

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Kasdi Merbah Ouargla

Faculté des Mathématiques et sciences de la matière



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Doctorat ès sciences

Spécialité: Chimie Organique

Par

Nawal LAHMER

Thème :

**ETUDE DE LA SEPARATION CHIRALE DES DERIVES
FLAVANONE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 01/07/2018

Devant le jury:

Mr. Mokhtar SAIDI	Professeur	Univ. KM OUARGLA	Président
Mr. Nasser BELBOUKHARI	Professeur	Univ. TM BECHAR	Rapporteur
Mr. Salah AKKAL	Professeur	Univ. CONSTANTINE 1	Examineur
Mr. Amar DJERIDANE	Professeur	Univ. LAGHOATE	Examineur
Mme. Ouanissa SMARA	M.C.A	Univ. KM OUARGLA	Examinatrice

*Je remercie « Allah », le tout puissant, pour m'avoir
donné la force et la patience.*

Je dédie ce travail :

*A mes **Parents***

*A mon **Marie***

*A mes belles **fillettes***

*A mes **frères***

*A tous les membres de ma **famille***

*A tous mes **collègues et amis***

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du **Laboratoire des Molécules Bioactives et Séparation Chirale** en collaboration avec le laboratoire de **Phytochimie et de Synthèse Organique** à l'université Tahri Mohamed Béchar.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur Nasser BELBOUKHARI, le directeur de laboratoire de recherche (**BMCS**), qui a initié, suivi et dirigé ce travail. Je le remercie tout particulièrement pour l'intérêt qu'il a porté à ce sujet, pour la confiance qu'il m'a accordé ainsi que pour les conseils avisés qu'il a u me prodiguer au cours de longues discussions qui ont été toujours fructueuses.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Abdelkrim CHERITI le directeur de Laboratoire de recherche **LPSO**.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Monsieur Mokhtar SAIDI professeur à l'université kasdi Merbah Ouargla pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Salah AKKAL professeur à l'université de Constantine I et à Monsieur Amar DJERIDANE, Professeur à l'Université de Laghouate, qui ont bien voulu être examinateurs.

Je remercie madame Ouanissa SMARA maitre de conférences classe A à l'université kasdi Merbah Ouargla pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ce travail.

Je remercie également l'ensemble des membres des laboratoires (**LPSO** et **BMCS**).
J'exprime toute ma reconnaissance à tous mes professeurs, et mes collègues.

Table des matières

Dédicace	i
Remerciement.....	ii
Table des matières.....	iii
Abréviations	ix
Liste des Figures	xi
Liste des Tableaux	xiv
Liste des schémas.....	xvi
Introduction générale	
	1
Chapitre I : Chiralité et CLHP chirale	
1. Introduction	6
2. Notion général sur la stéréochimie	6
3. Chiralité et chimie du vivant.....	6
4. Chiralité et domaine pharmaceutique.....	8
5. Les énantiomères (caractérisation et propriétés).....	9
5.1. Définition de l'activité optique.....	9
5.2. Représentation et nomenclature	9
5.3. Propriétés physicochimiques des énantiomères.....	10
6. Diastéréoisomères.....	14
7. Fabrication industrielle de principes actifs sous forme d'un seul énantiomère.....	15
7.1. Le « Chiral Switch ».....	15
7.2. Les séparations énantiosélectives.....	18
8. Techniques utilisées pour l'obtention d'énantiomères purs.....	18
8.1. Synthèse énantioselective.....	18
8.2. Résolution du racémique	19
9. Séparation chirale par CLHP.....	20
1. L'approche indirecte	20
2. L'approche directe.....	21
10. Séparation chirale par CLHP utilisant les phases stationnaires chirales.....	21
10.1. Classification des sélecteurs chiraux	22
10.2. Séparation chirale par CLHP utilisant des phases stationnaires chirales à base de polysaccharide.....	24
10.2.1. Application des phases stationnaires chirale basées en polysaccharide pour la résolution de différentes classes des composés.....	28
10.2.2. Mécanisme de résolution chirale	30
10.3. La domination des phases stationnaires chirales polysaccharidiques.....	33

Table des matières

11. Conclusion.....	34
Références bibliographique.....	35

Chapitre II : Classification et bioactivité des dérivés flavanone

1. Introduction.....	44
2. Chimie et classification des flavanones.....	44
3. BioSynthèse	45
4. Synthèse des flavanones.....	47
5. Diversité et distribution des flavanones.....	48
6. Bioactivité des flavanones	50
6.1. Etudes épidémiologiques en relation avec les flavanones des agrumes	50
6.2. Autres pathologies	51
6.3. Relation structure-activité	52
7. Exemples des études sur l'activité pharmacologiques des flavanones.....	53
7.1. Effet anti oxydant.....	53
7.2. Effet antiallergique	53
7.3. Effet anti-inflammatoire	54
7.4. Effets anti-ulcéreux.....	54
7.5. Effets anticancéreux	54
7.6. Effet Antimutagénique.....	55
7.7. Inhibition de développement des tumeurs	55
7.8. Effets antimicrobiennes.....	56
7.8.1. Antifongique	56
7.8.2. Antibactérienne.....	56
7.8.3. Antivirale	56
7.9. Effets cardio-vasculaires.....	56
7.10. Effets protecteurs vasculaires.....	57
7.11. Effet vasodilatateur	57
7.12. Effet anti-athérosclérose	57
7.13. Autres effets biologiques.....	57
7.14. Effets pharmacologiques d'énantiomères purs des flavanones	58
8. Les flavanones étudiés	58
8.1. Structures et propriétés physicochimiques.....	58

Table des matières

8.2. Sources des flavanones étudiés	61
9. Méthode d'extraction de l'héspéridine.....	61
9.1.Extraction de l' Héspéridine:.....	62
9.2. Purification de l'Héspéridine.....	62
9.3. Conversion de l'Héspéridine en Héspéretine:.....	62
9.4. Purification de l'Héspéretine.....	62
9.5. Identification de l'héspéridine et de l'héspéretine.....	63
9.6. Résultats et discussion.....	63
10. Les thioflavanones.....	64
10.1. Définition.....	64
10.2. Activités pharmacologiques.....	64
1. Activités anticancéreuses.....	64
2. Activités antioxydantes et inhibitrices de production de l'oxyde nitrique	66
11. Les imino-flavanones.....	67
11.1 Définition.....	67
11.2Activités biologiques.....	68
12. Les Azaflavanones.....	68
12.1. Définition.....	68
12.2. Activités biologiques.....	68
12.3. Relation structure activité.....	69
13. Conclusion.....	70
Références bibliographiques.....	71

Chapitre III : Techniques de séparation chirale, diastéromérisation et racémisation des flavanones

1. Introduction.....	82
2. Différents techniques de separation des enantiomères et diastereoisomères des flavanones décrits dans la littérature.....	82
1. Séparation chirale de l'Héspéridine et de Naringine et son analyse dans l'extrait butanolique de <i>Launaea arborescens</i>	82
2. Séparation d'isomères optiques de flavanones et de flavanones glycosides par nano-chromatographie liquide utilisant le phényl-carbamate-propyl- β -	84

Table des matières

cyclodextrine comme phase stationnaire chirale.....	
3. La séparation des énantiomères et des diastéréoisomères de flavanones glycosides de <i>Balanophora involucrata</i> Hook. f. par EC et CLHP en phase inverse sur la colonne C 18.....	86
4. Évaluation d'une phase stationnaire chirale de cellulose tris (3,5 diméthylphenylcarbamate) ayant un support de silice de petits pores	87
5. Séparation des énantiomères de Flavanone et du 2' hydroxychalcone par chromatographie liquide à haute performance dans les conditions à phase inverse...	88
6. Synthèse et application de mono-2 ^A -azido-2 ^A -deoxyperphenylcarbamoyle-β-cyclodextrine et de mono-2 ^A -azido-2 ^A -deoxyperacetyl-β-cyclodextrine en tant que phases stationnaires chirales pour la CLHP.....	89
7. Développement de dérivés dinitrophényl de β-cyclodextrine pour les séparations énantiomériques par CLHP.....	91
8. Effet de l'additif de phase mobile sur la séparation chirale	93
9. Séparation stéréoisomérique de quelques flavanones utilisant le succinate-substitué α-cyclosophoro-octadecaoses en tant qu'additifs chiraux dans l'électrophorèse capillaire	94
10. Influence de la composition de la phase mobile sur l'énantioséparation des Méthoxyflavanones avec la colonne préparée de CDMPC	94
11. Séparation chirale de l'Hesperétine et d'Hespéretine-O-glycosides par électrophorèse capillaire en utilisant les β-1,2-Glucans microbiens (Cyclosophoraoses).	95
12. Séparation chirale des hydroxyflavanones par électrophorèse capillaire de zone en utilisant les cyclodextrines sulfatées en tant que sélecteurs chiraux	96
13. D'autres méthodes.....	96
3. Racémisation et diastereomérisation des flavanones.....	97
3.1 Détermination des barrières de diastereomérisation de l'hesperidine et de naringine par les méthodes.....	98
3.2 Racémisation de l'hespéretine	101
1. Choix des conditions appropriées pour l'étude de racémisation de l'Hespéretine.....	102
2. Le procédé de racémisation	103
4. Conclusion	104

Table des matières

Références bibliographiques.....	106
Chapitre IV : Etude comparative de la séparation chirale des dérivés flavanone	
I. Introduction.....	110
II. Etude de la séparation chirale des flavanones sur différentes PSCs.....	110
1. Appareillage.....	111
2. Solvants et échantillons.....	112
3. Les phases stationnaires chirales.....	112
4. Méthodologie de travail.....	113
a. Sélection de la phase mobile	113
b. Conditions chromatographiques.....	114
c. Optimisation des conditions	114
d. Identification des énantiomères.....	115
e. des facteurs chromatographiques.....	115
5. Résultat et discussion.....	115
1. l'étude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool)	115
2. l'étude de la séparation en mode de phase normale	120
III. Etude de la séparation chirale des imino flavanones sur différentes PSCs.....	126
1. Etude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool).....	126
2. Etude de la séparation en mode de phase normale.....	129
IV. Etude des propriétés stéréochimiques et séparation chirale des analogues Aza-et Thio-flavanones.....	133
1. Dichroïsme circulaire et configuration absolue des Aza-et Thio-Flavanones....	133
2. Résolution des énantiomères de l'Azaflavanone.....	136
3. Séparation par TLC Chiral de 2,3-dihydro-2-phényl-4 (1H)-quinolone (Azaflavanone).....	139
4. Etude de la Séparation chirale de thioflavanone.....	139
V. Etude comparative entre les résultats de séparations chirales des dérivés flavanones et imino flavanones	140
1. Mécanisme de discrimination chirale.....	140
2. Structure moléculaire et reconnaissance chirale.....	142
VI. Conclusion.....	144
Références bibliographique.....	144

Conclusion Générale

Table des matières

Abréviations

Les abréviations et notations utilisées dans ce document sont explicitées ci-dessous :

Ac	Acétonitrile
ACPM	Additif Chiral de la Phase Mobile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKR	Aldo-keto Reductase
AMP	Adénosine Monophosphate
ATP	Adénosine Triphosphate
CBHI	Cellobiohydrolase I
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Cyclodextrine
CDMPC	Cellulose tris (3,5-diméthylphenylcarbamate)
CE	Capillary Electrophoresis
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMEC	Chromatographie Micellaire Electrocinétique
CoA	Coenzyme A
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPS	Chromatographie en Phase Supercritique
CTA-I	Cellulose Triacétate microcristalline
CTPC	Cellulose Trisphenylcarbamate
CVD	Maladies cardio-vasculaires
Cys	Cyclosoporaoses
d	Dextrogyre
DAD	Diode Array Detector
DEA	Diethylamine
DNP	Dinitrophényl
ECC	Electrochromatographie Capillaire
ECZ	Electrophorèse Capillaire de Zone
FLEC	Chloroformiate de (+)-1-éthyl-fluorényle
k'	Facteur de rétention
l	Lévogyre
MCF-7	Cellules tumorales du sein
MCV	Maladies Cardiovasculaires

Abréviations

MeOH	Méthanol
ODS	Octadécylsilane
PAF	Platelet Activating Factor
PEEK	Polyether-Ether cétone
PM	Phase Mobile
PS	Phase Stationnaire
PSC	Phase Stationnaire Chirale
R	Rectus
(R, R)-DANI	Isothiocyanate (1R, 2R) de 1,3-diacetoxy-1-4-nitrophényl-2-propyle
R-HPLC	Reversed phase High performance liquid chromatography
RMN H ¹	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>Rs</i>	Facteur de résolution
S	Sinister
S-β-CD	Sulfate β-Cyclodextrine
(S)-NIPE	(S)-N-4-nitrophénoxy-carbonyl-phénylalanine
TEAA	Triéthylammonium acetate
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Tri fluoro acide acétique
TM-β-CD	2,3,6-tri-O-méthyl β-cyclodextrine
t-PA	Tissue-type Plasminogen Activator
UV	Ultra-Violet
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
ΔG#	Energie d'activation
α-C18	α-Cyclosphoro-octadecaoses
α	Facteur de séparation

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1 : Structure de base des flavanones **01**

Figure 2 : Structure de (a) Azaflavanone et (b) Thioflavanone **02**

Chapitre I : Chiralité et CLHP chiral

Figure I.1. Structure du L-Aspartyl-L-phénylalanate de méthyle **08**

Figure I.2. Enantiomères du thalidomide **09**

Figure I.3. Mise en évidence de l'activité optique d'un composé chiral **10**

Figure I.4. Représentation des énantiomères du glycéraldéhyde selon la convention de Fisher et selon la règle des séquences de Cahn, Ingold et Prelog **11**

Figure I.5. Modèle de reconnaissance chirale **12**

Figure I.6. Représentation des énantiomères de l'adrénaline (a et b) ainsi que leurs sites d'ancrage sur un récepteur (c et d) **14**

Figure I.7. Énantiomères toxiques de l'éphédrine, de la pénicillamine et du thalidomide **15**

Figure I.8. Deux carbones asymétriques possédant 4 stéréoisomères **16**

Figure I.9 : « Chiral switch » de l'Oméprazole commercialisé par AstraZeneca® : sous forme de mélange racémique (Prilosec®) et sous forme de l'énantiomère S (Nexium®) **17**

Figure I.10. Les principales classes de synthèses asymétriques **20**

Figure I.11. Les différentes techniques de résolution chirale **21**

Figure I.12. Principe de fonctionnement d'un biocapteur **24**

Figure I.13. Principe de la reconnaissance chirale en CLHP **23**

Figure I.14. Structure de quelques polysaccharides **26**

Figure I.15. (a) Structure optimisée de triphénylcarbamate de cellulose. (b) Les emplacements possibles d'interaction ont expliqué pour l'identification chirale sur la cellulose triphénylcarbamate PSCs de cellulose **32**

Chapitre II : Synthèse, pharmacologie et extraction des dérivés flavanone

Figure II.1. Structure de base des flavanones **53**

Figure II.2 biosynthèse des flavonoides **55**

Figure II.3. Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogénèse **60**

Figure II.4. Structure de Thioflavanone (a) et Thioflavaone (b) **74**

Figure II.5. Induction de l'apoptose par la thioflavanone et la thioflavone **74**

Figure II.6. Structure des 3'-hydroxythioflavanone et 3'-nitrothioflavanone **75**

Figure II.7. Structure de 4 iminoflavanone **76**

Liste des figures

Figure II.8. Structure d'Aza-Flavanone 1	77
Figure II.9. Les dérivés d'Aza-Flavanone synthétisés	78
Chapitre III : Techniques de séparation chirale, diastéréomérisation et racémisation des flavanones	
Figure III.1. Chromatogrammes de séparation chirale des épimères de Naringine sur Chiralpak IA	83
Figure III.2. Structures des flavanones isolés à partir de plante <i>Balanophora involucrata</i> Hook. f	86
Figure III. 3. Chromatogramme analytique de CLHP en phase inverse des composés 1a et 1b de <i>B. involucrata</i> . Phase mobile	87
Figure III. 4. Structure de (a) mono-2 ^A -azido-2 ^A -deoxyperphenylcarbamoyle β -cyclodextrine et (b) mono 2 ^A azido 2 ^A -deoxyperacetyl β -cyclodextrine.	89
Figure III.5. Les chromatogrammes de la séparation chirale de (a) : Flavanone et de (b) : 7-méthoxyflavanone sur la colonne PSC a. Conditions : eau/méthanol 50 :50, débit 1 ml/min, $\lambda = 254$ nm.	90
Figure III.6. Structure de β -1,2-Glucans	95
Figure III.7. Comparaison de l'énantioséparation de Flavanone sur les trois colonnes. Chiralcel OD-H présente la meilleur résolution	97
Figure III.8. Chromatogrammes de diastéréomérisation d'épimères d'hespéridine et de naringine dans le MeOH à 40 ° C par la méthode de CLHP	98
Figure III.9. présentation graphique de $\ln [D] = f(t)$ pour l'hespéridine obtenu par CLHP	99
Figure III.10. présentation graphique de $\ln [D] = f(t)$ pour la naringin obtenu par CLHP	99
Chapitre IV : Etude comparative de la séparation chirale des dérivés flavanone	
Figure IV.1. Les colonnes chirales utilisées	113
Figure IV.2. Structure énantiomérique de 2'-hydroxyflavanone indique la présence de liaison hydrogène intramoléculaire	117
Figure IV.3. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de flavanone sur la colonne Chiralcel OD.	118
Figure IV.4. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 5-méthoxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD-H	119
Figure IV.5. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de	119

Liste des figures

Naringénine sur la colonne Chiralpak IA.	
Figure IV.6. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4'-méthoxyflavanone sur la colonne Chiralpak IA	120
Figure IV.7. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de Flavanone sur la colonne Chiralpak IB	120
Figure IV.8. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 6-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralpak IB	124
Figure IV.9. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 7-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OJ.	124
Figure IV.10. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de naringénine sur la colonne Chiralpak AD.	125
Figure IV.11. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4'-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD-H	125
Figure IV.12. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 2'-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD.	126
Figure IV.13. Les chromatogrammes représentent les séparations de quelques produits sur les phases stationnaires, Chiralcel OD-H ; Chiralcel OD-H ; Chiralpak IB ; Chiralcel OD-H pour les composés	128
Figure IV.14. Résolution des diastéréoisomères en phase normal	129
Figure IV.15. Projection standard de cycle aromatique aux hétérocycles.	134
Figure IV.16. Courbes de DC de (S)-(-)-Flavanone dans l'éthanol et le n-hexane.	134
Figure IV.17. Courbes de DC de (R)-(-)-Azaflavanone et (R)-(-)-Thioflavanone dans l'éthanol et le n-hexane et l'acétonitril	135

Liste des tableaux

Chapitre I : Chiralité et CLHP chiral

Tableau I.1 : Quelques médicaments du « chiral switch » et raisons associées	17
Tableau I.2: Structures des dérivés de polysaccharide avec une puissance de résolution chirale élevée	26
Tableau I.3 : les PSCs de polysaccharides commercialisés	29

Chapitre II : Classification, bioactivités et extraction des dérivés flavanone

Tableau II.1 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavanones	53
Tableau II.2 : structures et caractéristiques physicochimiques des flavanones étudiés.	59

Chapitre III : Techniques de séparation chiral, diastéromérisation et racémisation des flavanones

Tableau III.1 : Séparation chiral de l'hespéridine et naringin sur Chiralpak IC	83
Tableau III.2 : Résolutions énantiomériques et diastéréoisomériques des flavanones en mode à phase inverse en utilisant une phase mobile basée sur l'eau et le méthanol.	85
Tableau III.3: Résultat de la séparation chirale de flavanone sur les trois colonnes	87
Tableau III.4 : Facteur de rétention (k_I) pour le premier énantiomère, facteur d'enantioseparation (α) et de résolution (R_s) de Flavanone en conditions organiques polaire et en mélanges alcool-eau.	88
Tableau III.5 : Propriétés d'énantioséparation entre PSC a et PSC b dans les conditions à phase inverse	90
Tableau III.6 : Les structures des PSCs utilisés pour la séparation chirale des flavanones basé sur la dinitrophenyl β cyclodextrineitué substituée	91
Tableau III.7 : Résultats chromatographiques d'énantioséparation.	92
Tableau III.8: Résolution dénantiomères de Flavanone sur les colonnes OD, AD et OD+AD avec le TM β - CD en tant qu'additif de phase mobile	93
Tableau III.9: Influence de différents modificateurs alcooliques dans la phase mobile sur la séparation chirale des méthoxyflavanones sur la colonne de CDMPC	94
Tableau III.10. Les constantes de vitesse et l'énergie d'activation de Gibbs de la réaction de diastéréomérisation de la naringine et l'hespéridine déterminées par les méthodes de CLHP	100

Liste des tableaux

Tableau III.11 : Résultat de séparation chirale de l'hesperetine en divers phases mobile par la colonne Chiralcel OJ	102
Tableau III.12 : Résultat chromatographique de l'étude de racémisation à 50°C de l'Hespéretine	103
Tableau III.13 : Résultat chromatographique de l'étude de racémisation à 60°C de l'Hespéretine.	103
Chapitre IV : Etude comparative de la séparation chirale des dérivés flavanone	
Tableau IV.1 : Les caractéristiques des phases stationnaires chirales utilisées	110
Tableau IV.2 : La corrélation des conditions de séparation des composés neutres, acides, et basiques pour les phases stationnaires chirales basé en polysaccharides	113
Tableau IV.3 : Conditions chromatographiques de séparation à phase organique polaire.	115
Tableau IV.4 : Résultat chromatographique en phase organique polaire	116
Tableau IV.5 : Conditions chromatographiques de séparation à phase normal	121
Tableau IV.6 : Séparation chirale des flavanones en différentes compositions de la phase mobile dans les conditions à phase normale.	121
Tableau IV.7 : Conditions chromatographiques de séparation des iminoflavanones à phase organique polaire	126
Tableau IV.8 : Résultats chromatographiques en phase organique polaire	127
Tableau IV.9 : Conditions chromatographiques de séparation des iminoflavanones à phase normal.	129
Tableau IV.10 : Résultat chromatographique en mode de phase normal.	130
Tableau IV.11 . Données de Dichroïsme Circulaire de Flavanone, azaflavanone et thioflavanone	135
Tableau IV. 12 . Valeurs de résolution des composés étudiés	143
Tableau IV.13 : valeurs de résolution des composés étudiés	144

Liste des schémas

Chapitre II : Classification et bioactivité des dérivés flavanone

Schéma II.1 : Synthèse de Flavanone par l'intermédiaire de la condensation de Claisen-Schmidt de 2'-hydroxyacetophenone avec de l'aldéhyde benzoïque a suivi de l'isomérisation de 2'-hydroxychalcone l'intermédiaire formée. **48**

Chapitre IV : Etude comparative de la séparation chirale des dérivés flavanone

Schéma IV.1. processus de résolution des énantiomères d'Aza Flavanone **138**

Schéma IV.2: processus de résolution des énantiomères de Thio Flavanone **139**

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION Générale

Les **Flavanones** sont caractérisés par des "Structures privilégiées" en raison de leurs capacités à interagir avec un certain nombre de récepteurs différents dans le corps. [1].

De nombreux livres et articles ont été écrits sur les flavonoïdes et leurs dérivés, y compris leurs isollements et leurs élucidations structurales, la biosynthèse, l'activité biologique, le métabolisme, la synthèse chimique, et d'autres points d'intérêt. L'accent a été mis sur la relation entre les activités biologiques et structures de ces molécules [2].

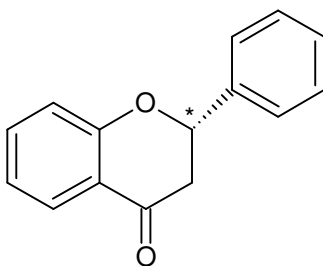


Figure 1 : Structure de base des flavanones

Aujourd'hui encore, ces molécules n'ont pas livré tous leurs secrets. Malgré l'utilisation thérapeutique potentielle des flavanones chirales, très peu d'études sur l'activité pharmacologique des énantiomères purs ont été effectuées [3,4].

Notre travail s'inscrit dans un programme de recherche visant à mieux comprendre le mécanisme de séparation chirale de ces molécules par CLHP Chirale utilisant les Phases Stationnaires Chirales à base de polysaccharide pour développer des méthodes analytiques rapides, sélectives et sensibles pour l'énantioséparation des flavanones et ces différents dérivés afin de déterminer la source bioactive véritable.

Le remplacement isostérique de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ou par un atome d'azote (**Figure 2**) est très utile pour la conception et la synthèse d'analogues, qui devraient améliorer la biodisponibilité et la bioactivité. Les thioflavonoïdes, les analogues soufrés des flavonoïdes naturels, sont responsables de nombreuses bioactivités, y compris l'activité antifongique, antimicrobienne, antioxydante et inhibitrice de la production d'oxyde nitrique. Ainsi, ils ont inhibé de manière significative la prolifération cellulaire avec une faible cytotoxicité et servir de traitements potentiels pour le cancer du sein [5,6]. En outre, les thioflavanones pourraient être des précurseurs précieux pour de nombreux produits pharmaceutiques, tels que la 1,5-benzothiazépine, un polyvalent pharmacophore dans le domaine de la recherche sur les médicaments. Par conséquent, les études sur les propriétés, les méthodes de synthèse et les applications des thioflavanones attire de plus en plus d'attention [3,4].

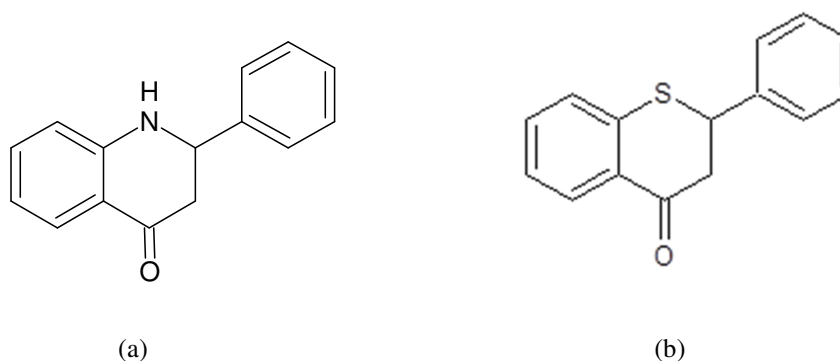


Figure 2 : Structure de (a) Azaflavanone et (b) Thioflavanone

Les dérivés azaflavanones ont eu un potentiel en tant qu'agent Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), Ces composés ont été découverts pour arrêter le cycle cellulaire via une nouvelle voie transitoire dépendante des micro-ARN et contrôlent également la prolifération cellulaire.

En outre, les azaflavanones peuvent être utilisés pour la découverte des nouveaux médicaments comme agents anti-inflammatoires et antiulcéreux puissants [5-10].

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères.

Cette technique séparative repose en général sur la formation de complexes diastéréoisomériques labiles entre chaque énantiomère et la phase stationnaire chirale. La sélectivité dépend alors de la différence de stabilité des complexes formés. Cette technique séparative est la plus répandue dans le domaine pharmaceutique en raison du grand nombre de phases stationnaires commercialisées (polysaccharides, cyclodextrines, antibiotiques macrocycliques, etc...) qui autorise une grande latitude d'ajustement des sélectivités par le biais des interactions ternaires soluté-phase stationnaire-phase mobile [11,12].

Notre travail expérimental a pour but d'étudier la séparation chirale de quelques dérivés de flavanone par CLHP en utilisant des PSCs à base de polysaccharides en deux mode chromatographiques : en phase normal et en phase organique polaire.

Il portera, dans un premier temps, sur l'optimisation de différents paramètres chromatographiques comprenant la composition de la phase mobile, nature de solvant organique et débit pour obtenir l'énantiorésolution complète de tous les composés étudiés.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu sur la mise en évidence du mécanisme de reconnaissance chirale de

INTRODUCTION Générale

certaines sélecteurs chiraux polysaccharidiques basant sur la nature chimique et les autres caractéristiques telles que les dimensions particulières de gel de silice, le type de fixation de sélecteur chirale sur le support chromatographique (déposés ou chimiquement immobilisé) d'une part, et de la structure des molécules étudiées (natures et positions des substituants) d'autre part.

- ❖ Cette thèse s'articule sur quatre chapitres qui sont suivis respectivement par une conclusion générale :
 - Dans la première partie, après un rappel sur la chiralité et les différentes méthodes et techniques de la séparation chirale surtout sur la chromatographie liquide à haute performance utilisant les phases stationnaires chirales dans un premier chapitre,
 - Nous donnerons un aperçu bibliographique sur les flavanones et ces analogues azotés et soufrés ainsi que leur bioactivité et extraction des différents dérivés des flavanones, dans un deuxième chapitre.
- ❖ La deuxième partie, est subdivisée en deux chapitres :
 - Dans le troisième chapitre nous présenterons les différentes techniques de séparation chirale, racémisation et diastéréomérisation des flavanones décrites dans la littérature ;
 - Le quatrième chapitre, est consacré aux :
 - ❖ Screening sur la séparation des dérivés de flavanone par les différents sélecteurs chiraux proposés, Les résultats auxquels nous sommes parvenus, seront exposés et commentés.
 - ❖ Nous présenterons les résultats de séparation chirale des iminoflavanones réalisés précédemment dans notre laboratoire, ainsi les études faites sur les analogues hétérocycliques aza et thio-flavanones.
 - ❖ Etude comparative entre les résultats de séparation chirale des flavanones et iminoflavanones sur les PSCs à base de polysaccharide dans les mêmes conditions. Enfin, on terminera par une conclusion qui sera suivie par les perspectives engendrées par ce travail.

Références bibliographiques

- [1] M. K. Khan (2010) Polyphénols d'Agurmes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine, Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille, pp 32-38.
- [2] R. Cirilli , R. Ferretti, E. De Santis, B. Gallinella, L. Zanitti, F. La Torre (2008) High-performance liquid chromatography separation of enantiomers of flavanone and 2'-hydroxychalcone under reversed-phase conditions, *Journal of Chromatography A*, 1190: 95–101.
- [3] L. Meng, M. Yu Jin, and J. Wang (2016) Rh-Catalyzed Conjugate Addition of Arylzinc Chlorides to Thiochromones: A Highly Enantioselective Pathway for Accessing Chiral Thioflavanones, *Org. Lett.* 18, 4986–4989.
- [4] D. Xiong *et al* (2017) A highly enantioselective access to chiral chromanones and thiochromanones via copper-catalyzed asymmetric conjugated reduction of chromones and thiochromones, *Chem. Commun.*, 53, 6844.
- [5] Choi EJ, Lee JI and Kim GH: Anti-carcinogenic effect of a new analogue 4'-chloroflavanone from flavanone in human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 25: 293-298, 2010.
- [6] Srivari Chandrasekhar *et al* (2012) aza-Flavanones as potent cross-species microRNA inhibitors that arrest cell cycle, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 : 645–648.
- [7] N.S. Gill, A. Kaur, R. Arora, V. Dhawan, M.Bali(2012) Synthetic Studies of Novel Azaflavanone Derivatives and its Biological Activities, *Curr.Res.Chem*, 4(4):88-98.
- [8] S. Kasturi *et al*(2017) Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of Azaflavanones as α -Glucosidase Inhibitors, *Med. Chem. Commun.*, 8 :1618-1630 .
- [9] R. Prasad, P. K. Sharma Y. R. Lee (2015) Mild and Efficient Silver(I) Triflate Catalyzed Synthesis of 2-Aryl- 2,3-dihydroquinolin-4(1H)-ones, and Their Antioxidant Activities, *Synthesis*, 47:3881–3890.

INTRODUCTION Générale

- [10] J. In Lee and Je-Hyuk Lee (2014) Antioxidant and Inhibitory Activities of Thioflavanones against Nitric Oxide Production, *Food Sci. Biotechnol.* 23(3): 957-963.
- [11] M, Beaufour, P. Morin, J. P. Ribet, J. C. Maurizot (2006) HPLC quantitation of the four stereoisomers of benzoxathiepin derivatives with cellulose phenyl type chiral stationary phase and circular dichroism detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41:544–548
- [12] C. Xu, W. Tu, C. Lou, Y. Hong, M. Zhao (2010) Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta-cypermethrin, *Journal of Environmental Sciences.* 22(5): 738–743.

Partie I

Chapitre I : **Chiralité et CLHP chirale**

1. Introduction

Nous aborderons dans ce chapitre, dans un premier lieu, quelques notions sur la chiralité, puis nous décrirons les différentes méthodes de séparation des énantiomères et discrimination chirale. Dans une deuxième partie nous nous intéresserons à la séparation chirale par CLHP utilisant les phases stationnaires chirales. Ceci sera suivi par une description détaillée sur les phases polysaccharidiques, leurs applications, et leurs mécanismes de résolution chirale.

2. Notion général sur la stéréochimie

Le terme stéréochimie est ancien et entre dans le domaine de l'expérimentation scientifique dès les XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècle [Etienne Malus: 1808; Jean-Baptiste Biot:1815; Louis Pasteur: 1848; Kékule: 1867; J.H Vant't Hoff et le Bel: 1874; Emile Fischer: 1910 et Canh-Ingold-Prelog: 1950]. C'est le terme général englobant tous les autres types de stéréoisomères (symétrie et énantiomérie; diastéréoisomères; chiralité; pouvoir rotatoire; activité optique; configuration absolue; convention R et S de Cahn-Ingold-Prelog; lévogyre; dextrogyre; mélange racémique; isomères géométriques et méso: résolution; etc..)[1].

Les premiers essais de compréhension de la chiralité ont été menés par Louis Pasteur en 1848, celui-ci ayant travaillé sur les produits de fermentation du vin, notamment l'acide tartrique. Les cristaux de ce composé récoltés se trouvaient sous deux formes pouvant être considérées comme gauches ou droites [2-7]. L'expérimentation de Pasteur a résidé dans le tri des deux formes de ces cristaux avant d'en vérifier la déviation de la lumière, qui s'est trouvée opposée pour chacune des formes de cristal. Vingt-cinq années plus tard et plus précisément, en 1874, le français Le Bel et le néerlandais Van't Hoff introduisent la théorie du carbone tétraédrique, créant le concept du carbone asymétrique. Enfin, en 1898, le physicien anglais Lord Kelvin donne le nom de « **chiralité** » à la « propriété qui distingue les énantiomères d'une même molécule » [8-10]

3. Chiralité et chimie du vivant

L'origine des molécules chirales sur Terre n'a pas encore été établie mais des scientifiques s'intéressent à sa découverte. Des chercheurs du CNRS en 2011 ont établi que l'asymétrie « naturelle » (ou chiralité) des molécules biologiques viendrait de l'espace. Certaines molécules chirales du vivant, comme les acides aminés et les sucres, ne sont

présentes que sous une seule forme (on appelle homochiralité la propriété des molécules organiques de n' exister dans les êtres vivants que sous une seule des deux formes chirales) et ces scientifiques se sont posés la question de savoir pourquoi la vie avait privilégié l' une de ces deux formes plutôt que l'autre [7,11].

Le concept de dissymétrie moléculaire a très vite été associé à la chimie du vivant. Les molécules chirales de synthèse sont à 90% faites à partir du chiral pool (ensemble des molécules chirales d'origine naturelle). La Nature qui nous entoure possède sa propre signature et l'homochiralité qui la caractérise a fasciné plus d'un scientifique. En 1886, l'Italien chimiste Piutti isole les deux formes énantiomériques de l'asparagine et met en évidence une différence de goût, la forme (+) étant sucrée alors que la forme (-) est insipide [11, 12].

Piutti est alors le premier à établir la relation entre la structure moléculaire et l'activité biologique. Cette découverte a ouvert la voie aux études concernant la stéréospécificité des récepteurs biologiques et les mécanismes de transduction du signal cellulaire pour le traitement de maladies telles que l'obésité, le diabète et l'hyperlipidémie, liées à la consommation de sucre [11 ,12].

La stéréospécificité des récepteurs gustatifs est illustrée par l'exemple de l'aspartame, dipeptide méthylé provenant de la synthèse d'acide aspartique et de phénylalanine. Cette molécule présente un pouvoir sucrant 150 fois supérieur à celui du sucre. C'est l'isomère L-L qui, commercialisé, présente un goût sucré alors que la forme D-D est amère (**figure 1**) [13].

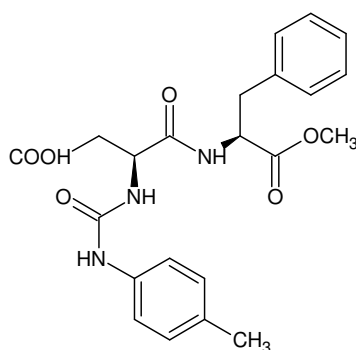


Figure I.1. Structure du L-Aspartyl-L-phénylalanate de méthyle [13].

Dans le domaine de l'agroalimentaire, la présence de D-acides aminés dans le lait cru est un signe de prolifération bactérienne. La détection du (E)-5-methylhept-2-en-4-one, reconnu comme principale saveur des noisettes, est un signe d'authenticité des huiles

comestibles. Dans le cas de l'huile de rose, l'authenticité est déterminée par la présence de (S)-(-)-citronellol, *cis*- et *trans*-oxyde de rose. En archéologie, la mesure du degré de racémisation d'acides aminés spécifiques peut fournir une méthode de datation. L'âge de coquilles fossiles peut être estimé en évaluant le rapport des isomères de l'isoleucine. L'estimation de la datation d'ossement fossiles provenant de sites préhistoriques du Sud de la France a été réalisée en suivant les taux de racémisation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique des protéines. Dans le cas de la maladie des urines du Sirop d'Erable (MSUD), un déficit enzymatique empêche la dégradation de trois acides aminés ramifiés (Leucine, Isoleucine et Valine). La recherche de marqueur dans les urines permet de diagnostiquer ce trouble métabolique [13-15].

En 1908, Abderhalde et Muller découvrent des différences entre les deux formes de l'épinephrine en termes d'activités pharmacocinétique, physiologique, toxicologique et métabolique. La stéréochimie est perçue comme un outil capital pour la recherche et le développement dans le domaine pharmaceutique [13].

4. Chiralité et domaine pharmaceutique

Le rôle primordial des molécules chirales en thérapeutique a été révélé et mis en évidence à la suite de la tragédie sanitaire de la Thalidomide® survenue dans les années 1970. A cette époque, la commercialisation de médicaments sous forme de mélange racémique était largement répandue en industrie pharmaceutique. La mise sur le marché de médicaments chiraux devient alors surveillée par les différentes autorités sanitaires [10,16].

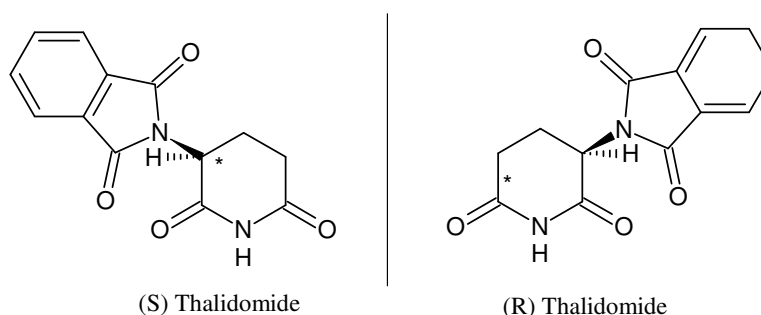


Figure I.2. Enantiomères du thalidomide [10].

De plus, dans la mesure où un médicament comportant un seul énantiomère en lieu et place du racémique est considéré comme un principe actif nouveau, le développement de médicaments énantiopurs (contenant un seul énantiomère) devenait économiquement intéressant pour les industriels. Ainsi, le marché des médicaments énantiopurs a

considérablement augmenté depuis la fin du 20^{ème} siècle : en 2012, les autorités sanitaires américaines ont approuvés 26 nouvelles molécules dont 11 sont des énantiopurs et aucune n'est un mélange racémique [11].

5. Les énantiomères (caractérisation et propriétés)

5.1. Définition de l'activité optique

L'activité optique est la capacité d'une molécule à modifier l'orientation d'un plan de polarisation de la lumière. Dans la lumière polarisée plane, le vecteur champ électrique varie périodiquement en amplitude mais demeure dans un plan qui possède une orientation constante. Après la traversée d'un « milieu optiquement actif » (exemple : un énantiomère), l'orientation de ce plan est modifiée d'un angle α . Dans des conditions expérimentales données, cet angle α est caractéristique de chaque composé optiquement actif [11,17].

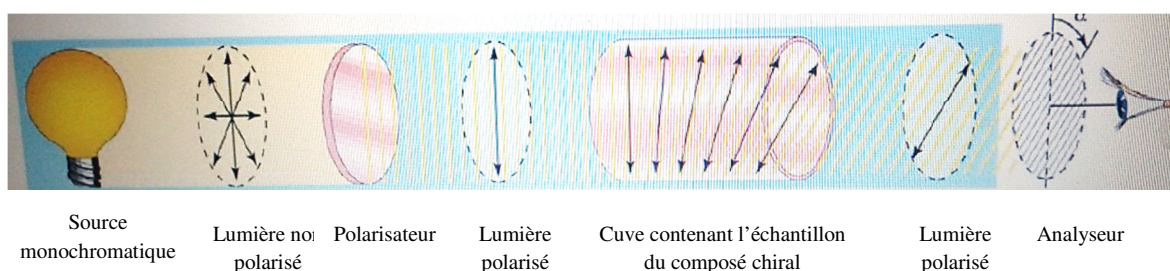


Figure I.3. Mise en évidence de l'activité optique d'un composé chiral [11].

Deux énantiomères ont des activités optiques identiques en valeur absolue mais de signe opposé [11].

5.2. Représentation et nomenclature

Une molécule chirale et son image par un miroir plan sont liées par une relation d'isomérisie appelée énantiomérisie. Une molécule chirale ne possède qu'un seul énantiomère. Un mélange équimolaire de deux énantiomères est appelé mélange racémique ne dévie pas la lumière polarisée ; il est représenté par (+,-), (d,l) ou (R,S) [18-24].

La représentation de la configuration des énantiomères fait appel à la convention de Fischer et de Cahn-Ingold-Prelog (ou règle des séquences) [22]:

La convention de Fischer: les liaisons horizontales et leurs substituants sont au-dessus du plan alors que les liaisons verticales et leurs substituants sont en-dessous du plan

La règle des séquences de Cahn, Ingold et Prelog : les substituants fixés sur le carbone asymétrique sont classés dans un ordre de priorité : $\text{OH} > \text{CHO} > \text{CH}_2\text{OH} > \text{H}$ par exemple pour le glycéraldéhyde. On obtient des dérivés R (Rectus) si les substituants sont dans le sens des aiguilles d'une montre et S (Sinister) s'ils sont dans le sens inverse [1, 11].

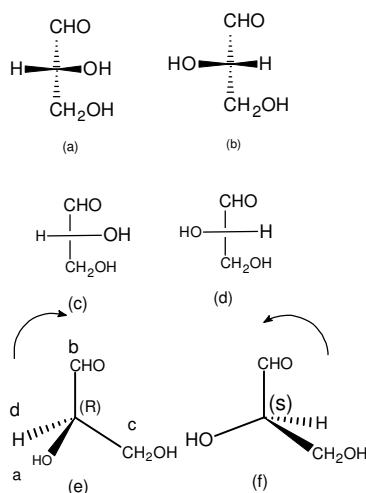


Figure I.4 : Représentation des énantiomères du glycéraldéhyde selon la convention deFisher et selon la règle des séquences de Cahn, Ingold et Prelog [11]

5.3. Propriétés physicochimiques des énantiomères

Les énantiomères d'une molécule chirale possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques telles que points de fusion et d'ébullition, solubilité et pKa, mais diffèrent seulement par leurs propriétés liées à l'activité optique. Leurs propriétés physico-chimiques identiques ne permettent pas de les séparer facilement par des techniques ordinaires. L'activité optique est une propriété physique exclusive à un énantiomère qui peut varier avec le solvant utilisé, la température, la concentration et le pH. Elle est illustrée avec l'exemple de l'énantiomère actif du chloramphénicol, qui est dextrogyre dans l'alcool et levogyre dans l'acétate d'éthyle [1,25].

5.4. Notions sur l'action pharmacologique et biologique des énantiomères

Au début du 20^{ème} siècle, Ehrlich démontre l'importance des rapports entre la structure d'une substance médicamenteuse et son activité avec l'introduction de la notion de récepteur chimique. Les récepteurs chimiques présentent une configuration spatiale tridimensionnelle bien définie et asymétrique (**Figure I.5**), si bien que dans le cas de médicaments chiraux, les

interactions entre le médicament et le récepteur sont favorables pour l'un des deux énantiomères et non pour les deux [11,26-28].

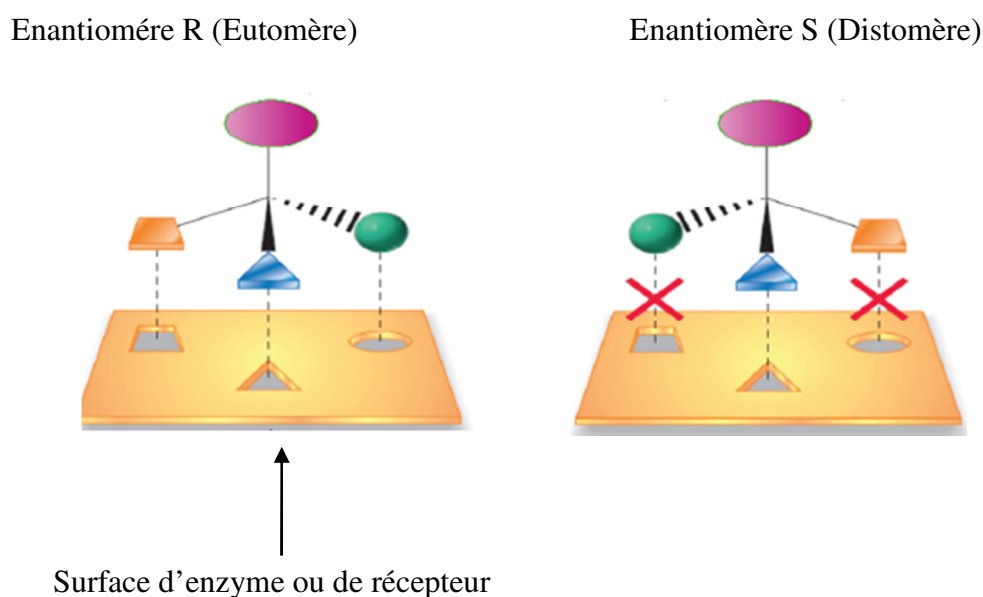


Figure I.5. Modèle de reconnaissance chirale [29].

