

*République Algérienne Démocratique Populaire.*  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique.  
Université Kasdi Merbah- OUARGLA-



## THESE

Présentée au département des sciences de la matière  
Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière

Pour obtenir le diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCE EN CHIMIE**

**Option : Chimie organique**

Par

**BOUANINI Meriem**

Thème

**Synthèse, séparation chirale et évaluation biologique des  
dérivés iminonaringine et iminonaringénine**

Soutenue le 10/02/2019 devant le JURY:

<b>Président</b>	<b>Mr. Mokhtar. SAIDI</b>	Professeur à l'université d'Ouargla
<b>Examineur</b>	<b>Mr. Salah. AKKAL</b>	Professeur à l'université de Constantine
<b>Examineur</b>	<b>Mr. Lazhar. BECHKI</b>	Professeur à l'université d'Ouargla
<b>Examineur</b>	<b>Mme. Ouanissa. SMARA</b>	Maître de conférences à l'université d'Ouargla
<b>Examineur</b>	<b>Mme. Messaouda. ALLAOUI</b>	Maître de conférences à l'université d'Ouargla
<b>Promoteur</b>	<b>Mr. Nasser. BELBOUKHARI</b>	Professeur à l'université de Béchar

# Dédicaces

A mes parents

A mon mari

A mes enfants : Sirine, Nassim , Loudgain et Anas

A mes sœurs et mes frères

A ma famille

## *Remerciements*

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué dans le Laboratoire des Molécules Bioactifs et Séparation Chirale (**LMBSC**). Je remercie chaleureusement son directeur et mon encadreur, **Nasser BELBOUKHARI**, professeur à l'université de Béchar, pour m'avoir encadré tout au long de ce travail. Il a été présent dans mes débuts incertains, dans mes moments de découragements. Toute ma reconnaissance pour son soutien et sa patience qu'il a su m'accorder pour mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier monsieur **Abdelkrim CHERITI**, professeur à l'université de Béchar et le directeur du Laboratoire de Phytochimie et de Synthèse Organique (**LPSO**), pour ses conseils et remarques pertinents.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et vive reconnaissance à monsieur le Professeur **J. Carlos Menéndez** de l'université de Madrid – Espagne, et à monsieur le Professeur **Hassan Y. Aboul-Enein** à l'université de Caire, Egypte.

Mes plus vifs remerciements vont au Docteur **Khaled SEKOUM**, Maître de conférences à l'université de Béchar, qui m'a aidé beaucoup au cours de ma formation.

Mes remerciements vont également à monsieur le professeur **Mokhtar SAIDI** de l'université d'Ouargla d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

J'aimerais également remercier monsieur le professeur **Salah AKKAL** de l'université de Constantine pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à madame le Maître de conférence **Ouanissa SMARA** et à madame le Maître de conférence **Messaouda ALLAOUI** de l'Université d'Ouargla pour avoir accepté de siéger le jury de ce travail.

Je tiens aussi à adresser tous mes remerciements au professeur **Lazhar BECHKI**, à l'université d'Ouargla, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ce travail.

Je souhaite adresser aussi toute ma sympathie à mes amis et collègues de laboratoire **LMBSC**. Un grand merci donc à Hayat, Ismahane, Aicha, Amin, Nadia, Khadîdja, Amel, Laila. Je voudrais également remercier l'administratrice du LPSO, Zohra.

## Résumé

Ce travail est consacré à la synthèse de nouvelles molécules organiques originales non décrites auparavant. Nous avons développé tout d'abord de nouvelles synthèses à réaliser à partir de deux flavanones différents, la naringine et la naringénine. Ces synthèses sont basées sur des réactions de condensations et d'additions nucléophiles en utilisant comme réactifs des amines primaires. Ceci nous a permis de préparer trente nouveaux dérivés de la naringine et la naringénine. Ces derniers sont caractérisés et identifiés par IR, UV, RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C.

La séparation chirale par CLHP de trente iminonaringine et iminonaringénine a été accomplie en mode phase normal et en phase organique polaire en utilisant cinq phases stationnaires chirales dérivés des polysaccharides (Chiralcel OD-H, Chiralcel OD, Chiralcel OJ, Chiralpak IA et Chiralpak IB) et diverses phases mobiles de n-alcane/alcool. La meilleure résolution pour nos produits synthétisés en utilisant deux phases stationnaires chirales à base de polysaccharides était pour Chiralpak®IB et Chiralcel®OD.

Finalement, pour mieux valoriser nos molécules synthétisées, des tests biologiques (antioxydants, antifongiques et antibactériennes) ont été effectués, et les résultats ont montré que ces dérivés ont présenté une activité antioxydante vis-à-vis du DPPH plus importante que celle de la naringine et la naringénine. Les tests antifongiques en utilisant les souches de *Candida albicans* sont négatifs, en ce qui concerne l'effet antibactérien les résultats nous ont permis d'affirmer que les produits synthétisés ont une activité inhibitrice faible vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Staphilococcus aureus* et négatives vis-à-vis d'*Entérocooccus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

**Mots clés :** Naringine, Naringénine, Imine, Synthèse, Séparation chirale, CLHP, Activité biologique

## Abstract

This work is devoted to the synthesis of new original organic molecules not previously described. We have first developed new syntheses achieved from two different flavanones, naringine and naringenin. These syntheses are based on reactions of condensations and nucleophilic additions using primary amines as reagents. This allowed the preparation of thirty new naringin and naringenine derivatives. These are all characterized and identified by IR, UV, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR.

The HPLC chiral separation of thirty iminonaringin and iminonaringenin was accomplished in normal and polar organic phase mode using five chiral polysaccharide-derived stationary phases (Chiralcel OD-H, Chiralcel OD, Chiralcel OJ, Chiralpak IA and Chiralpak IB), and various mobile phases of alkane / alcohol n. The best resolution for our synthesized products using two polysaccharide chiral stationary phases was namely for Chiralpak®IB and Chiralcel®OD.

Finally, in order to better value our synthesized molecules, biological tests (antioxidants, antifungals and antibacterials) were carried out, and the results showed that these derivatives exhibited an antioxidant activity with respect to the greater DPPH than that of naringin. and naringenine. The antifungal tests using *Candida albicans* strains are negative, as regards to the antibacterial effect, the results allowed us to affirm that the synthesized products have a weak inhibitory activity with respect to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. And negative for *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonasaeruginosa*.

**Keywords:** Naringin, Naringenin, Imine, Synthesis Chiral separation, HPLC, Biological activity

## ملخص

يهدف هذه العمل إلى تركيب مركبات أصلية غير متجانسة لم يتم تركيبها من قبل ، قمنا بتطوير طرق جديدة التحضير انطلاقا من النرانجين والنرانجين وتستند هذه المركبات على تفاعلات التكتيف والإضافات النيوكليوفيلية باستخدام عدة مفاعلات مثل الامينيات الأولية، سمحت لنا هذه الطرق بإعداد ثلاثين مشتقة جديدة أحادية وثنائية غير متجانسة من مواكبات النرانجين والنرانجين التي لم يتم تركيبها حتى الآن. هذه الاخيرة تم تمييزها وتحديدتها باستعمال طرق التحليل الطيفية UV، IR،  $RMN^1H$ ،  $RMN^{13}C$ .

تم فصل ثلاثين مركب إيمينونارينجين وإيمينونارينجينين بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة ضمن شروط الدور العادي والطور العضوي القطبي ، باستخدام خمس اطوار ثابتة متماكبة يدويا من مشتقات السكريات المتعددة (Chiralcel®OD-H, Chiralcel®OD), ( Chiralpak IA et Chiralpak IB Chiralcel OJ ) ، مع أطوار ساءلة ومختلفة التركيب ألكان / الكحول ن. تم التوصل إلى أفضل حل لمنتجاتنا المجمعّة باستخدام مرحلتين ثابتتين كربونيتين هما Chiralpak®IB و Chiralcel®OD .

أخيرا ، من أجل تقييم أفضل لجزيئاتنا المركبة ، أجريت الاختبارات البيولوجية (مضادات الأكسدة ، مضادات الفطريات ومضادات الجراثيم) ، وأظهرت النتائج أن هذه المشتقات لها نشاط مضاد للأكسدة فيما يتعلق بالـ DPPH أكبر من النرينجين. و النرنجين. الاختبارات المضادة للفطريات باستخدام سلالات المبيضات السلبية ، بقدر ما يتعلق الأمر بالتأثير المضاد للبكتيريا ، سمحت لنا النتائج بتأكيد أن المنتجات المصنعة لها نشاط مثبط ضعيف فيما يتعلق بالإشريشية القولونية والمكورات العنقودية. وسلبية للمكورات المعوية و الزائفة الزنجارية.

**الكلمات الرئيسية:** نارينجين، نارينجينين، إيمين، تركيب، فصل المتماكبات، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة ، النشاط البيولوجي.

# Table des matières

Dédicace	i
Avant-propos	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Table des matières	vi
Abréviations	xiv
Liste des Figures	xvi
Liste des Tableaux	Xix
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>

## *Chapitre I : Chimie et pharmacologie de Naringine et Naringenine*

I.1. Introduction	3
I.2. Les flavonoïdes	3
I-3 Description générale de la classe des flavanones	5
I-3-1 Chimie et classification des flavanones	5
I-3-2-La diversité et la distribution des flavanones	7
I-3-3-Synthèse des flavanones	8
I-3-4-Pharmacologie des flavanones	9
I-3-4-1 La biodisponibilité des flavanones	9
I-3-4-2 Etude pharmacocinétique des flavanones	9
I-3-4-3 Bioactivité des flavanones	10
I-3-4-3-1 L'activité antioxydante	10
I-3-4-3-2 Effets anti-cancer	10
I-3-4-3-3.Effet antimutagène	10
I-3-4-3-4 Effets pharmacologiques d'énantiomères purs des flavanones	11
I-4 Chimie de la naringénine	12
I-5 Chimie de la naringine	12
I-6 Sources de la naringenine et la naringine	12
I-7 Extraction de la naringine et naringenine	13
I-8 Purification de la Naringine et Naringenine	13
I-9 Solubilité de la Naringine et Naringenin	14

## Table des matières

I-10 Synthèse de la naringine et naringenine	14
I-11 Conversion de la naringine en naringenine	15
I-12 Identification et Analyse de la Naringine et Naringenine	16
I-13 Toxicité de la naringine et naringenine	17
I-14 Réactivité et activité biologique de la naringine et naringenine	18
I-14-1 Propriétés antioxydantes	18
I-14-2 Effets protecteurs vasculaires	18
I. 14. 3. Activité Antimicrobienne	18
I-14-4 Activité anti-carcinogène	19
I-14-5 Activité anti-inflammatoire	19
I-14-6 Activité anti-ulcèreux	20
I-15 Techniques de séparation chirale des flavanones décrites dans la littérature	20
I-15-1 Séparation chirale de l'Hespéridine et de Naringine	20
I-15-2 Séparation des énantiomères de Flavanone et du 2' hydroxychalcone	21
I-15-3 Séparation d'isomères optiques de flavanones et de flavanones glycosides	21
I-15-4 Séparation stéréoisomérique de quelques flavanones	21
I-15-5 Séparation chirale de l'Hesperétine et d'Hesperétine-O-glycosides	21
I-15-6 Séparation chirale des hydroxyflavanones par électrophorèse capillaire	22
I-16 Conclusion	22
Référence I	23

## Chapitre II : Etude Bibliographique sur les imines

II.1. Introduction	29
II.2. Réaction général de formation des imines (Base de Schiff)	29
II.3. Caractéristique générale de la Réaction	30
II.4. Mécanisme de formation des imines	30
II.5. Les réactions de formation des imines	31
II.5.1. A partir de L'ammoniac	31
II.5.2. A partir d'amine primaire	31
II.5.3. A partir de l'hydroxylamine	32
II.5.4. A partir de l'hydrazine	32
II.6. Importance des imines (bases de Schiff)	33



## Table des matières

II.7. Réduction d'imines et de nitriles	33
II.8. Propriétés spectroscopiques des bases de Schiff	35
II.9. Les méthodes de synthèse de quelque imines décrites dans la littérature	35
II.9.1. Synthèse de 2,4-dinitrophénylhydrazines	36
II.9.2. Synthèses des N –arylidenearylamines et des N –arylidenalkylamines	37
II.9.3. Synthèse de 4-Imino- flavones	37
II.9.4. Synthèse d'Imino-flavone	38
II.9.5. Synthèse des imino-hespéretines et iminohesperidines	39
II.9.6. Synthèse des imino-flavanones	40
II.9.6.a. Synthèse de Flavanonehydrazone	41
II.9.6.b. Synthèse de bis-imino-flavanone	41
II.9.7. Synthèse des 4- iminoflavan	41
II.10. Conditions de formation des imines	42
II.11. La stabilité des imines	42
II.12. Applications de la réaction de formation des imines	44
II.13. Conclusion	45
Référence II	46

### Chapitre III: Synthèse des dérivés d'imino naringine et d'imino naringine

III- 1-Introduction	51
III.2. Matériel et Méthodes	51
III- 3-Synthèse des dérivés de la naringine	52
III- 3-1-Mécanisme de la synthèse des imino naringines	52
III- 4-Synthèse des dérivés de la naringine	56
III- 4-1-Mécanisme de la synthèse des imino naringines	56
III.5. Analyse spectrale des différents composés synthétisés	59
III.5.1. Analyse UV	59
III.5.2. Analyse IR	61
III.5. 3. Analyse RMN <sup>1</sup> H et RMN <sup>13</sup> C	62
III. 6. Interprétation des spectres	62
III.7. Partie expérimentale	66
III. 7.1. Les dérivés d'imino naringine 3-17	66
III. 7.2. Les dérivés d'imino naringine 18-32	76

# Table des matières

III.8. Conclusion	87
<b>Chapitre IV: Séparation chirale des dérivés d’Iminonaringine et d’Iminonaringine par CLHP</b>	
IV. Introduction	88
IV.1. Chromatographie liquide haute performance	89
IV.2. Principe de CLHP	89
IV.3. Présentation du système CLHP SHIMADZU LC 20-A	89
IV.3.1. Dégazeur DGU-20A <sub>5</sub>	91
IV.3.2. La pompe LC-20AD	91
IV.3.3. L’injecteur	91
IV.3.4. Détecteur Shimadzu SPD-20A	92
IV.3.5. Contrôleur du système CBM-20Alite	92
IV.3.6. Système de traitement des données	92
IV.4. Etude de la séparation chirale des iminonaringines et des iminonaringininessur différentes PSCs	94
IV.4.1. Appareillage	95
IV.4.2. La phase mobile	96
IV.4.3. Les phases stationnaires chirales	96
IV.5. Méthodologie de travail	96
IV.5.1. Conditions chromatographiques	97
IV.5.2. Mise en marche du système HPLC	97
IV.5.3. Calculs des facteurs chromatographiques	98
a) Facteur de rétention k	98
b) Temps de rétention	99
c) L’efficacité de colonne	99
d) Facteur de séparation (sélectivité)	99
e) Facteur de résolution	100
IV.6. Résultat et discussion	100
IV.6.1 Séparation chirale des iminonaringines par CLHP	104

## Table des matières

IV.6.1.1 L'étude de la séparation en mode de phase organique polaire	104
IV.6.2 Séparation chirale des iminonaringines par CLHP	104
IV.6.2.1 L'étude de la séparation en mode de phase organique polaire	104
IV.6.2.2. L'étude de la séparation chirale en mode de phase normale	107
IV. 7. Mécanisme de résolution chirale	110
IV. 8. Conclusion	111
Références	112
<b>Chapitre V Evaluation biologique des dérivés d'Iminonaringenine et d'Iminonaringine</b>	
V.1. Introduction	115
V.2. Les antioxydants	115
V.2.2. Définition d'un antioxydant	115
V.2.3. Mécanismes d'actions des antioxydants	116
V. 2.4. Type des antioxydants	116
V.2.4.1. Les antioxydants endogènes	116
V. 2.4.2. Les antioxydants exogènes	116
V. 2.3. Les tests antioxydants	119
• Test de blanchissement du $\beta$ - Carotène	119
• Test au DPPH	119
V.3. Activité antimicrobienne	120
V.3.1. Effet antimicrobien	120
V. 3.2. Mode d'action des agents antimicrobiens	121
V.3.3. Germes soumis au test antibactérien	121
V. 4. Les antifongiques	122
V.4.1. Modes d'action des antifongiques	122
V.4.2. Résistance aux antifongiques	123
V.4. 3. Germe soumis au test antifongique	123
V.5.Partie expérimentale	124
V.5.1. Matériels et équipements utilisés	124
V.5.2. Mode opératoire	125
V.5.2.1 Test antioxydant	125
V.5.2.2 Test antibactérien	126
V.5.2.3 Test antifongique	128

## Table des matières

V.6.Résultats et discussions	128
V .7. Conclusion	133
Références	134
<b>Conclusion générale</b>	<b>138</b>

**Abréviations, Symboles et Unités utilisées.**

CL	Chromatographie Liquide
CLHP	Chromatographie Liquide sous Haute Pression
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
<i>J</i>	Constante de couplage
$\Delta$	Déplacement chimique
°C	Degrés Celsius
DDQ	Dichloro-dicyano quinone
DME	Diméthyl éther
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	<i>N,N</i> -Diméthyl Sulfoxyde
EC	Electrophorèse Capillaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
F3H	Flavanone 3- $\beta$ -Hydroxylase
N	Fréquence d'absorption
Glu	Glucose
Hz	Hertz
IR	Infrarouge
UV-vis	Ultraviolet- visible
RMN <sub>13</sub> C	Résonance Magnétique Nucléaire de Carbone 13
RMN <sub>1</sub> H	Résonance Magnétique Nucléaire de Proton
Rha	Rhamnose
Rut	Rutinoside
SM	Spectrométrie de Masse
$\Lambda$	Longueur d'onde
Mg	Microgramme
Mmol	Millimol
Nh	Néohesperidose
Nm	Nanomètre

Ppm	Partie Par Million
Pf	Point de fusion
k'	Facteur de capacité
A	Facteur de séparation
R	Rectus
S	Sinister
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	American type culture collection
BSs	Base de Schiff
CAT	Catalase
C.albicans	Candida Albicans
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FDA	Food and drug administration
HP $\beta$ CD	Hydroxypropoyl- $\beta$ -cyclodextrine
KBr	Bromate de potassium
MeOH	Méthanol
ROS	Reactive oxygen species
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Entrococcus faecalis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.auruginosa</i>	<i>Streptococcus auruginosa</i>
SOD	Super oxyde dismutase

## Liste des figures

---

<b>Figure I.1 :</b> Structure de base des flavonoïdes .....	03
<b>Figure I.2:</b> Principales classes des flavonoïdes .....	04
<b>Figure I. 3:</b> Squelette de base des flavanones.....	05
<b>Figure I. 4:</b> Structure de flavanone.....	05
<i>Figure I.5:</i> Structure de Rutinose et neohesperidose.....	07
<i>Figure I. 6:</i> Synthèse catalytique et énantiosélective de flavanones.....	08
<i>Figure I. 7 :</i> Synthèse des flavanones utilisant L-proline comme catalyseur.....	09
<i>Figure I. 8.</i> Structure de la naringénine.....	12
<i>Figure I. 9.</i> Structure de la naringine.....	12
<i>Figure I. 10:</i> Synthèse enzymatique de flavanones.....	13
<i>Figure I. 11:</i> Synthèse de flavanones à partir de la cyclisation du chalcone.....	15
<i>Figure I. 12 :</i> Hydrolyse de la naringine en naringénine.....	15
<i>Figure I. 13 :</i> Quelques signaux de RMN1H de la naringine.....	16
<i>Figure I. 14</i> Spectre de masse ionique du produit: naringine (A); la naringénine (B).....	17
<i>Figure I. 15 :</i> Chromatogrammes de séparation chirale des épimères de Naringine.....	20
<i>Figure II.1 :</i> Réaction général de formation des imines.....	29
<i>Figure II.2 :</i> Mécanisme de formation d'imine.....	30
<i>Figure II.3 :</i> Réaction de formation des imines à partir de L'ammoniac .....	31
<i>Figure II.4 :</i> Réaction de formation des imines à partir d'amine primaire .....	31
<i>Figure II.5 :</i> Réaction de formation des imines A partir de l'hydroxylamine.....	32
<i>Figure II.6 :</i> Réaction de formation des imines A partir de l'hydrazine.....	32
<i>Figure II.7.</i> Exemple d'une chaîne réactionnelle pour la biosynthèse de l'acide glutamique.....	33

## Liste des figures

<b>Figure II.8</b> Mécanisme de la réduction des imine par l'utilisation des hydrures métalliques .....	34
<b>Figure II.9:</b> Réaction de formation de 1-(2,4-diphényl)-2-(propan-2-ylidene) hydrazine .....	37
<b>Figure II.10.</b> Synthèse des N-arylidenearylamines .....	37
<b>Figure II.11.</b> Synthèse des N-arylidenealkylamines .....	37
<b>Figure II.12:</b> Synthèse des 4-imino-flavones selon UllahMughal et al, 2006.....	38
<b>Figure II.13:</b> Synthèse de l'héspétine-4-one-(benzoyle) hydrazone .....	38
<b>Figure II.14.</b> Synthèse d'imino-flavone .....	39
<b>Figure II.15.</b> Méthode de préparation des 4-iminohéspétines .....	39
<b>Figure II.16.</b> Méthode de préparation des bis-iminohéspétines .....	40
<b>Figure II.17.</b> Synthèse des 4-iminohésperidines .....	40
<b>Figure II.18.</b> Synthèse des bis-iminohéspédines .....	40
<b>Figure II.19.</b> Synthèse de Flavanonehydrazone .....	41
<b>Figure II.20.</b> Synthèse de bis imino-flavanone .....	41
<b>Figure II.21</b> .Synthèse de 4-iminoflavan .....	42
<b>Figure II.22.</b> Synthèse d'une imine à l'aide d'un Dean Stark .....	42
<b>Figure II.23.</b> Mécanisme général d'hydrolyse d'imine .....	43
<b>Figure II.24.</b> Différents groupements stables des imines .....	43
<b>Figure II.25.</b> Délocalisation de la double liaison de l'imine .....	43
<b>Figure II.26.</b> Réaction de formation d'oligomère .....	44
<b>Figure II.27.</b> Réaction de formation de l'imine de pyridoxal .....	44
<b>Figure III.01.</b> Structure de naringine .....	51
<b>Figure III.02.</b> Méthode de préparation des dérivés des 4-iminonaringénine 3-17 .....	52
<b>Figure III.03.</b> Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse des 4-iminonaringénine 3-17 .....	53
<b>Figure III.04.</b> Méthode de préparation des 4-iminonaringénine 18-32 .....	56
<b>Figure III.05.</b> Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse des 4-iminonaringénine 18-32 .....	57
<b>Figure III.06</b> .le spectre IR de produit 15 .....	63
<b>Figure III.07</b> .le spectre RMN1H de produit 15 .....	63



## Liste des figures

<i>Figure III.08. le spectre IR de produit 22</i> .....	65
<i>Figure III.09 : le spectre RMN1H de produit 22</i> .....	65
<i>Figure III.10 :le spectre RMN1H de produit 23</i> .....	66
<i>Figure IV.1 : Structure de base des flavanones</i> .....	88
<i>Figure IV.2. Les organes d'une chaine CLHP SHIMADZU LC-20A isocratique</i> .....	90
<i>Figure IV.3. Injecteur manuel</i> .....	92
<i>Figure IV .4 : Diagramme du système HPLC utilisé</i> .....	93
<i>Figure IV.5: Structure de la cellulose native, de l'amylose native</i> .....	94
<i>Figure IV.6. Les colonnes chirales utilisées</i> .....	96
<i>Figure IV.7.Chiralpak® IB (Cellulose tris-(3,5- dimethylphenylcarbamate)</i> .....	102
<i>Figure IV.8.Chromatogrammes de séparation énantiomérique des composés 1 et 16</i> .....	103
<i>Figure IV.9. Chromatogrammes montrant la séparation énantiomérique des composés</i> .....	104
<i>Figure IV.10.Les chromatographies présentent les séparations de quelques produits</i> .....	106
<i>Figure IV. 11.Resolution des diastéréoisomères en phase normal avec different phase PSCs</i> .....	109
<i>Figure V.1. Structure de Probucol</i> .....	117
<i>Figure V.2. Structure de N-acétylcystéine</i> .....	117
<i>Figure V. 3. structure de vitamine C</i> .....	117
<i>Figure V.4. structure de vitamine E</i> .....	118
<i>Figure V.5.Structure de la <math>\beta</math>-carotène</i> .....	118
<i>Figure V.6. Structure chimique du radical libre DPPH</i> .....	119
<i>Figure V.7. Photo des dérivés d'iminoaringine sur plaque CCM après le dépôt du DPPH</i> .....	125
<i>Figure V.8. Photo des dérivés d'iminoaringenine sur plaque CCM après le dépôt du DPPH</i> ...	126
<i>Figure V.9. Préparation d'inoculum</i> .....	127
<i>Figure V.10. Préparation des solutions de DMSO des dérivés synthétisés</i> .....	127
<i>Figure .V.11. Diamètres des zones d'inhibition des imines montrant des effets sur E.coli</i> .....	130
<i>Figure.V.12. Photos montrant l'effet des imines sur E. Coli</i> .....	131
<i>Figure .V.13. Diamètres des zones d'inhibition des imines montrant des effets surS.aureus</i> .....	131
<i>Figure.V.14. Photos montrant l'effet des imines surS.aureus</i> .....	132

## *Liste des figures*

---

<i>Figure.V.15. Photos montrant l'effet des imines sur P.aeruginosa.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure.V.16. Photos montrant l'effet des imines sur S.aureus.....</i>	<i>132</i>

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau I.1</b> : Applications pharmaceutiques de quelques flavonoïdes .....	05
<b>Tableau I.2</b> : Principales flavanones aglycones.....	06
<b>Tableau I.3</b> : Principales flavanones- <i>O</i> -glycosides.....	07
<b>Tableau II.1.</b> Description générales des protocoles de condensation décrits dans la littérature	36
<b>Tableau III.1</b> : Caractéristique physico-chimique des réactifs	52
<b>Tableau III.2</b> : Caractéristique physico-chimique des quinze dérivés naringine....	
<b>Tableau III.3</b> :Caractéristiquephysico-chimique des quinze dérivés naringine.....	57
<b>Tableau III.4</b> Les résultats d'analyse spectroscopie UV des iminonaringénines et iminonaringines	60
<b>Tableau III.5</b> Analyse IR des iminonaringénineetdes iminonaringines.....	61
<b>Tableau IV.1</b> : Les caractéristiques des phases stationnaires chirales utilisées.....	95
<b>Tableau IV.2</b> : Résultat chromatographique en phase organique polaire de la naringine et iminonaringénines	101
<b>Tableau IV.3</b> : Résultat chromatographique en phase organique polaire de la naringine et iminonaringénines	105
<b>Tableau IV.4</b> : Résultat chromatographique en phase normal.....	107
<b>Tableau V.1</b> : Matériels et équipements utilisés.....	124
<b>Tableau V.2</b> : Résultats du test antioxydant de produits 1-32.....	129

### Introduction générale :

Nous avons tous été témoins des évolutions importantes qui ont fait changer la façon d'aborder la recherche dans le monde du vivant. Il y a eu des révolutions technologiques dans quasiment toutes les disciplines des sciences de la vie. Les nouveaux outils disponibles s'affinent pour parer aux besoins non résolus, pour comprendre les processus biologiques complexes, pour concevoir de nouveaux concepts prometteurs, pour découvrir et produire de nouveaux principes actifs.

En 1884, Lord Kelvin met à jour la théorie pastoriennne en introduisant pour la première fois le terme de *chiralité*. Une entité moléculaire est chirale si elle se présente sous deux arrangements spatiaux, appelés énantiomères, non superposables à leur image dans un miroir. Depuis que la relation entre la structure moléculaire des énantiomères et l'activité biologique a été mise à jour, le domaine de la chiralité fascine toujours autant de scientifiques et est devenu un enjeu majeur dans de nombreux secteurs (santé, cosmétique, environnement et agrochimie)<sup>1,2</sup>

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules ayant des activités biologiques importantes telles que les flavanones. Ce sont des substances très répandues dans le règne végétal faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne, ainsi elles sont de plus en plus considérées comme les agents responsables de l'accroissement de l'espérance de vie chez les personnes ayant un régime alimentaire riche en fruits et légumes<sup>3</sup>

Dans cette optique, il serait très intéressant de disposer de molécules de structure originale afin d'évaluer leur activité ou celle de leur dérivés. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire LMBSC portant sur la synthèse des iminoflavanones à partir des flavanones s'inscrivent dans cette stratégie de même que le sujet de recherche qui m'a été confié.

Parmi les différents types de flavanones les plus étudiées, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la naringine et la naringenine qui sont des flavanones glycosidiques naturelles présentant des activités biologiques diverses, y compris l'effet

---

<sup>1</sup> Khater, S., West, C. 2014. Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with polysaccharide stationary phases *Journal of Chromatography A*, 1373, 197-210.

<sup>2</sup> Khater, S., West, C. 2014. Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for the direct determination of enantiomeric purity of provitamin B5 in cosmetic formulations with mass spectrometric detection *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 321-325

<sup>3</sup> Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison J.L, Remesy C 2009. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol*, 279:1148-1154.

d'antioxydant et anti- inflammatoire. Ces molécules présentent un centre de chiralité en position 2 dans le cycle lactonique, ainsi des centres de réactivités importantes ce qui lui permet d'être un synthon clé pour différentes synthèses et donc l'obtention de nouveaux hétérocycles intéressants et originaux <sup>4</sup>

L'étude, que nous avons entreprise dans le cadre de ce mémoire, a pour objectif principal la préparation, l'identification structurale et la séparation chirale de molécules non décrites à ce jour et qui portent au moins un centre chiral selon des méthodes réactionnelles simples et faciles à réaliser.

Le manuscrit sera donc articulé de la manière suivante :

Dans le premier chapitre, nous présenterons succinctement une description sur les deux molécules naringine et naringenine (structure et propriétés physico-chimiques).

Dans le deuxième, nous donnons les différentes méthodes de synthèse des imines et leurs dérivées.

Dans le troisième chapitre nous exposerons la partie expérimentale qui possède les protocoles de synthèse et l'identification structurale des iminonaringine et iminonaringenine préparées.

Le quatrième chapitre est un 'screening' sur la séparation de dérivés iminonaringine et iminonaringenine par les différents sélecteurs chiraux proposés.

Enfin, et pour valoriser nos dérivés nous avons introduit un cinquième chapitre pour les évaluer biologiquement à partir des tests réalisés sur quatre souches bactériennes, et une souche fongique ainsi nous avons réalisé un test qualitatif de pouvoir de piégeage des radicaux libre de ces dérivés.

Nous terminons par une conclusion générale et quelques perspectives jugées utiles pour ce travail.

---

<sup>4</sup> Gardana C, Nalin F et Simonetti P 2008.Evaluation of Flavonoids and Furanocoumarins from Citrus bergamia (Bergamot) Juice and Identification of New Compounds, *Molecules*, 13:2220-2228.

## Chapitre I :

## Chimie et pharmacologie de Naringine et Naringenine

**I.1. Introduction :**

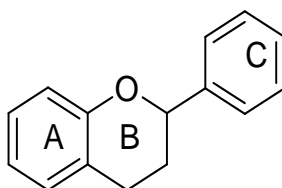
Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 9000 composés naturels connus, se sont des produits polyphénols largement distribués dans le règne végétal. Ils présentent une classe de métabolites phénoliques secondaires de plante et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes, écorces, graines et boissons. Ils sont considérés comme des pigments responsables des nuances de jaune, d'orange, et de rouge dans les plantes fleurissantes, ils sont également des facteurs importants pour la croissance, le développement, et la défense des plantes. [1].

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols et les flavanones. Ces derniers sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antivirales et antioxydantes [2-3].

Nous aborderons dans un premier lieu la définition des flavonoïdes et leur classification, puis nous parlons sur les flavanones en général. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par une description sur la naringine et la naringenine avant de terminer par leur propriété biologique.

**I.2. Les flavonoïdes :**

Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphenyl propane C6 -C3-C6 ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C (figure I.1) [3].



**Figure I.1:** Squelette de base des flavonoïdes.

### I-2-3 Classification

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C[4-5-6]. Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavanones, les flavanonols, les flavones, les flavonols, les flavanes, flavan-3,4-diol, les catéchines, les anthocyanidines, les chalcones, les dihydrochalcone et les iso-flavonoïdes ( figure I.2) [7-12]

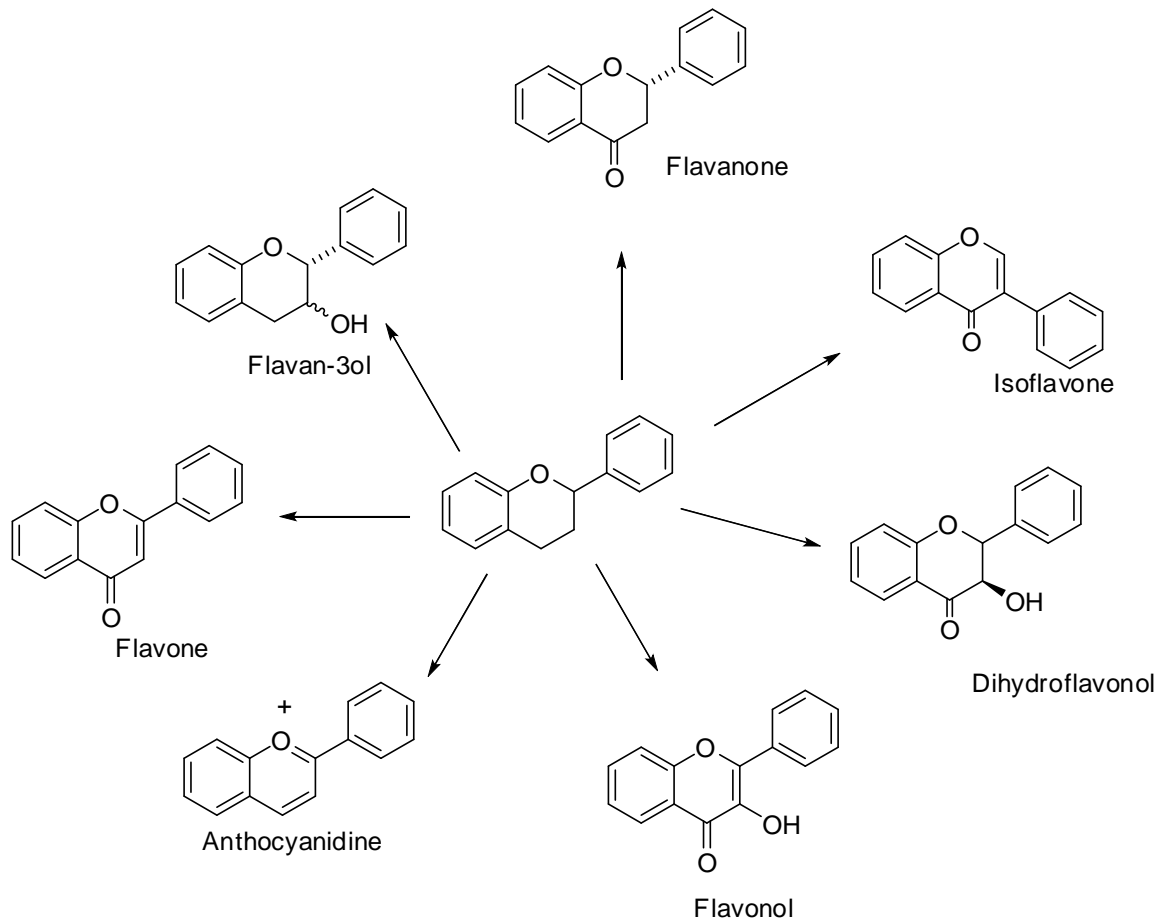


Figure I.2: Principales classes des flavonoïdes

### I-2-2 Quelques applications pharmaceutiques des flavonoïdes

Le domaine d'application des flavonoïdes est très vaste ; et selon leurs classifications et leurs diversités on peut trouver une large gamme des propriétés bénéfiques de ces composés ; le tableau ci-dessous (tableau.I-1) représente quelques vertus thérapeutiques des flavonoïdes. [13].

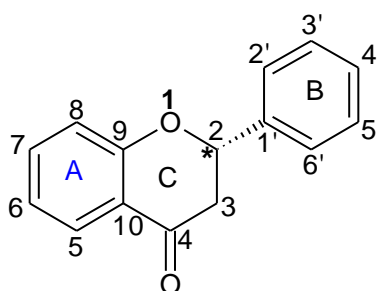
**Tableau I .1.** Applications pharmaceutiques de quelques flavonoïdes

Flavonoïdes	Propriétés	Références
Quercétine	Anti-inflammatoire, anti-tumeur, anti-virale	12
Flavones, flavonols, isoflavones, flavanones	Prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires	13
Hespéridine octonicotinoate	Traitement de l'hypercholestérolémie	13

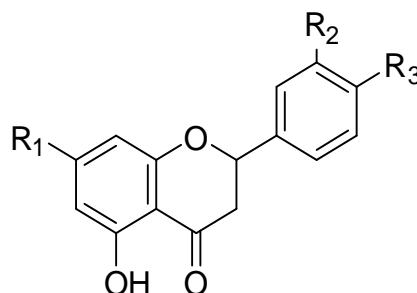
### I-3 Description générale de la classe des flavanones

#### I-3-1 Chimie et classification des flavanones

Les flavanones (2-phenyl- 2,3 dihydro-benzopyran-4-one), une des douze sous-classes des flavonoides, est principalement présente dans les agrumes et les légumes où ils sont habituellement trouvés comme 7-O-glycosides. [14-18].

**Figure I. 3:** Squelette de base des flavanones.

Parmi tous les autres flavonoïdes, la sous-classe des flavanones présente une caractéristique unique de posséder un centre chiral à la position C2 [15]. Ces flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison entre C-2 et C-3. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. (Figure I. 3) [16]

**Figure I. 4:** Structure de flavanone.



En flavanones, deux formes stéréoisomériques de chaque structure de flavanone sont possibles. (Figure I.3). 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. La structure des flavanones est très réactive et donne lieu à des réactions d'hydroxylations, d'*O*-méthylations, d'*O*-glycosylations, et à des réactions de polymérisation, d'acylation dans le but d'augmenter la stabilité, la solubilité, et la biodisponibilité de ces métabolites [6-20]. Les flavanone-7-*O*-glycosides représentent une classe importante des flavanones [21-22], se sont des pigments neutralisant les radicaux libres. Ils sont antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C[23-26].

Ces dérivés ont une substitution glycosylique exclusivement situant en position C-7 (sur le cycle A) [27]. Ces composés sont d'intérêt commercial en raison de leur multitude d'applications dans la nourriture et les industries pharmaceutiques [28].

Les bio-flavonoïdes de citrus sont riches en Rutine, Hespéridine, Eryodictol et Naringénine [29; 30].

Le tableau suivant (Tableau I.2) regroupe les principale flavanones aglycones. Tous ces aglycones ont une structure dans lequel deux groupes hydroxyle sont présents à l'extrémité C-5 et C-7 positions. En hespéretine et isosakuranetin de la C-4'position est méthoxylés [31].

**Tableau I. 2 :** Principales flavanones aglycones.

Nom de Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Hesperetine	OH	OH	OMe
Naringénine	OH	H	OH
Taxifilin	OH	OH	OH
Isosakuranetin	OH	H	OMe

Le tableau suivant (Tableau I.3) regroupe les principale flavanones-*O*-glycosides, et la Figure I. 5 représente la structure de Rutinose et neohesperidose [32].

Tableau I.3 : Principales flavanones-*O*-glycosides.

Nom de Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Hesperetin7- <i>O</i> -rutinoside (Hesperidine)	O-Ru <sup>a</sup>	OH	OMe
Naringenin7- <i>O</i> -neohesperidoside (Naringine)	O-Nh <sup>b</sup>	H	OH
Naringenin7- <i>O</i> -rutinoside (Narirutin)	O-Ru <sup>a</sup>	H	OH
Hesperetin7- <i>O</i> - neohesperidoside (Neohespéridine)	O-Nh <sup>b</sup>	OH	OMe

**a** :*O*-Ruthinose      **b** :neohesperidose.

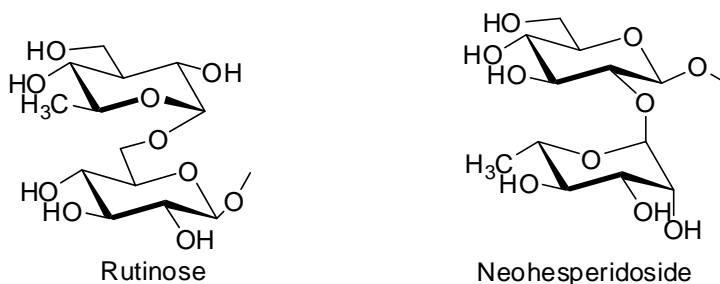


Figure I.5: Structure de la Rutinose et neohesperidose.

### I-3-2-La diversité et la distribution des flavanones:

Les fruits et les légumes sont riches en micronutriments tels que les vitamines et les antioxydants. Parmi ces composés phytochimiques, les flavanones sont largement distribués dans environ de 42 familles de plantes supérieures en particulier dans les Compositae, Leguminosae et Rutaceae [33]. Il ya quelques décennies, les flavanones sont seulement considérés comme des flavonoïdes mineurs [34]. Comme les chalcones, dihydrochalcones, dihydroflavonols et auronnes. Cependant, au cours des dernières années, le nombre total de flavanones connus a pris une telle ampleur qu'elles apparaissent désormais parmi les principales classes de flavonoïdes comme les flavones, les isoflavones, les flavanols, les flavonols et les anthocyanes [35].

Selon le type de plante, les flavanones peuvent être trouvés dans toutes les parties de la plante, aérienne, de la partie végétative à organes de la génération: souches, branches, l'écorce, les fleurs, les feuilles, les racines, rhizomes, graines, fruits, écorces etc ; outre les formes

aglycones des flavanones sont également présents ainsi que leurs conjugués. Ils peuvent être classés en plusieurs sous-groupes en fonction de leur O-substitution (OH et OMe), C-méthylation, Cprenylation et C / O-glycosylation [36]. Jusqu'à présent, environ 350 aglycones flavanone et 100 glycosides flavanone ont été découverts dans la nature [34]. Les formes glycosidiques représentent une proportion importante des flavanones conjugués.

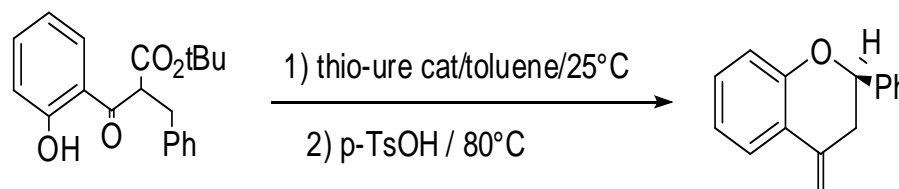
Il est préférable à noter que les plus fortes concentrations de flavanones se trouvent au pelage que par rapport à la partie charnue d'agrumes [38]. Parmi les flavanones, les aglycones, la naringénine et hespérétine et leurs glycosides qui sont d'un intérêt particulier en raison de leur forte prévalence dans les aliments.

