



HAL
open science

Étude bibliographique des flavonoïdes sulfatés : répartition, structure et propriétés biologiques

Philippe Bal

► **To cite this version:**

Philippe Bal. Étude bibliographique des flavonoïdes sulfatés : répartition, structure et propriétés biologiques. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01578333

HAL Id: dumas-01578333

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01578333>

Submitted on 29 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2000

N° D'ordre :

7007

**Etude bibliographique des flavonoïdes sulfatés :
répartition, structure et propriétés biologiques**

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme d'Etat de
Docteur en Pharmacie

PAR

Philippe BAL

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le Lundi 28 Février 2000 à 16 heures
devant le jury composé de :

Madame M. G. DIJOUX-FRANCA

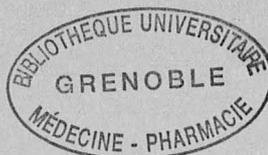
UFR de Pharmacie de Grenoble
Président du Jury

Monsieur A. BOUMENDJEL

UFR de Pharmacie de Grenoble
Maître de conférence

Monsieur M. TISSUT

UFR de Biologie de Grenoble
Professeur



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2000

N° D'ordre :

**Etude bibliographique des flavonoïdes sulfatés :
répartition, structure et propriétés biologiques**

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme d'Etat de
Docteur en Pharmacie

PAR

Philippe BAL

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le Lundi 28 Février 2000 à 16 heures
devant le jury composé de :

Madame M. G. DIJOUX-FRANCA

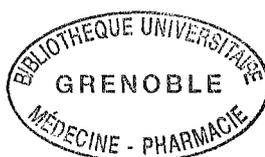
UFR de Pharmacie de Grenoble
Président du Jury

Monsieur A. BOUMENDJEL

UFR de Pharmacie de Grenoble
Maître de conférence

Monsieur M. TISSUT

UFR de Biologie de Grenoble
Professeur



A mon grand-père,

A David

Ce travail conclu plusieurs séjours au sein du laboratoire de Pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de Grenoble sous la responsabilité de Madame le Docteur M.G. DIJOUX-FRANCA. Je la remercie pour m'avoir dirigé dans cette étude. Elle me fait un grand honneur en acceptant la présidence du jury de cette thèse.

Je remercie vivement Madame le Professeur A.M. Mariotte pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie Monsieur le Docteur A. BOUMENDJEL pour sa sympathie. Je lui témoigne ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de siéger à ce jury.

Je suis également sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur M. TISSUT de l'UFR de Biologie de Grenoble, en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Philippe pour l'immense aide qu'il m'a apporté, ainsi que toute l'équipe du laboratoire pour son accueil et sa sympathie.

Je remercie enfin tous mes amis de la fac, Jean-Claude et Simone, qui ont rendu ces six années d'étude plus qu'agréables.

SOMMAIRE :

INTRODUCTION	4
1 STRUCTURE ET DISTRIBUTION	5
1.1 LES MONOCOTYLÉDONES	5
1.1.1 Les flavones	5
1.1.1.1. Famille des Palmae	5
1.1.1.2 Famille des Restionaceae	6
1.1.1.3 Famille des Commelinaceae	6
1.1.2 Anthocyanes, Flavanones.	7
1.1.2.1 Famille des Iridaceae	7
1.1.2.2 Famille des Myricaceae	7
1.2 LES DICOTYLÉDONES	8
1.2.1 Les Flavones	8
1.2.2 Les Flavonols	9
1.2.2.1 Famille des Compositae	9
1.2.2.2 Famille des Convolvulaceae	12
1.2.2.3 Familles des Zygophyllaceae et Leeaceae	13
1.2.2.4 Familles des Guttifereae et Tamaricaceae	14
2 EXTRACTION-PURIFICATION-CARACTERISATION	15
2.1 CARACTÉRISATION	15
2.1.1 Tests phytochimiques	15
2.1.2 C.C.M.	15
2.1.3 CLHP	15
2.1.4 Electrophorèse	16
2.2 ISOLEMENT	16
2.2.1 Extraction	16

2.2.2 Purification	16
2.3 CONCLUSION	17
3 DETERMINATION DE STRUCTURE	18
3.1 TECHNIQUES DESTRUCTRICES	18
3.1.1 L'hydrolyse acide	18
3.1.1.1 L'hydrolyse acide totale	18
3.1.1.2 L'hydrolyse acide partielle	19
3.1.2 L'hydrolyse enzymatique	20
3.2 MÉTHODES SPECTRALES	22
3.2.1 RMN ¹ H	22
3.2.2 RMN ¹³ C	24
3.2.3 Spectroscopie UV	24
3.2.4 Spectroscopie Infra-Rouge	25
3.2.5 Spectrométrie de masse	25
3.3 CONCLUSION	26
4 BIOGENESE	27
4.1 SULFATATION DES FLAVONOÏDES CHEZ LES PLANTES	27
4.1.1 Les flavonols sulfotransférases	27
4.1.2 Etude de la flavonol 3-sulfotransférase	27
4.1.3 Biosynthèse des flavonoïdes sulfatés chez le genre <i>Flaveria</i>	27
4.2 SULFATATION PAR LES MICRO-ORGANISMES	30
4.2.1 Flore intestinale	30
4.2.2 <i>Streptomyces fulvissimus</i>	31
5 SYNTHÈSE	32
5.1 ACIDE SULFAMIQUE	32
5.2 CONDENSATION ALDOLIQUE	32
5.3 POLYSULFATATION	33

5.3.1 Première étape	33
5.3.2 Deuxième étape	34
5.3.3 Obtention de dérivés sulfatés en 3	34
5.4 SYNTHÈSE ENZYMATIQUE	35
6 PROPRIETES BIOLOGIQUES	37
6.1 TRAITEMENT DES COMPLICATIONS DU DIABÈTE	37
6.1.1 L'aldose réductase	37
6.1.2 Le cristallin du diabétique	37
6.1.3 Inhibition de l'aldose réductase	38
6.2 DIMINUTION DES RÉACTIONS D'HYPERSENSIBILITÉ	38
6.2.1 Activité sur l'hypersensibilité de type I	39
6.2.2 Activité sur l'hypersensibilité de type II	39
6.2.3 Activité sur l'hypersensibilité de type III	39
6.2.4 Conclusion	39
6.3 PRÉVENTION DU CANCER DU SEIN	40
6.4 ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE	40
6.5 CONCLUSION	40
CONCLUSION ET DISCUSSION	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	43
ANNEXES	47

INTRODUCTION

L'étude phytochimique des plantes a permis de découvrir de nombreuses substances naturelles présentant un ou plusieurs groupements sulfates.

Ces dérivés sulfatés sont retrouvés dans différentes classes de composés naturels. Ils existent aussi bien dans la classe des saponines [Hostettman,1995] que dans celle des polyphénols comme les coumarines, les anthraquinones et les flavonoïdes [Barron,1988].

C'est cette dernière série que nous avons choisie d'étudier. Le but de ce travail a été d'effectuer une mise au point des derniers travaux réalisés dans ce domaine. Ce travail s'inscrit dans le prolongement de la revue de D. Barron parue en 1988 [Barron,1988].

Nous avons alors analysé les travaux réalisés après 1988 concernant les derniers composés isolés et identifiés ainsi que leur distribution dans le règne végétal. De plus, nous avons voulu résumer les différentes méthodes utilisées pour l'extraction, l'isolement, la détermination de leur structure ainsi que les techniques utilisées pour leur synthèse chimique.

Ce travail sera enfin complété par les principales voies de biogénèse et les propriétés biologiques déjà décrites pour ces composés. Nous verrons notamment l'intérêt qu'apporte la sulfatation des génines pour leur activité antioxydante ainsi que dans la prévention du cancer du sein et des complications oculaires du diabète.

1 STRUCTURE ET DISTRIBUTION

Depuis 1988, date de la dernière revue consacrée aux flavonoïdes sulfatés [Barron, 1988], de nombreux travaux ont été publiés. Ceux-ci portent aussi bien sur l'isolement et l'analyse structurale avec la description de 21 nouvelles molécules, que sur la présence dans d'autres plantes de flavonoïdes sulfatés connus.

Ce chapitre est donc consacré à ces avancées. Les différentes classes de flavonoïdes sulfatés de quatre familles de Monocotylédones et celles isolées dans la classe des Dicotylédones seront ainsi présentées.

Les Annexes 1 et 2 montrent les différents flavones et flavonols sulfatés isolés ainsi que leur origine.

1.1 LES MONOCOTYLEDONES.

Nous trouvons parmi les Monocotylédones présentant des flavonoïdes sulfatés (Annexe 3) des molécules connues isolées pour la première fois dans certaines espèces, ainsi que dix structures originales dont trois n'appartiennent ni aux flavonols ni aux flavones.

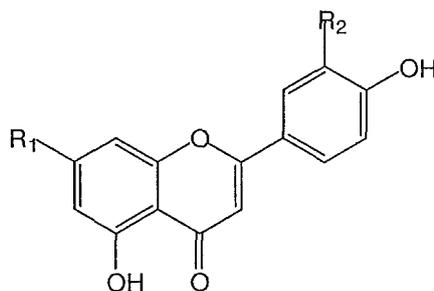
Ces travaux concernent donc six espèces réparties dans quatre familles : les *Palmae*, les *Restionaceae*, les *Commelinaceae* ainsi que les *Iridaceae*.

1.1.1 Les Flavones.

1.1.1.1 Famille des Palmae

Dans cette famille, l'espèce *Phoenix dactylifera* possède quatre flavones sulfatées [Tomas, 1988]. C'est la deuxième espèce du genre *Phoenix* à posséder des flavonoïdes sulfatés car deux d'entre eux, la lutéoline-7-sulfatoglucoside (1) et le chrysoeriol-7-sulfatoglucoside (2) étaient déjà isolés de *Phoenix roeblenii* (b).

Les deux autres dérivés isolés de *P. dactylifera*, la lutéoline-7-disulfatoglucoside (3) et le chrysoeriol-7-disulfatoglucoside (4) sont originaux [Tomas, 1988]. Ce sont les seuls flavonoïdes sulfatés isolés à ce jour dont les groupements sulfates soient portés par la même chaîne glycosylée. Cependant aucune précision n'est apportée quant à la position précise de ces groupements sulfatés.



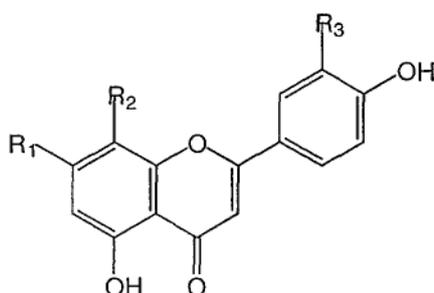
	R ₁	R ₂
1	Sulfatoglucoside	OH
2	Sulfatoglucoside	OMe
3	Disulfatoglucoside	OH
4	Disulfatoglucoside	OMe

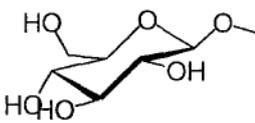
1.1.1.2 Famille des Restionaceae

L'étude de deux espèces de cette famille a permis d'isoler cinq nouveaux dérivés sulfatés de l'hypolaétine.

Un de ces dérivés a été isolé de *Hypolaena fastigiata* [William, 1998] : l'hypolaétine-7-sulfate-8-glucoside (**5**). C'est une flavone glycosylée dont la sulfatation s'effectue directement sur la génine contrairement aux quatre autres qui sont sulfatés sur la chaîne osidique.

Ces composés sont les dérivés 7-sulfatoglucosyl (**6**), 7-sulfatogalactosyl (**7**), 7-méthoxy-3'-sulfatoglucuronyl (**8**) et 7-méthoxy-3'-sulfatogalactosyl (**9**) de l'hypolaétine isolés de *Leptocarpus elegans* [William, 1998].

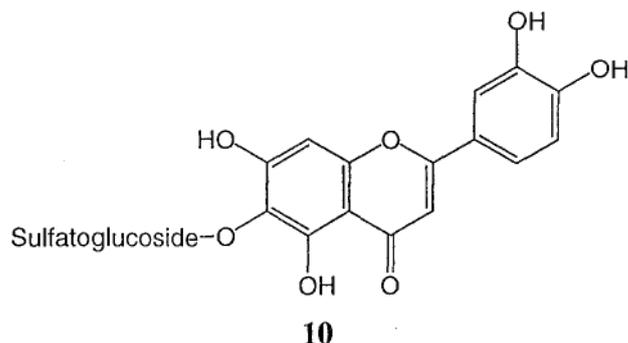


	R1	R2	R3
5	OSO ₃ ⁻		OH
6	Sulfatoglucoside	OH	OH
7	Sulfatogalactoside	OH	OH
8	OMe	OH	Sulfatoglucuronide
9	OMe	OH	Sulfatogalactoside

1.1.1.3 Famille des Commelinaceae

C'est à partir de *Tradescantia buckleyi* qu'un nouveau flavonoïde sulfaté a été isolé.

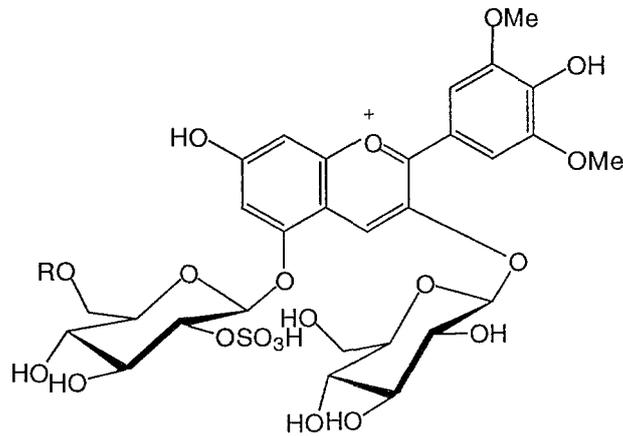
Il s'agit de la 6-hydroxy-6-sulfatoglucosyl-lutéoline (**10**) [Del pero, 1993]



1.1.2 Anthocyanes, Flavanones.

1.1.2.1 Famille des Iridaceae

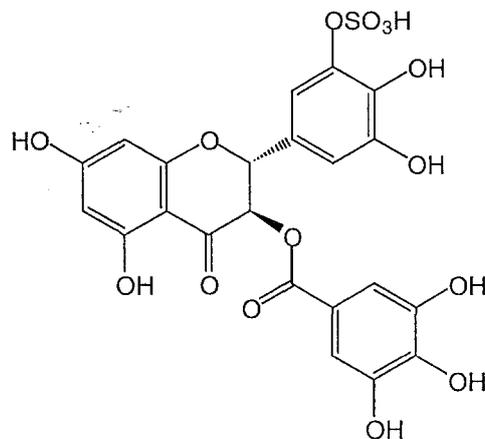
L'étude de *Babiana stricta* a permis d'isoler deux anthocyanes sulfatés : la malvidine-3-glucoside-5-(2''-sulfatoglucoside) (**11**) et la malvidine-3-glucoside-5-(2''-sulfato-6''-malonylglucoside) [Toki, 1994].



	R
11	H
12	Malonyl

1.1.2.2 Famille des Myricaceae

Ces deux nouveaux flavonoïdes sulfatés sont, avec le 3-gallate de la dihydromyricétine 3'-sulfate [Nonaka, 1983] (une hydroxyflavanone isolée de *Myrica rubra*), les trois seuls flavonoïdes sulfatés qui appartiennent ni aux flavones ni aux flavonols.



13

1.2 LES DICOTYLEDONES

Depuis 1988, 14 espèces réparties dans 9 familles différentes s'avèrent renfermer des flavonoïdes sulfatés dont 12 présentent des structures originales.

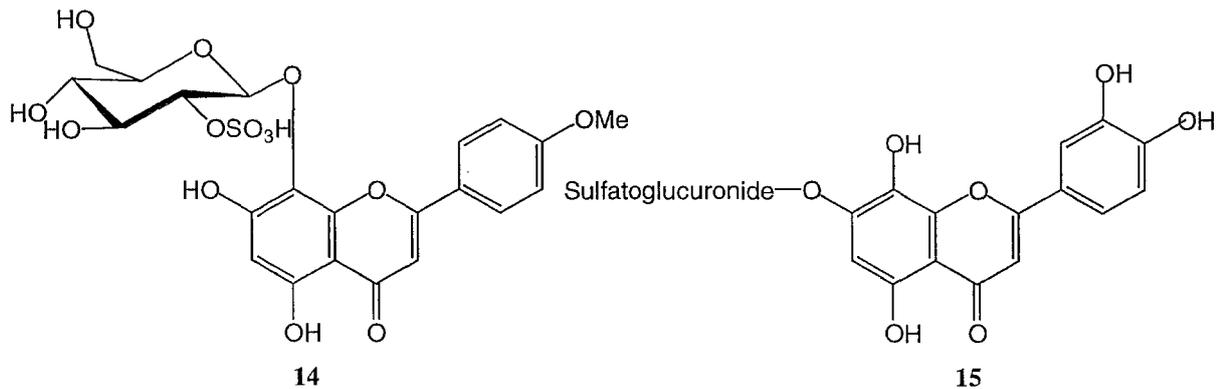
Parmi ces nouveaux composés, deux sont des dérivés de flavones et dix dérivent des flavonols.

L'Annexe 4 montre les espèces de dicotylédones à partir desquelles ont été isolés des flavonoïdes sulfatés.

1.2.1 Les flavones

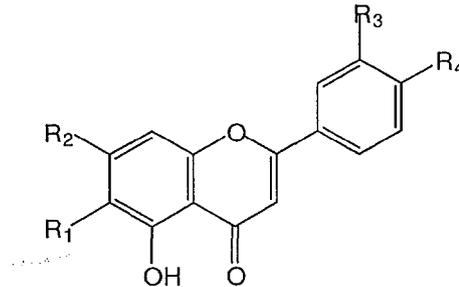
Les deux nouvelles flavones découvertes sont sulfatées sur la partie osidique.

La première, l'isoscutellaréine 4'-méthoxy-8-(2''-sulfatoglucosyl) (**14**) a été isolée d'*Althea officinalis* (Malvaceae) [Harborne,1994] et la seconde, l'hypolaétine-7-sulfatoglucuronyl (**15**) [Williams,1998] a été purifiée à partir de *Meeboldina thysanantha* (Restionaceae).



Outre ces deux nouvelles structures, les 12 autres flavones déjà répertoriées chez *Lippia nodiflora* (Verbenaceae) [Harborne, 1994] sont retrouvées chez une autre espèce du même genre : *L. canescens* (tableau 1).

Il s'agit de dérivés non glycosylés de l'hispiduline, de la 6-hydroxylutéoline, de la népétine, de la nodiflorétine et de la jacoéosidine.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Hispiduline-7-sulfate	OMe	OSO ₃ ⁻	H	OH
Hispiduline-4'-sulfate	OMe	OH	H	OSO ₃ ⁻
Hispiduline-7,4'-disulfate	OMe	OSO ₃ ⁻	H	OSO ₃ ⁻
6-Hydroxylutéoline-6-sulfate	OSO ₃ ⁻	OH	OH	OH
6-Hydroxylutéoline-7-sulfate	OH	OSO ₃ ⁻	OH	OH
6-Hydroxylutéoline-6,7-disulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OH	OH
Népétine-7-sulfate	OMe	OSO ₃ ⁻	OH	OH
Népétine-3',4'-disulfate	OMe	OH	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻
Nodiflorétine-7-sulfate	OH	OSO ₃ ⁻	OMe	OH
Nodiflorétine-6,7-disulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OMe	OH
Jacoéosidine-7-sulfate	OMe	OSO ₃ ⁻	OMe	OH
Jacoéosidine-7,4'-disulfate	OMe	OSO ₃ ⁻	OMe	OSO ₃ ⁻

Tableau 1 : Flavones sulfatées isolées de *Lippia canescens*.