Les études pharmacodynamiques réalisées avec des composés chiraux ont démontré des différences significatives dans l'action pharmacologique des énantiomères [26-28]. Cette différence dans l'activité pharmacodynamique des énantiomères a donné naissance à une terminologie additionnelle. L'énantiomère ayant une très grande activité ou affinité pour son récepteur est nommé eutomère ou isomère actif, alors que l'énantiomère ayant une très faible affinité pour son récepteur est nommé distomère ou isomère inactif. Le rapport d'affinité ou d'activité des deux énantiomères est nommé eudismique. Certains énantiomères ont des activités biologiques tellement diverses que les deux énantiomères sont commercialisés pour des applications thérapeutiques différentes. Par exemple, le dextroproxyphène est utilisé comme eutomère pour des propriétés analgésiques, alors que levoproxyphène est utilisé comme eutomère pour des propriétés antitussives. Il est important d'aborder ici les différentes propriétés de l'activité pharmacologique et la toxicité des énantiomères d'un composé chiral [1,29].

- a) **Les deux énantiomères peuvent avoir la même activité pharmacologique, tant qualitativement que quantitativement.**

La prométhazine est un exemple probant dans lequel sont démontrées les mêmes actions antihistaminiques et toxiques dans les deux isomères, ainsi les énantiomères de la cocaïne appartiennent à cette catégorie [1, 10, 29]

- b) **Un seul des isomères du composé chiral est doté d'une activité biologique.**

Ceci a été démontré pour un nombre important de bloqueurs des canaux calciques chiraux utilisés dans le traitement de l'angine et de l'hypertension. Par exemple, le (S)-(-)-propranolol agit au niveau du récepteur α_1 -adrénergique en le bloquant, alors que le (R)-(+)-propranolol est dépourvu de cette activité.

- c) **Les énantiomères possèdent une même activité biologique, identique qualitativement, et différente quantitativement.**

Cette différence est probablement due au fait que les deux énantiomères agissent au niveau des mêmes récepteurs, mais l'un des deux a une meilleure affinité, et de ce fait, une meilleure réponse pharmacologique est observée. Par exemple, la forme (S)-(-) warfarin est 2 à 5 fois plus active que la forme (R)-(+) warfarin [1]. Ainsi, l'énantiomère (R) de l'adrénaline a un effet vasoconstricteur plus important que l'isomère (S). Cette différence d'activité entre les deux énantiomères a été expliquée par la théorie d'Easson et Stedman, évoquée précédemment, envisageant trois points de contact pour l'antipode le plus actif.

Ainsi, la meilleure activité de la (R)-adrénaline s'explique par une meilleure fixation de celle-ci au récepteur (3 sites de fixation : une interaction de Van der Waals pour le noyau benzénique, une liaison hydrogène pour l'hydroxyle et une interaction charge-charge de la fonction amine ionisée) par rapport à la (S)-adrénaline (2 sites d'ancrage) [10] (**Figure I.6**). Dans ce cas, la commercialisation de l'énantiomère le plus actif présente l'avantage de l'emploi d'une dose plus faible de principe actif [29].

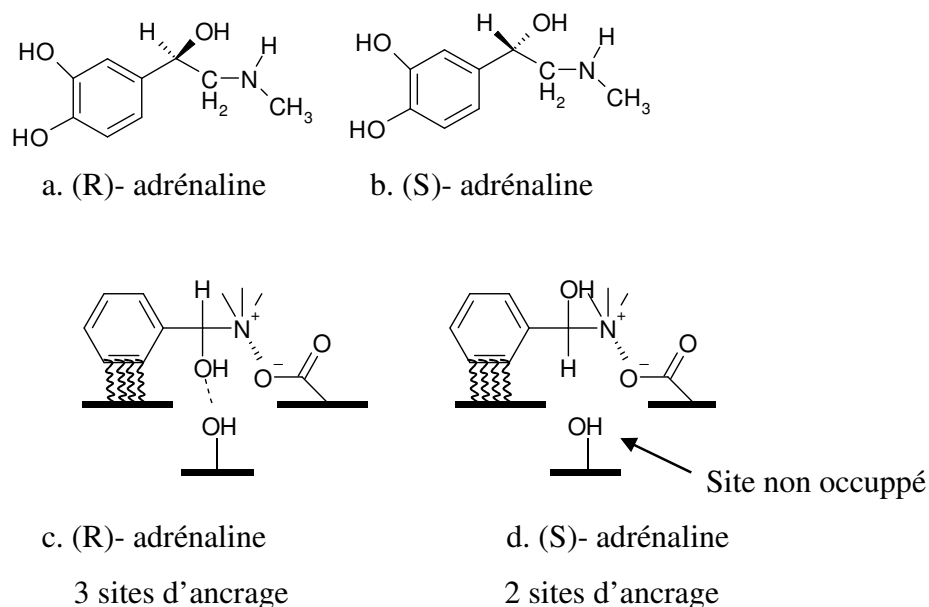


Figure I.6. Représentation des énantiomères de l'adrénaline (a et b) ainsi que leurs sites d'ancrage sur un récepteur (c et d) [29].

d) Les énantiomères ont une action pharmacologique qualitativement différente

Lorsque les énantiomères possèdent des propriétés pharmacologiques différentes, l'usage du mélange racémique peut être maintenu si leurs effets sont bénéfiques sur le plan thérapeutique.

En revanche dans le cas de la lévothyroxine, la séparation des énantiomères a un intérêt économique puisqu'elle permet d'accéder à deux médicaments distincts ayant des activités thérapeutiques différentes. En effet, la lévothyroxine, l'hormone thyroïdienne physiologique, est commercialisée pour traiter des patients souffrant d'hypothyroïdie alors que la dextrothyroxine permet le traitement de patients atteints d'hypercholestérolémie [1,29].

e) La toxicité est liée à un seul des deux énantiomères

Lorsque l'un des deux antipodes est toxique, la séparation des énantiomères s'avère obligatoire pour ne retenir que l'énantiomère actif non toxique, grâce à la mise en oeuvre du dédoublement du racémique ou par une méthode de séparation énantiosélective et de purification appropriée. Cependant, même en cas d'utilisation d'un énantiomère pur, il convient toujours d'être prudent et de ne pas exclure la possibilité d'une racémisation métabolique possible, se traduisant par l'apparition éventuelle d'une toxicité ou d'effets secondaires inattendus.

L'usage d'un antipode actif, dont l'énantiomère est toxique, nécessite donc une étude préliminaire, démontrant la non-isomérisation métabolique du principe actif en son

énantiomère toxique ainsi que la non-formation de métabolites toxiques. L'isomère *S* de la pénicillamine est un agent très efficace pour le traitement de l'arthrite chronique alors que son énantiomère est fortement toxique. Ainsi, dans le cas de la thalidomide, des études ont montré que l'énantiomère (*S*) était responsable des effets tératogènes. Cependant, des études portant sur les métabolites de la thalidomide ont été réalisées indiquant que les malformations fœtales observées étaient plus précisément liées au métabolite hydroxylé de l'énantiomère (*S*) [1, 12].

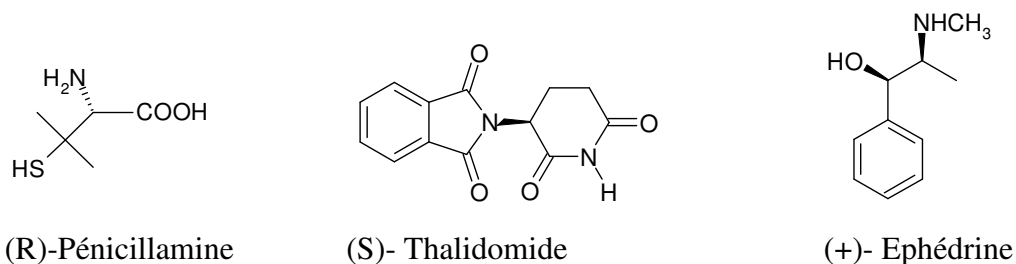


Figure I.7. Énantiomères toxiques de l'éphédrine, de la pénicillamine et du thalidomide [7].

6. Diastéréoisomères

Les diastéréoisomères sont des composés ayant deux ou plusieurs centres asymétriques. Ils se réfèrent à tous les autres stéréoisomères non superposables dans un miroir comme les isomères géométriques (Cis ou *Z*-isomères; Trans ou *E*-isomère) et les isomères méso. La plupart de leurs propriétés sont différentes, y compris leur activité optique et ils se comportent par conséquent comme deux substances chimiques différentes qui peuvent être séparées par des techniques chromatographiques courantes, comme pour un composé achiral (molécule possédant un centre de symétrie et une image miroir superposable) [1, 11].

Une molécule possédant *n* carbones asymétriques comporte 2^n stéréoisomères en relation d'énantiomérisation et de diastéréoisomérisation.

Exemple :

Deux carbones asymétriques possédant des substituants distincts \Rightarrow 4 stéréoisomères :

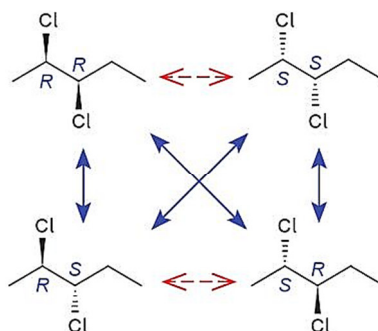


Figure I.8. Deux carbones asymétriques possédant 4 stéréoisomères [30]

7. Fabrication industrielle de principes actifs sous forme d'un seul énantiomère

7.1. Le « Chiral switch »

Depuis une dizaine d'années, les brevets couvrant les médicaments sous forme de mélange racémique expirent, laissant place à la mise sur le marché des génériques de ces médicaments. Pour lutter contre cette concurrence des génériques, les entreprises pharmaceutiques ont commercialisé un des énantiomères du médicament racémique. Cette stratégie est appelée « chiral switch » et a été entreprise par les laboratoires Astra Zeneca pour la spécialité Prilosec® (Oméprazole sous forme de mélange racémique). Ces derniers gardent ainsi le monopole de leur produit en développant le médicament gastrointestinal Nexium®, Esoméprazole, énantiomère (S) de l'Oméprazole (**Figure I.9**). L'énantiomère (S) de l'Oméprazole est plus efficace que l'Oméprazole (mélange racémique) en raison de son métabolisme hépatique, plus faible que celui de l'Oméprazole. Cette technique permet de rester compétitif face à la mise sur le marché des différents génériques [11,31-34].

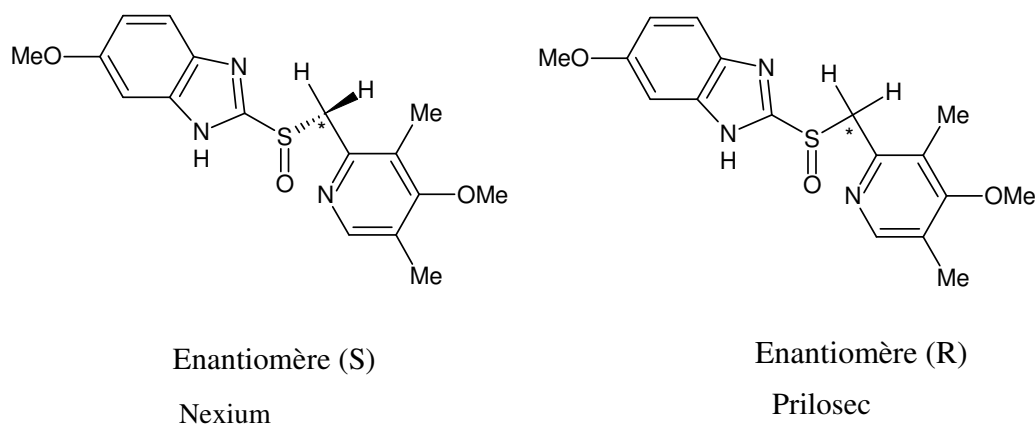


Figure I.9. « Chiral switch » de l'Oméprazole commercialisé par AstraZeneca® : sous forme de mélange racémique (Prilosec®) et sous forme de l'énantiomère S (Nexium®)[11, 31]

Les raisons du « chiral switch » sont diverses :

- Des effets indésirables gênants voir graves peuvent être observés dans le médicament racémique mais pas avec l'énantiomère seul.
- Le développement des technologies de fabrication des énantiomères purs peut encourager les laboratoires à commercialiser le médicament sous forme d'énantiomère seul.
- L'activité est portée par un seul des énantiomères.
- Seules des études de bioéquivalence notamment pharmacologiques et toxicologiques sont nécessaires pour la mise sur le marché de l'énantiomère seul [11,32].

Quelques exemples du « chiral switch » sont présentés dans le Tableau I

Tableau I.1 : Quelques médicaments du « chiral switch » et raisons associées [11 ,32]

Médicament énantiopur	Actions / Indications	Raisons de la commercialisation de l'énantiopur
Dexketaprofène (Enantiomère S)	Anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)	Action pharmacologique réside dans l'énantiomère S. Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique
Dexibuprofène (Enantiomère S)	AINS	Action pharmacologique réside dans l'énantiomère S. Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique
Esoméprazole (Enantiomère S)	Inhibiteur de la pompe à proton (IPP)	Diminution du premier passage hépatique et augmentation de la biodisponibilité par rapport à l'énantiomère R. Durée d'action plus longue qu'avec le mélange racémique. Réduction de la variabilité de réponse « inter-patients »
Levofloxacin (Enantiomère S)	Antibiotique	Activité plus importante de l'énantiomère S par rapport au mélange racémique
Levobupivacaine (Enantiomère S)	Anesthésique local	Réduction de la cardiotoxicité liée à l'énantiomère R
(S)-Kétamine (Enantiomère S)	Anesthésique	Enantiomère S plus actif et réduction des effets secondaires liés à l'énantiomère R (effets postanesthésique : hallucinations, agitation)
Levocétirizine (Enantiomère R)	Antihistaminique H1	Inactivité pharmacologique de l'énantiomère S et réduction des effets indésirables liés à l'énantiomère S
Cisatracurium (Enantiomère 1R,2R,1'R,2'R)	Relaxant musculaire	L'énantiomère seul est trois fois plus actif que le mélange racémique. Réduction de la dose administrée
(R)-Salbutamol (Enantiomère R)	Agoniste β_2	Activité bronchodilatatrice supérieure à celle du mélange racémique
(R,R)-Méthylphénidate (Enantiomère R,R)	Trouble d'hyperactivité	Action dix fois plus importante qu'avec l'énantiomère (S,S). Même activité qu'avec le mélange racémique mais avec une dose deux fois moins importante. Rapidité d'action plus importante, réduction de l'apparition d'effets secondaires.
D-pénicillamine	Maladie de Wilson	Toxicité de l'énantiomère L (perte de poids, pouvoir mutagène, mort)

L-dopa (Enantiomère R)	Maladie de Parkinson	Réduction des effets indésirables observés avec le médicament racémique (nausée, vomissements, anorexie, mouvements involontaires, granulocytopénie)
Levonorgestrel	Contraception orale	Activité pharmacologique réside dans l'énantiomère L.
Escitalopram (Enantiomère S)	Antidépresseur	Même profil pharmacologique et toxicologique mais activité cent fois plus importante de l'énantiomère S
Levomilnacipran (Enantiomère 1S,2R)	Anti-dépresseur (Inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline)	Enantiomère actif du milnacipran. Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique

7.2. Les séparations énantiosélectives

La régulation concernant l'utilisation de composés chiraux a induit un développement important de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique et des avancées considérables dans le domaine des techniques de séparation [13].

8. Techniques utilisés pour l'obtention d'énantiomères purs

8.1. Synthèse énantioselective

La voie royale pour obtenir des composés chiraux purs est la synthèse directe de l'énantiomère (synthèse asymétrique) sans passer par l'intermédiaire d'un racémique et par l'élimination de l'une des deux formes [29].

La synthèse asymétrique consiste à transformer un substrat prochiral en un produit chiral [35]. Cette transformation nécessite l'aide d'un auxiliaire chiral qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur. Dans ce dernier cas, on parle de catalyse asymétrique, situation la plus avantageuse en ce qui concerne l'auxiliaire chiral qui, en principe, peut être utilisé en quantité minime pour engendrer une très grande quantité du produit désiré [36].

Les trois principaux types de synthèse asymétrique (diastéréosélective, énantiosélective stœchiométrique ou catalytique) sont illustrés (**figure I.10**) [36].

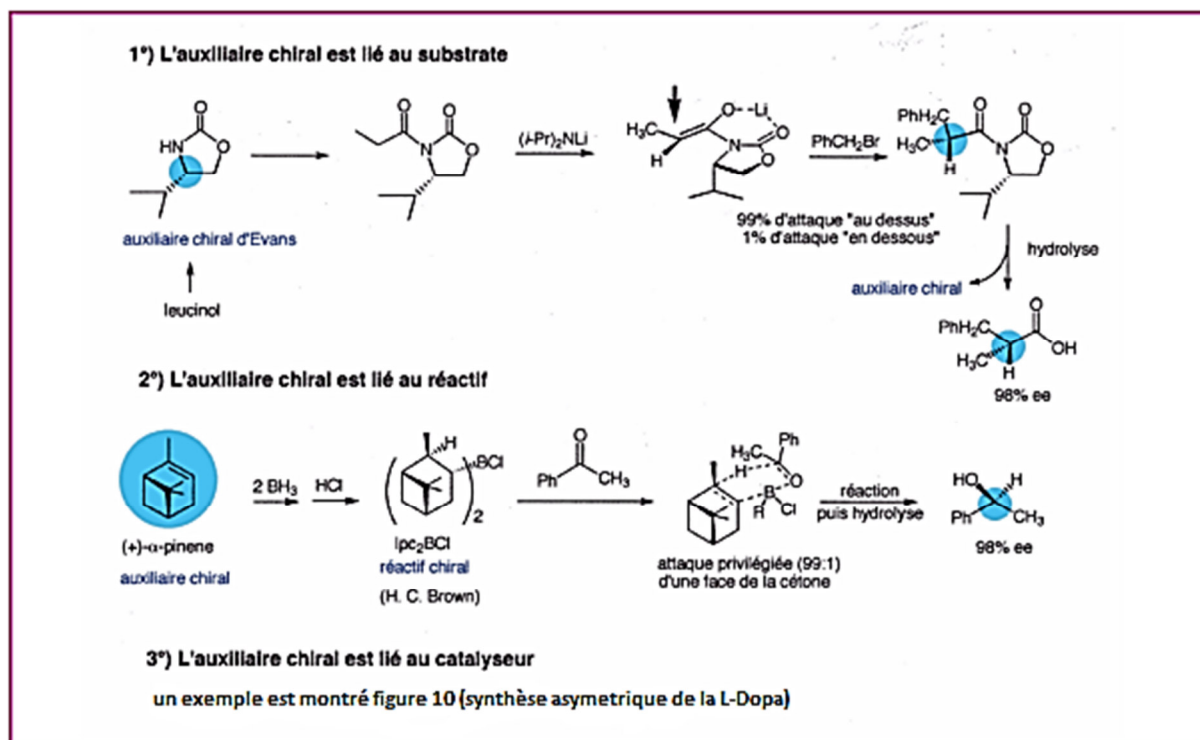


Figure I.10. Les principales classes de synthèses asymétriques [36].

La synthèse asymétrique a connu au cours de ces dernières années, un développement considérable et a donné lieu à de nombreuses applications industrielles telles que la synthèse des acides aminés, des antibiotiques, des phéromones, du menthol, etc [36]. Les parfums ou les composés agrochimiques sont aussi des cibles intéressantes pour ce type de synthèse [10]. Cependant, le développement de la synthèse asymétrique est à la fois coûteux et long à mettre en place [29].

8.2. Résolution du racémique

La résolution des racémiques a toujours été considérée comme l'un des problèmes les plus difficiles en chimie. Deux aspects coexistent :

- La séparation chirale analytique lorsqu'il s'agit de caractériser la pureté énantiomérique d'un composé ou de suivre le devenir du mélange racémique, par exemple dans une métabolisation [29, 37].

- La séparation chirale préparative pour obtenir des énantiomères de grande pureté optique lorsque la synthèse énantiosélective fait défaut [29,37].

Plusieurs méthodologies ont été utilisées pour résoudre les mélanges racémiques. Ces différentes techniques peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes classiques, regroupant les méthodes de biotransformations et la cristallisation et les technologies « plus

modernes » comprenant les méthodes par membranes chirales, les biocapteurs, les méthodes chromatographiques et électrophorétiques ainsi (Figure I.12) [29].

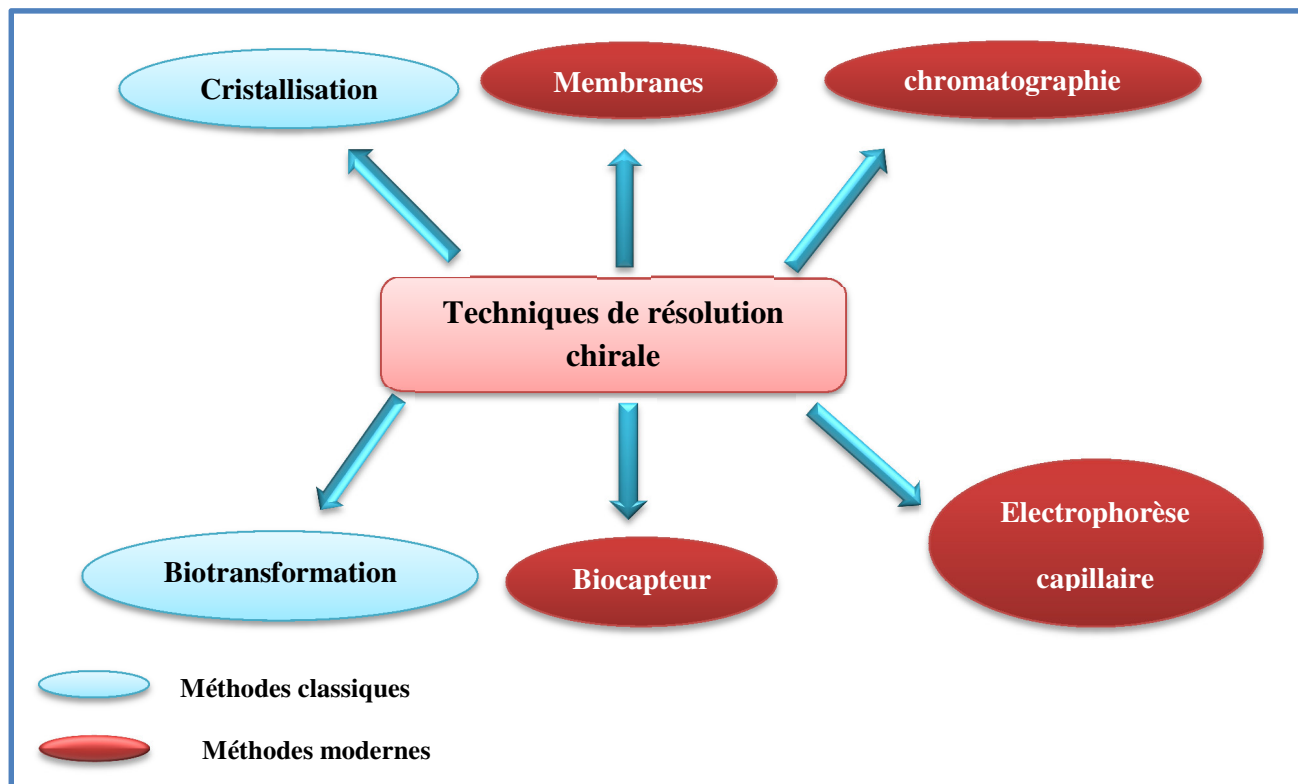


Figure I.11. Les différentes techniques de résolution chirale [12].

9. Séparation chirale par CLHP

La CLHP représente une technique de choix pour la quantification des énantiomères. On peut estimer qu'environ 90% des séparations chirales se font par CLHP et de nombreux sélecteurs chiraux sont disponibles. La séparation chirale sur les PSCs peut être développée en utilisant trois modes chromatographiques différents : en phase normale, en polarité de phase inversée et en mode organique polaire [29].

Deux approches distinctes sont utilisées pour résoudre des racémates en chromatographie liquide et en électrophorèse capillaire [29, 10].

1. L'approche indirecte

Elle consiste à faire réagir la molécule à analyser, présente sous la forme d'un mélange racémique, avec un réactif énantiomériquement pur (agent de dérivation) de façon à former deux diastéréoisomères, possédant des propriétés physico-chimiques différentes, qui sont donc séparables dans un environnement achiral « classique ». Cette méthode est cependant limitée aux molécules possédant des groupements permettant la dérivation (amines, alcools,

acides, etc.), elle nécessite des agents chiraux de bonne pureté énantiomérique et, pour une application préparative, une étape de synthèse additionnelle est nécessaire pour éliminer l'agent de dérivation chirale [29, 39-40].

Parmi les nombreux réactifs de dérivation chirale, utilisés dans différentes méthodes chromatographiques et électrophorétiques, citons notamment l'isothiocyanate (1R,2R) de 1,3-diacetoxy-1-4-nitrophényl-2-propyle ((R,R)-DANI), l'ester méthoxyéthylique de la (S)-N-4-nitrophénoxy-carbonyl-phénylalanine ((S)-NIPE), le chloroformiate de (+)-1-éthyl-fluorényle (FLEC) ou encore l'acide (S)-trifluorolactique [2, 41].

2. L'approche directe

Implique l'utilisation de sélecteurs chiraux soit dans la phase mobile (en chromatographie, additif chiral de la phase mobile : ACPM) ou dans le tampon de migration (méthode électrophorétique), soit immobilisés ou déposés à la surface de la phase stationnaire (phases stationnaires chirales : PSCs). Jusqu'à présent, la plupart des séparations chirales ont été réalisées en mode direct. Un grand nombre de sélecteurs chiraux ont été découverts et utilisés avec succès [40-42].

10. Séparation chirale par CLHP utilisant les phases stationnaires chirales

Au début de 1980, peu de phases stationnaires commerciales pour la chromatographie en phase gazeuse ou liquide étaient disponibles. Néanmoins, en 1966 Gil-Poids et autres avait décrit la première phase stationnaire chirale pour la chromatographie en phase gazeuse et en 1976 Sogah et cram ont introduit les éthers de couronne chiraux en tant que phases stationnaires. En 1978, Harada et autres a présenté les cyclodextrines comme des agents de séparation chirale et, en 1980, Armstrong a employé les cyclodextrines en tant qu'additifs dans la phase mobile pour les séparations chirales par la chromatographie sur couche mince [43].

Actuellement, Plus de 200 PSCs sont disponibles commercialement avec le sélecteur chiral immobilisé ou déposés sur un gel de silice. La résolution des énantiomères sur ces phases est en fonction de la différence de stabilité des complexes diastéréoisomériques formés entre les énantiomères et le sélecteur chiral. Le processus de reconnaissance chirale est fondé sur différentes interactions entre l'énantiomère et la phase stationnaire telles que les liaisons hydrogène, les interactions π - π , les interactions dipôle-dipôle, l'effet hydrophobe, les interactions ioniques et les effets stériques [42].

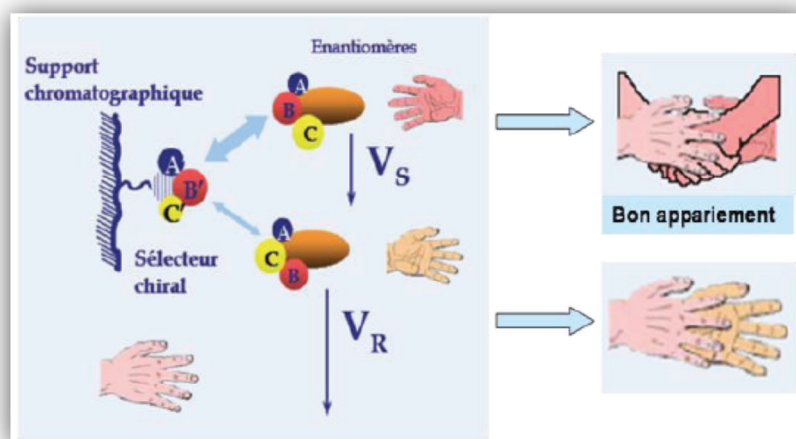


Figure I.14 : Principe de la reconnaissance chirale en CLHP [29].

Aujourd'hui, les cyclodextrines sont l'un des agents chiraux les plus utilisés en chromatographie et électrophorèse pour la séparation des énantiomères, bien que d'autres réactifs, comme ceux basés sur la cellulose, aient trouvé beaucoup de domaines d'application. Cependant, pour apprécier les difficultés impliquées dans la séparation des énantiomères, et le mécanisme par lequel elles sont sélectivement retenues sur les phases chirales, un certain arrangement de base de chimie chirale est nécessaire [43].

10.1. Classification des sélecteurs chiraux

La classification des sélecteurs chiraux est basée sur leur structure et sur les interactions mises en jeu lors du processus de la reconnaissance chirale. On peut ainsi distinguer deux grandes familles de sélecteurs chiraux : les sélecteurs dits « conventionnels » et les sélecteurs dits « sur mesure », spécifiques d'un énantiomère prédéterminé [39].

1. Les sélecteurs chiraux conventionnels

Regroupent les sélecteurs chiraux permettant la séparation d'énantiomères par formation de complexes diastéréoisomériques labiles. (Polysaccharides, glycopeptides, Pirkle, cyclodextrines et éther couronnes, protéines et les sélecteurs utilisés par échange de ligands) [39].

1.1 Les sélecteurs de type Pirkle et analogues

a. Les sélecteurs de type Pirkle

Les colonnes de Pirkle sont très populaires. La phase est du type aminoacide où la phénylglycine est dérivatisée sous forme de N-3,5-dinitrobenzoate. La reconnaissance chirale

se fait *via* des interactions π - π (transfert de charge), des interactions par formation de liaison hydrogène et /ou empilement de dipôles. Le domaine de prédilection de ces phases est le dédoublement des composés aromatiques neutres et apolaires ou bien des amines et alcools chiraux dérivatisés par un acide aromatique [10, 26, 44].

b. Les sélecteurs basés sur la formation de liaisons hydrogènes

Des sélecteurs semblables à ceux développés par l'équipe de Pirkle ont été conçus par Dobashi et autres. La différence fondamentale entre ces sélecteurs et les sélecteurs de type Pirkle réside dans le fait qu'ils ne possèdent pas de noyau aromatique mais généralement deux fonctions de type amide. Ces groupements présentent la caractéristique d'être simultanément donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène [10].

c. Les homopolymères à cavités

Cette classe rassemble différents sélecteurs qui font intervenir un phénomène d'inclusion de la molécule chirale dans les cavités du sélecteur. Les principaux sélecteurs chiraux employés sont les cyclodextrines, les dérivés de la cellulose ou de l'amylose, les éthers couronnes et les polymères synthétiques [10].

d. Les sélecteurs chiraux faisant intervenir l'échange de ligands

La chromatographie liquide chirale à échange de ligand utilise un ligand chirale, généralement un acide aminé capable de complexer des ions métalliques, tel que Cu^{2+} , qui sont présents dans la phase mobile. Ce ligand peut être, soit immobilisé sur la phase stationnaire, soit utilisé comme additif chirale dans la phase mobile. Ces phases sont en général efficaces pour séparer les acides aminés, les α -hydroxyacides ou les aminoalcools par un mécanisme de formations de complexes [26].

e. Les protéines

De nombreuses protéines ont été utilisées en séparation chirale. Citons notamment l'albumine humaine, l'albumine bovine, les glycoprotéines telles que l' α_1 -glycoprotéine acide, l'ovomucoïde du blanc d'oeuf du poulet, l'ovoglycoprotéine du blanc d'oeuf du poulet, l'avidine, la flavoprotéine, l'ovotransferrine (ou conalbumine) et la β -lactoglobuline, les enzymes comme la trypsine, l' α -chymotrypsine, la cellobiohydrolase I (CBHI), la cellulase, la pepsine, le lysozyme [10, 26]. Ces protéines ont été principalement utilisées en tant que phase stationnaire en CLHP. Elles sont très peu utilisées comme additifs chiraux dans la phase mobile [10].

Les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine (structure tertiaire, en feuillets plissés, etc.) et à la formation de cavités capables de reconnaître des molécules chirales. Des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et l'effet hydrophobe semblent en général être impliqués dans l'association stéréosélective [10].

f. Les antibiotiques macrocycliques

Les phases à base d'antibiotiques macrocycliques contiennent plusieurs centres stéréogéniques et plusieurs sites permettant plusieurs points d'interactions. Les antibiotiques macrocycliques les plus utilisés sont les glycopeptides (vancomycine et dérivés, ristocétine A, teicoplanine et dérivés, avopracine et plus récemment eremomycine), les ansamycines (rifamicine B et rifamicine SV) et un polypeptide aminoglycosidique tel que le thiostrepton [10, 26].

1.2. Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible pré-désigné

Spécifiques d'une cible prédéterminée (les polymères à empreinte moléculaire, les anticorps et les aptamères) [42].

10.2. Séparation chirale par CLHP utilisant des phases stationnaires chirales à base de polysaccharide

Les polysaccharides tels que la cellulose, l'amylose, et la chitine (Figure I.5) [45] le chitosane et l'amylopectine [46] sont optiquement les polymères actifs les plus abondants sur la terre et peuvent être aisément modifiées à des carbamates et des esters par des réactions avec les isocyanates et les chlorures d'acides, respectivement [45].

La cellulose et l'amylose possèdent un fort potentiel d'application en séparation chirale. En effet, ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composée de n unités de D-(+)-glucose reliées par des ponts β (1-4) pour la cellulose et par des ponts α (1-4) pour l'amylose. Chacune de ces unités contribue à la reconnaissance chirale des solutés avec lesquels elle interagit. Les résolutions obtenues par ces deux polymères naturels sont généralement faibles. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, la cellulose et l'amylose ont été modifiées par dérivation des fonctions -OH libres [29, 45].

La dérivation de ces groupements -OH permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules. La reconnaissance de ces molécules implique donc des

phénomènes d'inclusion, des interactions de type π - π , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions électrostatiques [45].

La majorité du PSCs à base de polysaccharide sont des dérivés de cellulose et d'amylose. L'enantioselectivité peut être variée selon la présence d'un ester ou du groupe de carbamate. Ces groupes peuvent subir des interactions sélectives avec les solutés chiraux. Ces PSCs peuvent être employés pour des modes normaux ou inversés [47].

Nombreuses publications ont démontré que la cellulose 3,5-diméthylphenylcarbamate, l'amylose 3,5-diméthylphenylcarbamate et la cellulose tris-(4-méthylbenzoate) peuvent réaliser la résolution chirale de plus de 80% des médicaments actuellement disponibles sur le marché [48].

Le tableau I.2 énumère les dérivés de polysaccharide qui ont une puissance de résolution chirale élevée. Les noms commerciaux sont également énumérés pour certains dérivés. Parmi ces PSCs, les tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) (Chiralcel[®] OD et Chiralpak[®] AD) de cellulose et d'amylose respectivement, la cellulose tris (4-méthylbenzoate) (Chiralcel[®] OJ), et l'amylose tris (S-1-phenylethylcarbamate) (Chiralpak[®] AS) apparaissent plus souvent dans la littérature. En employant des systèmes d'éluant hexane-alcool avec ces PSCs, 80-90% des composés chiraux peut être résolu [45].

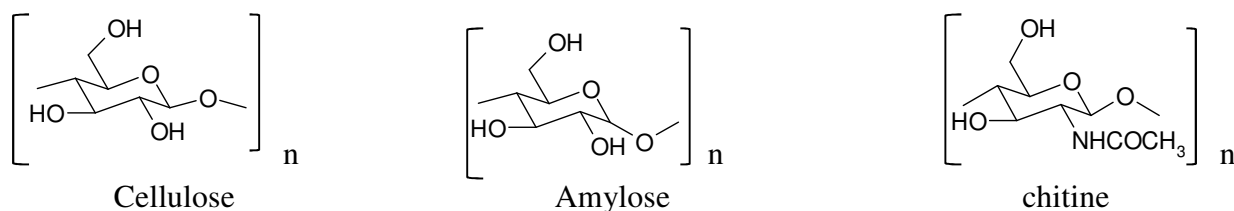
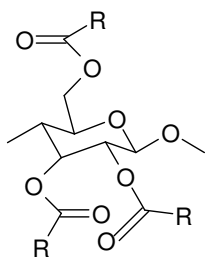
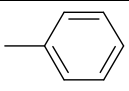
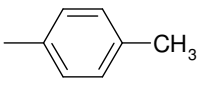
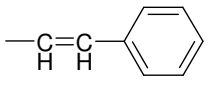
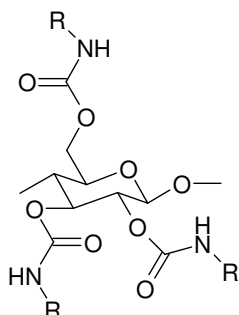
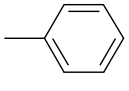
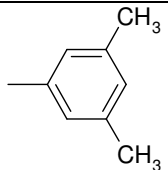
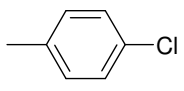
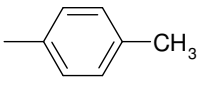
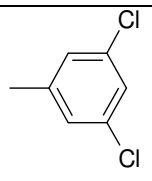

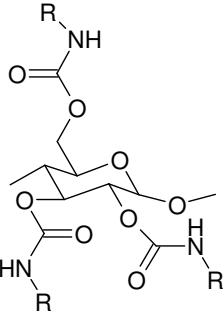
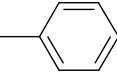
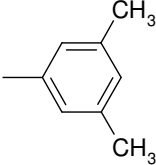
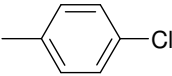
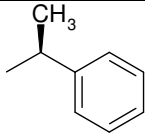

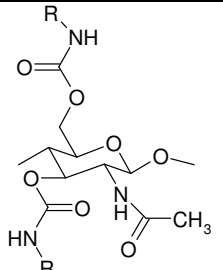
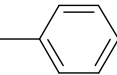
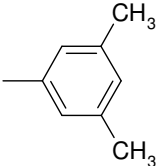
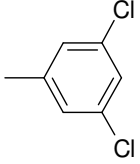


Figure I.15. Structure de quelques polysaccharides [45].

Tableau I.2: Structures des dérivés de polysaccharide avec une puissance de résolution chirale élevée.

Dérivés de polysaccharide	R	Noms commerciaux	Références
 <p>Esters de cellulose</p>	$-\text{CH}_3$	Chiralcel CTA-I (microcristalline) Chiralcel OA	[46, 48, 49]
		Chiralcel OB	[49-50]
		Chiralcel OJ	[40, 45, 48, 50, 51-54]
		Chiralcel OK	[45]
 <p>Carbamates de cellulose</p>		Chiralcel OC	[45]
		Chiralcel OD	[40, 44]
		Chiralcel OF	[55]
		Chiralcel OG	[55]
		-	[45]

		-	[45]
 Carbamates d'amylose		-	[45]
		Chiralpak AD	[43, 48, 55, 56]
		-	[45]
		Chiralpak AS	[40, 57]
		-	[45]
 Carbamates de chitine		-	[45]
		-	[45]
		-	[45]

Une étude pour séparer 510 composés racémiques sur la cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) a eu comme conséquence la résolution complète de 229 composés et la résolution partielle de 86 composés, indiquant l'importance de ce PSC dans la

chromatographie chirale. Les groupes d'hydroxyle aux positions 2, 3 et 6 dans chaque unité de glucose de cellulose sont substitués avec des résidus 3,5-diméthylphénylcarbamate, cette PSCs a été employé dans les séparations des hydrocarbures aromatiques de cyano ou des composés carbonyles, amines, alcools, dérivés d'acide aminé, β - bloquant, ec [58].

10.2.1. Application des phases stationnaires chirale basées en polysaccharide pour la résolution de différentes classes des composés

Les PSCs cellulosiques ou amylosiques sont utilisés, avec un grand succès, en polarité de phase normale ou inversée. Le principal défaut de ces PSCs était lié au fait que la phase stationnaire était déposée sur un gel de silice. Les solvants compatibles étaient limités aux alcools, alcanes et à l'acétonitrile. L'utilisation de solvants de polarité intermédiaire tels que le méthyle *t*-butyle éther, l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, l'acétone et les solvants chlorés était interdite car elle pouvait partiellement ou totalement dissoudre le réseau polymérique chirale. Ce problème est désormais résolu depuis la commercialisation d'une nouvelle gamme de colonnes (IA : amylose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate), IB : cellulose tris-(3,5- diméthylphénylcarbamate) et IC : cellulose tris-(3,5- dichlorophénylcarbamate)) dont la phase stationnaire est immobilisée sur de la silice. Celles-ci montrent une meilleure robustesse vis-à-vis d'un large panel de solvants et ouvrent de nouvelles possibilités quant au choix de la composition de la phase mobile pour la résolution d'énantiomères [29,14].

Le nom commercial des dérivés de la cellulose et d'amylose sont Chiralcel et Chiralpak, respectivement. Pour dénoter la nature à phase inversée du PSCs, R est ajouté dans le bout des noms commerciaux de Chiralcel et de Chiralpak.

Les autres caractéristiques telles que les noms commerciaux, la longueur de colonne, et la dimension particulière de ces PSCs sont fournies dans le tableau I.3 [45].

Tableau I. 3 : les PSCs de polysaccharides commercialisés [45, 39-58, 60-79].

Nom commercial	Nom chimique	Applications
PSCs de Cellulose		
Chiralcel OB	Cellulose tris benzoate	Petits composés aliphatiques et aromatiques
Chiralcel OB-H	Cellulose tris benzoate	Petits composés aliphatiques et aromatiques
Chiralcel OJ	Cellulose tris 4-methyl benzoate	Aryl methyl esters, aryl methoxy esters
Chiralcel OJ-R	Cellulose tris 4-methyl benzoate	aryl methoxy esters
Chiralcel CMB	Cellulose tris 3-methylbenzoate	Aryl esters et arylalkoxy esters
Chiralcel OC	Cellulose tris phenylcarbamate	Cyclopentenones
Chiralcel OD	Cellulose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralcel OD-H	Cellulose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralcel OD-R	Cellulose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralcel OD-RH	Cellulose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralcel OF	Cellulose tris 4-chlorophenylcarbamate	β -Lactames, dihydroxypryidines, Alcaloïdes
Chiralcel OG	Cellulose tri 4-methylphenylcarbamate	Alcaloïdes, β -Lactames
Chiralcel OA	Cellulose triacetate sur le gel de silice	Petits composés aliphatiques
Chiralcel CTA	Cellulose triacetate microcristaline	Amides, composés biaryl
Chiralcel OK	Cellulose tris cinnamate	Composés aromatiques
Amylose PSCs		
Chiralpak AD	Amylose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralpak AD-R	Amylose tris 3,5-	Alcaloïdes, tropines, amines,

	dimethylphenylcarbamate	β -bloquants
Chiralpak AD- RH	Amylose tris 3,5- dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralpak AR	Amylose tris (R)-1- phenylethylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines
Chiralpak AS	Amylose tris (S)-1- methylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines
Chiralpak IA	amylose tris 3,5- dimethylphenylcarbamate	Quinazolines, Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants, flavanones
Chiralpak IB	Cellulose tris 3,5- dimethylphenylcarbamate	Alcaloïdes, tropines, amines, β -bloquants
Chiralpak IC	tris(3,5- dichlorophenylcarbamate)	β -Lactames, dihydroxypyridines, Alcaloïdes, flavanones

10.2.2. Mécanisme de résolution chirale

Les PSCs basé sur les polysaccharides dérivatisés (déposés ou chimiquement immobilisé sur le gel de silice), les dérivés tri- (phenylcarbamate) et tri (benzoate) d'amylose et de cellulose, sont bien connus pour leur enantioselectivité extrêmement large et efficacité de séparation élevée [80].

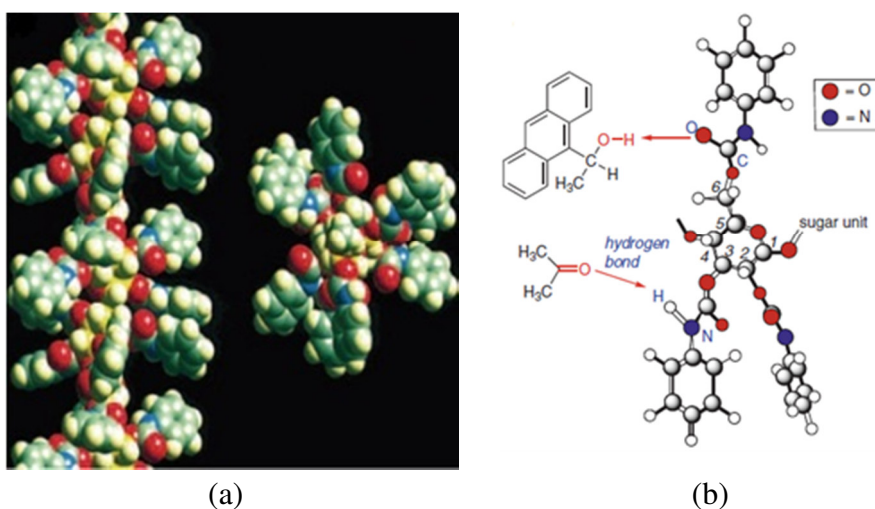


Figure I.16. (a) Structure optimisée de triphénylcarbamate de cellulose. (b) Les emplacements possibles d'interaction ont été expliqués pour l'identification chirale sur la cellulose triphénylcarbamate PSCs de cellulose [80].