### I-3-3-Synthèse des flavanones

Les flavanones comme la naringénine, l'ériodictyol et la diocléine sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes. La méthode standard de synthèse de flavanones est l'isomérisation de la 2'-hydroxychalcone qui conduit à un mélange racémique de flavanones [39; 40; 41].

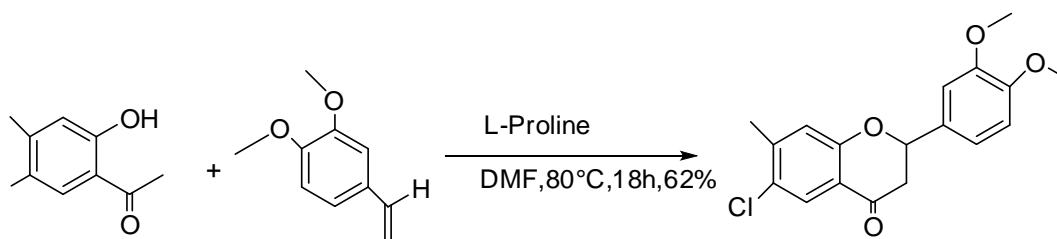
Ces réactions ne sont pas quantitatives, il faut engager plusieurs fois la chalcone dans l'équilibre pour obtenir un rendement satisfaisant [39].

Des fins industrielles ont justifié l'amélioration de la synthèse de flavanones par de nouveaux travaux : par exemple, une catalyse en milieu hétérogène a été mis au point, avec des structures nanocristallines d'oxyde de magnésium MgO [39-42]. L'une des caractéristiques du motif flavanone est son centre stéréogène en position 2 ; sa synthèse asymétrique est donc également envisageable et des synthèses organo-catalysées ont été développées, utilisent les thio-urées chirales (figure I. 6) [39].



**Figure I. 6:** Synthèse catalytique et énantiosélective de flavanones.

Chandrasekhar et al, 2005 créent une nouvelle synthèse des flavanones catalysées par le *L*-proline (figure I. 7) [43].



**Figure I. 7 :** Synthèse des flavanones utilisant *L*-proline comme catalyseur.

### I-3-4-Pharmacologie des flavanones

#### I-3-4-1 La biodisponibilité des flavanones

Une grande partie des études de biodisponibilité a été consacrée à la naringénine, hespérétine et de leurs glycosides. L'amélioration des méthodes d'analyse des métabolites du flavanone en plasma et l'urine chez l'homme ont permis d'estimer la biodisponibilité du flavanone, toutefois 10h après l'ingestion, les concentrations de la naringénine similaires ont été trouvées quelle que soit le régime, qui a clairement montré l'absorption intestinale retardée du rhamnoglucoside naringénine [39]. Il a été aussi confirmé chez l'homme que l'hespéridine et naringine sont absorbés dans la partie distale de l'intestin.

Des études structurales sur le plasma et les métabolites urinaires ont montré que la majeure des métabolites de la naringénine sont : la naringénine-7-glucuronide, la naringénine-4'-glucuronide, naringénine-7-sulfate-4'-glucuronide, la naringénine-7-glucuroconjugué-4'-sulfate et naringénine-7, 4'-disulfate [44].

#### I-3-4-2 Etude pharmacocinétique des flavanones :

Après l'administration par voie orale de 500 mg de naringine, l'analyse d'urine des volontaires a été optimisée pour la détermination de la naringénine et de ses métabolites [37]. De plus, la pharmacocinétique de la naringénine et de ses glucuronides dans le plasma chez le rat et le tissu cérébral a été réalisée avec succès par CLHP [44]. L'étude a été étendue pour déterminer les niveaux de la naringénine dans le sang du rat, du cerveau, du foie et de la bile, à l'aide de microdialyse couplé avec un système CLHP [45].

Très probablement, le premier rapport sur la pharmacocinétique de flavanones sur des sujets humains a été publié par Erlund et al en 2001. Après l'ingestion de jus d'orange ou de pamplemousse (8 mL / kg de poids corporel), la concentration du plasma de l'hespérétine et ses aglycones (naringénine après déconjugaison) a été trouvée dans la plage de 0,6 à 6 mol / L. De

plus, la demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) dans la gamme de 1,3 à 2,2 h montré un jeu relativement rapide. Le pourcentage de flavanones excrétés dans l'urine était inférieur à celui de leur absorption, ce qui indique une distribution importante dans les tissus de ces composés phénolique [12].

### **I-3-4-3 Bioactivité des flavanones**

Au cours des dernières décennies, des recherches approfondies ont été menées sur les composés diététiques qui pourraient être protecteur contre les maladies mortelles, en particulier les maladies cardio-vasculaires et certains types de cancers [33].

#### **I-3-4-3-1 L'activité antioxydante :**

L'activité antioxydante des flavanones dépend du nombre, de l'espace et la disposition des groupes OH phénoliques [9]. Jusqu'à présent, dans des investigations *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées afin de déterminer le potentiel antioxydant des aglycones flavanone, les chalcones et les glucosides. Une étude comparative sur les propriétés antioxydantes de neuf flavanones différents (naringine, la néohespéridine, neoeriocitrin, l'hespéridine, narirutin, la naringénine, hespérétine, heridictyol et isosakuratermin) en utilisant le test d'inhibition de blanchiment crocine a montré que la présence d'un noyau catéchol (3', 4'-dihydroxy substitution sur le cycle B) et son O-méthylation n'ont pas d'effet significatif sur l'AA d'aglycones, ce qui est surprenant. En revanche, une augmentation des AA a été observée avec les glycosides ayant un noyau catéchol tout O-méthylation de la catéchol a un effet opposé [11].

#### **I-3-4-3-2 Effets anti-cancer**

En termes de biologie moléculaire et cellulaire, le cancer est une maladie de l'expression du gène anormal. Récemment, l'hespérétine 7-glucuronide (Hp7G) a été démontré qu'elle affecte des ostéoblastes différenciation [50]. Les flavanones majeurs des agrumes peuvent être efficaces dans la lutte contre la carcinogénèse en minimisant les dommages à l'ADN, le développement de la tumeur et la prolifération.

#### **I-3-4-3-3. Effet antimutagène**

Les flavanones peuvent protéger les dommages au niveau d'ADN par leur capacité à absorber la lumière UV. Les résultats à partir d'un modèle UV irradiée d'ADN plasmidique ont montré un effet considérable sur la protection de naringénine contre la lumière UV induite par les dommages de l'ADN [31]. L'activité antioxydante modérée la capacité de flavanone qui peut

également être utile dans la protection contre la mutation par les radicaux libres générés près de l'ADN. En outre, la naringine inhibe également la cytotoxicité induite par  $H_2O_2$  et l'apoptose, éventuellement par l'intermédiaire de son effet sur  $H_2O_2$  induit l'expression d'un gène associée à l'apoptose[28]. La naringénine peut présenter comme antimutagène : modification de l'ADN stimulant, et réparation, à la suite des dommages oxydatifs dans les cellules cancéreuses de la prostate[16].

#### I-3-4-3-4 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. Aucune énantiosélectivité intéressante 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 [23, 24].

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une méthode appropriée pour la détermination de la Naringine et la Naringénine dans des extraits de *Citrus*, de plante, des fluides biologiques et des formulations pharmaceutiques [18], utilisent une colonne C-18 à phase renversée [18; 52-57] et une phase mobile aqueuse se composant de l'eau, de l'acétonitrile [58], du méthanol et du tétrahydrofurane ajoutés aux quantités mineures d'acides. La plupart de ces méthodes sont précises et peuvent être employées pour le contrôle de qualité des concentrés et des jus industriels [52]. Le système à phase renversée de CLHP a été employé pour séparer 141 flavonoïdes comprenant la naringine. La colonne plus utilisée était Lichrosorb RP-18 [52] ; ou les colonnes métallisées par  $\beta$ -cyclodextrine, car elles permettent de séparer des diastérisomères de flavanone-7-O-glycoside en extraits de *Citrus sp.* [18], la phase mobile est une combinaison d'un isocratique et les éluions de gradient comme méthanol-eau (acide formique à 0.2%) et un détecteur UV [53]. La naringine et les flavanones glycoside sont généralement détectés à 280 nm [18; 52; 54; 55]. Ils ont également discuté la corrélation entre la structure et les valeurs de temps de rétention de différents flavonoïdes.

#### I-4 Chimie de la naringénine

La naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone)(figure 1.8) se trouve en concentrations élevées dans les agrumes tandis que de faibles concentrations également trouvé dans les tomates et leurs produits [22].La naringénine se trouvent aussi sous forme aglycone et / ou en tant que glycosides. Parmi ces derniers, la naringine et les narirutin sont particulièrement abondants [41].

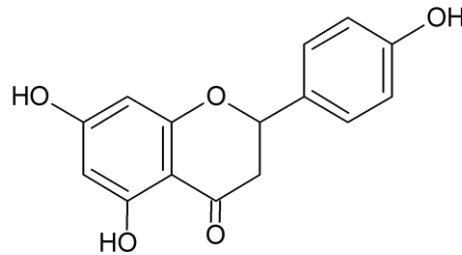


Figure I .8. Structure de la naringénine

#### I-5 Chimie de la naringine

La Naringine (4',5,7-trihydroxy flavanone-7-rhamnonglucoside) (figure 1.9) est un flavonoïde glycoside [13]. Il est le principal hétéroside des flavonoïdes du pamplemousse et donne aux jus de pamplemousse une saveur amère[14],il présent aussi dans les agrumes et de nombreux médicaments traditionnels chinois [15].

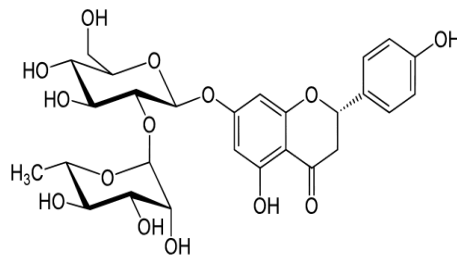


Figure I .9. Structure de la naringine

#### I-6 Sources de la naringénine et naringine :

La naringine est l'un des principaux citroflavonoïdes isolée en grands nombres des écorces jetées de l'orange ordinaire *Citrus aurantium* L.= l'oranger amer [44-45], *C. sinensis* = l'oranger doux [45], *C. unshiu* *Citrus limon* = le citronnier [47], *Citrus aurantifolia* = le

limettier (Citron vert) [46], *Citrus paradisi (maxima)* = le pamplemoussier [07, 46], *Citrus reticulata* = le mandarine [46], *Citrus medica* = Citron [47], et d'autres espèces du genre *Citrus* (appartenant à la famille des *Rutacées*) [49]. Aussi ; dans des genres *Fabacées*, *Bétulacées*, *Lamiacées* et *Papilionacées* (l'argousier (*Hippophaë rhamnoides.*)) [49; 52].

La Naringenine 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 naringenine (l'aglycone de la naringine) (8-42 mg/kg) qui se trouve aussi dans l'espèce du genre *Rhus retinorrhoea*. [49; 52].

Les espèces du genre *Citrus*, (telles que l'oranger doux, le citronnier, le limettier ...) sont des arbres ou des arbustes, cultivés abondamment dans les régions tempérées chaudes (Bassin méditerranéen [50], Floride, Californie, Australie...), et dans les secteurs tropicaux

### I-7- Extraction de la naringine et naringenine :

#### 1-7-1 A partir *HippophaëRhamnoides* :



**Figure. I.10 :** L'argousier (*Hippophaë rhamnoides.*)[49]

Un sirop commercial contenant de fortes quantités d'extrait de baies de la plante *HippophaëRhamnoides* a été utilisé comme matériel de départ. A 500 millilitres de sirop, on ajoute de l'acide chlorhydrique (concentration finale 1 N) et le mélange est chauffé dans un bécher pendant quinze minutes à 100°C. Après refroidissement, le matériel hydrolysé est additionné d'un excès d'acétone (3 à 4 fois le volume). Le mélange est agité à la température du laboratoire (agitation mécanique). Après quelques instants de repos, deux phases apparaissent. La phase supérieure (acétone) est devenue d'un brun-jaune soutenu. Elle est prélevée et gardée. Le traitement de la phase aqueuse par de l'acétone est répété plusieurs fois jusqu'à ce que l'acétone devienne très pâle. Ensuite, plusieurs extractions sont pratiquées de la même manière avec de l'éther en vue d'extraire le maximum d'agent actif (Naringine et



naringénine). [47], Les phases acétones sont réunies entre elles, et distillées. Les phases éther sont réunies entre elles et distillées, les sols vents pouvant servir à d'ultérieures extractions. [49].

La comparaison avec la naringine commerciale utilisée comme étalon (dissolution dans l'alcool éthylique) est faite selon plusieurs critères. Le spectre ultraviolet d'absorption de 220 à 310 nm est déterminé en utilisant 4 à 20 µg (microgrammes) de naringine/millilitre. Le spectre du produit isolé selon l'exemple 1 coïncide essentiellement avec celui obtenu avec le produit de référence. Illustration dans la figure 1. La naringénine a pratiquement le même spectre au maximum d'absorption (290 nm) que la solution de référence. Sur papier de chromatographie ou sur plaque de gel de Silice, la naringine est isolée comme le fait de la naringine commerciale en utilisant l'alcool éthylique comme solvant. Les spots (taches) sont détectés par la lumière UV et sont, dans les deux cas, proches du front de solvant. Le même procédé d'extraction et de purification a été directement appliqué aux fruits de l'Hippophae. La préparation selon cette méthode est plus soluble dans l'eau et possède une meilleure activité biologique, comparaison faite avec les composés commerciaux. Cette différence est probablement due à la présence de petites quantités de sucre ou lipides dans la préparation. La Naringine préparée selon la méthode illustrée porte le nom de " JO-1 " et les tests ont été réalisés sous ce même nom [49].

### **1-7-2 A partir de citrons verts :**

La peau de citrons verts est prélevée, broyée au "mixer " en mélange aqueux. Pour l'isolement de la naringine, le même procédé a été utilisé. Certains pamplemousses peuvent aussi servir de source d'extraction de la naringénine ou de la naringine [49].

### **1-7-3 A partir de Racines d'endives (chicorumendivia)**

Les racines d'endives poussées en terre sont lavées puis la couche externe noire est enlevée (grattage). Les racines sont lavées, coupées en morceaux, broyées avec de l'eau afin de produire un mélange épais qui est mis à bouillir 30 min (100°C); Le liquide est alors filtré sur tissus, les débris végétaux sont réextraits dans les mêmes conditions à plusieurs reprises. Les filtrats sont réunis, concentrés, puis hydrolysés avec l'acide chlorhydrique (concentration finale 1 N) pendant 10 min à 100°C, puis refroidis. Les étapes suivantes de purification sont les mêmes que celles décrites dans.

Dans tous les exemples cités dans la présente invention, la Naringine provient de baies d'HippophaeRhamnoides (une préparation commerciale) à partir de laquelle nous avons extrait le produit selon la méthode de illustrée [49].

### I-8 Purification de la Naringine et Naringenine

La purification de la naringine et naringenine a été facile en raison de sa solubilité satisfaisante en méthanol, le solvant le plus souvent choisi pour cette purification.

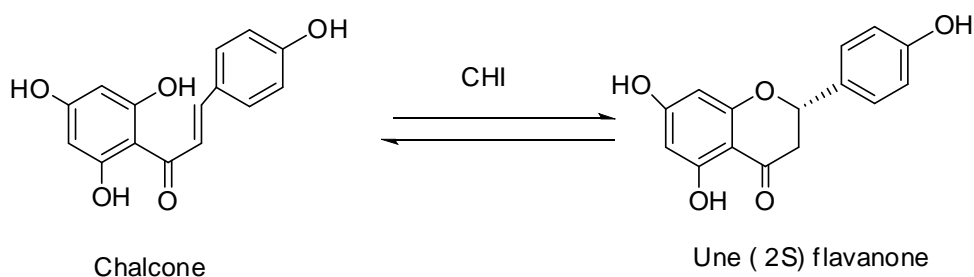
Une fois qu'un extrait polaire convenablement de l'écorce de pomploumousse est obtenu, un nettoyage préliminaire est avantageux. La méthode classique de séparer de la naringine est de précipiter avec de l'acétate, suivi de l'acidification [33].

### I-9 Solubilité de la Naringine et Naringenin

Les solubilités du naringine et de la naringénine dans différents solvants augmentent avec une augmentation de température. La solubilité de la naringine dans les six solvants était dans l'ordre méthanol, acétate d'éthyle, n- butanol, isopropanol, éther de pétrole, hexane, et la solubilité de la naringénine dans ces solvants suit l'ordre acétate d'éthyle, isopropanol, méthanol, n- butanol, éther de pétrole, hexane. La solubilité de la naringénine était significativement plus élevée que la naringine dans tous les solvants choisis en raison de la polarité plus similaire de la naringénine avec les solvants. [33-38].

### I-10 Synthèse de la naringine et naringenine

Les flavanones sont des isomères de 2'-hydroxychalcones, issues de la transformation du motif linéaire en motif cyclique (cycle C) [38]. La Chalcone Isomérase (CHI) catalyse la cyclisation, de la chalcone en flavanone, créant un centre stéréogène en position C-2. Ainsi que, grâce à la stéréospécificité de cette réaction enzymatique, la grande majorité des flavanones sont de configuration (2S)- flavanones (**Figure I. 10**)

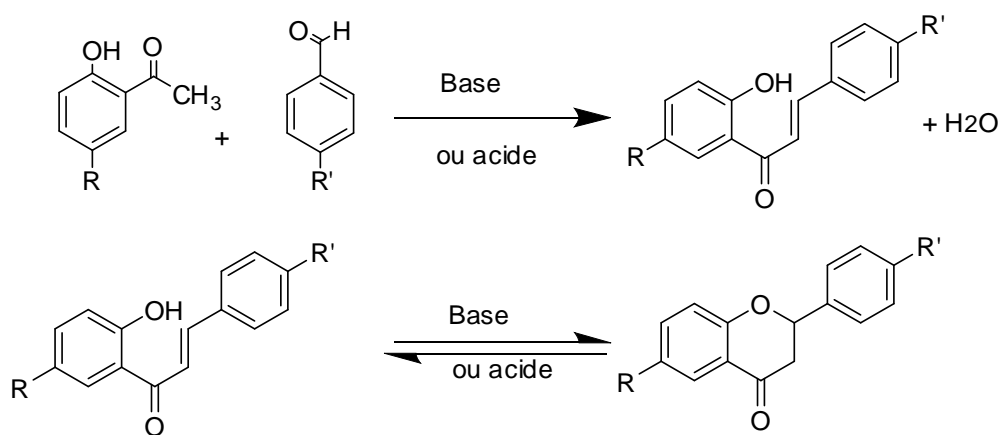


**Figure I. 10** : Synthèse enzymatique de flavanones.

La méthode traditionnelle pour la synthèse des flavanones comprenant aussi la naringine, se compose d'une addition conjuguée intramoléculaire des *O*-hydroxychalcones, au système cyclique carbonyle correspondant. Cette réaction peut être exécutée utilisant des acides, silica gels, bases, la lumière.

La cyclisation catalysée par un acide peut être effectuée en chauffant au reflux le chalcone dans l'acide acétique, ou également dans l'éthanol ou tout autre solvant approprié, en présence d'un catalyseur acide tel que H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [34].

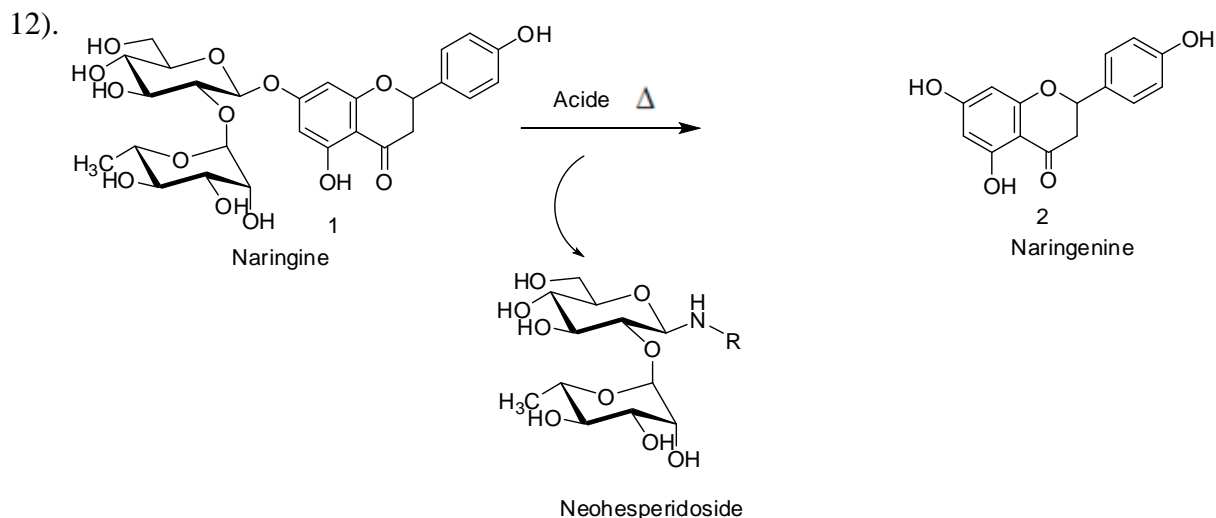
Les chalcones correspondants, à leur tour, sont habituellement obtenus par la condensation d'aldol des *O*-hydroxyacétophénone et des benzaldéhydes [35] selon la Figure I. 11 suivante :



**Figure I. 11:** Synthèse de flavanones à partir de la cyclisation du chalcone

### I-11 Conversion de la naringine en naringenine :

Le catalyseur acide dégradé la naringine en la naringenine, et en neohesperidoside (Figure I. 12).



**Figure I. 12 :** Hydrolyse de la naringine en naringenine utilisant un catalyseur acide. [34].

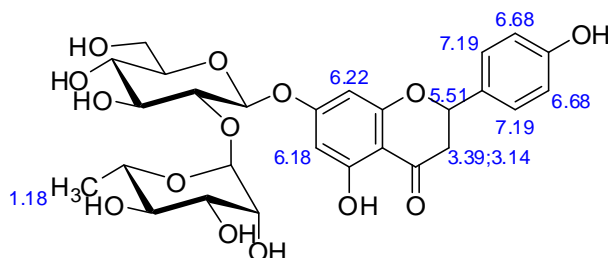
### I-12 Identification et Analyse de la Naringine et Naringenine

La naringine peut être séparé et identifié dans une opération par le couplage de CLHP à l'ultraviolet (UV), à la masse (SM), ou aux détecteurs de résonance magnétique nucléaire (RMN). [33 ;38].

Comme la plupart des flavonoïdes qu'absorbent la lumière entre 240-400 nm , les flavanones montrent une forte absorption d'environ 220-265 nm (Bande I), et une intensité réduite d'environ 280-330 nm , représentant la bande II [33].

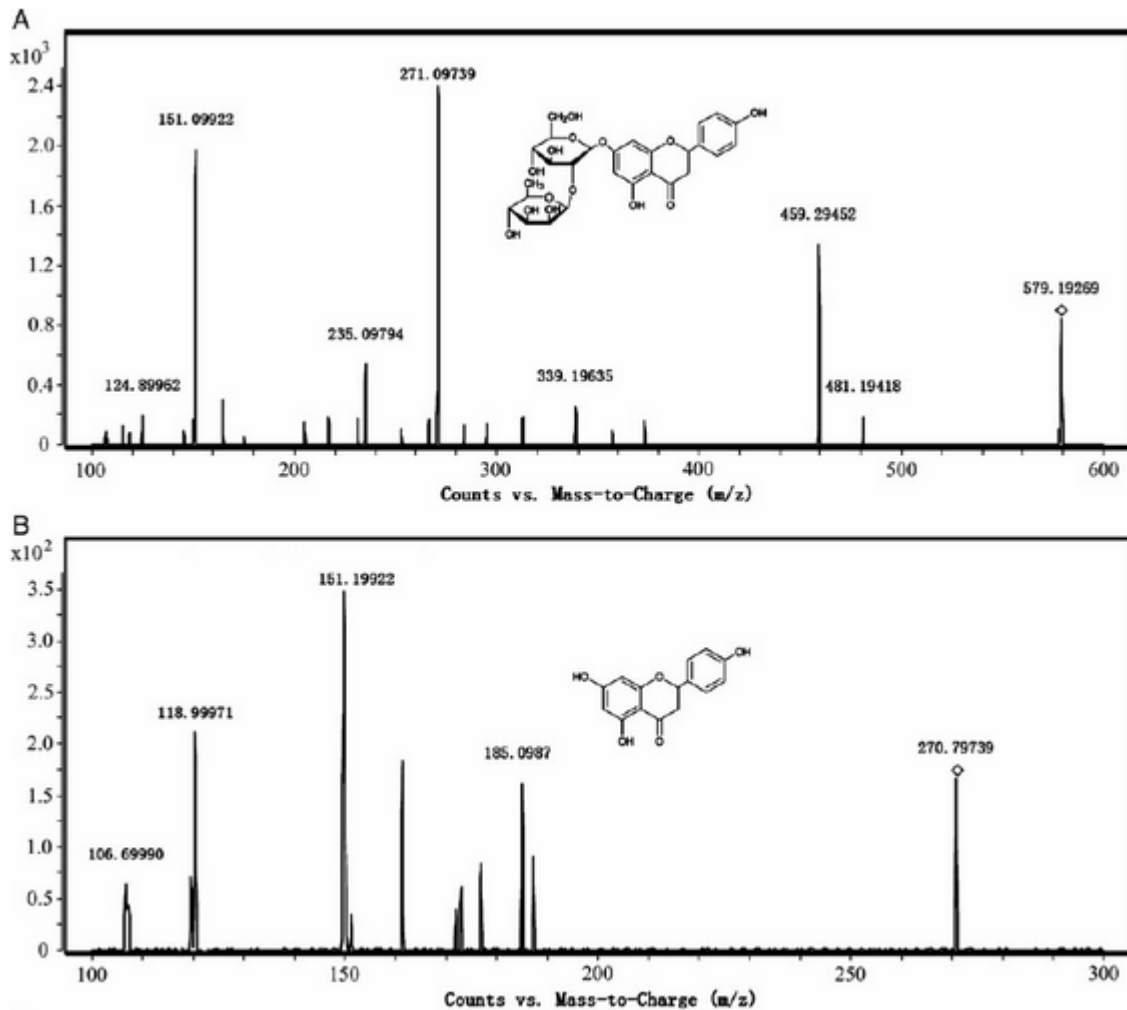
Les spectres RMN<sup>1</sup>H de la Naringine et la Naringenine dans la solution DMSO-d<sub>6</sub> ont été également étudiés et les valeurs pour les déplacements chimiques et les constantes de couplage ont été présentées (Figure I. 14) [33 ;38]. L'analyse des spectres de RMN montre que:

- Les signaux de 2 protons doublets entre 6,18 et 6,22 ppm dont les constantes de couplage indiquent qu'ils sont en position méta sur le cycle A ;
- Le spectre montre également 3 multiplets à 5,51 ppm (H-2), 3,39 ppm (H-3<sub>a</sub>), 3,14 ppm (H-3<sub>b</sub>). Le fort déblindage du proton H-2 indique qu'il est porté par un carbone lié à l'atome d'oxygène au niveau du cycle C ;
- Le spectre de RMN<sup>1</sup>H montre plusieurs signaux compris entre 5,6 et 2,5 ppm, se sont les protons de la partie osidique [38].



**Figure I. 13 :** Quelques signaux de RMN<sup>1</sup>H de la naringine

En plus, la naringine et la naringenine ont été analysées par *la chromatographie liquide /spectrométrie de masse* (CL-SM) [38]. La caractérisation des isomères différant dans le glycosylation s'est avérée possible sur la base de différents spectres de masse.



**Figure I. 14** Spectre de masse ionique du produit: naringine (A); la naringénine (B)

### I-13 Toxicité de la naringine et naringénine :

En général, les citroflavonoïdes, y compris la naringine semblent être extrêmement sûr et sans effets secondaires, même pendant la grossesse. Basé sur une expérience chez des souris mâles et femelles, il a été établi que la naringine phosphorylée (PH) n'a pas été toxique tant pour l'organisme et de tissus, facilement assimilables, non accumulative et n'a pas causé de réactions allergiques [61].

### I-14 Réactivité et activité biologique de la naringine et naringénine :

Il a plusieurs fonctions biologiques comme antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-carcinogène et comme protecteur vasculaire :

### I-14-1 Propriétés antioxydantes

La naringénine a montré une plus grande capacité antioxydante et l'efficacité du piègeur de radicaux hydroxyle et superoxyde. La glycosylation a atténué l'efficacité de l'inhibition de l'enzyme xanthine oxydase et l'aglycone pourrait agir comme un chélateur plus actif des ions métalliques que le glycoside. De plus, la naringénine a montré une plus grande efficacité dans protection contre les dommages oxydatifs aux lipides chez un sujet manière.

Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité anti oxydante des flavanones en comparant la Naringénine avec la Naringine. [52].

### I-14-2 Pharmacocinétique

Comme la naringénine est généralement présente dans les aliments liés aux sucres  $\beta$ -glycosides (c'est-à-dire naringine), on pensait à l'origine l'absorption par l'alimentation serait négligeable. Cependant, un nombre d'études ont détecté la naringénine dans l'urine humaine [40-45].et plasma [46].Après des doses orales de naringine [45]ou jus de pamplemousse [40-43].Furh et al., [46].ont montré que l'excrétion de naringénine glucuronides chez l'homme atteint des niveaux plus de 100 fois plus élevés concentration de naringénine excrétée dans l'urine. Hackett et al., [48].ont montré qu'une voie majeure pour les flavonoïdes le métabolisme chez le rat est excrété dans la bile. Ceci généralement survient après la conjugaison de l'hydroxyle polaire flavonoïde groupes avec l'acide glucuronique, le sulfate ou la glycine. Naringénin présent dans la bile peut être excrété ou réabsorbé, augmentant ainsi la possibilité de recyclage entéro-hépatique.

La naringénine a été détectée dans le plasma après l'administration orale de la naringine ou de jus de pamplemousse mais est généralement signalées comme étant inférieures aux limites de détection précises [48-50].et pas été signalé à dépasser 4 m M (10). Cependant, en raison de nature lipophile de la naringénine, il est possible qu'il s'accumule dans les tissus, en particulier les membranes, et finit par atteindre des concentrations plus élevées que celles observées dans le plasma. Cette accumulation se produirait probablement dans des tissus tels que le foie et l'intestin.

### I. 14. 3. Activité Antimicrobienne

La naringine, entre d'autres flavonoïdes, a montré des activités anti-infectantes et anti-répliquative *in vitro* contre des plusieurs des microbes de plante et d'animal.

**I. 14. 3. a. Antibactérienne**

Les flavonoïdes sont des substances antibactériennes efficaces contre une large gamme de micro-organismes (Basile et al., 1999 ; Ghedira, 2005 ; Al-Momani et al., 2007 ; González-Segovia et al., 2008 ; Orhan et al., 2010) . Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et solubles et à se complexer avec la paroi bactérienne.

La rutine, forme glycosyle de la quercétine, est la plus active des flavonoïdes avec une activité anti-listeria (Rodríguez-Vaquero et al., 2007b). Les flavones sont de forts inhibiteurs des bactéries Gram-, alors que les flavonoïdes contenant deux ou trois groupements hydroxyyles sur le cycle A et B sont plus actifs contre les bactéries Gram+ (Orhan et al., 2007). Rauha et al. (2000) ont rapporté que la quercétine et la naringénine sont actives contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. [54-55].

**I. 14. 3. b. Antifongique**

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante l'une des plus récentes études sur cette activité démontré une activité des flavanones glycosides de *Citrus Parasidi* et de *citrus sinensis* sur *penicillium digitatum*. En effet la Naringénine, l'Hespéridine extraite de ses deux espèces de *Citrus* servent a protéger ces derniers contre les attaques de *p. digitatum* [43, 44].

**I-14-4 Activité anticancérigènes**

Études animales impliquant des rats et des souris, ainsi que in vitro Des études utilisant des lignées cellulaires humaines ont démontré naringénine capacité à inhiber la cancérogenèse à trois étapes: promotion tumorale, angiogenèse et croissance tumorale.

Naringénin est également connu pour causer cytotoxique et apoptotique effets sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses d'une manière dose-dépendante ainsi que inhibe la croissance tumorale dans le sarcome S-180 implanté souris, ce qui suggère que la naringénine peut potentiellement être utilisé pour inhiber la croissance tumorale [54-59]. Les effets cytotoxiques étaient également induite dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines lorsque de fortes concentrations de naringénine ont été administrés (efficace à 50% concentration: 150-560 pM). Cependant, l'utilisation de flavonoïdes comme agents anticancéreux chimiothérapeutiques ou chimiothérapeutiques nécessite le développement de nouveaux flavonoïdes ou naringénine dérivés pouvant induire une cytotoxicité à de faibles concentrations d'une manière dépendante du type de cellule [58-61].

**I. 14. 5. Activité anti-inflammatoire**

La pathogenèse de la maladie inflammatoire de l'intestin (IBD) comme la colite ulcéreuse (CU) est généralement associée à une réduction capacité antioxydante. Génération de radicaux libres comme réactifs espèces d'oxygène (ROS) conduit à des lipides par oxydation, qui inhibe la capacité antioxydante cellulaire, ce qui entraîne inflammation du côlon. Il y a un grand besoin de rechercher un coffre-fort et des composés tolérables pour la gestion de l'inflammation à réduire la compliance du patient ainsi que les effets indésirables de traitements conventionnels. Naringine est un naturel flavonoïde qui peut être extrait des agrumes, des tomates, cerises, pamplemousses et cacao. Comme la plupart des flavonoïdes, naringenine a été trouvé expérimentalement avoir plusieurs potentiels pharmacologiques, y compris les anti-inflammatoires à cause de naringenin a des propriétés pour produire suffisamment substitutions d'hydroxyle (-OH), qui lui donnent la capacité de Récupérer les ROS. Ainsi, il a considéré que la naringénine peut diminuer et / ou améliorer les conditions pathologiques l'oxydation ou l'inflammation est considérée comme jouant un rôle vital [53].

**I. 14. 6. Activité anti-ulcèreux**

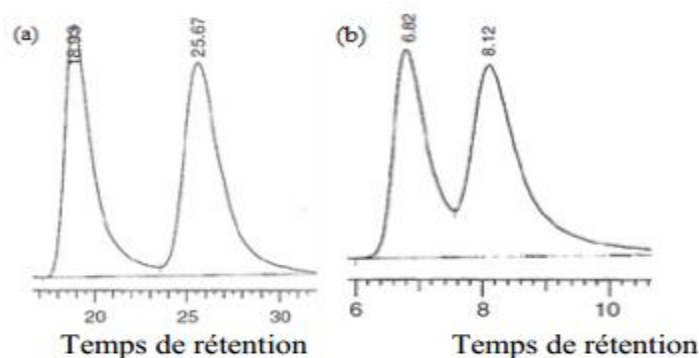
Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la Quercétine et la Naringenine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la Quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production 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, Naringenine, 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 [37].

**I-15 Techniques de séparation chirale des flavanones décrites dans la littérature :****I-15-1 Séparation chirale de l'Hespéridine et de Naringine et son analyse dans l'extrait****butanolique de *Launea arborescens***

Belboukhari et al (2010) rapporte le criblage de la séparation chirale de la Naringine et de l'Hespéridine par CLHP sur 11 phases stationnaires chirales (PSCs) (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) les meilleurs résultats pour les deux flavanones sont obtenus sur Chiralpak IC avec hexane/éthanol 70 :30 (Figure I.15) [69].



**Figure I. 15** : Chromatogrammes de séparation chirale des épimères de Naringine sur Chiralpak IA (a) (phase mobile hexane/éthanol 70:30) et de l'Hesperidine sur Chiralpak IC (b) (phase mobile hexane/éthanol/TFA 70:30:0.1), T=25°C, débit=1ml/min,  $\lambda$ =254nm

#### **I-14-2 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 PSCs de deuxième génération à base d'amylose Chiralpak IA en conditions à phase inverse [70].

#### **I-15-3 Séparation d'isomères optiques de flavanones et de flavanones glycosides**

Ahmed et al (2010) ont appliqué la Nano chromatographie liquide avec la phase stationnaire phenyl-carbamate-propyl- $\beta$ -Cyclodextrine pour la séparation énantiomérique ou diastéréoisomérique de plusieurs flavanones (Flavanone, 2'-Hydroxyflavanone, 4'-Hydroxyflavanone, 6-Hydroxyflavanone, 7-Hydroxyflavanone, 4'-Méthoxyflavanone, 6-Méthoxyflavanone, 7-méthoxyflavanone, Hespéretine, Hespéridine, Narigénine, et Naringine). La séparation chirale de tous les composés étudiés a été obtenue en mode à phase inverse en utilisant un mélange de H<sub>2</sub>O/MeOH en tant que phase mobile [72].

#### **I-15-4 Séparation stéréoisomérique de quelques flavanones**

Kwon et Jung (2011) ont isolé et le  $\alpha$ -Cyclosphoro-octadecaoses ( $\alpha$ -C18) à partir de Rhodobacter sphaeroides et l'employé avec succès dans l'électrophorèse capillaire (CE) comme additif chiral pour la séparation de cinq flavanones et flavanone-7-O-glycosides, y compris la Narigénine, l'Hesperetine, l'Eriodictyol, le Homoeriodictyol, l'Isosakuranetine, et l'Hespéridine.

Ils ont constaté que la séparation chirale réussie dépend de la présence des substituants succinate attachés au  $\alpha$ -C18 en CE [73].

#### **I-15-5 Séparation chirale de l'Hesperetine et d'Hespéretine-O-glycosides par électrophorèse capillaire**

Les  $\beta$ -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. Euna Cho et al (2009) ont étudié la séparation énantiomérique de l'Hespéretine, l'Hespéridine et la Neohespéredine en utilisant Les  $\beta$ -1,2-Glucans sous forme neutre ou anionique en tant qu'additif chiral en électrophorèse capillaire L'Hespéridine présente la meilleure résolution avec ce sélecteur, alors que les énantiomères de la Neohespéredine ne peuvent pas être résolus, l'Hesperetine présente une résolution partielle [74]

#### **I-15-6 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  $\beta$ -cyclodextrine aléatoirement substitué (S- $\beta$ -CD) a été étudiés par Lin et al (2008). Les résultats indiquent que le S- $\beta$ -CD est un excellent sélecteur chiral pour l'énantioséparation du 2'- hydroxyflavanone et un bon sélecteur chiral pour le 3'- hydroxyflavanone. Les énantiomères du 4'-hydroxyflavanone pourrait être effectivement séparés avec le S- $\beta$ -CD à une concentration de 2.0% (poids/volume) dans un délai de 20 mn [75-76]

### **I-16 Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons rapporté un rappel bibliographique sur les flavonoïdes et flavanones, ainsi nous avons présenté la source et l'intérêt biologique de la naringine et la naringenine, qui ont un motif clé pour la condensation avec les amines (la synthèse des imino-naringines et iminonaringenines).

## Références

1. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N et Osawa T 1998. Protective Effects of Lemon Flavonoids on Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Lipids*. 33: 689-695.
2. Aturki Z, Brandi V et Sinibaldi M 2004. Separation of Flavanone-7-O-glycoside Diastereomers and Analysis in Citrus Juices by Multidimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52: 5303-5308.
3. Pietta P, Gardana C et Pietta A 2003. Flavonoids in Herbs. In: Rice-Evans CA et Packer L (éd) Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, New York, pp. 43-69.
4. Chira K, Suh JH, Saucier C et Teissèdre PL 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 06 : 75-82.
5. Havsteen BH 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96: 67–202.
6. GattusoG. et all 2007 Flavonoid Composition of Citrus Juices, *Molecules*.12 ;1641-1673.
7. Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 63–67.
8. Wistuba D, Trapp O, Gel-Moreto N, Galensa R et Schurig V 2006 Stereoisomeric Separation of Flavanones and Flavanone-7-O-glycosides by Capillary Electrophoresis and Determination of Interconversion Barriers. *Analyticalchemistry*. 78: 3424-3433.
9. Winkel BSJ 2006. The Biosynthesis Of Flavonoids. In: Grotewold E (éd) The Science of Flavonoids. Springer, US, pp. 70-95.
10. Maltese F, Erkelens C, Kooy Fvd, Choi YH, Verpoorte R 2009. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food chemistry*. 116: 575-579.
11. Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A et Del Río JA 1997. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 45: 4505- 4515.

12. Tusa N, Abbate L, Renda A et Ruberto G 2007. Polyphenols Distribution in Juices from *Citrus* Allotetraploid Somatic Hybrids and Their Sexual Hybrids. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 55 : 9089-9094.
13. Portet B 2007. (doctorat) Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Université Paul Sabatier Toulouse III, France.
14. Hadj salem J 2009. (doctorat) Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologiques de Flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et Synthèse de Dérivés de ces Molécules par Voie Enzymatique. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
15. Marais JJ, Deavours B, Dixon RA et Ferreira D 2006. The Stereochemistry of Flavonoids. In: Grotewold E (éd) *The Science of Flavonoids*. Springer, US, pp. 01-46;
16. Proteggente AR, Rice-Evans CA, Wiseman S et van de Put FHMM 2003. The Relationship Between the Phenolic Composition and the Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables. In: Rice-Evans CA et Packer L (éd) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 71-95.
17. Kyle JAM et Duthie GG 2006. Flavonoids in Foods. In: Andersen ØM et Markham KR (éd) *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 219-262.
18. Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M et Resnik SL 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*. 124 : 1411–1415.
19. Ghedira K 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04 : 162-169.
20. Orallo F, Álvarez E, Basaran H, Lugnier C (2004) Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesteraseinhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 370: 452-463.
21. Ishii K, Ishii K, Furutab T, Kasuya Y 1997 Determination of naringin and naringenin in human urine by highperformance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*(704): 299–305.