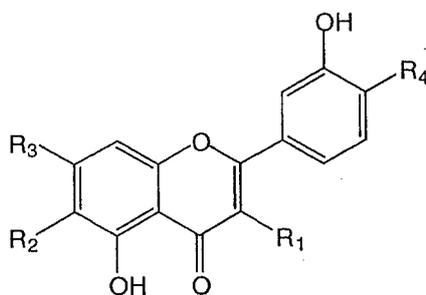
1.2.2 Les flavonols

Deux familles de la sous-classe des *Asteridae*, les *Compositae* et les *Convolvulaceae* regroupent 10 des 15 espèces qui possèdent des flavonoïdes sulfatés. Les quatre dernières espèces sont réparties dans quatre familles dont deux font partie de la sous-classe des *Dilleniidae* et deux de celle des *Rosidae*.

1.2.2.1 Famille des Compositae

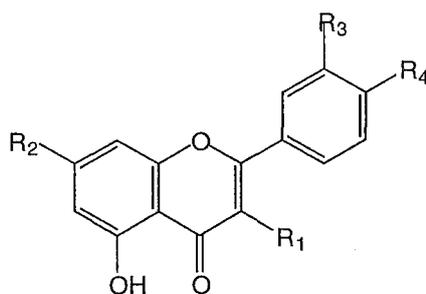
Dans la famille des *Compositae*, *Brickellia longifolia* a été étudiée [El sayed, 1990] et a permis l'isolement de deux nouveaux flavonols sulfatés : le kaempférol-6-hydroxyl-7,4'-diméthoxy-3-sulfate (**16**) et le kaempférol-6-hydroxyl-6,7-diméthoxy-3-sulfate (**17**).

L'eupatine-3-sulfate (**18**) a été également isolée. C'est une structure connue déjà isolée chez *Brickellia californica* [Barron, 1988].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
16	OSO ₃ ⁻	OH	OMe	OMe
17	OSO ₃ ⁻	OMe	OMe	OH
18	OSO ₃ ⁻	OMe	OMe	OMe

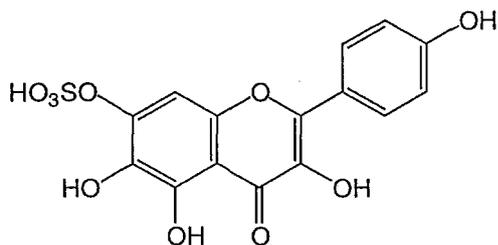
Dans le genre *Iphonia*, sept flavonols connus ont été isolés à partir d'*I. mucronata* (tableau 2) [Ahmed,1988].



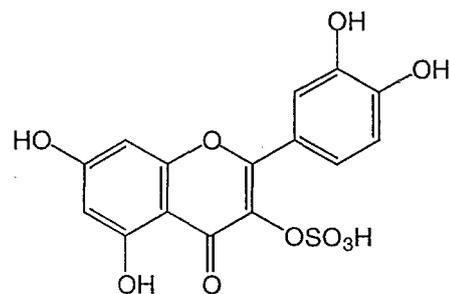
	R1	R2	R3	R4
Quercétine-3-sulfate	OSO ₃ ⁻	OH	OH	OH
Isorhamnétine-3-sulfate	OSO ₃ ⁻	OH	OMe	OH
Quercétine-3,7-disulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OH	OH
Isorhamnétine-3,7-disulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OMe	OH
Quercétine-3,7,4'-trisulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OH	OSO ₃ ⁻
Isorhamnétine-3,7,4'-trisulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OMe	OSO ₃ ⁻
Quercétine-3,7,3',4'-tetrasulfate	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻

Tableau 2 : Flavonols sulfatés isolés d'*Iphonia mucronata*.

Dans le genre *Inula* qui est connu pour posséder des flavonoïdes sulfatés [Barron,1988], *I. britannica* contient une nouvelle structure : le kaempférol-6-hydroxy-7-sulfate (**19**) [Oksuz, 1987]. Cette espèce possède aussi la quercétine-3-sulfate (**20**) déjà isolée d'*Oenanthe crocata* (Umbelliferae) [Harborne,1976b]



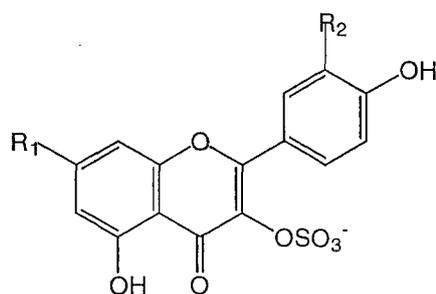
19



20

Deux autres espèces de la famille des *Compositae* possèdent des flavonoïdes sulfatés connus.

Il s'agit de *Pluchea dioscoridis* [Ahmed,1987a] dont on a isolé la quercétine-3,7-disulfate (**21**) et les dérivés 3-sulfate (**22**) et 3,7-disulfate (**23**) de l'isorhamnétine ainsi que *Sylibum marianum sbsp anatolicum* [Merçil,1988] à partir de laquelle le kaempférol-3-sulfate (**24**) a été isolé.



	R₁	R₂
21	OSO ₃ ⁻	OH
22	OH	OMe
23	OSO ₃ ⁻	OMe
24	OH	H

1.2.2.2 Famille des Convolvulaceae

Les neuf flavonols sulfatés qui ont été retrouvés dans cette famille proviennent de cinq espèces appartenant aux genres *Argyreia* et *Ipomoea*. Deux de ces structures sont nouvelles alors que les autres ont déjà été isolées dans d'autres familles de dicotylédones.

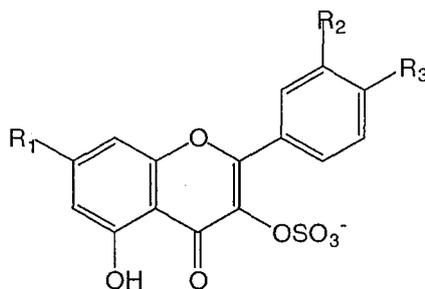
- Genre *Argyreia*

Cinq flavonols sulfatés de structures connues ont été isolés de trois espèces différentes [Mann, 1999].

La rhamnocitrine-3-sulfate (**25**) a été isolée d'*Argyreia mollis*, et d'*A. nervosa*.

D'*A. mollis* ont aussi été purifiés les dérivés 3-sulfate (**26**) et 3,3'-disulfate (**27**) de la rhamnétine.

A partir d'*A. nervosa* on a isolé la rhamnazine-3-sulfate (**28**), et d'*A. capitata* le kaempférol-7,4'-diméthoxy-3-sulfate (**29**).

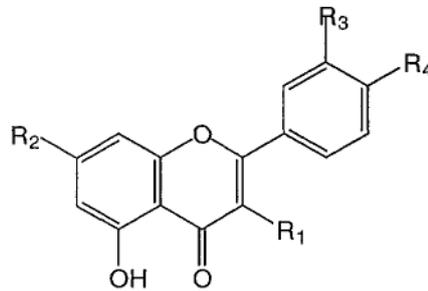


	R₁	R₂	R₃
25	OMe	H	OH
26	OMe	OH	OH
27	OMe	OSO ₃ ⁻	OH
28	OMe	OH	OMe
29	OMe	H	OMe

- Genre *Ipomoea*

Deux espèces de ce genre renferment des flavonols sulfatés. Ainsi d'*I. reticulata* [Mann,1999] on a identifié la rhamnocitrine-3-sulfate (**25**) et le kaempférol-3-sulfate (**24**).

C'est à partir d'*I. regnellii* qu'il a été rapporté la présence de deux nouveaux flavonols sulfatés [Mann,1999] : la quercétine-3,7-diméthoxy-4'-sulfate (**30**) et la quercétine-7,3',4'-triméthoxy-3-sulfate (**31**).



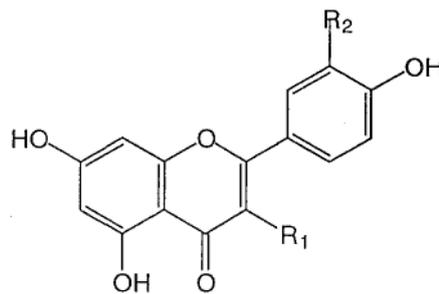
	R₁	R₂	R₃	R₄
30	OMe	OMe	OH	OSO ₃ ⁻
31	OSO ₃ ⁻	OMe	OMe	OMe

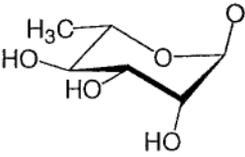
1.2.2.3 Famille des Zygophyllaceae et Leeaceae

Ces deux familles appartiennent à la sous-classe des *Rosidae*.

De la famille des *Leeaceae*, la quercitrine-3'-sulfate (**32**) isolé de *Leea guineensis* a été reporté pour la première fois [Op de beck,1998].

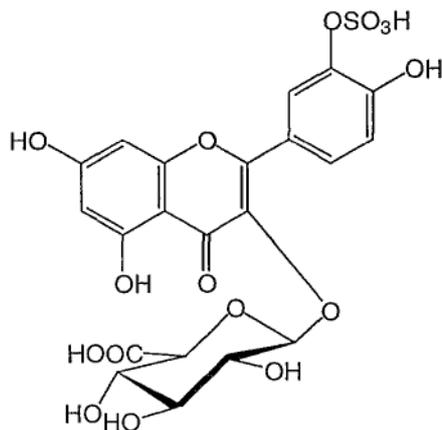
L'autre structure a été isolée *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) [Li,1996] ; il s'agit de l'isorhamnétine-3-(4''sulfatorutinoside) (**33**).



	R₁	R₂
32		OSO ₃ ⁻
33	4''-Sulfatorutinoside	OMe

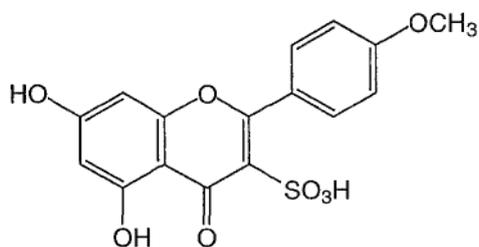
1.2.2.4 Familles des Guttiferae et Tamaricaceae.

Trois flavonoïdes sulfatés ont été isolés à partir de deux espèces de ces deux familles de la sous-classe des *Dilleniidae*. Un nouveau flavonoïde a été isolé de *Hypericum eleodes* (Guttiferae) [Seabra,1988]. Ce flavonol est sulfaté sur la génine et possède une chaîne osidique. Il s'agit de la quercétine-3-glucuronide-3'-sulfate (**34**).

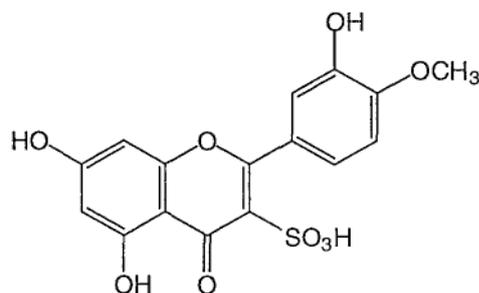


34

Dans la famille des *Tamaricaceae*, le kaempférol-4'-méthoxy-3-sulfate (**35**), une nouvelle molécule a été isolée de trois espèces du genre *Tamarix* [Tomàs-Berberàn,1990] : *T. africana*, *T. gallica* et *T. bobeana*. *T. bobeana* est une nouvelle espèce de ce genre à posséder des flavonoïdes sulfatés, et elle contient comme les autres la tamarixétine-3-sulfate (**36**).



35



36

2 EXTRACTION-PURIFICATION-CARACTERISATION

L'obtention de flavonoïdes sulfatés purs se fait, comme pour toutes les substances naturelles, en trois étapes : extraction et purification et caractérisation.

La détection se base sur des techniques de chromatographies. L'étape d'extraction se fait selon des techniques d'extraction liquide-solide, liquide-liquide ou de précipitation. Enfin les produits purs sont obtenus après chromatographie sur colonnes.

Nous présentons ici les techniques et les conditions expérimentales les plus souvent utilisées [Barron,1988].

2.1 CARACTÉRISATION

2.1.1 Tests phytochimiques

Lors du screening d'extraits bruts de plantes, on peut mettre en évidence la présence de molécules sulfatées en utilisant la propriété de l'ion sulfate à précipiter avec le chlorure de baryum (BaCl_2). Pour cela, on effectue une hydrolyse acide (HCl 2N, 95°C , 15 mn) qui libère l'ion sulfate.

L'apparition d'un précipité blanc formé après ajout de chlorure de baryum témoigne de la présence d'ion sulfate.

La recherche de flavonoïdes sulfatés à proprement parler peut se faire en utilisant soit une technique chromatographique (CLHP ou CCM) soit une technique d'électrophorèse.

2.1.2 CCM

Le système le plus souvent rencontré utilise la silice greffée en C-18 avec comme phase mobile un mélange butanol-acide acétique-eau (8 : 1 : 1) pour les flavonoïdes sulfatés les moins polaires, (3 : 1 : 1) ou (4 : 1 : 5) pour les plus polaires.

Dans ce cas, leur mobilité est inversement proportionnelle au nombre de groupements sulfates.

Les plaques sont ensuite révélées soit par exposition à des vapeurs de NH_4OH soit par pulvérisation de diphényl-borinate puis observées sous lumière UV.

Ainsi, après révélation aux vapeurs de NH_4OH , la plupart des flavonoïdes sulfatés ont une absorption violette sous UV, mais quelques fois, ils peuvent développer une fluorescence jaune, orange, bleue ou verte.

Par contre, en utilisant le diphényl borinate, les flavonoïdes sulfatés développent soit une fluorescence verte, jaune ou bleue, soit une absorbance marron ou violette.

2.1.3 CLHP

La CLHP sur colonne de silice greffée en C-18 permet de séparer les flavonoïdes sulfatés des flavonoïdes glycosylés de polarité très voisine.

La séparation est facilitée en créant une paire d'ions avec le tétrabutylammonium phosphate qui modifie la polarité des flavonoïdes sulfates : du fait de l'affinité de la paire d'ions pour la

phase inverse, la polarité des flavonoïdes sulfatés décroît avec le nombre croissant de groupements sulfates alors que celle des flavonoïdes glycosylés n'est pas modifiée.

Le mélange MeOH-AcOH-H₂O utilisé comme phase mobile élue les flavonoïdes sulfatés selon leur nombre croissant de groupements sulfates.

2.1.4 Electrophorèse

Cette technique se fait sur du papier Whatman N° 3 en utilisant un tampon AcOH-HCOOH pH 2,2. Les flavonoïdes sulfatés migrent alors vers l'anode avec une mobilité proportionnelle au nombre de groupements sulfates.

La vitesse de migration varie aussi en fonction de la classe de flavonoïdes et de la position des groupements sulfates : les dérivés sulfatés des flavonols migrent plus rapidement que les dérivés de flavones ; l'augmentation de la mobilité due à une substitution sur la position 3 est supérieure à celle provoquée si la substitution a lieu sur la position 7 ou 3'.

2.2 ISOLEMENT

La purification des flavonoïdes sulfatés se heurte à un certain nombre de contraintes car la liaison sulfate-ester est très instable et s'hydrolyse facilement libérant ainsi la génine. L'autre problème que l'on rencontre est la difficulté qu'il y a à séparer les flavonoïdes sulfatés des flavonoïdes glycosylés car ils ont des polarités très proches.

Il faut donc prendre garde à ne pas travailler dans des milieux trop acides, et éviter la chaleur. De plus, on peut être amené à modifier leur polarité afin de les séparer des dérivés glycosylés.

2.2.1 Extraction

L'extraction des flavonoïdes sulfatés se fait en deux étapes : extraction solide-liquide suivie d'une séparation liquide-liquide utilisant un gradient de polarité croissante.

L'extraction solide-liquide a lieu sur la plante sèche par un mélange hydroalcoolique de type MeOH-H₂O (5 : 5 à 8 : 2).

La deuxième étape est réalisée sur l'extrait hydroalcoolique obtenu précédemment après concentration à sec et dissolution dans H₂O.

Elle utilise des solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol). Ainsi il ne reste dans la phase aqueuse que les flavonoïdes glycosylés et sulfatés les plus polaires.

2.2.2 Purification

Les flavonoïdes sulfatés présents dans la phase aqueuse sont purifiés par précipitation en utilisant de l'éthanol : les substances très polaires comme les flavonoïdes sulfatés précipitent avec d'autres composés polaires.

Cette étape est généralement suivie de chromatographies sur colonne. Plusieurs types de colonnes peuvent être utilisés :

La chromatographie sur gel Polyclar est une chromatographie d'adsorption qui permet d'éliminer les sucres, certains acides aminés ou sels minéraux par lavage à l'eau et une élution par un gradient croissant de MeOH dans H₂O permet de décrocher les flavonoïdes sulfatés.

La chromatographie de partage sur cellulose en éluant avec gradient croissant de MeOH dans H₂O sépare les composants en fonction de leur polarité.

On utilise aussi la chromatographie d'exclusion-diffusion qui sépare les composés en fonction de leur taille. Pour cette technique, on a le choix entre deux types de gel (tableau 3)

Gel	Solvant d'élution
Sephadex LH-20	méthanol-eau (80 : 20)
Sephadex G-10	gradient eau méthanol
Tableau 3 : Conditions d'élution pour chromatographie sur Sephadex	

Lorsque le concentré aqueux est riche en flavonoïdes glycosylés, il est difficile de les séparer des flavonoïdes sulfatés.

Dans ce cas, la séparation sélective des dérivés sulfatés est possible en créant une paire d'ions avec du tétrabutylammonium. Les paires d'ions ainsi créées sont apolaires faciles à séparer des dérivés glycosylés au cours d'une séparation liquide-liquide : les flavonoïdes glycosylés restent dans la phase aqueuse tandis que les dérivés sulfatés migrent dans la phase organique.

Il faut ensuite régénérer les flavonoïdes sulfatés en utilisant l'acétate de potassium (KOAc) dans le méthanol qui permet d'obtenir les flavonoïdes sulfatés sous forme de sel de potassium qui passent dans la phase aqueuse.

2.3 CONCLUSION

Aussi, le caractère labile des groupements sulfates et l'hydrophilie des flavonoïdes sulfatés sont deux facteurs limitant pour leur isolement et leur purification.

3 DETERMINATION DE STRUCTURE.

L'analyse structurale de ces composés fait intervenir deux grands types de techniques : les techniques dites destructrices et les techniques spectroscopiques.

3.1 TECHNIQUES DESTRUCTRICES.

Ces techniques présentent l'inconvénient majeur d'utiliser une quantité relativement importante de produit. Elles sont basées sur l'hydrolyse partielle ou totale qui va permettre de détecter la présence de groupements sulfates ou de donner une indication quant à leur position.

La figure 1 illustre sur une molécule fictive (37) les liaisons hydrolysées par les différentes techniques.