Les groupes polaires de carbamoyl localisent de préférence à l'intérieur et près des centres chiraux sur l'épine dorsale de D-glucose, alors que les groupes aromatiques hydrophobes localisent à l'extérieur de la chaîne de polymère (Figure I.6). Les interactions de liaison hydrogène entre les parties polaires (comme -OH, -NH₂, -CONH₂, -O-, COO-, -COOH) des analytes chiraux et les groupes de carbamate sur le polysaccharide ce qui facilite la formation d'un complexe diastéréomérique de soluté/PSC.

D'autres interactions intermoléculaires telles que des interactions π - π entre les groupes phényle sur la PSC et les groupes aromatiques de l'analyte, des interactions dipôle-dipôle, et des interactions stériques dues à la structure hélicoïdale des PSCs jouent des rôles importants dans le processus de reconnaissance chirale [8, 80].

Également les chaînes latérales entourant les épines dorsales hélicoïdales de polymère peuvent créer des cavités chirales. La partie aromatique des analytes chiraux peut s'insérer dans ces cavités et apporter une contribution additionnelle à la stabilité du complexe analyte-PSC.

La capacité de reconnaissance chirale des phases stationnaires basées en polysaccharide est sensiblement influencée par les substituants présentés sur le groupement phényle du polymère d'hydrocarbure puisque ces substituants changeront l'acidité du groupement NH et la polarité du groupement C=O de carbamate. L'introduction d'un groupe méthylique électro-donneur ou d'un halogène électro-attracteur à la position méta et/ou para de cycle phénylique améliore souvent la capacité de reconnaissance chirale du PSC [65, 80, 67, 81].

10.2.2.1. Les dérivés de cellulose

La cellulose est un polymère naturel se composant d'une chaîne d'unités D-anhydroglucopyranose (β -D-glucose) lié par liaison 1-4. Les cycles de pyranose des unités de répétition sont dans la conformation de chaise avec les liens glycosidiques entre les carbones 1 et 4 en position équatoriale [82-85]

a. Cellulose tris acétate

Hesse et Hagel ont découvert que la cellulose triacétate microcristalline (CTA-I) produit une structure tertiaire et forment des cavités chirales avec lesquelles peuvent inclure une stéréosélectivité vis-à-vis des composés aromatiques. Plusieurs composés étaient résolus sur le CTA-I [46, 48].

b. Cellulose tris benzoate

Au contraire au mécanisme d'inclusion proposé pour le CTA-I, on a assumé que les interactions principales sont des liaisons hydrogènes et interactions de dipôle-dipôle sur ce type de phases [46].

c. Cellulose tris phenylcarbamate

Le groupe d'Okamoto a développé une série de PSCs basée sur les dérivés de cellulose trisphenylcarbamate (CTPCs) adsorbé à la silice macroporeuse. Le mécanisme de discrimination chirale des CTPC était illustré par l'analyse de rayon X, études RMN et simulations sur ordinateur. Le CTPC a une conformation de 3/2 gauchère hélicoïdale et les résidus de glucose sont régulièrement arrangés le long de l'axe hélicoïdal.

Une cannelure hélicoïdale chirale existe avec les groupes polaires de carbamate à l'intérieur de la cannelure et groupes aromatiques hydrophobes en dehors de cannelure. Les énantiomères polaires peuvent s'insérer dans la cannelure à agir l'un sur l'autre avec les résidus de carbamate par la formation des liaisons hydrogènes.

En plus de ces interactions polaires, il existe des interactions π - π entre le groupe phényle du CTPC et le groupement aromatique. Les substituants sur le cycle phénylique jouent également un rôle important dans l'énantiosélectivité [59, 46].

10.2.2.2. Les dérivés de l'amylose

La substitution de la cellulose par l'amylose a été trouvée pour avoir comme conséquence une énantioselectivité différente. Contrairement à la cellulose, la structure postulée pour l'amylose est de 4/1 gaucher hélicoïdal. Le 3-Fluoro, 3-chloro et 3-bromo-5-méthylphenylcarbamate de cellulose et d'amylose ont été étudiés comme des PSCs par Chankvetadze et autres et sont montrés une meilleure capacité de reconnaissance chirale que le 3,5-difluoro et le 3,5-diméthylphenylcarbamate [46].

Récemment, les nouveaux cyclohexylcarbamates de la cellulose et de l'amylose préparés par Kubota et autres ont montré des capacités de résolution comparables à ceux des tris (3,5-diméthylphenylcarbamates) de la cellulose et de l'amylose. Un inconvénient de type de phases déposées est la solubilité des dérivés de cellulose dans quelques solvants. Enomoto et autres ont décrit l'immobilisation de l'amylose à la silice en réduisant le résidu terminal de chaque molécule comportant une polymérisation enzymatique d' α -D-glucose-1-phosphate. Récemment, des approches pour la fixation basée sur le traitement photochimique et thermique ont été brevetées [46].

La raison principale de la résolution optique des PSCs est la stabilité différente des complexes diastereomériques entre les énantiomères et la phase stationnaire. Dans les PSCs avec les dérivés de carbamate (colonne de Chiralpak AD-H), les groupes polaires de carbamate peuvent agir l'un sur l'autre avec les énantiomères à travers les liaisons d'hydrogène entre les groupements C=O et NH et à travers les interactions de dipôle-dipôle utilisant la partie de C=O [86].

10.3. La domination des phases stationnaires chirales polysaccharidiques

Les PSCs de polysaccharides les plus populaires sont : la cellulose tris (3,5-diméthylphenylcarbamate), la cellulose tris-4-méthylbenzoate, l'amylose tris (3,5-diméthylphenylcarbamate), et l'amylose tris(*S*)- α -méthylbenzylcarbamate. L'indice de réussite était proche de 90% pour ces quatre colonnes dans les conditions normales.

Ces dernières années, de nouveaux dérivés de chlorométhylphénylcarbamate et dichlorophénylcarbamate disponibles commercialement et des phases stationnaires immobilisées ont démontré une applicabilité et énantioselectivité large [87].

En réalité, la grande majorité de composés chiraux pharmaceutiques contiennent assez de groupes fonctionnels (cycle aromatique, hydroxyle, carboxyle, amine, amide, carbamate)

autour de leurs centres chiraux qui sont cruciaux pour la reconnaissance chirale. Ces groupes fonctionnels importants permettent au PSC de polysaccharide d'agir avec les analytes par des interactions π - π , liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, ou les interactions stériques [80].

Une étude récente basée sur un ensemble d'essai de 53 composés pharmaceutiques chiraux a indiqué que quatre PSCs de polysaccharide ont démontré l'enantioselectivité pour 87% d'analytes examinées, tandis que trois phases d'antibiotiques glycopeptides macrocyclique (vancomycine, teicoplanine, et ristocetine) ont montré un indice de réussite inférieur à 65%. Cependant, l'indice de réussite combiné pour les deux classes des PSCs était 96%. Une autre étude basée sur un ensemble de différents échantillons a prouvé qu'approximativement 20% de plus de 100 racemates ne sont pas séparés sur les PSCs de polysaccharide étudiés [80].

11. Conclusion

La séparation chirale par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) utilisant les phases stationnaires chirales (PSCs) est l'une des méthodes les plus efficaces pour séparer des énantiomères, non seulement sur une échelle analytique, mais également sur l'échelle préparatoire, et dans les dernières deux décennies, beaucoup de PSCs ont été développés. Ces PSCs sont très largement utilisés (plus de 200 PSCs commerciales sont actuellement disponibles) et, de nombreuses applications sont réalisées grâce à eux. Cependant, ils ne sont pas dirigés spécifiquement contre une molécule cible prédéterminée. Donc, un « screening » des sélecteurs disponibles doit être réalisé afin de développer une méthode de séparation appropriée aux énantiomères [70,88].

Les PSCs cellulosiques ou amylosiques sont utilisés, avec un grand succès. De nombreux médicaments chiraux, à caractère acide, neutre ou basique, présentant un noyau aromatique et un groupement polaire près du centre d'asymétrie ont été résolus sur ce type de PSC. Citons les alcaloïdes, les dérivés atropiniques, les β -bloquants, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires. De plus, ces sélecteurs sont très intéressants à l'échelle préparative, en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge. De plus, ces sélecteurs sont disponibles en grandes quantités [1,114]. Dans le chapitre suivant nous exposerons rapidement, les différentes méthodes utilisées pour la séparation d'énantiomères de quelques flavanones.

Références bibliographique

- [1] P.C.Granville (1999) effet de la chiralité sur la pharmacocinétique, la biotransformation, la toxicité et l'efficacité de l'ifosfamide, Thèse de doctorat, Université de montréal, pp 2.
- [2] R. Milcent (2007) Chimie organique, Stéréochimie, entités réactives et réactions. EDP Sciences. France, pp 74, 86,87.
- [3] D. R. Lide (2006-2007) Handbook of Chemistry and Physics. 87th edition, Stanford, pp 32.
- [4] T. Boulesteix (2004) microscopie non linéaire : chiralité et génération de second harmonique. Thèse de doctorat, Université de paris, pp 3.
- [5] N. Lubain-Germain, J. Uziel (2008) Chimie organique en 25 fiches. Dunod, paris, pp 26.
- [6] S. D. Sarker, L. Nahar (2007) Chemistry for pharmacy students. John Wiley & Sons Ltd, England, pp 42.
- [7] J. F. Pinault (2004) Travaux sur le développement d'un auxiliaire chiral applicable à la phase solide et permettant de crée des centres chiraux quaternaire. Mémoire pour obtenir le grade de Maitre ès sciences, Université de Sherbrooke, Canada, pp 2,4, 5.
- [8] F. A. Carey (2000) Organic chemistry. Fourth edition, The McGraw-Hill Companies, New York, pp 265.
- [9] D. E. Bogucki (1997) The Synthesis of Enantiomerically Pure Aryltetralin Lignans. Thesis of doctorate, University of Manitoba, Canada, pp 4.
- [10] M. Haroun (2007) Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, 22, 42,48.
- [11] F. Sardou (2014) fabrication industrielle de principes actifs Pharmaceutiques par separation chirale et Racemisation, Université de Lorraine, pp 19-23.
- [12] J. Timbrell (2000) principles of biochemical toxicology. Third edition, Taylor & Francis Ltd, London, pp 73,114.

- [13] S. khater(2014) rationalisation des procédures de séparation des composés chiraux à visée pharmaceutique et cosmétique, université d'orléans, pp 48, 49,53.
- [14] D.W.Armstrong, T.J. Ward,R. D. Armstrong, T.E. Beesley (1986) Separation of drug stereoisomers by the formation of β -Cyclodextrin inclusion complexes. *Science* 232: 1132-1135.
- [15] H. Kim, Y. Choi, J.I. Kim, K. Jeong, and S. Jung (2009) Molecular modeling studies on the chiral separation of (\pm)-Catechins by Mono-succinyl- β -cyclodextrin. *Bull. Korean Chem. Soc*, **6**, 30: 1373-1375.
- [16] *Pharma-Flash* (2006) 33, N°03, ISSN 0378-7958.
- [17] C. Reichardt (2003) *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Third edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 68.
- [18] N. D. Lindemberg de Jesus (2005) extraction à deux phases aqueuse à l'aide d'alcools polyéthoxyles en vue de l'élimination de polluants organiques et d'ions métalliques. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, 42, 43.
- [19] P. Krausz, R. Benhaddou, R. Granet (2008) *Mini manuel de chimie organique*. Dunod, Paris, pp 32, 40.
- [20] *Chimie organique*(2004) version 03, p11,<http://membres.lycos.fr/nico911/chorga.html>.
- [21] A. Iraqi, A. Alami, A. Kella Bennani, H. Faraj, M. Lazrak, *Support de Cours de Chimie Organique nomenclature et stéréochimie*, 2005/2006. Université Sidi Mohamed ben Abdellah, Maroc, pp 29.
- [22] G. L. Patrick (2004) *Organic chemistry*. Second edition, Garland Science/BIOS Scientific Publishers, London, pp 49.
- [23] R. V. Hoffman (2004) *Organic chemistry*. Second edition. John Wiley & Sons, Inc, Canada, pp 128.
- [24] R. Lewis and W. Evans (2006) *chemistry*. Third edition, Palgrave Macmillan, New York, pp 342.
- [25] M. B. Smith, J. March (2007) *March's advanced organic chemistry reactions, mechanisms, and structure*. Sixth edition, John Wiley & Sons, Inc, pp 138.

- [26] A. Collet, J. Crassous, J-P. Dutasta et L. Guy (2006) Molécules chirales, stéréochimie et propriétés. Edition EDP sciences et CNRS, Paris, pp 228,230.
- [27] A. Bielejewska, K. Duszczak, K. Kulig, B. Malawska, M. Miskiewicz, A. Leś, J. Zukowski (2007) Influence of the mobile phase composition on chiral recognition of some pyrrolidin-2-ones in the liquid chromatographic system with polysaccharide stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 1173:52–57.
- [28] R. Kafri and D. Lancet (2004) Probability Rule for Chiral Recognition, *Chirality.* 16:369–378.
- [29] M. Zaher (2010) Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble, pp 33, 36, 37.
- [30] B.Voisard, C. Cormier (2013) Chimie organique, CEC édition, Anjou (Quebec) Canada, PP 88
- [31] Sweet M.J., 2009, The patentability of chiral drug post-KSR : The More Thing Change, The More They Stay The Same, *Berkeley Technology Law Journal* **24** (129) : 129-147
- [32] Nerkar A.G., Lade K.S., Gadhave N.A., Sawant S.D., 2011, Chiral switches : A Review, *Journal of Pharmacy Research* **4(4)** : 1300-1303
- [33] Mark Metzke, Targeting enantiomer product hopping with a new “obviousness” standard, *UCLA Journal of law and technology* 1(14)2010
- [34] Hutt A.J., Valentová J, The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates, *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comeniana.*2003.
- [35] Collet A., Crassous J., Dutasta J-P. and Guy L., "*Molécules chirales*", EDP Sciences, **2006**, 146.
- [36] KAGAN H., 2003 (nov-déc), La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs, *L'actualité chimique, Molécules et matériaux d' intérêt médical* : 10-14
- [37] C. V. Hoffmann, M. Laemmerhofer, W. Lindner (2007), Novel strong cation-exchange type chiral stationary phase for the enantiomer separation of chiral amines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1161: 242–251.
- [38] T. J. Ward (2006) Chiral Separations, *Anal. Chem.* 78 :3947-3953.

- [39] E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zar (1985) Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science*, 230: 813-814.
- [40] B. L. He, Y. Shi, B. Kleintop, T. Raglione (2008) Direct and indirect separations of five isomers of Brivanib Alaninate using chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.* 875:122–135.
- [41] G. Gubitz, M. G. Schmid (2004) *Chiral separation principles*, Illustrated edition, p 1.
- [42] J. Ruta (2008) Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en microchromatographie et en électrophorèse capillaire. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier , pp 21,22.
- [43] T.E. Beesley, R. P. W. Scott (1998) *Chiral chromatography*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- [44] Claudia Grewea, Sieglinde Mengeb, Carola Griehl (2007) Enantioselective separation of all-*E*-astaxanthin and its determination in microbial sources, *J. Chromatogr. A* 1166 : 97–100.
- [45] C. Yamamoto and Y. Okamoto (2004) Chiral separation by HPLC using polysaccharide-based chiral stationary phases in G. Gübitz and M. G. Schmid (Eds) *chiral separations methods and protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 173-175.
- [46] G. Gübitz and M. G. Schmid (2001) Chiral Separation by chromatographic and electromigration techniques. *Biopharm. Drug Dispos.* 22: 291–336.
- [47] S. D. Sarker, L. Nahar (2007) *Chemistry for pharmacy students*. John Wiley & Sons Ltd, England, pp 42.
- [48] C. Perrin, V.A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden (2002) Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part I. Normal-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 947: 69–83.
- [49] E. Stern, L. Goossens, C. Vaccher, J.-P. Bonte , P. Depreux , J. P. Henichart, J.F. Goossens (2008) Chiral resolution of the enantiomers of new selective CB2 receptor agonists by liquid chromatography on amylose stationary phases, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 46:848–853.

- [50] C. Roussel, C. Suteu, L. Shaimi, and M. Soufiaoui (1998) Structure and substituent effect on chiral separation of some 4a-Methyl-2,3,4,4a-Tetrahydro-1H-Fluorene derivatives and 4a-Methyl-1,2,3,4,4a,9a-Hexahydro-Fluoren-9-One derivatives on CTA-I and Chiralcel OJ Chiral stationary phases, *Chirality*. 10:522–527.
- [51] W. Lao, J. Gan (2006) Responses of enantioselective characteristics of imidazolinone herbicides and Chiralcel OJ column to temperature variations, *J. Chromatogr. A*. 1131: 74–84.
- [52] D. D. Rao, L. Kalyanaraman, S. S. Sait, P. V. Rao (2010) A validated stability-indicating normal phase LC method for clopidogrel bisulfate and its impurities in bulk drug and pharmaceutical dosage form, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52:160–165.
- [53] R. Cirilli, S. Alcarob, R. Fioravanti, D. Seccic, S. Fiorea, F. L. Torrea, F. Ortuso (2009) Unusually high enantioselectivity in high-performance liquid chromatography using cellulose tris(4-methylbenzoate) as a chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A*. 1216 :4673–4678.
- [54] S. Mitsuhashi, T. Fukushima , K. Arai, M. Tomiya, T. Santa, K. Imai, T. Toyo'oka (2007) Development of a column-switching high-performance liquid chromatography for kynurenine enantiomers and its application to a pharmacokinetic study in rat plasma, *Analytica Chimica Acta*. 587:60–66.
- [55] M. L. Calabró, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappalá, Paola Ficarra (2006) Enantioselective recognition of 2,3-benzodiazepin-4-one derivatives with anticonvulsant activity on several polysaccharide chiral stationary phases, *J. Chromatogr. B* 838 (2006) 56–62.
- [56] R. Cirilli, A. Simonelli, R. Ferretti, A. Bolasco, P. Chimenti, D. Secci, E. Maccioni, F. La Torre (2006) Analytical and semipreparative high performance liquid chromatography enantioseparation of new substituted 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-(1*H*)-pyrazoles on polysaccharide-based chiral stationary phases in normal-phase, polar organic and reversed-phase conditions, *J. Chromatogr. A*. 1101:198–203.
- [57] W. W. Barnhart, K. H. Gahm, Z. Hua, W. Goetzinger (2008) Supercritical fluid chromatography comparison of the poly(*trans*-1,2-cyclohexanediyl-bis acrylamide)

- (P-CAP) column with several derivatized polysaccharide-based stationary phases, *J. Chromatogr. B.* 875 : 217–229.
- [58] R. B. Kasat, S.Y. Wee, J. X. Loh, N-H. L.Wang, E.I. Franses (2008) Effect of the solute molecular structure on its enantioresolution on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). *J. Chromatogr. B*, 875: 81–92.
- [59] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco (2008) Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 1191:214–222.
- [60] Z. Wang, M. Jonca, T. Lambros, S. Ferguson, R. Goodnow (2007) Exploration of liquid and supercritical fluid chromatographic chiral separation and purification of Nutlin-3—A small molecule antagonist of MDM2, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 45: 720–729.
- [61] C. Foulon , C. Vaccher , A.-L. Villard , J.-Y. Puy, I. Lefebvre ,C. Perigaud , J.P. Bonte , J.F. Goossens (2006) Diastereoisomeric resolution of a pronucleotide using solid phase extraction and high performance liquid chromatography: Application to a stereoselective decomposition kinetic in cell extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 42: 245–252.
- [62] R. Nageswara Rao, A. Narasa Raju, D. Nagaraju (2006) Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs and pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41:280–285.
- [63] S. Besli, D. B. Davies, A. Kilic, R. A. Shaw, S. Sahin, A. Uslu, S. Yesilot (2006) Comparison of high-performance liquid chromatography of cyclotriphosphazene derivatives with one or two equivalent stereogenic centres, *Journal of Chromatography A.* 1132:201–205.
- [64] S. Alatorre-Santamaría, M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, M. C. de Mattos, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, V. Gotor (2008) Efficient access to enantiomerically pure cyclic α -amino esters through lipase-catalyzed kinetic resolution, *Tetrahedron: Asymmetry.* 19 :1714–1719.
- [65] K. Zhang, N. Xue, X. Shi, W. Liu, J. Meng, Y. Du (2010) A validated chiral liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of safinamide mesilate; a new anti-Parkinson drug, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 10 .

- [66] K. Kalikova, E. Tesarova, Z. Bosakova (2008) HPLC method for enantioselective analysis of cloprostenol, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 : 892–897.
- [67] G. Cannazza, D. Braghiroli, M. M. Carozzo, C. Parenti, C. Sabbionib, R. Mandrioli, S. Fanali, M. A. Raggi (2008) Enantioseparation of the antidepressant reboxetine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 48: 991–996.
- [68] C. De-Miao, F. Qiang, L. Na, Z. Song-Xian, Z. Qian-Qian (2007) Enantiomeric Separation of Naproxen by High performance liquid chromatography using Chiralcel OD as stationary phase, *Chin J Anal Chem.* (1) 35: 75–78.
- [69] J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies, *Methods of analysis and separation of chiral flavonoids*, *J. Chromatogr. B.* 848:159–181.
- [70] R. N. Rao, D. Nagaraju, A. N. Raju (2006) Enantiomeric resolution of doxazosin mesylate and its process-related substances on polysaccharide chiral stationary phases, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 :766–773.
- [71] K. A. Lee, S. Yeo, K. H. Kimb, W. Lee, J. S. Kang (2008) Enantioseparation of *N*-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids on polysaccharide-derived chiral stationary phases by reverse mode liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46:914–919.
- [72] A. Tekewe, S. Singh, M. Singh, U. Mohan, U.C. Banerjee (2008) Development and validation of HPLC method for the resolution of drug intermediates: dl-3-Phenyllactic acid, dl-*O*-acetyl-3-phenyllactic acid and (\pm)-mexiletine acetamide enantiomers, *Talanta* 75: 239–245.
- [73] M. P. Vaccher, J. Charton, A. Guelzim, D. H. Caignard, J. P. Bonte, C. Vaccher (2008) Preparative enantiomeric separation of potent AMP-activated protein kinase activator by HPLC on amylose-based chiral stationary phase Determination of enantiomeric purity and assignment of absolute configuration, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46:920–928.
- [74] U. Garscha, E. H. Oliw (2007) Steric analysis of 8-hydroxy- and 10-hydroxyoctadecadienoic acids and dihydroxyoctadecadienoic acids formed from 8R-

- hydroperoxyoctadecadienoic acid by hydroperoxide isomerases, *Analytical Biochemistry*. 367:238–246.
- [75] J. Q. Cutrone, R. Hartz, V. T. Ahuja, V. M. Vrudhula, D. R. Wub, R. A. Dalterioa, D. W. Iversonb, J. J. Bronson (2011) Chiral separation of potent corticotropin-releasing factor-1 receptor antagonists by supercritical fluid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54:602–606.
- [76] J. Jing-Yu, L. Wonjae, B. Chae-Sun (2008) Enantiomer resolution of nonsteroidal anti-Inflammatory drugs on chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives, *Chin J Anal Chem*. 36(9):1207–1211
- [77] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson (2008) Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers, *J. Chromatogr. B*. 875:72–80.
- [78] N. Belboukhari, A. Cheriti, C. Roussel, N. Vanthuyne (2010) Chiral separation of hesperidin and naringin and its analysis in a butanol, extract of *Launeae arborescens*, *Natural Product Research*. 24(7):669-681.
- [79] Y. Zhang, S. Bai, B. Song, P. S. Bhadury, D. Hu, S. Yang, X. Zhang, H. Fan, P. Lu (2010) Enantioseparation and plant virucidal bioactivity of new quinazoline derivatives with α -aminophosphonate moiety, *J. Chromatogr. B*. 878:1285–1289.
- [80] B. L. He (2010) Chiral recognition in separation methods, A. Berthod (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 159,160.
- [81] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein (2006) Application and comparison of immobilized and coated amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of β blockers enantiomers by liquid chromatography. *Talanta* 68:602–609.
- [82] Y. Liu, H. Zou (2008) High-performance liquid chromatographic evaluation of a coated cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase having a small-pore silica support, *Journal of Chromatography A*. 1178:118–125.
- [83] B. R. Harkness (1990) The chiroptical properties of specifically substituted cellulose derivatives. Thesis of doctorate, McGill University, Canada, pp 24.
- [84] X. M. Dong (1996) chiral nematic ordered suspensions of cellulose microcrystallites, Thesis of doctorate, McGill University, Canada, pp 24.

- [85] M. Khana, B. Viswanathan , D. Sreenivas Rao, R. Reddy (2007) Chiral separation of Frovatriptan isomers by HPLC using amylase based chiral stationary phase, J. Chromatogr. B. 846 :119–123.
- [86] Imran Ali and H.Y. Aboul-Enein (2007) Immobilized Polysaccharide CSPs: An Advancement in Enantiomeric Separations, Current Pharmaceutical Analysis, 2007, 3, 71-82.
- [87] G. Subramanian (2001) chiral separation techniques: A practical approach. Second edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp 57, 59.

Chapitre II : Classification, Bioactivités et extraction des dérivés flavanone

1. Introduction

Cette étude est centrée sur les **Flavanones**, des polyphénols abondants dans toutes les espèces d'agrumes. L'obtention de ces composés présente un intérêt clinique majeur vu leur activité athérosclérose, anti-inflammatoire, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale ...etc [2-4].

La technologie analytique récemment avancée a fourni l'évidence de l'existence des stéréoisomères de ces composés qui pourraient faire exister à deux configurations différentes à la position C2 [1].

Bien que l'analyse des énantiomères et des épimères des flavanones chirales a été effectuée pendant plus de 25 ans et malgré les avantages thérapeutiques potentiel des flavanones chirales et l'importance de la stéréosélectivité dans l'activité pharmacologique, ça reste souvent un déficit dans les sciences chimiques, pharmaceutiques, et médicales [5].

Après un rappel des structures et des propriétés des flavanones, une présentation de différentes activité pharmacologiques et méthode d'extraction des flavanones sera abordé.

2. Chimie et classification des flavanones

Les flavanones (2-phenyl- 2,3 dihydro-benzopyran-4-one), une des douze sous-classes des flavonoïdes, est principalement présente dans les agrumes et les légumes où ils sont habituellement trouvés comme 7-O-glycosides. Les flavanones présentent un dispositif structural unique, qui les distingue de toutes autres classes des flavonoïdes [6-9].

Les flavanones sont caractérisés par l'absence de double liaison en position 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie. Deux formes stéréoisomériques de chaque structure de flavanone sont possibles, puisque le C2 est un centre d'asymétrie. En conséquence, le cycle B peut être dans la configuration (2S) - ou (2R). La grande majorité des flavanones isolés à partir des plantes sont lévogyre (-) - ou (2S) - flavanones, parce que la réaction enzymatique catalysant la conversion des chalcones en flavanones est stéréospécifique [10-14]. Les flavanones glycosides peuvent exister comme mélanges des diastéréoisomères [15].

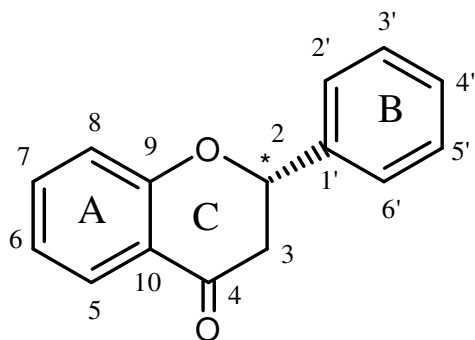


Figure II.1. Structure de base des flavanones [14].

Comme en tous autres flavonoïdes, les flavanones peuvent être classifiées dans plusieurs sous-groupes selon leur substitution (hydroxylation, méthylation, prénylation, benzoylation, glycosylation, etc.) des atomes de carbone appropriés dans le squelette, c.-à-d., C-5, C-6, C-7, et C-8 du cycle A, C2', C-3', C-4', C-5', et C-6' de cycle B, et C2 du cycle C dans les flavanones [10, 16]. Les dérivés C-alkylés sont relativement courants, surtout les dérivés C-prénylés. Les dérivés C-méthylés sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées. Ce type de composé a déjà été isolé des racines de *P. hostmannianum* [14].

Environ 350 flavanones aglycones et 100 flavanones glycosides ont été découverts dans la nature [16].

3. Biosynthèse

En raison des diverses fonctions physiologiques dans les plantes et des effets nutritionnels bénéfiques, Les flavonoïdes sont maintenant des cibles attrayantes pour les stratégies d'ingénierie génétique dans le but de produire plantes ayant une haute valeur nutritive en modifiant la biosynthèse des flavonoïdes. Dans la plupart des espèces végétales, la voie de la biosynthèse des flavonoïdes a été presque complètement élucidée. En général, la biosynthèse des flavonoïdes est initiée par deux précurseurs nommés Malonyl-CoA et P-Coumaroyl-CoA qui provient du métabolisme des glucides et des phénylpropanoïdes, respectivement. Après la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec une molécule de p-coumaroyl-CoA, sont formées des chalcones de couleur jaune composées de deux groupes phénoliques attachés par un pont ouvert à trois carters. Cette étape enzymatique initiée est catalysée par la chalcone synthase. La forme de chalcone instable est normalement isomérisée par les enzymes chalcone isomérase pour former la flavanone correspondante. Les flavanones sont l'ossature de cette voie de biosynthèse en fonction de toutes les autres classes de flavonoïdes sont Généré comme des flavones, des isoflavones, des flavanols, des flavonols

et des anthocyanines (Figure II.2) [17,18]. En outre, dans les espèces d'agrumes, UDP-glucose la flavanone-7-O-glucosyltransférase (UFGT) et le glucoside de flavanone UDP-rhamnose La rhamnosyltransférase (UFGRT) convertit séquentiellement les aglycones de flavanone en leur Glucosides et rhamnoglucosides.

Cette voie biosynthétique est fortement exploitée par les agronomes, les pathologistes des plantes, scientifiques et biologistes pour étudier le rôle des composés phénoliques dans différentes plantes fonctions physiologiques telles que l'interaction insecte-plante [19], la pigmentation [20], tolérance aux métaux lourds [21], maladie La résistance et le balayage UV [22]. Fowler et Koffas (2009) a examiné la production biotechnologique de flavanones en utilisant divers microorganismes. D'autre part, certains travaux traitent d'essayer de produire des niveaux inférieurs de Flavanones dans les plantes. Par exemple, une transformation génétique médiée par *Agrobacterium*[23].

L'approche a été utilisée pour réduire les contenus de naringine (en raison de son goût amer) dans les citrus *Paradisi Macf.* (pamplemousse). Une diminution des niveaux de naringine des feuilles a été obtenue en ciblant le Les gènes de chalcone synthase (CHS) et de chalcone isomérase (CHI) [24].

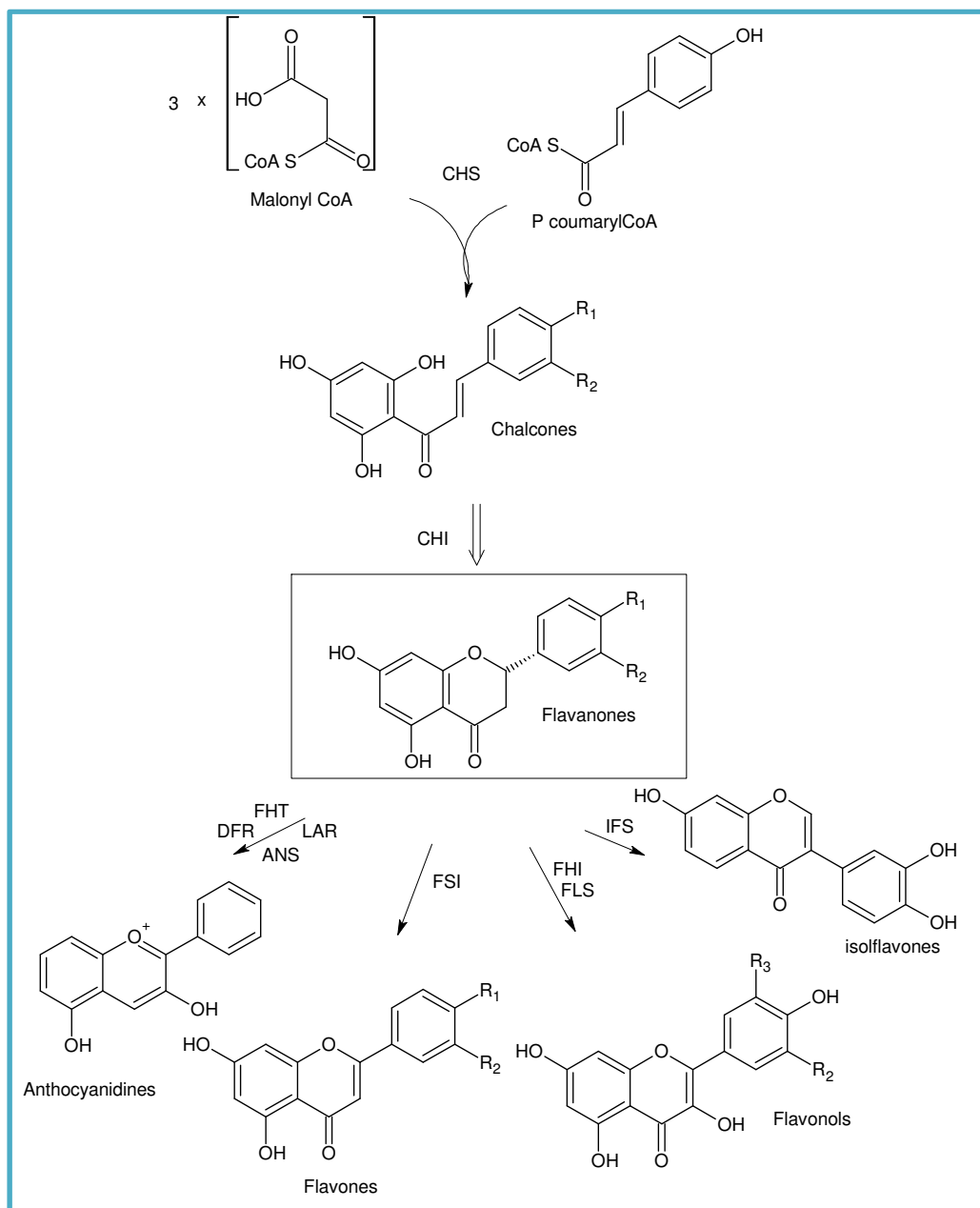


Figure II.2. biosynthèse des flavonoïdes

R est généralement OH ou OMe, bien que d'autres substitutions puissent se produire à ces positions.

CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomérase; FHT: Flavanone 3-hydroxylase; DFR: 4'-réductase de dihydroflavonol; LAR: Leucoanthocyanidine 4-réductase; ANS: Anthocyanidine Synthase; FSI: Flavone synthase; FLS: Flavonol synthase; IFS: 2-Hydroxyisoflavone Synthase[16].

4. Synthèse des flavanones

Les dérivés de flavanone représentent des intermédiaires importants dans la synthèse de composés possédant une activité anticancéreuse, anti-inflammatoire, antibactérienne et anti-SIDA [13]. Une flavanone peut être préparée par une réaction de condensation de type Claisen-Schmidt entre la 2-hydroxyacétophenone et les dérivés du benzaldéhyde suivie d'une isomérisation de l'intermédiaire, la 2-hydroxychalcone [16, 25, 26].

Cette réaction de cyclisation intramoléculaire peut être catalysée par des acides ou des bases en milieu homogène. D'autres voies de synthèse qui font appel à l'électrochimie, la photochimie ou l'isomérisation thermique sont également utilisées [16, 25].

Dernièrement, pour améliorer la synthèse de flavanones, la catalyse hétérogène a été mis au point : par exemple, D. French et al (2010) ont proposé une méthode pour synthétiser les flavanones avec le Li/Al [20]. L. B. Kunde et al (2009) ont utilisé le Mg/Al et le Zn/Al hydrotalcite [9].

La condensation aldolique d'aldéhydes aromatiques et de dérivés de l'acétophénone différemment substitués en présence de NaOH constitue la procédure classique utilisée pour accéder aux chalcones [16, 25].

La Flavanone est obtenue par chauffage de 2-hydroxychalcone en milieu acide. La séquence réactionnelle est illustrée dans schéma II.1 [18,27].

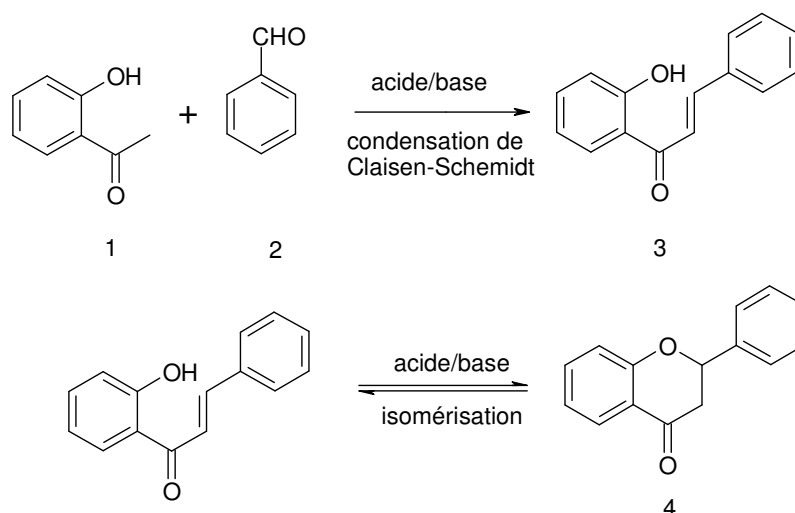


Schéma II.1 : Synthèse de Flavanone par l'intermédiaire de la condensation de Claisen-Schmidt de 2'-hydroxyacétophénone avec de l'aldéhyde benzoïque a suivi de l'isomérisation de 2'-hydroxychalcone l'intermédiaire formée [16].

5. Diversité et distribution des flavanones

Les flavanones sont largement distribuées dans environ 42 familles des plantes particulièrement dans *Compositae*, *légumineuseae* et *Rutaceae* [16, 28, 29].

Il y a quelques décennies, les flavanones ont été seulement considérés comme des flavonoïdes mineurs comme les chalcones, les dihydrochalcones, les dihydroflavonols et les aurones. Cependant, pendant les 15 dernières années, tout le nombre des flavanones connus est devenu assez grands qu'ils apparaissent maintenant parmi les classes des flavonoïdes principales comme les flavones, les isoflavones, les flavanols, les flavonols et anthocyanidines [16].

Selon le type de plante, les flavanones peuvent être trouvées dans toutes les parties de la plante, les tiges, les branches, les écorces, les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les graines, les fruits, etc [16].

Parmi les flavanones abondantes dans les plantes, les aglycones : la Narigénine et l'Hespéretine et leurs glycosides, sont d'intérêt particulier en raison de leurs forte présences en nourriture [16].

Généralement le genre *citrus* est connu pour l'accumulation des grands nombres de flavonoïdes di-glycosides dans quelques fruits et tissus végétatifs. Les di-glycosides les plus répandues trouvées sont les Neohesperidosides et Rutinosides. Les Neohesperidosides sont des rhamnoglucosides avec C-1 de rhamnose attachée au C-2 du glucose par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique [30-32].

La Rhamnose (6-deoxy-L-mannose) est un sucre doux présent dans beaucoup de plantes sous forme de rhamnosides. C'est un précurseur pour la synthèse de Furaneol (un aromatisant [4-hydroxy-2,5- dimethyl-3 (2H) - furannone], un important composant d'arome de fruits (par exemple, ananas, framboise et fraise) et nourritures traité [33].

La liaison 1→2 a comme conséquence un goût amer, et un des composés amers le plus répandu est le Neohesperidoside de Naringine. Le C-1 de Rhamnose est en covalence lié à C-6 du Glucose par une liaison O-glycosidique pour donner le Rutinoside. Les flavanones rutinosides (par exemple, Narirutine) sont insipides. Certaines espèces de genre *citrus* telles que le pamplemousse produisent principalement des neohesperidosides, alors que d'autres, telle que l'orange (*C. sinensis*), produisent principalement des rutinosides [34]. Le pamplemousse a eu un contenu de flavanones total de 27 mg d'aglycones/100 g du fruit comestible ou de jus [32, 35].

Différentes espèces de réglisse contiennent des flavanones (soxanthohumol, Liquiritigénine, la naringénine), la 8-prenyl-naringénine et la naringénine (présentent dans le houblon et la bière, le soja, le trèfle, et le kudzu) [36].

6. Bioactivité des flavanones

Les études soutiennent l'hypothèse que la consommation régulière des nourritures contenant les flavonoïdes peut réduire le risque des maladies mortelles, en particulier les maladies cardio-vasculaires et quelques types de cancers [16].

Les flavanones étant plus répandues dans le règne végétal que les chalcones et dihydrochalcones, leurs activités biologiques ont particulièrement été étudiées avec un intérêt particulier pour les dérivés C-alkylés [14].

6.1. Etudes épidémiologiques en relation avec les flavanones des agrumes

D'après un rapport de l'organisation mondiale de la santé en 2003, les études épidémiologiques concernant les flavanones indiquent que la prévention des risques de maladie est considérée comme "possible" pour les maladies cardio-vasculaires et "insuffisant" pour les cancers [37, 38]. Parmi une vingtaine d'études réalisées entre 1995 et 2002 [38], une seule étude P. Knekt *et al* (2002) [39] s'est intéressé à l'incidence de l'hésperidine et de la naringine sur différentes maladies telles que les maladies cardio-vasculaires, cancers, maladies respiratoires, diabète, cataracte et polyarthrite. Les associations positives entre l'apport de flavanones et la baisse du risque de maladies, mises en évidence par la consommation d'orange et de pomelos, sont montrées uniquement pour les maladies cardio-vasculaires et l'asthme.

Une équipe italienne (Rossi *et al.*, 2007) a montré une corrélation inverse entre l'apport de jus d'agrumes et le risque de développer un cancer de l'oesophage, la synergie entre flavanones et vitamine C étant suggérée [40]. Lors d'une étude d'observation, une plus grande consommation de pomelos était associée à une diminution de l'incidence du cancer du poumon [41].

Une association similaire a été observée entre consommation de naringine et incidence du cancer du poumon. La difficulté d'interprétation des études épidémiologiques tient au fait que les flavonoïdes d'une manière générale sont faiblement biodisponibles. En effet, seuls les aglycones de quelques molécules sont retrouvés dans le plasma à des concentrations très faibles de l'ordre de 0,3 à 0,75 $\mu\text{mol/L}$ pour la quercétine, catéchine, épicatechine après

apport d'oignons, de pommes ou d'autres végétaux. Les concentrations plasmatiques d'hespéridine et de naringénine sont plus élevées (1,3-2,2 $\mu\text{mol/L}$) après ingestion de jus d'agrumes mais cependant moins que les isoflavones de soja (1,4 à 4 $\mu\text{mol/L}$) [42]. Par ailleurs, la variabilité inter-individus étant importante au niveau du statut plasmatique, l'excrétion urinaire de ces flavanones comme marqueurs de la diète serait à évaluer également pour les études épidémiologiques [43].

L'implication des flavanones d'agrumes dans la prévention de maladies tels que les cancers, a été largement étudiée. L'hespéridine du jus d'orange s'est révélée efficace contre la cancérogenèse intestinale [44], les tumeurs mammaires [45], la vessie [46] et le colon [47]. Plus récemment, la naringine a fait l'objet de plusieurs recherches démontrant un effet thérapeutique en tant qu'agent antiprolifératif sur divers types de cancer incluant le cancer du sein et du colon [48-50]

6.2. Autres pathologies

De nombreux autres mécanismes biologiques étudiés chez des rats sont attribués aux flavanones des agrumes, l'hespéridine et la naringine. Concernant l'hespéridine (ou son aglycone l'hespéridine), des propriétés diverses (anti-inflammatoires, anti-allergiques, hypolipidémiques, hypotensives et même anti-âge) sont mises en évidence [51-55].

La naringine semble impliquée elle aussi dans le métabolisme des lipides : en augmentant le cholestérol HDL chez le lapin [56], ou en diminuant le LDL-cholestérol sanguin sur des rats hypercholestérolémiés [57]. Dans cette dernière étude, le profil lipidique (taux sanguins de cholestérol et triglycérides) était amélioré après la consommation de jus de pomélos par comparaison à une supplémentation en naringine seule. Il en était de même pour l'activité antioxydante, qui était plus élevée après consommation de jus. Ceci se comprend par l'apport notamment de vitamine C, qui joue un rôle important dans l'activité antioxydante. Les flavanones telles que la naringine et l'hespéridine sont reconnues pour leur capacité à piéger les radicaux libres, l'oxygène singulet, et l'anion superoxyde même si leur activité reste plus faible que la quercétine dans ce domaine. Les flavanones telles que la naringine ou l'hespéridine sont capables de chélater le fer (sous forme Fe^{3+}) [58]. Ce mécanisme a été reconnu pour expliquer le rôle protecteur des composés phénoliques dans les effets délétères de l'ADN au niveau cellulaire [59].

6.3 Relation structure-activité

D'une manière générale, le pouvoir antioxydant des flavonoïdes résulte d'une combinaison entre la structure des ortho-hydroxyles sur le cycle B, les doubles liaisons conjuguées (entre les positions 2 et 3) avec la fonction cétone en position 4 et la présence de groupes hydroxyles en position 3 et 5 permettant la création de liaison hydrogène avec le groupement cétone en position 4 [60]. En ce qui concerne les propriétés de chélation, certains auteurs indiquent que le site préférentiel se situerait entre le 5 hydroxyle et le groupe cétone en position 4 (cas de la naringénine) [61, 62].