22. Koh E et Mitchell AE 2006. Trends in the Analysis of Phytochemicals: Flavonoids and Carotenoids. In: Meskin MS, Bidlack WR et Randolph RK (éd) *Phytochemicals: Aging and Health*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 39-76.
23. Davies KM et Schwinn KE 2006. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In: Andersen ØM et Markham KR (éd) *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 143-218.
24. Chebil L 2006. (doctorat) Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Institut National Polytechnique de Lorraine, France ;
25. Poaty-Poaty B 2009. (doctorat) Modification Chimique d'Antioxydants pour les Rendre Lipophiles : Application aux Tannins. Université Henri Poincaré – Nancy I, France.
26. Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M et 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.
27. Gorinstein S, Huang D, Leontowicz H, Leontowicz M et al 2006. Determination of Naringin and Hesperidin in Citrus Fruit by High-Performance Liquid Chromatography. The Antioxidant Potential of Citrus Fruit. *Acta Chromatographica*. 17 : 108-124.
28. Fang T, Wang Y, Ma Y, Su W, Bai Y, Zhao P 2006. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*(40):454–459.
29. GuoaD, WangaJ, WangaX. , Luoah , ZhangaH, CaoaD, Chena L, HuangaN, 2011 Double directional adjusting estrogenic effect of naringin from *Rhizomadrynarieae* (Gusuibu). *Journal of Ethnopharmacology*(138):451– 457.
30. Ye XQ, Chen JC, Liu DH, Jiang P, Shi J, Xue S, Wu D, Xu JG et Kakuda Y 2001. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*. 124: 1561–1566.
31. Coll MD, Coll L, Laencina J et Tomás-Barberáán FA 1997. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 206: 404-407;

32. Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, Chang HR, Lin TH, Yang WE, Hsieh YS et Chu SC 2007. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via downregulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 167 : 193–206.
33. Vallejo F, Larrosa M, Escudero E, Zafrilla MP, Cerdá B, Boza J, García-Conesa MT, Espín JC, et Tomás-Barberán FA 2010. Concentration and Solubility of Flavanones in Orange Beverages Affect Their Bioavailability in Humans. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 58 : 6516–6524.
34. Cavia-Saiz M., *et al.*, 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric*, 90(7):1238-44.
35. Sagrera GJ et Seoane GA 2005. Microwave Accelerated Solvent-Free Synthesis of Flavanones. *J Braz Chem Soc*. 16(04): 851-856.
36. Wang X, Cheng S 2006. Solvent-free synthesis of flavanones over aminopropyl functionalized SBA-15. *Catalysis Communications*. 07 : 689–695.
37. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V et Fenoll J 1999. Spectro fluorometric determination of hesperidin by manual and flow-injection methods. *Fresenius J Anal Chem*. 364 : 279–283.
38. Fuhr U., *et al.*, 1995. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions. *Clin Pharmacol Ther*, 58:365-373.
39. Hackett A.M., *et al.*, 1979. The biliary excretion of flavanones in the rat. *Xenobiotica*, 9:491–502.
40. Hertog M.G.L., *et al.*, 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study, *Lancet*, 342:1007-1011.
41. Hertog M.G.L., *et al.*, 1995. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 155:381-386.
42. Choi J.S., *et al.*, 1991. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J Nat Prod*, 54:218-224.
43. Dou.w., *et al.*, 2009. Protective effect on naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/ NF- kB signaling. *Br J Nutr*, 110(4): 599- 608.
44. Chandrasekhar S, Vijeender K et Reddy KV (2005) New synthesis of flavanones catalyzed by L-proline. *Tetrahedron Letters*. 46 : 6991–6993.

- 45.
46. Ishii K., *et al.*, 1997. Determination of naringin and naringenin in human urine by high performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 704:299–305.
47. Johnson, A.R., *et al.*, 2013. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev*, 249: 218–238.
48. Jong-Hwa P., *et al.*, 2010. Cytotoxic Effects of 7-o- Butyl Naringenin on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Food Sci. Biotechnol*, 19(3): 717-724.
49. Keli S.O., *et al.*, 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen Study. *Arch Intern Med*, 156:637-642.
50. Kim J.H., *et al.*, 2015. Naringenin enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Archives of pharmaceutical research*.
51. Duganathl N, Sridhar C, Jaya veera KN 2013. Synthesis, characterization and antioxidant activity of some novel naringin semi synthetic derivatives .*IndoAm.J.Pharm.Res*; **3**:1547-1559.
52. Fuhr U, Kummert AL. 1995 The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *J Clin Pharm. Ther*; **58**: 365–373.
53. *Ribeiro MH 2011. Naringinases: occurrence, characteristics and applications. J Appl. Microbiol. Biotechnol*; **90** : 1883-1895.
54. Basile, A. ; Giordano, S. ; López-Sáez, J. A. et Cobianchi, R. C. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 52:1479-1482
55. Orhan, I.; Özcelik, B. et Şener, B. (2007). Antiviral and antimicrobial evaluation of some heterocyclic compounds from Turkish plants. *Top Heterocycl Chem*, 11: 303-323.
56. Lee Y.S., *et al.*, 1998. A method for measuring naringenin in biological fluids and its disposition from grapefruit juice by man. *Pharmacology*, 56:314-317.
57. Middleton E., *et al.*, 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Merck Index*; 43:1167-1179.
58. Nagy E., *et al.*, 1985. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and populi gemma by the GC/MS method. *Elsevier*, 1985:223-232.

59. Rajadurai M., *et al.*, 2009. Naringin ameliorates mitochondrial lipid peroxides, antioxidants and lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytother. Res*, 23: 358-362.
60. Rimm E.B., *et al.*, 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, 125:384-389.
61. Salim S., *et al.*, 2013. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol*, 19(34): 5633-5644.
62. Seo E.K., *et al.*, 1997. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry*, 45:509-515.
63. Maltese F, Erkelens C 2009. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*; **116**:575-579.
64. Havsteen B. Flavonoids 1993. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol* ; 32 : 1141-1148.
65. Mantas A, Deretey E, Ferretti FH, Estrada MR. Csizmadia IG 2000. Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity, *TheoChem* ; **504** : 171-179.
66. Batra P, Sharma AK 2013. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives *Biotech*; **3**: 439-459.
67. van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WF 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol* ; 56 :935-943
68. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C 2004. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules. *Free Radical Biol Med*; **36**: 838-849.
69. J. Pan , S. Zhang , L. Yan , J. Tai , Q. Xiao , K. Zoue, Y. Zhoue, J. Wu 2008. *J. Chromatogr. A*, 1185:117-129
70. R. Cirilli , R. Ferretti, E 2008. De Santis, B. Gallinella, L. Zanitti, F. L. Torre J. *Chromatogr. A*. 1190:95-101.
71. Li. M. Yuan 2008. *Technology*. 63:701-705.
72. K. S. Ahmed, F 2010. Tazerouti, A. Y. B-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D. Orazio, A. Roccoa, S. Fanali *J. Chromatogr. A*. 1217:1175-1182.
73. Chanhon Kwon, Seunho Jung 2011. *Carbohydrate Research* 346: 133-139.
74. E. Cho, Y. Jeon, and S. Jung. (2009) *Chiral Bull. Korean Chem. Soc.* 30(8): 1870-1872.



75. Belboukhari N 2012. Enantioseparation of hydroxyl flavanones on amylose and cellulose CSPS by HPLC methods *J Chromat Separation Techniq*; 3 : 67–68.
76. Lahmer N, Belboukhari N, Cheriti A 2011. Méthodes et techniques de la séparation chirale des flavanones *J Phytochem Bio Sub* 2011; 5:1–4.

## Chapitre II :

## Etude Bibliographique sur les imines

## II.1. Introduction :

Les imines ont depuis longtemps, été exploitées largement à des fines analytiques ; elles connaissent actuellement un développement considérable en chimie thérapeutique et en chimie des polymères [1]. Les premières synthèses de ce type de composés (imine) ont été réalisées en 1864 par schiff, c'est ainsi que ces composés ont pris ensuite leur nom (base de schiff). Ils sont obtenus par condensation d'une amine primaire avec un aldéhyde ou une cétone [2].

Nous allons, au cours de ce chapitre, aborder la synthèse organique des Imino Naringine et Imino Naringenine en utilisant nos information acquise au recherche bibliographique sur la synthèse des imines en générale et choisir le meilleur mode opératoire pour former les composés Iminonaringine et Iminonaringenine.

## II.2. Réaction général de formation des imines (Base de Schiff) :

Une base de Schiff est le produit de la réaction entre un composé carbonylé et une amine primaire Figure II.1. Par extension, on appelle base de Schiff tout produit comportant une double liaison C=N issue de la réaction entre un azote nucléophile et un composé carbonylé [3]. Les imines peuvent être considérées comme étant des analogues des aldéhydes et des cétones, car elles sont obtenues par remplacement de l'oxygène carbonyle par un atome d'azote [4].

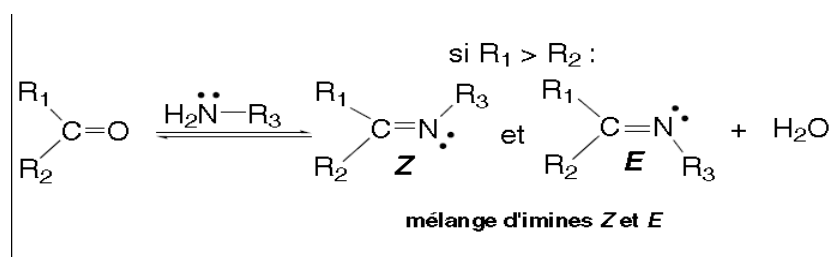


Figure II.1 : Réaction général de formation des imines.

### II.3. Caractéristique générale de la Réaction :

Les imines sont des composés très utiles. Elles servent notamment à synthétiser des amines plus complexes. Cependant ; la réaction de condensation est réversible, ce qui rend les imines très sensible vis à vis de l'hydrolyse. Il est en outre très difficile de les isoler sous forme de substance pure [5].

Notons qu'il faut ajouter normalement un catalyseur acide pour former l'imine, sans catalyse acide la réaction est très lente, bien qu'elle puisse se produire dans certains cas (les oximes, par exemple, se forment sans catalyse acide mais elles se forment beaucoup plus vite avec une catalyse acide) [7].

### II.4. Mécanisme de formation des imines

Les imines, sont préparées le plus souvent par la réaction de condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone avec une amine primaire [8]. Le mécanisme de cette méthode est une addition suivant d'une élimination. Première étape : activation du caractère électrophile du dérivé carbonyle par protonation de l'atome d'oxygène. Deuxième étape : attaque nucléophile de l'amine sur le dérivé carbonyle protoné. Troisième étape : déprotonation. Quatrième étape : protonation de l'atome d'oxygène. Cinquième étape : élimination intramoléculaire d'eau. Sixième étape : déprotonation de l'imine (figure II.2) [9].

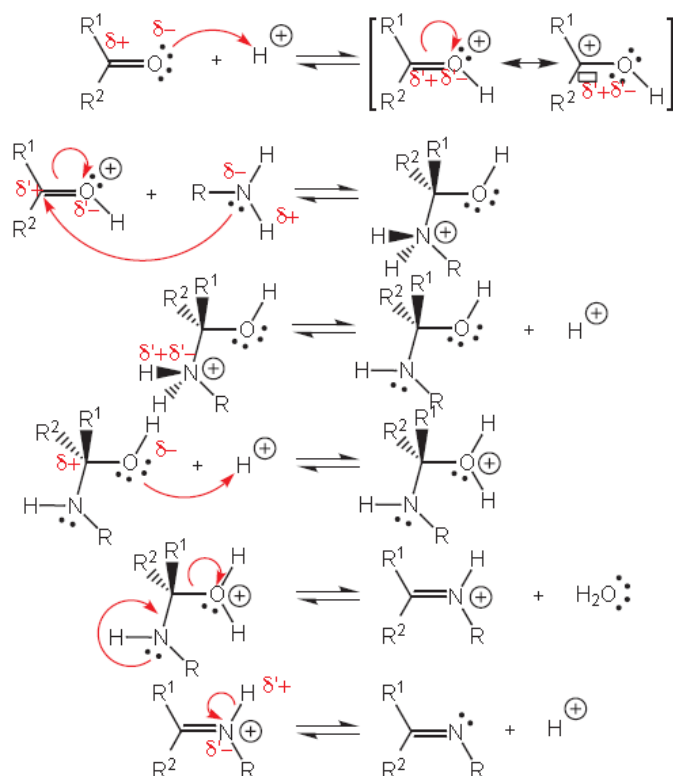


Figure II.2 : Mécanisme de formation d'imine

## II.5. Les réactions de formation des imines :

### II.5.1. A partir de L'ammoniac :

L'ammoniac réagit avec les aldéhydes et les cétones en fournissant des imines instables qui se transforment ou réagissent entre elles pour créer des polymères. Un exemple classique est la formation de l'hexaméthylènetétramine par réaction du formaldéhyde avec l'ammoniac (Figure II.3) [10].

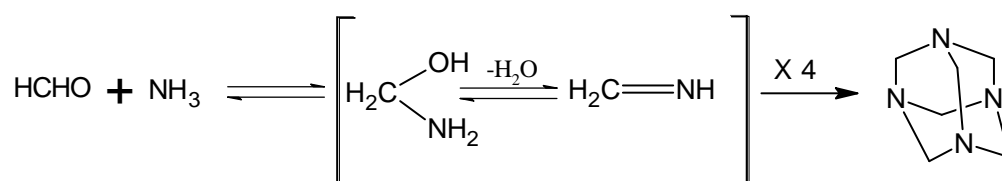


Figure II.3 : Réaction de formation des imines à partir de l'ammoniac.

### II.5.2.A partir d'amine primaire :

Les amines primaires forment avec les aldéhydes, et beaucoup plus difficilement avec les cétones, des imines qui peuvent être isolées [10].

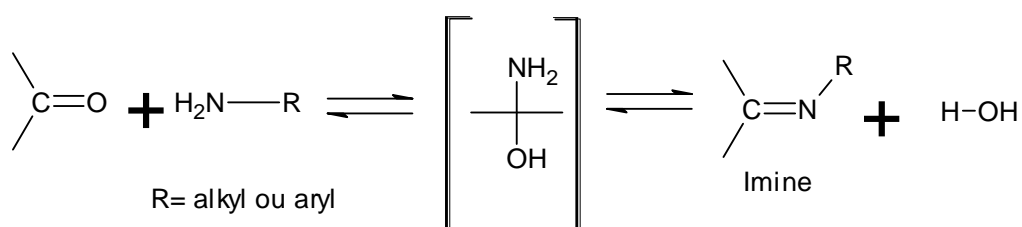
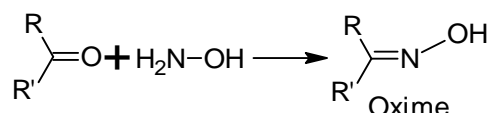


Figure II.4 : Réaction de formation des imines à partir d'amine primaire.

**II.5.3.A partir de l'hydroxylamine :**

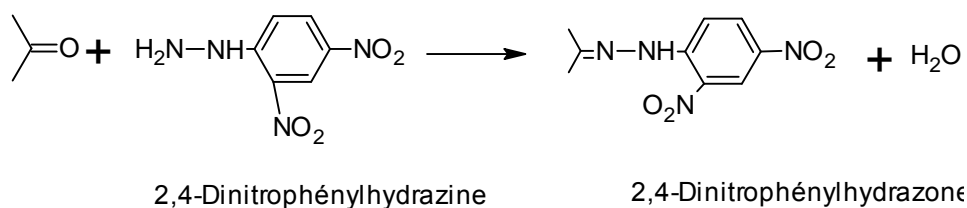
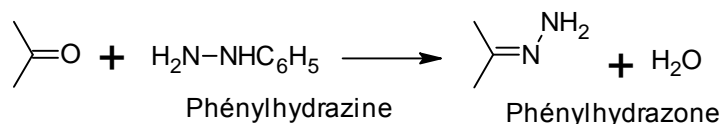
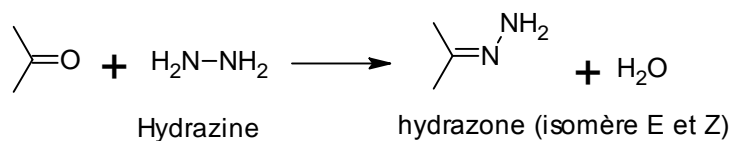
Toujours par le même processus, l'action de l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) sur un aldéhyde ou une cétone mène à une **oxime** : Le groupement hydroxyle de l'oxime se place en position *anti* par rapport au plus gros des deux substituants R ou R' (Figure II.5) [11].



**Figure II.5 :** Réaction de formation des imines à partir de l'hydroxylamine

**II.5.4.A partir de l'hydrazine:**

Il s'agit de l'addition nucléophile de l'hydrazine ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ) ou de l'un de ses dérivés sur un groupement carbonyle pour former une hydrazone. Cette addition est suivie d'une déshydratation (Figure II.6) [12].



**Figure II.6 :** Réaction de formation des imines A partir de l'hydrazine.

## II.6. Importance des imines (bases de Schiff)

Les imines sont d'importants intermédiaires lors de la biosynthèse d'acides aminés dans les systèmes vivants. Par exemple, l'acide glutamique est biosynthétisé à partir de l'alanine. Une enzyme spécialisée catalyse la formation d'une imine entre le groupement amine de l'alanine et le phosphate de pyridoxal. L'enzyme provoque ensuite la migration de la double liaison pour former une imine isomérique. C'est maintenant le carbone du phosphate de pyridoxal qui est doublement lié à l'azote. L'enzyme peut hydrolyser cette imine et démasquer la cétone de l'acide pyruvique et l'amine du phosphate de pyridoxamine. Ensuite le même échange, via des imines isomériques, s'effectue entre le phosphate de pyridoxamine et l'acide glutarique pour éventuellement former l'acide glutamique et le phosphate de pyridoxal de départ. Ces enzymes effectuent ces transformations de façon tout à fait énantiomérique [13-18].

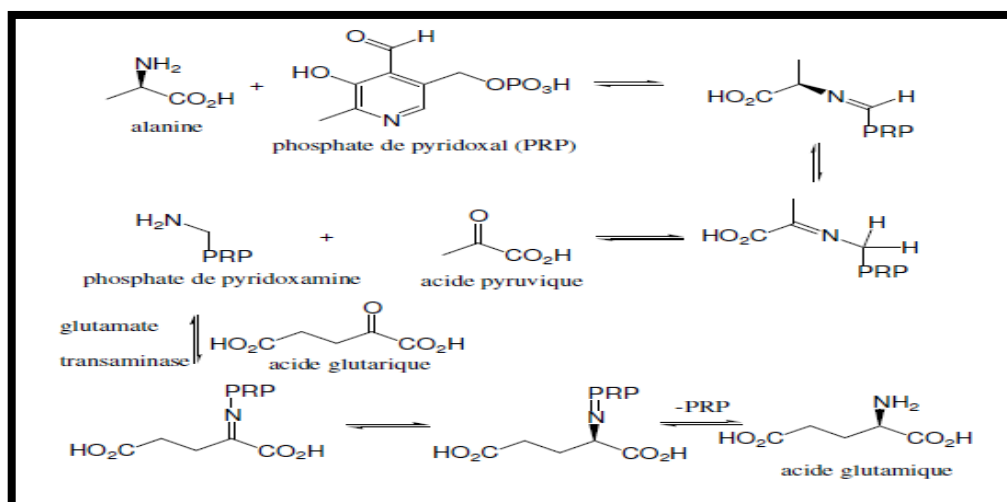


Figure II.07. Exemple d'une chaîne réactionnelle pour la biosynthèse de l'acide glutamique.

## II.7. Réduction d'imines et de nitriles

Il est possible d'ajouter des nucléophiles sur des équivalents azotés du groupe carbonyle. Les imines et les nitriles sont polarisés dans le même sens que le carbonyle avec le carbone portant une charge partielle positive et l'azote étant nucléophile. Ils sont donc réactifs face à des hydrures métalliques comme le LiAlH<sub>4</sub> et le NaBH<sub>4</sub>. Le produit de réduction est l'amine correspondante. Le mécanisme est identique à celui de la réduction de cétones et d'aldéhydes avec la différence que LiAlH<sub>4</sub> additionne deux fois sur la fonction nitrile. L'hydrure NaBH<sub>3</sub>CN est particulièrement intéressant car il réduit les imines, c'est à dire dans le même milieu réactionnel dans lequel l'imine est fabriquée (on appelle cette transformation d'une cétone ou

aldéhyde en amine l'amination réductrice). Notez que les conditions pour former une imine sont légèrement acides et que le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  ne réagit que très lentement avec l'acide (ce n'est pas le cas du  $\text{NaBH}_4$  et du  $\text{LiAlH}_4$  qui réagiraient violemment avec l'acide). La dernière étape dans la synthèse du lycorane consiste en la réduction d'un iminium par  $\text{NaBH}_4$  (Figure II.8) [19-22].

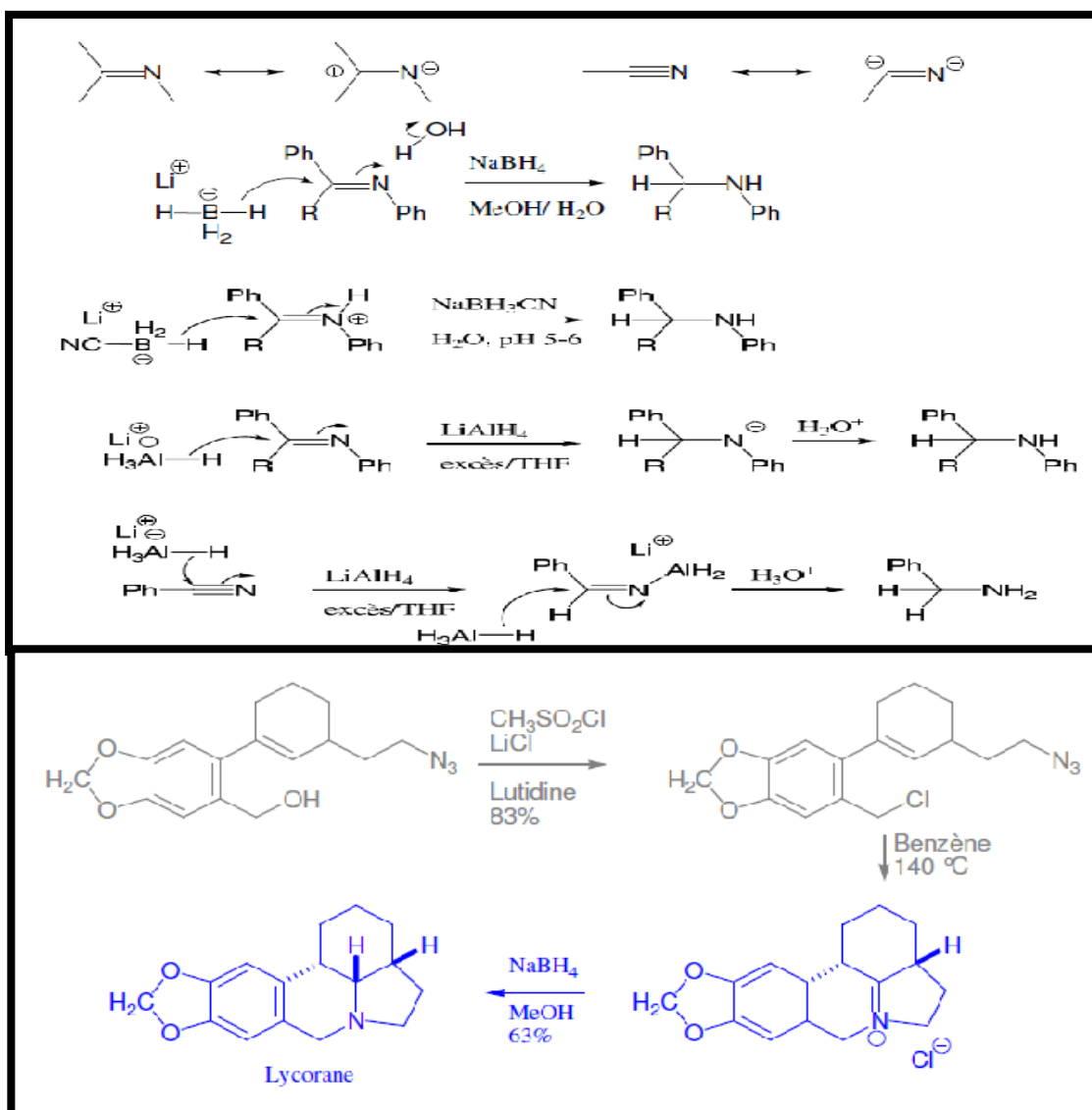


Figure II.8 Mécanisme de la réduction des imine par l'utilisation des hydrures métalliques.

## II.8. Propriétés spectroscopiques des bases de Schiff

Les fréquences de vibration du groupe azométhine (C=N) des ligands (BSs) sont comprises entre 1603-1680  $\text{cm}^{-1}$  selon la nature des différentes substitutions sur les atomes de carbone et d'azote. Cette propriété fait de la spectroscopie infrarouge une technique de choix pour l'identification de ce groupement fonctionnel [23].

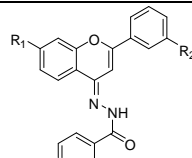
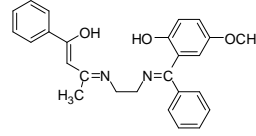
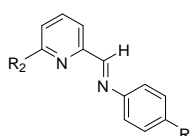
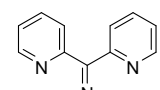
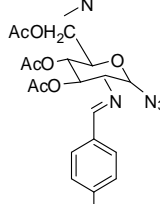
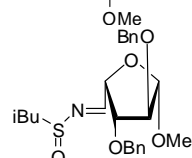
L'UV-vis des composés contenant un chromophore non conjugué sont caractérisés par des spectres de transition de type  $n-\pi^*$  dans l'intervalle 235-272 nm. Cependant, la conjugaison avec des groupements alcéniques ou aryliques conduira à des modifications remarquables sur ces spectres et qui sont attribués essentiellement à la prédominance des transitions de type  $\pi-\pi^*$  sur  $n-\pi^*$ [24-26].

## II.9. Les méthodes de synthèse de quelque imines décrites dans la littérature :

La littérature décrit un grand nombre de méthodes conduisant à la formation des imines et de leurs analogues. Toutes ces méthodes de condensation jouent sur l'élimination ou le piégeage de l'eau au cours de la réaction, [27- 30] afin de déplacer l'équilibre vers le produit insaturé désiré, ainsi que sur l'activation du carbonyle. Pour cette raison, il est nécessaire d'utiliser un agent déshydratant tel qu'un tamis moléculaire [30-35] ou une distillation azeotropique en utilisant un piège Dean Stark [36-40]. La dureté des conditions dépend de la réactivité des réactifs et de leur sensibilité : caractère nucléophile de l'amine et de la nature du carbonyle : aldéhydes, aldéhydes énolisables ou cétones. Les différentes méthodes de synthèses sont résumées dans le Tableau II.1.



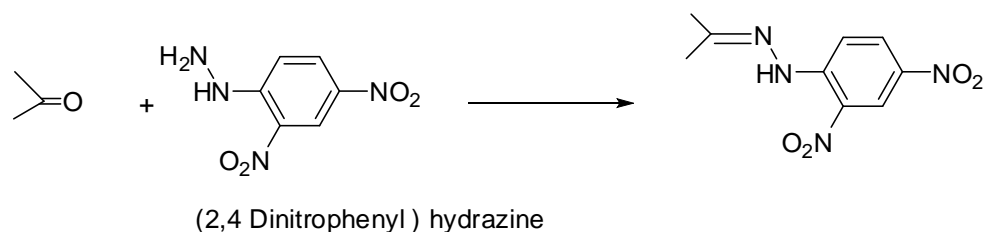
**Tableau II.1.** Description générales des protocoles de condensation décrits dans la littérature. [41-46].

Entrée	Les molécules	Structure	Catalyseur	Piégeage de l'eau	Solvant	T (°C)	Réf.
1	Hydrazone Flavanone		-	Irradiation microwave	propano 1	120- 200	41
2	Tetradentatebase de schiff-base		-	CaCl <sub>2</sub> anhydre	Ethanol	reflux	42
3	Pyim et Quim		-	-	MeOH	40-80	43
4	Imine de di-2, pyridyl		-	-	Toluène	reflux	44
5	Schiff bases a partir d- glucosamine		HCl	-	Acétone	60-70	45
6	Tert -butane sulfinamide		-	CuSO <sub>4</sub> anhydre	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux	46

Toutes ces réactions sont caractérisées par un temps de réaction très long d'une dizaine d'heures à plusieurs jours et d'un rendement de réaction allant de 30% à 90% en fonction des substrats.

### II.9.1. Synthèse de 1-(2,4-diphényl)-2-(propan-2-ylidene) hydrazine:

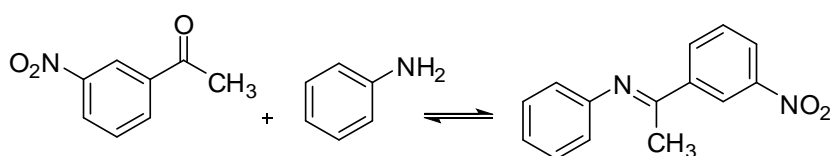
Les 2,4-dinitrophenylhydrazones sont particulièrement utilisées; elles se forment facilement lors de la réaction de la 2,4- dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) avec un composé carbonylé. Le fait qu'un composé inconnu réagit avec la 2,4-DNPH et forme un dérivé solide orange indique que c'est un aldéhyde ou une cétone (Figure II.9) [43].



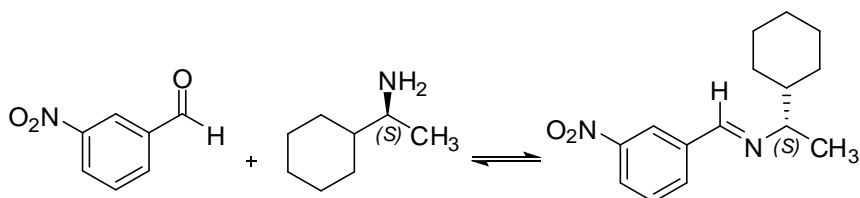
**Figure II.9:**Réaction de formation de 1-(2,4-diphényl)-2-(propan-2-ylidene) hydrazine.

### II.9.2. Synthèses des N –arylidenearylamines et des N –arylidenealkylamines

Au cours de ce travail, Touati R et *al* ont utilisé le chauffage par micro-ondes comme source d'énergie pour préparer une série d'imine et des imines optiquement pures. Cette technique a permis d'accéder aux composés désirés, avec des rendements comparables (Figure II.10) [47].



**Figure II.10.**Synthèse des N –arylidenearylamines.



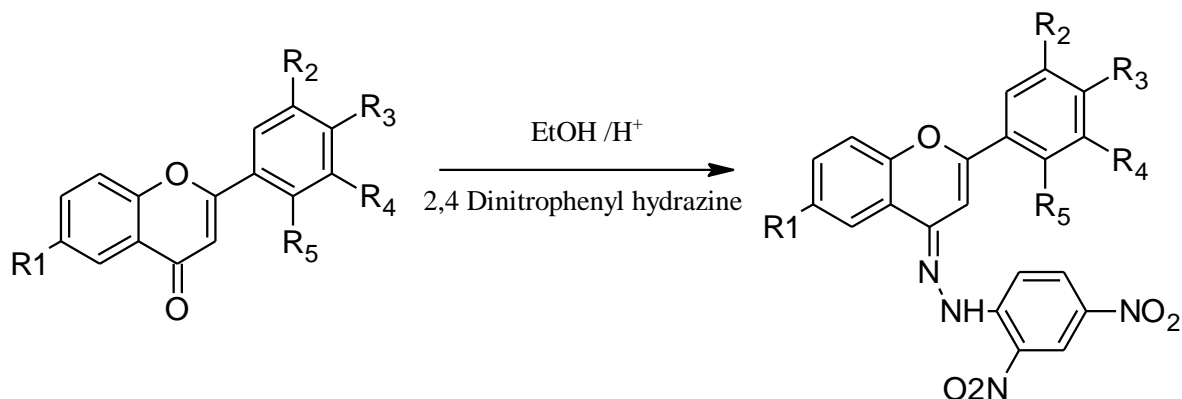
**Figure II.11.**Synthèse des N-arylidenealkylamines

Le mélange réactionnel est homogénéisé, puis irradié sous micro-ondes, avec agitation mécanique durant le temps requis (2 à 3 min) [42].

### II.9.3. Synthèse de 4-imino- flavones :

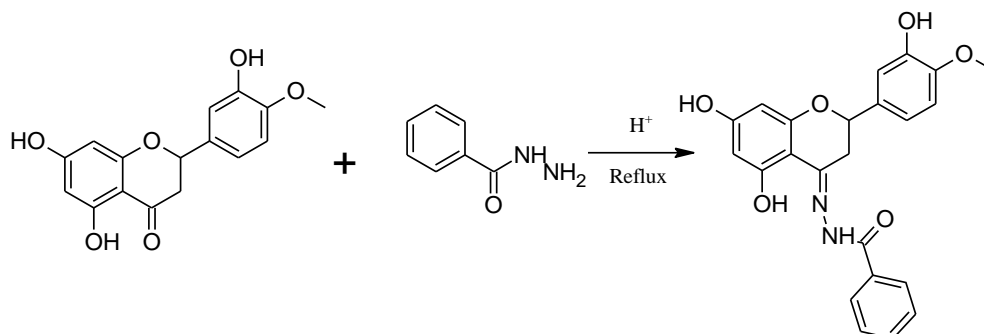
En raison de l'importance bioactive des flavones, Ullah Mughal et al, 2006 ont été pensé de remplacer l'atome d'oxygène en position C-4 de la flavone avec un atome de soufre ou par un groupement d'amine substitué pour vérifier aussi leur effet biologique

Ullah Mughal et al, 2006 ont synthétisé en parallèle une série de 4- imino-flavones, en chauffant à reflux les flavones avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine en présence du  $H_2SO_4$  dans l'éthanol (figure II.12)[47].



**Figure II.12:** Synthèse des 4-imino-flavones selon UllahMughal et al, 2006.

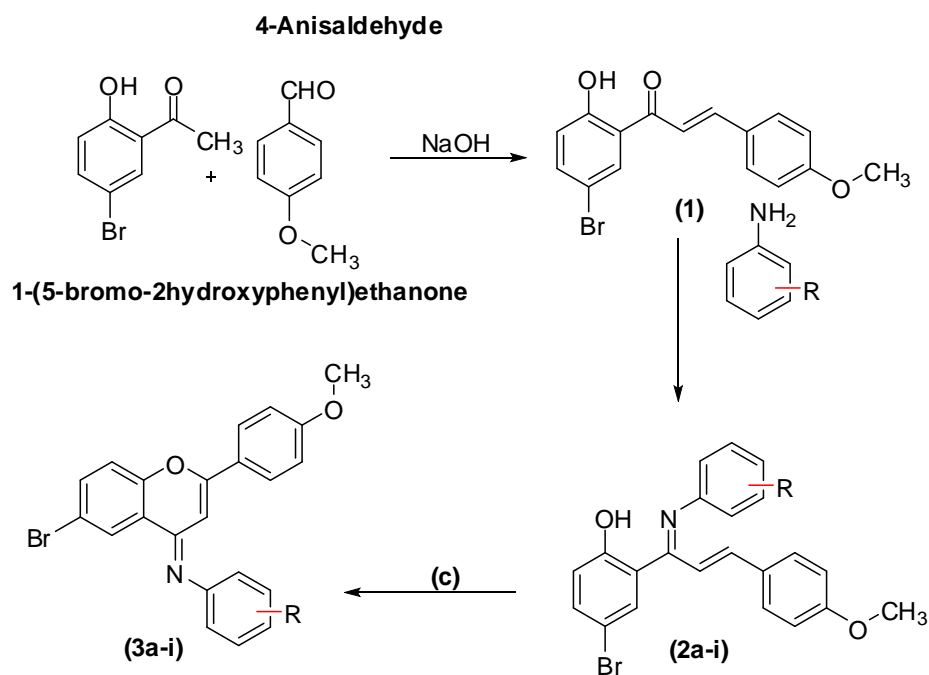
Li et al, ont synthétisé et caractérisé une imino-flavanone, c'est le hespétine-4-one-(benzoyle) hydrazone et leurs complexes, afin de donner une recherche profonde aux ramifications de l'hespétine et à leurs complexes avec le cuivre, le zinc et le lanthanide (Schéma II.9). Le hespétine-4-one-(benzoyle) hydrazone a été synthétisé en chauffant à reflux l'hespétine en présence de l'acide acétique avec le benzoylehydrazine [48-49].



**Figure II.13:** Synthèse de l'hespétine-4-one-(benzoyle) hydrazone .

#### II.9.4. Synthèse d'Imino-flavone

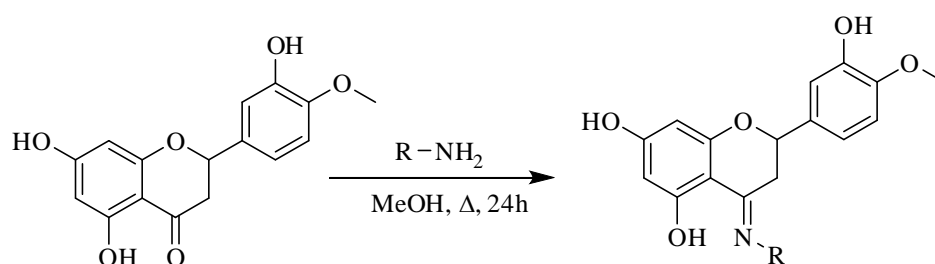
Une expérience en 2012 pour synthétiser de quelques Imino-flavone par cyclisation oxydative des Imin-chalcones est préforme en milieu DMSO en présence d'une quantité catalytique d'iode et  $H_2SO_4$ . (Figure II.14) [50]



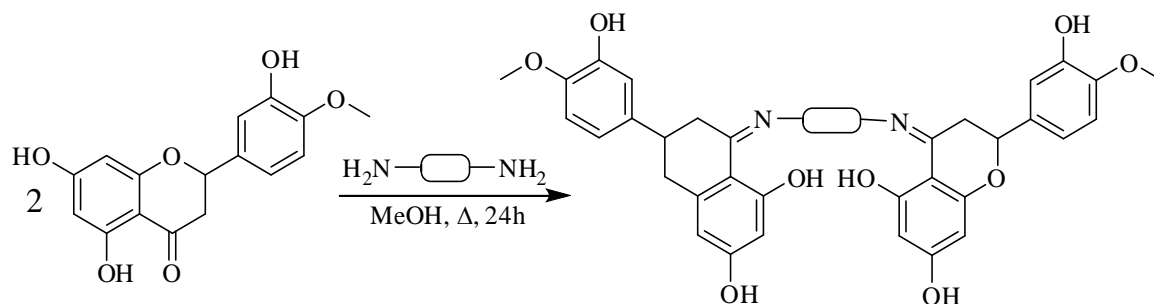
**Figure II.14.** Synthèse d'imino-flavone

### II.9.5. Synthèse des imino-hespéretines et iminohesperidines

Notre laboratoire (LMBSC) s'intéresse à la synthèse de molécules biologiquement actives à partir de molécules commerciales tel que l'hésperétine et hespéridine qui est obtenue par hydrolyse de l'hésperidine, et cela en utilisant des réactions simples et faciles à réaliser dans des conditions opératoires légères. (Figure II.15)

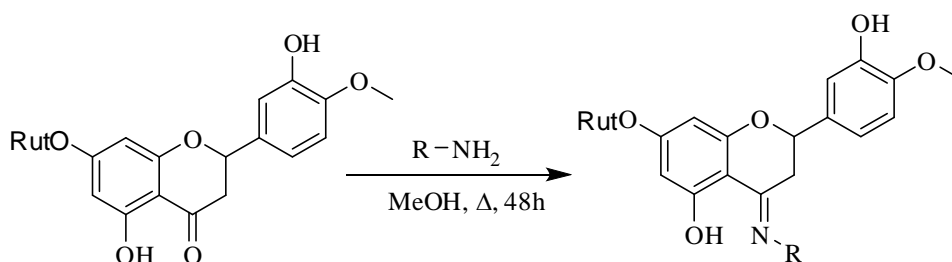


**Figure II.15.** Méthode de préparation des 4-iminohespéretines.[51]

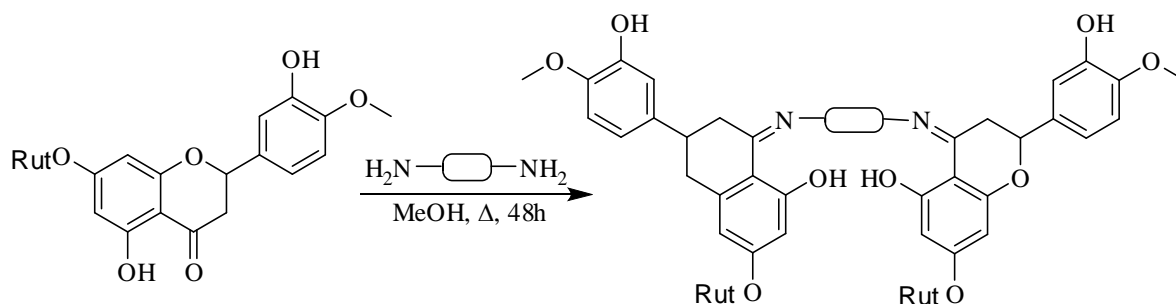


**Figure II.16.** Méthode de préparation des bis-iminohespéretines[51]

En 2012, N. Belboukhari et *al* ont synthétisé et identifié une série de huit nouveaux dérivés imino-hespéridine par réaction de condensation non catalytique entre l'hespéridine et des amines primaires. (Figure II.17) [52-53]



**Figure II.17.** Synthèse des 4-iminohesperidines.



**Figure II.18.** Synthèse des bis-iminohespéridines.

### II.9.6.Synthèse des imino-flavanones

La réactivité du carbonyle C4 de flavonoïdes avec des réactifs de la fonction carbonyle a reçu un intérêt croissant, ce qui est justifiée en partie par les aspects théoriques pour obtenir plus d'informations sur le caractère cétonique de diverses dérivés  $\gamma$ -pyrone,

### II.9.6.a. Synthèse de flavanone hydrazone

F. Kalla et al 1956, étaient en mesure de choisir des conditions réactionnelles telles que l'un des deux produits simples: le Flavanone hydrazone et l'azine peuvent être obtenus comme le produit principal [54].

La flavanone et hydrazin hydrate ont été dissous dans de l'éthanolanhydre, la solution maintenue sous agitation à 22°pendent 10 jours pour donner flavanone hydrazone pur. (Figure II.19) [54]

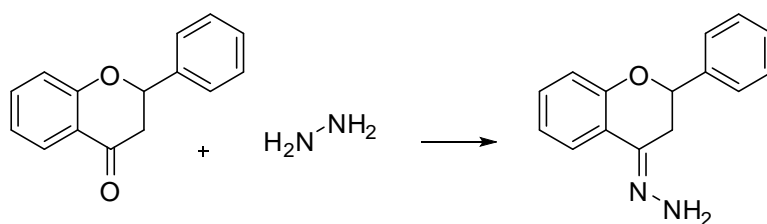


Figure II.19.Synthèse de Flavanone hydrazone.

### II.9.6.b. Synthèse de bis-imino-flavanone

Flavanone hydrazone et flavanone sont chauffés au reflux dans l'éthanol en présence d'acide acétique pendant 1 heure, pour donner le flavanone azine (Figure II.20) [55].

