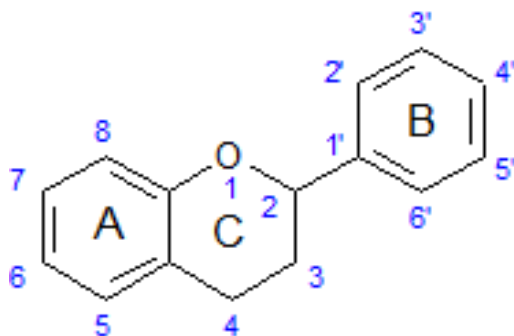


Les Flavonoïdes

Les **flavonoïdes** sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C₆-C₃-C₆, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexagonal.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Ils forment une sous-classe des polyphénols. Il y en a plus de 6000 à avoir été décrits chez les plantes.



- Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal où ils sont présents le plus souvent sous la forme soluble d'hétérosides. Ils sont fréquents chez les Bryophyta (mousses et hépatiques), les Pteridophyta (fougères) et les Gymnospermae (conifères : Arbre produisant des fruits en forme de cône et dont le feuillage est très persistant).

, comme le pin et le sapin) mais c'est chez les Angiospermae (Plante à graines dont l'ovule, fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos. (Les *angiospermes* portent généralement des fleurs typiques. Elles forment un sous-embranchement, s'opposant aux *gymnospermes* : Variété d'arbres dont les ovules et les graines sont apparentes.) qu'ils manifestent la plus grande diversité.

Ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées (papillonneuses) et les bactéries du groupe rhizobium (sont des bactéries aérobies du sol). Les racines de luzerne relâchent des flavonoïdes qui attirent la bactérie *Rhizobium meliloti* et induisent chez elle les gènes de nodulation (fixation d'azote).



Fougères

Les flavonoïdes sont des pigments responsables des colorations des fleurs et des fruits. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH). Les jaunes viennent

des chalcones, aurones et flavonols jaunes, les rouges et les mauves des anthocyanosides, les bleus trouvent leurs origines dans les co-pigments flavones-anthocyanosides. L'absorption dans l'ultraviolet produit des motifs perceptibles par les insectes et capables de les guider vers le nectar.

Les pigments colorés des fleurs servent à attirer les insectes pollinisateurs. Ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs.

On trouve ces pigments dans le rouge des pommes et des poires, dans les baies de genièvre, le miel, le raisin et le vin...

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes sont hydrosolubles et s'accumulent dans les vacuoles.



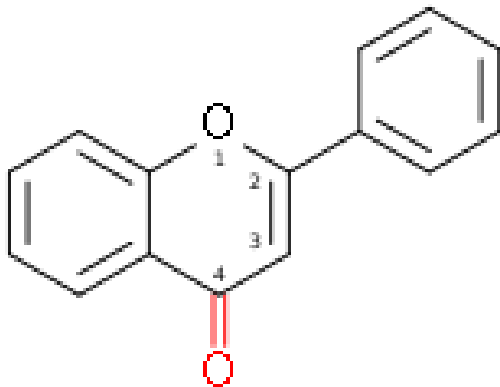
Genièvre

STRUCTURE CHIMIQUE :

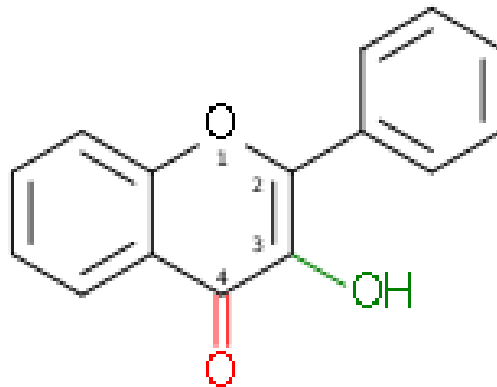
Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C_6 reliés par une chaîne en C_3 . Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone.

La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale C. On peut distinguer notamment dans les flavonoïdes :

FLAVONE :

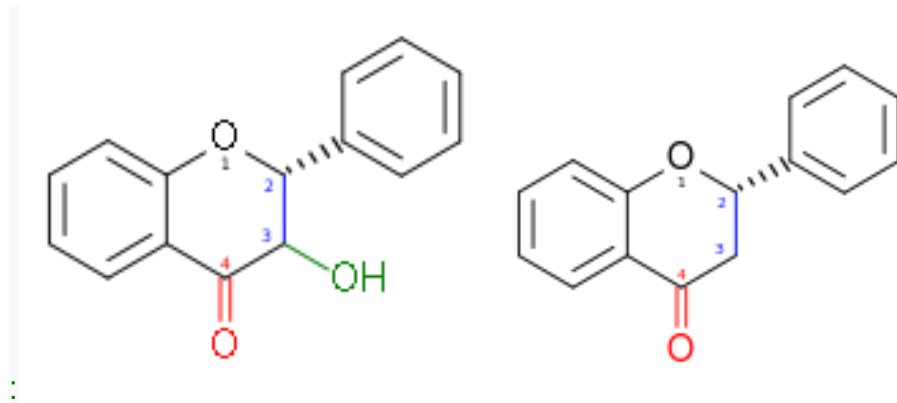


FLAVONOL :