D'autres auteurs suggèrent que la présence de deux groupes hydroxyles en position ortho sur la molécule est essentielle pour le mécanisme de la chélation du fer [59]. de récentes études tendent à expliquer d'autres mécanismes impliquant l'action de ces molécules sur l'expression des gènes des enzymes intervenant dans diverses régulations au niveau cellulaire et qui pourraient intervenir lors de maladies tels que les cancers et les maladies cardiovasculaires [63-65]. Les flavanones aglycones comme l'hespérétine et la naringénine semblent inhiber l'activité enzymatique de phase I, et la naringine semble stimuler les enzymes de phase II (Figure II.3).

Ces enzymes interviennent dans la détoxification de nombreux agents cancérigènes [66].

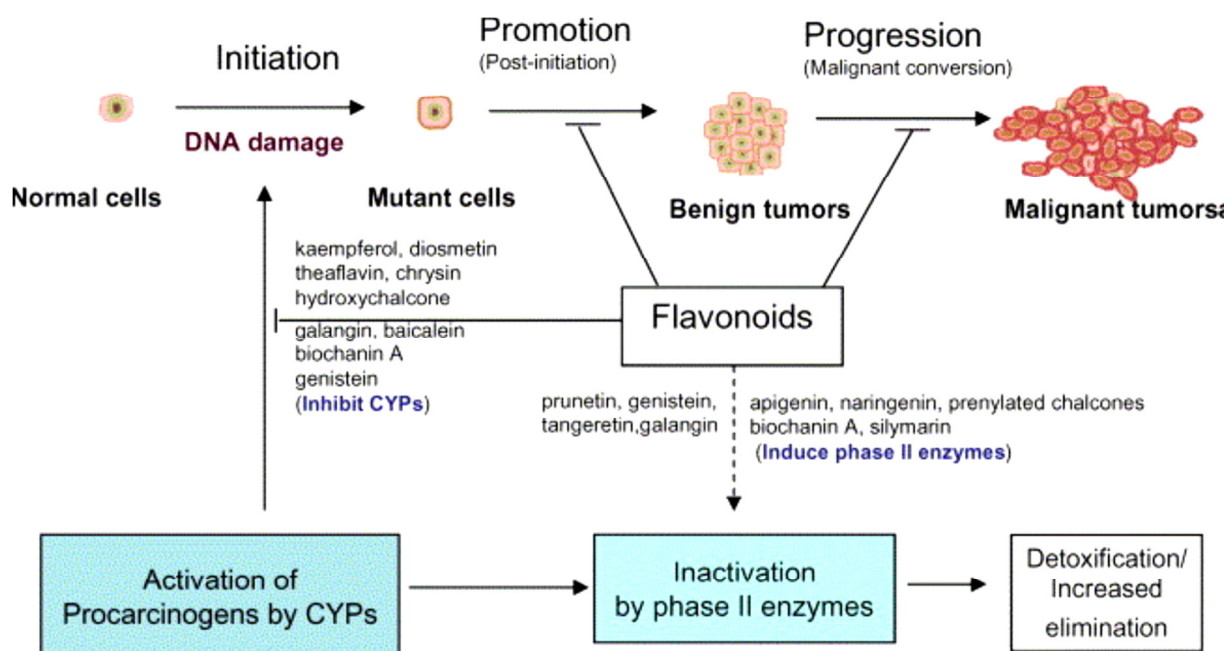


Figure II.3. Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse d'après Moon *et al.* (2006). Les flavonoïdes agiraient à deux niveaux (1) en inhibant les enzymes de la phase I (CYPs) qui métabolisent les xénobiotiques en substances plus polaires par hydroxylation et (2) en stimulant les enzymes de la phase II dont le rôle est d'accroître la solubilité des molécules par conjugaison pour faciliter leur élimination[67,68].

7. Exemples des études sur l'activité pharmacologiques des flavanones

Des exemples in vitro/in vivo des études entreprises pour explorer les effets bénéfiques des flavanones et les mécanismes impliqués sont discutés ci-dessous [16].

7.1 L'activité anti oxydante

Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont montré que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité anti oxydante des flavanones en comparant la Naringénine avec la Naringine. Des effets similaires sont observés quand l'Hespéretine est comparée avec son rutinoside (Hespéridine) [69, 70].

Tableau II.1 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavanones.

	Naringénine	Hespéretine	Naringine	Hespéridine
TEAC (mM)	1,53±0,05	1,37±0,08	0,76 ±0,05	1,08 ±0,03

L'activité des flavanones est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2- carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active.

Les aglycones montrent une activité antioxydante plus élevée que leurs glycosides relatifs. Par exemple, la naringine, a une activité antioxydante relativement basse comme mesurée par le DPPH [71].

7.2. Effet antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des flavoanones sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-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. Une étude par Matsuda et autres suggère que l'Hespéridine ait une activité antiallergique par l'inhibition de la production d l'histamine chez les rats [16, 72, 73].

7.3. Effet anti-inflammatoire

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude a montré l'activité anti-inflammatoire de l'Hespéridine en empêchant le dégagement de l'acide arachidonique et de l'histamine. En plus ils ont démontré que l'Hespéridine empêche les kinases et les phosphodiesterases responsables de la transduction et de l'activation cellulaire de signal pendant une réponse d'inflammation. Un effet inhibiteur de l'Hespéridine sur l'inflammation chronique des poumons induit par le carraghénane a été étudié chez les rats. Les résultats ont révélé une diminution du volume d'exsudats et du nombre de leucocytes de migration près de 48% et 34%, respectivement, ce qui montre que l'Hespéridine est un agent anti-inflammatoire modéré. En outre, ce groupe de recherche a observé que l'Hespéridine peut réduire l'hyperthermie chez les rats. Une étude *in vivo* a montré une activité anti inflammatoire intense de Naringin et Naringéine [16, 74, 75].

7.4. Effets anti-ulcéreux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la Quercétine et la Naringéine jouent 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 du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la Quercétine, Naringéine, Rutine, Kaempférol et Flavanone, et la production du 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 [74].

7.5. Effets anticancéreux

L. Skarydova *et al* (2009) ont étudié l'effet inhibiteur de 2'-hydroxyflavanone sur l'AKR₁C₃ (également connu sous le nom de 17 β- hydroxystéroïde dehydrogénase type 5 ou 3α hydroxystéroïde déshydrogénase type 2) fonctionne comme 3-céto, 17 céto et 20 céto stéroïde réductase et comme 3 α, 17 β- et 20 α hydroxystéroïde oxydase. L'expression relativement élevée d'ADN messagère d'AKR1C3 a été trouvée dans la prostate humaine et glande mammaire où elle est impliquée dans l'accès de réglementation de l'androgène et l'œstrogène, respectivement. AKR1C3 est une cible intéressante pour le développement des

agents pour traiter les formes hormonodépendant de cancer comme le cancer de prostate, le cancer du sein, et le cancer endométrial. D'ailleurs, puisque l'inhibition est sélective vers AKR1C3, 98.9 %, le 2'-hydroxyflavanone pourrait être utile comme un médicament potentiel pour l'usage clinique pour traiter ou empêcher des malignités hormone-dépendantes comme le cancer de prostate et du sein. La Naringénine peut aussi inhiber 71.9% de AKR1C3 par une concentration de 20 μ M [39]. Dans une autre étude une variété de flavanones méthoxylés a été préparée dans le but d'évaluer leur activité antiproliférative envers les cellules tumorales du sein MCF-7. Des meilleurs résultats ont été obtenus [25].

L'hespéridine s'est avérée utile pour réduire l'incidence du cancer oral et était également efficace une fois utilisée avant et pendant ou après l'exposition chimique [70].

7.6. Effet Antimutagénique

Les flavanones peuvent protéger contre les dommages de l'ADN par leurs capacités d'absorber la lumière UV. Les résultats d'un modèle irradié UV de l'ADN plasmidique ont montré un effet protecteur considérable de naringénine contre les dommages de l'ADN induits par l'UV. La capacité antioxydante modérée de flavanones peut également être utile dans la protection contre la mutation par les radicaux libres. La Naringénine peut montrer les changements anti-mutagéniques en stimulant la réparation d'ADN, suivant des dommages des cellules cancéreuses humaines de prostate [16, 77, 78].

Gregor et Jurd ont rapporté que le groupement hydroxyle libre à C3, et la double liaison entre les atomes C2 et C3, et le groupe cétonique à l'atome C4 sont essentiels en exprimant l'antimutagenicité des flavonoïdes [77].

7.7. Inhibition de développement des tumeurs

La catéchine a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones.

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des

radicaux libres. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase [10].

7.8. Activités antimicrobiennes

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe.

Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- l'inhibition du métabolisme microbien [79].

7.8.1. Antifongique

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante l'une des plus récentes études sur cette activité démontre une activité des flavanones glycosides de *Citrus Parasidi* et de *citrus sinensis* sur *penicillium digitatum*. En effet la Naringine, l'Hespéridine extraite de ses deux espèces de *Citrus* servent à protéger ces derniers contre les attaques de *p. digitatum* [80, 81].

7.8.2. Antibactérienne

Une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur le *staphylococcus aureus* [44] en plus de l'activité antiparasitaire et antipaludique [82].

7.8.3. Antivirale

L'activité antivirale de l'hespéridine a été démontrée contre l'herpès symple, poliomyélite, para-influenza, et infections virales syncytiales tandis que la Naringine, était inactive. Dans une étude récente, l'hespéretine a montré une activité antimicrobienne modérée contre *salmonella typhi* et *S. typhimurium* [16].

7.9. Effets cardio-vasculaires

Les maladies cardio-vasculaires (MCV) affectent le cœur et les vaisseaux sanguins environnants et peuvent prendre beaucoup de formes, telles que l'hypertension, la maladie de l'artère coronaire, la maladie cardiaque. Le stress oxydant accru a été trouvé qu'un des facteurs

principaux causant la MCV et sa control par les antioxydants comprenant des polyphénols est de grande importance biologique [16].

7.10. Effets protecteurs vasculaires

Les maladies qui sont habituellement associés à la perméabilité capillaire accrue sont le diabète, l'insuffisance veineuse chronique, les hémorroïdes, le scorbut, les ulcères. En 1937 Szent-Gyorgyi, un gagnant du prix Nobel, a démontré que l'Hespéridine réduit la perméabilité et la fragilité des parois des capillaires [10, 83, 84].

7.11. Effet vasodilatateur

Récemment, le potentiel vasodilatateur de l'Hespéretine, l'Hespéridine, la Narigénine et de Naringine a été démontré chez les rats. Cet effet vasodilatateur est probablement du à l'inhibition de différents isoenzymes de phosphodiesterase [16, 85].

7.12. Effet anti-athérosclérose

L'Hespéretine a été montrée pour limiter l'élévation de contenu hépatique de lipide et d'activités enzymatiques impliqués dans la synthèse de triacylglycérol dans les rats alimentés de l'acide orotique de 1%. Un effet hypolipidémique de l'Hespéretine a été rapporté même aux concentrations à haut pourcentage de lipides [16].

Chez les rats recevant un régime riche en cholestérol, 0.1% de Narigénine a réduit les niveaux du cholestérol de plasma et des triacylglycérols hépatiques. Cet effet a été accompagné d'une diminution de l'activité de 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase et acyl-CoA cholesterol acyltransferase [16].

7.13. Autres effets biologiques

L'Hespéridine est connu comme sédatif et anxiolytique [6] en plus ils ont démontré que l'effet protecteur de foie contre la fibrose de l'extrait frais de *Cordia myxa L.* est du principalement aux composés polyphénoliques ; Robinine, Rutine, Datiscoside, l'Hespéridine et le Dihydrorobinetine [86, 87].

En outre, la Narigénine et l'Hespéretine sont des phyto-oestrogènes au contraire à la Naringine qui ne possède pas cet activité. En fait, comme des isoflavones, ils peuvent lier aux récepteurs d'oestrogène, ou empêcher l'activité d'aromatase, l'enzyme responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes [77, 80, 88].

Knekt et autres ont trouvé que l'association entre une prise élevée de l'Hespéretine et de Naringénine et la basse incidence d'asthme et des maladies cérébrovasculaires [16].

Parmi les informations cliniques disponibles sur l' Hespéretine, ses effets sur la barrière hématoméningée, et certains genres de cancer [88-92].

7.14. Effets pharmacologiques d'énantiomères purs des flavanones

Malgré l'utilisation thérapeutique potentielle des flavanones chirales, très peu d'études sur l'activité pharmacologique des énantiomères purs ont été effectuées. Cependant, il y a un rapport où les énantiomères S et R de la Naringénine ont été étudiés pour l'inhibition de l'activité de la cyclosporine A oxydase dans les microsomes de foie humain, qui est une activité dépendante du cytochrome P450 3A4. Aucun énantiosélectivité intéressant ou activité inhibitrice significative n'ont été démontrés pour les deux énantiomères de la Naringénine. Donc il faut développer des méthodes analytiques rapides, sélectives et sensibles pour l'énantioséparation des flavanones afin de déterminer la source bioactive véritable [33, 91].

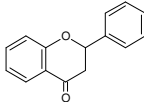
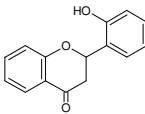
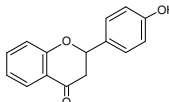
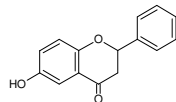
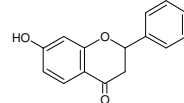
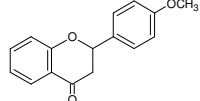
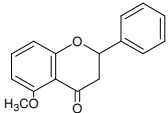
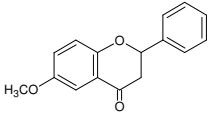
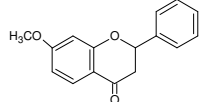
8. Les flavanones étudiés

8.1. Structures et propriétés physicochimiques

Dans notre étude nous avons étudié treize flavanones, un flavanone non substitué, huit flavanones mono substitués, dont quatre hydroxyflavanones et quatre methoxyflavanones, deux flavanones glycosides (Hespéridine et Naringine) et leurs aglycones (Hespéretine et Naringénine) respectivement.

Les structures de tous les composés étudiés avec ces caractéristiques physicochimiques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.2 : structures et caractéristiques physicochimiques des flavanones étudiés.

composé	structure	Formule brute Point de fusion (°C) Poids moléculaire(g/mol)	synonymes	solubilité
Flavanone [42, 59]		C ₁₅ H ₁₂ O ₂ 224.26 76-78 Cristaux blanc	2,3-Dihydroflavone	Soluble dans le méthanol et dans l'acétone
2'-hydroxyflavanone [59, 60]		C ₁₅ H ₁₂ O ₃ 240.258 164-165 Cristaux blancs	2-(2'-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2-(2'-hydroxyphenyl)-; 2-(2'-Hydroxy-phenyl)-chroman-4-one	Soluble dans le méthanol et dans l'acétone
4'-hydroxyflavanone [59, 60]		C ₁₅ H ₁₂ O ₃ 240.258 185-186 Cristaux blancs	2-(4'-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2-(4'-hydroxyphenyl)-; 2-(4'-Hydroxy-phenyl)-chroman-4-one	Solution Claire dans le méthanol
6-hydroxyflavanone [59, 60]		C ₁₅ H ₁₂ O ₃ 240.258 220-221 Cristaux blancs	6-hydroxy-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-phenyl-; 6-Hydroxy-2-phenyl-chroman-4-one	Soluble dans le méthanol et dans l'acétone
7-hydroxyflavanone [59, 60]		C ₁₅ H ₁₂ O ₃ 240.258 188-189 Cristaux rose pâle	7-hydroxy-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-7-hydroxy-2-phenyl-; 7-Hydroxy-2-phenyl-chroman-4-one	Soluble dans le méthanol
4'-méthoxyflavanone [60]		C ₁₆ H ₁₄ O ₃ 254.29 92-94 cristaux blancs	2-(4'-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2-(4'-methoxyphenyl)-; 2-(4'-methoxy-phenyl)-chroman-4-one	Solution claire dans l'acétone et dans le méthanol
5-méthoxyflavanone [60]		C ₁₆ H ₁₄ O ₃ 254.29 144-145 Cristaux blancs	5-methoxy-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5-methoxy-2-phenyl-; 5-methoxy-2-phenyl-chroman-4-one	Soluble dans le méthanol et dans l'acétone
6-méthoxyflavanone [60]		C ₁₆ H ₁₄ O ₃ 254.29 141-142	6-methoxy-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-6-methoxy-2-phenyl-; 6-methoxy-2-phenyl-chroman-4-one	Soluble dans l'acétone
7-méthoxyflavanone [60]		Cristaux blancs C ₁₆ H ₁₄ O ₃ 254.29 88-89 Cristaux blancs	7-methoxy-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; 4H-1-benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-7-methoxy-2-phenyl-; 7-methoxy-2-phenyl-chroman-4-one	Soluble dans l'acétone

Hespéretine		$C_{16}H_{14}O_6$	(5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone)	Soluble dans le toluène:ethyl formiate:acide formique (5:4:1), dans le méthanol et peu soluble dans l'éthanol
[55, 56, 60]		302.29		
		229-231		
		poudre crème		
Naringénine		$C_{15}H_{12}O_5$	(5,7,4'-Trihydroxyflavanone)	Soluble dans le méthanol
[43, 60]		272.26		
		251-253		
		Cristaux bruns		
Hespéridine		$C_{28}H_{34}O_{15}$	7 [α -rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyloxy] - 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) - 4H-1-benzopyran-4-one	Soluble dans la pyridine et dans le DMSO
[27, 60]		610.57		
		257-261		
Naringine		$C_{27}H_{32}O_{14}$	7 [α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranosyloxy] - 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) - 4H-1-benzopyran-4-one. Naringenin 7-Oneohesperidoside et naringenin 7-O-(2-O-alpha-L-rhamnosyl)-beta-D-glucoside.	Soluble dans le méthanol
[55, 60, 62, 63]		580.54		
		~171		
		Poudre jaunâtre		

Un inconvénient principal des flavanones est leur faible solubilité dans l'eau, qui limite leurs applications pratiques. En fait, la solubilité de ces flavanones est un facteur déterminant dans leurs applications thérapeutiques [3, 89, 93- 97].

Il est difficile de dissoudre certains flavanones glycosides dans le méthanol, l'éthanol, ou les mélanges alcool-eau. La solubilité de flavanone dépend du pH des solutions contenant de l'eau [98]. L'Hespéridine, est facilement soluble dans la pyridine et dans le diméthyl sulfoxide, légèrement soluble dans le méthanol, l'éthanol, et presque insoluble dans l'acétone, le benzène et le chloroforme. La solubilité de l'Hespéridine dans l'eau est de 0.02 g/l, dans le fluide gastrique à pH=1.2 est de 0.0491 g/l, et en fluide intestinal à pH=7.5 est de 0.068 g/l [77, 99,100]. La Naringine glycosylé est plus soluble 1000 fois que la Naringénine [101].

8.2. Sources des flavanones étudiés

La Naringénine est présentée dans les tomates, les cerises, l'origan, les haricots, et cacao. Les agrumes contiennent un taux plus élevé de naringine, alors que les tomates avoir un taux plus élevé de narigénine (l'aglycone de la naringine) (8-42 mg/kg) qui se trouve aussi dans l'espèce du genre *Rhus retinorrhoea* [13, 88, 102]. La Naringine est le constituant amer principal du pamplemousse (*citrus paradisi*) (jusqu'à 689 mg/kg) tandis que l'Hespéridine est prédominé dans les oranges (jusqu'à 515 mg/kg) [30, 33, 85, 103- 105].

L'Hespéridine un rhamnoglucoside insipide (rutinoside) de l' Hespéretine, est l'un des flavonoïdes les plus disponibles. Elle présente en fruit, feuilles et dans l'écorce de l'orange (*citrus sinensis*) et d'autres espèces de genre *Citrus*. Sa concentration est particulièrement haute. L'Hespéretine (5,7,3'-trihydroxyl-4'-methoxyl-flavanone), se produit aussi en agrumes et fleurs est un flavanone bioactive qui a des applications medicinal potentiel et peuvent être employées pour la préparation des colorants et des édulcorants [2,4,8].

Le 2'-hydroxyflavanone et le 4'-hydroxyflavanone se trouve dans les fruits et légumes rouge et jaune [79].

Les dérivés C-méthylés des flavanones sont fréquemment rencontrés chez les *Myrtaceae*. Le 5 méthoxyflavanone a déjà été isolé des racines de *P. hostmannianum* [14].

En générale, les flavanones mono substitués sont obtenu principalement par voie de synthèse et disponibles commercialement sous forme des racémiques [73].

9. Méthode d'extraction de l'hespéridine

Dans notre laboratoire de Phytochimie et de Synthèse organique on a réalisé la procédure d'extraction et l'analyse spectroscopique de l'hespéridine, flavanone glycosidé d'origine naturelle provenant des écorces d'oranges de trois espèces d'agrumes différentes, mandarine (*C.reticulata*), clémentine (*C.clementina*), orange douce (*C. sinensis*). L'hesperidine a été isolée à partir de peau d'orange en extrayant la peau sèche avec l'éther de pétrole. L'analyse spectroscopique (UV, IR et RMN) confirme la structure et la pureté de de l'hesperidine.

Matériel végétal:

Les écorces de trois espèces d'agrumes ont été obtenues auprès du restaurant de l'université et des déchets de Consommation domestique.

Produits chimiques:

Les produits chimiques utilisés sont : L'acide acétique, le méthanol, le diméthylformamide, l'éther de pétrole et le chloroforme de Merck (Allemagne).

9.1.Extraction de l' Hespéridine:

Les écorces d'oranges douces séchées à l'air ont été broyées en poudre et ont été extraites successivement jusqu'à 12 cycles (masse totale de la poudre est de 960 g), 80 grammes de cette poudre ont été placés dans un condenseur à reflux. On a ajouté 600 mL d'éther de pétrole bouillant à 40-50°C et le met à reflux pendant 1,5 h jusqu'à ce le matériel siphonné soit sans couleur. Après que les peaux d'orange aient été complètement dégraissées, après filtration du mélange chaud à travers un entonnoir Buchner, la poudre a été séchée à température ambiante. On extraire la poudre sèche a été renvoyée dans le ballon et on a ajouté 600 mL de methanol. Le contenu était Chauffé au reflux pendant encore 2 heures, puis on filtre le mélange chaud. Le filtrat a été concentré avec une colonne de distillation, en laissant un résidu sirupeux cristallisé à l'aide de l'acide acétique dilué (6 %), l'hespéridine sépare dehors en tant qu'aiguilles beiges (l' Hesperidine brute, Pf 268 ° C).

9.2. Purification de l'Hespéridine:**➤ Procédure A:**

L'hesperidine brute (seulement un échantillon) a été ajoutée au diméthylformamide (7 ml g⁻¹ de sirop) avant addition d'acide acétique, Préparée par réchauffement à environ 60 ° C, un peu d'acide acétique a été ajouté. La solution a ensuite été filtrée à travers un entonnoir Buchner, dilué avec un volume d'eau égal et a été laissé au repos pendant 4 heures pour cristalliser. Les cristaux de l'Hesperidine ont été filtrés.

➤ Procédure B:

L'Hesperidine brute a été ajoutée au chloroforme. L'hespéridine cristalline blanche a ensuite été filtrée à travers un entonnoir Buchner. L'Hesperidine pure a un point de fusion de 240-253 ° C.

9.3. Conversion de l'Hespéridine en Hespéretine:

Un mélange d'hespéridine (9 g) et de méthanol (250 ml) et d'acide sulfurique concentré (9 ml) a été agité et chauffé au reflux pendant 8 heures. La solution homogène résultante a été refroidie et concentrée puis diluée avec l'acétate d'éthyle (500 ml). Tous les 100 ml de la solution organique sont lavés avec de l'eau (4 x 100 ml) et séchés avec le sulfate de magnésium.

9.4. Purification de l'Hespéretine

L'Hesperetine a été purifiée par la procédure suivante:

Dissoudre le produit brut au minimum d'acétone, et la solution résultante a été ajoutée à un mélange d'eau vigoureusement agité (200 ml) et de l'acide acétique (3 ml). Dans un bain de glace, l'hespéretine précipitée a été lavée et refroidie à l'eau. Poudre jaune pur d'hespéretine obtenu a un point de fusion de 220-221 ° C.

9.5. Identification de l'hespéridine et de l'hespéretine

Les produits ont été analysés avec des méthodes de chromatographie et de spectroscopie (UV, IR et RMN).

Les spectres UV ont été obtenus dans un solvant MeOH avec un spectrophotomètre UNICAM UV300. Des spectres IR ont été obtenus avec un spectrophotomètre AVATAR 320 FT -IR. Les spectres RMN ont été prélevés sur un broker GP 250 (1 H, 250 MHz; 13C, 125 MHz).

9.6. Résultats et discussion

L'hesperidine brute extraite de la mandarine a pesé 1,75%, de Clementine et d'orange douce 2,4%. La production a été poursuivie par la suite parce qu'elle abrite abondamment.

➤ Résultats de l'analyse chromatographique

L'Hesperidine extraite à partir de peau d'orange et d'hespéridine commerciale a été chromatographiée sur du gel de silice, avec l'éluant butanol / acide acétique / eau (4: 1: 5) $R_f = 0,6$. L'hespéridine et l'hespéretine commerciale ont également été analysées sur gel Silice, avec l'acétate d'éthyle comme éluant de $R_f = 0,71$, et avec l'éluant méthanol / chloroforme (9,5: 0,5) $R_f = 0,72$. Le même résultat pour les deux échantillons.

➤ Résultats de l'analyse spectroscopique

La structure de l'hespéridine est représentée sur la figure 1. L'Hespéridine extraite de la peau d'orange a été identifiée par spectroscopie UV

Les données de spectre UV de l'extrait méthanolique dans le méthanol a montré une absorption maximale à 290, 315 et 345 nm.

Le spectre IR en disque KBr a montré une forte bande d'OH à 3541 et 3470 cm^{-1} , CH (aliphatique) à 3077, 2973, 2935 et 2913 cm^{-1} , C = C (aromatique) à 1601, 1514, 1465 et 1443 cm^{-1} et de C = O à 1651 cm^{-1} , C-O à 1280, 1203 cm^{-1} . Le schéma du spectre était le même que le standard.

Le spectre UV de deuxième composé obtenu à partir de l'hydrolyse de l'hespéridine a montré une absorption maximale à 290 nm.

Le spectre IR en tant que disque KBr a montré une forte bande de OH à 3497 cm^{-1} , CH (aliphatique) à $3120, 3039$ et 2836 cm^{-1} , CH (aromatique) à $2890 - 2957\text{ cm}^{-1}$ C = C (aromatique) à $1579, 1498\text{ cm}^{-1}$ et de C = O à 1635 cm^{-1} , C-O à 1170 cm^{-1} . Le motif du spectre était également le même que le standard.

Ces résultats montrent que ce procédure économique est très utile pour exploiter les déchets résulte par la consommation des oranges pour la production de l'hespéridine et l'hespéretine pures, flavanones ayant une activité pharmacologiques très importante.

10. Les thioflavanones

10.1. Définition

Les thioflavanones (2-phénylthiochroman-4-ones), sont les analogues Thio des flavanones, une classe importante des hétérocycles et servent de précurseurs des benzothiazépines biologiquement actifs et de thiochroman-4-one 1,1-dioxydes. Bien que les flavanones, y compris l'hespéretine, la naringénine, et l'eriodictyol, soient abondants dans les agrumes, les thioflavanones ne sont habituellement pas trouvés dans la nature. Cependant, les analogues de flavanone, Y compris les thioflavanones, sont en cours d'étude pour leurs biodisponibilités et bioactivité [106].

10.2. Activités pharmacologiques

Eun Jeong Choi *et al* (2012) ont étudié les effets anticancéreux de thioflavanone dans les cellules de cancer du sein humain MCF-7 et ont constaté qu'elle inhibait la prolifération cellulaire en induisant une apoptose à faible cytotoxicité. Les dérivés 3 cinnamylidène des thioflavanones présentaient des effets antiprolifératifs sur les cellules de lymphome chez les souris et les dérivés 3-chlorométhylène des thiochromanes-4-ones ont montré des activités antifongiques [109, 110].

1. Activités anticancéreuses

La caractéristique structurelle commune des flavonoïdes est le Noyau flavane, qui consiste en 15 atomes de carbone disposés en 3 cycles (Structure phénylchromanone, C6-C3-C6). Les cycles A et B sont des cycles de benzène et le cycle C est un pyran hétérocyclique ou une pyrone. Un certain nombre de mécanismes anticancéreux des flavonoïdes ont été associés à leurs Relation Structure Activité (SAR). Récemment, de nombreuses recherches ont visé comprendre la relation entre les modifications structurelles et l'activité biologique.

Pour augmenter l'activité anticancéreuse, la synthèse de nouveaux analogues de flavonoïdes a été effectuée [111].

En outre, l'activité anticancéreuse de ces composés synthétiques a été observée dans diverses cellules cancéreuses *in vitro*. Nous avons précédemment décrits les diverses activités biologiques des flavanones [112].

Les analogues des flavonoïdes contenant du soufre ont des activités supérieures aux molécules dont elles étaient dérivées. Par exemple, les thioflavopiridols synthétiques peuvent agir comme Inhibiteurs sélectifs de CDK1 dans des cellules tumorales humaines [113]. Choi EJ et al (2010) [114] ont suggéré que les dérivés synthétiques de flavanone étaient plus puissants que la flavanone dans un test d'antiprolifération en utilisant des cellules cancéreuses humaines. Les mêmes auteurs en 2012 ont étudié les activités anticancéreuses de thioflavanone et de thioflavone *in vitro*. Ils ont constaté que la thioflavanone et la thioflavone, qui sont synthétisées comme des analogues thio, peuvent posséder de plus grandes activités biologiques que leurs précurseurs.

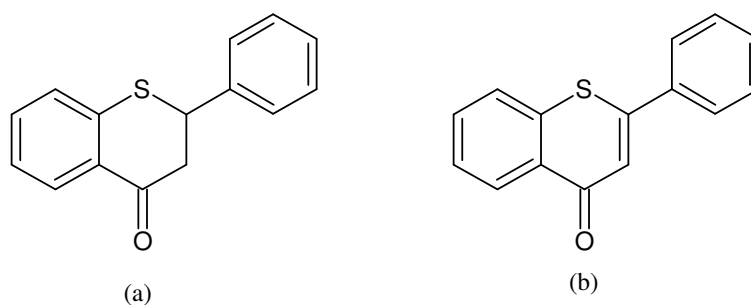


Figure II.4. Structure de Thioflavanone (a) et Thioflavone (b)

Les résultats montrent que la thioflavanone peut être un candidat médicamenteux anticancéreux plus approprié et a le potentiel d'inhiber sélectivement la croissance du cancer.

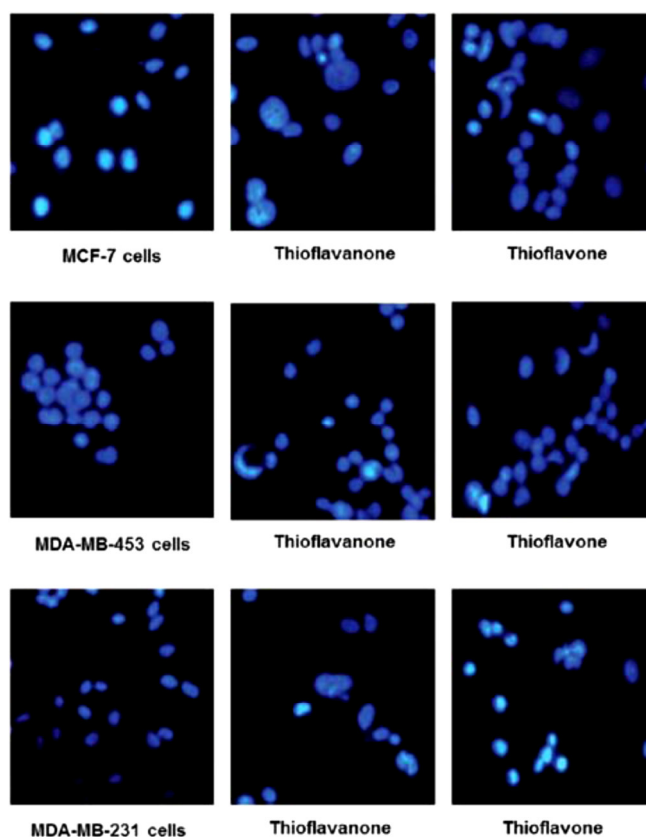


Figure II.5. Induction de l'apoptose par la thioflavanone et la thioflavone.

L'induction de l'apoptose par la thioflavanone peut être une nouvelle stratégie pour la chimiothérapie anticancéreuse [109].

2. Activités antioxydantes et inhibitrices de production de l'oxyde nitrique

Les activités antioxydantes et suppressives des dérivés de la thioflavanone contre la production d'oxyde nitrique ont fait l'objet d'une étude réalisée par Jae In Lee et Je-Hyuk Lee (2014). Les dérivés de thioflavanone ont été préparés avec des substituants méthoxy, méthyle, nitro, hydroxyle, chloro et fluoro à différentes positions.

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote, en abrégé NO, est une substance gazeuse constituée chimiquement d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote. Grâce à une réaction métabolique, il est produit par le corps humain à partir de l'arginine et de l'oxygène, par plusieurs enzymes dénommées NO synthases (NOS). Synthétisé en quantité peu abondante dans l'organisme, l'oxyde nitrique est, de ce fait, un neurotransmetteur rare doublé d'une grande importance eu égard à son rôle de transmission des signaux biochimiques dans de nombreux tissus, du système cardio-vasculaire au système nerveux central ou encore au niveau du système immunitaire. Qu'il s'agit de l'oxygénation, de l'apport nutritionnel, du

métabolisme par divers processus biochimiques ou physiologiques, cette substance gazeuse y intervient [115].

En résumé, le NO règle des fonctions cellulaires très variées dans des mécanismes moléculaires complexes qui ne sont pas encore tous explicités. Cependant la surproduction à long terme de NO aux sites inflammatoires provoque une inflammation chronique, l'asthme, Maladies neurodégénératives, sclérose en plaques, arthrite et Cancer [116]

Parmi les thioflavanones, la 3'-nitrothioflavanone et la 3'-hydroxythioflavanone ont montré des activités inhibitrices accrues contre la production d'oxyde nitrique (NO), comparées à la thioflavanone non modifiée.

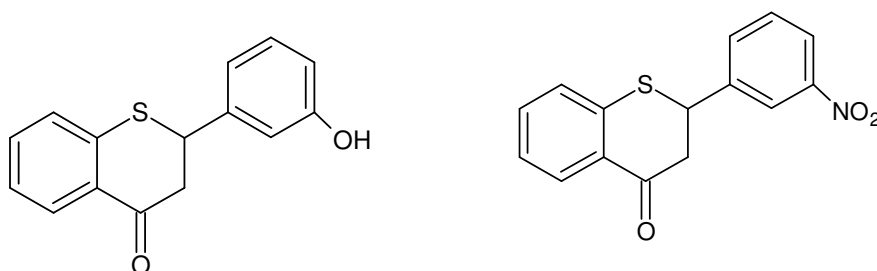


Figure II.6. Structure des 3'-hydroxythioflavanone et 3'-nitrothioflavanone

La 3'-hydroxythioflavanone, avec un groupe hydroxyle à la position 3', a montré une activité antioxydante 15-43 × plus élevée que la thioflavanone non modifiée et une inhibition plus puissante de la production de NO dans les cellules de macrophages induites par lipopolysaccharide (LPS) que la thioflavanone non modifiée, 3'-Hydroxy-thioflavanone est un antioxydant puissant avec une activité inhibitrice forte contre la production de NO, par rapport au thioflavanone non modifié Les activités inhibitrices des thioflavanones contre la production de NO étaient étroitement liées à la structure chimique de la thioflavanone[108].

11. Les imino-flavanones

11.1 Définition

Dans notre Laboratoire des Molécules Bioactifs et séparation Chirale (LMBC), Belboukhari *et al* (2013) ont développé de nouveaux dérivés de flavanone non décrits dans la littérature, ces études sont focalisées surtout vers la synthèse, séparation chirale et évaluation biologique des dérivés Imino Flavanone.

Dans ce travail ils ont synthétisé et identifié une série de quatorze nouveaux dérivés iminoflavanone par réaction de condensation entre la flavanone et des amines primaires, plus de détail sur la synthèse de ces molécules sera aborder dans le chapitre III.

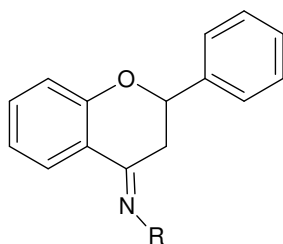


Figure II.7. Structure de 4 iminoflavanone

11.2 Activités biologiques

Dans la même étude précédente Belboukhari *et al* (2013) ont testé les différentes propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques des iminoflavanones synthétisés. L'activité antimicrobienne des composés synthétisés a été testée sur cinq souches bactériennes et une souche fongique. Les résultats ont montré que ces dérivés ont un pouvoir inhibitrice vis-à-vis tous les microorganismes testées. Cependant ils n'ont montré aucune activité antifongique vis-à-vis *Fusarium oxysporum*.

L'activité antioxydante vis-à-vis le DPPH et la β -carotène a montré que tous les dérivés synthétisés présentent une activité très importante sur les radicaux libre.

12. Les Azaflavanones

12.1. Définition

Les aza-flavanones se trouvent dans un grand nombre de produits naturels à large spectre d'activités biologiques, ils pourraient donc être des précurseurs des composés biologiquement actifs.

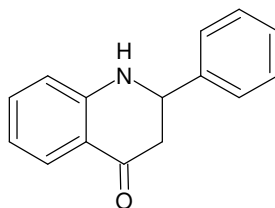


Figure II.8. Structure d'Aza-Flavanone 1

12.2. Activités biologiques

Les aza-Flavanones ont été identifiées comme une nouvelle classe d'inhibiteurs sélectifs de microARN. Ces composés ont été découverts pour arrêter le cycle cellulaire via une nouvelle voie transitoire dépendante des micro-ARN d'une espèce croisée interprétant un lien inattendu entre l'arrêt du cycle cellulaire et le contrôle médié par le microRNA dans le cancer.

Ils ont constaté que ces composés agissent comme des inhibiteurs de microARN et contrôlent également la prolifération cellulaire [117].

Autre étude montre que les dérivés d'Azaflavanone ont eu un potentiel en tant qu'agent Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [107].

N.S. Gill *et al* (2012) [118] Ont synthétisé les analogues aza des flavanones et étudié leurs activités anti-inflammatoire et anti-ulcéreux *in vivo*, les azaflavanones étudiés montre un pourcentage d'inhibition maximal par comparaison avec le diclofenac de sodium à dose de 200mg/Kg, les mêmes composés avec les mêmes concentrations montre un pouvoir d'inhibition des ulcères avec des pourcentages maximales. Cette étude montre que les dérivés d'azaflavanone peuvent être utilisés pour la découverte des nouveaux médicaments comme agents anti-inflammatoires et antiulcéreux puissants.

Dans une étude récente S. Kasturi *et al* (2017) [119] ont montré une forte activité d'inhibition de α -glucosidase par rapport aux médicaments standards de référence et identifiés comme des agents antidiabétiques potentiels.

Autres étude montre les propriétés antioxydantes des azaflavanones et leurs capacités comme capteurs des radicaux libres vis-à-vis les TEAC en comparant avec le standard Trolox [120].

12.3. Relation structure activité

S. Chandrasekhar *et al* (2012) [117] ont synthétisé une série de neuf dérivés d'azaflavanone et étudié leurs effets inhibiteurs de microARN.

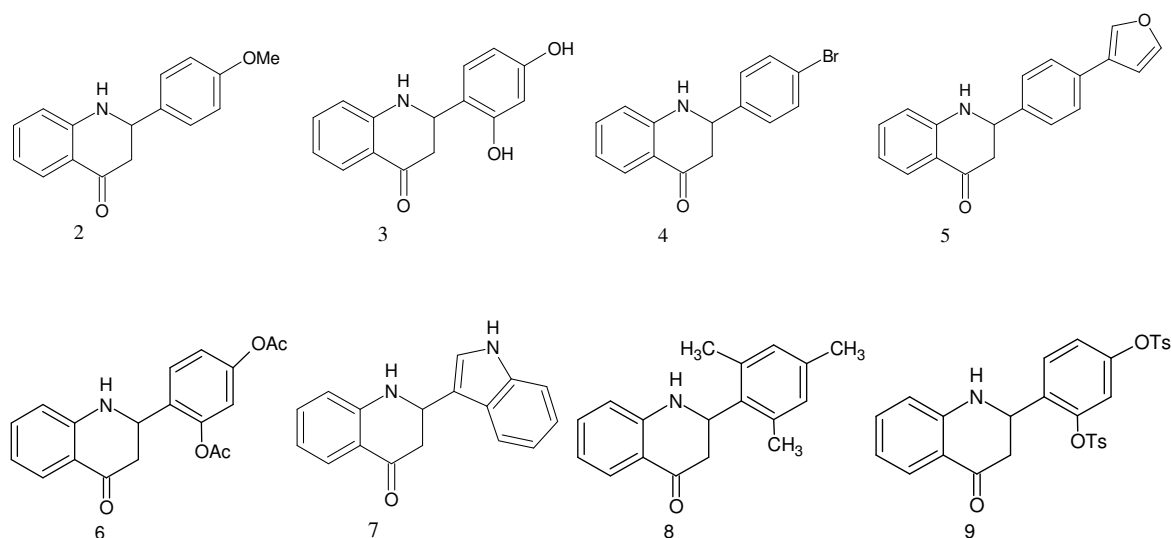


Figure II.9. Les dérivés d'Aza-Flavanone synthétisés

Les composés contenant un groupement hydroxyl ou un atome d'halogène dans la position para du substituant 2-aryle (composés 3 et 4) était préféré aux analogues portant

d'autres substituants. Remplacement des groupements hydroxyl sur le composé 3 avec des groupements acétoxy ou tosyloxy (composés 6 et 9) a entraîné la perte de l'activité inhibitrice des mi ARN. Les analogues avec d'autres substituants (1, 2, 5, 7, 8 et 9) ont été trouvés d'être moins actif. Ainsi, parmi les composés synthétisés, les composés 3 et 4 ont été les meilleurs inhibiteurs et ont bloqué la croissance cellulaire. Ainsi, ces deux composés ont été sélectionnés pour d'autres études en tant qu'analogues actifs optimisés [117].

13. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rapporté un rappel bibliographique sur les flavanones, leurs biosynthèses chez les espèces végétales, leurs synthèses et leurs intérêts biologiques ainsi nous avons résumé des exemples *in vitro/in vivo* des études pour explorer les effets bénéfiques des flavanones et les mécanismes impliqués, et puis nous avons rapporté la procédure d'extraction de l'hespéridine à partir des peaux d'orange réalisé dans notre Laboratoire de Phytochimie et de Synthèse Organique, comme exemple d'extraction des flavanones.

Références bibliographiques

- [1] S. Caccamese, C. Caruso, N. Parrinello, A. Savarino (2005) High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones, *Journal of Chromatography A*. 1076:155–162.
- [2] M. Uehara (2006) Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. Hesperidin and bone metabolism, *Clin. Calcium*. 16:1669 - 1676.
- [3] O. L. Radu, S. Armand, F. Lenouvel, H. Driguez, A. Cimpean et D. Iordachescu (2006) La glycolisation de la lutéoline en milieux de solvants organiques par l'action catalytique de la cyclodextrine glycosyltransférase de *Bacillus circulans*, *Revue Roumaine de Chimie*. 51(2):147–152.
- [4] S. S. Ibrahim (2008) Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, on Diabetes-Induced Brain Damage in Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(1): 84-95.
- [5] E. K. Susłow, J. D. Gładysz, A. Białonska, Z. Ciunik (2006) Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. *Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39:18–23.
- [6] B. A. Siles, H. B. Halsall, J. G. Dorsey (1995) Retention and selectivity of flavanones on homopolypeptidebonded stationary phases in both normal- and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 704:289-305.
- [7] F. Kanaze, M. Bounartzi, M. Georgarakis, I. Niopas (2007) Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin. *European Journal of Clinical Nutrition* 61: 472–477.
- [8] E. Cho, Y. Jeon, and S. Jung. (2009) Chiral Separation of Hesperetin and Hesperetin-O-glycoside in Capillary Electrophoresis Using Microbial β -1,2-Glucans. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30(8): 1870-1872.
- [9] L. B. Kunde, S. M. Gade, V.S. Kalyani, S. P. Gupte (2009) Catalytic synthesis of chalcone and flavanone using Zn–Al hydrotalcite adhere ionic liquid. *Catalysis Communications* 10:1881–1888.

- [10] A. Marfak (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides, Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp 28,40-42.
- [11] M. Bouheroum (2007) étude photochimique des plantes médicinales algériennes : *rantherium adpressum* et *ononis angustissima*. Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique Option : Phytochimie, Université Mentouri de Constantine, pp 39.
- [12] K. Rachid (2007) isolement et détermination des métabolites secondaires de l'exsudat toluène – acétate d'éthyl de *Centaurea calcitrapa* (ASTERACEAE). Thèse de magister, Université Mentouri Constantine, P 17.
- [13] Z. Belloum (2007) Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* L. mémoire de magister, université Mentouri Constantine, p 35.
- [14] B. Portet (2007) Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise : *Piper, hostmannianum* var. *berbicense*, Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p 27.
- [15] F. Maltese, C. Erkelens, F. V. Kooy, Y. H. Choi, R. Verpoorte (2009) Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy, Food Chemistry. 116: 575–579.
- [16] M. K. Khan (2010) Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine, Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille, pp 32-38.
- [17] EG. Schijlen, R. de Vos C, AJ. van Tunen, AG. Bovy(2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochem.* 65 : 2631-2648.
- [18] S. Martens, A. Mithofer (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochem.* 66 2399-2407.
- [19] M. Simmonds. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochem.* 56 (2001) 245-252.
- [20] M. Mato, Onozaki T, Ozeki Y, Higeta D, Itoh Y, Yoshimoto Y, Ikeda H, Yoshida H, Shibata M. Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Scientia Horticulturae* 84 (2000) 333-347.