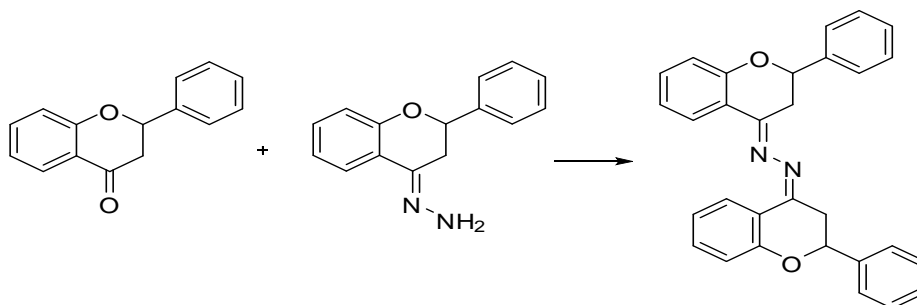


Figure II.20.Synthèse de bis imino-flavanone.

### II.9.7. Synthèse des 4- iminoflavan

Rahou et al, 2014 ont synthétisé des dérivés de 4-iminoflavan, en chauffant à reflux pendant 3 jours le flavanone avec une série d'amines primaires dans le méthanol, (Figure II.21)[53].

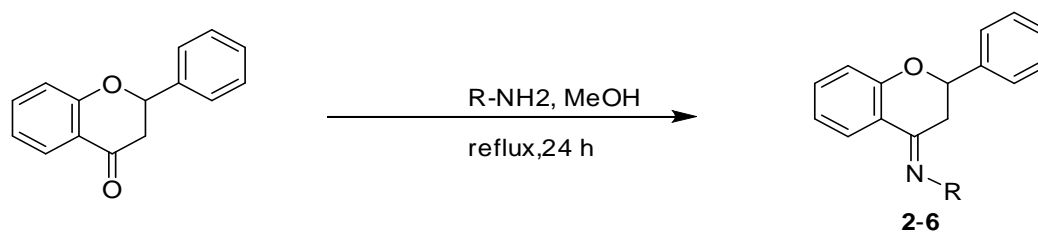


Figure II.21 .Synthèse de 4-iminoflavan

### II.10. Conditions de formation des imines

Notes qu'ils ajoute normalement un catalyseur acide pour former l'imine, sans catalyse acide la réaction est très lent, bien qu'elle puisse se produire dans certains cas, il est important de remarquer que l'acide n'est pas nécessaire pour l'étape d'addition en fait , la protonation de l'amine rend cette étape très lent en milieu acide fort , mais il est nécessaire pour l' élimination de l'eau dans le suite de la réaction . La formation d'imine est en réalité la plus rapide à pH 4-6 : aux pH inférieurs, la formation de l'imine ressemble à une réaction biologique : elle est plus rapide au voisinage de la neutralité. [55, 15]

### II.11.La stabilité des imines

Les imine sont instable, par apport au composé carbonylé et à l'amine de départ et celles doivent être préparées par une méthode qui élimine l'eau du mélange réactionnel. (Figure II.22)

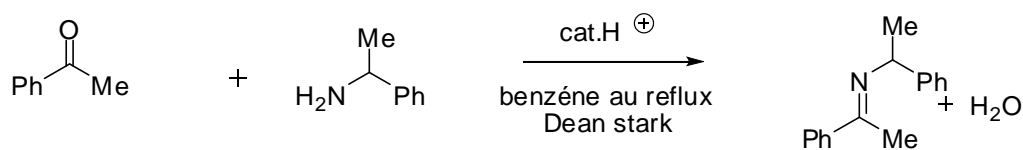
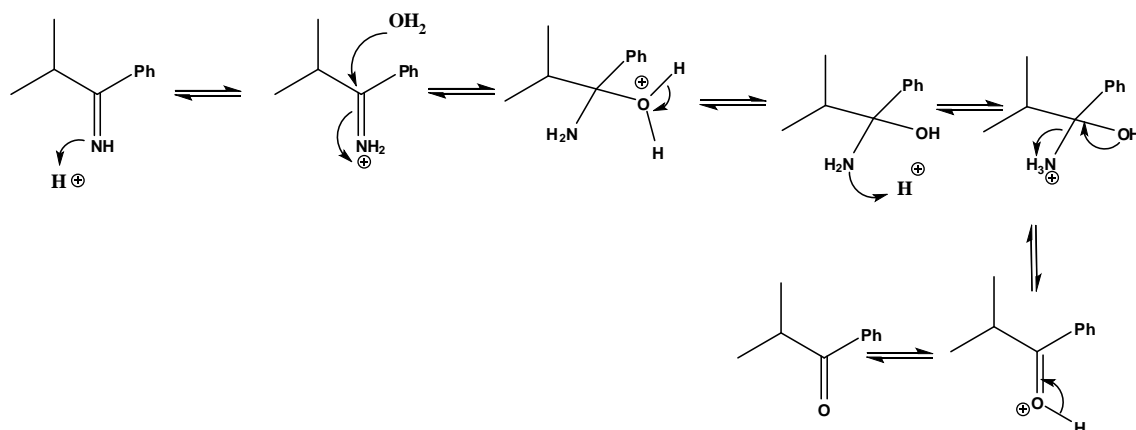


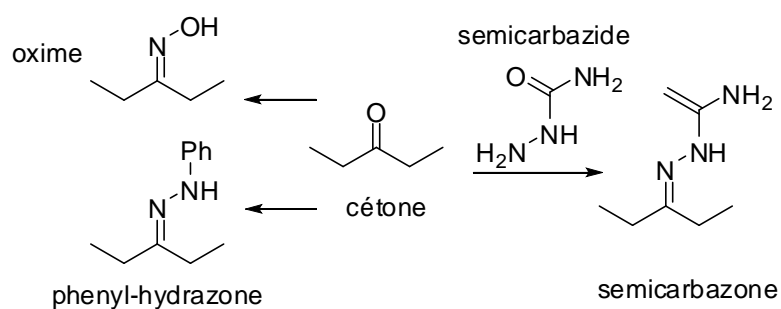
Figure II.22. Synthèse d'une imine à l'aide d'un Dean Stark.

Les imines sont facilement hydrolysées en composés carbonylés et amine par les acides aqueux, la plupart peuvent être hydrolysée par l'eau sans catalyse acide ni basique. (Figure II.23) [56]



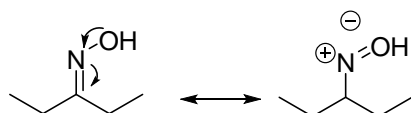
**Figure II.23.** Mécanisme général d'hydrolyse d'imine.

Les imines dont l'atome d'azote porte un groupement électro-négative sont en général stable c'est le cas des oximes, des hydrazones et des semicarbazones. (Figure II.24)



**Figure II.24.** Différents groupements stables des imines.

Ces composés sont plus stables que les imines parce que la substitution par des groupements électro-négatifs peut participer à la délocalisation de la double liaison de l'imine. La délocalisation fait diminuer la charge  $\delta^+$  de l'atome de Carbone de la liaison de l'imine et augment l'énergie de la BV (base vacante), ce qui la rend moins sensible à une attaque nucléophile. (Figure II.25) [55, 15]



**Figure II.25.** Délocalisation de la double liaison de l'imine.

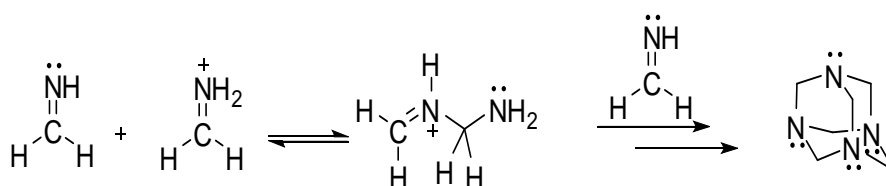
Les imines peuvent être stabilisées autrement que par polymérisation. La réaction des aldéhydes ou des cétones aromatiques avec les amines primaires ainsi que la réaction des



amines primaires aromatiques avec les aldéhydes ou les cétones aliphatiques produisent des imines stabilisées par conjugaison avec le système aromatique [57].

## II.12. Applications de la réaction de formation des imines

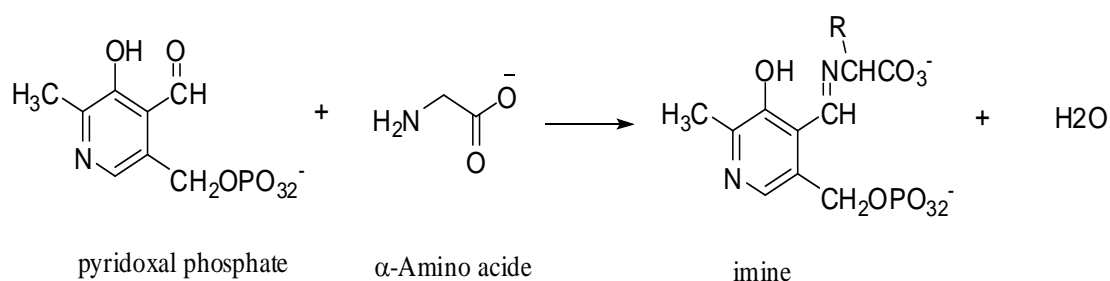
Les imines sont des composés assez réactifs. L'imine la plus simple est formée à partir de l'aldéhyde formique et de l'ammoniac, elle se polymérise ou oligomérisse dans les conditions de sa formation. L'oligomère obtenu est appelé urotropine, il a une structure qui ressemble à celle de l'adamantane: (Figure II.26) [29]



**Figure II.26.** Réaction de formation d'oligomère

Les imines peuvent être hydrolysées en solution aqueuse d'acide dilué et reformer le composé carbonyle et l'amine ; la réaction est simplement l'inverse du processus de formation. [14, 58]

Un exemple d'un aldéhyde biologiquement important est le phosphate de pyridoxal. Il est la forme active de la vitamine B6 est un coenzyme pour la plupart des réactions des acides aminés. Dans ces réactions l'acide aminé se lie à la coenzyme faisant réagir avec lui pour former une imine de la sorte représentée dans l'équation figure II.27. Réactions alors avoir lieu dans la partie acide aminé de l'imine, la modification de l'acide aminé. (Figure II.27) [10].



**Figure II.27.** Réaction de formation de l'imine de pyridoxal [10]

**II.13. Conclusion :**

La formation d'une imine intervient dans de nombreuses réactions biochimiques parce que les enzymes utilisent souvent un groupe  $-NH_2$  pour réagir en aldéhyde et une cétone.

La formation d'un lien imine est importante dans l'une des étapes des réactions qui jouent un rôle dans la photochimie de la vision. Les imines sont aussi intermédiaires dans une synthèse des amines qu'on effectue au laboratoire et qui est fort utile [12].

Dans ce chapitre nous avons apporté un rappel bibliographique sur les imines et quelque méthode de préparation classique de dérivés de flavonoïdes, parmi les plus significatives, rapportées dans la littérature, cette étude a une grande importance pour notre objectif, la synthèse des iminonaringine et des iminonaringenine qui se présentera dans le chapitre III.

## Références

1. Mahdeyeh S, Tayebbeh S et Zia M. 2012. Some Theoretical Study on the Interaction Between of a Salen Schiff-base Ligand with Zn (II), Cd (II) and Hg (II) Ions. *J. Chem. Pharm. Res*, 4(1):27-32
2. Caroline R. 2011. Des isonitriles aux hydrazones : Réactions multicomposants et Synthèse de hétérocycles. Thèse doctorat. Université ENSTA ParisTech, France. p17, 24, 28,31.
3. Sherma J. 2006. Planar Chromatography. *Analytical Chemistry*, 78 (12) 3841-3852
4. Thorat B. R, et *al.* 2012. Synthesis of novel Schiff bases of 4-hydroxy-3-methoxy-5 nitrobenzaldehyde and Development of HPLC Chromatographic Method for their analysis. *J. Chem. Pharm. Res*, 4(1):14-17.
5. Karim A. 2007. Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Dérivés Hétérocyclique en Série Imidazo[1,2-a] Pyridine, Préparation et Etude de la Réactivité de limidazo[1,2-a] Pyridine 2- et 3-Carboxaldéhyde. Mémoire de Magister. Université de Béchar, Algérie. P6-8, 14, 37, 41.
6. Shalin K, Durga N.D et Saxena P. N. 2009. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68 :181-187.
7. Thorat.B R, Kamat P, et *al.* 2011. Synthesis and Fluorescence study of Novel Schiff Bases of Isoniazide. *Chem. Pharm. Res*, 3(6):1109-1117.
8. Reinhard B, Jean S, Jean-Jacques S et Jean-Marie L. 1999. Mécanismes réactionnels en chimie organique : méthodes synthétiques, stéréochimie et réactions modernes. Bibliothèque national Paris ; Bruxelles. De Boeck Université, France.
9. Bruneton J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. La Voisier Tec Et Doc, Paris.
10. Francis A. Carey. 2000. Organic Chemistry. The United States Copyright. McGraw-Hill Higher, USA. p672-675.
11. Kheniche A. 2011. Synthèse et caractérisation de ligands et complexes des manganèse (ii)-bases de schiffpentadentates du type n,n'-bis(3- minopropyle)salicyldiiminato études des propriétés electrocatalytiques de complexes de manganèse en présence d'oxygène moléculaire. Mémoire de Magister. Université Mohamed Boudiaf M'sila, Algérie. P13,26,52.
12. Chiboub Fellah F. Z. 2008. Synthèse et Détermination Structurale de Complexes de Métaux de Transition et D'entités 3d-4f. Thèse Doctorat. Universités de Toulouse et de Tlemcen, Algérie. P13-15, 70, 96.

13. Rajender S. V, Rajender D et Sudhir K. 1997. Clay Catalyzed Synthesis of Imines and Enamines Under Solvent-Free Conditions Using Microwave Irradiation. *Tetrahedron Letters*, 38 (12): 2039-2042.
14. Hai Jian YA, et *al.* 2002. The Rapid Synthesis of Schiff-Base without Solvent under Microwave Irradiation. *Chinese Chemical Letters*, 13 (1) : 3–6.
15. Amandine F. 2010. Hydrogénation asymétrique de substrats azotés prochiraux en vue de l'obtention d'amines chirales primaires. Thèse doctorat. Université de Toulouse, France. p36, 46, 56, 86, 92, 141, 269.
16. Coleman W M et Taylor L. T. 1978. Nitric oxide reactivity with manganese complexes containing linear pentadentate ligands *InorgChemSoc*, 100 (6) 1705-1710.
17. Asit K. C, Srikant Bet Santosh R. 2004. Magnesium perchlorate as an efficient catalyst for the synthesis of imines and phenylhydrazones. *Tetrahedron Letters*, 45 (2004) : 7641–7644
18. Vittorio S et Ulrich L. 2009. On the formation of imines in water—a comparison. *TetrahedronLetters* 50 (2009) 4663–4665.
19. Vi Thuy D. 2002. Le Gossypol et ses Nouveaux Dérivés : Synthèse et Etude D'activités Biologiques. Thèse de Docteur. Université de Paris-Sud U.F.R Scientifique d'Orsay. France. p, 54, 59, 62, 69.
20. Laue T et Plagens A. 2005. *Named Organic Reactions 2<sup>nd</sup> Edition*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England. P82, 124, 181.
21. Ludovic J et Fensterbank L. 2007. Document D'accompagnement de Chimie Organique (2007). Université Pierre et Marie Curie PCEM 1. La Science a Paris. France. p14, 109-110.
22. Estelle M. 2007. Monobactames et triazolesfluorocarbones amphiphiles : vers des systemescatanioniques a proprietes multiples. Thèse de docteur de Nancy Université, Université Henri Poincaré, France. p38, 193, 206.
23. Fabrello A, et *al.* 2010. Mechanistic analysis of the transition metal-catalyzed hydrogenation of imines and functionalized enamines. *Coordination ChemistryReviews* 254 : 273–287.
24. René M. 2007. *Chimie Organique Stéréochimie, Entités Réactives et Réactions*. EDP Sciences. Les Ulis Cedex A, France. p16, 36, 43-45, 115, 185.
25. Fournier, M Ostiguy, C et *al.* 2007. Méthode pour l'évaluation simultanée de différentes amines en milieu de travail. *Études et recherches / Rapport R-503*, Montréal, IRSST. Canada. P23, 39.

26. Jonathan C, Stuart W et Nick G. 2009. *Chimie organique*. LMD Chimie. De Boeck, France. p6, 82, 130, 137.
27. Esmond E. Snell, et Terry W. Jenkins. 2005. The mechanism of the transamination reaction. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 54 (4) 161-177.
28. Titus J. 1995. *Chimie organique Cours de base Introduction pour étudiants en sciences naturelles* Institut de chimie organique, Université de Fribourg, France. p9, 83, 84-86.
29. Yorke J, Dent C, Decken A et Aibing X. 2010. Synthesis, Characterization and Applications of Novel Di-2-Pyridyl Imine Ligands. *Inorganic Chemistry Communications* 13 : 54-57.
30. Majid M. H, Masoumeh Z et Narges M. 2011. Guanidine hydrochloride: An active and simple catalyst for Mannich type reaction in solvent-free condition. *Chinese Chemical Letters* 22 : 797-800.
31. Wittig G et Hesse A. 1988. Directed Aldol Condensations:  $\beta$ -Phenylcinnamaldehyde *Organic Syntheses*, 6, p.901.
32. Lahmar N. 2006. Synthèse et Réactivité des Dérivés Carbonylés  $\alpha,\beta$ - Insaturés Fonctionnels. Thèse doctorat. Université de Tunis El Manar, Tunisie. P3, 72, 96, 98.
33. Jonathan A. Ellman, Timothy D. Owens, Et Tony P. Tang. 2002. N-tert-Butanesulfinyl Imines: Versatile Intermediates for the Asymmetric Synthesis of Amines. *Acc. Chem. Res.* 35 (11) : 984-
34. Vijendra K F et Vadivelu M. 2012. Synthesis of 3-substituted imidazo[1,5-a]pyridines having 1-(N-picolinamidin-2-yl) group. *Tetrahedron* 68 : 3927-3931.
35. Vittorio Set Ulrich L. 2009. On The Formation of Imines in Water-A Comparison. *Tetrahedron letters*, 50:4663-4665.
36. Shu K et Haruro I. 1999. Catalytic Enantioselective Addition to Imines. *Chem. Rev.* 99 (5) : 1069 -1094.
37. El Kazzi A. 2008. Catalyseurs d'oxydation et carbènes hétérocycliques organophosphorés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France. p20, 35, 48.
38. Gupta K.C, et Alekha K S. 2008. Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews* 252 : 1420-1450.
39. Veronika K, et al. 2004. Ferrocene compounds. XL. Synthesis and characterization of ferrocene Schiff bases. *Journal of Molecular Structure* 687 : 107-110.
40. Aihua N et Ziwei H. 2006. Microwave-Assisted Reaction of 2'-Hydroxychalcones with Hydrazides to Synthesize Flavanone Hydrazone and 4,5-Dihydropyrazole Derivatives. *J. Comb. Chem.* 8 (5) : 655-658.

41. Osowole A.A. 2008. Syntheses and Characterization of Some Tetradentate Schiff-Base Complexes and Their Heteroleptic Analogues. *E-Journal of Chemistry*, 5 (1) :130-135.
42. Attilio A G, et al. 2009. Copper(I)-imine complexes: Synthesis and catalytic activity in olefin cyclopropanation. *Inorganica Chimica Acta* 362 : 3507–3512.
43. Jake Y, et al. 2010. Synthesis, characterization, and applications of novel di-2-pyridyl imine ligands. *Inorganic Chemistry Communications* 13 : 54–57.
44. Esther M. S. Pérez, et al. 2010. Schiff bases from D-glucosamine and aliphatic ketones. *Carbohydrate Research* 345 : 23–32.
45. Oulaïdi F, et al. 2011. 1- C -Alkyl imino- D-xylitol and -L-arabinitol derivatives obtained via nucleophilic addition to pentose-derived N- tert -butanesulfinyl imines: sugar- versus chiral auxiliary-induced stereoselectivity. *Tetrahedron: Asymmetry* 22: 609–612.
46. Touati R et al. 2000. Synthèse d'imines optiquement pures par la technique micro-onde et application à la préparation de nouvelles amines secondaires. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IIc, Chimie : Chemistry* 3 : 35–42.
47. Ullah Mughal E, Ayaz M, Hussain Z et al. 2006. Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14 : 4704–4711.
48. Li Y, Yang Z.Y et Wang M.F. 2009. Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln(III) complexes with hesperetin-4-one-(benzoyl) hydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44 : 4585–4595.
49. Li Y et Yang ZY. 2009. DNA binding affinity and antioxidative activity of copper(II) and zinc(II) complexes with a novel hesperetin Schiff base ligand. *Inorganica Chimica Acta*. 362 : 4823–4831.
50. Patil S. G, et al. 2012. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of 6-bromo-4-methoxy-4-(substituted phenyl) iminoflavone. *J. Chem. Pharm. Res.* 4(1):501-507
51. Abdelbaki H. 2012. Synthèse et Evaluation Biologique des Dérivés Hétérocycliques de l'Hespérétine. Mémoire magistère. Université de Béchar, Algérie. P44-46.
52. Belboukhari N, Rahou I, et al. 2011. Chiral Separation of Imino-4-Hesperidin derivatives by Thin Layer Chromatography. *PhytoChem&Bio Sub Journal* 5(2) 2170-1768.
53. Rahou I, Belboukhari N, Sekkoum K, Cheriti A, Aboul - Enein HY. 2014 Chiral separation of 4 - iminoflavan derivatives on several polysaccharide - based chiral stationary phases by HPLC. *Chromatographia*.;77:1195 - 1201.

54. Kallay F, Janz G et Koczor I. 1956. The reaction of flavanone with hydrazine. Tetrahedron, Pergamon Press Ltd. Printed in Northern Ireland 21 : 19-24.
55. Vittorio S, Ulrich L. 2009. On the formation of imine in water- a comparison tetrahedron letters vol 50 ; page 4663-4665.
56. Andrew S et Jr Clayton H. 1986. Introduction a la Chimie Organique. Française Marketing Editeur des Préparation Grands Ecoles Médecine. Derek Barton, France.
57. Hercberg S. 1994. Fer, vitamines, oligo-éléments. Collège des Enseignants de Nutrition Institut Scientifique et Technique de la Nutrition et de l'Alimentation (CNAM Paris) Noireau, France.

## Chapitre III: Synthèse des dérivés d'iminonaringénine et d'iminonaringine

## III- 1-Introduction

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules ayant des activités biologiques importantes telles que les flavanones. Cette étude nous a permis d'apporter une méthode de synthèse d'une nouvelle série de composés (Iminonaringine et Iminonaringénine) à partir d'une réaction de condensation entre le flavanone et une variété d'amines primaires. Dans ce chapitre, nous présentons les différentes méthodes de synthèse des dérivés de la naringine et naringénine. (Figure III.01)

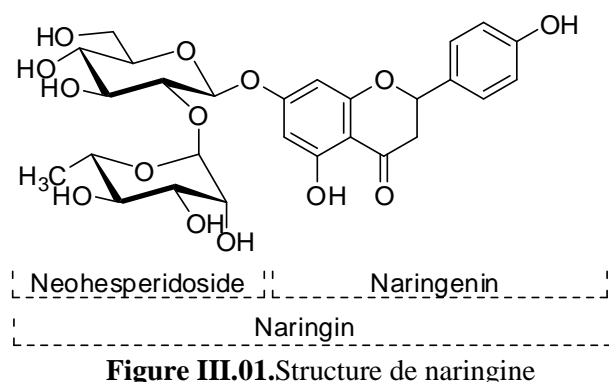


Figure III.01. Structure de naringine

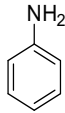
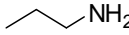

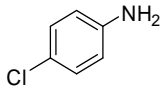
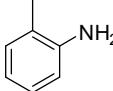
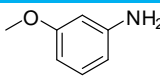
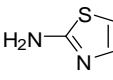
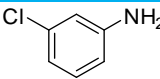
## III.2. Matériel et Méthodes :

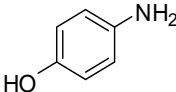
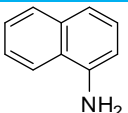
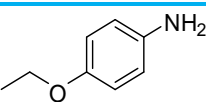
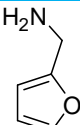
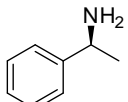
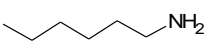
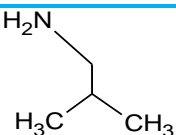
- **Evaporateur rotatif** de type R-210 Büchi ;
- **Les points de fusion** ont été obtenus en tubes capillaires sur un appareillage de type B-540 Buchi
- **Spectromètre de type analytical jena** a été utilisée, afin d'obtenir les spectres UV, le solvant utilisés est le méthanol.
- **Les spectres IR** ont été enregistrés au moyen d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) « Thermo Nicolet model AVATAR ».Après la recristallisation, les échantillons sont broyés et mélangés avec du KBr qui après pressage conduit à la formation d'une pastille d'environ un millimètre d'épaisseur sur laquelle les spectres sont enregistrés.
- **Les spectres RMN<sup>1</sup>H** ont été enregistrés à 250 MHz sur un appareil Bruker AC 400. Les produits ont été analysés dans le méthanol deutéré (MeOD-d4 :  $\delta = 3.31$  ppm)



- **Les spectres RMN<sup>13</sup>C** ont été enregistrés à 63 MHz avec découplage <sup>1</sup>H en large bande sur un appareil Bruker AC 400. Les produits ont été analysés dans le méthanol
- **Les chromatographies sur couche mince** ont été effectuées sur des plaques de silice Merck 60 F254. Le mélange Méthanol-Eau (1/10, v/v) a été utilisé comme phase mobile.
- **Les réactifs utilisés** : l'aniline, 3-chloroaniline, 4-chloroaniline, naphthylamine, méthylbenzylamine, 3- méthoxyaniline, 3- ethoxyaniline, o-toluidine, 1,3-thiazol-4-amine, propylamine, tertbutylamine, isobutylamine hexylamine, fufuralamine, 4-aminophenol (Tableau III.01) , ont été achetées par FlukaBuches.
- **Synthèse des iminoflavanones** : Dans un ballon de 50 mL, une solution du méthanol (5 mL), de flavanone (naringénine ou naringine) (0.5 mmol) et de l'amine primaire (0.5 mmol) sont additionnées. Après 24 heure d'agitation à reflux, le précipité obtenu est filtré et lavé plusieurs fois avec de l'éther diéthylique, puis recristallisé avec l'éthanol.

Tableau III.01. Caractéristique physico-chimique des réactifs

	Réactif	Structure	Formule brute Poids moléculaire (g/mol) Point de fusion ou T° ébullition (°C)
1	Aniline		C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N 93,11 184
2	Propylamine		C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N 59,11
3	Tertbutylamine		C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N 73,14
4	4-Chloroaniline		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClN 127,58 67-70
5	O-Toluidine		C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N 107,16
6	M-Anisidine		C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO 123,16
7	2-Aminothiazol		C <sub>3</sub> N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S 100,14 85-88
8	3-Chloroaniline		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClN 127,58 93-96

	Réactif	Structure	Formule brute Poids moléculaire (g/mol) Point de fusion ou T° ébullition (°C)
9	4-Aminophenol		C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO 109,13
10	1-Naphthylamine		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N 143,19 50
11	P-Phenetidine		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO 137,18 254
12	Fufuralamine		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> ON 97,12 70
13	(S)- (-)-α-Methylbenzylamine		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N 121,18 180
14	Hexylamine		C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N 108,14 131
15	Isobutylamine		C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N 73,14 63

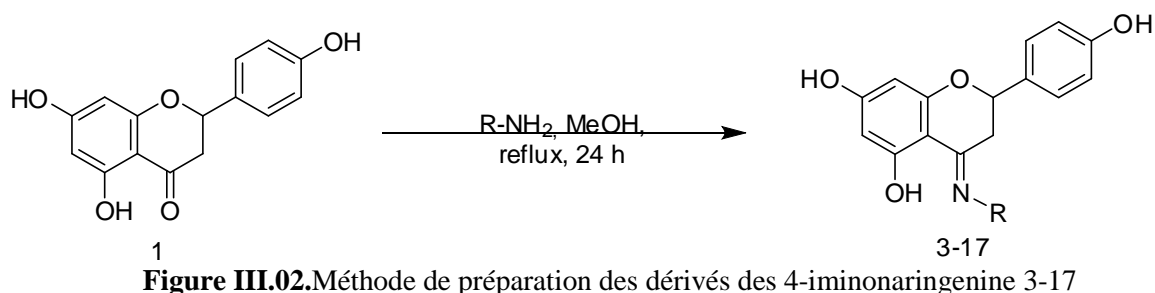
### III- 3-Synthèse des dérivés de la naringénine

Nous décrivons ici des synthèses efficaces des dérivés de la naringénine. Nous avons successivement synthétisés quinze composés de ses dérivés. Vu l'effet des différents réactifs nucléophiles (amine primaire, ...etc.), nous mentionnons ici une synthèse rentable de ces dérivés. L'étape clé de cette synthèse repose sur des réactions de condensation entre différents nucléophiles avec un site électrophile.

#### III- 3-1-Mécanisme de la synthèse des iminoaringénines

La synthèse des 4-iminoaringénine consiste à mélanger des quantités équimolaire de naringénine (1) avec différentes amines sans catalyseur. Après, nous suivons la cinétique de cette synthèse des iminoaringénine par CCM.

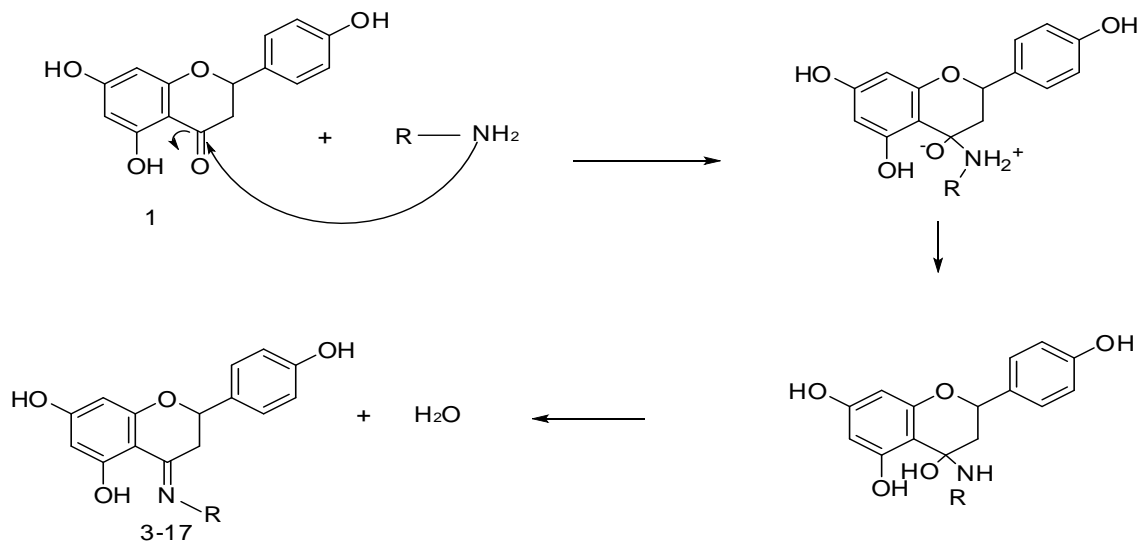
La condensation des amines primaires avec la naringénine nous a conduits à la formation de nouvelles molécules les 4-iminoanaringénine **3-17**(figure III.02).



**Figure III.02.** Méthode de préparation des dérivés des 4-iminoanaringénine 3-17

Le mécanisme proposé pour la synthèse des 4-iminoanaringénine **3-17** se fait en deux étapes (figure III.3) :

- ❖ La première étape du mécanisme consiste en une addition nucléophile qui se fait entre le doublet libre de l'amine primaire sur le carbonyle en position C-4 de Naringénine.
- ❖ Dans la deuxième étape, le gain d'un proton par l'ion d'alcoïde et la perte d'un proton par l'ion d'ammonium forme un intermédiaire tétraédrique neutre. La protonation peut avoir lieu sur l'azote ou l'atome d'oxygène, puis l'élimination d'une molécule d'eau de l'intermédiaire pour former une imine.

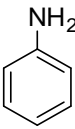
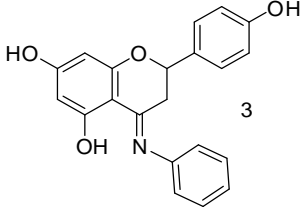
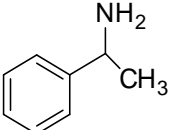
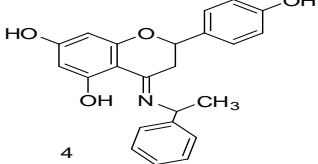
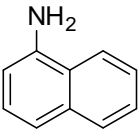
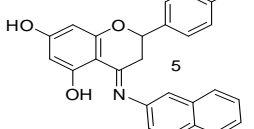
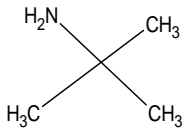
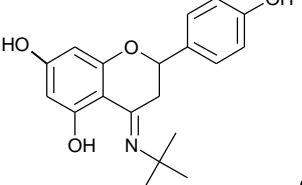
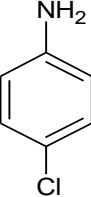
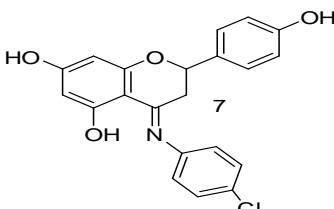
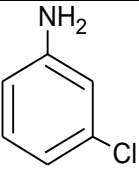
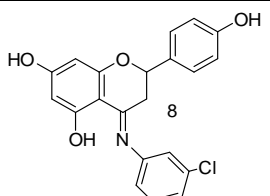
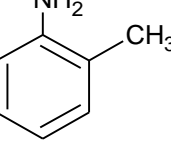
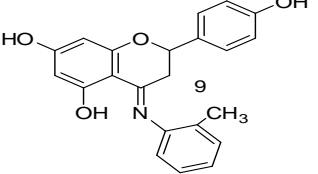
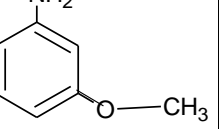
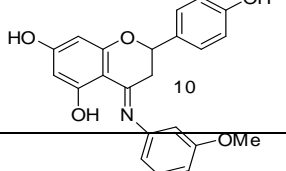


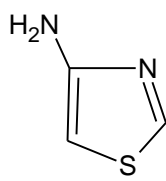
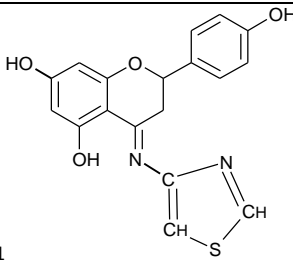
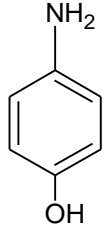
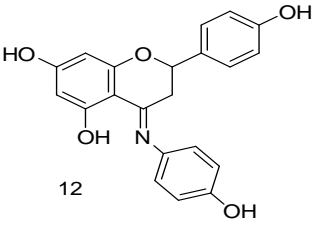
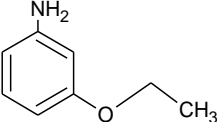
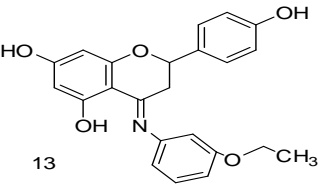
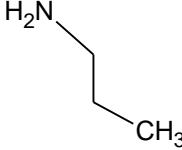
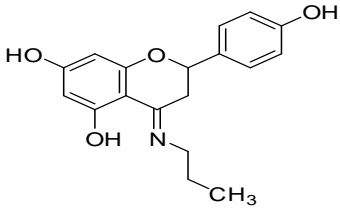
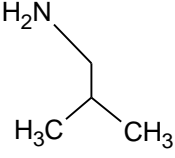
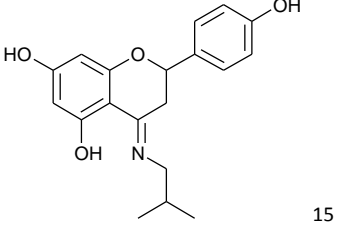
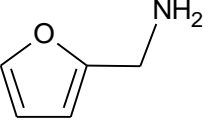
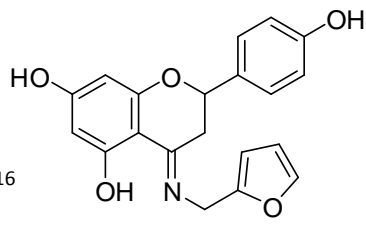

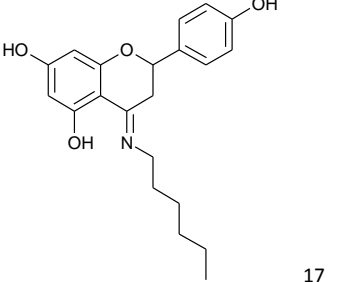
**Figure III.03.** Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse des 4-iminoanaringénine 3-17

Les amines primaires utilisées sont : l'aniline, 3-chloroaniline, 4-chloroaniline, naphthylamine, méthylbenzylamine, 3-méthoxyaniline, 3-éthoxyaniline, o-toluidine, 1,3-thiazol-4-amine, propylamine, tertbutylamine, isobutylamine hexylamine, fufuralamine, 4-aminophenol. Après 24 heures de reflux dans le méthanol, les 4-iminoanaringénine **3-17** sont obtenus avec des rendements moyens et élevés (45-70 %).

Les résultats obtenus pour la préparation des 4-iminoaringénine **3-17** sont récapitulés dans le Tableau III. 02:

Tableau III.02. Caractéristique physico-chimique des quinze dérivés naringénine élaborés

Entrée	Réactifs	Structures	Rdt, %	Pf, °C
3			45	200-202
4			69	209-211
5			60	200-202
6			62	206-208
7			62	196-198
8			65	200-202
9			55	186-188
10			60	180-182

11		 11	56	150-152
12		 12	60	188-190
13		 13	66	190-122
14		 14	65	200-202
15		 15	60	210-212
16		 16	70	196-198
17		 17	45	194-196

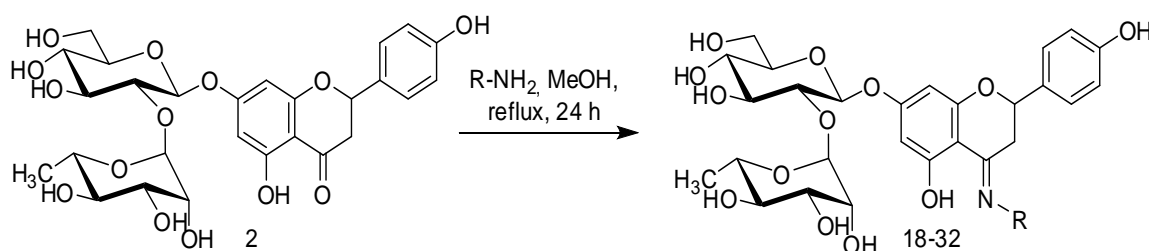
### III- 4-Synthèse des dérivés de la naringine

Pour la naringine, nous avons synthétisé quinze nouveaux dérivés d'iminoaringine par l'utilisation des monoamines primaires simples. Les produits de synthèse sont le résultat d'une réaction de condensation entre le site nucléophile des amines, et le site électrophile de la naringine situé en position C4.

#### III- 4-1-Mécanisme de la synthèse des iminoaringines

Les quinze nouveaux dérivés d'iminoaringine sont obtenus à partir d'un mélange équimolaire d'une série des amines primaires (l'aniline, 3-chloroaniline, 4-chloroaniline, naphthylamine, méthylbenzylamine, 3- méthoxyaniline, 3- ethoxyaniline, o-toluidine, 1,3-thiazol-4-amine, propylamine, tertbutylamine, isobutylamine hexylamine, fufuralamine, 4-aminophenol) et la naringine ; la réaction se déroule en milieu méthanolique sous chauffage à reflux pendant 24 h.

La figure (III.04) montre la méthode de préparation des nouveaux dérivés d'iminoaringine.



**Figure III.04.** Méthode de préparation des 4-iminoaringine 18-32

Le mécanisme proposé pour la synthèse des 4-iminoaringine **18-32** se fait en deux étapes (figure III.5) :

- ❖ La première étape du mécanisme consiste en une addition nucléophile qui se fait entre le doublet libre de l'amine primaire sur le carbonyle en position C-4 de Naringine.
- ❖ Dans la deuxième étape, le gain d'un proton par l'ion d'alcoïde et la perte d'un proton par l'ion d'ammonium forme un intermédiaire tétraédrique neutre. La protonation peut avoir lieu sur l'azote ou l'atome d'oxygène, puis l'élimination d'une molécule d'eau de l'intermédiaire pour former une imine.