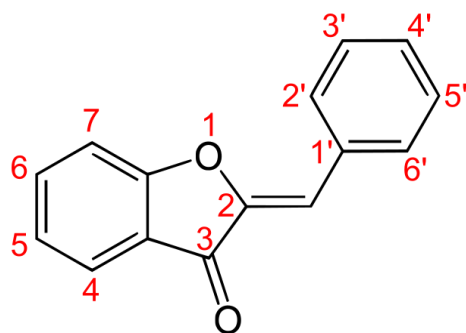


DIHYDROFLAVONOL

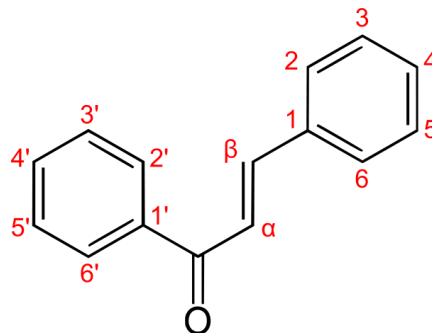
FLAVANONE



AURONE



CHALCONE



Propriétés physico-chimiques :

Les hétérosides de flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires.

L'extraction est réalisée habituellement à l'aide du méthanol ou de mélanges méthanol-eau parfois d'acétonitrile-eau.

Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes contenus dans les extraits éthanoliques du thym et du romarin sont estimés par la méthode d' AlCl_3 (Ayoola *et al*, 2008)

✂ 1ml d'une solution éthanolique d' AlCl_3 (2%) est rajouté à 1ml de l'extrait de la plante.

✂ Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 420 nm, la quercétine est utilisée comme un standard, la quantité des flavonoïdes est estimée en mg EQ/g d'extrait sec de la plante.

La spectrophotométrie :

1- Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert.

2- Principe :

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \ell C} \quad A_\lambda = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda \cdot \ell \cdot C.$$

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente.

Spectres UV-Visible des flavonoïdes :

Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes. Les flavones et flavonols sont caractérisés en majorité par deux bandes d'absorption majeures dans la région UV-Visible. Les flavones et les flavonols hautement oxygénés ont tendance d'absorbance vers les longueurs d'ondes les plus longues en entraînant un déplacement du spectre vers l'infra rouge. La méthylation ou la glycosylation des groupements hydroxyles des flavonoïdes résulte généralement d'un déplacement **hypsochromique** de la bande I.

Bande II	Bande I	Types de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols substitués en C3
250-280	350-385	Flavonols
245-275	310-330	Isoflavones

	(épaulement pic à 320)	Isoflavones (5-desoxy-6,7-dioxygénés)
275-295	300-330 Epaulement	Flavanones et dihydroflavonols
230-270 (Faible intensité)	340-390	Chalcones
230-270	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes

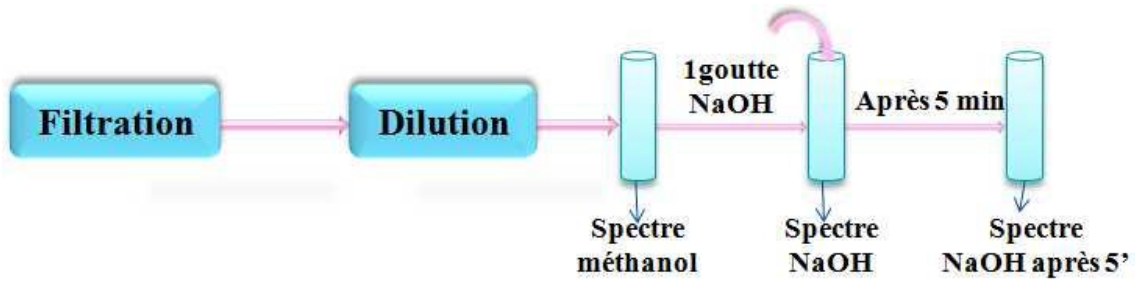
Principales caractéristiques des spectres UV-Visible des flavonoïdes (Markham, 1982)

L'effet hypsochrome est l'effet d'augmenter la fréquence d'absorption d'une molécule de colorant lorsque l'on introduit un auxochrome spécifique. Ceci a pour conséquence le changement de la position de la bande spectrale dans l'absorption, la réflectance, la transmittance ou l'émission d'une molécule vers les longueurs d'onde plus courtes.