- [21] K. Keilig, J. Ludwig-Müller Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Botanic. Stud.* 50 (2009) 311-318.
- [22] G. Cooper-driver, M. Bhattacharya. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochem.* 49 (1998) 1165-1174.
- [23] ZL. Fowler, MAG. Koffas. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83 (2009) 799-808.
- [24] U. Koca, MA. Berhow, VJ. Febres, KI. Champ, O. Carrillo-Mendoza, GA. Moore. Decreasing unpalatable flavonoid components in the effect of transformation construct. *Physiologia Plantarum.* 137 (2009) 101-114.
- [25] A. Bouraiou (2009) synthèse d'hétérocycles quinoléiques a visée thérapeutique et d'analogues structuraux de produits naturels. Thèse de doctorat, université Mentouri Constantine, pp 137.
- [26] X. Wang, S. Cheng (2006) Solvent-free synthesis of flavanones over aminopropyl-functionalized SBA-15, *Catalysis Communications* 7:689–695.
- [27] D. French, P. Schifano, J. C. Concepción, S. H. Leak (2010) Li–Al layered double hydroxides as catalysts for the synthesis of flavanone, *Catalysis Communications* 12:92–94.
- [28] R. Maurya, G. Singh and P. P. Yadav (2008) Antiosteoporotic agents from natural sources in Atta-ur-Rahman (Ed.) *Natural Products Chemistry.* 35:517-548.
- [29] R. Mata, M. L. Macias, I. S. Rojas, B. L. Hensen , R. A. Toscano and A. L. Anaya (1998) Phytotoxic compounds from *esenbeckia yaxhoob*, *Phytochemistry.* 49(2):441-449.
- [30] A. A. Franke, L. J. Custer, C. Arakaki, S. P. Murphy (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii, *Journal of Food Composition and Analysis.* 17:1–35.
- [31] A. D. Caro, A. Piga, V. Vacca, M. Agabbio (2004) Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage, *Food Chemistry.* 84:99–105.
- [32] J. J. Peterson, G. R. Beecher, S. A. Bhagwat, J. T. Dwyer, S. E. Gebhardt, D. Haytowitz, J. M. Holden (2006) Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A

- compilation and review of the data from the analytical literature, *J. Food Comp. Anal.* 19: S74-S80.
- [33] J. W. Erdman, J.D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J. T. Dwyer, J. Folts, J. Harnly, P. Hollman, C. L. Keen, G. Mazza, M. Messina, A. Scalbert, J. Vita, G. Williamson, and J. Burrowes (2007) Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, *J. Nutr.* 137: 718S–737S.
- [34] J. A.M. Kyle and G. G. Duthie (2006) Flavonoids in Foods, in book *Flavonoids chemistry, biochemistry, and applications*. Eds Ø. M. Andersen and Kenneth R. Markham published by Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp 283.
- [35] A. D. Lopez (2002) caractérisation et optimisation de la saveur du jus d'orange non fait de concentré, Thèse de doctorat, Université Laval, pp 26.
- [36] Isabelle Berta-Vanrullen (2005) Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation- Recommandations, Agence française de sécurité sanitaire des aliments PP 20, 157.
- [37] Scalbert A., Johnson I. T. & Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215S-217S.
- [38] Arts I. C. & Hollman P. C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S-325S.
- [39] Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A., Hakulinen, T. & Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, **76**, 560-568.
- [40] Rossi M., Garavello W., Talamini R., La Vecchia C., Franceschi S., Lagioui P., Zambon P., Dal Maso L., Bosetti C. & Negri E. (2007) Flavonoids and risk of squamous cell esophageal cancer. *Int J Cancer* **120**, 1560-1564.
- [41] Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R. & Kolonel L. N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 154-160.
- [42] Manach C., Scalbert A., Remesy C. & Morand C. (2006) Consommation et biodisponibilité des polyphénols. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 361-379 [P Sarni- Manchado and V Cheynier, editors]. Paris: TEC & DOC.
- [43] Erlund, I.; Meririnne, E.; Alfthan, G.; Aro, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J. Nutr.* **2001**, 131, 235-241.

- [44] Tanaka T. & Ogawa H. (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* **18**, 957-965.
- [45] So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M. & Carroll K. K. (1996) Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* **26**, 167-181.
- [46] Yang M., Tanaka T., Hirose Y., Deguchi T., Mori H. & Kawada Y. (1997) Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* **73**, 719-724.
- [47] Miyagi Y., Om A. S., Chee K. M. & Bennink M. R. (2000) Inhibition oazoxymethaneinduced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* **36**, 224-229.
- [48] Harmon A. W. & Patel Y. M. (2004) Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Res Treat* **85**, 103-110.
- [49] Kanno S., Tomizawa A., Hiura T., Osanai Y., Shouji A., Ujibe M., Ohtake T., Kimura K. & Ishikawa M. (2005) Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol & Pharm Bull* **28**, 527-530.
- [50] Vanamala J., Leonardi T., Patil B. S., Taddeo S. S., Murphy M. E., Pike L. M., Chapkin R. S.,
- [51] Guardia T., Rotelli A. E., Juarez A. O. & Pelzer L. E. (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* **56**, 683-687.
- [52] Park S. H., Park E. K. & Kim D. H. (2005) Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from Citrus unshiu and Poncirus trifoliata. *Planta Med* **71**, 24-27.
- [53] Kim H. K., Jeong T. S., Lee M. K., Park Y. B. & Choi M. S. (2003) Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta* **327**, 129-137.
- [54] Kim J. Y., Jung K. J., Choi J. S. & Chung H. Y. (2006) Modulation of the age-related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway by hesperetin. *Aging Cell* **5**, 401-411.
- [55] Ohtsuki K., Abe A., Mitsuzuwi H., Kondo M., Uemura K., Iwasaki Y. & Kondo Y. (2002) Effects of long-term administration of hesperidin and glucosyl hesperidin to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitam (Tokyo)* **48**, 420-422.

- [56] Jeon S. M., Park Y. B. & Choi M. S. (2004) Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clin Nutr* **23**, 1025-1034.
- [57] Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Krzeminski R., Gralak M., Delgado-Licon E.,
- [58] Fernandez M. T., Mira M. L., Florencio M. H. & Jennings K. R. (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorganic Biochem* **92**, 105-111.
- [59] Sestili P., Diamantini G., Bedini A., Cerioni L., Tommasini I., Tarzia G. & Cantoni O. (2002) Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J* **364**, 121-128.
- [60] Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4505-4515.
- [61] Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florencio, M.H., Jennings, K. R., *J. Inorganic Biochemistry* 2002, **92**, 105-111.
- [62] Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., *et al.*, *Free Radic. Res.* 2002, **36**, 1199-1208.
- [63] Jung U. J., Lee M. K., Jeong K. S. & Choi M. S. (2004) The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Nutr* **134**, 2499-2503.
- [64] Jung U. J., Lee M. K., Park Y. B., Kang M. A. & Choi M. S. (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1134-1145.
- [65] Borradaile N. M., De Dreu L. E. & Huff M. W. (2003) Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* **52**, 2554-2561.
- [66] Doostdar H., Burke M. D. & Mayer R. T. (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**, 31-38.
- [67] Moon Y. J., Wang X. & Morris M. E. (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* **20**, 187-210.

- [68] C. Dhuique-Mayer (2007) évaluation de la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes : Estimation *in vitro* de la biodisponibilité des caroténoïdes, Thèse doctorat, Université Montpellier II, pp 35,36.
- [69] G. N. Kim, J. G. Shin, H. D. Jang (2009) Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis Osbeck*) extract treated with *Aspergillus saitoi*, Food Chemistry. 117:35–41.
- [70] D. Bagchi, H. G. Preuss (2005) Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention, CRC press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp 386, 407.
- [71] H. H. Wijngaard, C. Rößle, N. Brunton (2009) A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry. 116: 202–207.
- [72] M. Yaqin, Y. Xingqian, H. Yunbin, X. Guoneng, X. Guihua, L. Donghong (2008) Ultrasound assisted extraction of hesperidin from pènggan (*Citrus Reticulata*) peel, Ultrasonics, sonochemistry. 15:227-232.
- [73] K. Shimoda, and H. Hamada (2010) Production of Hesperetin Glycosides by *Xanthomonas campestris* and Cyclodextrin Glucanotransferase and Their Anti-allergic Activities, Nutrients. 2:171-180.
- [74] C. Bensouici (2006) étude phytochimique de l'extrait butanolique de l'espèce, *Centaurea Maroccana*. Université Mentouri Constantine, p 27.
- [75] J. Arct, K. Pytkowska (2008) Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals, Clinics in Dermatology. 26:347–357.
- [76] L. Skarydova, L. Zivna, G. Xiong, E. Maser, V. Wsol (2009) AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids, Chemico-Biological Interactions. 178:138–144.
- [77] H. Lee, H. Yeom, Y. G. Kim, C. N. Yoon, C. Jin, J. S. Choi, B. R Kim and D. H. Kim, (1998) Structure-Related Inhibition of Human Hepatic Caffeine N3-Demethylation by Naturally Occurring Flavonoids, Biochemical Pharmacology. 55:1369–1375.
- [78] B.H. Havsteen (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacology & Therapeutics. 96 : 67–202.
- [79] B. Adlen (2008) étude phytochimique de la phase butanolique de l'espèce *Inula Crithmoides*. Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine, P 8, 9.

- [80] K. Madina (2008) extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne, thèse de magistère, université Mentouri Constantine, p 37.
- [81] S. Akroum (2006) Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* mémoire de magister de l'université Mentouri de Constantine, P 21.
- [82] E. Yannick (2009) Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité, thèse de doctorat de l'université de Toulouse, P 49, 80.
- [83] Y. Sakihama , M. F. Cohen , S. C. Grace , H. Yamasaki (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*. 177:67–80.
- [84] C. Thomas, S. Robert, E. Wingard (1978) An Improved Conversion of Hesperidin into Hesperetin Including Purity determination by Gradient-Elution, High-pressure Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 26(1): 278-280.
- [85] Paul M Dewick (2002) *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, England, pp 149-152.
- [86] A. H. Gilani , A-U. Khan, Q. Jabeen, F. Subhan, R. Ghafar (2005) Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K⁺ channel activation, *Journal of Ethnopharmacology*. 100:347–352.
- [87] M. Afzal, C. Obuekwe, A. R. Khan and H. Barakat (2007) Antioxidant activity of *Cordia Myxa L.* and its hepatoprotective potential. *EJEAFChe*, 6 (6):2109-2118.
- [88] European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy (2010) Flavonoids (Flavanones and dihydrochalcones), *EFSA Journal*. 8(9):1065.
- [89] K. Shimoda, H. Hamada, H. Hamada (2008) Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures, *Phytochemistry*. 69:1135–1140.
- [90] J. A. Yáñez, X. W. Teng, K. A. Roupe, N. M. Davies (2005) Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of hesperetin in biological matrices, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37:591–595.
- [91] J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies (2007) Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *J. Chromatogr. B* 848:159–181.

- [92] K. Grohmann, J. A. Manthey, R. G. Cameron (2000) Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures, *Carbohydrate Research* 328:141–146.
- [93] Galluzzo, P., Ascenzi, P., Bulzomi, P., and Marino, M. (2008). The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α -palmitoylation. *Endocrinology*, 149, 2567-2575.
- [94] Kanaze, F. I.; Bounartzi, M. I.; Georgarakis, M.; and Niopas, I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 472-477.
- [95] E. Tripoli, M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo, M. Giammanco (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 104:466–479.
- [96] J. Velišek, J. Davidek and K. Cejpek (2008) Biosynthesis of Food Constituents: Natural Pigments. *Czech J. Food Sci.* 26(2) 73–98.
- [97] A. Boudjerda (2008) Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (*Anthemideae*) , et *Ranunculus cortusifolius* (*Ranunculaceae*). Thèse de doctorat, Université Mentouri- Constantine, p 308.
- [98] M. L. Toumi, S. Merzoug, A. Boutefnouchet, A. Tahraoui, K. Ouali and M. A. Guellati (2009) Hesperidin, a natural citrus flavanone, alleviates hyperglycaemic state and attenuates embryopathies in pregnant diabetic mice, *Journal of Medicinal Plants Research*. 3:862-869.
- [99] A. Garg, S. Garg, L. Zaneveld et A. Singla (2001) Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytotherapy Research*. 15: 655–669.
- [100] A. Marston and K. Hostettmann (2006) in book *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, Eds Andersen OM, Markham AR, CRC press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp 1 – 36.
- [101] A. Bertrand, S. Morel, A. Franc, O. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsana and M. R. Simeona, L. M. glucansucrase (2006) Synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents, *Carbohydrate Research* 341:855–863.
- [102] Substances naturelles en Polynésie française, Fiches ressources végétales – Groupe 1 IRD éditions 2005. p 347.

- [103] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi and C. Caristi (2007) Flavonoid Composition of *Citrus* Juices, *Molecules*. 12:1641-1673.
- [104] M. Asztemborska, J. Zukowski (2006) Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods, *Journal of Chromatography A*. 1134:95–100.
- [105] N. M. Borradaile (1998) effects of citrus juices and constituent flavonoids on lipid and lipoprotein metabolism: in vivo and in vitro studies. Thèse de master, Université de Western Ontario, p 6.
- [106] R. Sakirolla, M. Yaeghoobi, N. Abd. Rahman (2012) Synthesis of flavanones, azaflavanones, and thioflavanones catalyzed by PMA-SiO₂ as a mild, efficient, and reusable catalyst, *Monatsh Chem*, 143:797–800.
- [107] Jae In Lee (2008) A New Synthesis of Thioflavanones from Thiosalicylic Acid, *Bull. Korean Chem. Soc*, 29 (6) 1263.
- [108] J. In Lee and Je-Hyuk Lee (2014) Antioxidant and Inhibitory Activities of Thioflavanones against Nitric Oxide Production, *Food Sci. Biotechnol*. 23(3): 957-963.
- [109] Eun Jeong Choi, Jae In Lee And Gun-Hee Kim (2012) Evaluation of the anticancer activities of thioflavanone and thioflavone in human breast cancer cell lines, *International Journal Of Molecular Medicine*, 29: 252-256.
- [110] Jae In Lee (2013) A Novel Synthesis of Heterocyclic Analogues of Thioflavanones from Haloheteroaromatic Carboxylic Acids, *Bull. Korean Chem. Soc*, 34(4) 1253-1256.
- [111] JI.Lee and MG Jung (2005) A new route for the synthesis of flavanones from 2-methoxybenzoic acids. *Bull Korean Chem Soc* 26: 2044-2046.
- [112] Lee JI, Jung MG and Jung HJ: A novel synthesis of flavanones from 2-hydroxybenzoic acids. *Bull Korean Chem Soc* 28: 859-862, 2007
- [113] Choi EJ, Lee JI and Kim GH: Anti-carcinogenic effect of a new analogue 4'-chloroflavanone from flavanone in human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 25: 293-298, 2010.

- [114] K.S. Kim *et al*: Thio- and oxoflavo- piridols, cyclin-dependent kinase 1-selective inhibitors: synthesis and biological effects. *J Med Chem* 43: 4126-4134, 2000.
- [115] R. Pariente, Oxyde nitrique, *EMC-Pneumologie* 1 (2004) 37–39.
- [116] Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol.* 2: 149-156 (2001)
- [117] Srivari Chandrasekhar *et al* (2012) aza-Flavanones as potent cross-species microRNA inhibitors that arrest cell cycle, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 : 645–648.
- [118] N.S. Gill, A. Kaur, R. Arora, V. Dhawan, M.Bali(2012) Synthetic Studies of Novel Azaflavanone Derivatives and its Biological Activities, *Curr.Res.Chem*, 4(4):88-98.
- [119] S. Kasturi *et al*(2017) Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of Azaflavanones as α -Glucosidase Inhibitors, *Med. Chem. Commun.*, **8** :1618-1630 .
- [120] R. Prasad, P. K. Sharma Y. R. Lee (2015) Mild and Efficient Silver(I) Triflate Catalyzed Synthesis of 2-Aryl- 2,3-dihydroquinolin-4(1H)-ones, and Their Antioxidant Activities, *Synthesis*, 47:3881–3890.

Partie II

Chapitre III :
Techniques de séparation chirale,
diastéromérisation et racémisation
des flavanones

1. Introduction

Comme nous avons vu dans le chapitre précédent, les flavanones contiennent un noyau de chromanone qui existe souvent comme deux énantiomères 2R et 2S, dérivant de son centre stéréogénique au C2. L'obtention de ces composés présente un intérêt clinique majeur vu leur activité athérosclérose, anti-inflammatoire, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale ...etc [1-5]. Après un rappel des structures et des propriétés des flavanones, une présentation de différentes techniques et méthodes utilisées pour la séparation des énantiomères et de diastéréoisomères de quelques flavanones sera abordée, ainsi les études de diastéromérisation et de racémisation.

2. Différents techniques de séparation des énantiomères et diastéréoisomères des flavanones décrits dans la littérature

1. Séparation chirale de l'Hespéridine et de Naringine et son analyse dans l'extrait butanolique de *Launaea arborescens*

Belboukhari et al (2010) rapporte le criblage de la séparation chirale sur 11 phases stationnaires chirales (PSCs) et la détermination des barrières d'énergie d'activation du diastéromérisation ΔG^\ddagger de la Naringine et de l'Hespéridine par CLHP [6].

Le criblage de la séparation chirale par des méthodes de CLHP des diastéromo-isomères de l'Hespéridine et de Naringine a été accomplie en mode à phase normale sur 11 phases stationnaires chirales (Chiralpak IA, Chiralpak AS-H, Chiralpak AD-H, Chiralpak AD-RH, Chiralcel OB-H, Chiralcel OJ, Kromasil CHI-TBB, Sumichiral OA-2500, Ulmo (S, S), Chiralcel OD-H et Chiralcel OD) avec diverses phases mobiles de n-hexane/alcool (isopropanol ou éthanol) [6]. Les résultats chromatographiques pour la séparation de (2R/2S) des flavanones glycosidées sont comme suit :

En utilisant le Chiralcel OD-H comme PSC, les valeurs de sélectivité α se sont étendues de 1.16 pour l'Hespéridine à 1.81 pour la Naringine, Chiralpak IA dans différentes conditions de 1.13 à 1.25 pour l'Hespéridine et la Naringine, Chiralpak AD-H a présenté une bonne séparation chirale de Naringine et de l'Hespéridine avec un facteur de sélectivité vers 1.28. Le Chiralpak AD a présenté seulement la séparation d'épimère de l'Hespéridine avec une sélectivité vers 1.21. De façon analogue, le facteur de résolution (R_s) est étendu de 0.97 pour l'Hespéridine à 2.27 pour la Naringine. Les valeurs de α et de R_s obtenus pour la Naringine avec le Chiralpak IA et une phase mobile très semblable (1.51 et 0.7, respectivement). Les

meilleurs résultats pour les deux flavanones sont obtenus sur Chiralpak IC avec hexane/éthanol 70 :30 (Figure III.1) [6].

Ces deux composés n'étaient pas résolus en utilisant les PSCs Chiracel OJ, Chiracel OB-H, Sumi, Ulmo et de Kromasil [6].

Les structures ont été confirmées par une séparation chirale sur Chiralpak IC élue (hexane / éthanol, 70: 30). Les résultats présentés dans le tableau 2 démontrent une composition racémique de l'hespéridine (46,96: 53,04) et naringine (68,45: 31,55) (figure 1).

Tableau III.1 : Séparation chirale de l'hespéridine et naringine sur Chiralpak IC.

Composé	Hespéridine	Naringine
PSC	Chiralpak IC	Chiralpak IC
Eluant(%)	70	70
FR	1	1
K ₁	5.12	4.55
Rt ₁	18.67	16.93
Rt ₂	23.51	22.75
R _s	1.55	2.43
α	1.31	1.42
composition(%)	46.96 :53.04	68.45 : 31.55

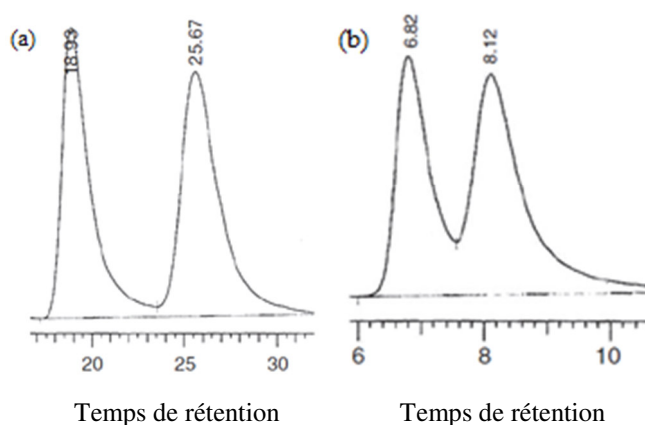


Figure III.1. Chromatogrammes de séparation chirale des épimères de Naringine sur Chiralpak IA : (phase mobile hexane/éthanol 70:30) (a) et de l'Hespéridine sur Chiralpak IC (phase mobile hexane/éthanol/TFA 70:30:0.1), T=25°C, débit=1ml/min, λ =254nm (b).

Les résultats ont été expliqués par Condition de protocole pour l'isolement de ces deux composés, dont la naringine a été séparée à la t.a. Mais l'hespéridine a été extraite au reflux à 100 ° C

2. Séparation d'isomères optiques de flavanones et de flavanones glycosides par nano-chromatographie liquide utilisant le phényl-carbamate-propyl- β -cyclodextrine comme phase stationnaire chirale.

Si-Ahmed et al (2010) ont appliqué la Nano chromatographie liquide avec la phase stationnaire phenyl-carbamate-propyl- β -Cyclodextrine pour la séparation énantiomérique ou diastéréoisomérique de plusieurs flavanones. La séparation chirale de tous les composés étudiés a été obtenue en mode à phase inverse en utilisant un mélange de H₂O/MeOH en tant que phase mobile [7].

Les flavanones choisie sont : Flavanone, 2'-Hydroxyflavanone, 4'-Hydroxyflavanone, 6-Hydroxyflavanone, 7-Hydroxyflavanone, 4'-Méthoxyflavanone, 6-Méthoxyflavanone, 7-méthoxyflavanone, Hespéretine, Hespéridine, Narigénine, et Naringine.

L'énantiosélectivité de PSC a été premièrement étudiée en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles contenant différents rapports d'acétonitrile (Ac)/eau. La concentration d'Ac a été variée dans la gamme 20-80%.L'augmentation de la concentration d'Ac a causé une réduction de temps de rétention et d'énantiosélectivité de tous les composés étudiés. En fait la nature aprotique de l'acétonitrile augmente son affinité pour les emplacements préféré dans la cavité hydrophobe de CD, soulevant sa concurrence avec les énantiomères. Les analytes ont été résolues à leurs énantiomères et diastéréo-isomères, excepté le 2' - hydroxyflavanone et naringine qui ont été partiellement séparés ($R_s = 0.50$) [7].

En utilisant le MeOH en tant que modificateur organique, au lieu d'Ac, dans la phase mobile dans la gamme 50-100%. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III.2 : Résolutions énantiomériques et diastéréoisomériques des flavanones en mode à phase inverse en utilisant une phase mobile basée sur l'eau et le méthanol.

composé	t_{r1}	k'_1	t_{r2}	k'_2	α	R_s
Flavanone ^a	23.3	3.18	29.33	4.31	1.35	2.34
7-hydroxyflavanone ^a	14.52	1.62	16.05	1.90	1.17	1.40
6-hydroxyflavanone ^a	14.80	1.67	17.91	2.23	1.34	1.45
4'-hydroxyflavanone ^a	13.61	1.46	15.92	1.88	1.29	1.49
2'-hydroxyflavanone ^c	24.35	3.44	25.07	3.57	1.03	0.31
7-méthoxyflavanone ^b	15.55	1.59	18.29	2.05	1.28	2.61
6-méthoxyflavanone ^b	16.87	1.81	19.67	2.28	1.26	1.93
4'-méthoxyflavanone ^a	15.42	1.57	18.64	2.11	1.34	3.28
Hesperetin ^a	16.55	1.99	25.07	3.53	1.77	2.51
Naringenin ^c	17.42	2.17	19.94	2.64	1.21	1.26
Hesperidin ^c	15.68	1.86	20.29	2.70	1.45	1.92
Naringin ^c	12.81	1.34	13.77	1.51	1.13	0.91

Colonne capillaire emballée avec le Phenylcarbamate-2-propyl- β -CD, 100 μm ×22cm ; différents rapports de H₂O/Ac (v/v) ; débit 240 nl/min ; échantillons analysés à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, volume injecté 100 nL.

- a- Phase mobile: H₂O/MeOH (40/60, v/v).
- b- Phase mobile: H₂O/MeOH (30/70, v/v).
- c- Phase mobile: H₂O/MeOH (50/50, v/v).

À la concentration de MeOH dans la gamme 50-70% tous les composés analysés ont été résolus à leurs énantiomères ou diastéréo-isomères excepté le 2'-hydroxyflavanone et Naringine. Comme rapporté dans le tableau II.5, les valeurs de résolution les plus élevées ont été réalisées pour les méthoxyflavanones, particulièrement ceux soutenant un groupe méthoxyl en position (4' ou 7).

L'Hespéretine et l'Hespéridine également ont fourni une bonne résolution probablement due à la position de groupement 4'-méthoxyl. La Narigénine et Naringine, qui ont un groupe hydroxyl dans la même position, étaient moins résolus. Ils ont observé des valeurs plus basses de R_s pour tous les hydroxyflavanones étudiés [7].

En comparant les résultats obtenus avec les deux phases mobiles, les valeurs de R_s obtenues avec le MeOH étaient plus hautes que ceux observés utilisant le même contenu d'Ac [7].

3. La séparation des énantiomères et des diastéréoisomères de flavanones glycosides de *Balanophora involucrata* Hook. f. par EC et CLHP en phase inverse sur la colonne C 18

Un pair des diastéréoisomères de flavanone glycoside (2R) et (2S) d'eriodictyol-5-O- β -d-glucopyranoside (1a, 1b), de *Balanophora involucrata* Hook. f. a été séparé avec succès par la colonne RP- C18 par Pan et al (2008). Quelques autres composés, y compris une paire d'énantiomères (2R) et (2S) d'ériodictyol (2a, 2b), et une paire de diastéréoisomères du flavanone glycoside, (2R) et (2S) d'eriodictyol-7-O- β -d-glucopyranoside (3a, 3b), ont été séparés par électrophorèse capillaire de même plante [8].

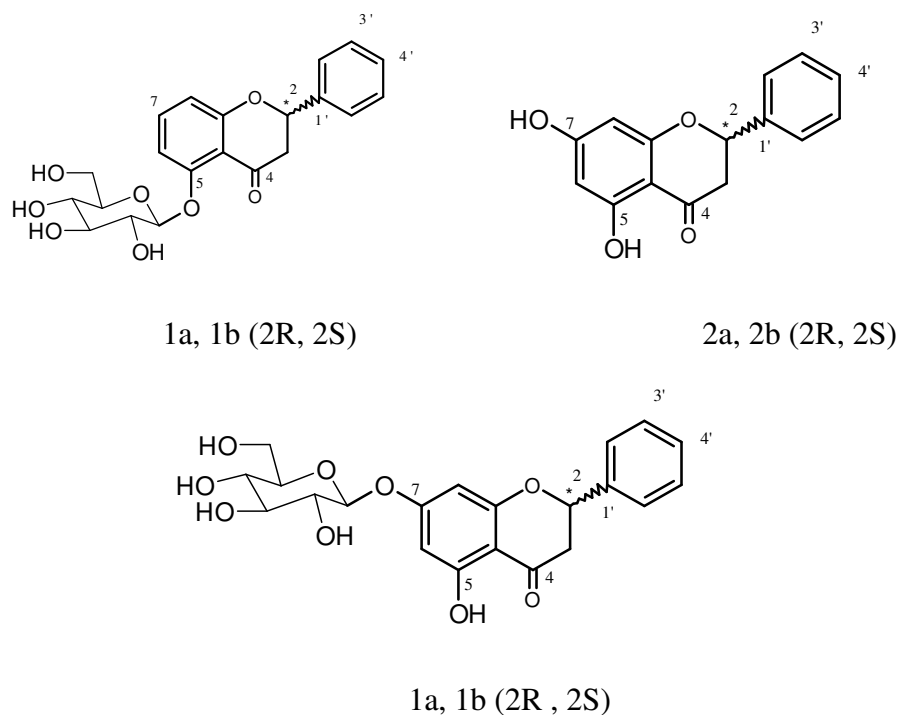


Figure III.2. Structure des flavanones isolés à partir de plante *Balanophora involucrata* Hook. f [8].

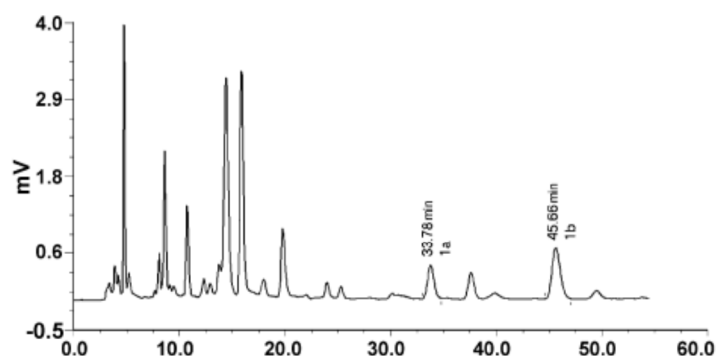


Figure III.3. Chromatogramme analytique de CLHP en phase inverse des composés 1a et 1b de *B. involucrata*. Phase mobile : méthanol-eau, 15:85 (v/v). Colonne : YMC ODS (250mm×4.6mm.). La température de colonne : 25 °C. débit : 1.0 ml/min. Longueur d'onde UV de: 280 nm [8].

4. Évaluation d'une phase stationnaire chirale de cellulose tris (3,5 diméthylphenylcarbamate) ayant un support de silice de petits pores

Un procédé synthétique en deux étapes a été élaboré par Liu et Zou (2008) pour la préparation de la phase stationnaire chirale de cellulose tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) (CSP) ayant un support de silice de petits pores. La phase stationnaire produite a été testée par plusieurs composés chiraux entre eux le flavanone. Les résultats de séparation de flavanone sur cette colonne sont comparés avec ceux obtenus sur deux autres colonnes : Chiralcel OD-H ou Chiralcel OD et PSC de (Matlin et ces collègues). La PSC préparée présente les meilleurs résultats (tableau III.3) [9].

Tableau III.3: Résultat de la séparation chirale de flavanone sur les trois colonnes.

colonne	k'_1	α	R_s
CSP-100	2.53	1.43	4.27
Chiralcel OD-H ou Chiralcel OD	1.47	1.41	3.08
PSC à petits pores	1.50	1.40	2.00

Phase mobile: *n*-hexane/2-propanol (90/10, v/v)

- a- Le CSP-100 était CDMPC déposé sur un support de gel de silice aminopropyl de 5 μ m, 100 Å de diamètre des pores (taille de colonne : 150mm×4.6mm.).
- b- Chiralcel OD-H et Chiralcel OD étaient le CDMPC déposé sur le gel de silice aminopropyl de grand pore : 5 μ m ou 10 μ m (taille de colonne 250mm×4.6mm.).

- c- PSC de (Matlin et ces collègues) le Petit-pore étaient CDMPC déposé sur 5 μ m ou 3 μ m, gel de silice aminopropyl de 120 Å (taille de colonne : 150mm \times 4.6mm 100mm \times 4.6mm) [9].

5. Séparation des énantiomères de Flavanone et du 2' hydroxychalcone par chromatographie liquide à haute performance dans les conditions à phase inverse

Cirilli et al (2008) ont présenté l'évaluation de l'applicabilité de PSC de deuxième génération à base d'amylose Chiralpak IA en conditions à phase inverse [10].

Tableau III.4 : Facteur de rétention (k'_I) pour le premier énantiomère, facteur d'énantioseparation (α) et de résolution (R_s) de Flavanone en conditions organiques polaire et en mélanges alcool-eau.

Phase mobile	k'_I	α	R_s
Méthanol ^a	0.91 (R)-(+)	2.17	7.70
Méthanol-eau 95 :5 ^a	1.56 (R)-(+)	2.43	9.16
Méthanol-eau 90 :10 ^a	2.44 (R)-(+)	2.62	9.66
Méthanol-eau 80 :20 ^a	6.39 (R)-(+)	2.88	7.54
Ethanol ^b	0.70 (R)-(+)	1.64	3.78
Ethanol-eau 90 :10 ^b	1.27 (R)-(+)	2.23	8.69
Ethanol-eau 80 :20 ^b	2.02 (R)-(+)	2.62	11.67
Ethanol-eau 70 :30 ^b	4.09 (R)-(+)	2.71	12.96
Acétonitrile ^a	0.36 (R)-(+)	1.52	2.46
Acétonitrile-eau 90 :10 ^a	0.46 (R)-(+)	1.93	3.71
Acétonitrile-eau 80 :20 ^a	0.76 (R)-(+)	1.97	4.87

Colonne, Chiralpak IA (150mm \times 4.6mm.) ; débit, a- 1 ml/min, b- 0.5 ml/min ; T=25°C ; détection, UV à 254 nm.

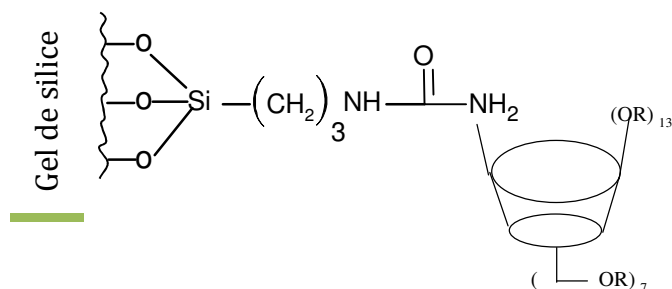
La séparation énantiomérique de Flavanone a été exécutée avec succès sur la PSC Chiralpak IA dans les conditions à phase inverse. La résolution dépend de la nature et de la concentration de modificateur alcoolique. Les résultats fournis par cette étude démontrent clairement que le système chromatographique basé sur la PSC immobilisée (Chiralpak IA) fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges

isomériques des composés chiraux et pour la surveillance de la stabilité de configuration de Flavanone dans des médias aqueux et non aqueux [10].

6. Synthèse et application de mono-2^A-azido-2^A-deoxyperphenylcarbamoyle-β-cyclodextrine et de mono-2^A-azido-2^A-deoxyperacetyl-β-cyclodextrine en tant que phases stationnaires chirales pour la CLHP

Poon et al (2006) ont préparé deux phases stationnaires chirales en se basant sur l'immobilisation régiosélective du β-cyclodextrine (β-CD) à la position C2 au support de silice. Le mono-2^A-azido-2^A-deoxyperphenylcarbamoyle cyclodextrine et mono 2^A azido 2^A-deoxyperacetyl cyclodextrine. Leur application à l'énantioséparation par CLHP a été démontrée en phase inverse pour des composés racémiques entre eux quelques dérivés de flavonone [11].

Les énantiomères sont généralement séparés sur la PSC (a), des meilleures résolutions sont obtenues pour la Flavanone, et le 7-méthoxyflavanone. La PSC (b) présente la résolution complète de 2'-hydroxyflavanone seulement $R_s=2.35$. Le résultat est représenté dans le tableau III.5 [11].



a. R= -CO-NH-Ph

b. R= -CO-CH₃

Figure III.4. Structure de (a) mono-2^A-azido-2^A-deoxyperphenylcarbamoyle β-cyclodextrine et (b) mono 2^Aazido 2^A-deoxyperacetyl β-cyclodextrine.

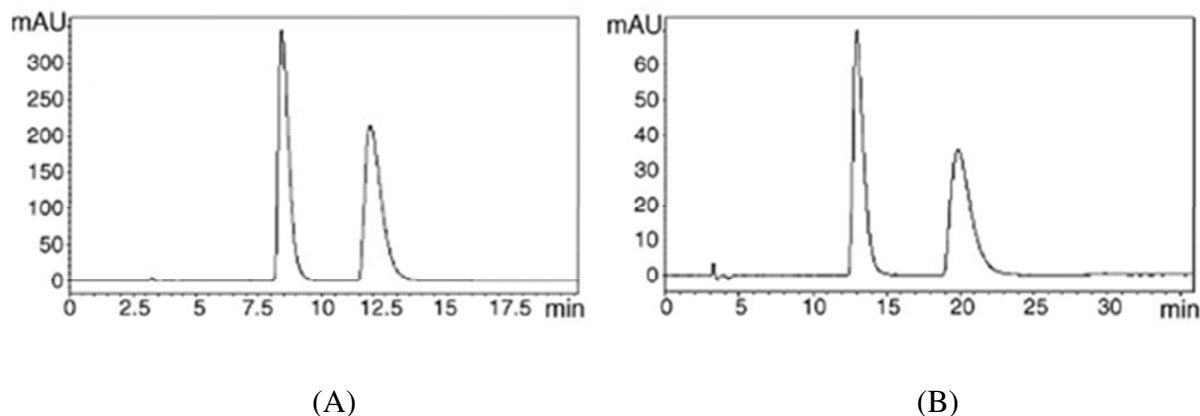


Figure III.5. Les chromatogrammes de la séparation chirale de (a) : Flavanone et de (b) : 7-méthoxyflavanone sur la colonne PSC a. Conditions : eau/méthanol 50 :50, débit 1 ml/min, $\lambda = 254$ nm.

Tableau III.5 : Propriétés d'énantioséparation entre PSC a et PSC b dans les conditions à phase inverse.

composé	K'1	K'2	α	Rs	colonne
Flavanone	1.6	2.68	1.68	3.89	PSC a
	3.12	3.44	1.10	0.83	PSC b
7-methoxyflavanone	3.01	5.13	1.70	3.71	PSC a
	3.26	3.61	1.11	0.91	PSC b
6-methoxyflavanone	3.54	5.30	1.50	3.67	PSC a
	1.74	2.13	1.22	1.14	PSC b
4'-hydroxyflavanone	1.24	1.95	1.58	2.72	PSC a
	3.33	-	-	-	PSC b
6-hydroxyflavanone	1.32	1.88	1.42	2.26	PSC a
	3.23	3.65	1.13	1.00	PSC b
5-methoxyflavanone	1.27	1.60	1.26	1.97	PSC a
	3.63	4.06	1.12	0.88	PSC b
4'-methoxyflavanone	1.42	2.08	1.46	1.74	PSC a
	3.69	3.92	1.06	0.29	PSC b
2'-hydroxyflavanone	1.08	1.44	1.33	1.07	PSC a
	2.48	3.40	1.37	2.35	PSC b

Débit = 1.000 ml/min pour PSC a et 0.8 ml/min pour PSC b, détection = 254 nm, phase mobile : eau/méthanol = 50/50.

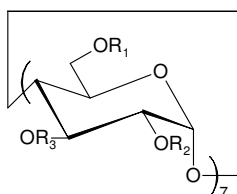
Les groupements existés sur la cavité de CD de la phase stationnaire mono 2^Aazido 2^A-deoxyperacetyl β -cyclodextrine peut affecter le phénomène d'inclusion avec le CD en fournissant la répulsion stérique qui peut réduire la stabilité entre le soluté et la PSC. C'est suggestif que les interactions π - π impliquant les cycles aromatiques dans la PSC a jouent un rôle important dans l'énantiodiscrimination dans les conditions de phase inverse [11].

7. Développement de dérivés dinitrophényl de β -cyclodextrine pour les séparations énantiomériques par CLHP

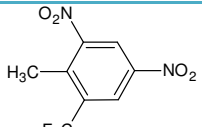
La synthèse et l'évaluation du nouveau dinitrophényl (DNP) β cyclodextrine (β CD) substitué comme phase stationnaire chirale (PSC) pour l'énantioséparation de diverses classes des analytes chiraux par CLHP sont présentés par Zhong et al (2006) parmi les produits étudiés, la Flavanone, la Naringine et le (4, 5, 7)-trihydroxyflavanone. Les structures des dérivés (DNP) sont représentées dans le tableau III.6 [12].

Le tableau II.6 énumère les données chromatographiques pour les séparations à phase Inverse sur PSC 1 à PSC 9 excepté la PSC 4 et PSC 7 : détection UV 254 nm débit 1 ml/min.

Tableau III.6 : Les structures des PSCs utilisés pour la séparation chirale des flavanones basé sur la dinitrophényl β cyclodextrine substituée [12]:



PSC	Structure de R ₁ , R ₂ et R ₃	Type de liaison
PSC 1		Liaison carbamate 7.2 %
PSC 2		Liaison carbamate 19.7 %
PSC 3		Liaison éther 6.5 %
PSC 5		Liaison éther 5.5 %
PSC 6		Liaison carbamate 24.5 %
PSC 8	R ₁ = H, R ₂ = R ₃ =	Liaison éther 9.8 %

CSC 9		Liaison éther 8.2 %
-------	---	---------------------

Le tableau suivant énumère les résultats chromatographiques d'énantioséparation pour les trois flavanones.

Tableau III.7 : Résultats chromatographiques d'énantioséparation.

composé	K' ₁	α	R _s	Phase mobile	colonne
Flavanone	7.26	1.14	1.22	MeOH/H ₂ O/TEAA 30/70/0.1 PH 4.1	PSC 1
	4.86	1.10	1.10	MeOH/H ₂ O/TEAA 45/55/0.1 PH 4.1	PSC 2
	9.06	1.08	0.96	MeOH/H ₂ O/TEAA 30/70/0.1 PH 4.1	PSC 3
	13.67	1.08	0.85	MeOH/H ₂ O/TEAA 35/65/0.1 PH 4.1	PSC 5
	10.95	1.10	1.72	Ac/H ₂ O 20/80 PH 4.1	PSC 6
	1.65	1.13	1.76	Ac/H ₂ O/TEAA 40/60/0.1 PH 4.1	PSC 8
	5.76	1.18	1.50	Ac/H ₂ O/TEAA 25/75/0.1 PH 4.1	PSC 9
Naringin	1.61	1.42	2.22	MeOH/H ₂ O/TEAA 50/50/0.1 pH4.1	PSC 6
	1.30	1.40	2.93	Ac/H ₂ O/TEAA 25/75/0.1 pH4.1	PSC 8
	5.53	1.23	1.6	Ac/H ₂ O/TEAA 15/85/0.1 pH4.1	PSC 9
4,5,7-Trihydroxy flavanone	11.38	1.05	0.60	MeOH/H ₂ O/TEAA 35/65/0.1 pH4.1	PSC 5
	10.81	1.02	0.60	Ac/H ₂ O/TEAA 25/75/0.1 pH4.1	PSC 6
	10.57	1.09	0.80	Ac/H ₂ O/TEAA 25/75/0.1 pH4.1	PSC 8

TEAA : Triethylammonium acetate

Toutes les séparations sont en mode à phase inverse pour toutes les colonnes. Toutes les PSCs ont été emballés en tant que colonne CLHP 250×4.6mm à l'exception de PSC 5, qui est emballée comme colonne CLHP 150×4.6mm. Toutes les séparations étaient à la température ambiante ~23 °C. Débit : 1 ml/min [12].

La Naringine et la Flavanone sont séparables sur PSC-6 et PSC-8 et PSC-9. En ce qui concerne le mécanisme de discrimination chirale, les groupes de DNP peut fournir les interactions π - π , dipôle-dipôle, les effets stériques. Les interactions π - π est prévue entre les analytes aromatiques et ce type de PSC [12].

8. Effet de l'additif de phase mobile sur la séparation chirale

Li-Ming Yuan (2008) a étudié l'influence de la présence de l'heptakis (2,3,6-tri-O-methyl) β -cyclodextrine (TM- β -CD) dans la phase mobile sur l'énantioseparation. Trois phases stationnaires chirales comprenant la cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate), l'amylose (3,5-dimethylphenylcarbamate), avec de l'hexane/isopropanol (90 : 10) en tant que phase mobile. Parmi les composés chiraux utilisés, la Flavanone [13]. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III.8: Résolution dénantiomères de Flavanone sur les colonnes OD, AD et OD+AD avec le TM β - CD en tant qu'additif de phase mobile

	OD ^a	OD+T ^b	OD+10T ^c	OD ^d	AD ^e	AD+T ^f	AD ^g	AD+OD ^h	AD+OD+T ⁱ	AD+OD ^j
K'1	0.38	0.36	0.36	0.35	0.29	0.26	0.25	0.29	0.34	0.35
α	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

- Colonne OD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10.
- Colonne OD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10 + 1 mm TM- β -CD.
- Colonne OD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10 + 10 mm TM- β -CD.
- Colonne OD, phase mobile hexane/isopropanol 90:10 après utilisé le TM- β -CD en tant qu'additif de phase mobile, et rincé avec 100ml hexane/isopropanol).
- Colonne AD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10.
- Colonne AD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10 + 1 mm TM- β -CD.
- Colonne OD, phase mobile hexane/isopropanol 90:10 après utilisé le TM- β -CD en tant qu'additif de phase mobile, et rincé avec 100ml d'hexane/d'isopropanol).
- Colonne DO + AD, phase mobile hexane/isopropanol 90: 10.
- Colonne OD + AD, phase mobile hexane/isopropanol 90 : 10 + 1 mm TM- β -CD.
- Colonne OD + AD, phase mobile hexane/isopropanol 90:10 après utilisé le TM- β -CD en tant qu'additif de phase mobile, et rincé avec 100ml hexane/isopropanol) [14].

Il a conclu que la présence de TM- β -CD peut améliorer les capacités de discrimination chirales des phases stationnaires chirales pour quelques composés. C'est le résultat des interactions simultanées de l'énantiomère avec de la cyclodextrine et du 3,5-diméthylphénylcarbamate de cellulose et d'amylose. La combinaison de l'additif chirale et de la phase stationnaire chirale fournit un outil efficace pour la résolution chirale de quelques composés, mais pour la résolution des énantiomères de Flavanone il n'y a pas beaucoup d'influence de cet additif [13].