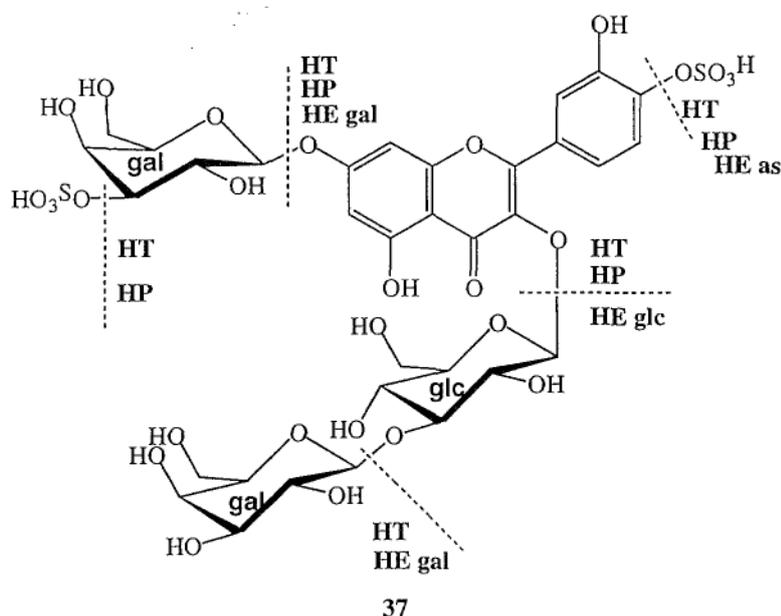


Figure 1 : Exemple de flavonoïde sulfaté avec cible des différentes techniques d'hydrolyse réalisé sur le composé 37.

(gal : galactose ; glc : glucose ; HT : hydrolyse totale ; HP : hydrolyse partielle ; HE glc : hydrolyse enzymatique par la β -Glucosidase ; HE gal : hydrolyse enzymatique par la β -Galactosidase ; HE as : hydrolyse enzymatique par l'aryl sulfatase)

3.1.1 L'hydrolyse acide

3.1.1.1 L'hydrolyse acide totale

L'hydrolyse acide totale par l'acide chlorhydrique 2N à 95°C pendant 15 mn aboutit comme son nom l'indique à la rupture des liaisons éther et ester telles que les liaisons, sucre-génine, sucre-sucre, génine-sulfate et sucre-sulfate. Cette étape permet après extraction de la génine par un solvant organique de l'identifier par les différentes techniques spectrales (UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , SM) [Barron, 1988].

Le résultat de l'hydrolyse totale du flavonoïde 37 est décrit dans la figure 2.

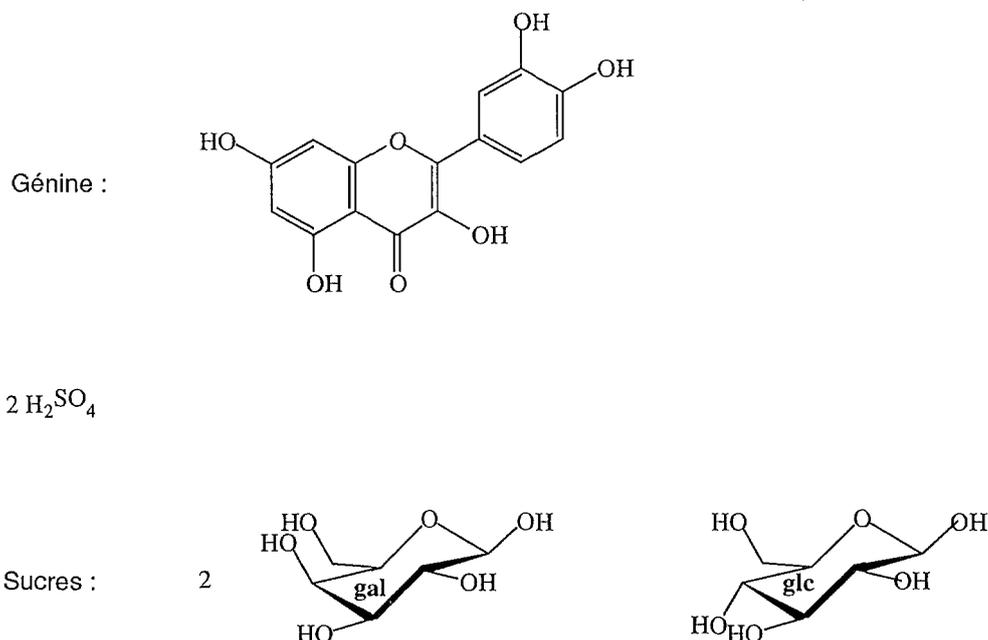


Figure 2 : Fragments obtenus après hydrolyse totale de 37 : La génine, 2 H₂SO₄, 2 galactoses, 1 glucose.

La présence de sulfate est mise en évidence en procédant à une précipitation par du chlorure de baryum. Une CCM sur cellulose dans EtOH-HCl 0,1N (80 : 20) révèle après pulvérisation d'hexanitrite de cobalt l'ion sulfate grâce à une tâche blanche sur fond violet.

Le cation associé peut être déterminé par absorption atomique.

Les éléments de la partie osidique sont identifiés quant à eux en les comparant par une technique chromatographique (CCM ou HPLC) à des composés de références [Barron,1988] ou par peracétylation puis CPG.

3.1.1.2 L'hydrolyse acide partielle

L'hydrolyse acide partielle par de l'acide acétique à 10% permet l'identification de produits intermédiaires de la molécule de départ. Cependant, la liaison sulfate ester est plus fragile que la liaison glycosidique, et l'hydrolyse partielle ne permet pas de déterminer (quand c'est le cas) le sucre sur lequel l'ion sulfate est fixé. On utilise alors l'hydrolyse enzymatique [Barron,1988].

La figure 3 montre les fragments obtenus après hydrolyse partielle de 37.

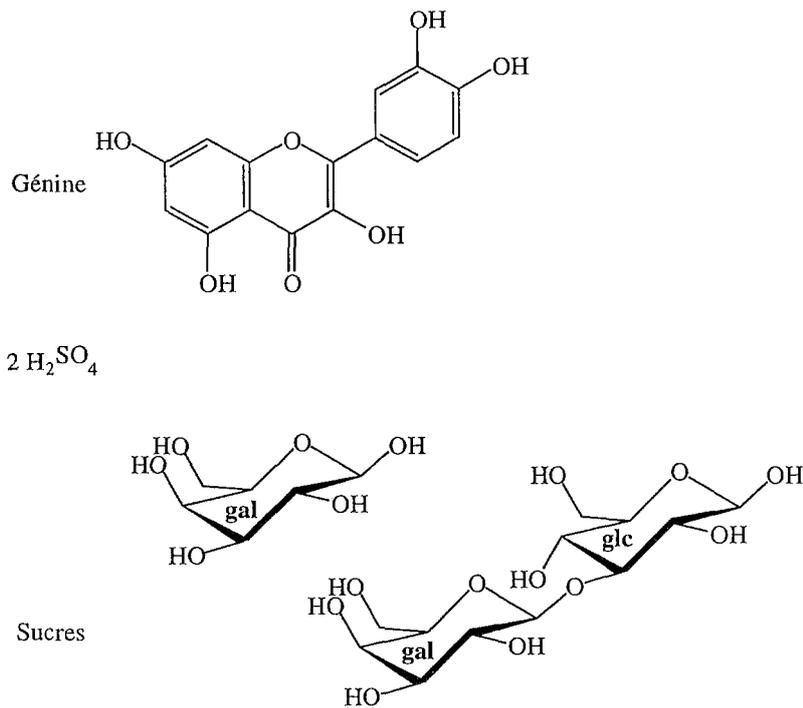


Figure 3 : Fragments obtenus après hydrolyse partielle 37 : La génine, 2 H₂SO₄, 1 galactose, 1 dioside Gal-Glc.

3.1.2 L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est plus spécifique que l'hydrolyse acide, ce qui permet un meilleur contrôle et un plus grand nombre d'intermédiaires de la molécule étudiée.

L'utilisation de la β -Glucosidase et de la β -Galactosidase permet de couper sélectivement la liaison glucosidique ou galactosidique (figure 4a et 4 b) [Barron,1988].

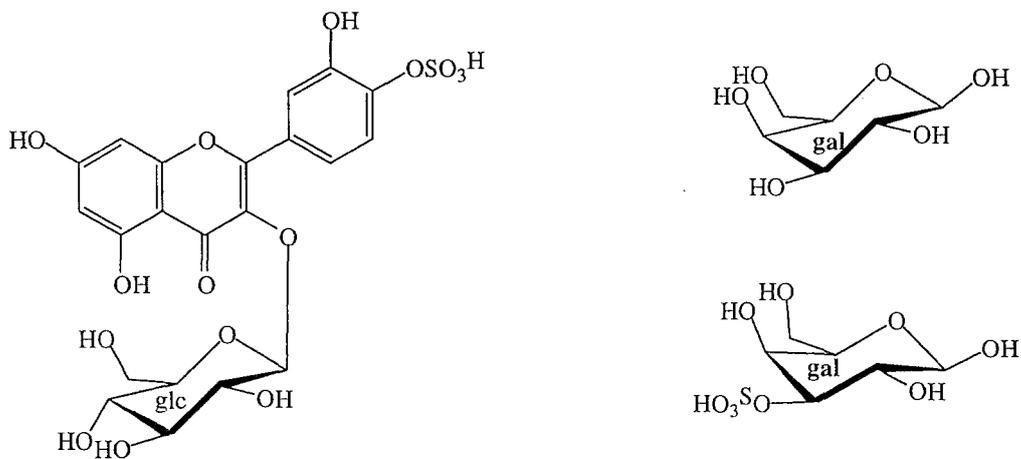


Figure 4a : Fragments obtenus après action de la β -Galactosidase sur le produit 37.

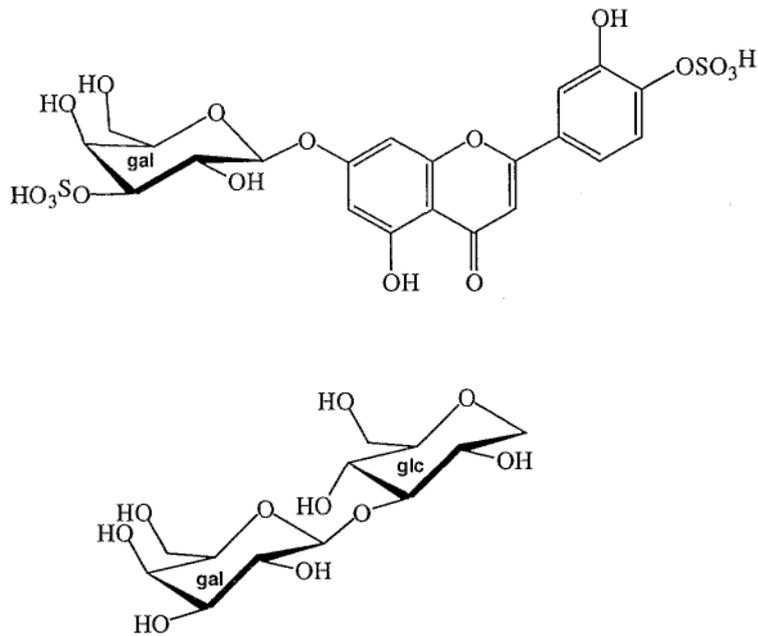


Figure 4b : Fragments obtenus après action de la β -Glucosidase du produit 37.

Le groupe sulfate peut être hydrolysé par des sulfatases qui ont une certaine sélectivité. Par exemple, l'aryl sulfatase agit sélectivement sur les liaisons sulfates-phénols : elle coupe en effet les groupements sulfates fixés sur la génine sans toucher ceux fixés sur les sucres [Barron,1988].

La figure 5 montre le résultat obtenu sur la molécule 37.

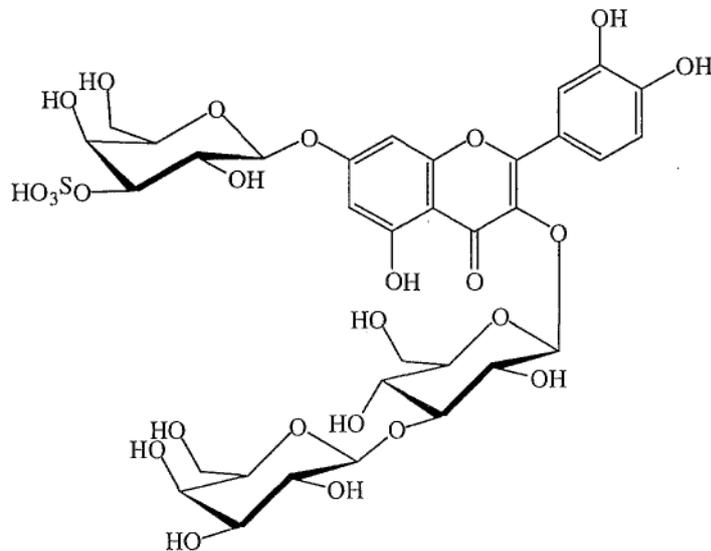


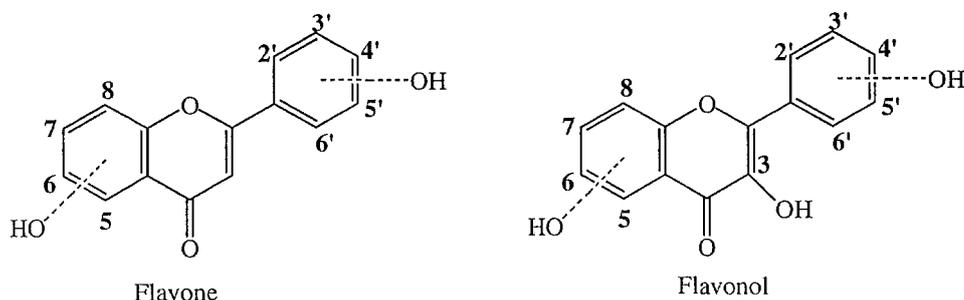
Figure 5 : Perte du groupement sulfate en 4' après action de l'aryl-sulfatase.

Enfin, en comparant les spectres d'absorption UV de la molécule intacte à ceux des différents produits hydrolysés, ces expériences permettent de positionner les parties glycosidiques et les fonctions sulfates sur la génine.

3.2 METHODES SPECTRALES

Parallèlement aux techniques dégradatives, il existe un certain nombre de méthodes spectrales. Ces techniques sont plus volontiers utilisées car elles ne modifient pas la structure du composé (RMN) ou ne nécessitent que très peu de produit (UV, SM) [Barron, 1988].

Ainsi, nous avons vérifié s'il existe une corrélation entre les données spectrales et la présence des groupes sulfates grâce aux valeurs trouvées dans la bibliographie. Ceci dans le but d'établir des règles qui serviraient lors de la détermination de la position de ou des groupements sulfates.



Rappel de la numérotation chez les flavones et les flavonols

3.2.1 RMN ¹H.

Nous allons voir les modifications des déplacements chimiques qu'apporte l'introduction d'un ou plusieurs groupements sulfates.

Pour cela, nous avons calculé la différence des déplacements chimiques entre les flavonoïdes mono, di et trisulfatés par rapport à leur génine (les valeurs sont présentées en Annexe 4).

Dérivés monosulfatés

Les résultats obtenus (tableau 4) montrent qu'une sulfatation en position 3 ne provoque qu'un très faible blindage (de -0,13 à 0 ppm) des protons des noyaux A et B.

Dans la série des flavonols, lorsque la sulfatation est en position 7, le déblindage observé pour H-6 se situe aux alentours de +0,34 ppm et il est d'environ +0,54 ppm pour H-8.

Chez les flavones, le déblindage observé par l'introduction d'un groupement sulfate en 7 est moins important pour les protons 6 et 8 : la moyenne pour H-6 est de +0,28 ppm et elle est de +0,40 ppm pour H-8. Par contre, les déplacements chimiques du proton 3 de ces flavones varient de +0,46 à -0,27 ppm. Elles ne sont donc pas suffisamment homogènes pour être généralisées.

Protons	3	6	8	2'	3'	5'	6'
Kaempférol-3-sulfate	-	-0,10	-0,13	0	-0,11	-0,11	0
Quercétine-7-sulfate	-	+0,33	+0,55	+0,01	-	-0,03	+0,08
Kaempférol-7-sulfate	-	+0,35	+0,53	+0,02	-0,01	-0,01	+0,02
Hispiduline-7-sulfate	+0,46	-	+0,34	+0,24	+0,11	+0,11	+0,24
Apigénine-7-sulfate	+0,06	+0,30	+0,44	-0,10	-0,11	-0,11	-0,10
Lutéoline-7-sulfate	-0,27	+0,26	+0,40	-0,29	-	-0,57	-0,10
Quercétine-3'-sulfate	-	-0,03	-0,01	+0,33	-	+0,06	+0,27

Tableau 4 : différence de déplacements chimiques en RMN ¹H entre les dérivés monosulfatés et leur génine. (DMSO-d₆)

La sulfatation de la position 3' provoque un déblindage de +0,33 ppm du proton 2' et de +0,27 ppm du proton 6'. Le déplacement chimique de H-5' quant à lui n'est quasiment pas perturbé par cette sulfatation.

Dérivés disulfatés

En comparant les résultats de la quercétine-3'-sulfate (tableau 4) à ceux de la quercétine-3,3'-disulfate (tableau 5), on remarque que l'introduction d'un groupement sulfate en position 3 perturbe l'influence du groupement sulfate en 3' : le déblindage de H-2' n'est plus que de +0,21 ppm tandis que celui de H-6' a presque doublé.

Les résultats des dérivés disulfatés en 7 et 4' (tableau 5) sont assez homogènes. On remarque que la sulfatation en 4' ne modifie pas le déblindage des H-6 et 8 causé par la sulfatation en 7 : par rapport aux flavonoïdes sulfatés en 7 (tableau 4), les déblindages observés pour les dérivés 7,4'-disulfatés restent les mêmes.

Protons	3	6	8	2'	3'	5'	6'
Quercétine-3,3'-disulfate	-	-0,01	-0,02	+0,21	-	0	+0,50
Quercétine-3,4'-disulfate	-	+0,03	+0,03	-	-	+0,44	-
Kaempférol-7,4'-disulfate	-	+0,30	+0,50	+0,14	+0,36	+0,36	+0,14
Quercétine-7,4'-disulfate	-	+0,37	+0,54	-0,02	-	+0,46	+0,16
Apigénine-7,4'-disulfate	+0,14	+0,35	+0,50	+0,08	+0,37	+0,37	+0,08
Lutéoline-7,4'-disulfate	+0,11	+0,34	+0,53	+0,16	-	-	-

Tableau 5 : Différence de déplacements chimiques en RMN ¹H entre les dérivés disulfatés et leur génine (DMSO-d₆)

Au niveau du cycle B, les différences de déplacements chimiques des H-2' et 6' sont très variables en fonction des composés. Lorsqu'il n'y a pas d'hydroxyle en 3', les protons situés en *ortho* du groupement sulfate subissent un déblindage d'environ +0,36 ppm ; une hydroxylation en 3' amène la valeur du déblindage de H-5' à +0,46 ppm.

Dérivés trisulfatés

Les valeurs rapportées dans le tableau 3 montrent que l'introduction d'un groupement sulfate en 3' sur les dérivés 7,4'-disulfate de la quercétine et du kaempférol ne modifie pas les valeurs du déblindage des différents protons du cycle B des dérivés disulfatés (tableau 6) .

Protons	6	8	2'	3'	5'	6'
Quercétine-3,7,3'-trisulfate	+0,41	+0,50	+0,30	-	+0,03	+0,50
Quercétine-3,7,4'-trisulfate	+0,30	+0,53	+0,24	-	+0,44	+0,17
Kaempférol-3,7,4'-trisulfate	+0,32	+0,43	+0,10	+0,33	+0,33	+0,10

Tableau 6 : Différence de déplacements chimiques en RMN ¹H entre les dérivés trisulfatés et leur génine (DMSO-d₆)

3.2.2 RMN ¹³C

Le squelette des flavones et des flavonols est constitué de trois types de carbones : le carbone 4 portant la fonction carbonyle qui est le plus déblindé (180 ppm), des carbones sp² qui résonnent de 90 à 130 ppm et des carbones sp² portant un OH qui résonnent entre 130 et 150 ppm. (tableau des valeurs en Annexe 5).

