiredy, S., Dallenbach-Tölke, K., & Sticher, O. (1988). The “PRISMA” optimization system in planar chromatography. *J. Planar Chromatogr*, 1, 336-342.
- 103- O’connell, J. E., & Fox, P. F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11(3), 103-120.
- 104- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225-230.
- 105- OSAWA, K., YASUDA, H., MARUYAMA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., & ITOKAWA, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), 2970-2974.
- 106- Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., ... & Kim, S. H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, 31(10), 1303-1311.
- 107- Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222.
- 108- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- 109- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- 110- Piquemal.G.(2008).Lesflavonoïdes(enligne)[http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content & view=article & id=166 & Itemid=215](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215)' *Plant Science*, 1: 377–382.
- 111- Pollak, P. E., Vogt, T., Mo, Y., & Taylor, L. P. (1993). Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant physiology*, 102(3), 925-932.
- 112- Ramadan, M. A., & Safwat, N. A. (2009). Antihelicobacter activity of a flavonoid compound isolated from *Desmostachya bipinnata*. *Aust J Basic Appl Sci*, 3(3), 2270-2277.

Les références bibliographiques

- 113- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000). Cocoa inhibits platelet activation and function. *The American journal of clinical nutrition*, 72(1), 30-35.
- 114- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal research reviews*, 23(4), 519-534.
- 115- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of Nutrition*, 22(1), 19-34.
- 116- Saffidine, K. (2018). *Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de carthamus caeruleus L. et de plantago major L* (Doctoral dissertation).
- 117- Saller, R., Meier, R., & Brignoli, R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 61(14), 2035-2063.
- 118- Samouelian, F., Gaudin, V., & Boccara, M. (2009). *Génétique moléculaire des plantes*. Editions Quae.
- 119- Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., & Djilas, S. (2016). Detection of bioactive compounds in plants and food products. In *Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food* (pp. 81-109). Springer, Cham.
- 120- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., & Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 397-402.
- 121- Schaufelberger, D. E. (1991). Applications of analytical high-speed counter-current chromatography in natural products chemistry. *Journal of chromatography. A*, 538(1), 45-57.
- 122- Schaufelberger, D., & Hostettmann, K. (1985). Analytical and preparative reversed-phase liquid chromatography of secoiridoid glycosides. *Journal of Chromatography A*, 346, 396-400.
- 123- Schmelzer, E., Jahnen, W., & Hahlbrock, K. (1988). In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 2989-2993.
- 124- Schmidt, T. J., Merfort, I., & Matthiesen, U. (1993). Resolution of complex mixtures of flavonoid aglycones by analysis of gas chromatographic-mass spectrometric data. *Journal of Chromatography A*, 634(2), 350-355.
- 125- Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in plant science*, 1(11), 377-382.
- 126- Siess, M. H., Le Bon, A. M., Canivenc-Lavier, M. C., Amiot, M. J., Sabatier, S., Aubert, S. Y., & Suschetet, M. (1996). Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo [a] pyrene– DNA Binding in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2297-2301.
- 127- Singhal, R. L., Yeh, Y. A., Prajda, N., Olah, E., Sledge, G. W., & Weber, G. (1995). Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 208(1), 425-431.
- 128- Skibola, C. F., & Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free radical biology and medicine*, 29(3-4), 375-383.
- 129- Smallcombe, S. H., Patt, S. L., & Keifer, P. A. (1995). WET solvent suppression and its applications to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 117(2), 295-303.
- 130- Smith, R. M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 3-27.