9. Séparation stéréoisomérique de quelques flavanones utilisant le succinate-substitué α -cyclophospho-octadécaoses en tant qu'additifs chiraux dans l'électrophorèse capillaire

Kwon et Jung (2011) ont isolé et le α -Cyclophospho-octadécaoses (α -C18) à partir de *Rhodobacter sphaeroides* et l'employé avec succès dans l'électrophorèse capillaire (CE) comme additif chirale pour la séparation de cinq flavanones et flavanone-7-O-glycosides, y compris la Narigénine, l'Hesperétine, l'Eriodictyol, le Homoeriodictyol, l'Isosakuranétine, et l'Hespéridine. Ils ont constaté que la séparation chirale réussie dépend de la présence des substituants succinate attachés au α -C18 en CE [15].

10. Influence de la composition de la phase mobile sur l'énantioséparation des Méthoxyflavanones avec la colonne préparée de CDMPC

Shao et al (2003) ont étudié l'influence de différents modificateurs alcooliques dans la phase mobile sur la séparation chirale de 4'-méthoxyflavanone, 5-méthoxyflavanone et 6-méthoxyflavanone, sur une colonne de cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (CDMPC), le mécanisme de discrimination chirale a été discuté. Le résultat est présenté sur le tableau ci-dessous [16].

Tableau III.9: Influence de différents modificateurs alcooliques dans la phase mobile sur la séparation chirale des méthoxyflavanones sur la colonne de CDMPC.

Modificateur alcoolique	4'-méthoxyflavanone			5-méthoxyflavanone			6-méthoxyflavanone		
	K' ₁	α	Rs	K' ₁	α	Rs	K' ₁	α	Rs
Ethanol	1.55	1.08	1.35	2.23	1.29	4.60	1.23	1.19	2.80

n-propanol	1.54	1.08	1.31	2.10	1.31	4.01	1.17	1.22	2.98
n-butanol	1.50	1.07	1.07	1.88	1.32	4.32	1.08	1.30	3.64
Iso-propanol	1.79	1.16	2.45	2.71	1.31	4.75	1.39	1.22	3.21
Sec-butanol	1.70	1.13	2.04	2.54	1.31	4.46	1.24	1.22	2.91
Tert-butanol	2.24	1.30	4.62	4.14	1.38	4.24	1.73	1.36	5.03

Conditions chromatographiques : phase stationnaire, CDMPC (dimension de colonne, 30 cm \times 0.4 cm; diamètre de particules de gel de silice, 5 μ m; diamètre de pore du gel de silice, 20 nm) ; phase mobile, hexane-alcool (la concentration du modificateur alcoolique en hexane, 1.31 mol/L) ; débit, 0.5 ml min⁻¹ ; la température, 30°C ; détection, 254 nm).

En utilisant l'hexane-tert-butanol (1.31 mol/L) comme phase mobile, ces trois méthoxyflavanones ont été excellemment séparées sur la colonne chirale de CDMPC. En comparant la résolution des trois flavanones, le 4'-méthoxyflavanone présente la faible résolution peut être due à la faible interaction π - π entre le cycle B et le cycle aromatique de CDMPC [16].

11. Séparation chirale de l'Hesperétine et d'Hespéretine-O-glycosides par électrophorèse capillaire en utilisant les β -1,2-Glucans microbiens (Cyclosophoraoses).

Les β -1,2-Glucans (Cys) isolés à partir des espèces de *Rhizobium* et *Agrobacterium* ont les diamètres internes de cavités semblables ou légèrement plus grands qu'à ceux des cyclodextrines. Eunae Cho et al (2009) ont étudié la séparation énantiomérique de l'Hespéretine, l'Hespéridine et la Neohespéridine en utilisant Les β -1,2-Glucans sous forme neutre ou anionique en tant qu'additif chiral en électrophorèse capillaire [17].

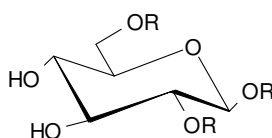


Figure III.6 : Structure de β -1,2-Glucans

L'Hespéridine présente la meilleure résolution avec ce sélecteur, alors que les énantiomères de la Neohespéridine ne peuvent pas être résolus, l'Hesperétine présente une résolution partielle [17]

12. Séparation chirale des hydroxyflavanones par électrophorèse capillaire de zone en utilisant les cyclodextrines sulfatées en tant que sélecteurs chiraux

La séparation chirale de trois hydroxyflavanones, y compris le 2'-, 3'-, et 4'-hydroxyflavanone, par électrophorèse capillaire de zone (ECZ) en utilisant le sulfate β -cyclodextrine aléatoirement substitué (S- β -CD) a été étudiée par Lin et al (2008). Les résultats indiquent que le S- β -CD est un excellent sélecteur chirale pour l'énantioséparation du 2'-hydroxyflavanone et un bon sélecteur chirale pour le 3'-hydroxyflavanone. Les énantiomères du 4'-hydroxyflavanone pourraient être effectivement séparés avec le S- β -CD à une concentration de 2.0% (poids/volume) dans un délai de 20 mn [18].

13. D'autres méthodes

Siles et al (1995) ont étudiés l'énantiosélectivité en phase normale et inverse de trois PSCs à base d'homopolypeptides (poly-L-lysine, poly- β -benzyl-L-aspartate et poly-L-tyrosine) pour sept dérivés de flavanone: Flavanone, 2'-Hydroxyflavanone, 4'-Hydroxyflavanone, 7-Méthoxyflavanone, 4'-Méthoxyflavanone, 5-Hydroxy-7-Méthoxyflavanone, 4',5-Dihydroxy-7-méthoxyflavanone. La deuxième PSC a présenté une meilleure résolution pour tous les composés dans les deux modes [19].

Le β -cyclodextrine, et le diméthyl- β -cyclodextrine et l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine sont utilisés en tant qu'additifs de phase mobile dans l'électrophorèse capillaire et résolve les épimères de la Naringine, Une colonne de Chiralpak IA pouvait également séparer la naringine directement en phase normale isocratique. Une étude plus récente a indiqué la séparation énantiomérique de la Naringine par électrophorèse capillaire en utilisant une variété des dérivés de cyclodextrine et démontré une meilleure résolution $R_s=4.85$ avec l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine. Une résolution complète a été obtenue avec le méthyl- γ -cyclodextrine ($R_s=3.81$), avec le carboxyméthyl- β -cyclodextrine ($R_s=2.26$) et sulphato- β -cyclodextrine ($R_s=3.63$) [6].

Dans une étude récente, l'Hespéridine a été séparée en utilisant la CLHP en phase normale La séparation de l'Hespéridine par l'électrophorèse capillaire en utilisant le sulphobutyl éther β -cyclodextrine, et le carboxyméthyl- β -cyclodextrine comme des sélecteurs chiraux a été également accomplie [6].

Z. Pirzada et al (2010) ont comparé la séparation chirale du Flavanone sur trois colonnes (Chiralcel OD-H, Chiralpak AD, et Chiralpak IC) dans les mêmes conditions : Phase mobile 4% MeOH avec 25mM IBA/CO₂. T= 35 °C, λ = 215 nm [20].

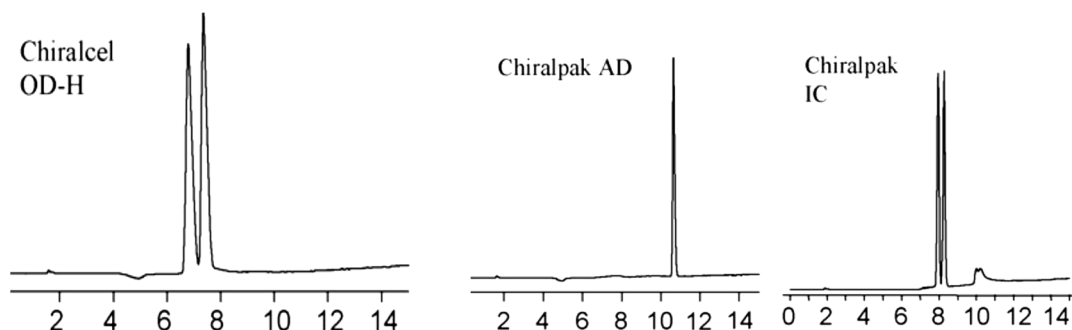


Figure III.7. Comparaison de l'énantioséparation de Flavanone sur les trois colonnes.

Chiralcel OD-H présente la meilleure résolution [20].

4. Racémisation et diastéromérisation des flavanones

La connaissance des barrières d'énantiomérisation et de diastéromérisation des stéréoisomères physiquement labiles est très importante en chimie médicinale et pour la détermination de la stabilité des médicaments chiraux. Cela peut aussi être utile en archéologie et géochimie comme outil de datation.

Entre autres techniques, divers modes de chromatographie sont des méthodes puissantes et précieuses pour la détermination des barrières d'énantiomérisation et de diastéromérisation.

La chromatographie dynamique et «stopped-flow» est la technique la plus utile principalement parce qu'ils ne nécessitent qu'une très faible quantité d'un mélange racémique [21].

La valeur attendue de la barrière de diastéromérisation détermine le choix de la méthode appropriée. Selon la littérature, la hplc dynamique est appropriée pour la détermination de barrière d'énantiomérisation de 60-120 kJ / mol, 70-150 kJ / mol peut être déterminée par la GC dynamique. Le «stopped-flow» GC peut être appliqué aux composés avec des barrières d'énantiomérisation de 70-180 kJ / mol et «stopped-flow» Electrophorèse capillaire de zone pour les barrières de 100-130 kJ / mol. Les méthodes dynamiques sont simples dans l'expérimentation. Malheureusement, ils nécessitent une très bonne séparation des énantiomères, ce qui est très souvent impossible à obtenir. Bien que la méthode de la chromatographie «stopped-flow» multidimensionnelle nécessite une opération sur deux colonnes: chiral (où l'énantioséparation est obtenue) et achiral (où le processus

d'énantiomérisation est effectuée), il est très pratique car l'influence de la phase stationnaire chirale sur les constantes de vitesse est éliminée [21-25].

3.1 Détermination des barrières de diastéréomérisation de l'hesperidine et de naringine par les méthodes CLHP [6]

La diastéréomérisation des deux flavanones glycosidées a été étudiée par la CLHP énantiosélective combinée avec la méthode cinétique classique. La constante d'énantiomérisation est calculée à partir de l'équation suivante :

$$k = \frac{1}{2t} \ln \frac{[A]_0 - [A]_{eq}}{[A]_t - [A]_{eq}} \quad (1)$$

$[A]_0$: concentration initiale de l'énantiomère décroissant, $[A]_t$: concentration de l'énantiomère décroissant au temps t, $[A]_{eq}$: concentration de l'énantiomère décroissant à l'équilibre.

La barrière d'énantiomérisation ΔG^\ddagger est calculé en utilisant l'équation d'Eyring [6,27]:

$$\Delta G^\ddagger = RT \ln \left(\frac{hk}{\kappa(k_B) T} \right) \quad (2)$$

Où T est la température d'énantiomérisation en Kelvin, R : constante de gaz universelle ($R = 8.31441 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), k_B constante de Boltzman ($k_B = 1.380662 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), h : la constante de Planck ($h = 6.626176 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), κ : coefficient de transmission ($\kappa = 0.5$).

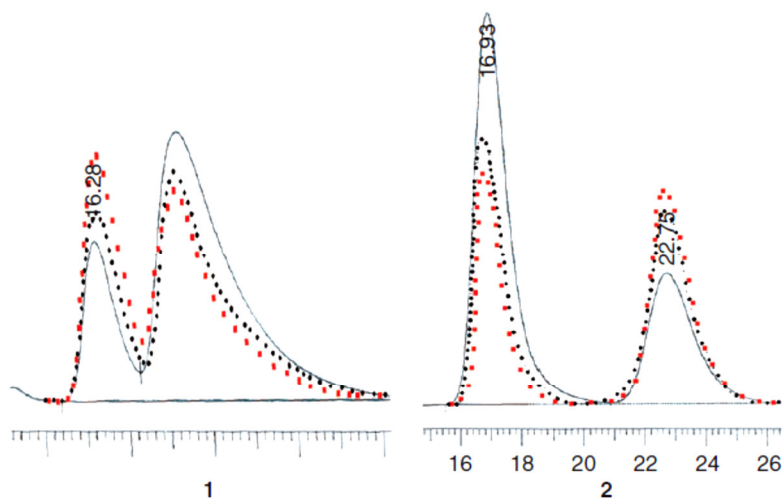


Figure III.8. Chromatogrammes de diastéréomérisation d'épimères d'hespéridine et de naringine dans le MeOH à 40 °C par la méthode de CLHP

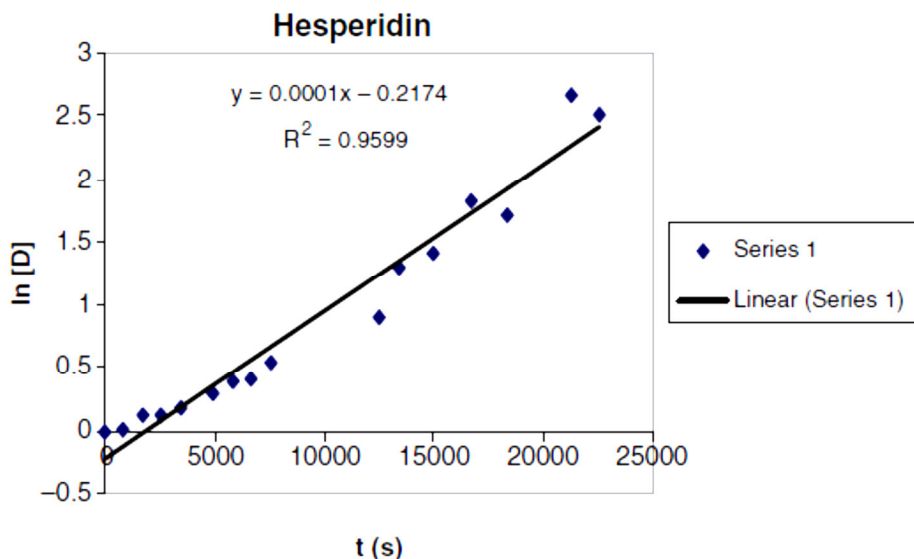


Figure III.9. Présentation graphique de $\ln [D] = f(t)$ pour l'hésperidine obtenu par CLHP

La présentation graphique de $\ln ([A]_0 - [A]_{eq}) / ([A]_t - [A]_{eq})$ en fonction du temps pour l'hésperidine et la Naringine sont présentés, respectivement, aux figures 6 et 7, et démontrent une relation linéaire selon l'équation (1). Les constantes de vitesse ont été déterminées à partir du tracé par régression linéaire.

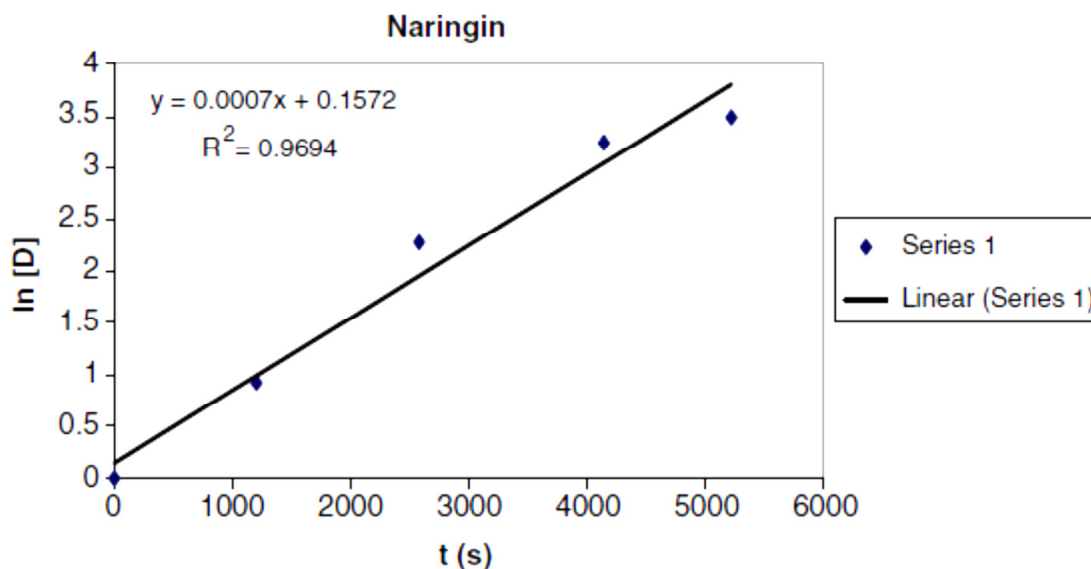


Figure III.10. Présentation graphique de $\ln [D] = f(t)$ pour la naringine obtenu par CLHP.

Dans cette méthode, la diastéromérisation est effectuée en dehors du système de séparation à une température et à un moment choisis. Ensuite, les échantillons sont analysés par CLHP énantiosélective à la température à laquelle la diastéromérisation est supprimée. Cette

méthode a été appliquée pour déterminer le taux Constant et l'énergie d'activation de Gibbs de diastéréomérisation de l'hespéridine et Naringine (tableau III.10).

Tableau III.10. Les constantes de vitesse et l'énergie d'activation de Gibbs de la réaction de diastéréomérisation de la naringine et l'hespéridine déterminées par les méthodes de CLHP.

Composé	Méthode	T(°C)	Solvant	k (s ⁻¹)	DG [#] (kJ mol ⁻¹)
Hesperidine	CLHP	40	MeOH:TEA (10 : 0.1)	10 ⁻⁴	84.00
	CLHP	60	MeOH	2.4 × 10 ⁻⁶	115.8
naringine	CLHP	40	MeOH	7 × 10 ⁻⁴	78.93
	D-CLHP	50	MeOH:H2O (10 : 90)	9.218 × 10 ⁻⁵	102.5
	D-CLHP	60	MeOH:H2O (10 : 90)	2.078 × 10 ⁻⁴	103.5

La solution à 0,27 mM de l'hespéridine et de naringine dans le méthanol (Ajouté 3 mmL de TEA) a été stocké à 40 ° C dans un thermostat. Tous les 24 h, les échantillons étaient prises et analysées directement par CLHP énantiosélective. En outre, c'était a prouvé qu'après quelques semaines de stockage des solutions à 40 ° C, le ratio 2R à 2S diastéréomère a atteint une valeur très proche de 1, ce qui conduit à la conclusion que, pour hespéridine aussi bien que pour la naringin, $k_{eq} \approx 1$.

Le graphe de $\ln ([A]_0 / [A]_{eq}) / ([A]_t / [A]_{eq})$ en fonction du temps pour l'hespéridine et la naringine présenté aux figures 9 et 10 démontre une relation linéaire selon l'équation (3).

En résumé, l'analyse par CLHP développé est stéréospécifique, reproductible et précis. Il a été appliqué avec succès à l'analyse chirale et à la quantification des diastéréomères des flavanones glucosidées.

3.2 Racémisation de l'hespéretine

La racémisation c'est la réaction qui permet le passage d'un composé chiral, optiquement actif, à un mélange racémique, inactif sur la lumière polarisée rectilignement [26]. La connaissance des barrières de racémisation, d'énantiomérisation et du diastéréomérisation des stéréoisomères configurationnellement labiles est importante dans la détermination de la stabilité des médicaments chiraux. Il peut également être utile en archéologie et géochimie comme outil de datation. La connaissance des taux constants de la réaction de diastéréomérisation des flavanones glycosides peut être pratiquement appliquée au

control de qualité de fraîcheur des jus d'agrumes. Les techniques chromatographiques sont les méthodes les plus puissantes pour la détermination des barrières d'énantiomérisation et de diastéromérisation. La chromatographie dynamique est la plus utile principalement parce qu'elles exigent seulement une quantité très petite de mélange racémique [27].

La valeur prévue de la barrière de racémisation détermine le choix de la méthode investigatrice appropriée. Selon la littérature, l'HPLC dynamique convient à la détermination de barrière d'énantiomérisation de 60-120 kJ/mol, 70-150 kJ/mol peut être déterminée par la CPG dynamique. Les méthodes dynamiques sont simples dans la partie expérimentale. Malheureusement elles exigent une séparation très bonne des énantiomères [6,27].

Des études sur l'augmentation de contenu de (2R) Naringine pendant la maturation du pamplemousse ont été éditées. M. Asztemborska et J. Zukowski ont rapporté la détermination des constantes et de barrières d'énergie d'activation de diastereomerisation de flavanones glycosides: la Naringine, le Narirutin, l'Hespéridine et la Néohespéridine, avec l'utilisation de l'HPLC dynamique et l'HPLC énantiosélective [6,27].

Le procédé de racémisation, qui est caractérisé par l'équilibre entre les deux énantiomères est facilité par la température, l'humidité, le solvant, le pH, et autres facteurs [28]. En outre, les flavanones avec un groupe hydroxyle libre dans la position 4' (par exemple la narigénine) se racémisent plus facilement que les flavanones avec un groupement méthoxyl sur cette position (l'Hespéretine par exemple) [29].

Dans la deuxième partie de notre travail expérimental nous avons étudiés la racémisation de l'hespéretine.

1. Choix des conditions appropriées pour l'étude de racémisation de l'Hespéretine

Les colonnes qui présentent la capacité de séparation des énantiomères de l'Hespéretine sont :

- Chiralpak AD, phase mobile : isopropanol, $R_s=0.719$, $t_{r1}=22.710$, $t_{r2}=23.901$, $\alpha=1.296$.
- Chiralcel OJ : phase mobile : n-hexane/ isopropanol, 80 :20, $R_s=0.798$, $t_{r1}=17.562$, $t_{r2}=21.069$, $\alpha=1.791$.
- Chiralpak IA: phase mobile : n-hexane/éthanol, 90 :10, $R_s=4.441$, $t_{r1}=32.254$, $t_{r2}=48.432$, $\alpha=3.302$.

On a choisi la Chiralcel OJ en raison du court temps de rétention. Pour améliorer la résolution on a varié la composition de la phase mobile, le résultat est présenté dans le tableau III.11.

Tableau III.11 : Résultat de séparation chirale de l'hespéretine en divers phases mobile par la colonne Chiralcel OJ.

Eluant	proportion	t_{r1}	t_{r2}	α	R_s
Propanol-2	100	17.626	-	-	-
Hexane/propanol-2	50:50	12.952	13.578	1.081	0.181
Hexane/propanol-2	70:30	21.103	22.642	1.116	0.824
Hexane/propanol-2	80:20	17.562	21.069	1.791	0.798
Hexane/propanol-2	95:05	36.147	37.905	1.057	0.645

D'après le résultat obtenu pour la séparation énantiomérique de l'hespéretine avec différentes composition de la phase mobile n-hexane/isopropanol, la meilleure valeur de résolution a été réalisée avec la proportion 70 :30 ($R_s=0.824$), avec des temps de rétention des deux énantiomères 21.103 min et 22.642 min respectivement.

2. Le procédé de racémisation

Notre système CLHP ne contient pas un four à colonne pour cela le procédé de racémisation de l'hespéretine se fait par chauffage de l'échantillon dans un tube à essai dans un bain marie avec la fixation de la température à 50°C dans un premier temps puis à 60°C.

On fixe la température de solution à 50°C pendant 30 min, dans la même température on a fait des injections successives tout les 30 min (après l'apparition des deux pics).

Le résultat est récapitulé dans le tableau suivant.

Tableau III.12 : Résultat chromatographique de l'étude de racémisation à 50°C de l'Hespéretine.

Temps (min)	t_{r1}	t_{r2}	α	R_s	A_1	A_2
0	23.239	24.976	1.098	0.867	68.2855	31.7145
30	23.713	25.587	1.178	1.019	66.2465	33.7535
60	23.852	25.662	1.207	0.806	69.0255	30.9745
90	23.809	25.595	1.204	0.712	65.8604	34.1396
120	23.383	25.174	1.174	0.989	66.3367	33.6633
150	22.981	24.726	1.174	0.991	66.4506	33.5494
180	22.917	24.555	1.200	1.143	69.4793	30.5207

D'après le tableau on remarque une faible variation dans la surface des pics des deux énantiomères, donc on constate que la racémisation de l'Hespéretine ne se fait pas facilement dans ces conditions.

On a réessayé avec la température de 60°C pendant deux heures le résultat est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.13 : Résultat chromatographique de l'étude de racémisation à 60°C de l'Hespéretine.

Temps (min)	t_{r1}	t_{r2}	α	R_s	A_1	A_2
0	25.611	27.489	1.093	0.931	66.934	33.066
30	24.917	26.778	1.095	0.976	69.3308	30.6692
60	25.299	27.203	1.096	0.962	66.7352	33.2648
90	25.225	27.098	1.094	0.930	66.0189	33.9811
120	25.289	27.115	1.092	0.890	66.1648	33.8352

De la même manière comme à la température 50°C il n'y a pas de variation considérable dans la composition des deux énantiomères, donc peut-être la barrière de rotation des énantiomères est très élevée ce qui exige une grande énergie, on ne peut pas la fournir par cette méthode, ou peut-être le problème est dans le choix de solvant, soit la racémisation exige

un PH acide. En conséquence l'Hespéretine est stable dans la température de 60°C et dans le méthanol, donc on peut constater que l'énantiomère S (le plus dominant) est le responsable à l'activité biologique et pharmacologique de l'Hespéretine.

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons résumé les techniques chromatographiques et électrophorétiques et les informations nécessaires à la compréhension de mécanisme de discrimination chirale des différents sélecteurs chiraux utilisés dans ces études.

Les dérivés de polysaccharides sont l'un des agents chiraux les plus utilisés en chromatographie pour la séparation des énantiomères de flavanones, bien que d'autres sélecteurs, comme ceux basés sur la cyclodextrine, aient trouvés beaucoup de domaines d'application [30]. Cependant, la séparation a été seulement réalisée avec un choix limité de phases stationnaires chirales.

En ce qui concerne l'étude de racémisation, l'hespéretine n'a montré aucune possibilité de racémisation sur la colonne Chiralcel OJ à la température 50°C et 60 °C. Des expériences supplémentaires sont encore nécessaires, notamment en ce qui concerne l'application des méthodologies analytiques développées. Il serait intéressant de :

- Appliquer le mode gradient d'élution Pour lequel on fait varier la composition du solvant en cours d'analyse en vue d'améliorer les séparations et surtout de raccourcir les temps d'analyse.
- Varier la température de la colonne par l'ajout d'un four à colonne au système afin d'améliorer les résolutions et diminuer les temps d'analyse et pour faciliter l'étude de racémisation par CLHP dynamique.

Références bibliographiques

- [1] S. Caccamese , C. Caruso, N. Parrinello, A. Savarino (2005) High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones, *Journal of Chromatography A*. 1076:155–162.
- [2] M. Uehara (2006) Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. Hesperidin and bone metabolism, *Clin. Calcium*. 16:1669 - 1676.
- [3] O. L. Radu, S. Armand, F. Lenouvel, H. Driguez, A. Cimpean et D. Iordachescu (2006) La glycolisation de la lutéoline en milieux de solvants organiques par l'action catalytique de la cyclodextrine glycosyltransférase de *Bacillus circulans*, *Revue Roumaine de Chimie*. 51(2):147–152.
- [4] S. S. Ibrahim (2008) Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, on Diabetes-Induced Brain Damage in Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(1): 84-95.
- [5] E. K. Susłow, J. D. Gładysz, A. Białonska, Z. Ciunik (2006) Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. *Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39:18–23.
- [6] N. Belboukhari, A. Cheriti, C. Roussel and N. Vanthuyne (2010) Chiral separation of hesperidin and naringin and its analysis in a butanol extract of *Launaea arborescens*, *Natural Product Research*. 24(7) 669–681.
- [7] K. S. Ahmed, F. Tazerouti, A. Y. B-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D. Orazio, A. Rocca, S. Fanali (2010) Optical isomer separation of flavanones and flavanone glycosides by nano-liquid chromatography using a phenyl-carbamate-propyl-cyclodextrin chiral stationary phase, *Journal of Chromatography A*. 1217:1175–1182.
- [8] J. Pan , S. Zhang , L. Yan , J. Tai , Q. Xiao , K. Zoue, Y. Zhoue, J. Wu (2008) Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucreta* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column, *Journal of Chromatography A*, 1185:117–129.

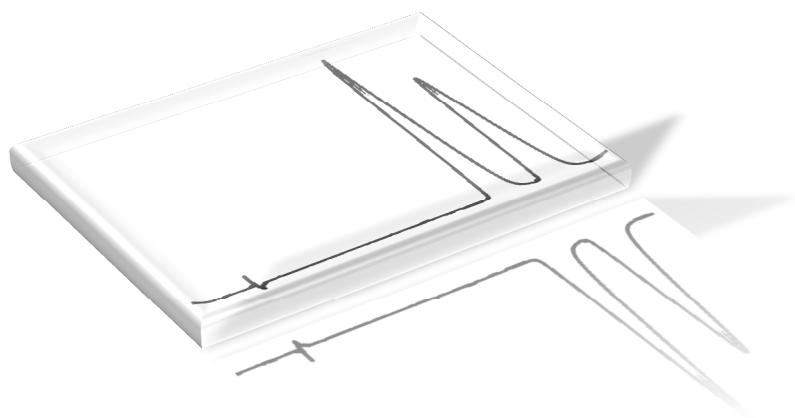
- [9] Y. Liu, H. Zou (2008) High-performance liquid chromatographic evaluation of a coated cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase having a small-pore silica support, *Journal of Chromatography A*. 1178 :118–125.
- [10] R. Cirilli , R. Ferretti, E. De Santis, B. Gallinella, L. Zanitti, F. L. Torre (2008) High-performance liquid chromatography separation of enantiomers of flavanone and 2'-hydroxychalcone under reversed-phase conditions, *Journal of Chromatography A*. 1190:95–101.
- [11] Y. F. Poon, I. W. Muderawan, S. Choon Ng (2006) Synthesis and application of mono-2A-azido-2A-deoxyperphenylcarbamoylated β -cyclodextrin and mono-2A-azido-2A-deoxyperacetylated β cyclodextrin as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1101:185–197.
- [12] Q. Zhong, L. He, T. E. Beesley , W. S. Trahanovsky , P. Sunc, C. Wang , D. W. Armstrong (2006) Development of dinitrophenylated cyclodextrin derivatives for enhanced enantiomeric separations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1115:19–45.
- [13] L. M. Yuan (2008) Effect of mobile phase additive on chiral separation, *Separation and Purification, Technology*. 63:701–705.
- [14] C. Bock, K.H. Waldmann, W. Ternes (2008) Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract *Nutrition Research* 28:879–891.
- [15] Chanhon Kwon, Seunho Jung (2011) Stereoisomeric separation of some flavanones using highly succinate-substituted α -cyclodextrin derivatives as chiral additives in capillary electrophoresis. *Carbohydrate Research* 346: 133–139.
- [16] B. H. Shao, X. Z. Xu, J. D. Lu, L. Zou, X. Y. Fu (2003) Influence of Mobile Phase Composition on the Enantioseparation of Methoxyl Flavanones with Self-prepared CDMPC Column and Chiral Recognition Mechanism. *Chinese Chemical Letters*. 14: 401 - 403.
- [17] E. Cho, Y. Jeon, and S. Jung. (2009) Chiral Separation of Hesperetin and Hesperetin-O-glycoside in Capillary Electrophoresis Using Microbial β -1,2-Glucans. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30(8): 1870-1872.

-
- [18] C. H. Lin, W. R. Fang, C. M. Kuo, W.Y. Chang, Y. C. Liu, W. Y. Lin, J. C. Wu, C. E. Lin (2008) Chiral separation of hydroxyflavanones in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis using sulfated cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A.* 1188:301–307.
- [19] B. A. Siles, H. B. Halsall, J. G. Dorsey (1995) Retention and selectivity of flavanones on homopolypeptidebonded stationary phases in both normal- and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 704:289-305.
- [20] Z. Pirzada, M. Personick, M. Biba, X. Gong, L. Zhou, W. Schafera, C. Roussel, C.J. Welch (2010) Systematic evaluation of new chiral stationary phases for supercritical fluid chromatography using a standard racemate library. *J. Chromatogr. A.* 1217:1134–1138.
- [21] M. Asztemborska, J. Zukowski(2006) Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods, *J. Chromatogr. A*, 1134 : 95–100.
- [22] P. Oswald (2002) Determination of the enantiomerization energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 779 : 283–295.
- [23] O. Trapp, G. Schoetz, And V. Schurig (2001) Determination of Enantiomerization Barriers by Dynamic and Stopped-Flow Chromatographic Methods, *Chirality* 13:403–414.
- [24] O. Trapp (2006) Fast and Precise Access to Enantiomerization Rate Constants in Dynamic Chromatography, *Chirality* 18:489–497.
- [25] P. Shahgaldian, U. Pielas (2006) Cyclodextrin Derivatives as Chiral Supramolecular Receptors for Enantioselective Sensing, *Sensors*, 6: 593-615
- [26] R. Milcent (2007) Chimie organique, Stéréochimie, entités réactives et réactions. EDP Sciences. France, pp 88, 89.
- [27] M. Asztemborska, J. Zukowski (2006) Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods, *Journal of Chromatography A*, 1134:95–100.

- [28] M. Cattania, J.M.F. Bassalo (2006) Racemization, chiral stability and weak interactions, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 102:441–449.
- [29] J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies (2007) Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *J. Chromatogr. B* 848:159–181.
- [30] T. Zhang , D. Nguyen, P. Franco (2008) Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases, *Journal of Chromatography A*. 1191:214–222.

Chapitre IV:

Etude comparative de la séparation chiral des dérivés flavanone



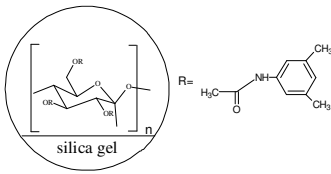
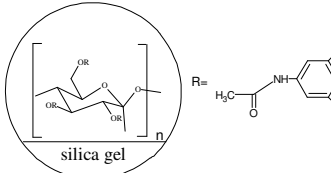
I. Introduction

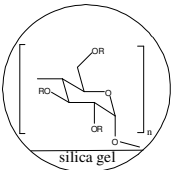
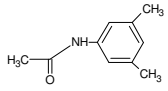
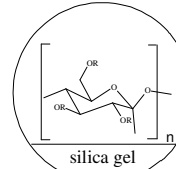
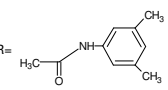
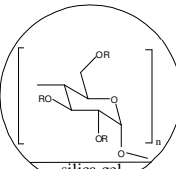
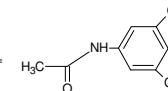
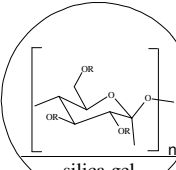
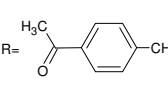
Le but de notre travail expérimental est d'étudier la séparation des énantiomères et de diastéréoisomères de quelques dérivés de flavanone par CLHP, et d'optimiser tous les conditions analytiques en utilisant les PSCs à base de polysaccharides en deux modes chromatographiques : en phase normal et en phase organique polaire. Nous présenterons ainsi dans ce chapitre les résultats de séparation chirale des iminoflavanones réalisés précédemment dans notre laboratoire, ainsi les études faites sur les analogues hétérocyclique aza et thio-flavanones. Ceci sera suivi par l'étude comparative entre les résultats de séparation chirale des flavanones et iminoflavanones dans les mêmes conditions.

II. Etude de la séparation chirale des flavanones sur différentes PSCs

Dans notre travail nous avons étudié la séparation des énantiomères et des diastéréoisomères de treize flavanones, la flavanone non substituée, huit flavanones mono substituées, dont quatre hydroxyflavanones et quatre méthoxyflavanones, deux flavanones glycosides (Hespéridine et Naringine) et leurs aglycones (Hespéretine et Naringénine) respectivement par CLHP chirale en utilisant six colonnes chirales à base de polysaccharides (cellulose et amylose), (tableau V.4). Les structures des composés étudiés avec leurs caractéristiques sont représentées au tableau II.2 (chapitre II).

Tableau IV.1 : Les caractéristiques des phases stationnaires chirales utilisées.

Colonne	Structure	Nom	Diamètre (µm)	Type
Chiralcel® OD		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	10	déposée
Chiralcel® OD-H		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	5	déposée

Chiralpak® IA			Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	5	Immobilisée
Chiralpak® IB			Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	5	Immobilisée
Chiralpak® AD			Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	10	déposée
Chiralcel® OJ			Cellulose tris-(4-methylbenzoate)	10	déposée

1. Appareillage

Les études sont réalisées sur un poste de CLHP Shimadzu® 20 A (décrit dans le chapitre III).

Les différents modules qui composent cette installation sont :

- Une pompe Shimadzu® LC 20 AD (Kyoto, Japan).
- Un dégazeur Shimadzu® DGU 20 A₅ (Kyoto, Japan).
- Un système d'injection manuel, vanne d'injection Rheodyne 1907 à boucle de 20 µL.
- Seringue d'injection Hamilton 25 µL.
- Un détecteur UV Shimadzu® SPD-20 A (Kyoto, Japan), ($\lambda = 254$ nm pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule 12 µL.
- Un système de commande et de contrôle (Shimadzu® CBM-20Alite) qui permet de gérer les différents modules.

- Un logiciel d'exploitation (Shimadzu® LC solution) pour enregistrer et traiter les chromatogrammes.
- Les phases mobiles sont préalablement filtrés (verre fritté 0,45 μm) et dégazés aux ultrasons puis par le dégazeur. Toutes les colonnes sont utilisées à une température ambiante.

2. Solvants et échantillons

Les solvants utilisés étaient de qualité HPLC, le n-heptane de Reidel-deHaën (seelze, Allemagne), isopropanol de MERCK KGaA (darrnstadt Allemagne), n-hexane, méthanol et l'éthanol du Sigma-Aldrich (Seelze, Allemagne). Les flavanones choisies (naringénine, flavanone, 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone, 6-hydroxyflavanone, 7-hydroxyflavanone, 4'-méthoxyflavanone, 5-méthoxyflavanone, 6-méthoxyflavanone et 7-méthoxyflavanone) sont obtenus chez Sigma-Aldrich (St Louis, MOIS, USA), la naringine et l'héspéridine sont fournis par ACROS ORGANICS (New Jersey, USA), l'héspéretine est obtenu par l'hydrolyse acide de l'héspéridine, les solutions de chaque flavanone (1 mg/ml) ont été préparées dans le méthanol.

3. Les phases stationnaires chirales

Les colonnes utilisées sont : Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralcel O-DH, Chiralcel OD et Chiralcel OJ, ont été obtenus à partir de Chiral Technologies Europe (Illkirch Cedex, France). Chiralpak AD, Chiralcel OD-H et Chiralcel OD sont constituées de tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) de l'amylose et de cellulose déposée sur la surface de gel de silice, Chiralpak IA et Chiralpak IB sont immobilisés sur la silice et sont basés sur le tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) de l'amylose et de cellulose respectivement, Chiralcel OJ est basé sur la cellulose (4-méthylbenzoate) déposée sur la silice. La Chiralpak IB est semblable au chiralcel OD-H (même sélecteur chirale et même diamètre de particules de gel de silice), mais le polysaccharide est immobilisé sur le gel de silice. Les dimensions des colonnes sont 250mm×4.6mm et les diamètres particuliers sont 5 μm pour le Chiralcel OD-H, Chiralpak IA, Chiralpak IB, et 10 μm pour les autres colonnes.



Figure IV.1. Les colonnes chirales utilisées

(Chiralcel OD et OD-H, Chiralpak IA, IB et AD, la Chiralcel OJ est installée sur l'appareil de CLHP).

4. Méthodologie de travail

a. Sélection de la phase mobile

Le choix de la phase mobile est l'aspect clé dans la résolution chirale par CLHP.

1. Le choix de la phase mobile dépend des propriétés du composé racémique.
2. On devrait choisir la phase mobile où le composé racémique est soluble.
3. La corrélation des conditions de séparation avec la nature des analytes neutres, acides, ou basiques (tableau IV.2).

Tableau IV.2: La corrélation des conditions de séparation des composés neutres, acides, et basiques pour les phases stationnaires chirales basé en polysaccharides [1].

Nature de composé	Phase normale	Phase inverse
Neutre	iPrOH/hexane ^a	Eau/Ac
Acide	iPrOH /hexane/TFA, pH proche à 2	Acide/Ac
Basique	iPrOH /hexane/DEA, pH proche à 2	Tompon pH< 7/Ac

a. Pour les composés neutres le PH n'affecte pas la résolution.

iPrOH, isopropanol; Ac, acetonitrile; TFA, trifluoro acide acetique; et DEA, diethylamine.

Le pH de la phase mobile peut influencer la séparation des analytes ionisable. Les flavanones étudiées ici sont neutres, à l'exception de l'Hespéredine et de Naringine et leurs aglycones qui montrent une acidité faible, due aux groupements hydroxyle multiples présentent en leurs structures chimiques. Par conséquent, le pH n'a pas pu influencer de manière significative l'énantiosélectivité des composés analysés.

b. Conditions chromatographiques

1. On laisse l'appareil de CLHP marcher pendant environ 60 minutes ou jusqu'à la stabilisation de la ligne de base au débit sélectionné pour chaque phase mobile. (0.2 ml/min pour l'isopropanol, 0.5ml/min pour l'éthanol 0.5-0.6 ml/min pour le mélange alcool/alcane)
2. On injecte un volume approprié (20 μ l) de la solution du composé à étudié.
3. On attend jusqu'à ce que les chromatogrammes soient apparus et observer la résolution chirale.

c. Optimisation des conditions

Pour réaliser la résolution chirale maximale, le choix de PSC approprié et la phase mobile est très important. En outre, les paramètres instrumentaux devraient être soigneusement adaptés.

1. Si aucune résolution chirale ne se produisait, alors on change la phase mobile ou la phase stationnaire (PSC).
2. En cas de problème de détection, on varie la longueur d'onde et on augmente la concentration de l'échantillon.
3. Si la résolution chirale est partielle on utilise les solutions suivantes: (i) modification de la phase mobile; (ii) diminution de débit; (iii) diminution de la concentration de l'échantillon ; ou (iv) Les trois au même temps.
4. Si les chromatogrammes apparaissent hors de l'échelle, alors on diminue la concentration de l'échantillon.
5. Si l'élution est tardive : (i) on augmente le débit, mais ce ne doit pas être augmenté plus que la limite recommandée (pour ne dépasse pas la pression maximale); (ii) on augmente la polarité de la phase mobile ; ou (iii) les deux au même temps.
6. Si les pics sont larges : (i) on augmente le débit (ii) augmentation de la polarité de la phase mobile ; ou (iii) les deux [1].

d. Identification des énantiomères

Les énantiomères résolus sont identifiés en comparant leurs temps de rétention à ceux des différents énantiomères optiquement purs dans les conditions identiques. Si les énantiomères actifs optiquement purs ne sont pas disponibles, alors l'identification des énantiomères résolus devrait être effectuée par le détecteur optique (dichroïsme circulaire) [1].

Dans notre étude l'identification des énantiomères n'est pas nécessaire puisque les composés analysés sont des composés purs donc les deux pics apparus sont nécessairement correspond aux deux énantiomères, ce qui nous intéresse c'est l'optimisation des conditions de séparation et l'analyse quantitative.

e. Calculs des facteurs chromatographiques

Après réalisation de la résolution chirale complète, le calcul des facteurs chromatographiques est très essentiel. Les facteurs les plus importants à calculer sont le facteur de rétention (k'), le facteur de séparation (α), et le facteur de résolution (R_s) et les surfaces des pics pour les énantiomères résolus. Les valeurs de ces paramètres peuvent être calculées par logiciel d'exploitation (Shimadzu® LC solution).

5. Résultat et discussion

1. l'étude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool)

L'énantiosélectivité de six PSCs a été premièrement étudié en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles polaires (100% alcool) dans les conditions chromatographiques décrites dans le **tableau IV.3**.

Tableau IV.3 : Conditions chromatographiques de séparation à phase organique polaire.

Phase stationnaire	Phase mobile	Débit (mL/min)	Volume d'injection (μ L)	Température ($^{\circ}$ C)	Longueur d'onde de détection (nm)
Ethanol 100%	Chiralpak IA	0.5	20	25	254 280 pour l'Hespéridine, l'Hespéretine et Naringine.
Isopropanol	Autres colonnes	0.2	20	25	254 280 pour l'Hespéridine, l'Hespéretine et Naringine.

Le tableau IV.4 illustre le résultat chromatographique obtenu par CLHP sous ces conditions.

Tableau IV.4 : Résultat chromatographique en phase organique polaire.