L'introduction d'un groupement sulfate déblindé le carbone qui porte cette fonction et blinde les carbones en *ortho* et *para*. Les variations de déplacements chimiques induit par la sulfatation pour chaque position du squelette flavonoïdique est résumé dans le tableau 7 [Barron,1988].

Carbone	Position du groupement sulfate (carbone concerné)					
	3	7	3'	4'	3'+4' calc	3'+4' obs
Ipsos	+3,3 (C-3)	+5,0 (C-7)	+4,2 (C-3')	+4,3 (C-4')	+1,0 (C-3')	+2,1 (C-3')
					+0,7 (C-4')	+0,7 (C-4')
Ortho	-9,7 (C-2)	-2,7 (C-6)	-6,9 (C-2')	3,2 (C-3')	-8,9	-5,4
	-2,0 (C-4)	-4,0 (C-8)	-3,6 (C-4')	-6,0 (C-5')	-7,6	-3,5
Méta	-1,1 (C-10)	+0,8 (C-5)	-0,6 (C-1')	-2,0 (C-2')	-	-
	-	+1,2 (C-9)	-1,6 (C-5')	-1,6 (C-6')	-	-
Para	-	-2,4 (C-10)	-4,9 (C-6')	-4,5 (C-1')	-5,1 (C-1')	-3,0 (C-1')
	-				-6,5 (C-6')	-4,0 (C-6')

Tableau 7 : Déplacements chimiques du ¹³C induits par le groupement sulfate (DMSO-d₆)

3.2.3 Spectroscopie UV

D'une manière générale, les flavonoïdes sulfatés montrent les mêmes caractéristiques UV (Annexe 6) que les composés méthylés ou glycosylés. Cependant, la sulfatation en position 3 ou 4' induit un effet hypsochrome de la bande I plus important que celui induit par la méthylation ou la glycosylation sur les mêmes positions. Ainsi l'effet hypsochrome de la bande I provoqué par une sulfatation en 3 est de 20 à 30 nm et de 8 à 14 nm pour une sulfatation en 4' [Barron,1988 ; 1988b].

Le clivage de la liaison sulfate par HCl provoque un effet bathochrome de la bande I indiquant la présence de groupements sulfatés en position 3, 3' et/ou 4' mais n'indique rien en ce qui concerne la présence ou non de groupement sulfate en position 7. La lecture des spectres UV se fait 30 mn après ajout de 3 gouttes d'HCl 25% dans du méthanol.

Toutes les flavones sulfatées en 4' montrent un effet bathochrome de la bande I de 15 à 25 nm après addition d'HCl (tableau 8). Dans le cas de la lutéoline, la sulfatation en 3' induit un effet bathochrome de 8 nm.

On peut aussi ajouter que les effets bathochromes de la sulfatation en 3' et de celle en 4' sont additifs puisque l'effet bathochrome observé sur la lutéoline 7,3',4'-trisulfate est de 35 nm.

Chez les flavonols, l'effet bathochrome observé après addition d'HCl n'est significatif que si il y a sulfatation en position 3. Ainsi lorsque l'hydroxyle en 3 est sulfaté, l'effet bathochrome observé dans le cas de flavonols 3-sulfate et 3,7-disulfate est de 15 à 20 nm, de 25 à 30 nm pour les dérivés 3,3'-disulfate et 3,7,3'-trisulfate et de 30 à 40 nm pour les dérivés 3,4'-

disulfate et 3,7,4'-trisulfate. Ces effets sont cumulatifs puisque les dérivés 3,3',4'-trisulfate ont un effet bathochrome de la bande I de 48 à 43 nm.

Cependant, la quercétine-3,7,3'-trisulfate et son isomère 3,7,4'-trisulfate montrent les mêmes effets bathochromes après ajout d'HCl. Ainsi pour déterminer avec certitude la position des groupements sulfate, il a fallu utiliser le clivage enzymatique utilisant l'aryl-sulfatase qui est capable d'hydrolyser spécifiquement la liaison 3'-sulfate ou 4'-sulfate laissant la liaison 3-sulfate intacte ce qui est impossible avec HCl.

Ainsi il y a possibilité de distinguer la position 3' ou 4' de la liaison sulfate car le cleavage du sulfate en 4' induit un effet bathochrome de la bande I de 17 à 22 nm comparé à celui induit par le cleavage en 3' qui est de 7 à 10 nm.

Réactif	Effet bathochrome de la bande I en nm		Interprétation
	Flavones	Flavanols	
HCl	+ 8		3'-sulfate
HCl	+ 15 à 25		4'-sulfate
HCl	+ 35		3',4'-disulfate
HCl		+ 15 à 20	3-sulfate
HCl		+ 25	3,3'-disulfate
HCl		+ 30 à 40	3,4'-disulfate
HCl		+ 48 à 43	3,3',4'-trisulfate
Aryl-sulfatase		0 15 à 20 avec HCl	3-sulfate
Aryl-sulfatase		0 > 25 avec HCl	4'-Ome-3,3'-disulfate
Aryl-sulfatase		+ 7 à 10	4'-OH-3,3'-disulfate
Aryl-sulfatase		+ 17 à 22	3,4'-disulfate (avec ou sans OH libre en 3')
Aryl-sulfatase		+30 à 35	3,3',4'-trisulfate

Tableau 8 : Interprétation des spectres UV des flavones et flavanols sulfatés

3.2.4 Spectrométrie Infra-Rouge

Les spectres IR des flavonoïdes sulfatés présentent deux bandes larges vers 1200 cm^{-1} (S=O) et 1040 cm^{-1} (C-S-O) [Barron,1988].

3.2.5 Spectrométrie de masse

Parmi toutes les techniques d'ionisation possible, la technique d'Impact Electronique (E.I.) n'est pas utilisée car les fragments significatifs ne sont pas observés. On préfère par contre utiliser la technique FAB (Fast Atom Bombardment) en mode positif ou négatif. Les matrices utilisées pour des flavones ou flavanols monosulfatés sont en général le glycérol ou le thioglycérol et le glycérol-H₂O dans le cas de composés polysulfatés [Barron,1988].

Le mode d'ionisation le plus utilisé est le FAB en mode négatif. Avec cette technique, les dérivés monosulfatés présentent deux pics majeurs $[M-H]^-$ et $[M-SO_3]^-$; lorsqu'il y a des contre ions (ci) comme le Na⁺ ou le K⁺, les pics $[M+Na-H]^-$ et $[M+K-H]^-$ sont aussi observés.

Les pics observés pour les dérivés disulfatés sont : $[M-SO_3+H]^-$ et $[M-2 SO_3+H]^-$. De même les dérivés trisulfatés donnent les pics : $[M+2ci]^-$, $[M-SO_3+2ci]^-$ et $[M-SO_3+H+ci]^-$.

Les différentes fragmentations obtenues par cette technique sont résumées dans le tableau 9 [Barron,1988].

Fragments (chargé -)	Sulfatation des dérivés flavonoïdes		
	Mono-	Di-	Tri-
M+2ci			+
M+ci-H	+		
M+ci		+	
M	+		
M-SO ₃ +2ci			+
M-SO ₃ +H+ci			+
M-SO ₃ +H		+	
M-SO ₃	+		
M-2SO ₃ +H		+	

Tableau 9 : Fragments observés dans les spectres FAB mode négatifs des flavonoïdes mono-, di- ou trisulfatés

3.3 CONCLUSION

Après l'analyse des caractéristiques des spectres RMN ¹H, nous constatons qu'il est difficile d'établir une corrélation entre la position des groupements sulfates et les déplacements chimiques.

Par contre la RMN ¹³C reste la méthode de choix pour positionner les groupements sulfates :

Les spectres RMN ¹³C permettent grâce aux déplacements chimiques de déterminer avec certitude la position des groupements sulfates. Le problème de cette expérience est la quantité de produit nécessaire relativement importante qui peut être difficile à obtenir lors de l'étude phytochimique de plantes.

Il existe deux techniques qui nécessitent de plus faibles quantités de produits : la spectroscopie UV et la spectrométrie de masse. Mais ces techniques ne donnent pas ou peu d'informations sur la position des groupements sulfates : la présence d'un groupement sulfate en position 7 n'est pas détectée par la spectrométrie UV, et la spectrométrie de masse ne donne des informations que sur le nombre de groupements sulfates.

4 BIOGÉNÈSE

Dans le monde vivant, la plus grande partie des flavonoïdes sulfatés proviennent des végétaux, et l'étude du genre *Flaveria* montre que la biogénèse de ces composés résulte de l'action de quatre sulfotransférases.

Une première partie de ce chapitre traite donc de la biogénèse des flavonoïdes sulfatés chez les plantes : on verra les organes où a lieu leur synthèse puis le fonctionnement des sulfotransférases.

La deuxième partie traite de la biosynthèse des flavonoïdes sulfatés chez d'autres organismes car on a relevé deux cas où les flavonoïdes sont sulfatés par des micro-organismes : les bactéries de la flore intestinale et *Streptomyces fulvissimus*.

4.1 SULFATATION DES FLAVONOÏDES CHEZ LES PLANTES.

La quantité de flavonoïdes sulfatés n'est pas la même selon l'organe de la plante : on les trouve en quantité importante dans les bourgeons terminaux ainsi que dans la première paire de feuilles.

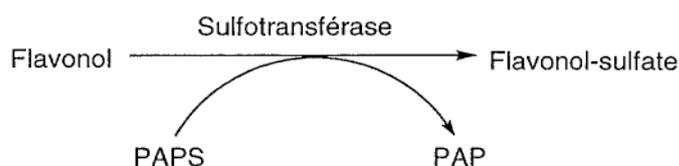
Leur concentration diminue dans les feuilles matures et ils sont quasiment absents dans les racines.

Les études sur la biosynthèse utilisant du [³H] cinnamate et du [³⁵S] sulfate ont montré que l'incorporation du groupement sulfate est la dernière étape de leur biosynthèse [Barron,1988].

Cette réaction est possible grâce aux flavonols sulfotransférases dont la mise en évidence a été faite en utilisant, comme donneur de sulfate le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS).

Le substrat utilisé est la quercétine et un extrait de cellules de *Flaveria bidentis* a servi de source d'enzymes.

Cette expérience a abouti à la formation de dérivés mono- à tétrasulfatés de la quercétine par la réaction suivante :



4.1.1 Les flavonols sulfotransférases

Trois sulfotransférases ont été isolées de *Flaveria chloraefolia* : les flavonol 3, 3' et 4'-sulfotransférases, et une quatrième de *Flaveria bidentis* : la flavonol 7- sulfotransférase [Varin,1992].

La flavonol 3-sulfotransférase (F 3-ST) possède un site accepteur spécifique pour la position 3 de nombreux flavonols. Cette enzyme catalyse la première étape de la sulfatation des flavonoïdes polysulfatés.

Les flavonols 3-sulfate peuvent être le substrat de la flavonol 3'-sulfotransférase (F 3'-ST) ou flavonol 4'-sulfotransférase (F 4'-ST). On obtient alors des dérivés disulfatés en position 3 et 3' ou en 3 et 4'.

La quatrième est la flavonol 7-sulfotransférase (F 7-ST) qui a une affinité pour la position 7 des flavonols 3,3' et 3,4'-disulfate. Elle catalyse la synthèse des dérivés 3,7,3' ou 3,7,4'-trisulfate.

Ces enzymes présentent un même poids moléculaire. Elles ne montrent aucune exigence pour des cations divalents et ne sont pas inhibées par des réactifs qui possèdent des groupements SH.

Leurs pI et leurs différents Km sont représentés dans le tableau 10 [Varin,1992].

Propriétés	F 3-ST	F 3'-ST	F 4'-ST	F 7-ST
Km Flavonoïdes (µM)	0.2	0.29	0.36	0.24
Km PAPS (µM)	0.2	0.35	0.38	0.33
pH optimum	6.0 ;8.5	7.5	7.5	7.5
pI apparent	5.4	6.0	5.1	6.5
Poids moléculaire (D)	35 000	35 000	35 000	35 000

Tableau 10 : Caractéristiques des flavonols sulfotrasférases.

4.1.2 Etude de la Flavonol 3-sulfotransférase

L'étude de la Flavonol 3-sulfotransférase montre que son activité dépend fortement du substrat.

Elle possède un site spécifique pour la position 3 de plusieurs flavonoïdes. Son affinité est importante pour la rhamnétine puis elle diminue avec l'isorhamnétine, la quercétine, la patulétine et le kaempférol.

La présence d'un hydroxyle en position 6, 8 ou 5', de même que l'absence d'hydroxyle sur le cycle A ou B empêche toute réaction de sulfatation par cette enzyme.

Sa très grande affinité pour le sulfate et les flavonols indique que les substrats sont présents à de très faibles concentrations au niveau du site de synthèse. Lorsqu'elle dépasse 2 µM la réaction est fortement inhibée.

L'analyse cinétique montre qu'il s'agit d'une réaction d'ordre Bi Bi où le PAPS et le substrat sont tous les deux liés à l'enzyme.

Le donneur de sulfate est fixé en premier sur l'enzyme, et à la fin de la réaction, le PAP est libéré.

Les flavonols 3-sulfates ainsi formés exercent un rétrocontrôle important l'enzyme (figure 6).

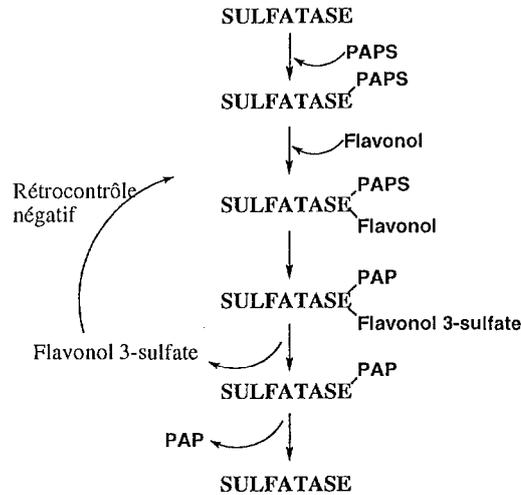


Figure 6 : Etapes de la sulfatation par la F 3-ST

Suite à un clivage de cette enzyme par la trypsine, deux peptides ont été étudiés et leur séquençage a montré qu'aucune similitude n'existait entre leur séquence et celle obtenue à partir de sulfotransférases de mammifères.

Aussi, les anticorps anti phénol-sulfotransférases de foie humain ne reconnaissent pas la F 3-ST. Par contre, on a trouvé des réactions croisées d'anticorps anti F 3-ST avec la F 3'-ST et F 4'-ST de la même plante, ce qui évoque des similitudes entre ces trois enzymes.

4.1.3 Biosynthèse des flavonoïdes sulfatés chez le genre *Flaveria*.

Les deux premières étapes de la sulfatation des flavonols sont identiques dans les deux espèces (figure 7) puis la sulfatation se poursuit chez *F. bidentis* grâce à la Flavonol 7-sulfotransférase pour donner les dérivés 3,7,3' et 3,7,4' trisulfatés [Varin,1992].

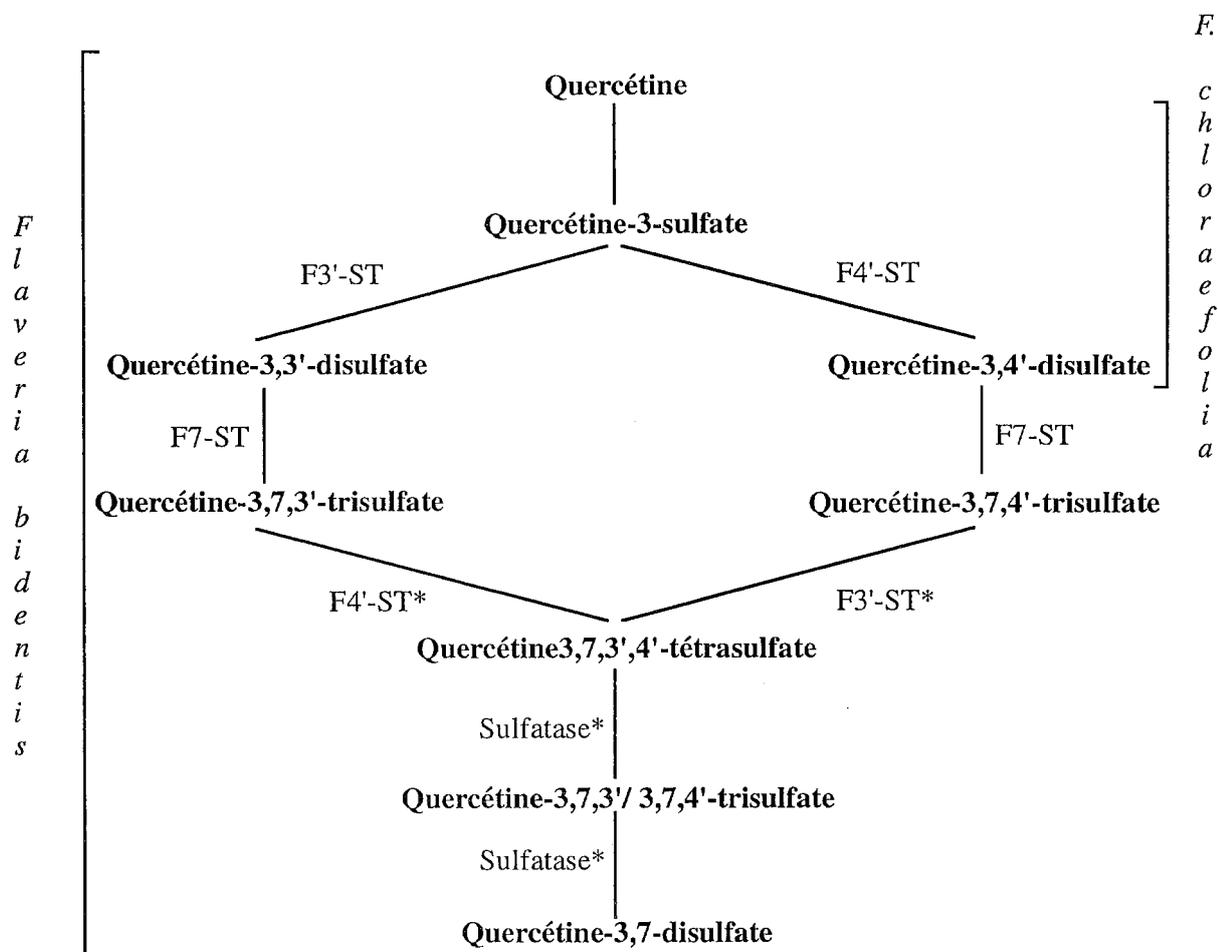


Figure 7 : Biosynthèse des flavonoïdes sulfatés chez *Flaveria*

La présence du dérivé 3,7,3',4'-tétrasulfaté chez *Flaveria bidentis* implique la présence d'une ou de deux sulfotransférases présentant un site de reconnaissance du cycle B sulfaté en 3' ou 4' (* dans la figure 7).

De la même manière, la présence de la quercétine 3,7-disulfate présente à raison de 70% alors que la F 7-ST n'agit que sur les dérivés 3,3' et 3,4'-disulfate mais pas directement sur les 3-sulfatés, laisse penser qu'il existe des flavonoïdes arylsulfatases spécifiques chez *Flaveria bidentis* (* dans la figure 7).

4.2 SULFATATION PAR LES MICRO-ORGANISMES

On a relevé deux cas où les flavonoïdes sont sulfatés par des micro-organismes : les arylsulfotransférases de la flore intestinale et *Streptomyces fulvissimus*.