Les références bibliographiques

- 131- Sonnenbichler, J. (1986). Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on mRNA, protein, and RNA synthesis in rat livers. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationship*, 319-331.
- 132- Soro, T. Y., Néné-bi, A. S., Zahoui, O. S., Yapi, A., & Traoré, F. (2015). Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné)(Olacaceae). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(3), 3802-3813.
- 133- Spencer, J. P., Vauzour, D., & Rendeiro, C. (2009). Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of biochemistry and biophysics*, 492(1-2), 1-9.
- 134- Stafford, H. A. (1990). Flavonoid metabolism.
- 135- Stapleton, A. E. (1992). Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell*, 4(11), 1353.
- 136- Suntornsuk, L. (2002). Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 27(5), 679-698.
- 137- Swinnen, J. V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., ... & Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *International journal of cancer*, 98(1), 19-22.
- 138- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research*, 7(3), 1089-1099.
- 139- Thomsen, L. L., Ching, L. M., Zhuang, L., Gavin, J. B., & Baguley, B. C. (1991). Tumor-dependent increased plasma nitrate concentrations as an indication of the antitumor effect of flavone-8-acetic acid and analogues in mice. *Cancer research*, 51(1), 77-81.
- 140- Tsuchiya, H., & Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytochemistry*, 7(2), 161-165.
- 141- Urquiaga, I. N. E. S., & Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, 33(2), 55-64.
- 142- Van Tunen, A. J., Mur, L. A., Brouns, G. S., Rienstra, J. D., Koes, R. E., & Mol, J. N. (1990). Pollen-and anther-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene. *The plant cell*, 2(5), 393-401.
- 143- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.
- 144- Voirin, B. (1983). UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'); di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substituted B rings. *Phytochemistry*, 22(10), 2107-2145.
- 145- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free radical biology and medicine*, 36(7), 829-837.
- 146- Wollenweber, E., Wehde, R., Dörr, M., Lang, G., & Stevens, J. F. (2000). C-Methylflavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, 55(8), 965-970.
- 147- Wu, Y., Wang, F., Zheng, Q., Lu, L., Yao, H., Zhou, C., ... & Zhao, Y. (2006). Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Lagdera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science*, 13(4), 569-578.
- 148- Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R., & Yamasaki, K. (1998). Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*, 48(1), 131-136.
- 149- Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, well-being and health*, 2, 23-48.

Les références bibliographiques

- 150- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., & AbuBakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology journal*, 8(1), 1-11.
- 151- Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y., & Xia, M. (2012). The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP–PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 314-327.
- 152- Zogg, G. C., Nyiredy, S., & Sticher, O. (1989). Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography MPLC. II: Influence of solvent strength and flow rate of the mobile phase, capacity and dimensions of the column. *Journal of liquid chromatography*, 12(11), 2049-2065.

Résumé :

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives .

Mots-clés: flavonoïde, biosynthèse, séparation flavonoïde, chromatographie, activité biologique, antioxydants.

المخلص:

الفلافونويد هي منتجات منتشرة على نطاق واسع في المملكة النباتية وعادة ما يتم استهلاكها يوميا في شكل فواكه وخضروات ومشروبات مثل النبيذ والشاي ، وهي قادرة على تعديل نشاط بعض الإنزيمات وتغيير سلوك العديد من الأنظمة الخلوية ، مما يشير إلى أنهم قد يمارسون العديد من الأنشطة البيولوجية ، بما في ذلك مضادات الأكسدة الهامة ، وقائية الأوعية الدموية ، ومضادات تسمم الكبد ، ومضادة للحساسية ، ومضادة للالتهابات ، ومضادة للقرحة وحتى خصائص مضادة للأورام.

الكلمات المفتاحية : الفلافونويد، التركيب الحيوي ، فصل الفلافونويدات، الكروماتوغرافيا ، النشاط البيولوجي، مضادات الأكسدة.

Summary :

Flavonoids are products widely distributed in the plant kingdom and are commonly consumed daily in the form of fruits, vegetables, and beverages such as wine and tea, and are able to modulate the activity of certain enzymes and alter the behavior of many cellular systems, suggesting that they may exert a multitude of biological activities, including significant antioxidant, vasculoprotective, antihepatotoxic, antiallergic, anti-inflammatory, antiulcer and even anti-tumor properties.

Keywords : flavonoid, biosynthesis, flavonoid separation, chromatography, biological activity, antioxidants.