Colonne		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Chiralcel® OD	<i>Rs</i>	-	1.128	-	2.397	2.290	-	-	2.626	2.709	2.365	2.331	2.469	4.771
	<i>tr</i> ₁	22.411	17.394	-	18.648	18.467	-	21.997	19.654	19.614	18.088	18.693	31.986	31.754
	<i>tr</i> ₂	-	18.831	-	21.078	20.831	-	-	22.617	22.936	20.276	21.077	35.892	40.181
	<i>α</i>	-	2.134	-	1.519	1.337	-	-	1.356	1.361	1.329	1.294	1.266	1.587
	<i>A</i> ₁	-	-	-	46.306	50.081	-	-	49.585	52.892	49.515	54.778	43.376	50.226
	<i>A</i> ₂	-	-	-	46.337	48.706	-	-	50.243	46.792	49.383	47.757	40.624	46.715
Chiralcel® OD-H	<i>Rs</i>	-	-	-	-	3.516	-	-	1.741	1.226	2.073	3.479	2.754	4.861
	<i>tr</i> ₁	25.491	17.259	16.955	19.111	32.736	19.404	23.221	24.172	21.667	38.097	30.117	36.830	35.442
	<i>tr</i> ₂	-	-	-	-	37.725	-	-	26.621	23.019	41.597	34.984	41.354	43.999
	<i>α</i>	-	-	-	-	1.289	-	-	1.156	1.226	1.156	1.236	1.214	1.457
	<i>A</i> ₁	-	-	-	-	50.081	-	-	49.819	47.496	49.664	47.182	47.131	51.392
	<i>A</i> ₂	-	-	-	-	48.706	-	-	49.137	52.061	48.510	52.851	52.444	49.788
Chiralcel® OJ	<i>Rs</i>	-	-	-	-	-	2.544	-	-	-	-	2.468	-	-
	<i>tr</i> ₁	17.626	27.064	15.575	20.210	21.128	21.074	30.658	21.037	21.145	-	8.635	37.911	39.751
	<i>tr</i> ₂	-	-	-	-	-	26.556	-	-	-	-	15.484	-	-
	<i>α</i>	-	-	-	-	-	1.873	-	-	-	-	2.257	-	-
	<i>A</i> ₁	-	-	-	-	-	65.679	-	-	-	-	47.172	-	-
	<i>A</i> ₂	-	-	-	-	-	33.838	-	-	-	-	52.841	-	-
Chiralpak® IA	<i>Rs</i>	-	-	-	4.061	-	3.891	6.938	-	4.174	17.929	2.327	11.950	-
	<i>tr</i> ₁	8.153	6.418	6.536	6.294	12.445	4.842	10.083	10.872	8.533	17.656	11.357	18.590	6.345
	<i>tr</i> ₂	-	-	-	8.177	-	5.905	13.938	-	10.867	38.231	12.514	36.419	-
	<i>α</i>	-	-	-	1.495	-	1.391	2.028	-	2.095	2.403	1.240	2.457	-
	<i>A</i> ₁	-	-	-	45.429	-	49.741	51.118	-	51.440	51.834	47.387	49.479	-
	<i>A</i> ₂	-	-	-	54.57	-	50.210	47.420	-	48.557	48.025	47.974	49.031	-
Chiralpak® IB	<i>Rs</i>	0.472	-	2.125	-	1.924	-	3.099	-	-	0.752	2.999	1.687	-
	<i>tr</i> ₁	23.723	17.775	25.734	19.378	26.263	18.74	28.124	20.877	20.959	29.141	30.117	27.950	21.218
	<i>tr</i> ₂	24.622	-	31.809	-	28.356	-	31.823	-	-	30.069	34.984	29.818	-
	<i>α</i>	1.123	-	1.654	-	0.737	-	1.318	-	-	1.074	1.236	1.161	-
	<i>A</i> ₁	19.956	-	61.165	-	49.250	-	-	-	-	-	45.965	48.761	-
	<i>A</i> ₂	79.325	-	38.523	-	49.897	-	-	-	-	-	45.597	44.409	-
Chiralpak® AD	<i>Rs</i>	0.719	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.147	0.746	0.779
	<i>tr</i> ₁	22.710	16.418	16.401	18.483	25.495	18.793	22.123	18.275	18.236	29.315	26.763	32.547	30.243
	<i>tr</i> ₂	23.901	-	-	18.791	-	-	-	18.746	-	-	29.565	33.749	31.366
	<i>α</i>	1.296	-	-	1.043	-	-	-	1.084	-	-	1.170	1.072	1.135
	<i>A</i> ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48.769	43.854
	<i>A</i> ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54.541	47.534

(1) Hespéretine, (2) Hespéridine, (3) Naringine, (4) Naringénine, (5) Flavanone, (6) 2'-Hydroxyflavanone, (7) 4'-Hydroxyflavanone, (8) 6-Hydroxyflavanone, (9) 7-Hydroxyflavanone, (10) 4'-Méthoxyflavanone, (11) 5-Méthoxyflavanone, (12) 6-Méthoxyflavanone, (13) 7-Méthoxyflavanone.

Rs, facteur de résolution; *tr*₁, temps de rétention de 1^{er} énantiomère élué; *tr*₂, temps de rétention de 2^{ème} énantiomère élué; *α*, facteur de séparation; *A*₁, surface de 1^{er} pic; *A*₂, surface de 2^{ème} pic.

Pour la colonne Chiralcel OD et Chiralcel OD-H, la séparation de flavanone non substituée et de tous les méthoxyflavanones a été effectuée avec une bonne résolution (1.74-4.86). Concernant les composés qui contiennent des groupements hydroxyle dans le cycle B, la séparation n'a été pas effectuée, peut être due à la formation de liaisons hydrogènes intra moléculaire ce qui empêche la séparation (Figure VI.2), à l'exception de l'Hespéridine qui présente une résolution relativement faible ($R_s=1.128$). les valeurs de résolution et de sélectivité sont très proche entre les deux colonne puis ce qu'il sont différenciées seulement par le diamètre des particules de gel de silice, donc dans ce cas l'influence de diamètre de particules de support de phase stationnaire sur la séparation énantiomérique est relativement faible, cependant, on observe une augmentation légère dans les valeurs de résolution.

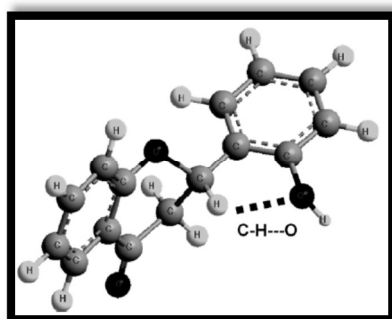


Figure IV.2. Structure énantiomérique de 2'-hydroxyflavanone indique la présence de liaison hydrogène intramoléculaire [2].

En comparant les résultats obtenus par la Chiralcel OD-H et la Chiralpak IB qui sont constitués de même sélecteur chirale, mais sont distinguées par la nature de liaison avec le gel de silice, on observe une diminution remarquable dans la résolution des énantiomères séparés par la Chiralpak IB, donc l'immobilisation de sélecteur chirale sur le gel de silice a diminué leur capacité de discrimination chirale [3, 4].

Les diastéréo-isomères de naringine sont séparés par la Chiralpak IB avec une résolution de 2.125, alors que la séparation énantiomérique de leur aglycone (la naringénine) a été effectuée seulement par la Chiralpak IA avec une résolution de 4.061.

Généralement, les temps de rétention des énantiomères séparés pour les composés hydroxylés est plus court que pour les composés méthoxylés.

La différence dans la capacité de discrimination chirale peut être due aux différents volumes de la cannelure hélicoïdale du dérivé de cellulose (OD-H) et du dérivé d'amylose

(AD), parce qu'il est bien connu que les phases d'amylose possèdent une forme spirale plus large et plus compacte.

L'amylose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) immobilisé sur le gel de silice présente la meilleure énantiosélectivité vis-à-vis la majorité des flavanones étudiées avec un temps de rétention plus court peut être due à la polarité de l'éthanol.

La Chiralcel OJ ne peut séparer que les énantiomères de 2'-hydroxyflavanone et de 5-méthoxyflavanone peut être due à la position non favorable des groupes de substituants sur la structure des analytes qui n'a pas mené des interactions fortes avec la cellulose (4-méthylbenzoate).

La séparation des diastéréo-isomères de l'Hespéridine et de Naringine n'est pas réussie sur ces phases stationnaires chirales dans ces conditions, sachant que les deux flavanones sont les composés les plus polaires parmi toutes les flavanones étudiées, donc peut être la diminution de la polarité de la phase mobile va améliorer la qualité de séparation.

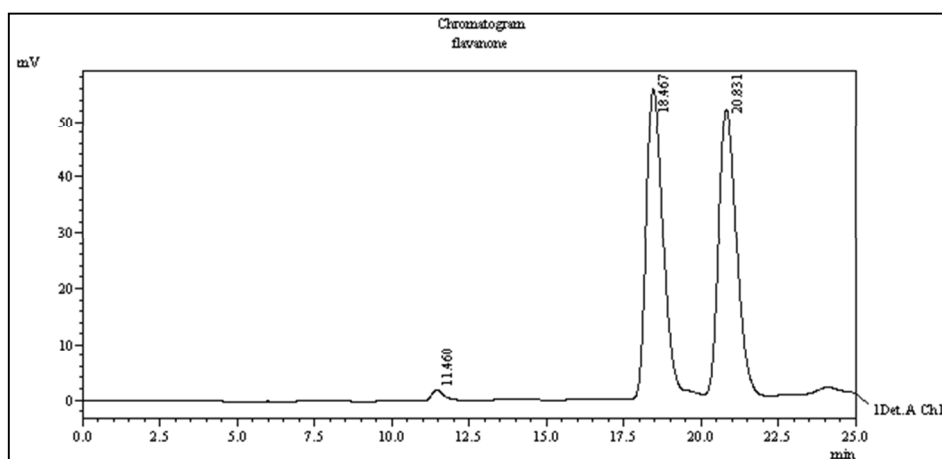


Figure IV.3. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de flavanone sur la colonne Chiralcel OD.

Phase mobile : isopropanol, débit : 0.2ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=1.337$, $R_s= 2.290$.

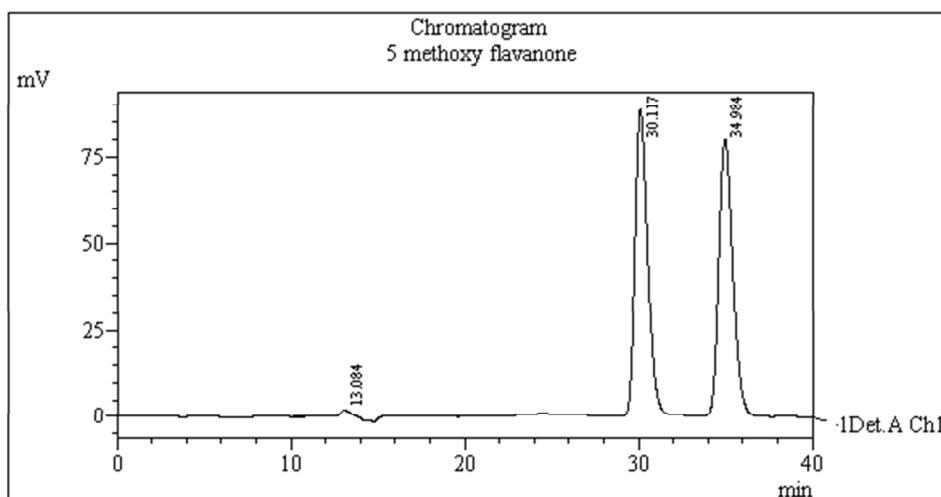


Figure IV.4. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 5-méthoxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD-H.

Phase mobile : isopropanol, débit : 0.2ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=1.286$, $R_s= 3.479$.

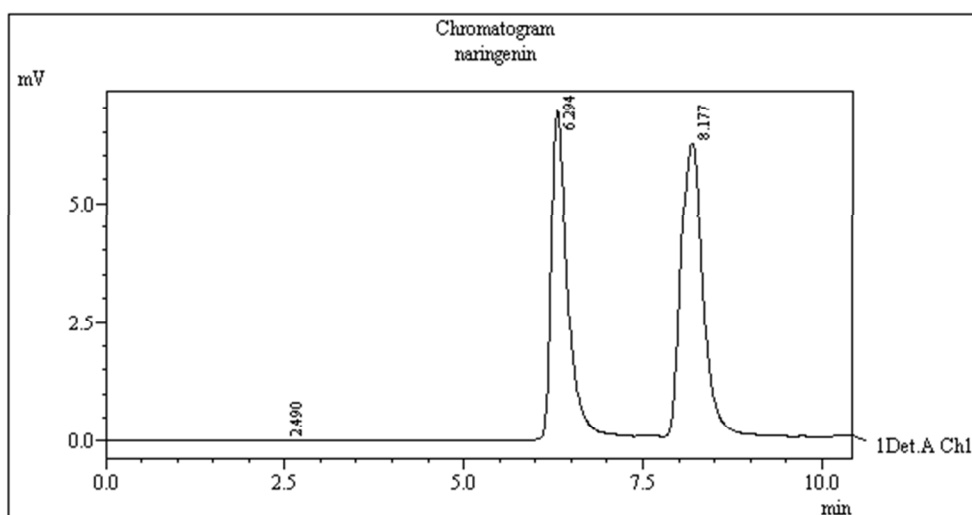


Figure IV.5. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de Naringénine sur la colonne Chiralpak IA.

Phase mobile : éthanol, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm,

T : 25°C, $\alpha=1.459$, $R_s= 4.061$.

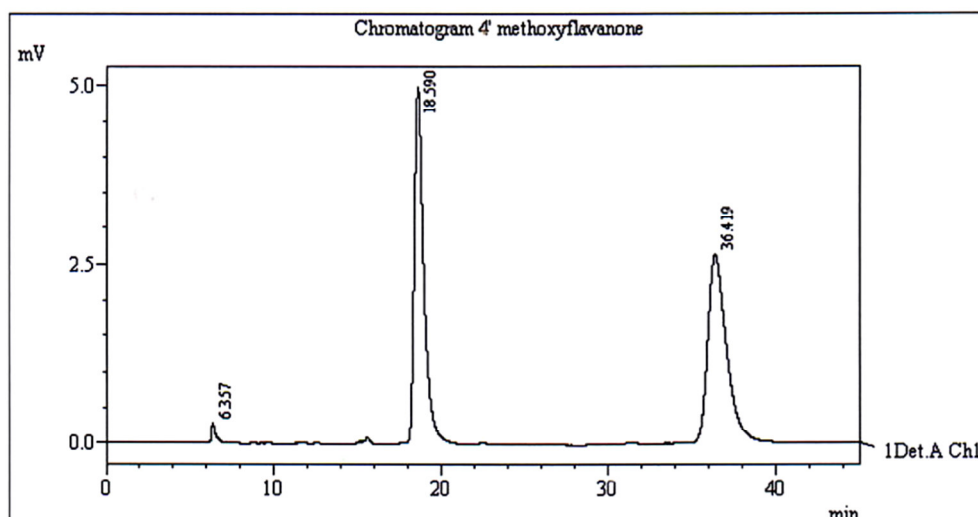


Figure IV.6. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4'-méthoxyflavanone sur la colonne Chiralpak IA.

Phase mobile : éthanol, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=2.457$, $R_s= 11.950$.

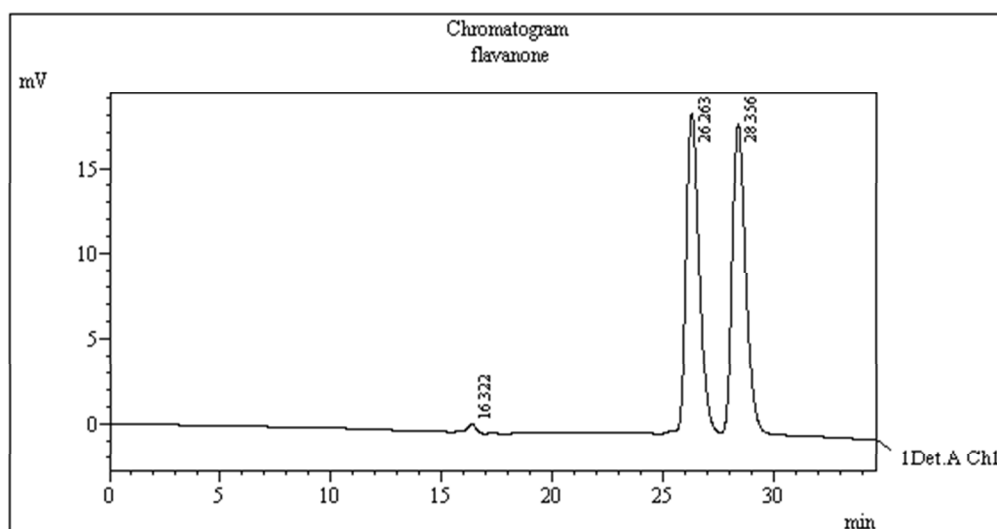


Figure IV.7. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de Flavanone sur la colonne Chiralpak IB.

Phase mobile : Isopropanol, débit : 0.2ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=1.210$, $R_s= 1.924$.

2. l'étude de la séparation en mode de phase normale

Les treize composés choisis ont été analysés par les six PSCs avec de diverses phases mobiles n-alcane/alcool dans les conditions chromatographiques décrites dans le **tableau IV.5**.

Tableau IV.5 : Conditions chromatographiques de séparation à phase normal

Phase mobile	Débit (mL/min)	Volume d'injection (μ L)	Température ($^{\circ}$ C)	Longueur d'onde de détection (nm)
Hexane/Ethanol	0.6	20	25	254 280 pour l'Hespéridine, l'Hespéretine et Naringine.
Hexane/ Isopropanol	0.5	20	25	254 280 pour l'Hespéridine, l'Hespéretine et Naringine.
Heptane/isopropanol	0.5	20	25	

Les résultats sont représentés dans le **tableau VI.6**.

Tableau IV.6 : Séparation chirale des flavanones en différentes compositions de la phase mobile dans les conditions à phase normale.

Composé	PSC	éluant (alcool %)	débit	t_{r1}	t_{r2}	R_s	α
1	Chiralcel [®] OD	20 ^c	0.5	32.722	34.677	0.01	1.078
1	Chiralcel [®] OD-H	30 ^a	0.5	22.217	23.518	0.517	1.086
1	Chiralcel [®] OJ	30 ^a	0.5	21.103	22.642	0.824	1.116
1	Chiralpak [®] IA	10 ^a	0.6	32.254	48.432	4.441	3.302
2	Chiralcel [®] OD-H	50 ^a	0.5	6.993	-	-	-
2	Chiralcel [®] OJ	100 ^a	0.2	27.064	-	-	-
2	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	6.045	-	-	-
2	Chiralpak [®] IA	50 ^b	0.6	5.734	-	-	-
2	Chiralpak [®] IB	100 ^a	0.2	17.775	-	-	-
2	Chiralpak [®] IB	20 ^a	0.5	8.245	-	-	-
2	Chiralpak [®] AD	100 ^a	0.2	16.418	-	-	-
3	Chiralcel [®] OD	50 ^a	0.5	18.039	29.988	3.469	2.053
3	Chiralcel [®] OD-H	10 ^c	0.5	9.692	20.868	2.324	1.051

3	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	22.236	25.433	0.398	1.210
3	Chiralpak [®] IA	100 ^b	0.5	6.536	-	-	-
3	Chiralpak [®] IB	100 ^a	0.2	25.734	31.809	2.125	1.654
3	Chiralpak [®] AD	100 ^a	0.2	16.401	-	-	-
3	Chiralcel [®] OD	50 ^a	0.5	18.039	29.988	3.469	2.053
3	Chiralcel [®] OD-H	10 ^c	0.5	9.692	20.868	2.324	1.051
4	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	12.545	-	-	-
4	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	7.074	10.278	1.633	2.4
5	Chiralcel [®] OD-H	10 ^c	0.5	7.215	7.453	0.486	1.090
5	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	25.636	30.312	4.150	1.237
5	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	7.947	9.788	4.184	1.803
6	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	25.221	26.672	1.149	1.074
6	Chiralpak [®] IB	05 ^a	0.6	18.246	21.378	5.687	1.335
6	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	10.878	11.885	1.716	1.165
7	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.2	17.151	19.264	2.919	1.457
7	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.2	9.503	9.788	0.729	1.089
8	Chiralcel [®] OD	20 ^c	0.5	9.673	10.383	1.609	1.339
8	Chiralcel [®] OD-H	10 ^c	0.5	13.824	15.167	2.342	1.18
8	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.2	12.139	12.463	1.46	1.051
8	Chiralpak [®] IB	05 ^a	0.6	17.903	18.655	1.445	1.062
8	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	9.156	9.781	1.561	1.144
9	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	13.479	14.470	1.389	1.127
9	Chiralpak [®] IB	05 ^a	0.6	20.257	21.618	2.161	1.093
9	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	10.878	11.885	1.716	1.165
10	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	25.636	30.312	4.150	1.237
10	Chiralpak [®] IB	05 ^a	0.6	18.183	18.967	1.521	1.472
10	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	11.362	17.553	10.130	2.638
11	Chiralcel [®] OD	20 ^a	0.6	9.143	9.433	13.886	5.259
12	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	23.499	26.493	2.930	1.184
12	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.2	9.434	13.902	9.170	2.235
13	Chiralcel [®] OJ	20 ^a	0.6	19.551	-	-	-
13	Chiralpak [®] IA	50 ^b	0.6	12.855	28.602	22.600	5.215

13	Chiralpak [®] IB	05 ^a	0.6	18.478	21.715	5.721	1.339
13	Chiralpak [®] AD	20 ^a	0.6	13.828	15.960	3.886	1.236

Note: ^a Hexane/éthanol, ^b Hexane/isopropanol, ^c Heptane/isopropanol.

(1) Hespéretine, (2) Hespéridine, (3) Naringine, (4) Naringénine, (5) Flavanone, (6) 2'-Hydroxyflavanone, (7) 4'-Hydroxyflavanone, (8) 6-Hydroxyflavanone, (9) 7-Hydroxyflavanone, (10) 4'-Méthoxyflavanone, (11) 5-Méthoxyflavanone, (12) 6-Méthoxyflavanone, (13) 7- Méthoxyflavanone.

La séparation complète ($R_s > 1.5$) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose pour la flavanone non substituée, la valeur de résolution est étendue de 1.924 à 3.516, les valeurs basses de la résolution ont été obtenues avec les PSCs à base d'amylose (Chiralpak AD, $R_s=0.729$), aucune séparation a été réalisé sur Chiralpak IA pour ce composé, en outre, la séparation de la flavanone a été réalisée sur Chiralcel OD, Chiralcel OD-H et Chiralpak IB avec de l'isopropanol 100% en tant que phase mobile, avec une bonne résolution ($R_s= 3.516$) sur Chiralcel OD-H, mais le temps de rétention est plus court sur Chiralcel OD (18.467, et 20.831min) , car nous disons plus tard que Chiralcel OD-H et Chiralpak IB ont le même sélecteur chiral, mais le polysaccharide est immobilisé sur la silice.

La Chiralcel OD montre une meilleure résolution que la Chiracel OJ qui est basée sur la cellulose 4 –méthylbenzoate. Toutes les hydroxyflavanones ont été résolues avec une bonne résolution par toutes les PSCs avec différentes phases mobiles, les ordres d'élution de ces flavanones sur les six phases sont semblables, ceci peut être liée à leur dispositif structural commun. Les légères différences dans l'ordre d'élution peuvent, cependant, être attribuées aux différences dans la nature chimique et aux propriétés physiques des pahses stationnaires chirales.

Les énantiomères des méthoxyflavanones sont retenus plus longtemps que celles des hydroxyflavanones sur toutes les phases stationnaires chirales, peuvent être en raison des différences dans la polarité entre les composés (les hydroxyflavanones sont plus polaires que les méthoxyflavanones) et la nature polaire de la phase mobile.

Les diastéréo-isomères de l'hespéridine ne peuvent pas être séparé aussi dans ces conditions, tandis que les énantiomères de leur aglycone l'Hespéretine) ont été résolue

excellamment sur le chiralpak IA mais avec un temps de rétention très long. Les énantiomères de Narigénine étaient résolus sur les dérivés d'amylose mieux que sur les dérivés de cellulose.

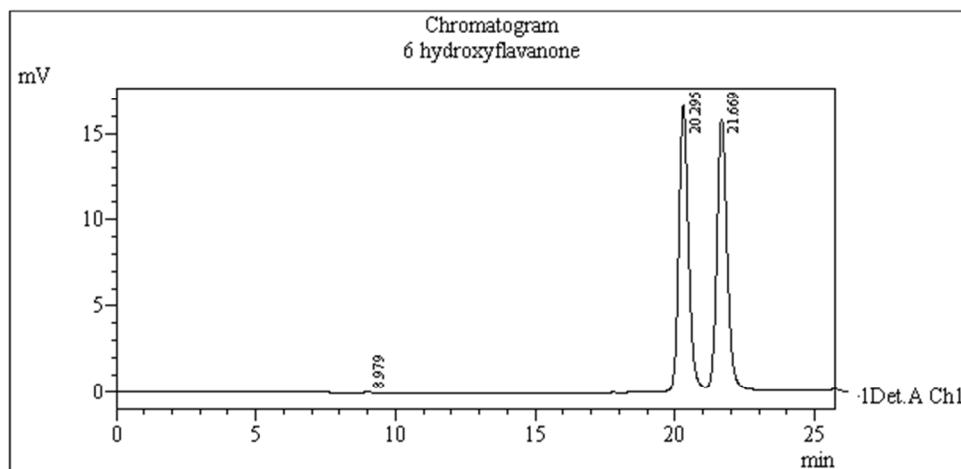


Figure IV.8. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 6-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralpak IB.

Phase mobile : n-hexane/isopropanol 95 :05, débit : 0.6ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, α =1.121, R_s = 2.149.

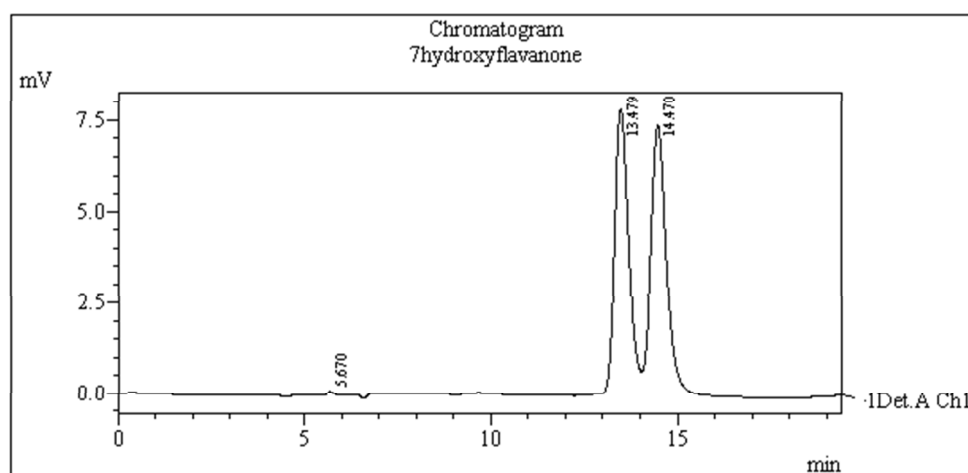


Figure IV.9. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 7-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OJ.

Phase mobile : n-hexane/isopropanol 80 :20, débit : 0.6ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, α =1.127, R_s = 1.389.

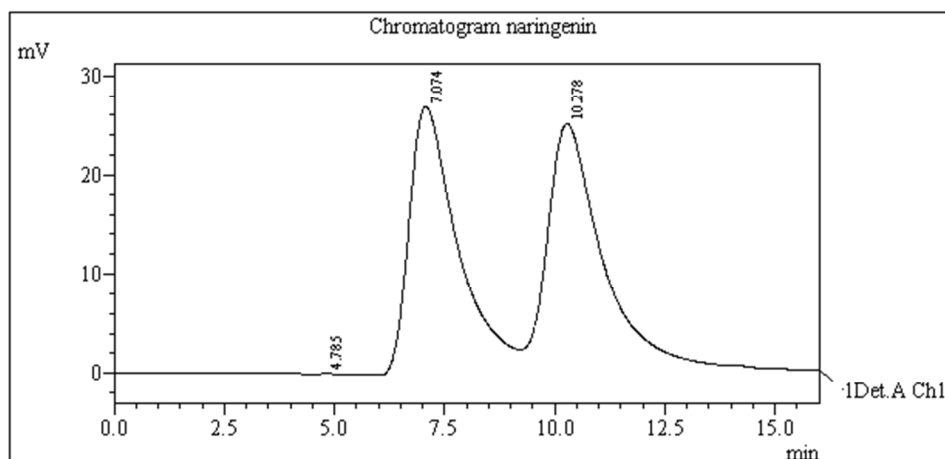


Figure IV.10. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de naringénine sur la colonne Chiralpak AD.

Phase mobile : n-hexane/isopropanol 80 :20, débit : 0.6ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=2.400$, $R_s= 1.633$.

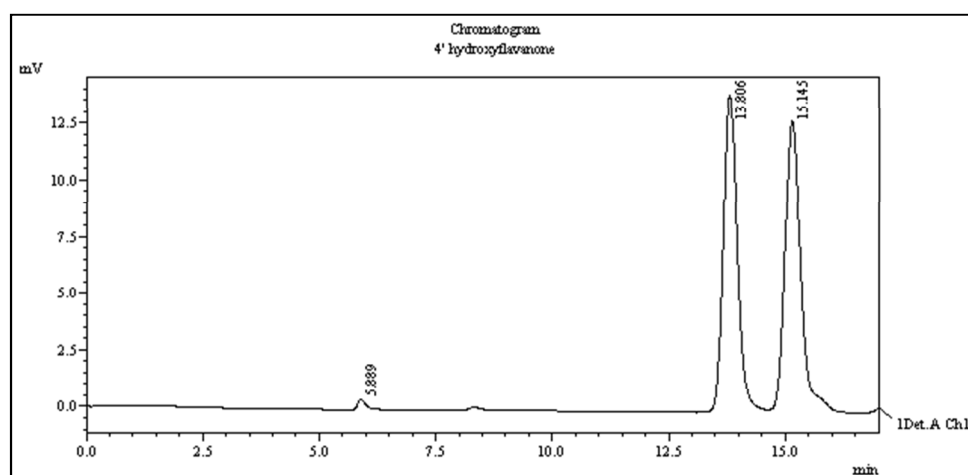


Figure IV.11. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de

4'-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD-H.

Phase mobile : n-heptane/isopropanol 90:10, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, $\alpha=1.169$, $R_s= 2.336$.

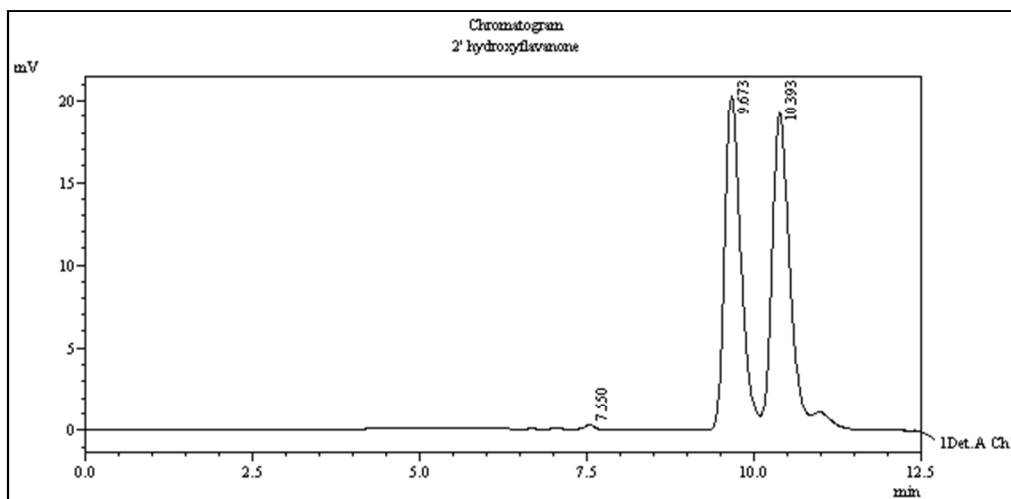


Figure IV.12. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 2'-hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel OD.

Phase mobile : n-heptane/isopropanol 80:20, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20 μ L, détection : 254nm, T : 25°C, α =1.339, R_s = 1.609.

III. Etude de la separation chirale des imino flavanones sur differentes PSCs

1. Etude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool)

Belbokhari *et al* [5-7] ont synthétisé une série des dérivés iminoflavanone, puis ils ont étudié la séparation chirale de ces produit, l'énantiosélectivité de six PSCs a été premièrement étudié en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles polaires (100%) alcools. On utilise comme phase mobile le propanol-2 avec un début de 0.1 ml et une longueur d'onde $\lambda = 290$ pour détecter la plupart des composés injectés.

TableauIV.7 : Conditions chromatographiques de séparation des iminoflavanones à phase organique polaire

Phase mobile	Débit (mL/min)	Volume d'injection (μ L)	Température (°C)	Longueur d'onde de détection (nm)
isopropanol	0.1	20	25	290

Le tableau IV.8 illustre les résultats chromatographiques obtenus par CLHP.

Tableau IV.8 : Résultats chromatographiques en phase organique polaire.

Composé	PSCs	tr ₁	tr ₂	Rs	α
01	Chiralpak AD	23.500	24.438	0.582	1.130
	Chiralcel OD	25.648	28.555	2.049	1.276
	Chiralpak IB	25.502	27.578	1.679	1.222
	Chiralpak IA	17.861	18.164	0.152	1.114
	Chiralcel OD-H	29.957	31.120	0.887	1.056
02	Chiralcel OD-H	31.007	35.483	3.140	1.155
	Chiralpak IB	25.351	28.430	2.022	1.322
	Chiralpak IA	28.329	36.743	1.469	1.300
	Chiralpak AD	23.426	24.256	0.007	1.116
	Chiralcel OD	25.351	28.430	2.022	1.322
03	Chiralpak IA	18.857	19.321	0.608	1.036
	Chiralpak AD	23.521	24.450	0.463	1.127
	Chiralcel OD	26.801	31.539	2.553	1.423
	Chiralpak IB	24.832	27.576	1.827	1.199
04	Chiralpak AD	23.521	24.450	0.463	1.127
	Chiralcel OD	27.356	31.440	2.438	2.098
	Chiralpak IB	24.704	27.359	1.848	1.279
05	Chiralpak IA	49.940	51.043	0.120	1.027
	Chiralcel OD	24.487	26.734	1.026	1.260
	Chiralpak IB	25.026	26.991	1.354	1.079
06	Chiralpak AD	23.432	29.506	4.272	1.829
	Chiralcel OD-H	30.365	33.684	1.774	1.112
	Chiralcel OD	26.720	29.262	1.327	1.097
	Chiralpak IB	24.533	26.059	1.127	1.181
07	Chiralpak AD	23.399	26.352	1.339	1.073
	Chiralcel OD	26.734	29.209	1.247	1/119
08	Chiralpak AD	23.303	24.216	0.371	1.087
	Chiralcel OD-H	30.180	34.6390	2.867	1.146
	Chiralcel OD	26.741	29.329	0.506	1.173
	Chiralpak IB	50.960	52.49	0596	1.051
09	Chiralpak AD	26.656	29.939	0.833	1.037
	Chiralcel OD-H	50.744	34.563	2.805	1.494
	Chiralcel OD	28.903	31.340	2.119	1.033
	Chiralpak IB	30.269	52.203	2.805	1.290
10	Chiralcel OD-H	26.315	28.436	2.262	1.089
	Chiralcel OD	20.477	24.608	2.300	1.269
	Chiralpak IB	50.407	51.734	0.340	1.073
11	Chiralcel OD	26.528	30.816	2.375	1.195
	Chiralpak IB	62.325	66.912	1.673	1.084
12	Chiralpak IB	51.172	49.765	0.512	1.035
13	Chiralcel OD-H	29.450	32.116	0.206	1.116
14	Chiralpak IA	47.154	48.631	0.734	1.055
	Chiralcel OD	26.222	29.622	1.989	1.329
15	Chiralpak AD	23.342	26.014	1.642	1.270
	Chiralcel OD-H	28.893	32.504	2.477	1.012
	Chiralcel OD	25.798	27.761	1.174	1.158

Pour la colonne Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, et Chiralpak IB la séparation de flavanone non substituée et de tous les composés synthétisés a été effectuée avec une bonne résolution.

Généralement, les temps de rétention des énantiomères et des diastéréoisomères séparés pour la flavanone 1 et les produits 2-5 est plus court en comparant avec les produits 6-15. La cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) déposée sur le gel de silice (Chiralcel OD et Chiralcel OD-H) présente la meilleur énantiosélectivité vis-à-vis la majorité des produits étudiées avec un temps de rétention plus long, peut-être due à la nature de phase mobile (isopropanol) et à la diminution de la valeurs de débit.

Les diastéréoisomères de produit 13 sont séparés seulement avec la colonne Chiralcel OD-H mais avec une basse valeur de résolution $R_s=0.206$.

La séparation des diastéréoisomères des produits n'est pas réussie sur la phase stationnaire chirale Chiralcel OJ dans ces conditions, peut-être la diminution de la polarité de la phase mobile va donner une séparation.

Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak IA pour la majorité des produits, et les autres sont séparés avec des mauvaises valeurs de résolution qui ne dépasse pas la valeur 1.4.

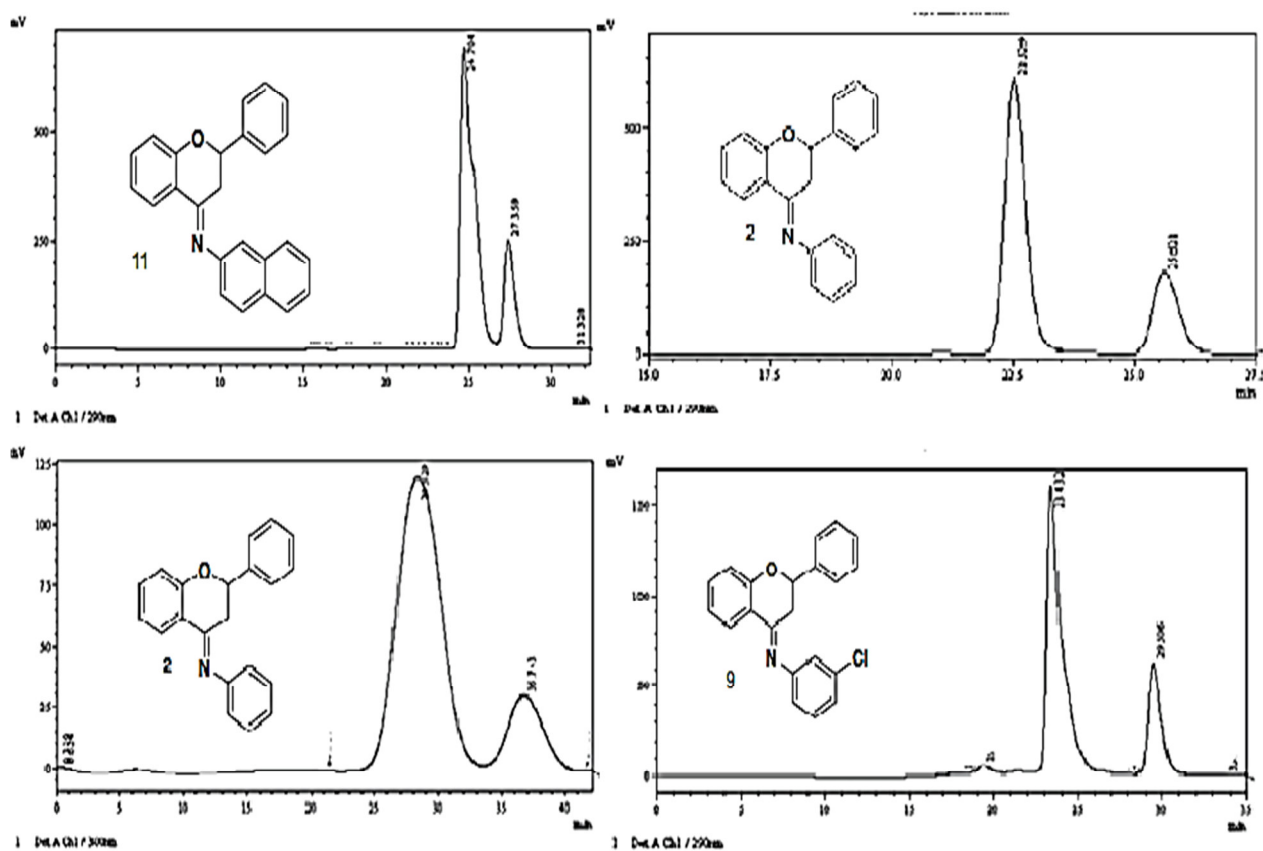


Figure IV.13. Les chromatogrammes représentent les séparations de quelques produits sur les phases stationnaires, Chiralcel OD-H ; Chiralcel OD-H ; Chiralpak IB ; Chiralcel OD-H pour les composés. Phase mobile : Isopropanol (100%), débit 0.1ml/min, T:25°C, Détecteur UV à $\lambda=290\text{nm}$ [41].

2. Etude de la séparation en mode de phase normale

La séparation de Flavanone et produits synthétisés a été réalisé sur les six PSCs avec divers phases mobiles n Alcane /Alcool dans les conditions chromatographiques décrites dans le tableau IV.9.

TableauIV.9 : Conditions chromatographiques de séparation des iminoflavanones à phase normale.

Phase mobile	Débit (mL/min)	Volume d'injection (μL)	Température (°C)	Longueur d'onde de détection (nm)
Hexane/Ethanol	0.5	20	25	290
Hexane/isopropanol	0.1	20	25	290
Heptane/isopropanol	0.3	20	25	290

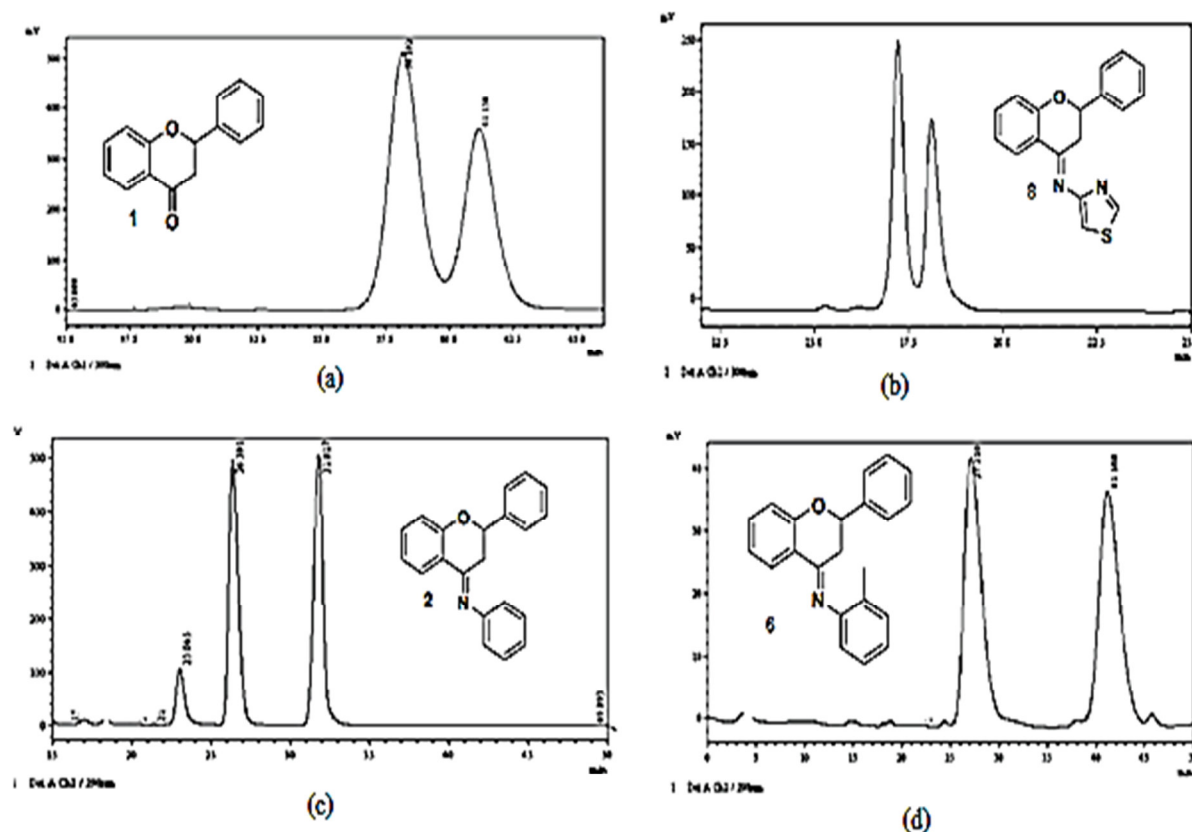


Figure.IV.14. Résolution des diastéréoisomères en phase normale, avec divers PSCs, phase mobile,(a) Chromatogrammes de séparation énantiomère des composés 1, 8, 2 et 6 en mode de phase normale sur différents PSCs, température 25 ° C, détecteur UV situé à 290 nm. (a) Chiralpak@IA; phase mobile, n-hexane: 2-propanol (90:10 v / v), (b) Chiralpak@IA, n-hexane: éthanol (95:05 v / v), (c) Chiralcel@OD-H, n-heptane: 2-propanol (90:10 v / v), (d) Chiralcel@OJ n-hexane: éthanol (80:20 v / v) [41].

Le tableau suivant illustre les résultats chromatographiques en mode de phase normal.

Tableau IV.10 : Résultat chromatographique en mode de phase normal.

PSCs	Eluant Débit ml /mun	Composé	facteurs		
			Tr min	Rs	α
Chiralpak IA	Hexane /EtOH 95 :5 0.5	01	20.278	2.999	1.050
		02	20.763	0.749	1.050
			20.310		
		03	21.008	0.343	1.029
			19.261		
		04	19.626	0.608	1.036
			18.857		
		05	19.321	0.799	1.038
			19.630		
		07	20.326	2.477	1.145
			10.241		
		09	11.591	1.457	1.081
			17.222		
		10	18.111	1.104	1.059
			16.919		
	11	17.669	1.598	1.093	
		16.958			
	12	17.690	1.685	1.092	
		17.001			
	13	17.990	1.710	1.068	
		17.004			
	14	17.972	1.567	1.085	
		18.234			
	15	19.254	1.326	1.079	
		16.885			
	Hexane Propanol- 2 90 :10 0.1	01	58.182	1.304	1.102
			61.154		
		04	10.458	1.435	1.361
			13.809		
		06	57.337	1.258	1.054
60.406					
08		55.014	1.061	1.049	
		57.486			
09		54.217	0.787	1.042	
		56.308			
10		56.260	1.156	1.057	
		58.962			
15		54.224	1.768	1.149	
		58.361			
		75.807			

Chiralcel OD-H	Heptane /propanol -2 90/10 0.3	01	26.391 31.817	5.004	1.342		
		02	22.529 25.621	3.490	1.246		
		03	22.638 25.706	3.512	1.136		
		04	22.586 25.680	3.482	1.247		
		05	22.744 25.866	3.658	1.246		
		06	22.350 25.239	3.624	1.191		
		07	22.283 25.101	3.698	1.236		
		08	22.456 25.321	3.693	1.233		
		09	26.271 28.641	3.623	1.291		
		10	26.315 28.436	2.262	1.089		
		13	26.189 28.355	2.273	1.084		
		14	26.032 28.175	2.264	1.088		
		15	26.198 28.320	2.451	1.129		
			Heptane /propanol -2 90/10 0.2	01	31.084 32.169	0.912	1.070
				02	30.799 31.822	0.646	1.067
03	30.532 31.498			0.548	1.057		
04	30.632 31.494			0.471	1.057		
05	31.525 32.852			0.774	1.084		
06	30.677 31.872			0.717	1.079		
07	33.596 35.369			1.221	1.098		
08	30.217 31.279			0.523	1.067		
09	29.544 31.024			1.112	1.106		
10	30.381 32.041			1.104	1.067		
11	30.789 32.191			0.869	1.092		
12	25.173 27.007			1.528	1.162		
13	30.838 30.988			0.932	1.051		
14	32.975 31.136			1.097	1.135		
15	32.458			0.845	1.044		

PSCs	Eluant Débit ml /mun	Composé	facteurs				
			Tr min	Rs	α		
Chiralpak IB	Hexane /propanol-2 95/05 0.4	01	14.482 16.104	3.132	1.235		
		02	14.424 15.985	3.089	1.118		
		03	13.788 14.566	1.531	1.078		
		04	14.533 15.303	1.656	1.141		
		05	14.322 15.246	1.533	1.065		
		06	14.208 15.109	1.599	1.076		
		08	13.822 14.630	1.648	1.128		
		09	9.577 10.377	1.520	1.128		
		10	14.438 15.973	3.136	1.114		
		12	13.859 14.689	1.283	1.121		
		15	13.714 14.498	1.460	1.067		
		Chiralcel OJ	Hexane /EtOH 80/20 0.2	02	7.631 22.716	4.368	2.714
				05	23.996 37.775	4.212	1.477
				06	22.956 36.229	3.247	1.544
				07	27.110 37.963	4.888	1.467
10	19.353 32.347			3.034	1.691		

La séparation complète ($R_s > 1.5$) a été toujours réalisés sur les PSCs à base de cellulose Chiralpak IB, Chiralcel OD et Chiralcel OD-H, la valeur de résolution est étendue de 0.471 à 5.71, les valeurs basses de la résolution ont été obtenues avec les PSCs à base d'amylose Chiralpak IA et AD.