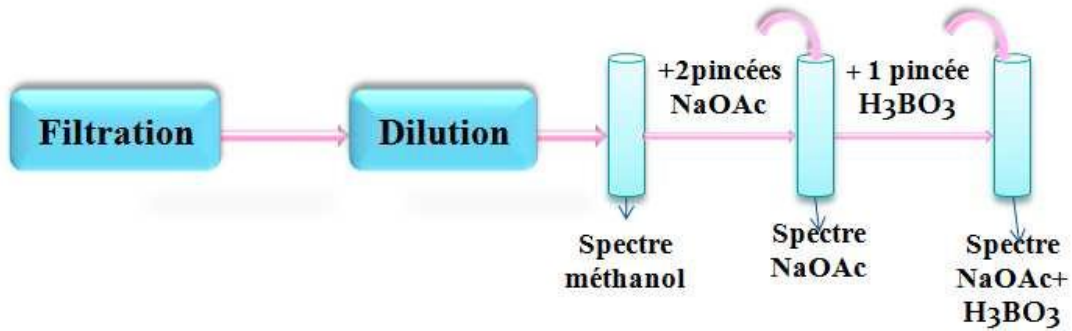
Etude spectrale des flavonoïdes :

Les composés isolés sont analysés par mesure de leur spectre d'absorption UV-Vis dans le méthanol, ainsi que leur déplacement bathochromique, hypsochromique, hyperchromique suite à l'addition des réactifs spécifiques .

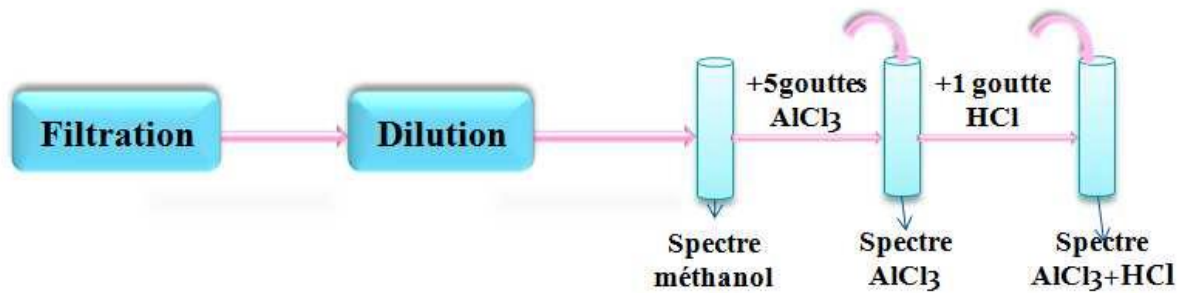
Première série :



0



Troisième série :



Réactifs	Déplacements en nm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavones
	330-360	250-280	Flavonols (3-OH substitué)
	350-380	250-280	Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+45 à 65 BI avec stabilité d'intensité		4'-OH
	+50 à 60 avec diminution d'intensité		3',4'-di OH
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4' -OMe
	Absence de pic entre 320-335		7-OR
	Apparition d'un pic entre BI et BII		7-OH
AlCl ₃ + MeOH	Transformation de BI en une inflexion		5-OH
AlCl ₃ + HCl / AlCl ₃	+20 à 45		5-OH
	+60		3-OH
AlCl ₃ + HCl / AlCl ₃	-30 à 45		3',4' -di OH
	-10		3',4'-OH,OMe
	-20		3',4',5'-tri OH
AlCl ₃ + HCl / MeOH	+35 à 55		5-OH
	+17 à 20		5-OH
NaOAc / MeOH	+20 à 80		7-OH
	Déplacement très faible		7-OR
	Diminution d'intensité avec le temps		6,7 ; 7,8 ou 3',4'-di-OH
	Spectre se décompose avec le temps		5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3,3',4'-triOH

NaOAc +H ₃ BO ₃ / MeOH	+12 à 36	3',4'-di OH
	+5 à 10	6,7 ou 7,8 – di OH

En présence de NaOAc et NaOAc+H₃BO₃ :

L'acétate de sodium NaOAc est une base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule 3, 7 et 4'. Elle provoque un effet bathochrome de 5 à 20 nm, sur la bande II qui signal la présence d'un hydroxyle libre en 7.