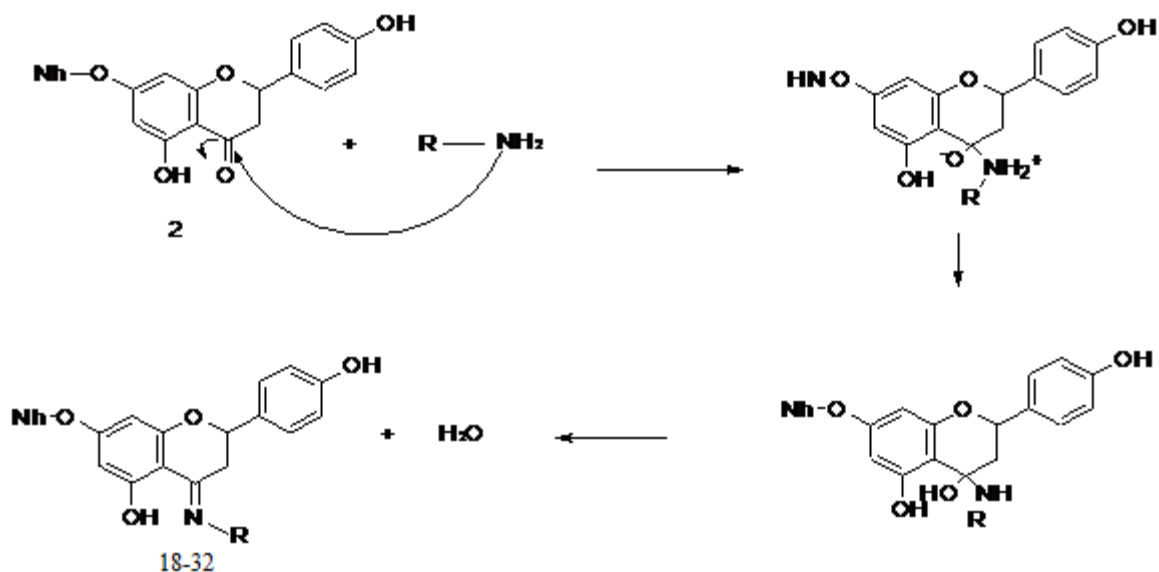
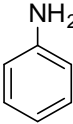
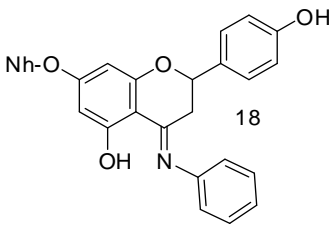
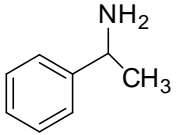
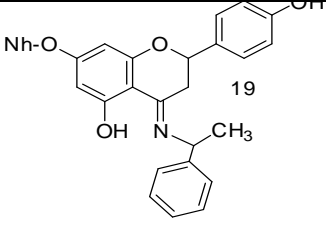
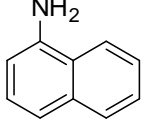
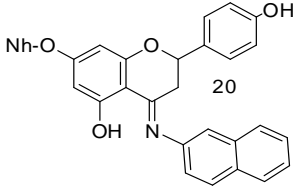
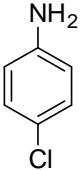
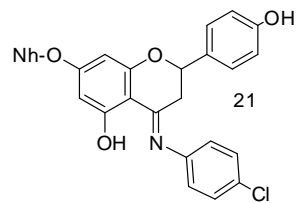
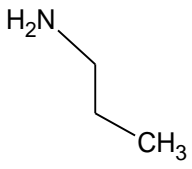
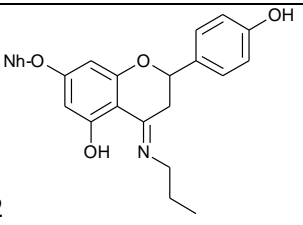
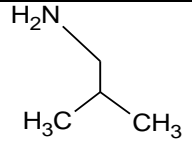
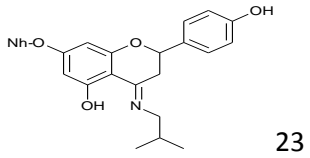
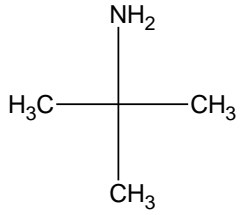
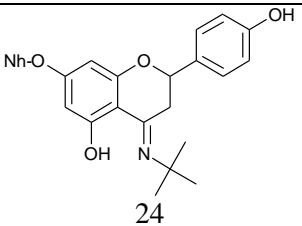
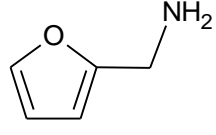
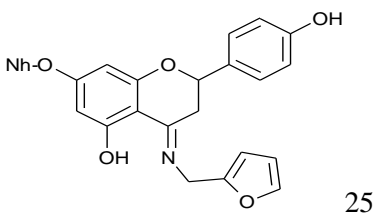
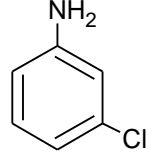
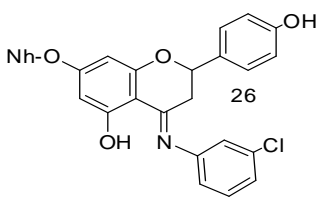
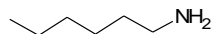
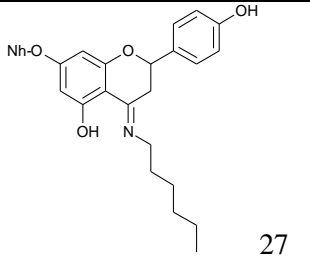


Figure III.05. Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse des 4-iminoaringénine 18-32

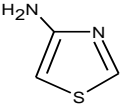
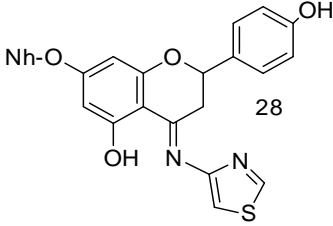
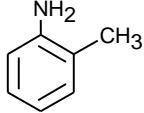
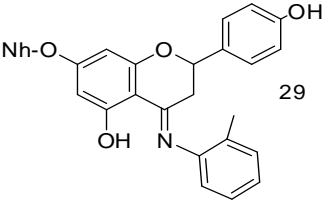
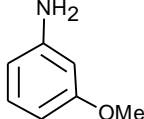
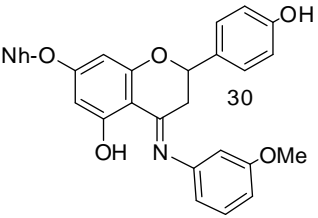
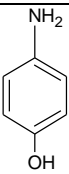
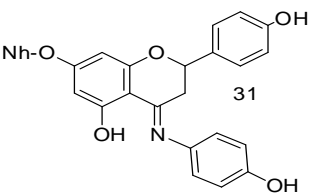
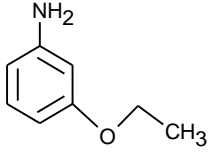
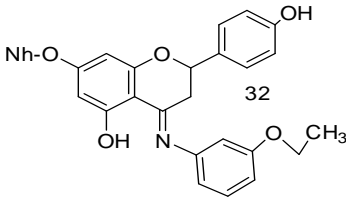
Les structures des composés synthétisés sont présentées dans le tableau (III.03), avec des rendements moyens et élevés (43% -75 %).

Tableau III.03. Caractéristique physico-chimique des quinze dérivés naringénine élaborées.

Entrée	Réactifs	Structures	Rdt,%	Pf,°C
18			43	160-162
19			74	166-168
20			75	170-172

21			66	165-177
22			63	200-202
23			64	210-212
24			51	206-208
25			66	196-198
26			55	208-210
27			46	194-196



28			50	188-190
29			45	190-192
30			56	190-192
31			61	194-196
32			55	200-202

### III.5. Analyse spectrale des différents composés synthétisés

#### III.5.1. Analyse UV

Les résultats d'analyse dans le domaine UV-vis (280- 600) nm de différents composés montrent des déplacements ((bathochrome ou hypsochrome) par rapport les deux bandes d'absorption (I et II) de la naringénine et celle de la naringine ; les spectres sont enregistrés dans le méthanol qui permet de la solubilité totale de ces dérivés dans une gamme de 200 nm à 600 nm, le tableau (III.04) représente les valeurs d'absorption de chaque produit dans cette région d'absorption.

**Tableau III.04** Les résultats d'analyse spectroscopie UV des iminoaringénines et iminoaringines

Les résultats d'analyse spectroscopie UV des iminoaringénines				Les résultats d'analyse spectroscopie UV des iminoaringines			
Composé	Aspect	Bande d'absorption UV $\lambda_{max}^{MeOH}$ (nm)		Composé	Aspect	Bande d'absorption UV $\lambda_{max}^{MeOH}$ (nm)	
		Bande II	Bande I			Bande II	Bande I
1	Beige	225	290	2	Jaune claire	220	285
3	Jaune claire	225	287	18	Beige	244	291
4	Noire	219	293	19	Jaune	235	291
5	Mauve	231	293	20	Violet claire	227	283
6	Marron	230	300	21	Jaune foncé	222	294
7	Marron	225	292	22	Marron	230	315
8	Marron	215	265	23	Marron.j	225	310
9	Jaune	217	290	24	Marron .j	230	300
10	Mauve	230	292	25	Marron	225	320
11	Jaune	225	285	26	Marron	228	290
12	Marron jaunâtre	218	290	27	Jaune	225	315
13	Jaune foncé	240	298	28	Marron	220	320
14	Jaune	239	315	29	Marron jaunâtre	230	285
15	Marron jaunâtre	225	310	30	Marron foncé	235	300
16	Marron	225	320	31	Marron jaunâtre	255	300
17	Jaune foncé	225	315	32	Marron	220	275

## III.5.2. Analyse IR

Pour plus de précision, nous avons analysé nos produits dans le domaine infra-rouge (600-4000)  $\text{cm}^{-1}$ , ce type d'analyse nous à donner des informations sur les fonctions les plus caractéristiques de ces dérivés. Le tableau (III.05), représente les valeurs d'absorption de chaque composé.

Tableau III.05 Analyse IR des iminoaringénines et des iminoaringines

Analyse IR des iminoaringénines (IR $\nu_{max}^{KBr}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ))			Analyse IR des iminoaringines (IR $\nu_{max}^{KBr}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ))		
Composé	C=O	C=N	Composé	C=O	C=N
1	1670	-	2	1645	-
3	-	1613	18	-	1575
4	-	1610	19	-	1611
5	-	1610	20	-	1600
6	-	1596	21	-	1611
7	-	1610	22	-	1601
8	-	1608	23	-	1607
9	-	1610	24	-	1598
10	-	1612	25	-	1607
11	-	1610	26	-	1574
12	-	1600	27	-	1596
13	-	1606	28	-	1600
14	-	1601	29	-	1602
15	-	1607	30	-	1604
16	-	1607	31	-	1598
17	-	1596	32	-	1600

D'après le Tableau III.5, nous remarquons l'absence de la bande d'absorption à  $1645\text{ cm}^{-1}$  (caractéristique à la liaison C=O de la naringine et de la naringénine) pour tous les produits, ainsi l'apparition d'une nouvelle bande entre  $1569\text{--}1613\text{ cm}^{-1}$  caractéristique à la double liaison C=N, cela montre bien la formation des imines.

### III.5. 3. Analyse RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C

Les résultats d'analyse de spectroscopie RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C sont donnés pour chaque composé dans la partie expérimentale ci-dessous.

### III. 6. Interprétation des spectres

Tous les composés ont été obtenus de bons rendements par des réactions de condensation sur le flavanone en utilisant des rapports molaires appropriés de différents réactifs dans méthanol. Ces composés synthétisés ont été purifiés par recristallisation dans l'éthanol.

Les dérivés de naringénine et naringine synthétisées sont généralement solubles dans les alcools (méthanol et l'éthanol) et l'eau, et ils sont insolubles dans l'éther diéthylique, l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme et le dichlorométhane.

#### III. 6.1. Les dérivés d'iminoaringénine.

Les résultats d'analyse spectroscopique UV sont enregistrés dans le méthanol. Le spectre d'absorption UV de la naringénine montre l'apparition de deux bandes principales vers 225 nm (bande I) et vers 290 nm (bande II) ; pour les composés synthétiques 6 et 13 la première bande apparaît dans le domaine 230-240 nm (Bande II) et la deuxième vers 300-298 nm (Bande I), donc la condensation nucléophile d'une amine primaire sur la naringénine provoque des déplacements bathochromes.

Les spectres d'analyse infrarouge des composés synthétiques montrent des résultats précis concernant la présence et l'absence des bandes caractérisant de ces produits.

Les dérivés 3-17 d'iminoaringénines présentent dans les spectres d'absorption dans la région IR des bandes caractéristiques vers ( $1569\text{ cm}^{-1} - 1613\text{ cm}^{-1}$ ) qui correspond à la formation de la fonction imine présentée par la double liaison C=N ; et aussi l'apparition des bandes d'absorption vers  $3200\text{ cm}^{-1}$  à  $3410\text{ cm}^{-1}$  qui caractérisent la présence des fonctions alcool (O-H), et vers  $1050\text{ cm}^{-1}$  pour la liaison (C-O), les liaisons C=C sont présentées par la vibration vers  $1410\text{ cm}^{-1}$  à  $1480\text{ cm}^{-1}$ . Remarquant pour chaque produit de synthèse 3-17 l'absence de la double liaison (C=O) du groupement carbonyle en position C4.

Un exemple d'analyse IR du composé 15 est présenté dans la figure III.06.

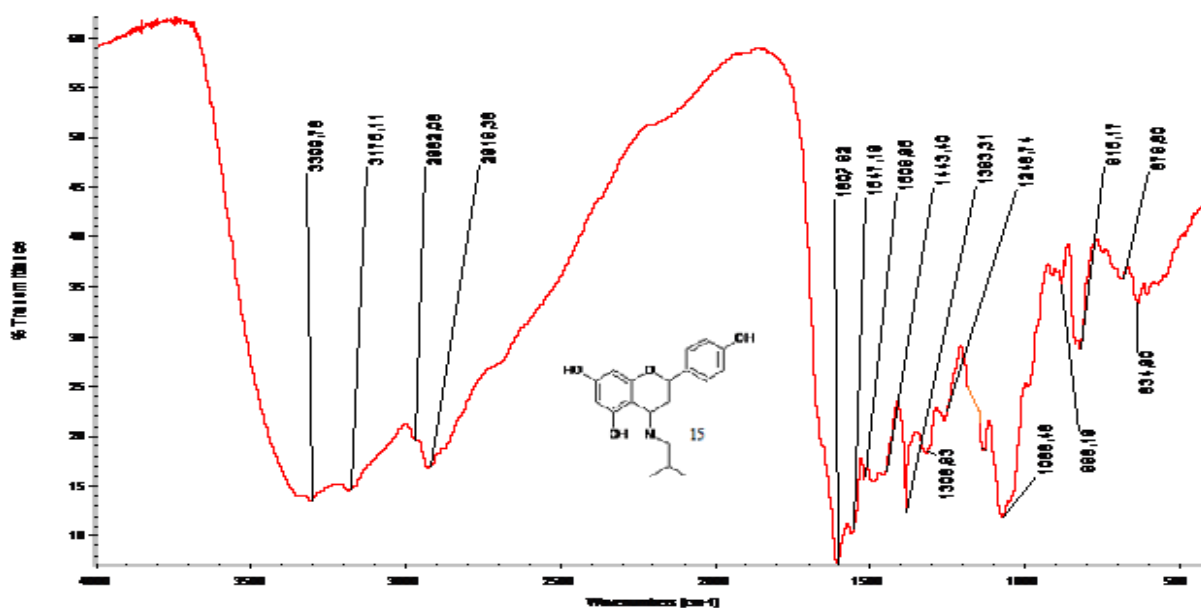


Figure III.06 .Spectre IR de produit 15

Un exemple d'analyse RMN<sup>1</sup>H du composé 15:

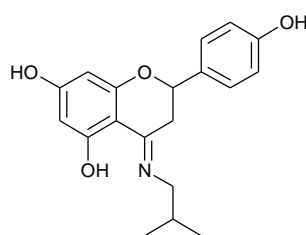


Figure III.07 : Produit 15.

- Deux signaux déblindés vers 7.22 ppm et 6.72 ppm correspondant aux C-H aromatiques du cycle B (H2'-H6', H3'-H5').
- Un signal multiplet apparaît vers 6.50 ppm de deux protons aromatiques H-6 et H-8 dans le cycle A.
- Doublet de doublet à 5.07 ppm avec une intégration de 1 proton correspond à H-2.
- Un signal vers 3.06 ppm apparaît au proton d'azote N-CH.
- Deux doublets dédoublés qui s'intègrent pour 2 protons apparaissant respectivement à 2.61 et 2.85 ppm correspondent aux H-3<sup>b</sup> et H-3<sup>a</sup> deux protons diastérotopique.
- Un signal multiplet vers 1.32 ppm de CH<sub>3</sub>

### III. 6. 2. Les dérivés d'iminoaringénine

D'après les résultats d'analyse spectroscopique UV, la naringine montre des bandes d'absorption maximale caractéristique à 220 nm (Bande I), et à 285 nm (Bande II).

L'étude des spectres UV est similaire dans les composés 18 et 25, elle montre une absorption maximale pour les deux bandes (I et II) dans le spectre enregistré dans le méthanol, la première bande apparaît dans le domaine 244-225 nm (Bande I) et la deuxième vers 291-320 nm (Bande II), donc la condensation nucléophile d'une amine primaire sur la naringine provoque des déplacements bathochromes dans la bande I avec  $\Delta\lambda = 24$  nm, et dans la bande II avec  $\Delta\lambda = 6$  nm par rapport à celle de naringine.

Les spectres IR fournissent des informations structurales importantes sur cette réaction de condensation. Les spectres des composés 18-32 présentent des bandes d'absorption caractéristiques aux vibrations d'élongation des liaisons : O-H, C=N, C=C et C-O, et l'absence de la bande d'absorption à  $1645\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la vibration d'élongation du groupement carbonyle C=O en position C-4 de naringine, confirme la formation des iminoaringénines 18-32. Les bandes d'absorption correspondent à la vibration de la liaison (C=N) pour les composés 18-32 appartiennent à ( $1569 - 1613\text{cm}^{-1}$ ). Les bandes d'absorption dues aux vibrations d'élongation des groupements hydroxyles ont été observées à une intensité forte vers  $3377-3426\text{cm}^{-1}$ . Alors que, la bande d'absorption attribuée à la liaison C=C aromatique apparaît de  $1552$  à  $1508\text{cm}^{-1}$ .

La figure suivante (figure III.8) représente un exemple d'analyse IR de produit 22 synthétisée.

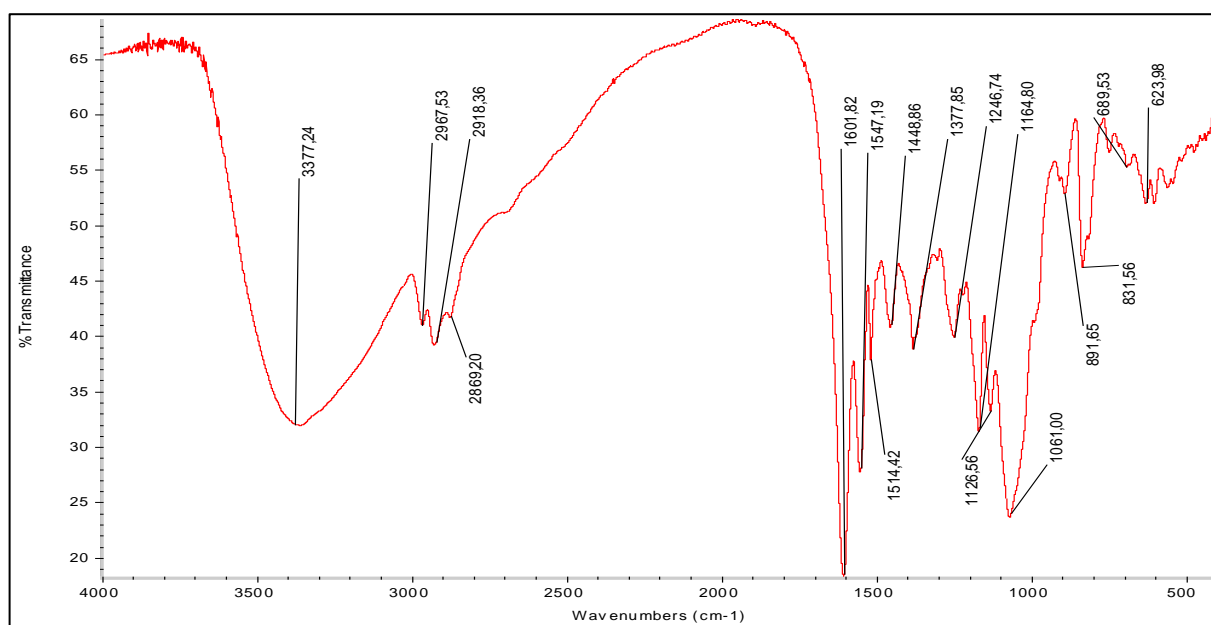


Figure III.08 : Spectre IR de produit 22.

Un exemple d'analyse RMN<sup>1</sup>H du composé **22** présenté dans la figure III.08:

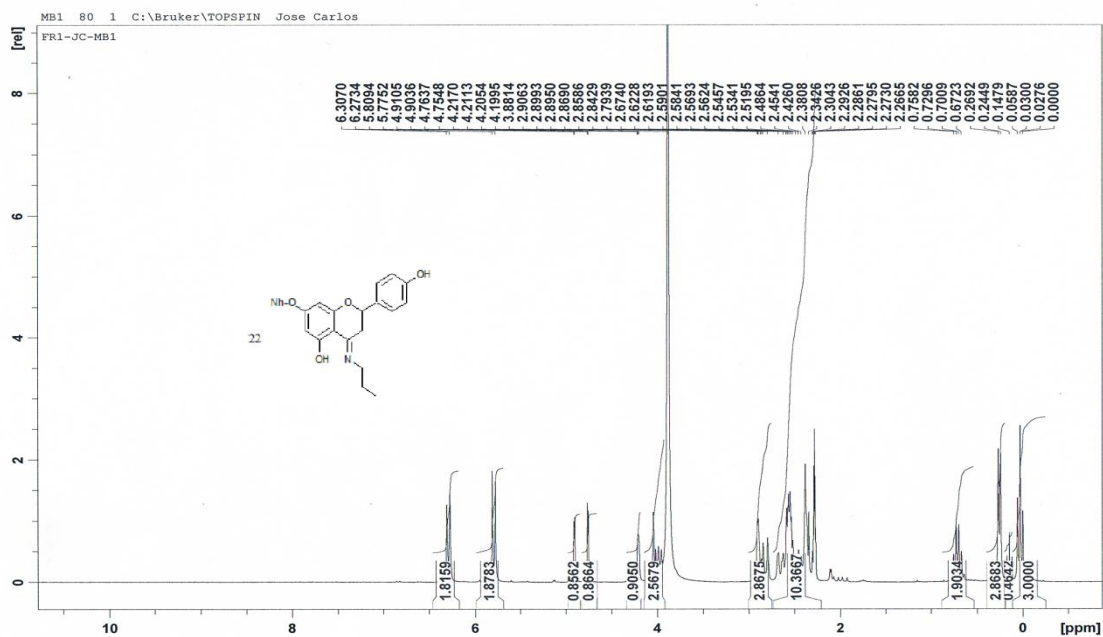


Figure III.09 : Spectre RMN<sup>1</sup>H de produit **22**.

Un exemple d'analyse RMN<sup>1</sup>H du composé **23** présenté dans la figure III.9

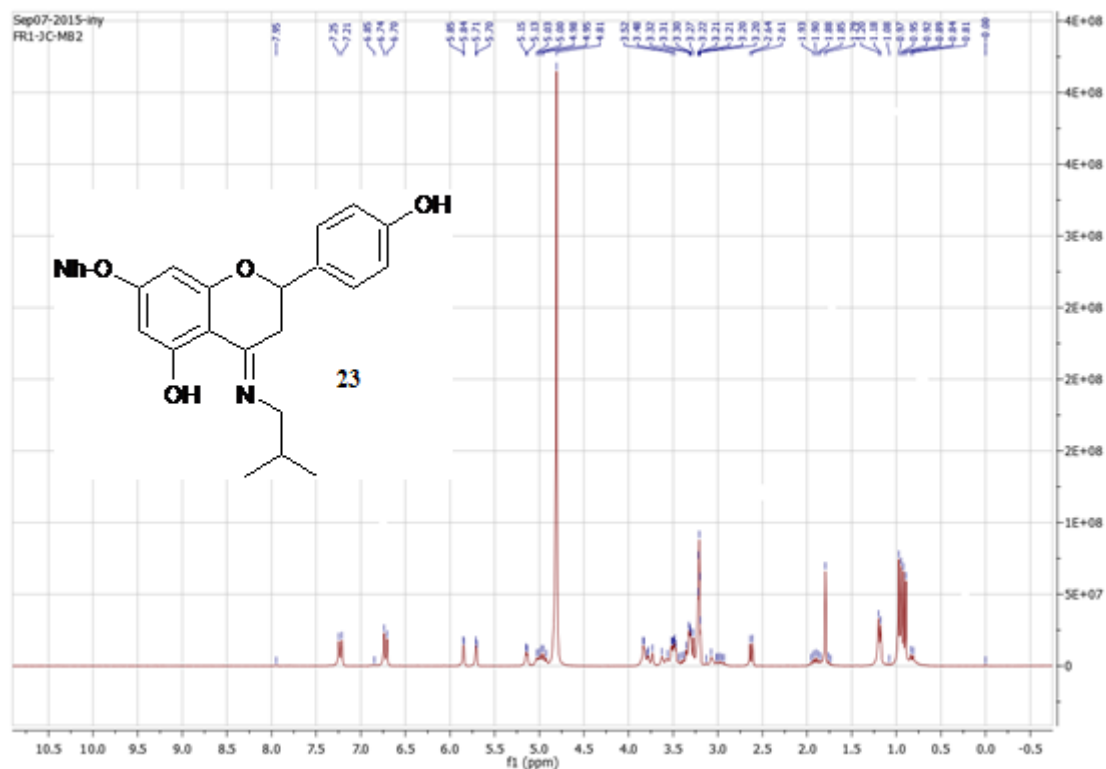


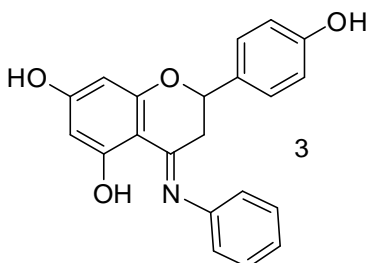
Figure III.10 : Spectre RMN<sup>1</sup>H de produit **23**.

- Deux signaux déblindés vers 7.22 ppm et 6.72 ppm correspondant aux C-H aromatiques du cycle B (H2'-H6', H3'-H5').
- Un signal multiplet apparaît vers 5.50 ppm de deux protons aromatiques H-6 et H-8 dans le cycle A.
- Doublet de doublet à 5.07 ppm avec une intégration de 1 proton H correspond à H-2.
- Un signal vers 3.06 ppm apparaît au proton lié à l'atome d'azote N-CH.
- Deux doublets dédoublés qui s'intègrent pour 2 protons apparaissant respectivement à 2.61 et 2.85 ppm correspondent aux H-3<sup>b</sup> et H-3<sup>a</sup> deux protons diastérotopiques.
- Un signal multiplet vers 1.2 ppm de CH<sub>3</sub>
- Un doublet vers 0.93 ppm de CH<sub>3</sub> lié au neohesperidoside.

### III.7. Partie expérimentale :

**III.7.1. Synthèse des 4-iminonaringénines 3-17 :** Dans un ballon de 50 mL, une solution du méthanol (5 mL), de naringénine (0.5 mmol) et de l'amine primaire (0.5 mmol) sont additionnées. Après 24 heures d'agitation à reflux, le précipité obtenu est filtré et lavé plusieurs fois avec de l'éther diéthylique, puis recristallisé avec l'éthanol.

- **Produit 3 : 2-(4-Hydroxyphényl)-4-(phénylimino) chroman-5,7-diol** Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de l'aniline (0.0465 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 347 g/mol, (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N).

**Rendement :** 45 %.

**Aspect :** solide jaune clair ; **Rf**= 0.94 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 200-202 °C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$  **cm<sup>-1</sup>**: 3410 (O-H), 1613 (C=N), 1480 (C=C), 1050 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 225-287 nm.

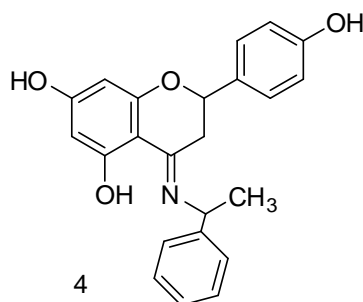
**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2' et H-6'), 7.13 (dd, 6.35, 6.4, H-3'', H-5''), 6.75 (dd, 6.35, 6.4, H-4''), 6.63 (dd, 6.4, 2.7, H-2'', H-6''), 6.31 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H, m, H-6 et H-8), 5.12 (1H, dd, *J* = 7.5 & 2.5 Hz, H-2), 2.95 (1H, dd, *J* = 12.5 & 2.5 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.64 (1H, dd, *J* = 12.5 & 7.5, H-3<sup>a</sup>).



**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta\text{ppm}$ ): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 146.51 (C-1''), 115.07 (C-2''), 115.07 (C-6''), 118.39 (C-4''), 129.26 (C-3''), 129.26 (C-5''). 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 49,9(C-N).

**Produit 4 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(methylbenzylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de méthylbenzylamine (0.0605 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire** : 375g/mol, ( $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$ ).

**Rendement** : 69%.

**Aspect** : solide noire. **Rf**= 0.92. (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion** : 209-211 °C.

**IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$** : 3400 (O-H), 1610 (C=N), 1400 (C=C), 1050 (C-O).

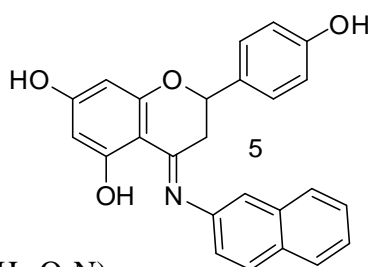
**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MthOH}}$  nm**: 219-293 nm.

**RMN  $^1\text{H}$**  (250 MHz, MeOH,  $\delta\text{ppm}$ ) 7.54(2H,d, $J = 7.2\text{ Hz}$ , H-2' et H-6'), 7.40 (dd, 6.35, 6.4, H-3'', H-5''), 7.39 (dd, 6.4, 2.7, H2'', H-6''), 7.27 (dd, 6.35, 6.4, H-4''), 6.30 (2H,d, $J = 7.2\text{ Hz}$ , H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m, H-6 et H-8), 5.02(1H,dd, $J = 7.5\text{ \& } 2.5\text{ Hz}$ , H-2), 2.89 (1H,dd, $J = 12.5\text{ \& } 2.5\text{ Hz}$ , H3<sup>b</sup>), 2.60 (1H,dd, $J = 12.5\text{ \& } 7.5$ , H3<sup>a</sup>), 1.50 (3H,s, CH<sub>3</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta\text{ppm}$ ): ): 164.2 (C-4), 162.8 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 146.51 (C-1''), 130.9(C-1'), 127.2 (C-2',-C6'), 116.8 (C-3',C5'), 115.07 (C-2''), 115.07 (C-6''), 118.39 (C-4''), 129.26 (C-3''), 129.26 (C-5''). 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 62,6(C-N), 24.7(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 5: 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(naphthylimino) chroman-5,7-diol .**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de naphthylamine (0.0759 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 397g/mol, (C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N).

**Rendement :** 60%.

**Aspect :** solide mauve. **Rf**= 0.92 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 200-202 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm**<sup>-1</sup>: 3400 (O-H), 1610 (C=N), 1480 (C=C), 1050 (C-O).

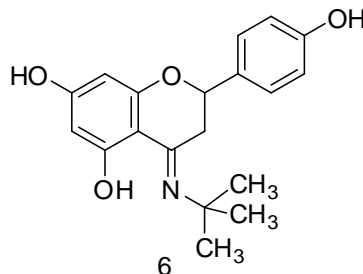
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 231-293 nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' et H-6'), 6.79 (d, 2.3 Hz H-1''), 6.75 (dd, 2.3 Hz, 8.4 Hz, H-3''), 7.51 (d, 8.4 Hz, H-4''), 7.55 (d, 8.25 Hz, H-5''), 7.09 (dd, 8.4 Hz, 6.9 Hz, H-6''), 7.23 (dd, 6.9 Hz, 8.55 Hz, H-7''), 6.30 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6 et H-8), 5.12(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.95 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.64 (1H,dd,*J*=12.5 & 7.5,H3<sup>a</sup>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 111.57 (C-1''), 140.76 (C-2''), 119.95 (C-3''), 129.04 (C-4''), 127.58 (C-5''), 123.40 (C-6''), 126.35 (C-7'')

➤ **Produit 6 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(tertbutylimino) chroman-5,7-diol .**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de tertbutylamine (0.0365 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 327 g/mol, (C<sub>19</sub> H<sub>21</sub> O<sub>4</sub> N).

**Rendement :** 62 %.

**Aspect :** solide marron **Rf**= 0.86 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 206-208 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm**<sup>-1</sup>: 3420 (O-H), 1596 (C=N), 1514 (C=C), 1181 (C-O).

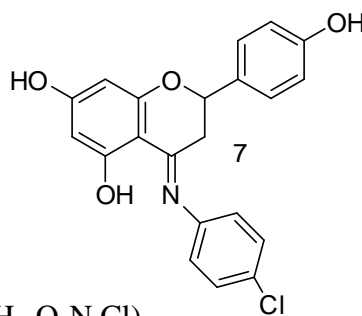
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 230 (band II); 300 (band I).

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.34 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6 et H-8), 5.12(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.95 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.64 (1H,dd, $J$ =12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 1.30 (9H,s,3CH<sub>3</sub>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 49,9(C-N), 40.7(C3), 30.4(3CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 7 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(p-Chloro-Phenylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de p-chloroaniline (0.063 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire** : 381.5 g/mol, (C<sub>21</sub> H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N Cl).

**Rendement** : 62%.

**Aspect** : solide marron. **Rf**= 0.84 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion** : 196-198 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm**<sup>-1</sup>: 3415 (O-H), 1610 (C=N), 1520 (C=C), 1175 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 225-292 nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.30(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.48 (dd, 6.1, 6.2, H-3'', H-5''), 7.02 (dd, 6.1, 6.2, H-2'', H-6''), 6.34 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 6.04 (2H,m,H-6 et H-8), 5.05(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.90 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.60 (1H,dd, $J$ =12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 148.17 (C-1''), 122.1 (C-2'',C-6''), 130.85 (C-3'',C-5''), 132.6 (C-4'').

➤ **Produit 8 : 4-naringénine. 2-(4-Hydroxyphényl)-4-( m-Chloro-Phénylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de 3-chloroaniline (0.063 g ; 0.5 mmol).

**Masse Molaire :** 381.5 g/mol, (C<sub>21</sub> H<sub>16</sub> O<sub>4</sub> N Cl).

**Rendement :** 65 %.

**Aspect :** R<sub>f</sub> = 0.80 (Eau/MthOH : 1/10).

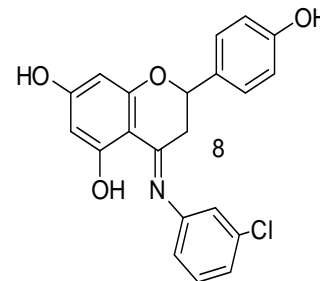
**Point de fusion :** 200-202°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$  cm<sup>-1</sup>: 3410(O-H), 1608(C=N), 1525(C=C), 1169 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 215-265 nm.

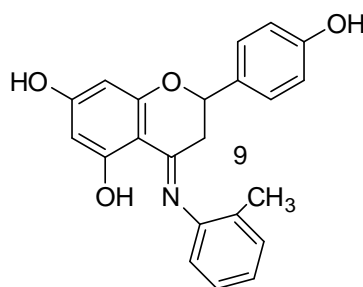
**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.30(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.01 (dd, 5.9, 6.1 H-5''), 6.69 (d, 6.1, H-4''), 6.55 (d, 2.3, H-2''), 6.43 (dd, 6.2, 2.3 H-6''), 6.40 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.62 (2H,m,H-6andH-8), 5.06(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.95 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.64 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 148.17 (C-1''), 102.1 (C-2''), 159.85 (C-3''), 107.6 (C-4''), 130.4 (C-5''), 104.01 (C-6'').



➤ **Produit 9 : 2-(4-Hydroxyphényl)-4-( 2-Me Phénylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de *o*-Toluidine (0.053 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 361 g/mol, (C<sub>22</sub> H<sub>19</sub> O<sub>4</sub> N).

**Rendement :** 55 %.

**Aspect :** solide jaune. R<sub>f</sub> = 0.86 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 186-188°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$  cm<sup>-1</sup>: 3422 (O-H), 1610 (C=N), 1508 (C=C), 1142 (C-O).

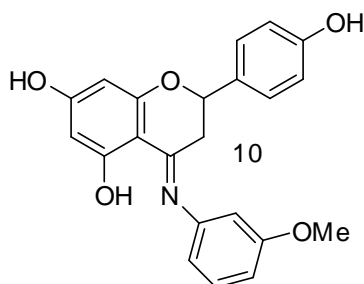
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 217-290 nm.

**RMN <sup>1</sup>H** (250 MHz, MeOH, δ ppm) 7.39(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.02 (d, 6.35, H-3''), 6.98 (dd, 6.3, 6.4, H-5''), 6.67 (dd, 6.2, 6.1, H-4''), 6.58 (d, 6.4, H-6''), 6.42 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.60 (2H,m,H-6andH-8), 5.00(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.98 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.59 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 2.03 (3H, s, 2''-CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (63 MHz, MeOD, δ ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 134.9(C-1''), 120.01(C-6''), 121.3(C-4''), 127.1(C-2''), 128.3(C-3''), 129.2(C-5''), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 13.2(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 10 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(*m*-Methoxy phenylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de *m*-anisidine (0.061 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 377 g/mol, (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N).

**Rendement :** 60 %.

**Aspect :** solide mauve **R<sub>f</sub>** = 0.78 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 180-182°C.

**IR ν<sub>max</sub><sup>KBr</sup> cm<sup>-1</sup>:** 3410 (O-H), 1612(C=N), 1491 (C=C), 1077-1178 (C-O).

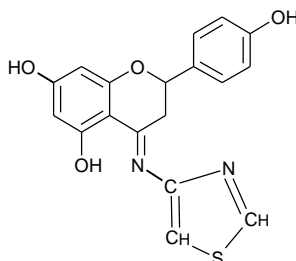
**UV λ<sub>max</sub><sup>MthOH</sup> nm:** 230-292nm.

**RMN <sup>1</sup>H** (250 MHz, MeOH, δ ppm) 7.20(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.21 (d, H-2''), 6.35 (dd, H-4''), 7.05 (dd, H-5''), 6.24d (dd, H-6''), 6.29(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6andH-8), 5.15(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.99 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.68 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 3.71 (3H, s, 3''-O-CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (63 MHz, MeOD, δ ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 148.13 (C-1''), 101.00 (C-2''), 160.75 (C-3''), 107.93 (C-4''), 130.07 (C-5''), 103.81 (C-6''). 95.0 (C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 40.7(C<sub>3</sub>).

➤ **Produit 11: 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(2-thiazolylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de 4-aminothiazole (0.05 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 354 g/mol, (C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S).

**Rendement :** 56 %.

**Aspect :** solide jaune  $R_f = 0.82$  (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 150-152°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr} \text{cm}^{-1}$ : 3435(O-H), 1610 (C=N), 1485 (C=C), 1165 (C-O).

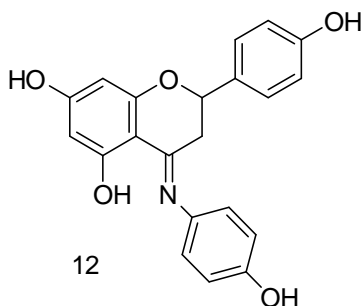
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH} \text{nm}$ : 225-285 nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.35(2H,d,  $J = 7.2$  Hz, H-2' and H-6'), 6.48 (2H,d,  $J = 7.2$  Hz, H-3' and H-5'), 7.1 (d, 6.7, H-3''), 6.78 (d, 6.7, H-5''), 5.79 (2H,m, H-6 and H-8), 5.12(1H,dd,  $J = 7.5$  & 2.5 Hz, H-2), 3.02 (1H,dd,  $J = 12.5$  & 2.5 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.62 (1H,dd,  $J = 12.5$  & 7.5, H-3<sup>a</sup>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.3 (C-4), 164.2 (C-7), 161.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.2(C-4'), 130.1(C-1'), 127.8 (C-2',-C6'), 126.3 (C-3',C5'), 168.92 (C-1''), 138.49 (C-3''), 108.18 (C-5''), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 40.7(C3)

➤ **Produit 12 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(p-hydroxyphenylimino) chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de 4-aminophénole (0.054 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 363 g/mol, (C<sub>21</sub> H<sub>17</sub> O<sub>5</sub> N),.

**Rendement : 60 %.**

**Aspect :** solide marron jaunâtre  $R_f=0.70$  (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 188-190°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3470 (O-H), 1600 (C=N), 1480 (C=C), 1077-1155 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 218-290nm.

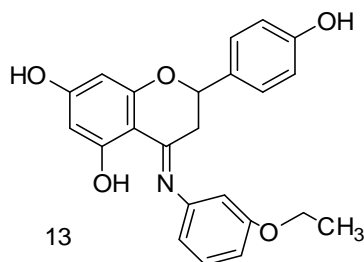
**RMN  $^1H$**  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.50(2H,d, $J = 7.2$  Hz, H-2' and H-6'), 6.37 (2H,d, $J = 7.2$  Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6andH-8), 5.11(1H,dd, $J=7.5$  & 2.5Hz,H-2), 2.98 (1H,dd, $J = 12.5$  & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.63 (1H,dd, $J=12.5$ & 7.5,H3<sup>a</sup>).

**RMN  $^{13}C$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 49,9(C-N), 40.7(C3).

➤ **Produit 13 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(m-ethoxyphenylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine

e (0.137g ; 0.5 mmol) et de 3-ethoxyphenyl (0.068g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire : 391 g/mol**, (C<sub>23</sub> H<sub>21</sub> O<sub>5</sub> N),.

**Rendement : 66 %.**

**Aspect :** solide jaune foncé  $R_f= 0.60$  (Eau/MthOH : 1/10).

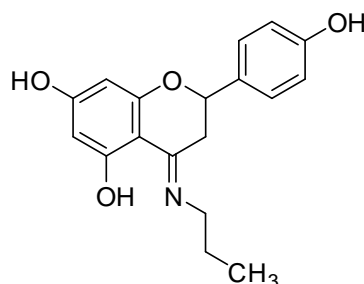
**Point de fusion :** 190-122°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3420 (O-H), 1606 (C=N), 1489 (C=C), 1100-1160 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 240-298nm.

➤ **Produit 14 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(propylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137g ; 0.5 mmol) et de propylamine (0.029 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 313 g/mol, (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N),.

**Rendement :** 65 %.

**Aspect :** jaune. **R<sub>f</sub>**= 0.80 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 200-202°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3377 (O-H), 2967 (CH<sub>3</sub>), 2962-2918 (CH<sub>2</sub>), 1601 (C=N), 1514 (C=C), 1066(C-O).

**UV** $\lambda_{max}^{MeOH}$  nm: 239 (band I); 315 (band II).

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm) 7.31(2H,d,*J* = 7.5Hz, H-2' and H-6'), 6.29(2H,d,*J* = 7.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.04(1H,s,H-8), 5.0(1H,dd, *J* = 7.5 & 2.5 Hz, H-2), 3.60(2H,m, N-CH<sub>2</sub>), 2.86(1H,dd, *J* = 12.5 & 2.5 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.62(1H,dd, *J* = 12.5 & 7.5 Hz, H-3<sup>a</sup>), 1.27(2H,m, CH<sub>2</sub>), 0,71(3H,m, CH<sub>3</sub>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 168.1 (C-4), 164.4 (C-7), 159.9(C-5), 157.4(C-4'), 156.7 (C-9) 128.7 (C-2',C6'), 116.9 (C-3',C5'), 95.1(C-6), 94.2(C-8), 76.7 (C-2), 59.8(CH<sub>2</sub>-N), 40.3(C-3), 21.1(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 11.3(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 15 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-( isobutylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de isobutylamine (0.028 g ; 0.5 mmol).

**Masse Molaire :** 327 g/mol, (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N).

**Rendement :** 60 %.

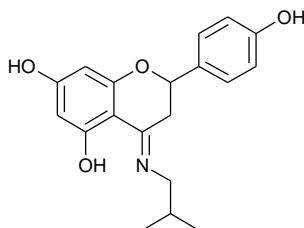
**Aspect :** Marron jaunâtre. **R<sub>f</sub>**= 0.82 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 210-212°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3388 (OH), 1607 (C=N), 1508 (C=C), 1126 (C-O).