La séparation des diastéréoisomères des produits tes réussie sur les PSCs Chiralcel OJ et Chiralpak IA dans ces conditions, sachant que les composés sont polaires, donc la diminution de la polarité de la phase mobile améliore la qualité de séparation.

Chiralpak IA ne présente aucune séparation en mode organique polaire par contre, il présente une bonne séparation pour la majorité des produits en mode de phase normal.

Les composés 1,5 et 6 ont été résolus avec une bonne résolution par toute les PSCs avec différentes phases mobiles.

En conclusion Chiralcel OD-H a montré une plus haute énantiosélectivité que tous les autres colonnes pour la plus part des composés dans les deux modes chromatographiques.

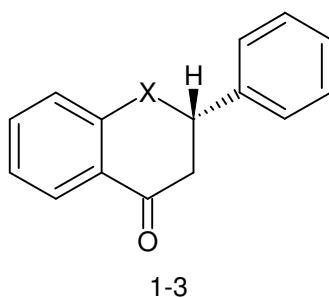
Les meilleures valeurs de résolution ont été réalisées pour les deux produits 2 et 10.

IV. Etude des propriétés stéréochimiques et séparation chirale des analogues Aza-et Thio-flavanones

Bien que les propriétés chimiques des N- et S-hétéro-analogues des flavonoïdes aient été étudiées, il n'y a que quelques publications sur leur examen spectroscopique, à notre connaissance, leurs propriétés chiroptiques n'ont été étudiées que par S. Antus *et al* (1994). La résolution optique de l'azaflavanone et de la thioflavanone a été décrite, mais la configuration absolue de leurs énantiomères n'a pas été élucidée [43].

1. Dichroïsme circulaire et configuration absolue des Aza-et Thio-Flavanones

S. Antus *et al* (1994) [8] ont réalisé une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de dichroïsme circulaire a permis la détermination de configuration absolue des aza et thioflavanones par Dichroïsme circulaire.

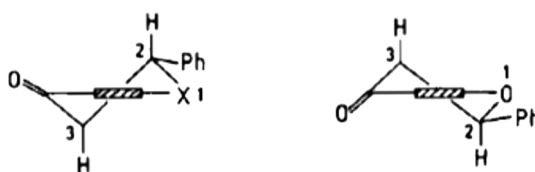


	X	$[\alpha]_D^{24}$	Configuration
(-)-1	NH	-21	R
(-)-2	S	-56	R
(-)-3	O	-64	S

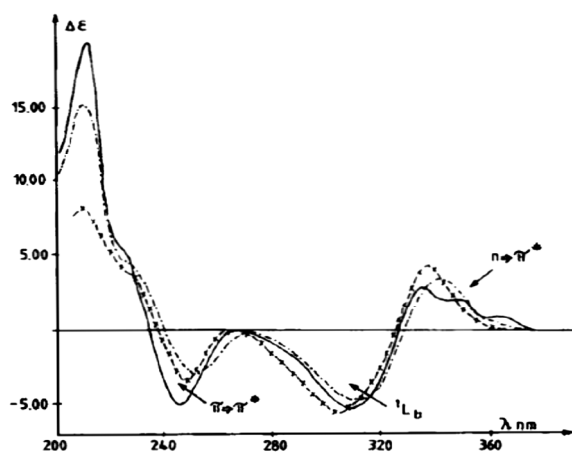
Afin d'obtenir des informations chiroptiques et stéréochimiques, ils ont effectué des mesures de DC dans la région d'absorption UV des composés 1 à 3 dans des solvants de polarité différente. Le S(-)-Flavanone a été sélectionné comme composé de référence

approprié, dont les spectres DC ont été étudiés dans la gamme de 400 à 200 nm et comparé à ceux de (-)-1 et (-)-2. Afin d'attribuer l'origine des effets de Cotton de $n \rightarrow \pi^*$ et 1L_b .

Les données de DC pour (S)-(-)-3 dans l'acétonitrile, l'éthanol et le n hexane sont présentées à la figure IV.17 et sont listées dans le tableau IV.7. Quatre effets de Cotton ont été observés dans chaque solvant, dont la transition bande avec un signe positif à la longueur d'onde la plus longue a été attribuée à la $n \rightarrow \pi^*$ du chromophore d'acétophénone, la configuration S peut être affectée au centre de chiralité C-2. Comme le montre la Figure VI.16, les deux (-)-azaflavanone (1) et (-)-thioflavanone (2) possèdent un CD presque identique dans la région d'absorption UV complète dans la solution d'éthanol et ils changent de même dans le n-hexane. Dans les deux cas, la première bande de signe négatif et la troisième de signe positif a été assigné sur la base de leur déplacement hypsochrome et bathochrome dans le n-hexane aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$, respectivement, du chromophore Chiral d'acétophénone. Depuis les signes opposés des effets de Cotton de (-)-1 et (-)-2, par rapport à ceux de (S -(-)- 3, leur cycle hétérocyclique doit également adopter la conformation opposée, comme illustré par la FigureVI.15. Parce que le groupe phényle en C-2 est orienté équatorialement [$J_{2-H, 3-H} = 12,7$ et $12,1$ Hz pour (-)-1 et (-)-2, respectivement] dans les deux cas, la configuration absolue de (-)-1 et (-)-2 est donc 2R.



FigureIV.15. Projection standard de cycle aromatique au hétérocycle de (R)-(-)-Azaflavanone et (R)-(-)-Thioflavanone (X = NH et S, respectivement, à gauche) et (-)- Flavanone à droite.



FigureIV.16. Courbes de DC de (S)-(-)-Flavanone dans l'éthanol et le n-hexane.

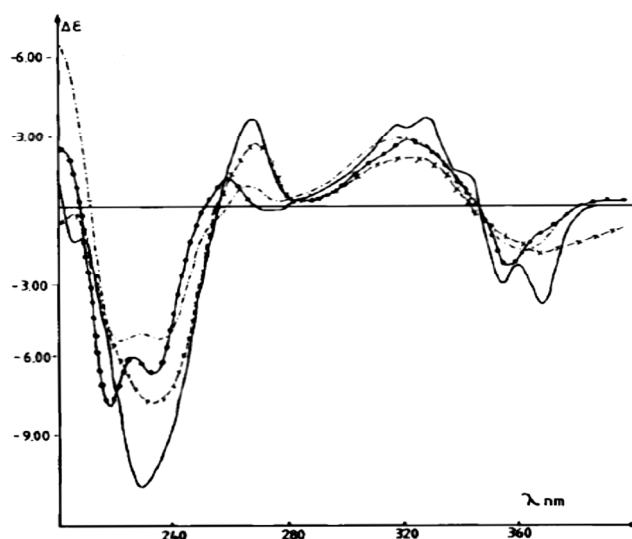


Figure.IV.17 . Courbes de DC de (R)-(-)-Azaflavanone et (R)-(-)-Thioflavanone dans l'éthanol et le n-hexane et l'acétonitrile

Tableau VI.11. Données de Dichroïsme Circulaire de Flavanone, azaflavanone et thioflavanone

Composé	Solvant	λ [nm] ($\Delta \epsilon$)		
(-)-Azaflavanone	acétonitrile	368(-2.61)	324 (+2.48)	235 (-5.12)
		219(-4.41)	190 (-26.10)	
	Ethanol	368 (-2.25)	326 (+2.81)	267 (+ 0.99)
		235 (-5.93)	222 (-5.97)	
	n-Hexane	368 (-4.90)	353 (-3.57)	343 (+1.57)
		330 (+4.31)	319 (+ 3.84)	303 (+ 2.43)
267 (+0.99)		235 (-5.93)	222 (- 5.97)	
(-)-Thioflavanone	acétonitrile	366 (-1.61)	360 (-1.48)	329 (+ 1.41)
		272 (+2.16)	232 (-6.91)	
	Ethanol	364 (-2.56)	357 (-1.83)	322 (+ 2.01)
		271 (+2.57)	229 (-11.32)	
	n-Hexane	370 (-1.22)	358 (-3.02)	324 (+ 2.74)
		270 (+ 3.66)	229 (-11.32)	
(-)-Flavanone	acétonitrile	355(+1.48)	338(+4.51)	310 (- 5.56)
		248(-3.75)		
	Ethanol	342(+2.22)	311 (-4.77)	352 (- 3.02)
		252(-3.02)	227 (+4.43)	210 (+ 15.18.)
	n-Hexane	364 (+0.89)	348 (+2.24)	334 (+ 3.17)
		314(-4.71)	305 (-5.15)	244 (-4.93)
		223(+5.55)	210(+19.22)	

Selon la règle d'Antus, la sphère chirale (cycle), qui est la plus proche du chromophore du benzène, détermine le signe de l'effet 1L_b Cotton. Une hélicité P de cycle chiral se manifeste par des effets positifs du Cotton dans la transition 1L_b et une hélicité M

dans les effets négatifs, ne prévoyait pas un moment de transition électrique ($\vec{\mu}$) situé dans le plan de cycle aromatique montre approximativement la direction de l'axe C_2 chromophore (a). Si le moment de transition électrique tourne à plus d'environ 30° de l'axe C_2 , en raison de l'influence des substituants de cycle benzène, le signe de la bande 1L_b inverse sans changer la conformation absolue de cycle chirale (b) [8].

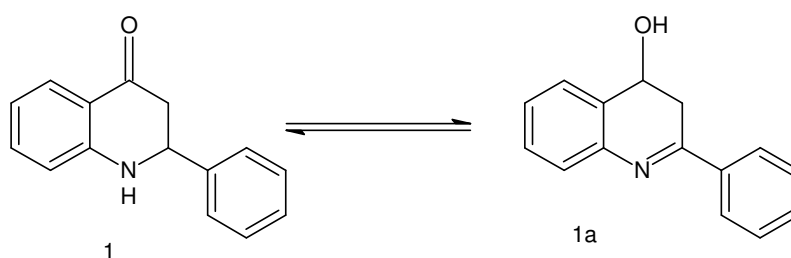
La synthèse stéréocontrôlée de la thioflavanone lévrotatoire (2) a déjà été exécutée par Dike *et al*, dont l'affectation de configuration R est entièrement conforme à ces résultats.

2. Résolution des énantiomères de l'Azaflavanone

La séparation des énantiomères de l'Azaflavanone ((\pm)-2,3-dihydro-2-phényl-4 (1H)-quinolone) a été réalisée par A.L.Tokés et L.Szilágyi (1987) [9]. La résolution des énantiomères a été obtenue en utilisant le réactif oxo optiquement actif (-)-5-(α -phényl)-semioxamazide. La pureté énantiomérique a été vérifiée par 1H -RMN en utilisant le réactif lanthanide chiral Eu (hfc)₃.

Dans cette étude, ils ont préparé les énantiomères individuels de l'analogue aza de Flavanone par condensation de 2-aminoacétophénone avec le benzaldéhyde pour donner 2'Aminochalcone. L'utilisation d'un excès de benzaldéhyde a été évitée et la réaction a été effectuée à température ambiante. La fermeture de cycle de chalcone était effectuée en présence d'éthoxyde de sodium.

Contrairement à la flavanone, l'analogue aza (1) peut se tautomériser dans la forme 3,4-dihydro-4-hydroxy-2-phénylquinoléine, 2 a, et ce processus peut conduire à la perte totale de pureté optique des énantiomères. Il était donc intéressant de déterminer la contribution, de forme tautomérique (Ia). Le spectre ${}^{13}C$ -RMN de racémique 1 a montré une résonance carbonyle-C à 193.15 ppm et deux autres signaux à 46,38 (pour C-3) et 58,40 (pour C-2) ppm indiquant la présence quasi exclusive de la forme keto (I). Conformément à cette constatation le racémique 1 a été montré pour réagir en douceur avec les réactifs oxo pour donner l'hydrazone, l'azine et les dérivés oxime pour réaliser la résolution des énantiomères de 1 à travers le réactif oxo optiquement actif (-)-5-(α -phényl)-semioxamazide (2).



1 a été traité en méthanol avec (-) - 5- (α-phényl) -semioxamazide (2) pour donner le mélange diastéréomère (3a+ 3b). La séparation des diastéréomères d'oxamazones a été réalisée par cristallisation fractionnée, donnant un produit cristallin, fortement lévrotatoire (3a) et un autre produit moins lévrotatoire (3b). Les deux diastéréisomères des oxamazones (3a et 3b) ont été cristallisés dans le méthanol. La décomposition des oxamazones avec l'acide sulfurique dilué a donné l'énantiomères de 1.

Le processus de résolution est représenté dans le schéma VI.1.

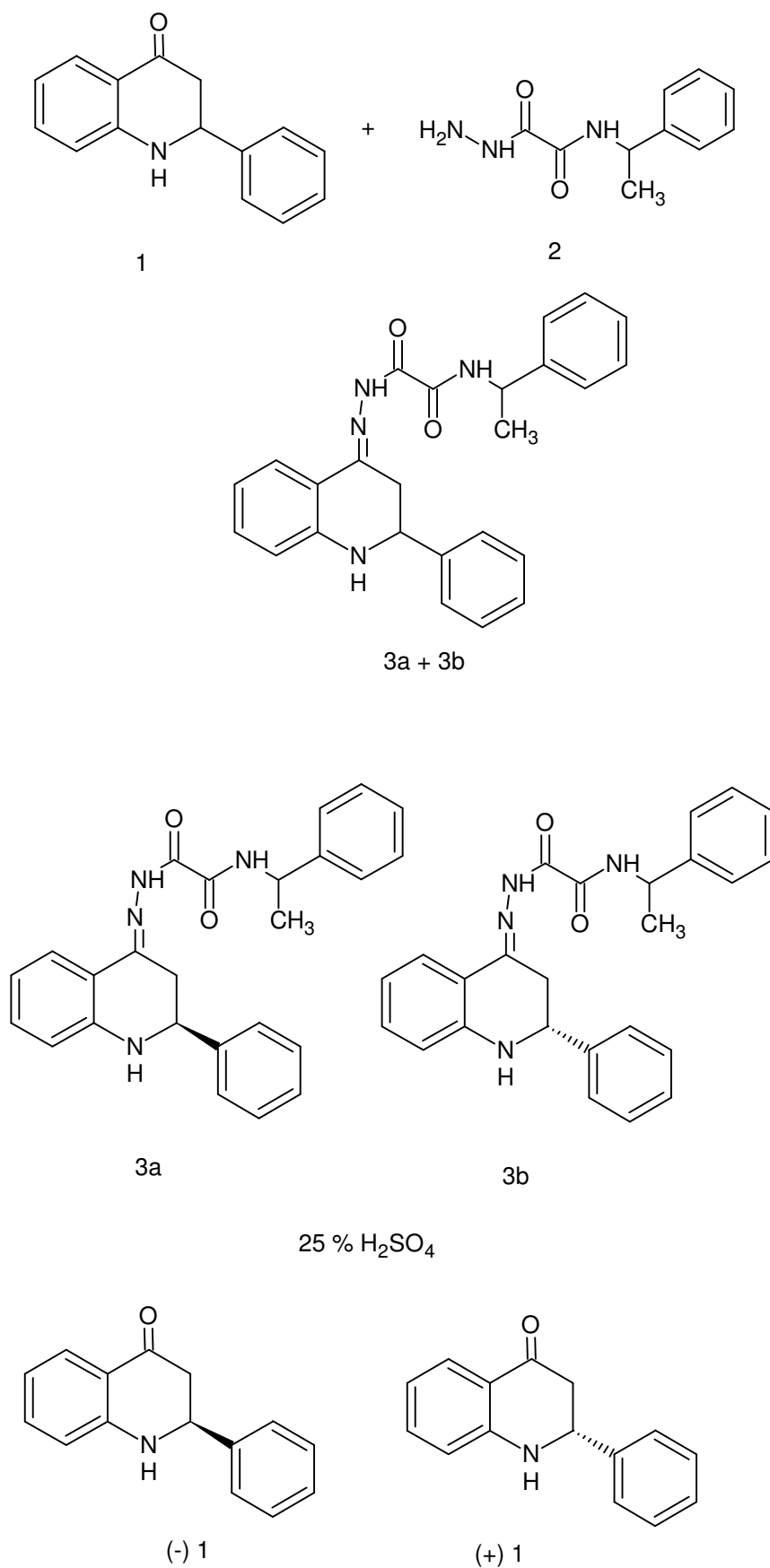


Schéma IV.1. processus de résolution des énantiomère d'Aza Flavanone

La pureté énantiomérique de l'énantiomère (-1) de **1** pourrait être estimée en utilisant le lanthanide chiral méthode de changement de réactif (CLSR).

3. Séparation par TLC Chiral de 2,3-dihydro-2-phényl-4 (1H)-quinolone (Azaflavanone)

Dans notre laboratoire A. Cheriti *et al* ont synthétisé l'azaflavanone par le même procédé décrit par A.L.Tokés et L.Szilágyi, puis il ont étudié la séparation des énantiomères de composé synthétisé par Chromatographie sur couche mince sur gel de silice en utilisant des sélecteurs chiraux optiquement purs le D(+)-saccharose et le D(-) manitol [10].

4. Etude de la Séparation chirale de thioflavanone

A.L.Tokés [11] a utilisé la même méthode de synthèse et de séparation chirale « décrite plus haut » par lui sur le 2,3-dihydro-2-phényl-4 (1H)-quinolone pour synthétiser puis résoudre les énantiomères de 2,3-Dihydro-2-phenyl-4H-1-benzothiopyran-4-one. C'est la seule technique utilisée pour la séparation chirale de ce composé décrit dans la littérature.

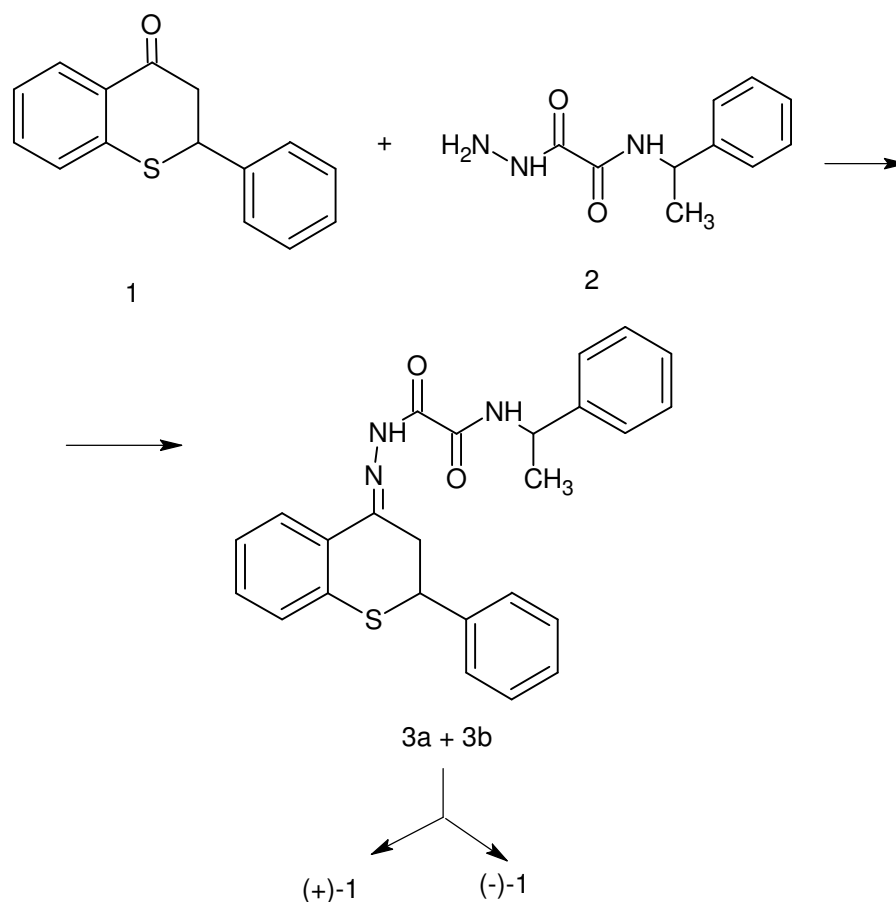


Schéma IV.2: processus de résolution des énantiomères de Thio Flavanone. [11]

La résolution des énantiomères a été obtenue en utilisant le réactif oxo optiquement actif (-)-5-(α - phenethyl) - semioxamazide. La pureté énantiomérique a été vérifiée par ¹H-RMN en utilisant le réactif lanthanide chiral Eu (hfc)₃.

V. Etude comparative entre les résultats de séparations chirales des dérivés flavanones et imino flavanones

Afin d'étudier l'influence de la position de substituant, pour étudié la relation entre la structure moléculaire et le mécanisme de discrimination chirale nous comparons les résultats obtenu dans les mêmes conditions, phase mobile, phase stationnaire chiral, débit de la phase mobile. On a choisi de comparer les résultats de séparation chirale des flavanones commerciales avec celui synthétisé (iminoflavanones).

1. Mécanisme de discrimination chirale

Le premier modèle de reconnaissance chirale a été proposé par Dalglish puis modifiée par Pirkle. Il suppose l'existence d'un minimum de trois points d'interaction entre le soluté et le sélecteur. Ces interactions, déterminées par la composition chimique de ces deux protagonistes, peuvent être attractives ou répulsives. Ce modèle autorise deux interactions pour chaque énantiomère, la troisième, de nature stéréosélective, est possible seulement pour l'un d'entre eux. Les interactions pouvant participer au processus de discrimination chirale peuvent être des attractions ou répulsions coulombiennes, des liaisons hydrogène, des effets hydrophobes, des encombrements stériques, des phénomènes d'inclusion dans des cavités, des transferts de charges, des interactions π - π , et des interactions dipôle-dipôle [12-15].

Ainsi, ce modèle de reconnaissance chirale, simplifié, a le mérite d'expliquer le fonctionnement de la plupart des sélecteurs chiraux utilisés en séparation chirale à l'exception des polymères. En effet, lorsque la PSC est un polymère, il convient d'ajouter aux interactions attractives et répulsives classiques, un phénomène de reconnaissance qui tient compte de la géométrie globale du soluté. Comme les polysaccharides. La dérivation des groupements -OH permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules [16-19].

Dans notre étude nous avons remarqué que le temps de rétention de la flavanone non substituée était légèrement plus court que les flavanones monosubstituées, ils existent des interactions π - π , liaisons hydrogènes et interactions de dipôle-dipôle entre les PSCs, et les flavanones. Le cycle phénylique de PSC devrait être une base π en raison des deux

groupements méthyliques. Pour les méthoxyflavanones, le cycle phénylique avec le groupement méthoxyl est une forte base π en raison du groupe méthoxyl. Ainsi l'interaction π - π entre le cycle phénylique de PSC et de cycle phénylique avec le groupement méthoxyl de flavanones sont plus faible que celle entre le cycle phénylique de PSC et le cycle phénylique sans groupement méthoxyl des flavanones. D'une part, nous pouvons voir que le cycle phénylique sans groupement méthoxyl est relié au carbone chiral pour le 5-méthoxyflavanone, le 6-méthoxyflavanone et le 7 méthoxyflavanone mais pour le 4'-méthoxyflavanone, le cycle phénylique correspondant n'est pas relié au carbone chiral. Ceci peut être la raison du plus mauvais énantioséparation de 4'-méthoxyflavanone sur la cellulose tris (3, 5-diméthylphenylcarbamate). Ainsi l'interaction π - π pourrait jouer un rôle important dans l'énantioséparation des flavanones sur la cellulose tris (3, diméthylphenylcarbamate). Par conséquent, en corrélation avec la structure moléculaire, le pouvoir résolutif inférieur de la 5-méthoxyflavanone que d'autres trois méthoxyflavanones est probablement résulte de la configuration spatiale du substituant 5-méthoxy qui peut former une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle.

Le temps de rétention est devenu plus long avec l'augmentation de la proportion d'alcool. La présence de l'alcool dans la phase mobile fait une concurrence avec la phase stationnaire chirale pour la formation de liaisons hydrogènes avec les analytes. La capacité de concurrence de l'isopropanol, est plus faible que celle de l'éthanol.

Les interactions π - π , ainsi que les liaisons hydrogènes jouent un rôle important pour l'énantioséparation de toutes les flavanones par les phases stationnaires chirales, particulièrement pour l'énantioséparation de 4'-méthoxyflavanone, 2' et 4'-hydroxyflavanone, par conséquent, par la corrélation avec la structure moléculaire, la basse capacité de discrimination chirale pour le 2' -hydroxyflavanone que les trois autres hydroxyflavanones est probablement résulte de la configuration spatiale de substituant 2'-hydroxyl qui peut former une liaison hydrogène intramoléculaire autour de centre stéréogénique.

Les énantiomères de Narigénine n'étaient pas résolus sur la Chiralcel OD suggérant que les groupements hydroxyle présent en leur structure empêchent leur énantioséparation.

2. Structure moléculaire et reconnaissance chirale

Pour étudié la relation entre la structure moléculaire et le mécanisme de discrimination chirale nous comparons les résultats obtenu dans les mêmes conditions, phase mobile, phase stationnaire chiral, débit de la phase mobile. Pour cette raison On a choisi de comparer les résultats de séparation chirale des flavanones commerciales avec celui synthétisé (iminoflavanones) en mode de phase organique polaire avec l'isopropanol comme éluant.

Cette comparaison permet de mieux comprendre le mécanisme de séparation mise en jeux et l'influence de remplacement de fonction carbonyle par la fonction imine.

Les phases stationnaires chirales Chiralcel OD et chiralcel OD-H présentent les meilleures valeurs de résolution pour les deux cas, mais pas pour tous les composés analysés, pour les flavanones la valeur de Résolution situe entre 1,74 et 4,86 mais les énantiomères des composés qui contiennent des groupements hydroxyle dans le cycle B, n'ont été pas séparé, peut être due à la formation de liaisons hydrogènes qui empêche la séparation.

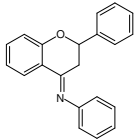
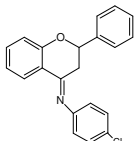
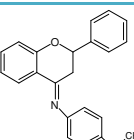
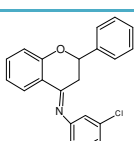
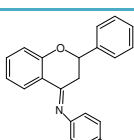
Pour les iminoflavanones les valeurs de résolution des énantiomères séparés s'étendu entre 1.174 et 3.140 pour le composé 02, qui présente un cycle benzène lié à la fonction imine la haute sélectivité de ce composé vis-à-vis ces PSCs due aux fortes interactions π - π entre les cycles benzènes de composés analysés avec le sélecteur chiral.

Les basses valeurs de résolution sur le Chiralcel OD et Chiralcel OD-H sont : 1.026, 1.327, 1.247, 0.506, 0.206 et 1.174 Attribuées respectivement aux composés 5, 6, 7, 8, 13 et 15, ces résultats montre clairement l'effet de substitution sur le cycle benzène lié à la fonction imine qui empêche les interactions π - π ce qui diminue la capacité de discrimination chirale. Les interactions π - π pourrait jouer un rôle très important dans l'énantioséparation des dérivés iminoflavanone sur la cellulose tris (3, diméthylphénylcarbamate).

Pour mieux comprendre l'effet de substitution sur le cycle benzène lié avec la fonction imine nous comparons les valeurs de résolution des composés 2, 5, 7, 9 et 10 sur les PSCs qui présentent généralement les milleurs sélectivité vis à vis ces iminoflavanones, le Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralpak IB, Chiralpak AD qui sont différencier principalement par le diamètre, la nature de polysaccharide (cellulose ou amylose), ainsi la nature de liaison entre le polysaccharie et le support de gel de silice (immobilisé ou déposés), ces facteurs qui influent la séparation de la part de PSC.

Les valeurs de Rs sont montrées dans le tableau suivant.

Tableau IV. 12. Valeurs de résolution des composés étudiés

	Produits	Chiralcel OD	Chiralcel OD-H	Chiralpak AD	Chiralpak IB
2		2.022	3.140	0.077	0.022
5		1.026	–	–	1.026
7		1.247	–	1.339	–
9		2.119	2.805	0.833	0.450
10		2.300	2.262	–	0.340

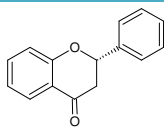
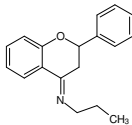
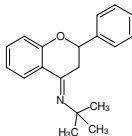
Le cycle benzène lié avec la fonction imine de composé 2 n'est pas substitué, les composés 5,7 et 10 sont para substitué par Cl, OMe et OH respectivement, le composé 9 est méta substitué par un Cl.

Ces résultat montre que la substitution en position méta par un Cl n'a pas influencer la séparation, par contre la substitution en position para empêche la séparation sauf le cas de composé 10 la substitution par un groupement OH n'empêche pas la séparation. La phase d'amylose Chiralpak AD présente des mauvaises séparations ainsi que la Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilisé sur le gel de silice Chiralpak IB.

Pour étudier l'influence du remplacement de groupement carbonyl par une fonction imine sur la séparation nous choisissons de comparer les valeurs de résolutions pour la

flavanone avec les deux produits 2 et 4 dans les mêmes conditions précédents avec la phase mobile de l'isopropanol et les quatre PSC présentent généralement les meilleurs résultats de séparation.

Tableau IV.13: valeurs de résolution des composés étudiés

	Produits	Chiralcel OD	Chiralcel OD-H	Chiralpak AD	Chiralpak IB
1		2.049	0.887	0.077	1.679
3		2.553	–	0.463	1.827
4		2.438	–	1.339	1.848

À partir ces résultats on observe une augmentation dans les valeurs de résolution pour les composés 3 et 4 par apport au flavanone sur les PSC Chiralcel OD et Chiralpak IB. Les interactions π - π , ainsi que les liaisons hydrogènes jouent un rôle important pour l'énantioséparation de toutes les flavanones par les phases stationnaires chirales, donc la fonction imine renforce ces interactions.

VI. Conclusion

Nos résultats démontrent clairement que le système chromatographique basé sur des PSCs dérivés de polysaccharides fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des flavanones. Chiralpak IA peut résoudre environ 77% de tous les composés étudiés avec des phases mobiles basées sur des mélanges hexane/éthanol ou éthanol pur. Chiralpak IB et Chiralcel OD peuvent résoudre le même rapport que Chiralpak IA mais avec des mélanges hexane/isopropanol ou isopropanol pur en tant que phases mobiles. Sous les mêmes conditions Chiralcel OD-H et Chiralpak AD peuvent résoudre environ 54% de tous les composés, bien que, Chiralcel OJ puisse résoudre 62%. La 2' hydroxyflavanone, 5-, 6- et 4'-methoxyflavanone ont été résolues dans chaque colonne dans

différentes conditions. Généralement Chiralcel OD-H a montré une plus haute enantioselectivité que Chiralpak IB pour la plupart des composés, qui contiennent le même sélecteur chirale qui est déposé ou immobilisé sur la silice, respectivement.

Les iminoflavanones sont séparés généralement sur les Phases Stationnaires Chirales de Cellulose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) déposé sur le support de gel de silice, Chiralcel OD et Chiralcel OD-H, différencier seulement par le diamètre des pores (10µm et 5 µm) respectivement. La résolution dépend de la nature et de la concentration de modificateur alcoolique.

L'étude comparative montre l'influence de chaque substitution et chaque changement dans la structure sur la reconnaissance chirale, en générale les résultats fournis par cette étude démontrent l'influence de changement de la fonction carbonyle des flavanones par une fonction imine par augmentation dans la résolution de ses énantiomères.

Le remplacement isostérique de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ou un atome d'azote est très utile pour la conception et la synthèse d'analogues, qui devraient améliorer la biodisponibilité et la bioactivité.

Nous avons abordé dans ce chapitre les différentes études décrites dans la littérature concernés par l'étude des caractéristiques optique et séparation chirale de ces analogues des flavanones, mais il reste encore un déficit dans l'étude de résolution des énantiomères de ces composés par les différentes techniques de séparation chirale, une seule étude qui a été réalisé dans notre laboratoire concerné par l'étude de la séparation de l'Azaflavanone sur TLC chirale.

Autres études ont intéressé par la synthèse asymétrique pour atteindre les énantiomères purs des azaflavanones, et thioflavanones. Jusqu'à maintenant aucune étude n'a été abordée la séparation chirale de ces composés en utilisant les PSCs.

Références bibliographique

- [1] H. Y. Aboul-Enein and I. Ali (2004) Applications of Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for Resolution of Different Compound Classes in G. Gübitz and M. G. Schmid (Eds) *chiral separations methods and protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 173-175.
- [2] C. H. Lin, W. R. Fang, C. M. Kuo, W.Y. Chang, Y. C. Liu, W. Y. Lin, J. C. Wu, C. E. Lin (2008) Chiral separation of hydroxyflavanones in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis using sulfated cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A.* 1188: 301–307.
- [3] C. R. Mitchell, N. J. Benz, S. Zhang (2008) Comparison of the factors that contribute to retention on immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and macrocyclic glycopeptides chiral stationary phases with the Abraham model, *J. Chromatogr. B.* 875:65–71.
- [4] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson (2008) Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers, *J. Chromatogr. B.* 875:72–80.
- [5] I. Rahou(2013) Synthèse, activité biologiques et séparation chirale des dérivés Imino-Flavanones, mémoire de magister, Université de Béchar, Algérie, pp 62-66.
- [6] I. Rahou, N. Belboukhari, K. Sekkoum, A. Cheriti H. Y. Aboul-Enein (2014) Chiral Separation of 4-Iminoflavan Derivatives on Several Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases..., *Chromatographia*.
- [7] I. Rahou, K. Sekkoum, Nasser Belboukhari, A. Cheriti, and H. Y. Aboul-Enein (2016) Liquid Chromatographic Separation of Novel 4- Amino-Flavanes Series Diastereomers on a Polysaccharide-Type... *Journal of Chromatographic Science*, 1–7.
- [8] S. Antus, E. Baitz-Gacs, J. Kajtar, G. Snatzke, A. L. Tokks (1994) Circular Dichroism and Absolute Configuration of Aza- and Thiaflavanones, *Liebigs Ann. Chem*, 497-502.
- [9] A. L. Tokes, L. Szilagyi (1987) Resolution Of (\pm)-2,3-Dihydro-2-Phenyl-4(1H)-Quinolone, *Synth. Commun*, 17:1235-1245.

- [10] A. Slimani (2012) Synthèse, caractérisation, identification et Séparation TLC Chiral de 2-aryl, 2,3-dihydro-4 (1H)-quinolone, mémoire magister, Université d'Oran, Algérie, pp 81,93-94.
- [11] Adrienne L. Tokes (1987) Optical Resolution of (\pm)-2,3-Dihydro-2-phenyl-4H-1-benzothiopyran-4-one, *Liebigs Ann. Chem.* 1007-1008.
- [12] B. L. He (2010) Chiral Recognition in Separation Methods, A. Berthod (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 155,1156.
- [13] M. Zaher (2010) Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, pp 39.
- [14] R. Milcent (2007) Chimie organique, Stéréochimie, entités réactives et réactions. EDP Sciences. France, pp 88, 89.
- [15] M. Asztemborska, J. Zukowski (2006) Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods, *Journal of Chromatography A*, 1134:95–100.
- [16] N. Belboukhari, A. Cheriti, C. Roussel and N. Vanthuyne (2010) Chiral separation of hesperidin and naringin and its analysis in a butanol extract of *Launea arborescens*, *Natural Product Research*. 24(7): 669–681.
- [17] M. Cattania, J.M.F. Bassalo (2006) Racemization, chiral stability and weak interactions, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 102:441–449.
- [18] J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies (2007) Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *J. Chromatogr. B* 848:159–181.
- [19] K. R. Vega-Villa, C. M. Remsberg, K. L. Podelnyk, N. M. Davies (2008) Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of isosakuranetin in rat urine, *Journal of Chromatography B*. 875:142–147.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Dans notre Laboratoire des Molécules Bioactifs et Séparation Chirale (MBSC) et au cours de nos travaux de recherche, ce travail s'est attaché à étudier les propriétés énantiosélectives des dérivés de polysaccharides en CLHP chirale vis-à-vis les flavonoïdes chiraux. De nombreux médicaments chiraux, à caractère acide, neutre ou basique, présentant un noyau aromatique et un groupement polaire près du centre d'asymétrie ont été résolus sur ce type de PSC. Citons les alcaloïdes, les dérivés atropiniques, les β -bloquants, les antihistaminiques, les anti-inflammatoires. De plus, ces sélecteurs sont très intéressants à l'échelle préparative, en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge. De plus, ces sélecteurs sont disponibles en grandes quantités. Cependant, ils ne sont pas dirigés spécifiquement contre une molécule cible prédéterminée. Donc, un « screening » des sélecteurs disponibles doit être réalisé afin de développer une méthode de séparation appropriée aux énantiomères.

Dans ce travail nous avons présenté l'utilisation des phases stationnaires chirales, en tant que sélecteurs chiraux, à des fins de séparation des flavonoïdes chiraux et l'optimisation de différents paramètres chromatographiques en mode isocratique comprenant la composition de la phase mobile, nature de solvant organique et débit pour obtenir l'énantiorésolution complet de tous les composés étudiés.

Pour mieux comprendre la relation entre la modification structurelle et la séparation chirale, nous nous sommes intéressés notamment à présenter l'étude réalisée dans notre Laboratoire sur la séparation chirale des iminoflavanones sur différents PSCs, ainsi les études concernées par la séparation chirale ou l'étude des propriétés stéréochimique des analogues thio et Aza-Flavanones décrites dans la littérature afin d'étudier la relation entre la structure moléculaire et le mécanisme de discrimination chirale.

Une comparaison a été menée afin d'étudier l'influence de la position de substituant, la nature de sélecteur chiral, le diamètre des particules de gel de silice et leur type de liaison avec le sélecteur chiral sur les propriétés énantiosélectives de ces PSCs. Les expériences montrent que la PSC Chiralpak IA possède un pouvoir résolutif plus important que les autres PSCs. De plus cette colonne combine les propriétés séparatives des 2 colonnes chirales : Chiralpak IB et Chiralpak AD.

L'étude comparative montre l'influence de chaque substitution et chaque changement dans la structure sur la reconnaissance chirale, en générale les résultats fournis par cette étude démontrent l'influence de remplacement de la fonction carbonyle des flavanones par

Conclusion générale

une fonction imine sur la séparation chirale par augmentation dans la résolution de ses énantiomères.

Le remplacement isostérique de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ou un atome d'azote est devraient améliorer la biodisponibilité et la bioactivité, Bien que les propriétés chimiques et biologiques des N- et S-hétéro-analogues des flavonoïdes aient été étudiées, aucune étude n'a été abordée la séparation chirale de ces composés en utilisant les PSCs.

En conclusion chaque changement dans la structure affecte ou influe sur la séparation puis ce que chaque atome elle a sa propre empreinte.

Des expériences supplémentaires sont encore nécessaires, notamment en ce qui concerne l'application des méthodologies analytiques développées. Il serait intéressant de :

- Appliquer le mode gradient d'élution pour lequel on fait varier la composition du solvant en cours d'analyse en vue d'améliorer les séparations et surtout de raccourcir les temps d'analyse.
- Varier la température de la colonne par l'ajout d'un four à colonne au système afin d'améliorer les résolutions et diminuer les temps d'analyse et pour faciliter l'étude de racémisation par CLHP dynamique.
- Développer des sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible prédéterminé.

Enfin, puisque les énantiomères de flavanones peuvent posséder des activités biologiques différents, nous envisageons de continuer jusqu'à la séparation chirale préparative et nous espérons, ainsi, avancer dans les tests biologiques d'énantiomères purs.

Étude de thionation des flavanones pour accéder à des nouveaux analogues des flavanones non décrits dans la littérature, avec l'étude des propriétés biologiques et séparation chirale.

Résumé

Dans ce travail nous avons étudié la séparation chirale par CLHP de treize flavanones en mode de phase normal et en phase organique polaire en utilisant six phases stationnaires chirales dérivées des polysaccharides (Chiralcel OD-H, chiralcel OD, chiralcel OJ, Chiralpak AD, chiralpak IA et chiralpak IB) et diverses phases mobiles de n-alcane/alcool.

L'énantioséparation de la flavanone et de ses huit dérivés mono substitués est rapportée. Elle comprend quatre flavanones méthoxylées en positions ; 4', 5, 6 et 7 respectivement, et quatre flavanones hydroxylées en positions 2', 4', 6 et 7 respectivement. L'énantioséparation des aglycones, l'hespéretine et narigénine et la séparation diastériomérique de leurs flavanones glycosides, l'hespéridine et la naringine est réalisées. Le mécanisme de discrimination chirale de chaque phase stationnaire est suggéré, et basé sur la nature et la conformation chimique du sélecteur chirale.

Pour mieux comprendre la relation entre la modification structurelle et la séparation chirale, nous nous sommes intéressés notamment à présenter l'étude réalisée dans notre Laboratoire sur la séparation chirale des iminoflavanones sur différents PSCs, ainsi les études concernées par la séparation chirale ou l'étude des propriétés stéréochimiques des analogues thio et Aza-Flavanones décrites dans la littérature afin d'étudier la relation entre la structure moléculaire et le mécanisme de discrimination chirale.

Mots clés: Flavanones, iminoflavanone, CLHP, Enantioséparation, Séparation diastériomérique, Phase stationnaire chirale.

Abstract

In this work we studied the chiral separation by HPLC of thirteen flavanones in the normal-phase mode and organic polar mode using six polysaccharide-derived chiral stationary phases (Chiralcel OD-H, chiralcel OD, chiralcel OJ, Chiralpak AD, chiralpak IA and chiralpak IB) and various *n*-alkane/alcohol mobile phases.

The enantioseparation of flavanone and its eight mono substituted derivatives is reported including four methoxylated flavanones in positions; 4', 5, 6 and 7 respectively, and four hydroxylated in positions 2', 4', 6 and 7 respectively. Moreover, the enantioseparation of the two aglycones hesperetin, naringenin and the diastereomeric separation of their flavanone glycosides hesperidin and naringin were achieved. The chiral recognition mechanism of each stationary phase is suggested based on the chemical nature and conformation of the chiral selector.

To better understand the relationship between structural modification and chiral separation, we were particularly interested in presenting the study carried out in our Laboratory on the chiral separation of iminoflavanones on different PSCs, by the chiral separation or the study of the stereochemical properties of the analogs thio and Aza-Flavanones described in the literature in order to study the relationship between the molecular structure and the chiral discrimination mechanism.

Keywords: Flavanones, iminoflavanone, HPLC, Enantioseparation, Diastereomeric separation, Chiral stationary phase.

الملخص

تم خلال هذا البحث فصل المتماكبات اليدوية لثلاثة عشر فلافانونا بكروماتوغرافيا السائل ذو الكفاءة العالية ضمن شروط الطور العادي و الطور العضوي القطبي باستعمال ستة أطوار ثابتة متماكبة يدويا من مشتقات السكريات المتعددة هي: Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralpak IB, Chiralpak IA Chiralpak AD, Chiralcel OJ مع عدة أطوار سائلة مختلفة التركيب ألكان/كحول.

حيث تم فصل متماثلات الفلافانون و ثمانية من مشتقاته الأحادية التفرع منها أربعة ميثوكسيلية التفرع في المواضع 4، 5، 6 و 7 على الترتيب، و أربعة هيدروكسيلية التفرع في المواضع 2، 4، 6 و 7 على الترتيب، بالإضافة إلى فصل متماثلات كل من الهيسبريتين و النارنجين وثنائيات التماثل لنظيريهما الحلبيكوزيديين الهيسبريديين و النارنجين. كما قمنا بدراسة آلية التمييز بالاعتماد على طبيعة و بنية الطور الثابت المتماكب يدويا.

من أجل فهم مدى تأثير التغير في البنية الجزيئية على الفصل اليدوي قمنا بدراسة مقارنة بين النتائج المتحصل عليها مع نتائج فصل مركبات الامينوفلافانون و المشتقات الازوتية والكبريتية (حيث يكون الازوت أو الكبريت الذرة غير المتجانسة) وذلك من أجل دراسة مدى تأثير البنية الجزيئية على الية التمييز.

الكلمات المفتاحية: الفلافانون،امينوفلافانون، كروماتوغرافيا السائل ذو الكفاءة العالية، فصل المتماثلات، فصل ثنائيات التماثل، الأطوار الثابتة المتماكبة يدويا.