L'addition d'acide borique en présence de l'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande I avec 12 à 13 n.m indique un système orthodihydroxyle

En présence de AlCl₃ et AlCl₃ + HCl :

La présence (ou absence) de système ortho dihydroxyle dans les flavonoïdes peut être déduit à partir de l'analyse de leur spectre dans le méthanol avant et après l'addition de chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique.

Dans ces cas la formation d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en 5 (ou en 3) et d'un complexe labile avec le système Ortho dihydroxyle sur les cycles A ou B.

L'utilisation d'AlCl₃ pour la détection de groupement ortho dihydroxylé, se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique neutre.

L'addition de HCl permet de s'assurer de la stabilité du complexe formé. La présence d'un système orthodihydroxyle est observée, sur le spectre obtenu avec le AlCl₃ acidifié par

un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm par rapport au spectre de AlCl_3 . Un déplacement hypsochrome de la bande I de 20 nm est significatif d'une Flavone tri – substitué sur le noyau B.

D'autre part, le spectre obtenu avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ donne un déplacement bathochrome de la bande I de 60 nm, ce qui indique la présence de OH libre en 3, et éventuellement en 5, un déplacement de cette bande de 35 à 55 nm signifié que l'hydroxyle en position 5 est libre.

RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection.

Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage (Gunther, 1994). *Corrélations homonucléaires*

- **COSY** ($1\text{H} - 1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires $2J$ et $3J$ (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- **NOESY** ($1\text{H} - 1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre

protons (effets Overhauser) d'une même molécule. *Correlations hétéronucléaires*

- **HSQC** (1JH-C) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- **HMBC** (2JH-C, 3JH-C) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance 2JHC, 3JH-C, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

Elucidation structurale d'un flavanoïde :

EXEMPLE 1 :

La spectroscopie RMN 1H du produit :

-apparition d'un doublet à 7,86 ppm (2H,d, 8.8 hz) attribuable aux H2'H6'

-l'apparition d'un doublet à 6.93 ppm (2H,d, 8.8 hz) attribuable aux H3'H5'.

-l'apparition d'un singulet à 6.60 ppm correspondant à H3.

-l'apparition de deux doublets à 6.46 ppm (1H,d, 2.1 hz) et à 6.21 ppm (1H,d, 2.1 hz) attribuable à H8 et H6 respectivement

La spectroscopie UV-Vis :

Le spectre UV-Vis du produit dans le méthanol montre qu'il est un Flavone, sa coloration violette sous UV, ainsi que la valeur maximale d'absorbance de la Bande I en présence du méthanol, qui correspond à la longueur d'onde 336nm indique qu'il est un Flavone, c'est-à-dire il ne contient pas de groupement (-OH) en position 3.

Le déplacement bathochromique de la bande I de + 63 nm suite à l'addition de NaOH avec le maintien de la même intensité de l'absorbance prouve qu'il existe un groupe (-OH) en position 4'.avec l'apparition d'un nouveau maximum d'absorbance à 325 nm qui indique l'existence d'un groupement (-OH) à la position 7, cet argument est confirmé par le déplacement bathochromique de la bande II de +6 nm après l'ajout du réactif NaOAc.

L'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I après comparaison des deux spectres AlCl_3 / $(\text{AlCl}_3 + \text{HCl})$ indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di OH sur le cycle B. Par contre l'apparition d'un déplacement bathochromique de la bande I de + 45 nm après la superposition des deux spectres $(\text{MeOH} - \text{AlCl}_3 + \text{HCl})$ prouve qu'il y a un groupement (-OH) en position 5.

D'après tous ces résultats, la structure du produit est la suivante :

5, 7,4'Trihydroxy flavone. Il est connu sous le nom Apigénine

EXEMPLE 2 :

Le profil du spectre RMN ^1H enregistré dans le DMSO, oriente vers la structure d'un Flavonoïde.

On remarque sur le spectre:

Un singulet d'intégration 1H à 6,78 ppm, attribuable à H8.

Un singulet d'intégration 1H à 6,84 ppm attribuable à H3.

Un doublet d'intégration 2H à 6,91 ppm attribuable à H3' et H5'. $J=7$

Un doublet d'intégration 2H à 7,90 ppm attribuable à H2' et H6'. $J=7$

Un singulet d'intégration 3H à 3,52 ppm attribuable au groupe (-OCH₃).

Un singulet d'intégration 1H à 13,04 ppm attribuable au groupe (-OH).

La structure est :

4', 5,7-trihydroxy 6-methoxyflavone et il est connu sous le nom Hispiduline