4.2.1 Flore intestinale

L'enzyme responsable de la sulfatation des flavonoïdes par la flore intestinale catalyse le transfert d'un groupement sulfate à partir d'un phénol sulfaté (et non à partir du PAPS) à un autre phénol qui possède des spécificités strictes. Cette enzyme bactérienne est plusieurs milliers de fois plus active que les enzymes d'origine animale ou végétale [Koizumi, 1990].

Cette enzyme est capable de sulfater des polyphénols comme les chalcones, les xanthones et les flavones, mais cette activité varie en fonction de la position des groupements hydroxyles. La sulfatation de la quercétine en utilisant comme donneur de sulfate du PNS en excès, aboutit à la formation des dérivés 3,3'-disulfate et 3,7,3'-trisulfate. Lorsque le PNS est en concentration équimolaire ou en faible excès (le double), on obtient que le dérivé 3,3'-disulfate.

Au niveau du tractus digestif, cette sulfatation des flavonoïdes les rend hydrosolubles, et sont donc moins absorbés par l'organisme.

On peut à ce sujet s'interroger sur l'origine de l'activité de certains flavonoïdes : doivent-ils ou non leur activité à la sulfatation ?

4.2.2 *Streptomyces fulvissimus*

Lorsqu'on a mis en culture ce micro-organisme en présence de 5-hydroxyflavone, après 48 heures, on retrouve deux métabolites : le 5,4'-dihydroxyflavone et le 5,3',4'-trihydroxyflavone. Lorsqu'on prolonge l'incubation, on observe une diminution du taux du 5,4'-dihydroxyflavone et la formation du 5-hydroxyflavone 4'-sulfate [Ibrahim, 1989].

5 SYNTHÈSE

5.1 ACIDE SULFAMIQUE

Cette méthode permet de sulfater les hydroxyles du cycle B des flavonoïdes. Lorsque les hydroxyles 3' et 4' sont libres, la sulfatation se fait préférentiellement en 3' et si cette position est méthylée, la réaction a lieu sur les hydroxyles libres selon l'ordre suivant : 4'>7>3 ou 5 [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

Cette technique utilise l'acide sulfamique à chaud dans la pyridine (figure 8). On pensait au départ que cette réaction passait par l'intermédiaire pyridinium sulfamate et que l'introduction du groupement sulfate ne se faisait que sur une seule position. Mais il s'est avéré que l'on obtenait un mélange complexe de dérivés mono- et disulfatés difficiles à séparer.

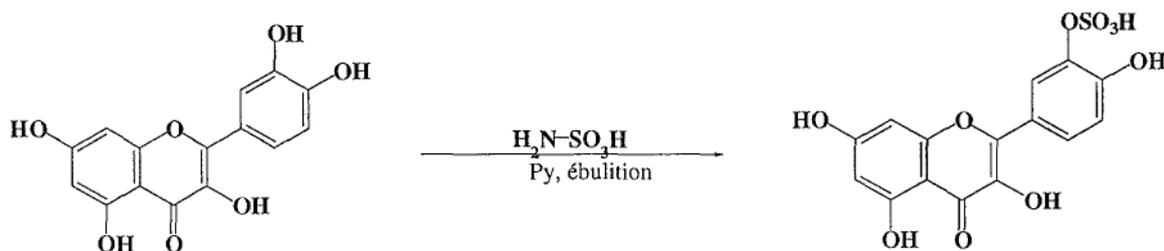


Figure 8 : Sulfatation par l'acide sulfamique

Cette méthode à tout de même été largement utilisée et a permis la synthèse de nombreux flavonols (tableau 12).

5.2 CONDENSATION ALDOLIQUE

Cette méthode suit le schéma classique de la synthèse des flavonoïdes qui consiste en une condensation aldolique entre une acétophénone et un aldéhyde, suivie d'une oxydation.

La condensation aldolique a lieu en milieu basique à 60°C pendant 10 heures. Puisque la liaison sulfate ester résiste à l'hydrolyse alcaline il est possible d'utiliser comme substrat une acétophénone préalablement sulfatée par la technique de l'acide sulfamique pour obtenir un flavonoïde sulfaté en position 7 (figure 9) [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

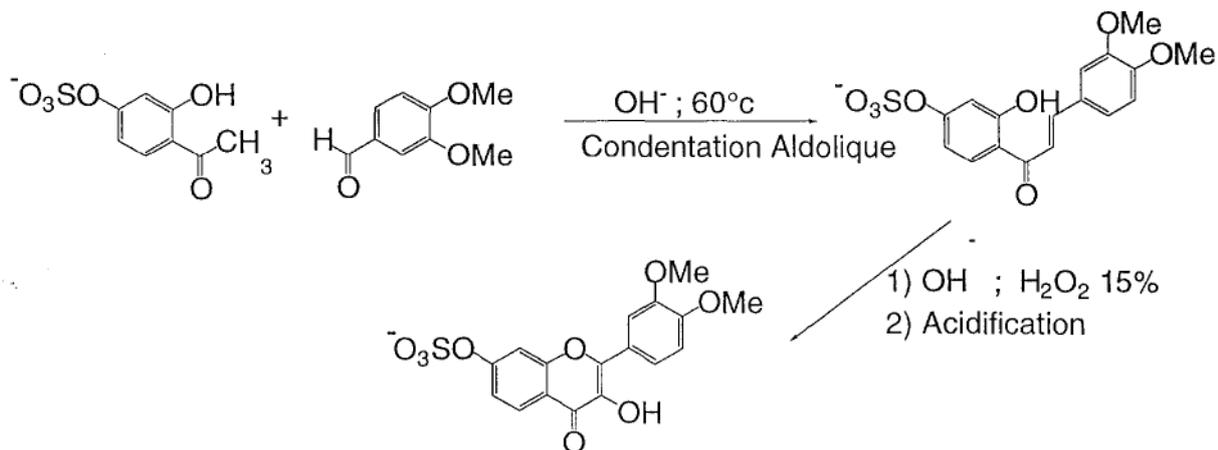


Figure 9 : Obtention de flavonoïdes sulfatés en 7

De même il est possible d'obtenir un dérivé sulfaté en position 4' et 7 en utilisant l'aldéhyde sulfaté en 4 comme substrat (figure 10).

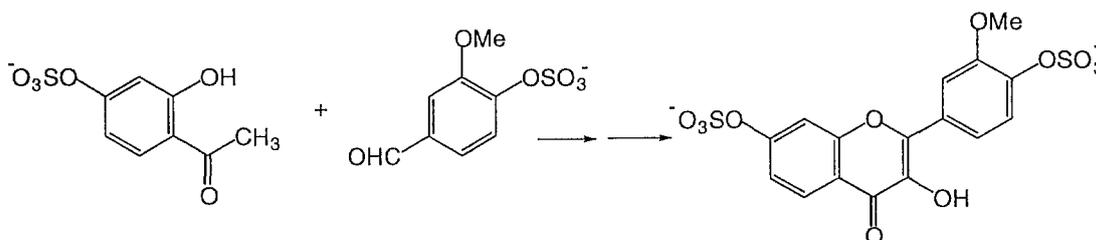


Figure 10: Obtention d'un dérivé sulfaté en position 4'

5.3 POLYSULFATATION.

La polysulfatation des flavonoïdes permet d'introduire un groupement sulfate sur tous les hydroxyles libres des flavonoïdes.

Les flavonoïdes polysulfatés sont en général le substrat d'une réaction de désulfatation enzymatique qui permet d'obtenir des dérivés de flavonoïdes sulfatés en position 3 [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

5.3.1 Première étape

Cette étape utilise le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) qui réagit avec du tétrabutylammonium hydrogènesulfate (TBAHS) pour donner le complexe *o*-sulfonylisourée (figure 11). Ce complexe réagit ensuite avec les hydroxyles du squelette flavonoïde pour donner le complexe sulfate ester dicyclourée. Enfin, l'utilisation d'acétate de potassium dans du méthanol permet d'obtenir le flavonoïde polysulfaté sous forme de sel de potassium (figure 12).

L'utilisation de TBAHS plutôt que l'acide sulfurique s'explique par le fait que l'acide sulfurique réagit plus vite que le flavonoïde avec le complexe *o*-sulfonylisourée empêchant donc l'esterification de la génine.

La sulfatation se produit sur les hydroxyles phénoliques les plus acides, et l'ordre de réactivité est donc 7>4'>3.

Les produits obtenus sont les dérivés 7-mono, 7,4'-di et 7,4',3-trisulfate en fonction du nombre d'équivalents de DCC et TBAHS utilisés. Ils sont facilement séparés des impuretés par simple chromatographie sur colonne sephadex.

On remarque cependant que la sulfatation peut se faire sur la position 3' lorsqu'il y a une fonction méthoxylée en 4', ce qui est impossible si l'hydroxyle en 4' est sulfaté.

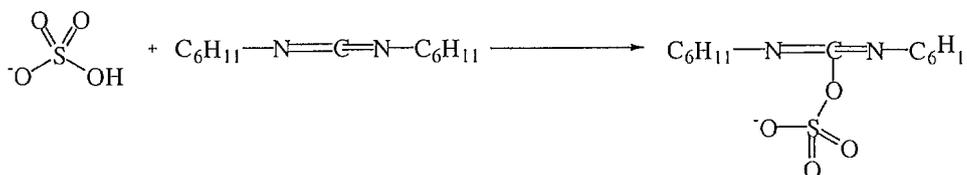


Figure 11 : Obtention du complexe O-sulfonylisourée

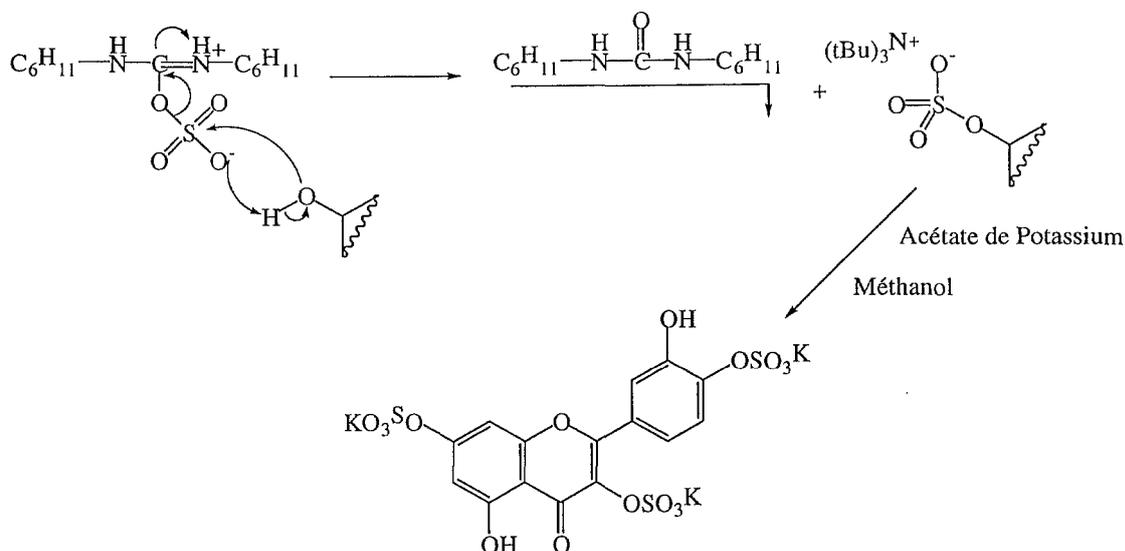


Figure 12 : Obtention de Flavonols polysulfatés par la méthode DCC + TBAHS

5.3.2 Deuxième étape

Cette méthode est utilisée lorsque l'on veut obtenir un dérivé *o*-disulfaté en position 3' et 4'. Elle utilise le complexe trioxyde sulfure de triméthylamine qui libère *in situ* le sulfure trioxyde en présence de carbonate de calcium et réagit avec l'hydroxyle 3' (figure 13) [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

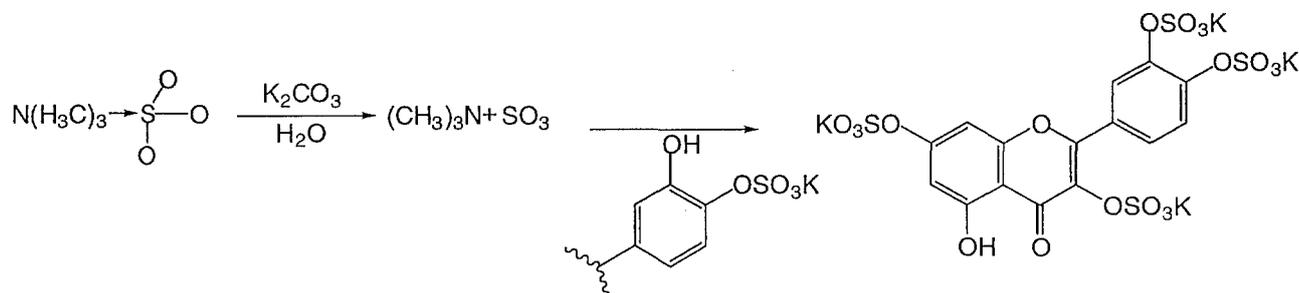


Figure 13: Sulfatation de la position 3'.

5.3.3 Obtention de dérivés sulfatés en 3.

La sulfatation de l'hydroxyle en position 3 résulte de trois techniques et se fait en trois étapes : les deux premières étapes permettent d'obtenir des dérivés polysulfatés par les méthodes de synthèses chimiques vues précédemment et la troisième étape est une réaction enzymatique utilisant une aryl-sulfatase qui réalise une désulfatation contrôlée des composés polysulfatés [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

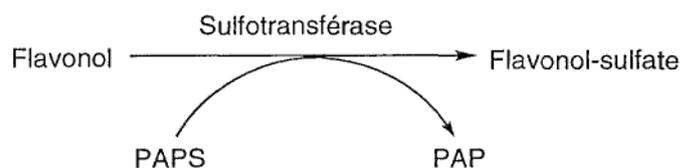
La liaison sulfate ester en position 3 résiste à l'hydrolyse catalysée par l'aryl-sulfatase. Les liaisons sulfate ester les plus sensibles à cette enzyme sont 7/4' >>> 3'. Ainsi, en utilisant les flavonols polysulfatés obtenus par les méthodes chimiques, et en partant du principe que le nombre de groupements sulfates hydrolysés est proportionnel à la quantité d'enzyme utilisée, on peut obtenir différents flavonols sulfatés en position 3.

La listes des flavonoïdes sulfatés synthétisés par ces différentes méthodes est résumée dans le tableau 12

5.4 SYNTHÈSE ENZYMATIQUE

Comme on l'a vu dans le chapitre précédent, la possibilité d'obtenir l'aryl sulfatase hautement purifiée permet l'hydrolyse contrôlée des liaisons sulfates esters des flavonoïdes permettant entre autre de synthétiser des flavonols sulfatés en position 3. Cette méthode permet la désulfatation des flavonoïdes polysulfatés qui se fait en fonction de la sensibilité de la liaison à l'aryl sulfatase ($7/4' > 3' >> 3$) et de la quantité d'enzyme utilisée [Barron, 1987b, 1988c, 1988d].

De la même manière, l'utilisation des trois sulfotransférases isolées de *Flaveria bidentis* (3,3',4'sulfotransférase) et de la 7 sulfotransférase isolée de *F. chloraefolia* a permis d'obtenir *in vitro* les dérivés sulfatés présents dans ces deux plantes. (Cf chapitre biogénèse).(A)



Outre la quercétine, les 3, 3', 4' sulfotransférases acceptent d'autres flavonols comme substrat (tableau 11). Cela qui permet de synthétiser de nombreux dérivés sulfatés de flavonols.

Substrat	Activité relative (%)		
	3-Sulfotransférase	3'-sulfotransférase	4'-sulfotransférase
Rhamnétine	100		
Isorhamnétine	94		
Quercétine	58		
Patulétine	52		
Kaempférol	48		
Ombuine	37		
Tamarixétine	31		
Quercétine-3-sulfate		100	100
Patulétine-3-sulfate		58	Toki, 1994
Tamarixétine-3-sulfate		33	0
Kaempférol-3-sulfate		0	Harborne, 1976c
Isorhamnétine-3-sulfate		0	38

Tableau 11 : Activité relative des sulfotransférases en fonction du substrat.

Composés	Méthode
Apigénine	
7-sulfate	DCC ; SA
Lutéoline	
7-sulfate	DCC ; SA
3'-sulfate	DCC + ST + AS; SA
4'-sulfate	DCC + AS ; SA
7,3'-disulfate	SA
Diosmétine	
7-sulfate	SA
7,3'-disulfate	SA
Kaempférol	
3-sulfate	DCC + AS ; SA
7-sulfate	DCC
3,7,4'-trisulfate	DCC
Quercétine	
3-sulfate	DCC + AS ; SA
7-sulfate	DCC
3,7-disulfate	DCC + AS
3,4'-disulfate	DCC + AS
3,3'-disulfate	DCC + ST + AS
3,7,4'-trisulfate	DCC
3,7,3',4'-tetrasulfate	DCC + ST
Rhamnétine	
3-sulfate	DCC + AS
Isorhamnétine	
3-sulfate	DCC + AS
Tamarixétine	
3-sulfate	DCC + AS
Eupalitine	
3-sulfate	DCC + AS
Veronicafoline	
3-sulfate	DCC + AS

Tableau 12 : Liste des flavonoïdes sulfatés synthétisés avec les techniques utilisées. (AS : aryl sulfatase ; DCC : dicyclohexylcarbodiimide et tetrabutylammonium hydrogène sulfate ; SA acide sulfamique ; ST : complexe sulfure trioxide-triméthylamine).

6 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Outre leurs propriétés antioxydantes, les flavonoïdes sulfatés ont une activité inhibitrice de certaines enzymes qui leur donne un rôle dans la prévention des complications du diabète ou dans la prévention du cancer du sein. On leur prête aussi une activité inhibitrice des réactions d'hypersensibilités.

Ce chapitre montre l'intérêt de la sulfatation dans toutes ces propriétés.

6.1 COMPLICATION DU DIABETE.

C'est grâce à leur propriété inhibitrice de l'aldose réductase que les flavonoïdes sulfatés jouent un rôle dans la prévention de la cataracte, une des complication du diabète [Haraguchi, 1996].

6.1.1 L'aldose réductase.

Cette enzyme catalyse la réaction de réduction de nombreux aldoses en alcool correspondant (figure 15).

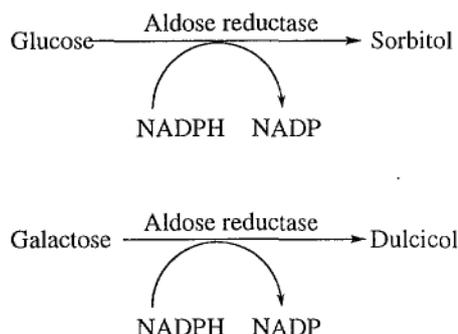


Figure 15 : Réactions catalysées par l'aldose réductase

Les alcools ainsi obtenus sont ensuite oxydés en cétones par les polyols déshydrogénases (figure 16).

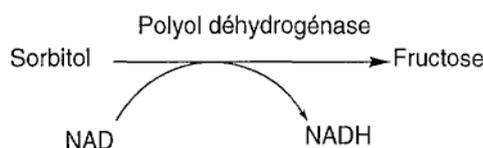


Figure 16 : Oxydation du sorbitol par la polyol deshydrogénase.

Ces deux réactions entrent dans des voies métaboliques normales des sucres.

L'aldose réductase est présente dans de nombreux tissus comme le cristallin, la rétine, le foie, les reins, les nerfs, les globules rouges etc...