**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 225 (band II); 310 (band I)nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm) 7.22(2H,d,*J* = 7.5 Hz, H-2' and H-6'), 6.72(2H,d,*J* = 7.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.50(2H,m, H-6 and H-8), 5.07(1H,dd, *J* = 7.5 & 2.5 Hz, H-2), 3.06 (1H,d, N-CH), 2.85 (1H,dd, *J* = 2.5 & 12.5 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.61 (1H,dd, *J* = 7.5 & 12.5 Hz, H-3<sup>a</sup>), 1.32 (6H,m, 2CH<sub>3</sub>).

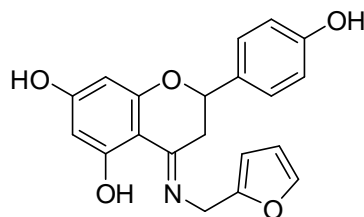




**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 168.1 (C-4,C-7), 163.6 (C-5), 160.0(C-9), 158.2 (C-4'),129,5(C-1'),128.7 (C-2',-C6'), 115.6 (C-3',C5'),95.0(C-6),94.6(C-8), 77.7 (C-2),44.6(CH-N),39.6(C3), 24.3(2CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 16 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(furfurylimino)chroman-5,7-diol**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de furfurylamine (0.048 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 351 g/mol, (C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N).

**Rendement :** 70 %.

**Aspect :** Marron. **Rf**= 0.84 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 196-198°C.

**IR $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>:** 3366 (OH, strong), 1607 (C = N), 1514 (C=C), 1170 (C–O).

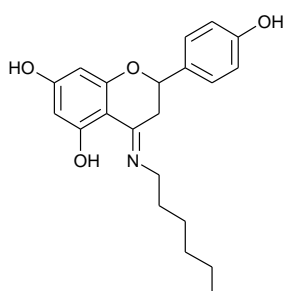
**UV $\lambda_{max}^{MthOH}$ nm:** 225 (band II); 320 (band I).

**RMN  $^1\text{H}$**  (250 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm), 7.51(1H,d, $J$  = 7.5 Hz, H-3''), 7.31(2H,d, $J$  = 7.5 Hz, H-2' and H-6'),6.82 (2H,d, $J$  = 4.61Hz,H-3' andH-5'),6.48(1H,m,H-4''),6.28 (3H,m,H-6,8 and 5''),5.79 (1H,dd,  $J$ =7.5&2.5Hz,H-2), 4.81(2H,s,N-CH<sub>2</sub>), 2.90(1H,dd, $J$ = 15 &2.5 Hz,H3<sup>b</sup>), 2.73(1H,dd, $J$ =15& 7.5 Hz,H3<sup>a</sup>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 168.5 (C-4 ),167,5( C-7), 162.5 (C-5), 159.9 (C-9), 158.1 (C-4'), 152.1 (C-1''), 143.1 (C-3''), 129.7 (C-1'), 128.8 (C-2' & 6'), 115.6 (C-3' & 5'),110.6 (C-4''),108.2 (C-10), 107.7 (C-5''), 95.3 (C-6),94.8 (C-8),77.7(C-2),44.2(CH<sub>2</sub>-N),39.1(C-3).

➤ **Produit 17 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(hexylimino)chromane-5,7-diol.**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.137 g ; 0.5 mmol) et de (0.050 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 355 g/mol, (C<sub>21</sub> H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>N),.

**Rendement :** 45 %.

**Aspect :** Jaune. **Rf**= 0.90 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 194-196°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3382 (OH), 1596 (C = N), 1552 (C=C), 1125 (C-O).

**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$ nm: 225 (band II); 315 (band I),

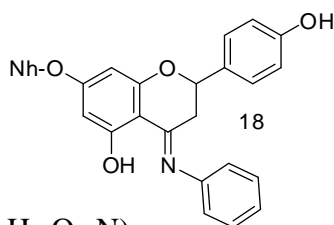
**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm) 7.22 (2H,d,*J* = 7.5 Hz, H-2' and H-6'), 6.71 (2H,d, *J* = 7.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.10 (1H, t, H-6), 5.76 (1H,dd,*J*=7.5 & 2.5 Hz,H-2), 3.40 (2H,m,H1''), 3.20 (1H,dd,*J*= 15 & 2.5 Hz,H3<sup>b</sup>) 2.68 (1H,dd,=7.5&15 Hz,H3<sup>a</sup>), 1.63 (2H,m,H2'') , 1.37 (2H,m,H5''), 1.29 (6H,m,H3'',4'') 0.82(3H,m, H6'').

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 167.9 (C-4&C-7), 163.5 (C-5), 160.0 (C-9), 158.2(C-4'), 129.7 (C-1') 128.8 (C-2'&6'), 115.6 (C-3'&5'), 95.6 (C-6), 94.7 (C-8) , 77.7 (C-2) , 45.1 (C-1''), 39.7(C-3), 31.3 (C-2''&C-4''), 26.5 (C-3'') , 22.5 (C-5''), 14.3(C-6'').

**III.7.2. Synthèse des 15- iminoaringine 18-32 :** Dans un ballon de 50 mL, une solution du méthanol (5 mL), de naringine (0.5 mmol) et de l'amine primaire (0.5 mmol) sont additionnées. Après 24 heure d'agitation à reflux, le précipité obtenu est filtré et lavé plusieurs fois avec de l'éther diéthylique, puis recristallisé avec l'éthanol.

➤ **Produit 18 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(phenylimino) chromane-5-ol-7-O- Neohesperidoside.**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de aniline (0.046 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 655 g/mol, (C<sub>33</sub> H<sub>37</sub>O<sub>13</sub>N).

**Rendement :** 43 %.

**Aspect :** solide beige **Rf**= 0.90 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 160-162°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3400(O-H), 1575(C=N), 1375 (C=C), 1050-1070 (C-O).

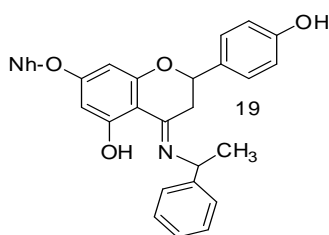
UV  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 244-291nm.

RMN  $^1H$  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.13 (dd, 6.35, 6.4, H-3'', H-5''), 6.75 (dd,, 6.35, 6.4, H-4''), 6.63 (dd, 6.4, 2.7, H2'', H-6''), 6.31 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m, H-6 and H-8), 5.12(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz, H-2), 2.95 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz, H3<sup>b</sup>), 2.64 (1H,dd, $J$ =12.5 & 7.5, H3<sup>a</sup>), 0.81(3H,m, CH<sub>3</sub>) .

RMN  $^{13}C$  (63 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2', C-6'), 126.8 (C-3', C-5'), 146.51 (C-1''), 115.07 (C-2''), 115.07 (C-6''), 118.39 (C-4''), 129.26 (C-3''), 129.26 (C-5''). 95.0 (C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 49.9(C-N), 9.3(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 19 : 2-(4-Hydroxyphényl)-4-(naphthylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de méthylbenzylamine (0.060 g ; 0.5 mmol).



Masse Molaire : 683 g/mol, (C<sub>35</sub> H<sub>41</sub> O<sub>13</sub> N).

Rendement : 74 %.

Aspect : solide jaune Rf= 0.9 (Eau/MthOH : 1/10).

Point de fusion : 166-168°C.

IR  $\nu_{max}^{KBr}$  cm<sup>-1</sup>: 3400 (O-H), 1611(C=N), 1400(C=C), 1050(C-O).

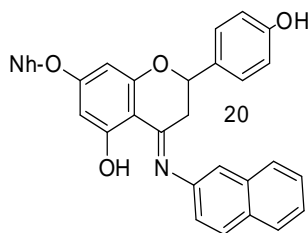
UV  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 235-291nm.

RMN  $^1H$  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.40 (dd, 6.35, 6.4, H-3'', H-5''), 7.39 (dd, 6.4, 2.7, H2'', H-6''), 7.27 (dd, 6.35, 6.4, H-4''), 6.30 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m, H-6 and H-8), 5.02(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz, H-2), 2.89 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz, H3<sup>b</sup>), 2.60 (1H,dd, $J$ =12.5 & 7.5, H3<sup>a</sup>), 1.50 (3H,s, CH<sub>3</sub>), 0.70(3H,m, CH<sub>3</sub>) .

RMN  $^{13}C$  (63 MHz, MeOD,  $\delta$ ppm): ): 164.2 (C-4), 162.8 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 146.51 (C-1''), 130.9(C-1'), 127.2 (C-2', -C6'), 116.8 (C-3', C5'), 115.07 (C-2''), 115.07 (C-6''), 118.39 (C-4''), 129.26 (C-3''), 129.26 (C-5''). 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 62.6(C-N), 24.7(CH<sub>3</sub>), 9.0(CH<sub>3</sub> GL).

➤ **Produit 20: 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(naphthylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de naphthylamine (0.075 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 705 g/mol, (C<sub>37</sub>H<sub>39</sub>O<sub>13</sub>N).

**Rendement :** 75%.

**Aspect :** solide violet claire **Rf**= 0.82 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 170-172°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$  **cm**<sup>-1</sup>: 3410 (O-H), 1600 (C=N), 1395 (C=C), 1050-1065 (C-O).

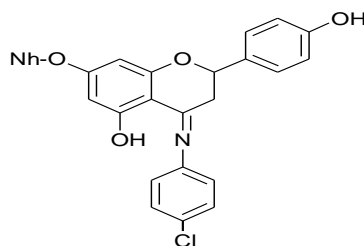
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 227-283nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.79 (d, 2.3 Hz H-1''), 6.75 (dd, 2.3 Hz, 8.4 Hz, H-3''), 7.51 (d, 8.4 Hz, H-4''), 7.55 (d, 8.25 Hz, H-5''), 7.09 (dd, 8.4 Hz, 6.9 Hz, H-6''), 7.23 (dd, 6.9 Hz, 8.55 Hz, H-7''), 6.30 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6andH-8), 5.12(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.95 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.64 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 0.70(3H,m, CH<sub>3</sub>).

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 111.57 (C-1''), 140.76 (C-2''), 119.95 (C-3''), 129.04 (C-4''), 127.58 (C-5''), 123.40 (C-6''), 126.35 (C-7''), 9.8(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 21 :2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(4-chlorophenylimino)chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringénine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de 4-chloroaniline (0.063 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 689,5 g/mol, (C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>O<sub>13</sub>N Cl).

**Rendement :** 66%.

**Aspect :** solide jaune foncé **Rf**= 0.80 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 165-177°C.

**IR $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>:** 3200 (O-H), 1600 (C=N), 1450(C=C), 1050(C-O).

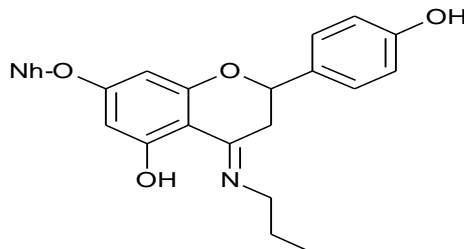
**UV  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm:** 222-294nm.

**RMN <sup>1</sup>H** (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.30(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.48 (dd, 6.1, 6.2, H-3'', H-5''), 7.02 (dd, 6.1, 6.2, H-2'', H-6''), 6.34 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 6.04 (2H,m,H-6andH-8), 5.05(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.90 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.60 (1H,dd, $J$ =12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 0.92(3H,m, CH<sub>3</sub>) .

**RMN <sup>13</sup>C** (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 148.17 (C-1''), 122.1 (C-2'',C-6''), 130.85 (C-3'',C-5''), 132.6 (C-4''), 9.35(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 22 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(propylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de (0.029 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 621 g/mol, (C<sub>30</sub> H<sub>39</sub>O<sub>13</sub>N).

**Rendement :** 63 %.

**Aspect :** solide marron **Rf**= 0.82 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 200-202°C.

**IR $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>:** 3377 (O-H), 1601 (C=N), 1514 (C=C), 1295-1203 (C-O).

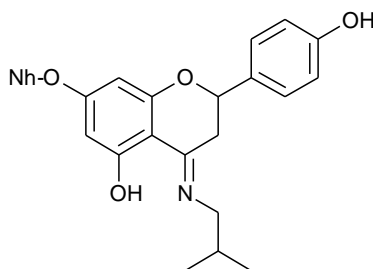
**UV  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm:** 230-315nm.

**RMN <sup>1</sup>H** (250 MHz, MeOH, ppm,  $J^3$ ,  $J^2$  Hz) 7.31(2H,d,H-2' and H-6'), 6.29(2H,d,H-3' and H-5'), 5.74(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5 Hz, H-2), 3.60(2H,m,N-CH<sub>2</sub>), 2.86(1H,dd, $J$ =2.5 & 12.5 Hz,H3<sup>b</sup>), 2.62(1H,dd, $J$ =7.5& 12.5, H3<sup>a</sup>), 1.27(2H,m,CH<sub>2</sub>), 0.71(3H,m, CH<sub>3</sub>) .

**RMN <sup>13</sup>C** (63 MHz, MeOH, ppm): 168.1 (C-4), 164.4 (C-7), 159.9(C-5), 156.7 (C-9) 128.7 (C-2',-C6'), 126.9 (C-3', C5'), 76.7 (C-2), 59.8(CH<sub>2</sub>-N), 47.3(C3), 21.1(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 9.3(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 23 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(isobutylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de isobutylamine (0.028 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 635g/mol, (C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>O<sub>13</sub>N) .

**Rendement :** 64%.

**Aspect :** solide marron jaunâtre. **Rf**= 0.76. (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 210-212 °C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$  **cm**<sup>-1</sup>: 3388 (O-H), 1607 (C=N), 1508 (C=C), 1170-1126 (C-O).

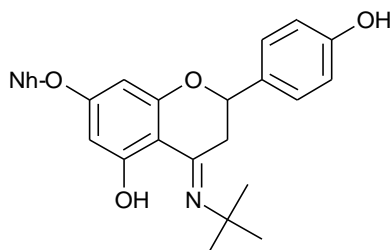
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm**: 225-310 nm.

**RMN** <sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.22(2H,d,H-2'andH-6'),6.72(2H,d,H-3'andH-5'), 5.50 (2H, m,H-6 and H-8),5.07(1H,dd,J=7.5&2.5Hz,H-2),3.06(2H ,d,N-CH<sub>2</sub>), 2.85 (1H ,dd,J=2.5 & 12.5Hz,H<sub>3</sub><sup>b</sup>),2.61 (1H ,dd,J=7.5 &12.5Hz,H<sub>3</sub><sup>a</sup>),1.2(1H,m,CH),0.93(6H,m,2CH<sub>3</sub>) .

**RMN** <sup>13</sup>C (63 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm): 168.1 (C-4,C-7), 163.6 (C-5), 160.0(C-9), 158.2 (C-4'),129.5(C-1'),128.7 (C-2',-C6'), 115.6 (C-3',C5'), 77.7 (C-2),68.6(CH<sub>2</sub>-N),39.6(C3), 32.3(CH),20.4(2CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 24 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(tertbutylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de tertbutylamine (0.036 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 635g/mol, (C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>O<sub>13</sub>N).

**Rendement :** 51%.

**Aspect** : solide marron jaunâtre. **Rf**= 0.86 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion** : 206-208 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$ : 3420 (O-H), 1598 (C=N), 1514 (C=C), 1181-1126 (C-O).

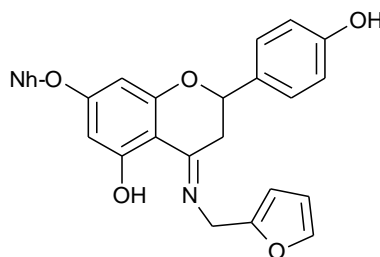
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}nm$ : 230-300 nm.

**RMN**  $^1H$  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.54(2H,d,H-2' and H-6'), 6.34(2H,d,H-3' and H-5'), 5.79(2H,m,H-6andH-8), 5.12(1H,dd,J=7.5&2.5Hz,H-2), 2.95(1H,dd,J=2.5&12.5,H3<sup>b</sup>), 2.64(1H,dd,J=7.5&12.5,H3<sup>a</sup>), 1.20(9H,s, 3CH<sub>3</sub>).

**RMN**  $^{13}C$  (63 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 157.4 (C-9) 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 78.3 (C-2), 59.9(C-N), 46.7(C3), 28.3(3CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 25** : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(furfurylimino)chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.30 g ; 0.5 mmol) et de furfurylamine (0.048 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire** : 635g/mol, (C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>O<sub>14</sub>N).

**Rendement** : 66%.

**Aspect** : solide marron. **Rf**= 0.80 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion** : 196-198 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$ : 3366 (O-H), 1607 (C=N), 1514 (C=C), 1170-1126 (C-O).

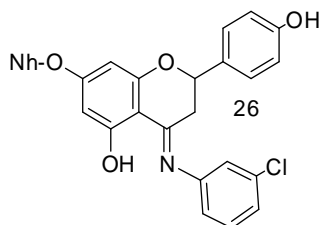
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}nm$ : 225-320 nm.

**RMN**  $^1H$  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm), 7.51 (1H,d,H-3''), 7.31 (2H,d,H-2' and H-6'), 6.82(2H,d,H-3'andH-5'), 6.48(1H,m,H-4''), 6.28(3H,m,H-6,8and5''), 5.79 (1H,dd,J=7.5&2.5Hz,H-2), 4.81 (2H,s,N-CH<sub>2</sub>), 2.90 (1H,dd,J=2.5&15 Hz,H3<sup>b</sup>), 2.73(1H,dd,J=7.5&15 Hz,H3<sup>a</sup>), 1.18(3H,d, CH<sub>3</sub>).

**RMN**  $^{13}C$  (63 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm): 168.5 (C-4), 167.5(C-7), 162.5 (C-5), 159.9(C-9), 158.1 (C-4'), 152.1 (C-1''), 143.1(C-3''), 129.7 (C-1'), 128.8 (C-2' & 6'), 115.6(C-3' & 5'), 110.6(C-4''), 107.7(C-5''), 77.7(C-2), 44.2(CH<sub>2</sub>-N), 39.1(C-3), 18.5(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 26 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(3-chlorophenylimino)chromane-5-ol-7-O-neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.308 g ; 0.5 mmol) et de 3-chloroaniline (0.063 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 689,5 g/mol, (C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>O<sub>13</sub>N Cl).

**Rendement :** 55%.

**Aspect :** solide marron. **Rf**= 0.70 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 208-210 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm<sup>-1</sup>:** 3426 (O-H), 1574 (C=N), 1508 (C=C), 1170-1082 (C-O).

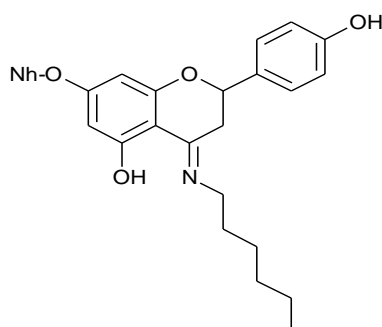
**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  **nm:** 228-290 nm.

**RMN**<sup>1</sup>**H** (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.55(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.22 (dd, 5.9, 6.1 H-5''), 6.75 (d, 6.1, H-4''), 6.60 (d, 2.3, H-2''), 6.40 (dd, 6.2, 2.3H-6''), 6.38 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.50 (2H,m,H-6andH-8), 5.01(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 3.01 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.74 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 1.05(3H,d, CH<sub>3</sub>)

**RMN**<sup>13</sup>**C** (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.4 (C-4), 164.0 (C-7), 162.3(C-5), 159.8 (C-9), 157.2(C-4'), 130.8(C-1'), 127.1 (C-2',-C6'), 125.9 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.1(C-8), 78.0 (C-2), 148.22 (C-1''), 102.1 (C-2''), 159.88 (C-3''), 107.0 (C-4''), 130.2 (C-5''), 104.0 (C-6''), 17.8(CH<sub>3</sub>).

➤ **Produit 27 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(hexylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de l'hexylamine (0.05 g ; 0.5 mmol).





**Masse Molaire :** 665g/mol, (C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>O<sub>13</sub>N),.

**Rendement :** 46%.

**Aspect :** solide Jaune. **R<sub>f</sub>**= 0.6 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 194-196 °C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm<sup>-1</sup>:** 3382 (O-H), 1596 (C=N), 1552 (C=C), 1170-1137 (C-O).

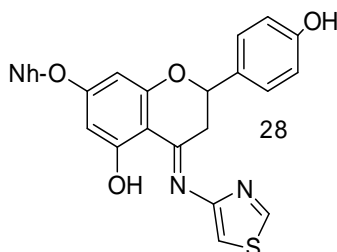
**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$ **nm:** 225-315 nm.

**RMN**<sup>1</sup>**H** (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.22(2H,d,H-2' and H-6'), 6.71(2H,d,H-3' and H-5'), 5.76(1H,dd,J=7.5&2.5Hz,H-2), 3.40(2H,m,H''), 3.20(1H,dd,J=2.5&15Hz,H3<sup>b</sup>), 2.68 (1H, dd, J=7.5&15 Hz,H3<sup>a</sup>), 1.63(2H,m,H2''), 1.37(6H,m,H3'',4''and 5''), 1.05(3H,m, H6''), 0.82(3H,d, CH<sub>3</sub>).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (63 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm): 167.9 (C-4&7), 163.5(C-5), 160.0 (C-9), 158.2(C-4'), 129,7(C-1'), 128.8(C-2'&6'), 115.6(C-3'&5'), 77.7(C-2), 45.1(C-1''), 39.7(C-3), 31.3(C-2''&5''), 26.5(C-3''), 22.5(C-5''), 17.8(C-6''), 14.3(CH<sub>3</sub><sup>GLU</sup>).

➤ **Produit 28 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(2-thiazolylimino)chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de 4-aminothiazol (0.05g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 662 g/mol, (C<sub>30</sub> H<sub>34</sub>O<sub>13</sub>N<sub>2</sub>S).

**Rendement :** 50%.

**Aspect :** solide marron. **R<sub>f</sub>**= 0.56 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 188-190°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ **cm<sup>-1</sup>:** 3425 (O-H), 1600 (C=N), 1540 (C=C), 1155-1140 (C-O).

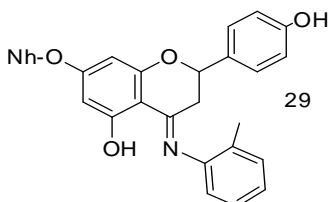
**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$ **nm:** 220-320nm.

**RMN**<sup>1</sup>**H** (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.35(2H,d,J = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.48 (2H,d,J = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 7.1 (d, 6.7, H-3''), 6.78 (d, 6.7, H-5''), 5.79 (2H,m,H-6andH-8), 5.12(1H,dd,J=7.5 & 2.5Hz,H-2), 3.02 (1H,dd,J = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.62 (1H,dd,J=12.5 & 7.5,H3<sup>a</sup>), 0.98(3H,d, CH<sub>3</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.3 (C-4), 164.2 (C-7), 161.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.2(C-4'), 130.1(C-1'), 127.8 (C-2',-C6'), 126.3 (C-3',C5'), 168.92 (C-1''), 138.49 (C-3''), 108.18 (C-5''), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 40.7(C3), 12.8(CH<sub>3</sub><sup>GLU</sup>).

➤ **Produit 29 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(2-Me-Phenylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de o-toluidine (0.053g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 669 g/mol, (C<sub>34</sub> H<sub>39</sub> O<sub>13</sub> N).

**Rendement :** 45 %.

**Aspect :** solide marron jaunâtre **R<sub>f</sub>** = 0.68 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 190-192°C.

**IR  $\nu_{max}^{KBr}$  cm<sup>-1</sup>:** 3410(O-H), 1602(C=N), 1515 (C=C), 1165-1130(C-O).

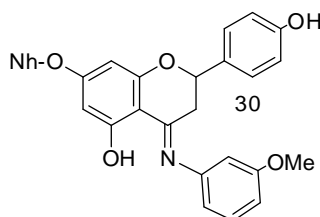
**UV  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm:** 230-285nm.

**RMN  $^1\text{H}$**  (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.39(2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.02 (d, 6.35, H-3''), 6.98 (dd, 6.3, 6.4, H-5''), 6.67 (dd, 6.2, 6.1, H-4''), 6.58 (d, 6.4, H-6''), 6.42 (2H,d, $J$  = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.60 (2H,m,H-6andH-8), 5.00(1H,dd, $J$ =7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.98 (1H,dd, $J$  = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.59 (1H,dd, $J$ =12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 2.03 (3H, s, 2''-CH<sub>3</sub>), 0.95(3H,d, CH<sub>3</sub>) .

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 134.9(C-1''), 120.01(C-6''), 121.3(C-4''), 127.1(C-2''), 128.3(C-3''), 129.2(C-5''), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 13.2(CH<sub>3</sub>), 10.8(CH<sub>3</sub><sup>GLU</sup>).

➤ **Produit 30 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(*m*-Methoxyphenylimino) chromane-5-ol-7-O- neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de *m*-anisidine (0.061 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 685 g/mol, (C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>O<sub>14</sub>N).

**Rendement :** 56 %.

**Aspect :** solide marron foncé **R<sub>f</sub>**=0.80 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 190-192°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3422 (O-H), 1604(C=N), 1532(C=C), 1175-1129 (C-O).

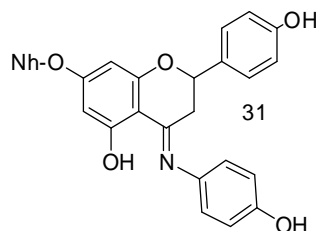
**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$ nm: 235-300nm.

**RMN**<sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.20(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.21 (d, H-2''), 6.35 (dd, H-4''), 7.05 (dd, H-5''), 6.24d (dd, H-6''), 6.29(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.79 (2H,m,H-6andH-8), 5.15(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 2.99 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.68 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 3.71 (3H, s, 3''-O-CH<sub>3</sub>), 1.01(3H,d, CH<sub>3</sub>) .

**RMN**<sup>13</sup>C (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 148.13 (C-1''), 101.00 (C-2''), 160.75 (C-3''), 107.93 (C-4''), 130.07 (C-5''), 103.81 (C-6''). 95.0 (C-6), 94.6 (C-8), 78.3 (C-2), 40.7(C3), 12.8(CH<sub>3</sub><sup>GLU</sup>).

➤ **Produit 31 : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(p-hydroxyphenylimino) chromane-5-ol-7-O-neohesperidoside**

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de 4-aminophénol (0.054 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire :** 671g/mol, (C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>O<sub>14</sub>N).

**Rendement :** 61 %.

**Aspect :** marron jaunâtre **R<sub>f</sub>** = 0.70 (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion :** 194-196°C.

**IR** $\nu_{max}^{KBr}$ cm<sup>-1</sup>: 3415(O-H), 1598(C=N), 1515(C=C), 1142-1155 (C-O).

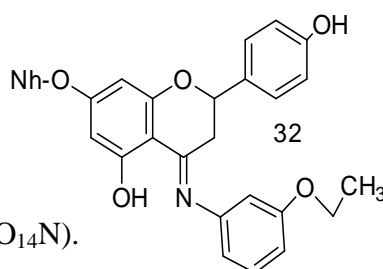
**UV** $\lambda_{max}^{MthOH}$ nm: 255-300 nm.

**RMN**<sup>1</sup>H (250 MHz, MeOH,  $\delta$  ppm) 7.53(2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 6.85 (2H,d,*J* = 7.2 Hz, H-3' and H-5'), 5.62 (2H,m,H-6andH-8), 5.09(1H,dd,*J*=7.5 & 2.5Hz,H-2), 3.00 (1H,dd,*J* = 12.5 & 2.5Hz,H3<sup>b</sup>), 2.70 (1H,dd,*J*=12.5& 7.5,H3<sup>a</sup>), 1.18(3H,d, CH<sub>3</sub>) .

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (63 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm): 164.2 (C-4), 164.1 (C-7), 162.7(C-5), 160.0 (C-9), 157.4(C-4'), 130.9(C-1'), 127.9 (C-2',-C6'), 126.8 (C-3',C5'), 95.0(C-6), 94.6(C-8), 78.3 (C-2), 49,9(C-N), 40.7(C3).

➤ **Produit 32** : 2-(4-Hydroxyphenyl)-4-(m-ethoxyphenylimino) chromane-5-ol-7-O-neohesperidoside

Ce produit est préparé à partir de naringine (0.303g ; 0.5 mmol) et de 3-ethoxyphenyl (0.068 g ; 0.5 mmol).



**Masse Molaire** : 699 g/mol, ( $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{O}_{14}\text{N}$ ).

**Rendement** : 55 %.

**Aspect** : marron  $R_f=0.80$  (Eau/MthOH : 1/10).

**Point de fusion** : 200-202°C.

**IR**  $\nu_{max}^{KBr}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3411 (O-H), 1600(C=N), 1528(C=C), 1135-1115 (C-O).

**UV**  $\lambda_{max}^{MthOH}$  nm: 220-275nm.

**III.8. Conclusion :**

Dans cette partie de travail, nous avons comme objectif la synthèse de nouveaux dérivés de la Naringine et la Naringénine. Nous avons atteint notre but par des méthodes de synthèse originales qui se faisant à partir des réactifs appropriés et qui nous ont permis de synthétiser une large variété de nouveaux iminoaringénine et iminoaringine non connus dans la littérature.

La réaction de condensation de la naringine et la naringénine par l'amine possible et réalisable dans les conditions normales et sans catalyse. Dans cette étude nous avons montré que : Le rendement des imino naringine et des imino naringénine dépend beaucoup de la nature d'amine primaire.

L'identification des produits synthétisés par les méthodes spectroscopique IR , UV et RMN confirme la présence de la fonction imine dans la majorité des produits.

#### IV. Introduction

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. L'emploi d'une phase stationnaire chirale (PSC) est aujourd'hui de loin la méthode la plus utilisée et repose sur la formation labile de diastéréoisomères à la surface de la phase énantiométrique. [1-4]

Les développements des technologies en chimie analytique ont permis la mise en évidence de l'existence des stéréoisomères dans beaucoup de produits naturels. En particulier, les flavanones qui pourraient faire exister à deux configurations différentes à la position C2 [5-10].

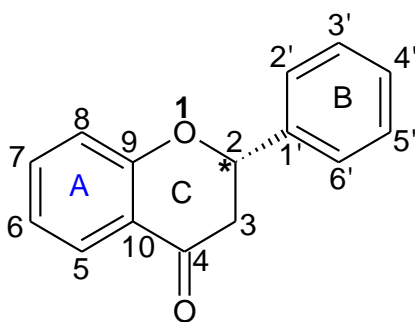


Figure IV.1 : Structure de base des flavanones [11].

L'obtention de ces composés présente un intérêt clinique majeur vu leur activité athérosclérose, anti-inflammatoire, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale ...etc[11-13]. Bien que l'analyse des énantiomères et des épimères des flavanones chirales a été effectuée pendant plus de 20 ans et malgré les avantages thérapeutiques potentiels des flavanones chirales et l'importance de la stéréosélectivité dans l'activité pharmacologique, çà reste souvent un déficit dans les sciences chimiques, pharmaceutiques, et médicales [14-15].

Le but de notre travail est d'étudier la séparation des énantiomères et des diastéréoisomères des dérivés Iminoanringénines et Iminoanringénines par CLHP, suite aux travaux réalisés dans notre laboratoire, puis d'optimiser tous les conditions analytiques en utilisant les PSCs à base de polysaccharides en deux modes chromatographiques: en phase normale et en phase organique polaire.

### **IV.1. Chromatographie liquide haute performance**

Avant les années 1970, un petit nombre de méthode chromatographique est utilisé dans les laboratoires. Ultérieurement, des colonnes ouvertes sont utilisées pour initier l'introduction de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) dans la séparation des composés chimiques complexes [10-12].

La chromatographie liquide à haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées [14].

Notre travail expérimental nous a permis dans un premier lieu de comprendre les principes de fonctionnement des modules constituant un système CLHP Shimadzu 20-A disponible dans notre laboratoire.

### **IV.2. Principe de CLHP**

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans une colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [11-13] Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire [15].

### **IV.3. Présentation du système CLHP SHIMADZU LC 20-A**

Les différentes composantes d'une chaîne CLHP sont présentées sur le schéma suivant Figure IV.2

Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.



**Figure IV.2.** Les organes d'une chaîne CLHP SHIMADZU LC-20A isocratique

1. La phase mobile est extraite de la bouteille réservoir et pompée dans les tubulures par La pompe.
2. Le dégazeur élimine l'air dissous de la phase mobile, empêchant la formation de bulles d'air et par conséquent, toute élévation, dérive ou autre irrégularité de la ligne de base causée par l'air dissous.
3. La pompe envoie la phase mobile dans l'injecteur manuel, la colonne et le détecteur (dans cet ordre) et finalement dans le récipient d'égout.
4. Des échantillons sont injectés dans le système par l'injecteur manuel avec une seringue.
5. La colonne contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.
6. Un détecteur UV, ( $\lambda = 290\text{nm}$  pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule  $12 \mu\text{L}$  il permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser.
7. La phase mobile en provenance du détecteur s'écoule dans le récipient d'égout

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:



### **IV.3.1. Dégazeur DGU-20A<sub>5</sub>**

Afin d'assurer une analyse stable à tout moment, la phase mobile devra être dégazée. La phase mobile passe à travers une tubulure spéciale faite de filme de résine. Le dégazage est très réalisé par réduction de la pression entourant cette tubulure. Ce dégazeur peut dégazer séparément jusqu'à 5 solvant raccordé à l'unité de la pompe. [12-14]

### **IV.3.2. La pompe LC-20AD**

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire [1, 3,4]. Elle permet de travailler soit :

- **En mode isocratique**, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- **En mode gradient**, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- ✓ Débit de la phase mobile
- ✓ viscosité de l'éluant
- ✓ taille des grains de la phase stationnaire
- ✓ géométrie de la colonne.

### **IV.3.3. L'injecteur**

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- **Manuelle** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- **Automatique** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne **Figure IV.3.**

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.



**Figure IV.3.** Injecteur manuel.

#### **IV.3.4. Détecteur Shimadzu SPD-20A**

Le Shimadzu SPD-20A est un détecteur multifonctionnel spectrophotométrique utilisé pour la chromatographie liquide à haute performance. Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-400 nm) relié à la sortie de colonne. [12,13].

L'appareil dispose de 3 modes de mesures : longueur d'onde unique, longueur d'onde double et balayage de longueur d'onde. Le mode longueur d'onde double exécute simultanément la détection de deux longueurs d'onde, et peut fournir des chromatogrammes des deux longueurs d'onde, ou un chromatogramme d'une longueur d'onde et un chromatogramme de ratio. Dans le mode de balayage de longueur d'onde, c'est le spectre d'absorbance qui est mesuré. Le mode balayage de longueur d'onde est conçu pour être utilisé pendant que le flux est arrêté [14,15].

#### **IV.3.5. Contrôleur du système CBM-20Alite**

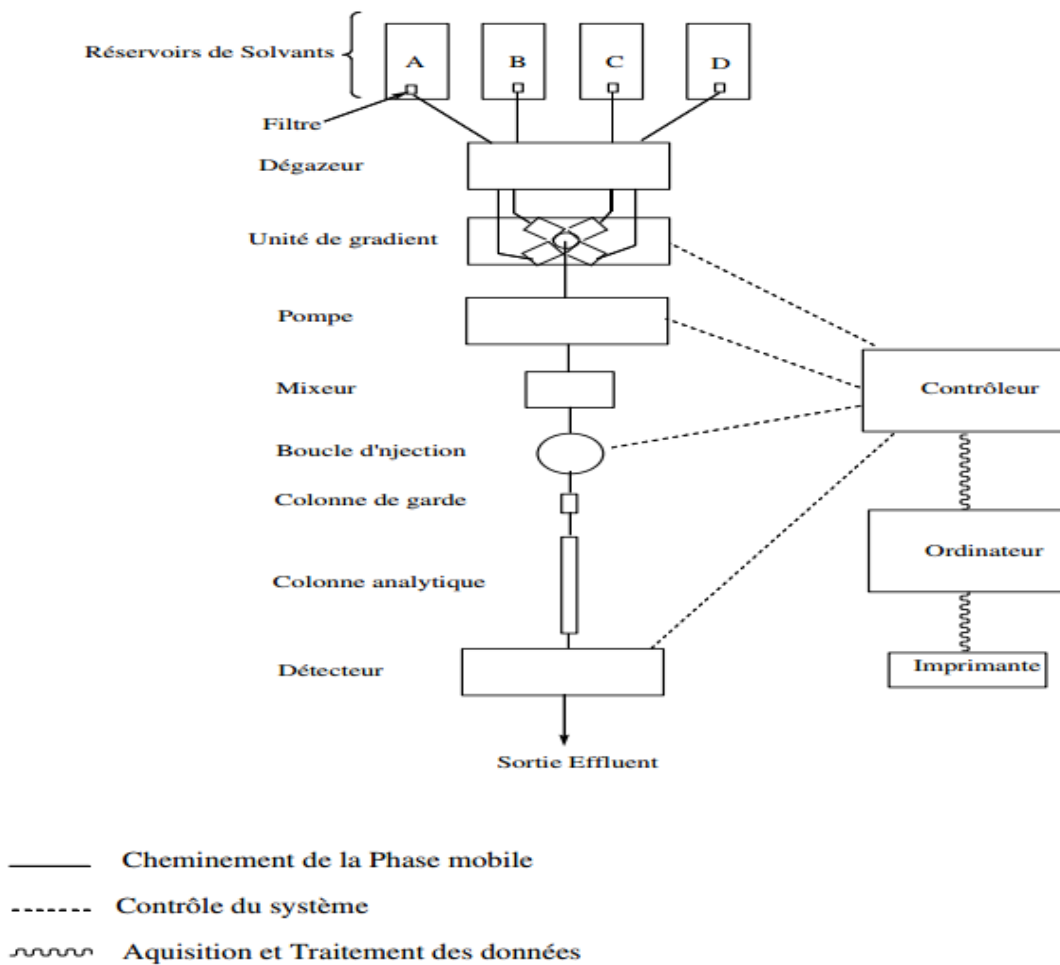
Le CBM-20Alite en option peut contrôler jusqu'à 5 modules CLHP. Étant installé dans l'unité de pompe, le système nécessite un espace plus réduit [16].

#### **IV.3.6. Système de traitement des données**

C'est un ordinateur menu du logiciel LC Solution. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Les données traitées peuvent être

imprimées. Le logiciel LC Solution offre deux types d'applications qui intègrent la plupart des fonctions pour l'analyse : analyse en temps réel et analyse en différé :

- Analyse en temps réel (LC Real time analysis) : Elle nécessite la mise en marche du système, et le contrôle en mode software grâce au logiciel LC Solution. [16].
- Analyse en différé (Post-run analysis) : L'analyse est effectuée sans que le système soit relié. Cette option permet d'éditer des dossiers de méthodes ou des fichiers séquentiels pendant l'acquisition des données.



**Figure IV .4 : Diagramme du système HPLC utilisé [21].**

#### IV.4. Etude de la séparation chirale des iminoaringénines et des iminoaringénines sur différentes PSCs

L'essor de la chromatographie chirale lié à l'évolution des phases stationnaires chirales repose sur « les travaux de recherche de grands groupes tels que ceux de Davankov, Pirkle, Okamoto, Blaschke, Allenmark, Hermansson, Armstrong, Gasparrini, Francotte et Lindner » Le premier exemple de séparation chirale en pSFC (pour packed column SFC ou SFC sur colonne remplie) a été réalisé en 1985 par l'équipe de Caude et Rosset sur une phase stationnaire chirale (PSC) de type Pirkle. Aujourd'hui, environ 1780 phases stationnaires chirales sont décrites dans la littérature, dont environ 200 sont commercialisées. [3-4]

La plupart des polymères naturels, incluant les polysaccharides, sont chiraux (cellulose, amylose, chitosane, xylane, curdlane, dextrane et inuline) et ont un potentiel d'applications chirales. La résolution d'acides aminés à l'aide de polysaccharide (cellulose) a été reportée pour la première fois en 1951 par Kotake et al. [17]. Parmi les polymères naturels, la cellulose et l'amylose sont les plus abondants dans la nature (figure IV.5)

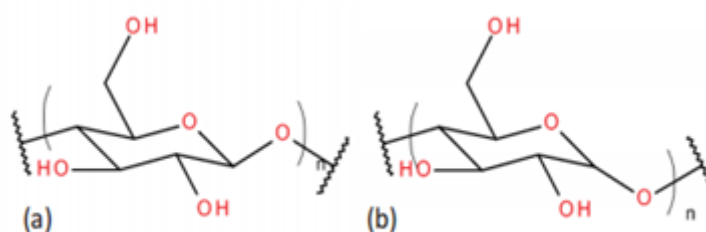
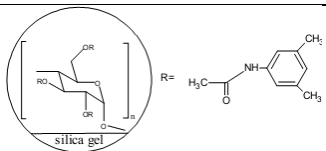
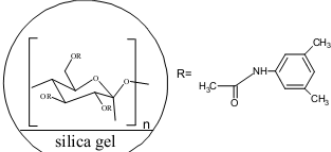
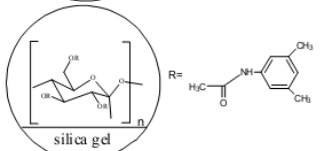
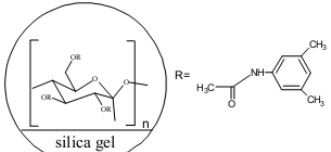
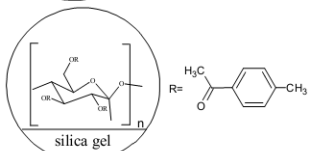


Figure IV.5.: Structure de (a) la cellulose native, de (b) l'amylose native

Dans notre travail nous avons étudié la séparation des énantiomères et des diastéréoisomères de trente deux composés par CLHP chirale en utilisant cinq colonnes chirales à base de polysaccharides (cellulose et amylose), Tableau IV.1.

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

Colonne	Structure	Nom	Diamètre (mm)	Type
Chiralpak® IA		Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	Immobilisée
Chiralpak® IB		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	Immobilisée
Chiralcel® OD		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	10	déposée
Chiralcel® OD-H		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	déposée
Chiralcel® OJ		Cellulose tris-(4-methylbenzoate)	10	déposée

#### IV.4.1. Appareillage

Les études sont réalisées sur une station de CLHP Shimadzu® 20 A, 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), ( $\lambda = 290$  nm et  $\lambda = 280$  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® Lcsolution) pour enregistrer et traiter les chromatogrammes.

Les phases mobiles sont préalablement filtrés (verre fritté 0,45  $\mu\text{m}$ ) et dégazés aux ultrasons puis par le dégazeur. Toutes les colonnes sont utilisées à une température ambiante.

### IV.4.2. La phase mobile

Les solvants utilisés doivent être de qualité HPLC et doivent être filtrés à travers d'un filtre 0,45 $\mu\text{m}$ , avant leur utilisation. Il faut que les solvants utilisés soient miscibles. Si on va utiliser un mélange de solvants organiques et de tampons, il faut tester la miscibilité et la solubilité de l'échantillon dans ce mélange, avant utilisation [12].