6.1.2 Le cristallin du diabétique.

L'opacification du cristallin (la cataracte) est l'une des complications majeures provoquées par le diabète et le rôle de l'aldose réductase semble être important. En effet, chez le rat rendu diabétique, la concentration en sorbitol dans le cristallin est élevée (50 $\mu\text{mol/g}$ de tissu frais).

Par ailleurs, un régime riche en galactose provoque une élévation de la concentration de dulcicol au niveau du cristallin (80 $\mu\text{mol/g}$ de tissu frais).

Or ces sucres diffusent mal à travers la membrane cellulaire ce qui provoque une importante entrée d'eau par le phénomène d'osmose, responsable de la cataracte.

C'est ce même phénomène qui est responsable de certaines rétinopathies et neuropathies périphériques associées au diabète humain.

L'aldose réductase est donc une cible thérapeutique dans la lutte contre les complications du diabète car son inhibition diminuerait la concentration des sucres responsables de l'entrée d'eau dans la cellule.

6.1.3 Inhibition de l'aldose réductase par les flavonoïdes sulfatés.

Dans la recherche des molécules inhibant l'aldose réductase, il s'est avéré que, parmi les flavonoïdes testés, les plus actifs soient les dérivés sulfatés.

Ainsi des flavonoïdes obtenus par synthèse (quercétine-3-acétyl-7,3',4'-trisulfate ; quercétine-3,5-diacétyl-7,3',4'-trisulfate ; 5,7,3'-triacétyl-3,4'-disulfate et la quercétine-3,7,3',4'-tétrasulfate) montrent une activité inhibitrice importante à une concentration 10^{-8} M alors que la quercitrine (quercétine glycosylée) non sulfatée n'a pas d'activité(66).

A la concentration 10^{-9} M les dérivés les plus actifs sont les plus acylés, et la sulfatation semble n'être nécessaire que pour solubiliser ces produits.

D'autres flavonoïdes isolés de *Polygonum hydropiper* ont fait l'objet d'une étude d'inhibition de l'aldose réductase. Les résultats sont résumés dans le tableau 13.

Composés	IC ₅₀ (μM)
Quercétine	50,1
Quercétine-3-sulfate	50,9
Isorhamnétine	>95,0
Isorhamnétine-3-sulfate	69,0
Isorhamnétine-3,7-disulfate	1,8
Rhamnazine	>91,0
Rhamnazine-3-sulfate	30,1
Isoquercitrine	16,0
Tamarixétine-3-glucoside-7-sulfate	5,0

Tableau 13 : Inhibition de l'aldose réductase par les flavonoïdes

Ce tableau montre que l'introduction d'un groupement sulfate sur une génine augmente son activité de façon non négligeable. Ainsi l'activité de la rhamnazine-3-sulfate (IC₅₀ =30,1 μM) est trois fois plus importante que celle de la génine correspondante (IC₅₀ >91,0 μM).

On remarque aussi que les composés les plus actifs sont l'isorhamnétine-3,7-disulfate (IC₅₀ =1,8 μM) et la tamarixétine-3-glucoside-7-sulfate (IC₅₀ =5,0 μM). La sulfatation de l'hydroxyle en 7 semble donc être un facteur important dans l'inhibition de l'aldose réductase.

6.2 INHIBITION DES RÉACTIONS D'HYPERSENSIBILITÉ.

La baïcaline est un dérivé glycosylé de la baïcaleine isolée de la racine de *Scutellaria baicalensis* utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise lors des crises d'asthme ou allergiques. Il semble que c'est cette flavone qui soit responsable de ces activités.

Des chercheurs ont étudié l'activité sur l'hypersensibilité de deux dérivés solubles de la baïcaléine : les sels de sodium de la baïcaléine-6-sulfate (BSS) et la baïcaléine-6-phosphate (BPS) [Nagai, 1975].

6.2.1 Activité sur l'hypersensibilité de type I. (13)

L'hypersensibilité de type I ou hypersensibilité immédiate se produit lorsqu'un allergène est reconnu par une IgE et active un mastocyte qui provoque la crise allergique en se dégranulant et libérant ainsi de l'histamine.

Lorsque l'allergène pénètre dans les bronches, l'hypersensibilité peut se manifester par une crise d'asthme avec diminution du volume d'air inhalé. Au niveau cutané la mise en évidence de l'hypersensibilité immédiate se fait par la technique PCA (Passive cutaneous anaphylaxis).

L'étude a montré que BPS et BSS inhibent l'anaphylaxie cutanée passive hétérologue avec un pourcentage d'inhibition pour ces deux substances qui est de 69,0 et 27,4% respectivement.

Au niveau respiratoire, le test de Schultz-Dale montre que la contraction de la musculature de la trachée est inhibée de 75,6% par BPS et de 51,89% par BSS. Leur effet sur l'asthme s'effectue en diminuant la chute de la fréquence et de l'amplitude de la respiration et la chute de la pression sanguine est elle aussi inhibée par ces deux dérivés.

6.2.2 Activité sur l'hypersensibilité de type II.

L'hypersensibilité de type II est liée à la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes de membranes cellulaires avec activation du complément.

Il existe deux tests qui permettent de déterminer l'activité inhibitrice de l'hypersensibilité de type II : L'étude de l'inhibition de l'anaphylaxie cutanée inversée (RCA) pour laquelle l'inhibition due à BPS est de 29,3% et de 22,2% pour BSS. L'étude de l'inhibition de la réaction de « FORSSMAN CUTANEOUS VASCULITIS » où la diminution de l'hématome est de 25 à 30%.

Pour le test de RCA, lorsque les dérivés sulfatés sont administrés *per os*, l'inhibition maximale est atteinte au bout de 6 heures puis elle diminue pour devenir inférieure à celle de la géline. Une administration intra-péritonéale est, par contre, suivie d'une activité immédiate qui diminue très rapidement.

6.2.3 Activité sur l'hypersensibilité de type III.

L'hypersensibilité de type III est le résultat du dépôt du complexe immun (Ac-Ag) sur les parois des vaisseaux et dans les tissus provoquant la destruction de ceux-ci par la libération par les phagocytes de dérivés actifs de l'oxygène.

Cette hypersensibilité est mise en évidence par la réaction d'Arthus qui est une réaction cutanée qui se présente sous forme d'une zone rouge et gonflée après injection intradermique de l'antigène. Or BPS et BSS ne diminuent pas la taille de cette zone montrant ainsi leur inactivité sur ce type d'hypersensibilité.

6.2.4 Conclusion.

Les résultats de cette étude ont montré que BPS et BSS inhibent l'hypersensibilité de type I et II, mais qu'il n'en a aucun effet sur l'hypersensibilité de type III responsable de la polyarthrite rhumatoïde, du lupus érythémateux disséminé, etc...

Selon les auteurs, l'activité inhibitrice plus importante de BPS par rapport à BSS s'explique par le fait que BPS libère plus vite la génine au niveau des tissus. Ceci montre que le rôle de la sulfatation est d'augmenter la solubilité de la baicaléine mais n'a pas de rôle dans l'activité inhibitrice. Cependant, ces dérivés sulfatés présentent le désavantage d'être plus rapidement éliminés ce qui diminue leur durée d'action.

6.3 PRÉVENTION DU CANCER DU SEIN.

Dans ce chapitre, les flavonoïdes sulfatés cités n'ont pas été isolés du règne végétal. Ce sont les génines qui sont absorbées puis sulfatées lors de leur métabolisation pour devenir actives.

Dans le cancer du sein, l'inhibition de la stérol sulfatase qui active la DHEA (deshydroépiandrostérone) en la désulfatant semble être une voie dans la prévention du cancer du sein [Wong, 1997].

Des chercheurs ont ainsi étudié l'action de deux dérivés sulfatés de la daidzéine (la daidzéine-4'-sulfate et la daidzéine-7,4'-disulfate) sur la stérol sulfatase.

Les résultats de cette étude montrent que la daidzéine n'inhibe pas la stérol sulfatase alors que ses dérivés sulfatés ont une activité inhibitrice importante, avec une IC_{50} qui est pour le dérivé monosulfaté de 6 μM et de 1,5 μM pour le dérivé disulfaté. L'étude cinétique de cette inhibition montre qu'il s'agit d'une inhibition par compétition avec le substrat (DHEA-sulfate).

Les dérivés sulfoconjugués de la daidzéine inhibent aussi l'hydroxystéroïde sulfotransférase et la phénol sulfotransférase.

6.4 ACTIVITÉ ANTIOXYDATIVE

Deux méthodes mesurant l'activité antioxydative et piègeur de radicaux libres ont été utilisées pour tester trois flavonoïdes sulfatés présent dans les feuilles de *Polygonum hydropiper* (la quercétine 3-sulfate, l'isorhamnétine 3, 7-disulfate et la taurixétine 3-glucoside 7-sulfate) [Yagi, 1994].

Dans ces deux expériences, les flavonoïdes sulfatés ont une activité plus importante que la Quercétine et c'est l'isorhamnétine 3,7-disulfate qui montre la plus grande activité.

Cette propriété montre que les flavonoïdes sulfatés peuvent également jouer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

6.5 CONCLUSION

La sulfatation semble aussi potentialiser l'activité des flavonoïdes dans leur rôle préventif des complications du diabète, du cancer du sein. Il en est de même pour leur activité antioxydante et antiradicalaire.

Ces résultats montrent le double avantage de cette dérivation des flavonoïdes car elle augmente leur activité et la solubilité des flavonoïdes.

Par contre, les dérivés sulfatés sont éliminés plus rapidement et leur activité est donc plus brève que celle des génines correspondantes.

THÈSE SOUTENUE PAR : PHILIPPE BAL

TITRE : Etude bibliographique des flavonoïdes sulfatés : *répartition, structure et propriétés biologiques*

CONCLUSION

Les flavonoïdes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal, mais leurs dérivés sulfatés sont encore peu connus.

Le but de cette recherche bibliographique a été d'établir une mise à jour des travaux réalisés jusqu'ici sur les flavonoïdes sulfatés, tant sur le plan de leur répartition dans le règne végétal, de leur extraction, de la détermination de leur structure, de leur synthèse que de leurs propriétés biologiques.

Ainsi nous avons constaté leur large distribution au sein du règne végétal. Cela indique que leur présence ne peut pas être considérée comme un critère chimiotauxonomique. Il semble, en effet, que leur présence soit plutôt le résultat d'une adaptation du végétal à son environnement (aquatique, salin ...).

Aux 101 flavonoïdes sulfatés isolés avant 1988, date de la dernière revue sur ce domaine, viennent s'ajouter 18 nouveaux dérivés, et un certain nombre de composés connus mais isolés dans d'autres espèces végétales. Parallèlement à ces composés naturels, les techniques de synthèse enzymatique couplées aux méthodes chimiques ont aussi largement contribué à augmenter le nombre des flavonoïdes sulfatés.

L'extraction, la purification et l'identification de ces composés font appel à des techniques relativement classiques. Cependant, dans le cadre de l'analyse structurale, et après une synthèse et une analyse de toutes les données bibliographiques, nous avons tenté d'établir une corrélation entre l'introduction du groupement sulfate et la modification des caractéristiques spectroscopiques de la molécule. Les tableaux regroupant ces informations en annexes pourront être utiles car très faciles d'accès lors de l'analyse structurale de composés "nouveaux".

Ce travail a également montré que les plantes ne sont pas les seuls organismes à synthétiser des flavonoïdes sulfatés : des microorganismes ont aussi cette faculté.

Chez les plantes, leur biosynthèse fait intervenir plusieurs enzymes comme les flavonol sulfotransférases et les aryl sulfatases.

La sulfatation des flavonoïdes, qui leur confère une certaine hydrophilie est souvent liée à une intensification de leurs activités biologiques.

Ainsi il semble que ces composés jouent un rôle dans la prévention de certaines maladies comme les maladies cardiovasculaires grâce à leur activité antioxydante, le cancer du sein ou la cataracte chez les sujets diabétiques.

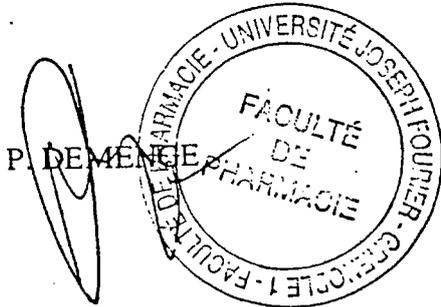
Toutefois, ces composés étant plus solubles, ils sont plus rapidement éliminés, et leur activité est donc plus brève.

La recherche de ce type de composés dans d'autres plantes et la mise en place de techniques de purification plus rapides permettraient d'exploiter les flavonoïdes sulfatés à des fins médicales dans la prévention de ces maladies. Il serait aussi intéressant de rechercher d'autres propriétés biologiques afin d'étendre les applications potentielles de ces composés.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 1.2.2000

LE DOYEN



LE PRESIDENT DE THESE


Dr. M-G. DIJOUX-FRANCA

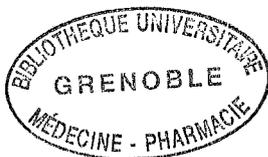
Références bibliographiques

- Averett J.E., Hahn W.J., Berry P.E. and Raven P, Flavonoids and flavonoid evolution in *Fuchsia* (Onagraceae), *Amer. J. Bot.*, (1986), **73**, 1525-1534.
- Abe K.I, Inoue O. and Yumioka E., Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats, *Chem. Pharm. Bull.* (1990), **38**, 208-211.
- Agrawal P.K., Carbo-13 nmr of flavonoids, in *Studies in organic chemistry n°39*, Elsevier Science Publishers, USA, (1989).
- Ahmed A. Ahmed, Melek F.R., and Tom J. Mabry, Sulfated and non-sulfated flavonoids from *Pluchea dioscoridis*, (1987a), **50**, 311
- Ahmed A. Ahmed, Melek F.R., Ahmed A; Seif El-Dinn and Tom J. Mabry, Polysulphated flavonoid from *Iphiona mucronata*, *Rev. Latinoamer Quim.*, (1988) **19**, 107-109.
- Barron D., Colebrook L.D. and Ibrahim R.K., An equimolar mixture of quercetin 3-sulfate from *Flaveria chloraefolia*, *Phytochemistry*, (1986), **25**, 1719-1721.
- Barron D., Ibrahim R.K., 6-methoxyflavonol 3-monosulfates from *Flaveria chloraefolia*, *Phytochemistry*, (1987a), **26**, 2085-2088.
- Barron D. and Ibrahim R.K., Synthesis of flavonoid sulfates : I. Stepwise sulfation of position 3,7, and 4' using N,N-dicyclohexylcarbodiimide and tetrabutylammonium hydrogen sulfate, *Tetrahedron*, (1987b), **43**, 5197-5202.
- Barron D. and Ibrahim R.K., Quercetin and patuletin 3,3'-disulphates from *Flaveria chloraefolia*, *Phytochemistry*, (1987c), **26**, 1181-1184.
- Barron D., Varin L., Ibrahim R.K., Harborne J.B. and Williams C.A., Review, sulphated Flavonoïds-An update, *Phytochemistry*, (1988), **27**, 2375-2395.
- Barron D and Ibrahim R.K., Hydrochloric acid and aryl-sulphatase as reagent for UV-spectral detection of 3- and 4-sulphated flavonoids, *Phytochemistry*, (1988b), **27**, 2335-2338.
- Barron D and Ibrahim R.K., Synthesis of flavonoïd sulfates. III. Synthesis of 3',4'-ortho disulfates using sulfur trioxide-trimethylamine complex, and of 3'-sulfate using aryl sulfatase, *Z. Naturforsch.*, (1988c), **43c**, 631-635.
- Barron D and Ibrahim R.K., Synthesis of flavonoïd sulfates. III. Synthesis of 3',4'-ortho disulfates using sulfur trioxide-trimethylamine complex, and of 3'-sulfate using aryl sulfatase, *Z. Naturforsch.*, (1988d), **43c**, 625-630.
- Cabrera J.L., Juliani H.R. and Gros E.G., Quercetin 3,7,3'-trisulphate from *Flaveria bidentis*, *Phytochemistry*, (1985), **24**, 1394-1395.

- Cabrera J.L., Juliani H.R., Quercetin-3-acetyl-7,3',4'-trisulphate from *Flaveria bidentis*, *Lloydia*, **39**, 253-254.
- Del Pero Martinez M.A., and Martinez A.J., Flavonoid distribution in *Tradescantia*, *Biochemical Systematics and ecology*, (1993), **21**, 255-265.
- El sayed N.H., Norris J.A., Ahmed A.A. and Mabry T.J., Flavonoids of *Brickellia longifolia*, *Phytochemistry*, (1990), **29**, 2364-2365.
- Gudej J., Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althea officinalis*, *Planta medica*, (1991), **57**, 284-285.
- Haraguchi H., Ohmi I., Sakai S., Fukuda A., Toihara Y., Fujimoto T., Okamura N. and Yagi A., Effect of *Polygonum hydropiper* sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes, *Journal of natural product*, (1996), **56**, 443-445.
- Harborne J.B., Williams C.A., A new class of flavone pigments in the Palmae, *Z. Naturforsch*, (1971), **26b**, 490.
- Harborne J.B., Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the *Bixaceae*, *Frankeniaceae* and the related families, *Phytochemistry*, (1975), **14**, 1331-1337.
- Harborne J.B., Williams C.A., Occurrence of sulphated flavones and caffeic acid esters in members of the Fluviales, *Biochemical Systematics and Ecology*, (1976a), **4**, 37-41.
- Harborne J.B., King L., Flavonoid sulphates in the Umbelliferae, *Biochemical Systematics and Ecology*, (1976b), **4**, 111-115.
- Harborne J.B., Williams C.A., Flavonoid patterns in leaves of the Gramineae, *Biochemical Systematics and Ecology*, (1976c), **4**, 267-280.
- Harborne J.B., *in the flavonoid advances in research since 1986*, Chapman and Hall Ltd., London (1994).
- Ibrahim A.R. and Abul-Hajj Y.J., Aromatic hydroxylation and sulfatation of 5-hydroxyflavone by *Streptomyces fulvissimus*, *Applied and Environment Microbiology*, (1989), **55**, 3140-3142.
- Kuntze L.O., Isolation of quercetin 3,7,3',4'-tert-sulphate from *Flaveria bidentis*, *Experientia*, (1972), **28**, 380.
- Imperato F., Kaempferol 3-sulphate in the fern *Adiantum capillus-veneris*, *Phytochemistry*, (1982), **21**, 2158-2159.
- Koizumi M., Shimizu M. and Kobashi K., Enzymatique sulfation of quercetin by arylsulfotransferase from human intestinal bacterium, *Chem. Pharm. Bull.* (1990), **38** (3), 794-796.
- Li C.J., Elgamal M.H., Sharker K.H., Ahmed A.A. Mabry T.J., A new sulfated flavonoid from *Zygophyllum dumosum*, *Natural Product Letters*, (1996), **8**, 281-284.
- Liu, Y.L., Neuman P., Timmermann B.N. and Mabry T.J., Techniques for flavonoid analysis, *Rev. Latinoamer. Quim. Suppl. I.*, (1989), 90-130.
- Mann P., Tofern B. KalogaM. And Eich E., Flavonoid sulfates from the Convolvaceae, *Phytochemistry*, (1999), **50**, 267-271.