Les solvants utilisés étaient de qualité HPLC, le n-heptane de Reidel-deHaën (Seelze, Allemagne), Propanol-2 de MERCK KGaA (Darmstadt, Allemagne), n-hexane, méthanol et l'éthanol du Sigma-Aldrich (Seelze, Allemagne). Les solutions de chaque produit (5 mg/ml) ont été préparées dans le méthanol.

### IV.4.3. Les phases stationnaires chirales

Les colonnes utilisées sont : Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralcel O-DH, Chiralcel OD et Chiralcel OJ, ont été obtenues à partir de Chiral Technologies Europe (Illkirch Cedex, France). Les dimensions des colonnes sont 250mm $\times$ 4.6mm et les diamètres particulaires sont 5 $\mu\text{m}$  pour le Chiralcel OD-H, Chiralpak IA, Chiralpak IB, et 10  $\mu\text{m}$  pour les autres colonnes.



Figure IV.6. Les colonnes chirales utilisées

### IV.5. Méthodologie de travail

À l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

### **IV.5.1. Conditions chromatographiques**

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. (0.1 ml/min pour le propanol-2, 0.2ml/min pour l'éthanol 0.2-0.3 ml/min pour le mélange alcool/alcane). On injecte un volume approprié (20 µl) de la solution du composé à étudié. On attend jusqu'à ce que les chromatogrammes soient apparus et observer la résolution chirale.

### **IV.5.2. Mise en marche du système HPLC**

- Vérifier les solvants
- Mettre sous tension les compartiments du système dans l'ordre suivant :
  - Dégazeur.
  - Pompe.
  - Détecteur.
  - Contrôleur.
- Mettre en marche le PC pour connecter le système et passer au contrôle

software à l'aide du logiciel LC Solution.

- Ouvrir la méthode d'analyse ou en crée une, en entrant les paramètres

suivants :

- Mode d'élution et débit.
- Proportion des solvants dans le cas du mode gradient.
- Temps d'analyse (temps d'acquisition).
- Longueur d'onde et atténuation.
- Enregistrement de la méthode.
- Mettre en marche la pompe.
- Purger le circuit si nécessaire.
- Vérifier la stabilité de la ligne de base.
- Analyse par simple injection (Utilisée dans les tests préliminaires et

d'optimisation).

- Charger l'échantillon dans la boucle d'injection.
  - Ouvrir la fenêtre de dialogue « single run » en introduisant les données sur la nature de l'échantillon (inconnue ou étalon...).
  - Injecter l'échantillon.
- Analyse par lot (utilisée dans le cas des injections répétées, permet de commander les injections automatiquement).
- Utiliser l'option « batch processing » (traitement par lot) et la fenêtre du dialogue Wizard pour commander les étapes suivantes.
  - Entrer les données nécessaires (nature de l'échantillon...).
  - Fermer la fenêtre de dialogue et exécuter le lot.

### **IV.5.3. 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 ( $\alpha$ ), 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) [12].

#### **a) Facteur de rétention $k$ (ou de capacité)**

Le facteur de rétention  $k'$  représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de  $k'$  différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de  $t_r$  et deux valeurs de  $k'$  différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire [17,18].

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

Le facteur de rétention, encore appelé facteur de capacité  $k$ , est un paramètre très important de la chromatographie.



**b) Temps de rétention**

Le temps de rétention  $t_R$  est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté  $t_R$  et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée. Dans le cas idéal  $t_R$  est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps  $t_M$ , appelé temps mort (désigné également par  $t_0$ ) [19,22]

**c) L'efficacité de colonne**

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne CLHP peut s'exprimer par le nombre  $N$  de plateaux théoriques, Plus le nombre des plateaux théoriques  $N$  est élevé, plus la colonne est efficace. Pour chaque étape d'optimisation, le nombre de plateaux théoriques est exprimé par la formule suivante :

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

$w_{1/2}$  : largeur à mi-hauteur [22,23].

**d) Facteur de séparation (sélectivité)**

On définit la sélectivité  $\alpha$  d'une séparation par le rapport de facteur de distribution ( $k_1$  et  $k_2$ ) de deux solutés. Plus  $k$  est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de  $k$  dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$\alpha$  est égale à 1 lorsque n'a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs [23-24].

**e) Facteur de résolution**

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2} = \frac{k}{k + 1} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Avec : Si  $R_s < 1$  : une mauvaise résolution.

Si  $1 < R_s < 1,5$  : une résolution acceptable.

Si  $R_s \geq 1,6$  : une bonne résolution.

Si  $1,4 < R_s < 1,6$  : une résolution optimale.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

- La distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention  $t_{r2}$  et  $t_{r1}$
- La largeur des pics.

**IV.6. Résultat et discussion**

**IV.6.1 Séparation chirale des iminonaringénines par CLHP**

**IV.6.1.1 L'étude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool)**

L'énantiosélectivité de cinq PSCs a été premièrement étudié en analysant les composés avec des phases mobiles polaires (100% alcool). On utilise comme phase mobile le Propanol-2, l'Ethanol et le Méthanol avec un débit de 0.2-0.4 mL/min et une longueur d'onde  $\lambda=280$  nm pour détecter la plupart des composés injectés. Le tableau IV.2 illustre les résultats chromatographiques obtenus par CLHP sous ces conditions.

Tableau IV.2 : Résultat chromatographique en phase organique polaire de naringénine et des iminoaringénines.

PSCs	Eluant Débit ml/min	Composé	Debut ml/min	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rs	$\alpha$	
Chiralpak®IB	2-Propanol	1		24.70	29.32	5.17	6.32	2.77	1.22	
		3		24.26	28.58	5.12	6.15	2.42	1.20	
		4		25.25	29.25	5.10	6.05	2.32	1.21	
		5		24.56	28.14	5.11	6.14	2.14	1.22	
		6		24.47	28.81	5.11	6.62	2.84	1.29	
		7	0.2	26.41	32.08	5.59	7.01	2.82	1.25	
		8		25.36	29.10	5.14	6.25	2.65	1.22	
		9		24.22	28.79	5.04	6.00	2.98	1.20	
		10		23.60	27.44	4.88	5.84	2.30	1.23	
		11		26.30	31.86	5.50	6.96	2.74	1.24	
		12		24.68	29.30	5.15	6.30	2.78	1.22	
		13		24.45	28.79	5.09	6.12	2.80	1.20	
		14		24.24	28.81	5.06	6.02	3.00	1.19	
		15		23.62	27.46	4.90	5.86	2.30	1.20	
		16		26.42	32.09	5.60	7.02	2.83	1.25	
		17		26.33	31.89	5.58	6.97	2.78	1.24	
		Chiralpak®IB	EtOH	1		9.59	10.99	1.39	1.74	2
6				-	-	-	-	-	-	
14				-	-	-	-	-	-	
15	0.4			-	-	-	-	-	-	
16				9.77	11.34	1.44	1.83	1.57	1.27	
17				-	-	-	-	-	-	
17				-	-	-	-	-	-	
Chiralpak®IB	MeOH	1		8.59	9.01	1.14	1.25	0.84	1.09	
		14		-	-	-	-	-	-	
		15		-	-	-	-	-	-	
		6	0.4	8.59	9.03	1.14	1.25	0.88	1.09	
		16		-	-	-	-	-	-	
		17		-	-	-	-	-	-	
Chiralcelk®OD	2-Propanol	1		22.62	37.89	4.65	8.47	2.34	1.82	
		6		-	-	-	-	-	-	
		14		-	-	-	-	-	-	
		15	0.2	-	-	-	-	-	-	
		16		24.09	-	5.02	-	-	-	
		17		-	-	-	-	-	-	
	Chiralcelk®OD	EtOH	1		12.96	13.94	2.24	2.48	0.65	1.10
			14		7.50	-	0.87	-	-	-
			15		13.23	13.96	2.30	2.49	0.36	1.08
			6	0.4	12.63	13.88	2.15	2.47	0.62	1.14
			16		7.15	7.46	0.78	0.86	0.62	1.10
			17		-	-	-	-	-	-
	Chiralcelk®OD	MeOH	1		7.39	13.91	0.84	2.47	0.68	1.88
			6		-	-	-	-	-	-
			14		-	-	-	-	-	-
			15	0.4	-	-	-	-	-	-
			16		-	-	-	-	-	-
17				-	-	-	-	-	-	

Rs, facteur de résolution; *tr1* : temps de rétention de 1<sup>er</sup> énantiomères élués; *tr2* : temps de rétention de 2<sup>ème</sup> énantiomères élués;  $\alpha$  : facteur de séparation.

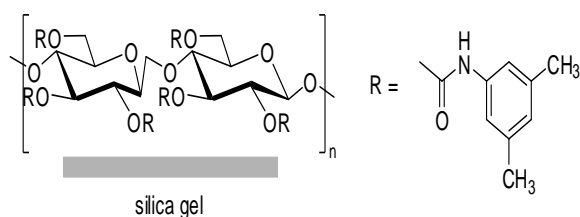
Les conditions chromatographiques ont été optimisées pour obtenir la meilleure séparation des énantiomères 4-iminoaningénine en mode phase organique polaire et en modes phase normale en utilisant les cinq PSCs.

Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak<sup>®</sup> IA, Chiralcel<sup>®</sup> OD-H et Chiralcel<sup>®</sup> OJ pour la naringénine et les produits synthétisés.

La meilleure séparation chirale était pour Chiralcel<sup>®</sup> OD du cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) déposé sur du gel de silice à 10 µm et Chiralpak<sup>®</sup> IB du cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) immobilisé sur du gel de silice de 5 µm.

La séparation chirale des dérivés 4-iminoaningénine a été testée dans les modes des phases polaires normale et organique. Cependant, en mode phase normale, aucune séparation n'a été obtenue en utilisant des phases mobiles constituées d'hexane EtOH: 95-5, 50:50 v / v.

La séparation de la naringénine et les produits synthétisés a été réalisée sur Chiralpak IB (Figure IV.7) avec le propanol-2 comme phase mobile, à donnée des bonnes valeurs de résolution



**Figure IV.7.** Chiralpak<sup>®</sup> IB (Cellulose tris-(3,5- diméthylphénylcarbamate)

Nos études ont montré que les énantiomères 16 et la naringénine pouvaient être séparés dans une phase mobile constituée de 100% EtOH sur la Chiralpak<sup>®</sup>IB avec des bons facteurs de sélectivité,  $\alpha = 1,27$  et  $1,25$ , respectivement (figure IV.8).

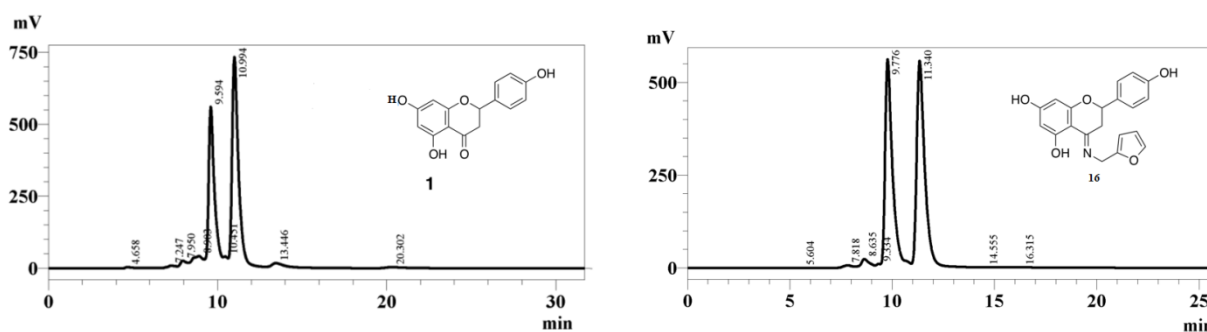
Cependant, aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak<sup>®</sup>IB pour les composés 14, 15 et 17 lors de l'utilisation de MeOH à 100% ou d' EtOH à 100% en tant que phases mobiles.

L'utilisation de 2-propanol a conduit aux meilleures valeurs de sélectivité pour la résolution de tous les énantiomères de 4-iminoaningénine.

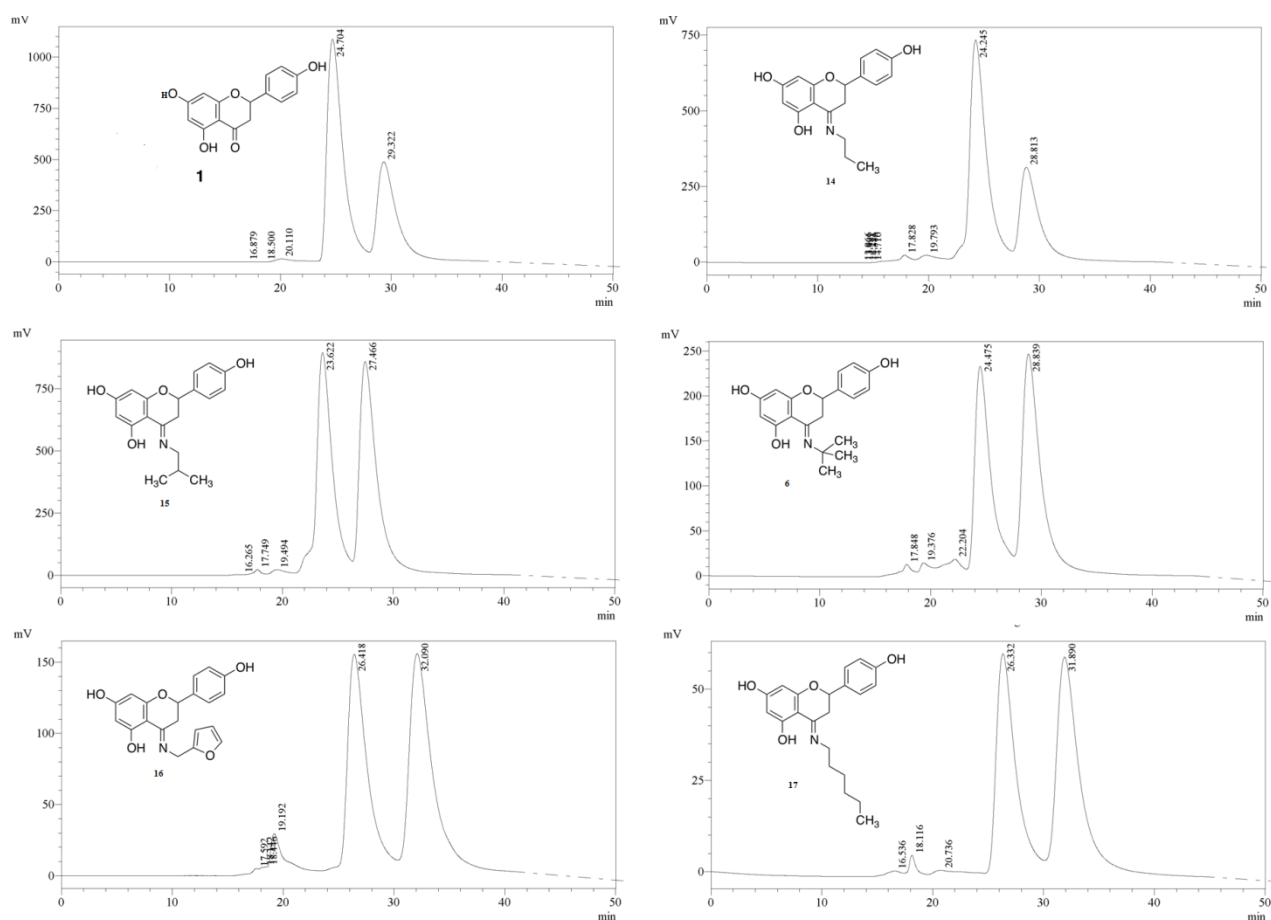
La meilleure séparation a été observée sur la colonne Chiralpak®IB en utilisant du 2-propanol pour le composé 14, pour lequel  $R_s = 3$ . Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ° C.

Le choix du solvant organique en tant que phase mobile en mode phase organique polaire est important pour obtenir une énantiomérisation réussie ainsi que le type de CSP choisi. L'effet de la température et du débit de la composition de la phase mobile sur la résolution  $R_s$  et la sélectivité  $\alpha$  ont été examinés.

Les conditions optimales impliquent l'utilisation d'une phase mobile de 100% 2-propanol à un débit de 0,2 ml / min sur une colonne Chiralpak®IB maintenue à température ambiante figure IV.9. Les paramètres chromatographiques associés sont rassemblés dans le tableau IV.2.



**Figure IV.8.** Chromatogrammes de séparation énantiomérique des composés 1 et 16 en mode de phase organique polaire en utilisant 100% de EtOH dans Chiralpak®IB, température 25 ° C, détecteur UV réglé à 280 nm.



**Figure IV.9.** Chromatogrammes montrant la séparation énantiomérique des composés 1, 6, 14, 15, 16 et 17 en mode phase polaire organique en utilisant 100% de 2-propanol dans Chiralpak®IB, température 25 ° C, détecteur UV réglé à 280 nm.

## IV.6.2 Séparation chirale des iminoarangenines par CLHP

### IV.6.2.1 L'étude de la séparation en mode de phase organique polaire (100% alcool)

L'énantiosélectivité de cinq PSCs a été premièrement étudié en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles polaires (100% alcool). On utilise comme phase mobile le

Propanol-2 avec un débit de 0.2 ml et une longueur d'onde  $\lambda=290$  pour détecter la plupart des composés injectés. Le tableau IV.3 illustre les résultats chromatographique obtenus par CLHP sous ces conditions.

**Tableau IV.3** : Résultat chromatographique en phase organique polaire de naringine et Iminoaringénines.

Composé	PSCs	tr1	tr2	Rs	$\alpha$
<b>02</b>	Chiralcel OD	25.648	28.555	2.034	1.276
	Chiralpak IB	25.502	27.578	1.679	1.222
	Chiralpak IA	20.295	21.669	0.152	1.114
	Chiralcel OD-H	29.957	31.120	0.887	1.056
<b>18</b>	Chiralcel OD-H	31.007	35.483	3.140	1.155
	Chiralpak IB	24.298	27.399	2.001	1.311
	Chiralcel OD	25.351	28.430	2.022	1.322
<b>19</b>	Chiralcel OD	26.801	31.539	2.553	1.423
	Chiralpak IB	24.832	27.576	1.827	1.199
<b>20</b>	Chiralcel OD	27.356	31.440	2.438	2.098
	Chiralpak IB	24.245	28.813	1.848	1.279
<b>21</b>	Chiralcel OD	24.487	26.734	1.026	1.260
	Chiralpak IB	25.026	26.991	1.354	1.079
<b>22</b>	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
<b>23</b>	Chiralpak IB	26.734	29.209	1.247	1.119
	Chiralcel OD	25.656	30.340	2.118	1.488
<b>24</b>	Chiralcel OD-H	30.180	34.390	2.867	1.146
	Chiralcel OD	26.741	29.329	0.506	1.173
	Chiralpak IB	30.960	32.496	0.596	1.051
<b>25</b>	Chiralcel OD-H	30.269	34.563	2.805	1.290
	Chiralcel OD	26.656	31.340	2.119	1.494
	Chiralpak IB	30.744	32.203	0.450	1.033
<b>26</b>	Chiralcel OD-H	26.315	28.436	2.262	1.089
	Chiralcel OD	20.477	24.608	2.300	1.269
	Chiralpak IB	29.407	31.734	0.340	1.073
<b>27</b>	Chiralcel OD	26.528	30.816	2.375	1.195
	Chiralpak IB	32.325	36.912	1.673	1.084
<b>28</b>	Chiralpak IB	29.172	31.765	0.512	1.035
<b>29</b>	Chiralpak IB	29.450	32.116	0.206	1.116
<b>30</b>	Chiralcel OD	23.432	29.902	3.289	1.565
<b>31</b>	Chiralpak IB	28.893	32.504	2.477	1.012
	Chiralcel OD	25.798	27.761	1.174	1.158

*tr1*, temps de rétention de 1<sup>er</sup> diastéréoisomères élué; *tr2*, temps de rétention de 2<sup>ème</sup> diastéréoisomères élué; *Rs*, facteur de résolution;  $\alpha$ , facteur de séparation.

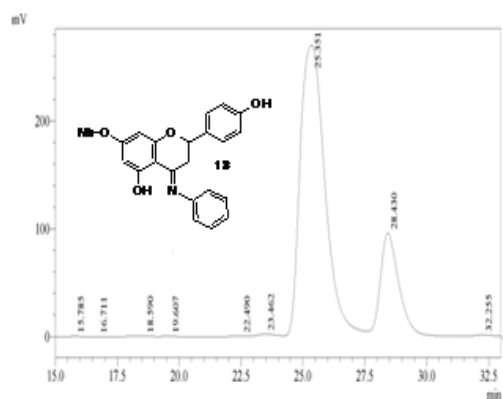
La séparation de la naringine et les produits synthétisés a été réalisée sur Chiralpak IB avec le propanol-2 comme phase mobile, à donnée des bonnes valeurs de résolution (**figure IV.10**).

On remarque que les temps de rétention des diastéréoisomères séparés pour la naringine 2 et les produits 18-21 est plus court que pour les produits 22-31.

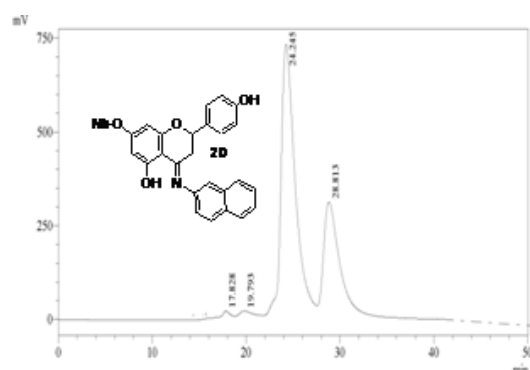
La cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) déposée sur le gel de silice (Chiralcel OD et OD-H) présente la meilleure énantiosélectivité vis-à-vis la majorité des produits étudiés avec un temps de rétention plus long, peut-être due à la nature de phase mobile (propanol-2) et à la diminution de la valeur de débit.

Les diastéréoisomères des produits 28 et 29 sont séparés seulement avec la colonne Chiralpak IB mais avec une mauvaise valeur de résolution  $R_s=0.206$ , et la meilleure séparation est faite pour le produit 18 sur la phase stationnaire Chiralcel OD-H avec une valeur de résolution  $R_s=3.140$ . Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak IA pour les produits synthésés, et le naringine est séparé avec une mauvaise résolution,  $R_s=0.152$ . La séparation des diastéréoisomères des produits n'est pas réussie sur la phase stationnaire Chiralcel OJ dans ces conditions.

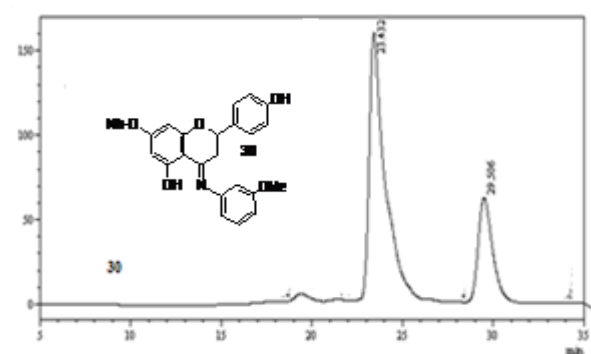
a)-



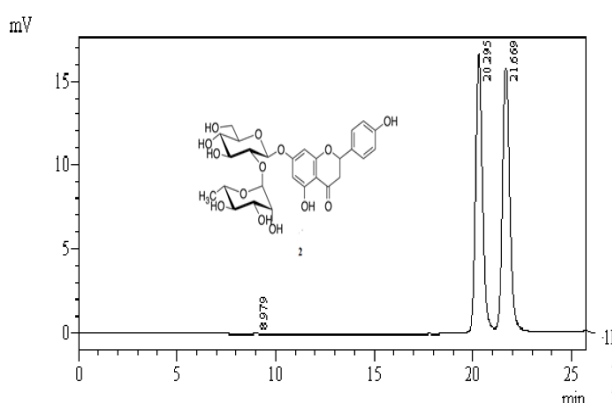
b)-



c)-



d)-



**Figure IV.10.** Les chromatographies présentent les séparations de quelques produits sur les phases stationnaires : a)-Chiralcel OD(18), b)-Chiralpak IB(20) ,c)- Chiralcel OD(30), d)-Chiralpak IA (2),.: phase mobile: propanol-2 (100%). débit 0.2 ml/min, T:25°C, détecteur UV à  $\lambda=290\text{nm}$ .



IV.6.2.2. L'étude de la séparation chirale en mode de phase normale

La séparation chirale de naringine et les produits synthétisés ont été réalisés sur cinq phases stationnaires chirales avec diverse phase mobiles n alcool/alcane.

Tableau IV.4 : Résultat chromatographique en phase normal.

PSCs	Eluant Début ml/min	Composé	Facteurs				
			Tr min	Rs	A		
Chiralcel OD	Hexane/propanol-2 80 :20 0.2	02	24.704 29.322	2.78	1.22		
		18	29.789 30.822	0.646	1.067		
		19	29.532 30.498	0.548	1.057		
		20	29.632 30.494	0.571	1.057		
		21	30.525 31.842	0.774	1.084		
		22	29.667 30.882	0.717	1.079		
		23	32.586 34.379	1.221	1.098		
		24	29.217 30.279	0.523	1.067		
		25	26.391 31.813	1.112	1.106		
		26	29.381 31.041	1.104	1.067		
		27	29.789 31.191	0.869	1.092		
		28	26.373 31.815	3.400	1.254		
		29	29.838 31.365	0.932	1.051		
		30	29.988 31.975	1.097	1.135		
		31	30.136 31.458	0.845	1.044		
		Chiralpak IB	Hexane/propanol-2 90 :10 0.2	02	14.482 16.104	3.132	1.235
				18	14.424 15.985	3.089	1.118
				19	13.788 14.566	1.531	1.078
20	14.533 15.303			1.656	1.141		
23	14.322 15.246			1.533	1.065		
28	14.208 15.109			1.599	1.076		
Chiralpak IA	Hexane/propanol-2 90 :10 0.2			02	13.822 14.630	1.648	1.128
		18	9.577 10.377	1.520	1.128		
		20	14.438 15.973	3.136	1.114		
		26	18.467 20.831	1.283	1.121		
		28	13.714 14.498	1.460	1.067		

La séparation des diastéréoisomères des produits est réussie sur les phases stationnaires Chiralcel OD 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.

Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak IA pour ces composés en mode organique polaire, par contre, on observe une séparation de quelques produits en phase normale. Chiralpak IA peut résoudre tous les composés étudiés avec des phases mobiles apolaires le cas du mélange hexane/ propanol-2.

La séparation de la naringine et des produits synthétisés **18, 20, 26 et 28** a été réalisée sur Chiralpak IA avec le Hexane/propanol-2 (90-10) comme phase mobile, à donner des bonnes valeurs de résolution **figure IV.11**.

La séparation de la naringine et des produits synthétisés a été réalisée sur les PSCs à base de cellulose Chiralpak IB et Chiralcel OD, la valeur de résolution est étendue de 0.54 à 3.40. La Chiralcel OD montre une meilleure résolution que la Chiralpak IB qui est basée sur la cellulose 4-méthylbenzoate. Les composés **2, 18, 20 et 28** ont été résolus avec une bonne résolution par toutes les PSCs avec différentes phases mobiles.

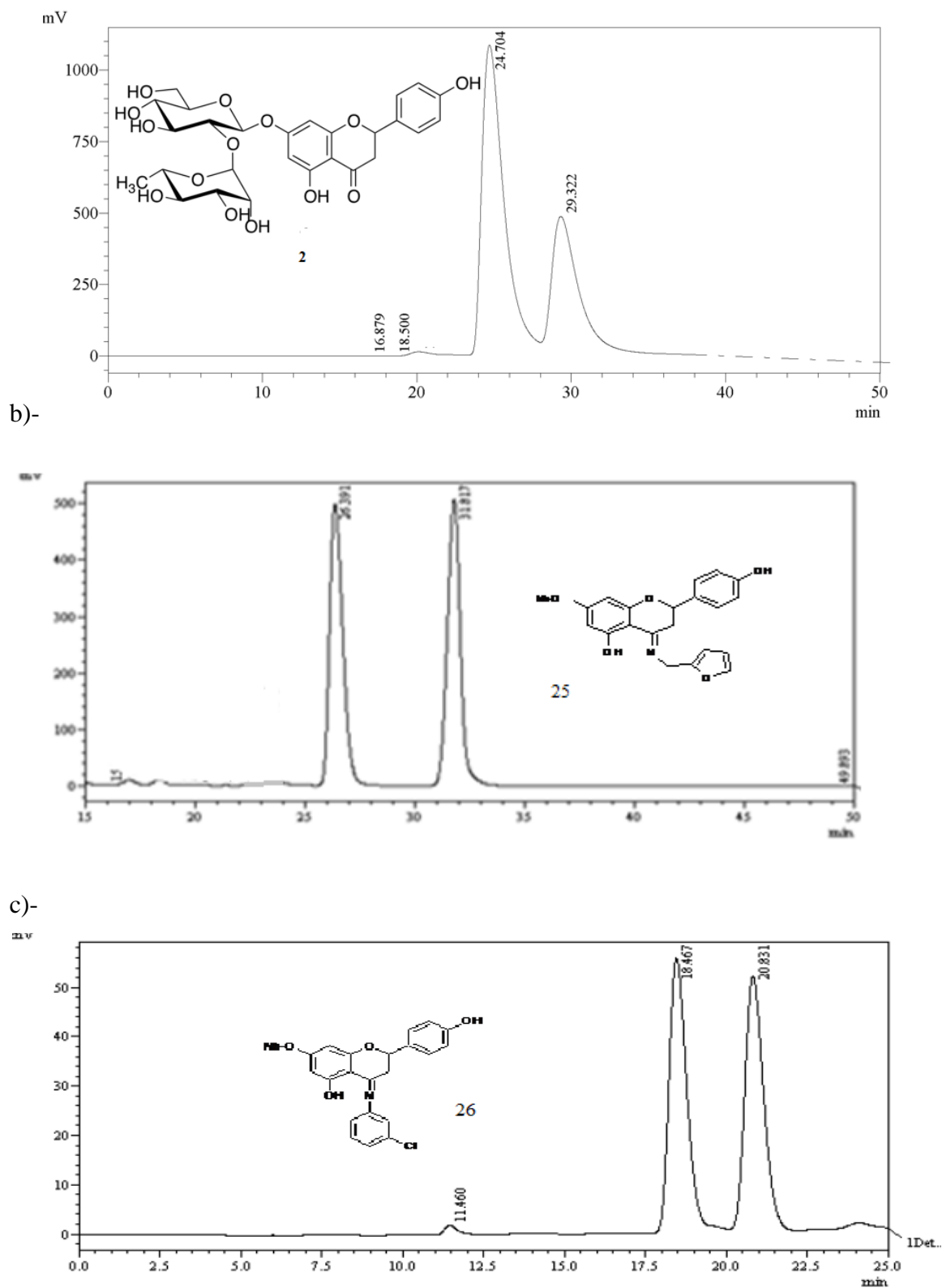
La sélection de la colonne chirale appropriée est la partie la plus essentielle et la plus provocante de développement de méthode de séparation chirale. En effet, le processus de discrimination chirale est sensible non seulement aux structures de l'analyte et du PSCs mais également aux conditions de séparation.

La séparation des diastéréoisomères des produits n'est pas réussie sur la phase stationnaire chirale Chiralcel OJ dans ces conditions.

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.

Comme rapporté dans le tableau IV.3, les valeurs de résolution les plus élevées ont été réalisées pour les deux produits **28** et la naringine **2** figure IV.11

a)-



**Figure IV. 11.** Résolution des diastéréoisomères en phase normale avec différent phase PSCs, Chiralpak IA (2), a)- Chiralcel OD(2), b)- Chiralcel OD(25), c)- Chiralpak IA(26): phase mobile: Hexane/propanol-2 (90-10), débit 0.2 ml/min, T:25°C, détecteur UV à  $\lambda=290\text{nm}$ .

#### **IV. 7. Mécanisme de résolution chirale**

Le mécanisme de reconnaissance chirale est depuis longtemps étudié par des méthodes spectroscopiques (RMN, diffraction par rayons X, fluorescence, dichroïsme circulaire), séparatives (HPLC, GC, SFC, CE) et de modélisation moléculaire. Aujourd'hui la majorité des séparations d'énantiomères est réalisée par chromatographie chirale [30-33], avec notamment 12 000 cas répertoriés en 2013 sur la base de données Chirbase [34-36].

Cette étude est centrée, 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 certains 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.

La grande majorité de dérivés chiraux contiennent assez de groupes fonctionnels (cycle aromatique, hydroxyle, carboxyle, amine) 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  $\pi$ - $\pi$ , liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, ou les interactions stériques [25-33].

La raison principale de la résolution optique des PSCs est la stabilité différente des complexes diastéréomérique entre les énantiomères et la phase stationnaire.

Il existe des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre le groupe phényle du PSCs à base de cellulose et le groupement aromatique des produits (cycle B). Les substituants sur le cycle phénylique jouent également un rôle important dans l'énantiosélectivité.

De plus 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.

Cette étude récente basée sur un ensemble d'essai de 32 composés chiraux a indiqué que deux PSCs (Chiralcel®OD et Chiralpak®IB) ont démontré l'énantioselectivité pour 90% d'analytes examinées, tandis que deux phases le Chiralpak® IA et Chiralcel®ODH ont montré un indice de réussite inférieur à 50%.

### IV. 8. Conclusion

Cette étude décrit la séparation chirale des dérivés de 4-iminoaringénine et discute leur énantioséparation en utilisant deux phases stationnaires chirales à base de polysaccharides à savoir Chiralpak®IB et Chiralcel®OD. La meilleure résolution pour la naringénine et les 4-iminoaringénines a été atteinte en utilisant des colonnes de Chiralpak®IB de type immobilisé en mode de phase organique polaire en utilisant 100% de 2-propanol comme phase mobile. Et la séparation chirale des dérivés de 4-iminoaringine en deux modes chromatographique, la séparation complète ( $R_s > 1.5$ ) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose le Chiralcel OD et OD-H.

Les PSCs cellulose ou amylose sont utilisés, avec un grand succès. De plus, en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge. 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.

Nous avons réussi à réaliser une analyse qualitative des composés synthétisés, 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 déposé fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des iminoaringénines et iminoaringines .

## Références

1. J. Gal, *Chirality*, 24 (2012) 959.
2. L. Thunberg, K. Öhlén, M. Lindskog, S. Karlsson, M. Klarqvist (AstraZeneca R&D), Poster session presented at 26th International Symposium on chiral Discrimination, Prague, République Tchèque, 2014.
3. O. Gyllenhaal, A. Karlsson, *Chromatographia*, 52 (2000) 351.
4. M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 741 (1996) 33
5. Lahmer N, Belboukhari N et Cheriti A. 2011. Etude de la séparation chirale des flavanones par CLHP. *PhytoChem& Bio Sub Journal* (1) 5.
6. Fowler ZL and Koffas M.A.G. 2009. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Microbiology and Biotechnology*. 83:799-808.
7. Marfak. A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des dérivés, Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp 28,40-42.
8. Bouheroum. M. 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.
9. Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 63–67.
10. Aturki Z, Brandi V et Sinibaldi M 2004. Separation of Flavanone-7-O-glycoside Diastereomers and Analysis in Citrus Juices by Multidimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5303-5308.
11. Portet. B. 2007. Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise: *Piper*, *hostmannianum* var. *berbicense*, Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p27.
12. Uehara. M. 2006. Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. Hesperidin and bone metabolism, *Clin. Calcium*. 16:1669-1676.
13. Radu. O. L, Armand. S, et al. 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.
14. Anne-Sylvie KESTEMA N. 2008. thèse de doctorat. Délivré par L'Université Toulouse ,

Paul Sabatier, P 25-32

15. Ibrahim. S. S. 2008. Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, on Diabetes-Induced Brain Damage in Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(1): 84-95.
16. Susłow. E. K, et al. 2006. Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. *Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39:18-23.
17. Siles B. A, Halsall H. B et Dorsey J. G. 1995. Retention and selectivity of flavanones on homopolypeptide bonded stationary phases in both normal- and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 704:289-305.
18. Syame Khater. 2014. Rationalisation des procédures de séparation des composés chiraux à visée pharmaceutique et cosmétique. Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie de l'université d'Orléans, pp 59-60.
19. Rouessac. F, Rouessac A, Cruché. D. 2004. *Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6e édition, Dunod, Paris, pp 36-57.
20. Manuel d'instructions. 2005. pompe pour la chromatographie liquide à haute performance SHIMADZU LC'20AD, SHIMADZU corporation, Analytical & Measuring Instruments Division, Kyoto, Japan, pp 28, 35, 248.
21. Manuel d'instructions. 2005. contrôleur du système pour la chromatographie liquide à haute performance SHIMADZU CBM'20A Lite, SHIMADZU corporation, Analytical & Measuring Instruments Division, Kyoto, Japan, pp 17.
22. Manuel d'utilisation. 2005. Station de travail LC de chromatographie liquide haute performance SHIMADZU [LabSolutions/LCsolution], SHIMADZU corporation, Analytical & Measuring Instruments Division, Kyoto, Japan, pp 17, 25, 33.
23. He B. L. 2010. *Chiral Recognition in Separation Methods*, A. Berthod (ed.) Springer! Verlag Berlin Heidelberg, pp 159, 160.
24. Rizzi. A. 1998. retention and selectivity, in E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (Eds) *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker, New York, , pp 2, 3.
25. A. Del Rio, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1566
26. Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, J. 2004. *Chromatogr. A* 1041 .211.
27. Rahou I, Sekkoum K, Belboukhari N, Cheriti A., Aboul-Enein HY. 2016. Liquid chromatographic separation of novel 4-amino-flavanes series diastereomers on a polysaccharide-type chiral stationary phase *J Chromatograph Sci*; **54**: 1787–1793.
28. Caccamese S, Chilleemi R. 2009. Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*; **1217**: 1089-1093.

29. Lu WJ ,Ferlito V,Xu C,Flockhart DA , Caccamese S. 2011. Enantiomers of naringenin as pleiotropic, stereoselectiveinhibitors of cytochrome P450 isoforms. *J Chirality*; **23**:891–896.
30. Curti V, Di Lorenzo A, Rossi D, Martino E, Capelli E, Collina S, Daglia M. 2017. Enantioselective modulatory effects of naringenin enantiomers on the expressionl evels of *miR-17-3p* involved in endogenous antioxidant defenses.*J Nutrients*;**9**: 1-13.
31. Aboul-Enein. 2001. HYHigh-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases. *J Chromatogr A*; 906: 185-193.
32. Mesplet N, Saito Y, Morin P, Luigi A, Agrofoglio. 2003.Liquid chromatographic separation of phosphoramidate diastereomers on a polysaccharide-type chiral stationary phase *J Chromatogr*;**983** : 115–124.
33. Belboukhari N, Cheriti A, Roussel C, Vanthuyne N. 2010 .Chiral separation of hesperidin and naringin and its analysis in a butanol extract of *Launeaarborescens*. *Nat ProdRes*;**247** : 669–681.
34. Rahou I ,Belboukhari N, Sekkoum K , Cheriti A, Aboul-Enein H. Y . 2014. Chiral separation of 4-iminoflavan derivatives on several polysaccharide-based chiral stationary phases by HPLC. *Chromatographia*;**77**: 1195-1201.
35. Cirilli R, Ferretti R, De Santis E, Gallinella B, Zanitti L, La TorreF. 2008. High-performance liquid chromatography separation of enantiomers of flavanone and 2'-hydroxychalcone under reversed-phase conditions. *J Chromatogr A*;**1190** :95–101.
36. Roussel C, Bonnet B, Piederriere A, Suteu C. J. 2001. Chirality Enantioselective correlation between retention factor and lipophilicity index in chiral separation on cellulose and amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) CSPs in reversed mode: A case study;**13**: 56-61.



## **V. 1.Introduction**

Les flavanones spécialement la Naringine et la Naringenine présentent un certain nombre important de propriétés pharmacologiques, telles que les activités anti-hypocholestérolémiant [1-3], antioxydantes [4-6], anti-inflammatoires, diurétiques [7], antidiabétiques.

Vu l'importance biologique de la naringine et la naringenine, notre objectif principal pour cette partie est l'évaluation biologique des dérivés d'iminoaringine et d'iminoaringenine synthétisés en tant qu'antioxydantes et antimicrobiennes, tout en comparant par rapport aux deux molécules de la naringine et la naringenine. Pour cela, nous préférons commencer par une brève description théorique sur les activités antioxydants et antimicrobiennes.

## **V.2. Les antioxydants**

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants. Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique [8].

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des éléments très importants pour la vie de l'organisme suite à l'implication de leurs effets bénéfiques, par exemple les radicaux oxygéniques exercent des actions critiques sur les signaux de traduction, et sur les gènes de transcription, les cellules phagocytaires (macrophages) utilisent également les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) pour combattre les agents infectieux (bactéries et virus). Cependant ces mêmes radicaux peuvent causer des dégâts oxydatifs cellulaires, endommagement des tissus et même la mort des cellules et le développement des processus pathologiques [08].

En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants.

### **V.2.1. Définition d'un antioxydant**

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat [9].

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et les polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation [10].

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

### **V.2.2. Mécanismes d'actions des antioxydants :**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction des radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [11].

### **V.2.3. Type des antioxydants**

#### **V.2.3.1. Les antioxydants endogènes :**

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...) [12-15].

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques [16].

#### **V.2.3.2. Les antioxydants exogènes :**

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

- **Médicaments:**

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les  $\beta$ -bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes. Parmi ces médicaments, nous pouvons citer :

- **Le probucol®** (Lurselle) : Médicament utilisé pour baisser le taux sanguin de cholestérol, prévenir l'athérogenèse en agissant comme antioxydant et en supprimant la modification oxydative des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Figure V. 1). [17].

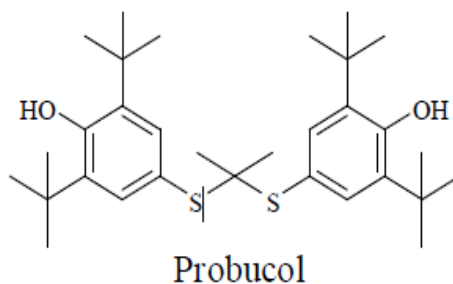


Figure V.1. Structure de Probucol

- **La N-acétylcystéine** : molécule qui agirait de manière significative dans la régénération du glutathion (antioxydant) en pénétrant les cellules. Elle peut être également utile dans le traitement des blessures du poumon dues à des espèces réactives de l'oxygène (Figure IV. 2).

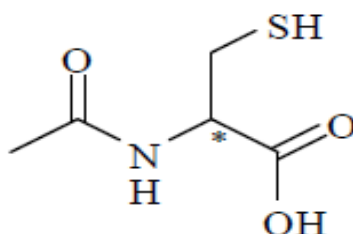


Figure V.2. Structure de N-acétylcystéine

- **L'hydralazine, le captopril, le terazosin**: médicaments utilisés contre l'hypertension artérielle, reconnus pour la production d'enzymes antioxydantes dans certaines conditions [18].