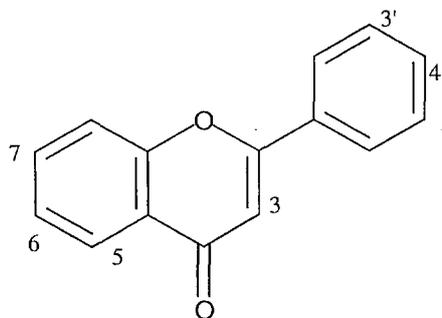
- Meriçli A.H., Flavonolignans, Kaempferol 3-sulphate and other Flavonoids from *Silybum marianum* subsp. *Anatolicum*, *Planta medica* (1988), 44.
- Nagai H., Osuga K. and Koda A., Inhibition of hypersensitivity reaction by soluble derivatives of baicalein, *Japan J. Pharmacol.*, (1975), **25**, 763-772.
- Nawwar M.A.M., Souleman A.M.A., Buddrus J., and Linscheid M., Flavonoids of the flowers of *Tamarix nilotica*, *Phytochemistry*, (1984), **23**, 2347-2349.
- Nonaka G.-I., Muta M. and Nishioka I., Myricatin, a galloyl flavanonol sulfate and prodelfphinidin gallates from *Myrica rubra*, *Phytochemistry*, (1983), **22**, 237-241.
- Oksuz S. and Topcu G., Triterpene fatty acid esters and flavonoids from *Inula britannica*, *Phytochemistry*, (1994), **26**, 3082-3084.
- Op de Beck P., Dijoux M.G., Cartier G. and Mariotte A.M., Quercitrin 3'-sulfate from leaves of *Leea guinnensis*, *Phytochemistry*, (1998), **4**, 1171-1173.
- Seabra R.M. and Correia Alves A., Quercitin 3-glucuronide-3'-sulfate from *Hypericum elodes*, *Phytochemistry*, (1988), **27**, 3019-3020.
- Seabra R.M. and Correia Alves A., Quercitin 3'-sulfate from *Hypericum elodes*, *Phytochemistry*, (1991), **30**, 1344-1345.
- Toki K., Saito N., Ueda T., Chibana T., Shigihara A. and Honda T., Malvidin 3-glucoside-5-glucoside sulphates from *Babiana stricta*, *Phytochemistry*, (1994), **37**, 885-887.
- Tomas Lorente F. and Ferreres F., Nota. Sulfatos de flavonoides en frutos de *Phoenix dactylifera*, *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* (1988), **28**, 581-585.
- Tomas-Barberan F.A., Iniesta-Sanmartin E., Ferreres F., Tomas Lorente F., Trowitzsch-Kienast W and Wray V., *Trans-coniferyl alcohol 4-O-sulphate and flavonoid sulphates from some Tamarix species*, *Phytochemistry*, (1990), **29**, 3050-3051.
- Varin L., Ibrahim R.K., Flavonoid sulfation : Phytochemistry, enzymologie and molecular biology, in Phenolic metabolism in plant, Edited by H.A. Stafford, Plenum Press, New-York, (1992), 233-254.
- Williams C.A., Harborne J.B., Crosby T.S., Tricetin, Diosmetin and luteolin sulphates of *Lachenalia unifolia*, *Phytochemistry*, (1976), **15**, 349-350.
- Williams C.A., Harborne J.B., The leaf flavonoids of the Zingiberales, *Biochemical Systematics and Ecology*, (1977), **5**, 221-229.
- Williams C.A., The leaf flavonoids of the *Orchidaceae*, *Phytochemistry*, (1979), **18**, 803-813.
- Williams C.A., Harborne J.B., and Mayo S.J., Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family *Araceae*, *Phytochemistry*, (1981), **20**, 217-234.
- Williams C.A., Garnock-Jones P.J., Leaf flavonoids and other phenolic glycosides and the taxonomy and phylogeny of *Fuchsia* sect. *Skinnera*, *Phytochemistry*, (1986), **25**, 2547-2549.
- Williams C.A., Harborne J.B., Greenham J., Briggs B.G. and Johnson L.A.S., Flavonoid patterns and the revised classification of Australian Restionaceae, *Phytochemistry*, (1998), **49**, 529-552.
- Wong C-K. and Keung W.M., Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol sulfatase (EC 3.1.6.2), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (1997), **233**, 579-583.

Yagi A., Uemura T., Okamura N., Haraguchi H., Imoto T. and Hashimoto K., Antioxydative sulphated flavonoids in leaves of *Polygonum hydropiper*, *Phytochemistry*, (1994), **35**, 885-887.



ANNEXE 1

Liste des flavones sulfatés et leur source.



Flavone

Composé**Apigenine**5,7,4'-trihydroxyflavone
7-Sulfate7-Sulfatoglucosyl
7-Sulfatogalactosyl
7-Sulfatoglucuronyl4'-Sulfate
7,4'-Disulfate**Hispiduline**Scutellareine 6-Méthoxy
7-Sulfate

4'-Sulfate

7,4'-Disulfate

Luteoline5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone
7-Sulfate

3'-Sulfate

4'-Sulfate

Source

Bixa orellana
Daucus carota
Maranta bicolor
Maranta leuconeura var
kerchoveana
Phoenix canariensis
Tetracera stuhlmanniana
Fuchsia procumbens
Fuchsia colensoi
Fuchsia perscedens
Zostera marina
Bixa orellana
Bixa orellana

Iphoria scabra
Lippia nodiflora
Lippia canescens
Lippia nodiflora
Lippia canescens
Lippia nodiflora
Lippia canescens

Bixa orellana
Zostera marina
Zostera nana
Fuchsia colensoi
Fuchsia excorticata
Fuchsia perscandens
Fuchsia procumbens
Daucus carota
Oenanthe fistulosa
Lachenalia unifolia
Maranta bicolor
Maranta leuconeura var
kerchoveana
Lachenalia unifolia
Bixa orellana
Daucus carota
Bixa orellana

Références

Barron, 1988
 Harborne, 1976b
 Williams, 1977
 Williams, 1977

Barron, 1988
 Barron, 1988
 Barron, 1988
 Williams, 1986
 Williams, 1986
 Harborne, 1976a
 Harborne, 1975
 Harborne, 1975

Barron, 1988
 Harborne, 1994
 Harborne, 1994
 Barron, 1988
 Harborne, 1994
 Barron, 1988
 Harborne, 1994

Barron, 1988
 Harborne, 1976a
 Harborne, 1976a
 Averett, 1986
 Averett, 1986
 Averett, 1986
 Averett, 1986
 Harborne, 1976b
 Harborne, 1976b
 Harborne, 1976c
 Williams, 1977
 Williams, 1977

Barron, 1988
 Harborne, 1975
 Barron, 1988
 Harborne, 1975

7,3'-Disulfate	<i>Zostera marina</i> <i>Bixa orellana</i> <i>Lachenalia unifolia</i> <i>Maranta bicolor</i> <i>Maranta leuconeura</i> var <i>kerchoveana</i> <i>Zanichellia palustris</i>	Barron, 1988 Harborne, 1975 Williams, 1976 Williams, 1977 Williams, 1977 Harborne, 1976a
7,4'-Disulfate	<i>Bixa orellana</i>	Harborne, 1975
7-Sulfatoglucosyl	<i>Phoenix roebelenii</i> <i>Phoenix dactylifera</i>	Barron, 1988 Tomas, 1988
7-Sulfatoglucuronyl	<i>Fuchsia excorticata</i> <i>Fuchsia colensoi</i> <i>Fuchsia procumbens</i>	Barron, 1988 Williams, 1986 Williams, 1986
7-Sulfate-3'-Glucosyl	<i>Mascarena verschafeltii</i>	Barron, 1988
7-Sulfatorutinosyl	<i>Phoenix roebelenii</i>	Barron, 1988
7-Sulfate-3'-rutinosyl	<i>Mascarena verschafeltii</i>	Barron, 1988
7-Disulfatoglucosyl	<i>Phoenix dactylifera</i>	Harborne, 1994
Chrysoeriol		
Luteolin-3'-méthoxy		
7-Sulfate	<i>Zostera marina</i> <i>Zanichellia palustris</i> <i>Thalassia tertudinum</i>	Barron, 1988 Harborne, 1976a
7-Sulfatoglucosyl	<i>Juncus effusus</i> <i>Phoenix dactylifera</i>	Barron, 1988 Tomas, 1988
7-Disulfatoglucosyl	<i>Phoenix dactylifera</i>	Harborne, 1994
Sulfatogalactosyl	<i>Scindapsus pictus</i>	Williams, 1981
Diosmetine		
Luteoline-4'-méthoxy		
7-Sulfate	<i>Zostera marina</i> <i>Lachenalia unifolia</i> <i>Lachenalia unifolia</i>	Barron, 1988 Williams, 1976 Barron, 1988
3'-Sulfate	<i>Lachenalia unifolia</i>	Barron, 1988
7,3'-Disulfate	<i>Lachenalia unifolia</i>	Barron, 1988
6-Hydroxyluteoline		
6-Sulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994
7-Sulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994
6,7-Disulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994
6-Sulfoglycosyl	<i>Tradescantia buckleyi</i>	Del pero, 1993
Nepetine		
6-Méthoxyluteoline		
7-Sulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i> <i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994 Barron, 1988 Harborne, 1994
3',4'-Disulfate		
Nodifloretin		
6-Hydroxyluteolin-3'-Méthoxy		
7-Sulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i> <i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994 Barron, 1988 Harborne, 1994
6,7-Disulfate		
Jacoeosidin		
6-Hydroxyluteolin-6,3-DiMéthoxy		
7-Sulfate	<i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i> <i>Lippia nodiflora</i> <i>Lippia canescens</i>	Barron, 1988 Harborne, 1994 Barron, 1988 Harborne, 1994
7,4'-Disulfate		

Isoscutellarétine8-Hydroxyapigenine
4'-Méthoxy 8-(2''-Sulfatoglucosyl)*Altheaea officinalis*

Harborne, 1994

Hypolaetine8-Hydroxyluteoline
7-Sulfate
7-Sulfate-8-glucosyl
7-Glucuronyl sulfate
7-Glucosyl sulfate
7-Galactosyl sulfate
8-Sulfate
8-Glucosyl-3'-Sulfate*Bixa orellana*
Hypolaena fastigiata
Meeboldina thysanantha
Leptocarpus elegans
Leptocarpus elegans
Bixa orellana
*Malva sylvestris*Harborne, 1975
Williams, 1998
Williams, 1998
Williams, 1998
Williams, 1998
Barron, 1988
Barron, 1988**Hypolaetine-7-Méthoxy**3'-Glucuronyl sulfate
3'-Galactosyl sulfate*Leptocarpus elegans*
*Leptocarpus elegans*Williams, 1998
Williams, 1998**Hypolaetine-4'-Méthoxy**

8-Glucosyl-3'-Sulfate

Althea officinalis

Barron, 1988

Tricetine7-Sulfate
3'-Sulfate
7,3'-Disulfate*Lachenalia unifolia*
Lachenalia unifolia
*Lachenalia unifolia*Williams, 1976
Barron, 1988
Barron, 1988**Tricine**Tricetine-3',5'-DiMéthoxy
7-Sulfatogalactosyl
7-Sulfatoglucuronyl*Cyperus polystachyos*
Cyperus polystachyos
Fuchsia colensoi
Fuchsia excorticata
Fuchsia perscandens
*Fuchsia procumbens*Barron, 1988
Barron, 1988
Williams, 1986
Williams, 1986
Williams, 1986
Williams, 1986**Vitexine**Sulfate

7-Sulfate

7-Sulfatoglucosyl

7-Sulfatorutinosyl*Stromanthe sanguinaea*
Culcasia saxatilis
Washingtonia robusta
Philodendron ornatum
Washingtonia robusta
Stromanthe sanguinaea
Culcasia species
*Washingtonia robusta*Williams, 1977
Williams, 1981
Barron, 1988
Williams, 1981
Barron, 1988
Williams, 1977
Williams, 1981
Barron, 1988**Isovitexine**Sulfate
7-Sulfate

Sulfatoglucosyl*Stromanthe sanguinaea*
Phoenix roebelenii
Philodendron ornatum
*Stromanthe sanguinaea*Williams, 1977
Barron, 1988
Williams, 1981
Williams, 1977**Orientine**7-Sulfate
7-Sulfatoglucosyl*Phoenix roebelenii*
Arecastrum romanzoffianum
*Stromanthe sanguinaea*Barron, 1988
Barron, 1988
Williams, 1977**Iso-orientine**

7-Sulfate

Phoenix roebelenii

Barron, 1988

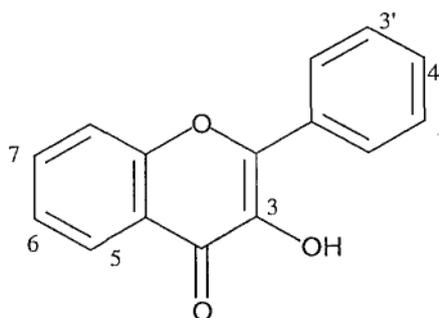
Mangiferine

Sulfate

Polystychya nyanzansis
*Polystychya pachychila*Williams, 1979
Williams, 1979

ANNEXE 2

Liste des Flavonols sulfatés et leur source.



Flavonol

Composé	Plante	Réf
Kaempferol 5,7,4' trihydroxyflavonol 3-Sulfate	<i>Acrotema uniflorum</i> <i>Ipomoea reticulata</i> <i>Andiatum capillus-veneris</i> <i>Silybum marianum subsp. anatolicum</i> <i>Frankenia pulverulenta</i> <i>Reaumuria uniflorum</i> <i>Pluchea dioscoridis</i>	Barron,1988 Mann,1999 Imperato,1982 Merçil,1988 Barron,1988 Barron,1988 Ahmed,1987a
7-Sulfate 3,7-Disulfate	<i>Acrotema uniflorum</i> <i>Cystopteris fragilis</i> <i>Cystopteris fragilis</i> <i>Asplenium filix-foemina</i> <i>Davidsonia pruriens</i> <i>Frankenia pulverulenta</i> <i>Adiantum capillus-veneris</i> <i>Asplenium fontanum</i>	Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988
3,7,4'-Trisulfate 3-β-(3''-Sulfatoglucosyl) 3-β-(6''-Sulfatoglucosyl) 3-α-(6''-Sulfatoglucosyl) 3-Sulfatorhamnosyl 3-Glucuronyl-7-Sulfate 3-Sulfatorutinosyl 3-(6''-Sulfatogentiobiosyl)		
Rhamnocitrine Kaempferol 7-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Ammi visnaga</i> <i>Argyrea mollis</i> <i>Argyrea nervosa</i> <i>Ipomoea reticulata</i>	Barron,1988 Mann,1999 Mann,1999 Mann,1999
Kaempferide Kaempferol 4'-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Tamarix spp.</i>	Harborne,1994
Kaempferol 7,4'-Diméthyl ether 3-Sulfate	<i>Tamarix aphylla</i> <i>Tamarix nilotica</i> <i>Argyrea capitata</i> <i>Ipomoea regnellii</i>	Barron,1988 Nawwar,1984 Mann,1999 Mann,1999
6-Hydroxykaempferol 3-Sulfate	<i>Inula britannica</i>	Oskuz,1987
6-Hydroxykaempferol 3-Méthoxy 7-Sulfate	<i>Neurolaena lobata</i>	Barron,1988

Eupafoline 6-Hydroxykaempferol 6-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron, 1988
Eupalitine 6-Hydroxykaempferol 6,7-DiMéthoxy 3-Sulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron, 1988
6-Hydroxykaempferol 7,4'-DiMéthoxy 3-Sulfate	<i>Brickellia longifolia</i>	Harborne, 1994
6-Methoxykaempferol 3-Sulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron, 1987a
6-Methoxykaempferol 7-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Brickellia longifolia</i>	El-Sayed, 1990
Quercetine 5,7,3',4' trihydroxyflavonol 3-Sulfate	<i>Oenanthe crocata</i> <i>Iphonia scabra</i> <i>Flaveria bibendis</i> <i>Flaveria chloraefolia</i> <i>Frankenia pulverulenta</i> <i>Ammi visnaga</i> <i>Paspalum convexum</i> <i>Scindapsus pictus</i> <i>Inula Britannica</i>	Barron, 1988 Ahmed, 1988 Barron, 1988 Barron, 1986 Harborne, 1975 Harborne, 1976b Harborne, 1976c Williams, 1981 Barron, 1987a
7-Sulfate	<i>Frankenia pulverulenta</i>	Harborne, 1975
3'-Sulfate	<i>Hypericum eleodes</i> <i>Frankenia pulverulenta</i>	Harborne, 1994 Harborne, 1975
3,7-Disulfate	<i>Flaveria bidentis</i> <i>Iphonia scabra</i>	Barron, 1988 Ahmed, 1988
3,3'-Disulfate	<i>Pluchea dioscoridis</i>	Ahmed, 1987a
3,4'-Disulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i> <i>Flaveria bidentis</i> <i>Iphonia scabra</i>	Barron, 1988 Barron, 1988 Harborne, 1994
3,7,3'-Trisulfate	<i>Flaveria bidentis</i>	Barron, 1988
3,7,4'-Trisulfate	<i>Flaveria bidentis</i> <i>Iphonia scabra</i>	Barron, 1988 Ahmed, 1988
3,7,3',4'-Tetrasulfate	<i>Flaveria bidentis</i> <i>Iphonia scabra</i>	Barron, 1988 Ahmed, 1988
3-Sulfatoglucosyl	<i>Phoenix dactylifera</i> <i>Paspalum convexum</i>	Harborne, 1994 Harborne, 1976c
3-Sulfatorhamnosyl	<i>Davidsonia pruriens</i>	Barron, 1988
3-(3''-Sulfatoglucosyl)	<i>Asplenium septentrionale</i>	Barron, 1988
3-Glucuronyl-7-Sulfate	<i>Frankenia pulverulenta</i>	Barron, 1988
3-Glucuronyl-3'-Sulfate	<i>Hypericum eleodes</i>	Harborne, 1994
3-Sulfatorutinosyl	<i>Arescastrum romanzoffianum</i>	Barron, 1988
3-Acetyl-7,3',4'-Trisulfate	<i>Flaveria bidentis</i>	Barron, 1988
Quercitrine 3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-3'-Sulfate	<i>Leea guinensis</i>	Op de beck, 1998
Quercetine-3-Méthoxy 5-Glucosyl-3'-Sulfate	<i>Calorophus elongatus</i>	Williams, 1998

Rhamnetine		
Quercetine-7-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Ammi visnaga</i> <i>Tamarix aphylla</i> <i>Argyreia mollis</i> <i>Argyreia mollis</i>	Barron,1988 Mann,1999 Harborne,1976b
3,3'-Disulfate		
3,5,4'-Trisulfate-3'-Glucuronyl	<i>Tamarix aphylla</i>	Barron,1988
Isorhamnetin		
Quercetin-3'-Méthoxy 3-Sulfate (Persicarin)	<i>Polygonum hydropiper</i> <i>Iphonia scabra</i> <i>Flaveria bibendis</i> <i>Oenanthe stolonifera</i> <i>Lasthenia sp</i> <i>Ammi visnaga</i> <i>Oenanthe crocata</i> <i>Oenanthe pimpinelloides</i> <i>Pluchea dioscoridis</i> <i>Frankenia pulverulenta</i> <i>Flaveria bidentis</i> <i>Pluchea dioscoridis</i> <i>Iphonia scabra</i> <i>Acroterma uniflorum</i> <i>Iphonia scabra</i> <i>Frankenia pulverulenta</i> <i>Arescastrum romanzoffianum</i> <i>Zygophyllum dumosum</i>	Barron,1988 Ahmed,1988 Barron,1988 Harborne,1971 Harborne,1971 Harborne,1976b Harborne,1976b Harborne,1976b Ahmed,1987a Barron,1988 Barron,1988 Ahmed,1987a Barron,1988 Barron,1988 Ahmed,1988 Barron,1988 Barron,1988 Li,1996
7-Sulfate		
3,7-Disulfate		
3,4'-Disulfate		
3,7,4'-Trisulfate		
3-Glucuronyl-7-Sulfate 3-Sulfatorutinosyl		
Tamarixetin		
Quercetin 4'-Méthoxy 3-Sulfate	<i>Tamarix laxa</i>	Barron,1988
Quercetin 3,7-DiMéthoxy 4'-Sulfate	<i>Ipomoea regnellii</i>	Mann,1999
Rhamnazin		
Quercetin 7,3'-DiMéthoxy 3- Sulfate	<i>Polygonum hydropiper</i> <i>Argyreia nervosa</i>	Barron,1988 Mann,1999
OmBuin		
Quercetin 7,4'-DiMéthoxy 3-Sulfate 3,3'-Disulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i> <i>Acroterma uniflorum</i>	Barron,1988 Barron,1988
Quercetin 7,3',4'-TriMéthoxy 3-Sulfate	<i>Ipomoea regnellii</i>	Mann,1999
Quercetagenin 3-Méthoxy 6-Hydroxyquercetin 3-Méthoxy 7-Sulfate	<i>Neurolaena oaxacana</i>	Barron,1988
Patuletin		
Quercetagenin 6-Méthoxy 3-Sulfate 7-Sulfate 3,3'-Disulfate	<i>Brickellia chloraefolia</i> <i>Lasthenia sp</i> <i>Brickellia californica</i> <i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron,1986 Barron,1988 Barron,1988 Harborne,1994
Eupatolitin		
Quercetagenin 6,7-DiMéthoxy 3-Sulfate	<i>Brickellia veronicifolia</i> <i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron,1988 Barron,1987a