#### V.2.3.3 Antioxydants naturels:

- **La vitamine C ou acide ascorbique** :

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

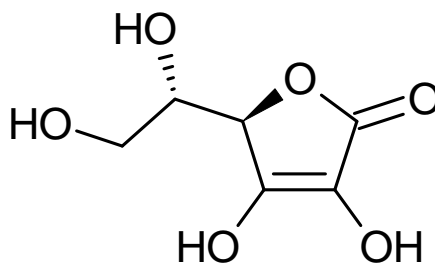
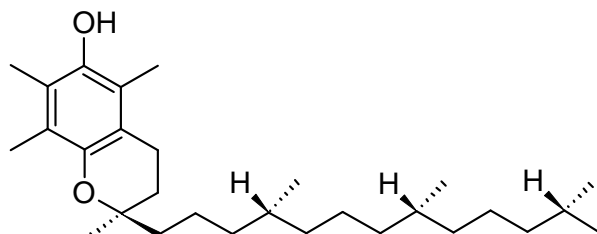


Figure V. 3. Structure de vitamine C

- **La vitamine E ou tocophérol :**

Prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxy.



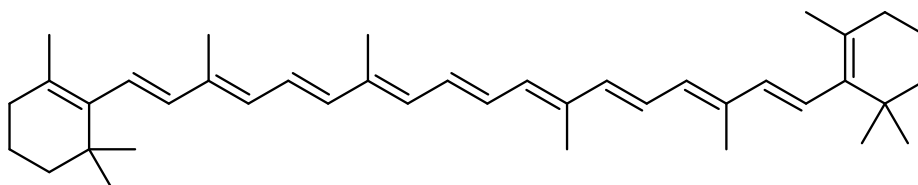
*Figure V.4. structure de vitamine E*

- **Le sélénium :**

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers. [19].

- **Le  $\beta$ -carotène :**

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.



*Figure V.5. Structure de la  $\beta$ -carotène*

- **Les flavonoïdes :**

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation. [17-19].

- **Les tanins :**

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

- **Les coumarines :**

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

- **Les phénols :**

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. [20].

#### V.2.4 Les tests antioxydants

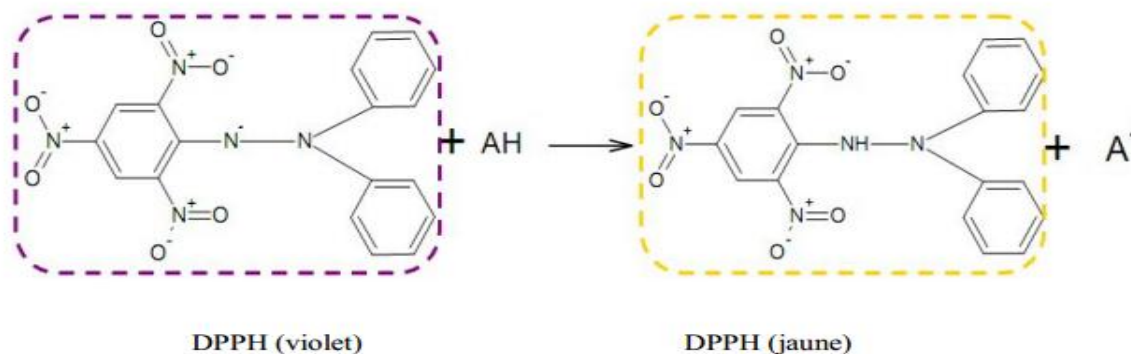
- **Test de blanchissement du  $\beta$ - Carotène :**

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaque simultanément le  $\beta$ - carotène et ayant comme résultat le blanchissement du  $\beta$ -carotène et la disparition de sa couleur jaune.

- **Test au DPPH :**

#### Principe:

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ) (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH $\cdot$  est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (Figure V.6). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm [21-22].



**Figure V.6.** Structure chimique du radical DPPH $\cdot$  et de sa forme réduite.

- **Test sur CCM :**

Les extraits à tester sont déposés sur des plaques CCM de gel de silice GF254 en aluminium et développés dans des systèmes appropriés. Après le séchage, les CCM sont giclées avec une solution méthanolique à 2 mg/ml de DPPH. Les activités anti-radicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet. [23].

- **Test en solution :**

Pour le test en solution, le travail s'effectue à l'aide de microplaques et d'un lecteur de microplaques. On mélange 50 µl d'une solution à 0.022 % de DPPH dans le méthanol avec 230 µl des composés à tester en solutions méthanoliques à différentes concentrations (80, 40, 20, 10, 5 et 2.5 mM). Après 30 mn, les valeurs sont mesurées à 517 nm avec le spectrophotomètre.

- **Le test TEAC**

Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC) ou test ABTS<sup>•+</sup> Decolorization Assay. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. [23-26].

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer ABTS<sup>•+</sup>. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capturer du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en µM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit ou par ml s'il s'agit d'un liquide. [24].

### **V.3. Activité antimicrobienne**

#### **V. 3.1. Effet antimicrobien**

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. [27].

### V. 3.2. Mode d'action des agents antimicrobiens

Il existe une variété de modes d'actions des agents antimicrobiens, tels que 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, dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN, des protéines des lipides, et la fonction mitochondriale, ainsi que la formation des complexes avec la paroi.

Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et à l'arrangement de la membrane externe. [28-29].

### V. 3.3. Germes soumis au test antibactérien

#### - *Escherichia coli* :

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers. [30].

#### - *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas irrégulier à la façon d'une grappe de raisin.

*Staphylococcus aureus* est un germe aérobie - anaérobie facultatif doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques. La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides.

#### - *Pseudomonas aeruginosa* :

Le genre *Pseudomonas* est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies.

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux.

Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales. [28-29].

#### **- Enterococcus faecalis :**

*Enterococcus faecalis* est un microorganisme communément détecté des infections endodontiques asymptomatiques, persistantes. Sa prévalence dans ces infections varie de 24% à 77%. Cette constatation peut s'expliquer par divers facteurs de survie et la virulence possédée par *E. faecalis*, y compris sa capacité à rivaliser avec d'autres micro-organismes, envahir tubules de la dentine, et de résister à la privation de nourriture. Utiliser la bonne technique aseptique, l'augmentation des tailles de préparation apicale, et l'inclusion de 2% chlorhexidine d'énier en combinaison avec de l'hypochlorite de sodium sont actuellement les méthodes les plus efficaces pour lutter contre *E. faecalis* dans les systèmes radiculaires des dents. Dans les soins dentaires, la recherche continue sur *E. faecalis* et son élimination de l'appareil dentaire peut ainsi définir l'avenir de la spécialité endodontique. [31-32].

### **V. 4. Les antifongiques**

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ces organismes forment un groupe phylogénétique homogène constitué de champignons macroscopiques et de champignons microscopiques (mycètes) à savoir les levures et les moisissures qui peuvent être saprophytes ou parasites. Dans ce dernier cas, ils peuvent attaquer soit l'être humain et on parle de mycose, soit les plantes causant ainsi des maladies cryptogamiques. [28-29].

#### **V. 4.1. Modes d'action des antifongiques**

Plusieurs familles thérapeutiques sont utilisables actuellement dans le traitement des mycoses à savoir : les polyènes (nystatine et amphotéricine B), les azolés (imidazolés et triazolés), etc. Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons on distingue :

- Action sur la synthèse de la paroi fongique : polyoxines, nikkomycines, papulacandines.



- Action sur la membrane plasmique (polyènes, ciclopiroxolamine), ou l'ergostérol, constituant spécifique de la paroi des cellules fongiques (allylamines, azolés, terbinafine, thiocarbamate et la morphine).
- Blocage de la division cellulaire (griseofulvine).
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (flucytosine).
- Inhibition de la chaîne respiratoire avec comme cible les mitochondries (ciclopiroxolamine). [32].

#### V. 4.2. Résistance aux antifongiques

L'utilisation d'agents antifongiques de même classe chez l'homme et dans l'environnement pose des problèmes potentiels, particulièrement le développement de résistances. La résistance clinique d'*Aspergillus fumigatus* aux traitements par l'itraconazole, un des antifongiques les plus utilisés en médecine pour combattre les aspegilloses, augmente de plus en plus. *Aspergillus fumigatus* est aussi un organisme jouant un rôle important dans la dégradation de composants organiques. Il se répand dans l'environnement par la dispersion de spores de très petite taille. C'est l'espèce de champignon causant le plus d'infections (que l'on nomme "aspergilloses") à l'échelle mondiale.

Les mécanismes de résistance, mis en place par certaines souches de champignons, sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent soit sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires impliqués dans un rejet actif de l'antifongique . [33].

#### V. 4.3. Germe soumis au test antifongique

##### - *Candida albicans* :

*Candida albicans* est une levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. Saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté (femme). *C. albicans* existe en tant que commensal des animaux à sang chaud, y compris l'homme. Elle colonise les muqueuses de la cavité buccale et vaginale et le tube digestif et est aussi capable de causer une variété d'infections, selon la nature du défaut de l'hôte sous-jacent. Par conséquent, *C. albicans* infections (candidose) sont très fréquents chez les individus sains. La candidose peut être divisé en superficielle (comme la candidose buccale et vaginale et la candidose cutanéomuqueuse chronique) et profondes (comme *Candida* en raison myocardite aiguë disséminée et

Candida septicémie) et représentent un problème clinique majeur. Pour plusieurs raisons (traitements immunosuppresseurs, cathétérisme long terme, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre et une survie plus longue des personnes immunodéprimées), les infections à Candida ont augmenté de façon spectaculaire au cours des deux dernières décennies. [34-38].

## V. 5. Partie expérimentale

### V. 5.1 Matériels et équipements utilisés

Tableau V.01. Matériels et équipements utilisés

Matériels et équipements utilisés		Produits	Milieux de culture
<b>Activité antioxydant</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plaque CCM</li> <li>- Eprouvette gradué 10 ml</li> <li>- Pipette gradué 2 ml</li> <li>- Tubes capillaires</li> </ul>	<b>Activité biologique</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Autoclave</li> <li>- Balance analytique</li> <li>- Boîtes de Pétri</li> <li>- Bec Benzène</li> <li>- Disques stériles de papiers Buvard (6 mm de diamètre)</li> <li>- Erlen Meyer 1000 ml</li> <li>- Eprouvette 10 ml ,500 ml</li> <li>- Ecouvillons</li> <li>- Etuve</li> <li>- Incubateur</li> <li>- Pipettes Pasteur</li> <li>- Pipette graduée</li> <li>- Plaque chauffante</li> <li>- Tubes à essai stériles</li> <li>- Réfrigérateur</li> <li>- Vortex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DMSO</li> <li>- MeOH</li> <li>- Eau physiologique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bouillon nutritif</li> <li>- Mueller Hinton</li> <li>- Sabouraud</li> </ul>

#### ➤ Souches utilisées

##### 1- Souches bactériennes

Les souches bactériennes de Gram (+), et la souche fongique sont obtenues à partir de l'institut Pasteur d'Alger.

- *Escherichia Coli* ATCC 25922
- *Staphilo coccusaereus* ATCC 25923
- *Entérocooccus feacalis* ATCC 29212
- *Pseudoumonas aeroginosa* ATCC 27853

## 2- Levure

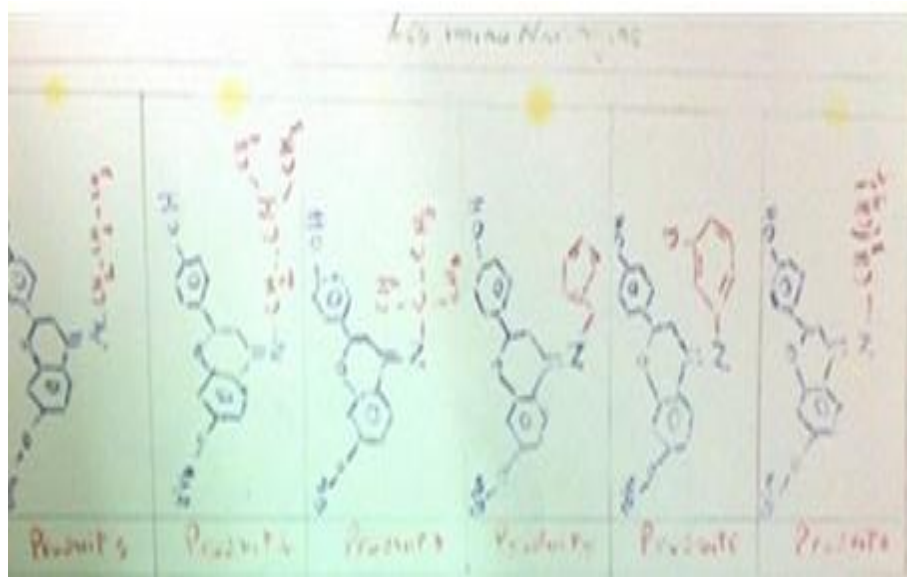
- *Candida.albicans* ATCC 2091

## V. 5.2 Mode opératoire

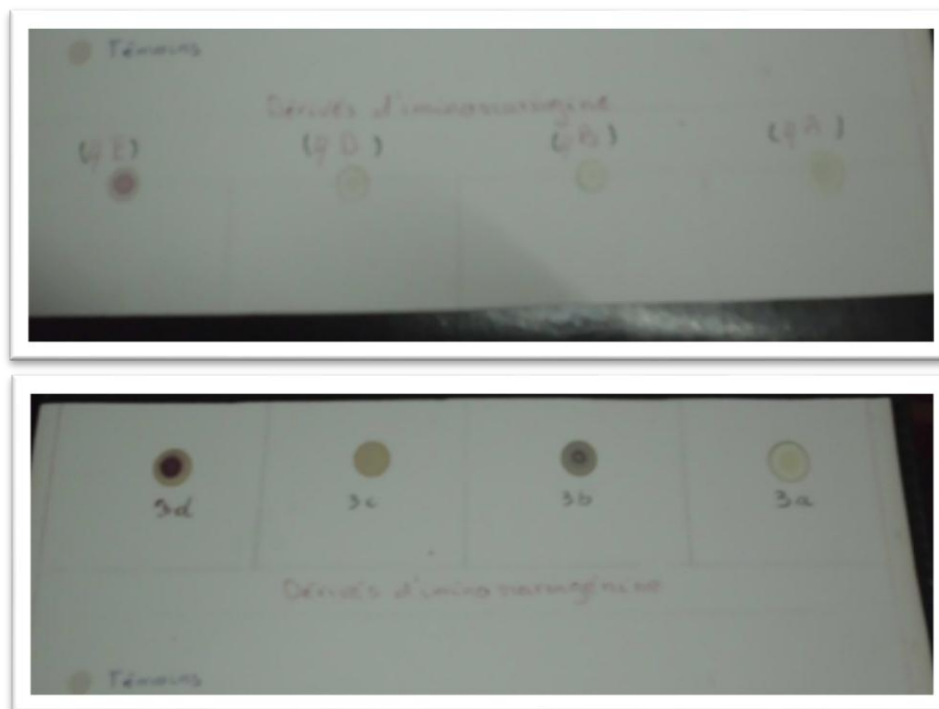
### V. 5.2.1 Test antioxydant des dérives d'iminoaringine et d'iminoaringine

Les deux séries d'iminoaringénine et d'iminoaringine soumises au test du DPPH, pour valoriser leurs pouvoirs de piégeage des radicaux libres ; pour cette raison, nous avons dissout  $10^{-2}$  g de chaque produit dans un millilitre de méthanol pour obtenir une solution de concentration 0.01 g/ml

A l'aide d'un tube capillaire nous avons déposé une goutte de chaque solution sur une plaque CCM (figure V.7 et V. 8.



**Figure V.7.** Photo de quelques dérivés d'iminoaringine sur plaque CCM après le dépôt du DPPH.



**Figure V.8.** Photo de quelques dérivés d'iminonaringine sur plaque CCM après le dépôt du DPPH. Après 10 min, la plaque est séchée à l'air ambiant, et giclée avec une solution du DPPH de concentration 2 mg/ml de méthanol.

## V. 5.2.2 Test antibactérien des dérivés d'iminonaringine et d'iminonaringine

### V. 5.2.2.1 Purification des souches bactériennes

Les quatre souches bactériennes sont cultivées dans un milieu gélosé solide dans des tubes à essai. Dans une zone stérile, nous avons prélevé une ou deux colonies de chaque souche (environ de  $10^{-6}$ –  $10^{-8}$  germes), avec une pipette Pasteur dans un tube à essai qui contient 10 ml de B.N, les tubes sont bien jugés à l'aide d'un vortex.

On prélève une goutte de chaque tube, et on fait la culture des bactéries dans des boîtes de Pétri contient 6 mm d'épaisseur de G.N ; les boîtes sont incubées dans un incubateur à 37°C pendant 24 h.

### V. 5.2.2.2 Réalisation de l'antibiogramme par méthode de diffusion sur milieu gélosé

#### a- Préparation de l'inoculum

Dans une zone stérile, après 24h d'incubation on prélève a partir de chaque boîte, des colonies bactériennes (A, B, C, D) et les met en suspension dans des tubes a essai contient 10 ml d'eau physiologique ; la densité optique mesurée a l'aide • d'un spectromètre (à  $\lambda=620$  nm) de chaque suspension doit être comprise entre 0.08 et 0.1. (Figure V.9).

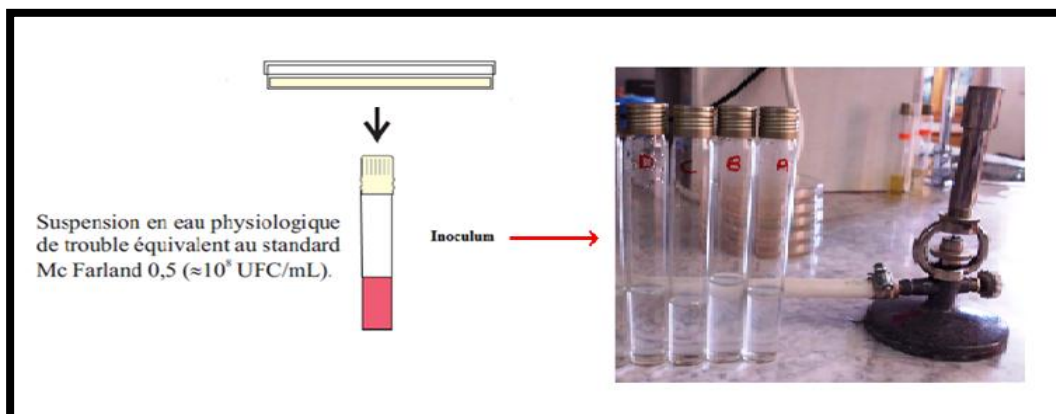


Figure V.9. Préparation d'inoculum

### b- Préparation des produits de synthèse mise en test

Les produits utilisés pour le test antibactérien sont :

La naringine , naringenine et ces dérivés.

Nous avons préparé des solutions de chaque produit de concentration 4 mg/ml de DMSO (figure V.10).

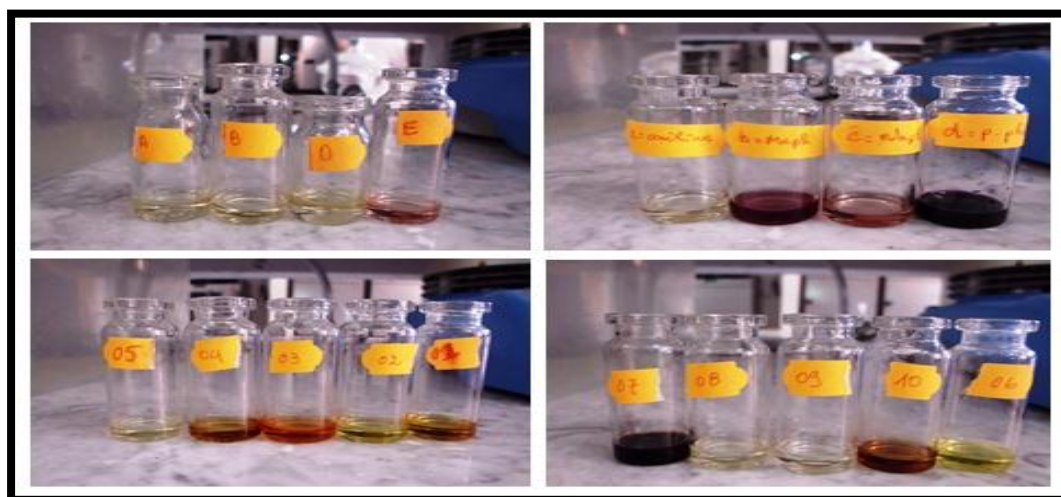


Figure V.10 Préparation des solutions de DMSO des dérivés synthétisés

### c- Ensemencement en milieu solide :

Toujours dans une zone stérile, les boîtes de Pétri sont préparées à couler aseptiquement par le milieu MH liquéfié dans un bain marie et laissé solidifié sur la paillasse. Chaque quatre boîtes sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon par un inoculum et on les laisse sécher.

Après on dépose dans chaque boîte, des disques imbibés par les solutions des dérivés préparés, avec un disque imbibé par le DMSO comme témoin. Les boîtes sont incubées dans un incubateur à 37°C, après 24h on observe les résultats.

#### **d- Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse, les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition.

#### **V. 5.2.3 Test antifongique**

Le test antifongique est réalisé par la méthode de diffusion sur un milieu solide.

##### **a- Purification et préparation de l'inoculum de *C.albicans***

Le *C.albicans* est cultivé dans un milieu solide GN, on prélève des colonies (10<sup>6</sup> - 10<sup>8</sup> germes) dans un tube à essai qui contient 9 ml d'eau physiologique, pour former une suspension ; après stérilisation du tube, on fait la culture de *C.albicans* dans un milieu Sabouraud. La boîte est incubée à 30 °C ; après 2 jours d'incubation, on prélève à l'aide d'une pipette Pasteur deux colonies et on les met en suspension dans un tube à essai qui contient 9 ml d'eau physiologique.

##### **b- Préparation des produits**

Des solutions (La naringine, naringenine et ces dérivés) de concentration 4 mg/ ml de DMSO sont préparées.

##### **e- L'antifongigramme**

Le milieu Sabouraud est liquéfié et coulé dans des boîtes de pétri, et laissé solidifié sur la paillasse, à l'aide d'une pipette Pasteur sous forme de râteau, chaque boîte est recouverte par l'inoculum, après 5 min on dispose sur le milieu des disques imbibés par les solutions préparés (4mg/ml de DMSO) avec le témoin (disque imbibé par le DMSO). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 jours.

#### **V. 6. Résultats et discussions**

##### **V.6.1. Activité antioxydante**

Le résultat de l'activité antioxydante sur plaque CCM des dérivés, est récapitulée dans le tableau (V.02) ; les différents composés montrent un pouvoir intéressant de piégeage des radicaux du DPPH, car chaque goutte de solution d'imine est transformée en couleur jaune plus ou moins foncé après le dépôt de DPPH ; (figure V.03)

**Tableau V.02. Résultats du test antioxydant de produits 1-32**

Dérivés	La Couleur avant le test	La Couleur après le test
DPPH (témoins)	Violet	Violet
1	Beige	Jaune (+++)
2	Jaune claire	Jaune (+++)
3	Jaune claire	Jaune (+)
4	Noir	Violet à fond jaune (+++)
5	Mauve	Jaune (+)
6	Marron	Jaune (+)
7	Marron	Jaune (+)
8	Marron	Jaune (+)
9	Jaune	Jaune (+)
10	Mauve	Jaune (+++)
11	Jaune	Jaune (+)
12	Marron jaunâtre	Jaune (+)
13	Jaune foncé	Jaune (+)
14	jaune	Jaune (+)
15	Marron jaunâtre	Jaune (++)
16	Marron	Jaune (+)
17	Jaune foncé	Jaune (+)
18	Beige	Jaune (+)
19	Jaune	Jaune (+++)
20	Violet claire	Jaune (++)
21	Jaune foncé	Jaune (+)
22	Marron	Jaune (+)
23	Marron jaunâtre	Jaune (++)
24	Marron jaunâtre	Jaune (+)
25	Marron	Jaune (+)
26	Marron	Jaune (+)
27	Jaune	Jaune (+)
28	Marron	Jaune (+)
29	Marron jaunâtre	Jaune (+)
30	Marron foncé	Jaune (+)
31	Marron jaunâtre	Jaune (+)
32	Marron	Jaune (+)

(+) : Intensité du couleur

D'après le tableau V.2, notre étude a montré que les dérivés de naringine et naringénine ont présenté une activité antioxydante. L'ensemble des produits synthétisés a présenté des spots jaunes avec un fluorescent différent utilisant le test DPPH.

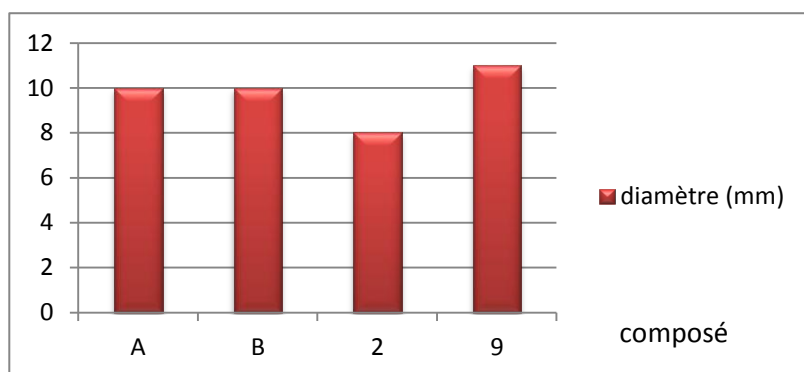
L'activité antioxydante pourrait s'expliquer par le squelette principal de nos produits, qu'est le squelette d'une flavanone, la naringine et la naringénine. On outre, les flavanones comme les autres flavonoïdes - d'après la littérature- sont des piègeurs ou capteurs des radicaux libres, des nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont déjà montré la propriété antioxydante de la naringine et la naringénine.

Dans nos conditions expérimentales, chacun des produits synthétisés a un pouvoir antioxydant mais avec une intensité variable. On observe aussi que les produits **1, 2, 4, 10** et **19** ont des spots jaune plus foncé que les autres, alors on peut tenir compte ces composés comme des antioxydants.

### V.6.2. Activité antibactérienne

Les résultats des tests antibactériens effectués des produits sur les quatre souches bactériennes (*E.colli* ; *P. auruginosa* ; *E.feacalis* ; *S. aureus*) sont présentés ci- dessous.

#### - Effet des imines synthétisés sur *E.coli*



**Figure .V.11.** Diamètres des zones d'inhibition des imines montrant des effets sur *E.coli*

A : produit 30, B : produit 31.



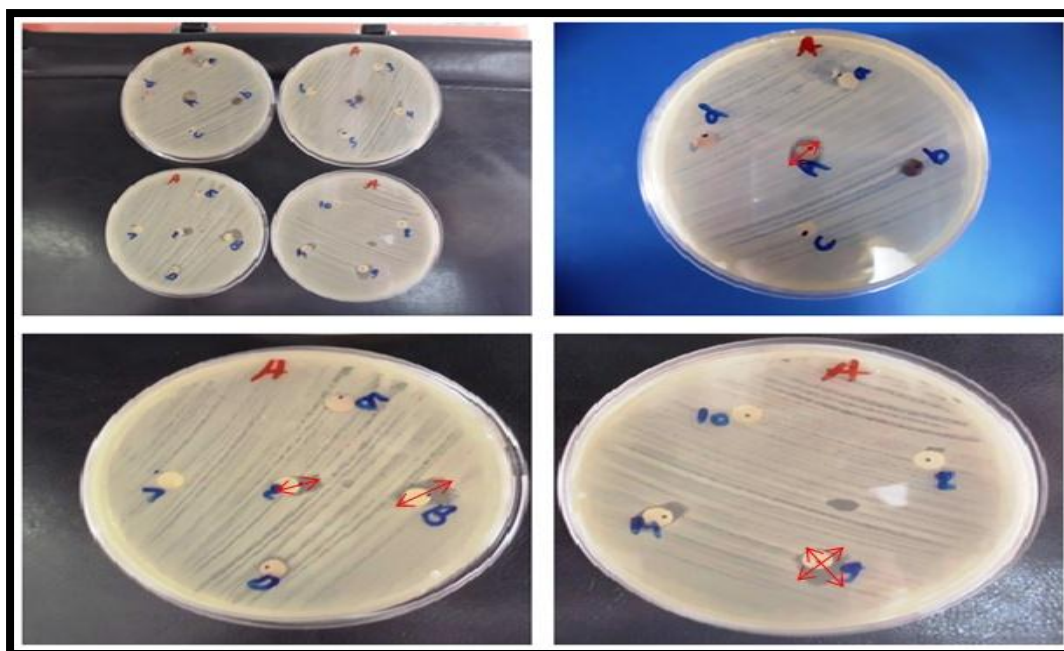


Figure.V.12. Photos montrant l'effet des imines sur *E. Coli*.

Les quatre produits A, B, 2 et 9 montrent un effet sur la souche *E.coli*, les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 8 – 11 mm.

- **Effets des imines synthétisés sur *Staphylococcus aureus***

Pour la souche *Staphylococcus aureus*, les cinq dérivés (a, c, d, B, 5) montrent des effets intéressants avec des diamètres des zones d'inhibition entre 7mm et 16 mm.

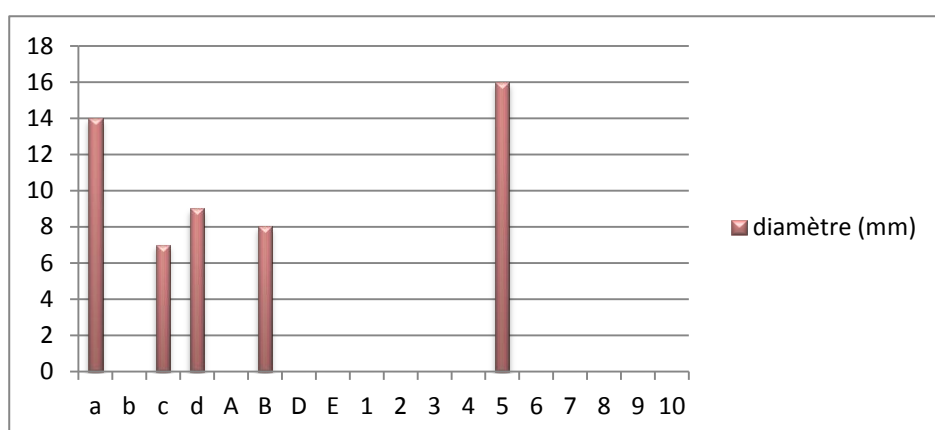


Figure .V.13. Diamètres des zones d'inhibition des imines montrant des effets sur *S. aureus*

a : produit 22, c : produit 24, d : produit 27

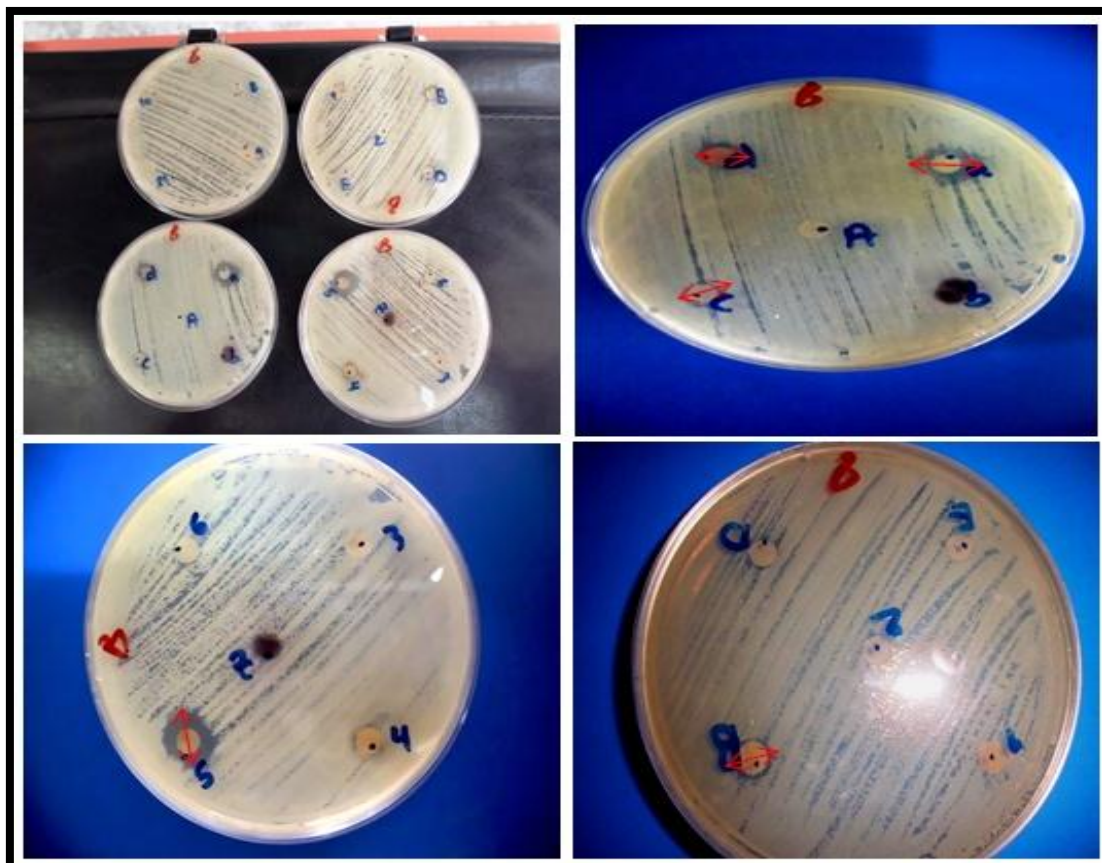


Figure.V.14. Photos montrant l'effet des imines sur *S. aureus*.

- Effets des imines synthétisés sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*

Les dérivés ne montrent aucun effet sur la souche (C) et (D), *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* sont résistants aux imines.

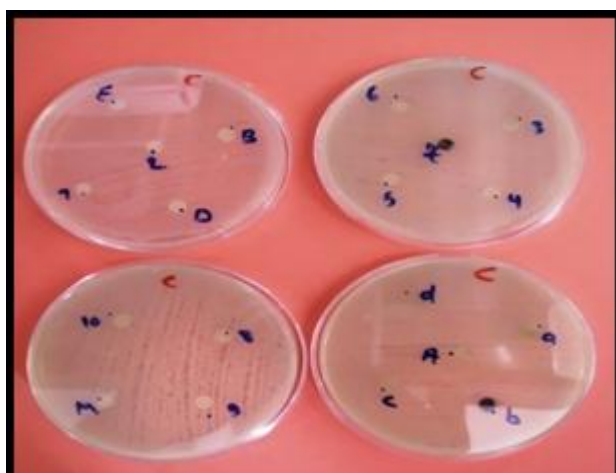


Figure.V.15. Photos montrant l'effet des imines sur *P.aeruginosa*.

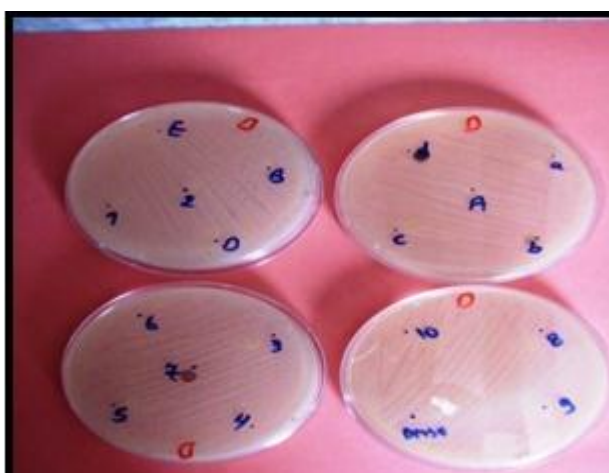


Figure.V.16. Photos montrant l'effet des imines sur *E.feacalis*.

### V.6.3. Activité antifongique sur *C.albicans*

Les dérivés ne montrent aucun effet sur la levure *C.albicans*, sont résistants aux imines.

### V. 7.Conclusion

L'étude présentée dans ce dernier chapitre nous a permis de montrer que la naringine , la naringenine et les produits synthétisés **3-32** ont des propriétés antioxydantes. Par cette action, ils peuvent contribuer à la prévention contre certain type des maladies comme le vieillissement de la peau et le cancer par exemple. D'après les résultats, on remarque que les produits synthétisés présentent une faible activité contre les souches testé. Par ailleurs, l'utilisation de ces dérivés synthétisés comme antifongiques n'a pas montré une inhibition fongique.

## Références

- 1 Ameer B., *et al.*, 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther*, 60:34-40.
- 2 Cavia-Saiz M., *et al.*, 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycosidenaringin: a comparative study. *J Sci Food Agric*, 90(7):1238-44.
- 3 Keli S.O., *et al.*, 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen Study. *Arch Intern Med*, 156:637-642.
- 4 Kim J.H., *et al.*, 2015. Naringenin enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Archives of pharmaceutical research*.
- 5 Lee Y.S., *et al.*, 1998. A method for measuring naringenin in biological fluids and its disposition from grapefruit juice by man. *Pharmacology*, 56:314-317.
- 6 Middleton E., *et al.*, 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Merck Index*; 43:1167-1179.
- 7 Nikolaeva IG, Dymshcheva LD, Nikolaev SM et Nikolaeva GG 2007. Antioxidant Activity and Flavonoid Composition of the New Nootropic Preparation Polynoophyt. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 41(10) : 532-535.
- 8 Accoceberry I. and Noël T. 2006. Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* 61 (3): 195-199.
- 9 Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. 2000. Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p.
- 10 Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. 2006. The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*. **73**: 413-421.
- 11 Deba, F., Dang Xuan, T., Yasuda, M., Tawata, S. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*. **19**: 346-352 .
- 12 Diallo A., 2005. Thèse de Doctorat. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Mali.
- 13 Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D 2002. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*; 35:221– 8.

- 14 Favier, A. 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique *L'actualité chimique*. 108-115.
- 15 FostingMatene S. 2005. Thèse de doctorat. Etude phytochimique et activités biologiques de *Maerua angolensis* DC (Capparidaceae). Université de Bamako. p77-79.
- 16 Gangouépiéboji, J. 2007. Thèse de doctorat. caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Liège.
- 17 Gloria MoleroRosaliaDíez-Orejas Federico Navarro-García LucíaMonteolivaJesús Pla Concha Gil Miguel Sánchez-Pérez César Nombela.1998. Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiology* ; 1:95–106.
- 18 Maataoui, B. S., Hmyene, A., Hilali, S. 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 7: 3-8.8
- 19 MarkowiczBastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. 2007. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Cameliasinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- 20 Milane, H., 2004. Thèse de doctorat. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Strasbourg.
- 21 Nauciel, C. 2000. Bactériologie médicale. Masson (Ed). Paris, 276p.
- 22 O.Fandougouma. 2011. Thèse magistère. Synthèse et Evaluation Biologique des dérivés Hétérocycliques de l'Hespéridine. Université de Bechar, Algérie.
- 23 Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.
- 24 Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. 117: 112- 119.
- 25 S.Smaoui, 2010. thèse de doctorat, purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Tunisie.
- 26 S. Athamina. 2009. Thèse magistère. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Université Elhadjkhadar de Batna, Algérie.

- 27 Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* **95**: 200-204.
- 28 Vigié C 2000. Médecine thérapeutique. 3, (3), *Thérapeutique*.
- 29 Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y .L., Sun, X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science.* **81**: 686-692.
- 30 Rimm E.B., *et al.*, 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, 125:384-389
- 31 Salim S., *et al.*, 2013. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol*, 19(34): 5633-5644.
- 32 Seo E.K., *et al.*, 1997. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry*, 45:509-515.
- 33 Pincemail J ; Defraigne J.D. 2004. Les antioxydants un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.
- 34 Gerard-Monnier D ; Chaudière J 1996. Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion, *PathBiol*, 44 : 77 – 85.
- 35 Miller N. *et al.* 1996. Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls, *FEBS Lett*, 384 : 240-2.
- 36 Barlow S.M. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
- 37 Moure A *et al.* 2001. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- 38 Shahidi F 1997. *Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications*; Ed: AOCS MISSION STATEMENT; p: 174-197.

### Conclusion générale :

Dans notre Laboratoire des Molécules Bioactifs et Séparation Chirale (LMBSC) et au cours de nos travaux de recherches, nous avons développé de nouveaux dérivés de la naringine et la naringénine non décrits dans la littérature. Nos études sont focalisées surtout vers la synthèse, séparation chirale et l'évaluation biologique des dérivés des iminonaringines et des iminonaringénines, qui s'intègre dans l'un des axes de recherche développé dans notre laboratoire.

Trois parties ont été développées dans ce travail :

La première partie porte sur la synthèse de dérivés de la naringine et la naringénine. Cette partie nous a permis de donner un aperçu sur les principales méthodes utilisées dans la préparation de ces dérivés. Trente composés de 4-iminonaringines et 4-iminonaringénines ont été préparés avec des rendements moyens et élevés par condensation de la naringine et la naringénine avec les amines primaires selon une nouvelle méthode sans catalyseur. Ces derniers sont caractérisés et identifiés par les méthodes spectroscopiques IR, UV, RMN<sup>1</sup>H, et RMN<sup>13</sup>C.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons séparé les énantiomères et les diastéréoisomères de dérivés synthétisés 4-iminonaringines et 4-iminonaringénines par CLHP en deux modes chromatographiques ; en utilisant les PSCs à base de polysaccharides, et discute leur énantioséparation. La meilleure résolution pour la naringénine et les 4-iminonaringénines en utilisant deux phases stationnaires chirales à base de polysaccharides à savoir Chiralpak®IB et Chiralcel®OD a été atteinte en utilisant des colonnes de Chiralpak®IB de type immobilisé en mode phase organique polaire en utilisant 100% de 2-propanol comme phase mobile. Et la séparation chirale des dérivés de 4-iminonaringines en deux modes chromatographiques, la séparation complète ( $R_s > 1.5$ ) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose le Chiralcel OD.

Ces résultats, nous ont permis de justifier 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 iminonaringines et iminonaringénines .

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons testé les différentes propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques *in vitro* de nos produits synthétisés. L'ensemble des composés **3-32** ont montré une activité antioxydante vis-à-vis le DPPH. Cela serait utile pour prévenir certains types de cancer et des pathologies cardiovasculaires. Les

composés **4**, **10** et **19** sont les composés qui possèdent un résultat plus significatif par rapport aux autres composés et surtout par rapport à la naringine.

En perspective, nous envisageons de développer d'autres méthodes de synthèse des dérivés de la naringine et la naringenine à travers des réactions de cyclisation.

Nous espérons, ainsi, avancer plus dans les tests biologiques afin d'étudier la relation structure-activité par les méthodes théoriques SAR et QSAR.