Spinacetin Quercetagenin 6,3'-DiMéthoxy 3-Sulfate	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron,1988
Jaceidin Quercetagenin 3,6,3'-TriMéthoxy 4'-Sulfate	<i>Brickellia glutinosa</i>	Barron,1988
Veronicafolin Quercetagenin 3,7,3'-TriMéthoxy 3-Sulfate	<i>Brickellia veronicaefolia</i>	Barron,1988
Eupatin Quercetagenine 6,7,4'-TriMéthoxy 3-Sulfate	<i>Brickellia californica</i> <i>Brickellia longifolia</i> <i>Flaveria chloraefolia</i>	Barron,1988 El-Sayed,1990 Barron,1987a
Quercetagenin 6,3',4'-TriMéthoxy 3-Sulfate	<i>Decachaeta haenkeana</i>	Barron,1988
Gossypetin 8-Hydroxyquercitin 3-Sulfate 8-Glucuronyl-3-Sulfate 8-Glucosyl-3-Sulfate	<i>Malva sylvestris</i> <i>Malva sylvestris</i> <i>Malva sylvestris</i>	Barron,1988 Barron,1988 Barron,1988
Myricetin 3-Sulfatorhamnosyl	<i>Davidsonia pruriens</i>	Barron,1988
Dihydromyrcetin 3-Gallate-3'-Sulfate	<i>Myrica rubra</i>	Barron,1988

ANNEXE 3

Liste des monocotylédones présentant des flavonoïdes sulfatés.

familles	Genres et espèces	Références
Araceae	<i>Anthurium hookeri</i> , <i>Gonatropus boivinii</i> , <i>Scindapsus</i> sp., <i>Anchomanes difformis</i> , <i>Philodendron ornatum</i> ,	Barron, 1988
Commelinaceae	<i>Culcasia saxatilis</i> <i>Tradescantia hirta</i> <i>T. buckleyi</i>	Williams, 1981 Barron, 1988 Del pero, 1993
Cyperaceae	<i>Cyperus polystachyos</i> , <i>C. bulbosus</i> , <i>C. enervis</i> , <i>C. laevigatus</i> , <i>C. sanguinolentus</i> , <i>C. flavescens</i> , <i>C. subulatus</i> , <i>C. flavus</i> , <i>C. brevifolius</i> , <i>Schenus ericetorum</i> , <i>S. fluitans</i> , <i>S. pleiostemoneus</i> , <i>S. scabripes</i> , <i>Isolepis habra</i> , <i>I. hookeriana</i> , <i>I. inundata</i> , <i>I. prolifera</i> , <i>Eleocharis equisetina</i> , <i>E. pusilla</i> , <i>Fimbristylis ferruginea</i> , <i>Scleria mackaviensis</i> , <i>Carex longibrachiata</i>	Barron, 1988
Alismataceae	<i>Damasonium stellatum</i> , <i>Sagittaria falcata</i>	Barron, 1988
Hydrocharitaceae	<i>Halophila engelmannii</i> , <i>Thalassia terdinum</i> , <i>Halophila baillonis</i> , <i>H. ovalis</i> , <i>H. stipulacea</i> , <i>Thalassia hemprichii</i> , <i>Enhalus acoroides</i>	Barron, 1988
Zannichelliaceae	<i>Zannichellia palustris</i>	Barron, 1988
Zosteraceae	<i>Zostera angustifolia</i> , <i>Z. marina</i> , <i>Z. nana</i> , <i>Z. americana</i> , <i>Z. asiatica</i> , <i>Z. capensis</i> , <i>Z. capricorni</i> , <i>Z. caulescens</i> , <i>Z. japonica</i> , <i>Z. muellerii</i> , <i>Z. noltii</i> , <i>Z. novazelandica</i> <i>Phyllospadix iwatensis</i> , <i>P. japonicus</i> , <i>P. scouleri</i> , <i>P. serrulatus</i> , <i>P. torreyi</i>	Barron, 1988
Graminaceae	<i>Ichnanthus pallens</i> , <i>Panicum maximum</i> , <i>P. convexum</i> , <i>P. humboldtianum</i> , <i>Bothriochloa bladhii</i> , <i>B. caucasica</i> , <i>B. edwardsiana</i> , <i>B. insculpta</i> , <i>B. ischaemum</i> , <i>B. radicans</i> , <i>Cymbopogon procerus</i> , <i>Dimeria ballardii</i> , <i>Erianthus maximus</i> , <i>Saccharum barberi</i> , <i>S. eduli</i> , <i>S. officinarum</i> , <i>S. robustum</i> , <i>S. sinense</i> , <i>S. spontaneum</i> , <i>Tripsacum dactyloides</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Chloris roxburghiana</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>C. lenfuensis</i> , <i>Spartina townsendii</i> , <i>Eragrostis horizontalis</i> , <i>Cortaderia bifida</i> , <i>C. pilosa</i> , <i>C. richardii</i> , <i>C. selleana</i> , <i>Gynerium sagittatum</i> , <i>Chionochloa conspicua</i> , <i>C. rigida</i> , <i>Notodanthonia racemosa</i> , <i>Stipagrostis garubensis</i> , <i>Microlaena stipoides</i> <i>Paspalum convexum</i>	Barron, 1988
Iridaceae	<i>Iris sanguinea</i> , <i>Calydorea speciosa</i> , <i>Cipura paludosa</i> , <i>Cypella lauthalii</i> , <i>Eleutherine bulbosa</i> , <i>Gelasine azurea</i> , <i>Tigridia pavonia</i> , <i>Trimenzia steyermarkii</i> , <i>Pillansia temlemannii</i> , <i>Crocus tommasianus</i> , <i>Melasmaerula graminea</i> , <i>Synnotia villosa</i>	Barron, 1988
Juncaceae	<i>Juncus maritimus</i> , <i>J. acutus</i> , <i>J. jacquini</i> , <i>J. balticus</i> , <i>J. inflexus</i> , <i>J. effusus</i> , <i>J. conglomeratus</i> , <i>J. squarrosus</i> , <i>J. gerardi</i> , <i>J. acutiflorus</i> , <i>J. articulatus</i> , <i>Marrsippospermum grandiflora</i> , <i>Rostkovia magellanica</i> , <i>Prionium serratum</i>	Barron, 1988
Liliaceae	<i>Bellevalia flexuosa</i> , <i>Lachenalia uniflora</i> , <i>L. aloides</i> , <i>Ipheion uniflorum</i>	Barron, 1988
Marantaceae	<i>Maranta bicolor</i> , <i>M. leuconeura</i> var. <i>kerchoviana</i> , <i>Stromanthe sanguinea</i>	Barron, 1988
Orchidaceae	<i>Gymnadenia campsea</i> , <i>Restrepia elegans</i> , <i>Polystachya nyanzansis</i> <i>P. pachychila</i>	Barron, 1988 Williams, 1979
Restionaceae	<i>Hypolaena fastigata</i> , <i>Elegia parviflora</i> <i>Leptocarpus elegans</i> , <i>Calorophus elongatus</i>	Barron, 1988 Williams, 1998
Palmae	<i>Areca alicae</i> , <i>Aracastrium romanzofflorum</i> , <i>A. romanzofflorum</i> var. <i>australe</i> , <i>Bactris guinensis</i> , <i>Butia bonnetii</i> , <i>B. capitata</i> , <i>B. capitata</i> var. <i>pulposa</i> , <i>B. eriospatha</i> , <i>B. yustay</i> , <i>Calamus polystachys</i> , <i>Clinostigma samiense</i> , <i>Coccolrinax rhussiana</i> , <i>Copernicia maconglosa</i> , <i>Cyrtostachys</i> sp., <i>Daemonorops jenkinsiana</i> , <i>Gaussia attenuata</i> , <i>Giglonia insignis</i> , <i>Iguanura geononaeformis</i> , <i>Jubaea chilensis</i> , <i>Kothalsia echinanetra</i> , <i>Licuala muelleri</i> , <i>Linospadix monostachya</i> , <i>Livistona altissima</i> , <i>L. chinensis</i> , <i>L. marinae</i> , <i>Mascarena lagenicaulis</i> , <i>M. revaughanii</i> , <i>M. verschaaffeltii</i> , <i>Mauritia flexuosa</i> , <i>Microcoelum weddellianum</i> , <i>Nanorhops ritichiana</i> , <i>Neodypsis decryi</i> , <i>Nypa fruticans</i> , <i>Opsiantra maya</i> , <i>Phoenix cananiensis</i> , <i>P. dactylifera</i> , <i>P. fannifera</i> , <i>P. loureiri</i> , <i>P. pusilla</i> , <i>P. reclinata</i> , <i>P. roebelini</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. tonentosa</i> , <i>Pritchardia affinis</i> , <i>P. martii</i> , <i>Ptychosperma macarthurii</i> , <i>P. propinquum</i> , <i>Rhapis excelsa</i> , <i>R. flabelliformis</i> , <i>Rhopalostylis baueri</i> , <i>Sabal beccariana</i> , <i>S. causerum</i> , <i>Thrinax parviflora</i> , <i>Trithrinax acanthocoma</i> , <i>Veitchia mervillii</i> , <i>Washingtonia filifera</i> , <i>W. robusta</i>	Barron, 1988

ANNEXE 4

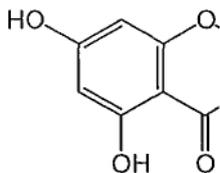
Liste des dicotylédones présentant des flavonoïdes sulfatés.

Famille	Genre et espèce	Référence
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>	Barron,1988
Chenopodiaceae	<i>Atriplex</i> (3), <i>chenopodium</i> (2), <i>Halochemum strobilaceum</i> , <i>Petrosimonia oppositifolia</i> , <i>Suaeda</i>	Barron,1988
Cistaceae	<i>Helianthemum squamatum</i>	Barron,1988
Compositae	<i>Brickelia glutinosa</i> , <i>B. californica</i> , <i>B. veronicaefolia</i> , <i>B. lacinata</i> , <i>B. baccharidea</i> , <i>B. chlorolepis</i> , <i>B. longifolia</i> ; <i>Callilepis laureola</i> , <i>Epaltis gariepina</i> , <i>Decachaeta haenkeana</i> , <i>Flaveria chloraefolia</i> , <i>F. bidentis</i> <i>Helichrysum angustifolium</i> , <i>Inula erithmoides</i> , <i>Inula britanica</i> , <i>Lastenia</i> (2), <i>Sphaeranthus incisus</i> , <i>Iphonia scabra</i> , <i>Neurolaena</i> (3), <i>Senecio</i> (5)	Barron,1988
Convulvolaceae	<i>Ipomoeae reticulata</i> , <i>I. regnellii</i> , <i>Argyrea mollis</i> , <i>A. nervosa</i> , <i>Ipomoeae reticulata</i> , <i>I. regnellii</i> , <i>Argyrea mollis</i> , <i>A. nervosa</i> et <i>A. capitata</i> <i>A. capitata</i>	Mann,1999
Davidsoniaceae	<i>Davidsonia pruriens</i>	Barron,1988
Dilleniaceae	<i>Acrotoma</i> (1), <i>Davilla</i> (2), <i>dillenia</i> (3), <i>Schumacheri</i> , <i>Tetracera</i> (14)	Barron,1988
Frankeniaceae	<i>Frankenia corymbosa</i> , <i>F. ericifolia</i> , <i>F. laevis</i> , <i>F.pulverulenta</i> , <i>F. thymifolia</i>	Barron,1988
Guttiferae	<i>Hypericum eradnatum</i> , <i>H. eleodes</i> , <i>H. grandiflorum</i>	Barron,1988
Leeaceae	<i>Leea guinensis</i>	Op de beck,1998
Malvaceae	<i>Althea officinalis</i> , <i>Malva sylvestris</i>	Barron,1988
Myricaceae	<i>Myrica rubra</i>	Barron,1988
Onagraceae	<i>Fuchsia excorticata</i> , <i>F. procumbens</i> , <i>F. perscandens</i> , <i>F. colensoi</i>	Barron,1988 Averett,1986
Polygonaceae	<i>Poluygonum hydropiper var. vulgare</i> , <i>P. perfoliatum</i> , <i>P.thunbergii</i>	Barron,1988
Rosaceae	<i>Acaena</i> (5), , <i>Dendriopterium menendezii</i> , <i>Potentilla</i> (3), <i>Sanguisorba minor</i> , <i>S. officinalis</i>	Barron,1988
Tamaricaceae	<i>Tamarix africana</i> , <i>T. aphylla</i> , <i>T. cananensis</i> , <i>T. pentandra</i> , <i>T. laxa</i> , <i>T. smyrnensis</i> , <i>Myricaria germanica</i> , <i>Reaumuria mucronata</i>	Barron,1988
UmBelliferae	<i>Ammi visnaga</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Oneanthe</i> (6)	Barron,1988
VerBenaceae	<i>Lppia nodiflora</i> , <i>L. canescens</i>	Barron,1988
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum domusum</i>	Li,1996
PlumBaginaceae	<i>Armeria maritima</i> , <i>Limonium</i> (10), <i>Plumbago europaeae</i>	Barron,1988
Entre parenthèse : nombre d'espèces présentant des flavonoïdes sulfatés dans le genre.		

ANNEXE 5
Spectre RMN ^1H de flavonoïdes sulfatés

- Apigénine
 1. 7-sulfate
 2. 7,4'-disulfate
 Lutéoline
 3. 7-sulfate
 4. 7,4'-disulfate

ref.	1	2	3	4
N°	Barron, 1987b 400 MHz; DMSO-d ₆	Barron, 1987b 400 MHz; DMSO-d ₆	Barron, 1987b 400 MHz; DMSO-d ₆	Barron, 1987b 400 MHz; DMSO-d ₆
3	6,70, s	9,90, s	6,42, s	6,80, s
6	6,55, d(2,0)	6,60, d(2,1)	6,48, d(2,1)	6,56, d(2,0)
8	6,96, d(2,0)	7,02, d(2,1)	6,87, d(2,1)	7,00, d(2,0)
2'	7,84, d(8,8)	8,02, d(8,9)	7,14, d(2,5)	7,59, d(1,8)
6,87 , d(8, 8)	7,35, d(8,9) 5' 6,87, d(8,8) 7,35, d(8,9) 6,35, d(8,5) ca 7,44-7,48, m 6' 7,84, d(8,8) 8,02, d(8,9) 7,34, dd(2,5/8,5) ca 7,44- 7,48, m			



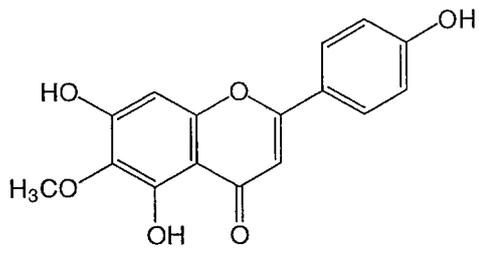
Apigénine Lutéoline

1. Hispiduline 3. Iso
 scutellarétine4'-
 méthylether8-O-β-
 glucosyl-2''-
 sulfate 2. Hispiduli
 ne-7-sulfate

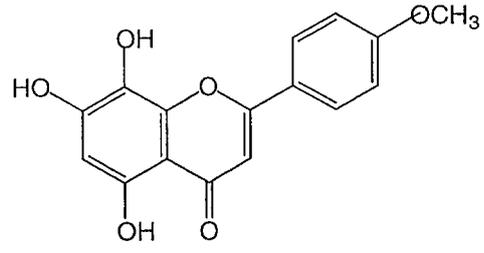
ref.	1	2	3
N°	200	Ahmed, 1987b 90 MHz CCl ₄	Gudej, 1991 CD ₃ OD
3	6,04	6,5, s	
6			
8	6,26	6,6, s	6,72, s
2'	7,46, d(9,0)	7,7, d(9,0)	6,32, s
3'	6,58, d(9,0)	6,69, d(9,0)	8,24, dd(9,0/2,1)
5'	6,58, d(9,0)	6,69, d(9,0)	8,24, dd(9,0/2,1)
6'	7,46, d(9,0)	7,7, d(9,0)	
4-OMe			3,93, s
6-OMe		3,7, s	
1''			5,07, d(7,7)
2''			4,55, dd(8,7/7,7)

3", 4", 5", 6"

3,79-3,62, m



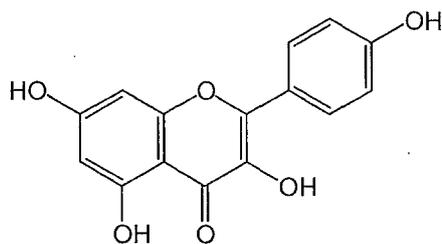
Hispiduline



Isoscutellarétine

- Kaempférol
- | | | | |
|----|-------------------|----|-------------------------------|
| 1. | 3-Sulfate | 5. | 7-méthylether-3-sulfate |
| 2. | 7-sulfate | 6. | 7,4'-diméthylether |
| 3. | 7,4'-disulfate | 7. | 7,4'-diméthylether-3-sulfate |
| 4. | 3,7,4'-trisulfate | 8. | 6-hydroxykaempférol-3-sulfate |

	1	2	3	4
ref	Barron, 1988c	Barron, 1987b	Barron, 1987b	Barron, 1987b
N°	299,9 MHz; DMSO-d ₆	400 MHz; DMSO-d ₆	400 MHz; DMSO-d ₆	400 MHz; DMSO-d ₆
6	6,1	6,55, d(2,0)	6,50, d(2,0)	6,52, d(2,0)
8	6,32	6,98, d(2,0)	6,95, d(2,0)	6,88, d(2,0)
2'; 6'	8,06, d(8,7)	8,08, d(8,9)	8,20, d(8,9)	8,16, d(8,9)
3'; 5'	6,83, d(8,7)	6,93, d(8,9)	7,30, d(8,9)	7,27, d(8,9)
	5	6	7	8
ref	Mann, 1999	Nawwar, 1984	Nawwar, 1984	Oskuz, 1987
N°	400 MHz DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	400 MHz; DMSO-d ₆
6	6,36, d(2,1)	6,34, d(1,5)	6,34, d(1,5)	
8	6,72, d(2,1)	6,74, d(1,5)	6,72, d(1,5)	6,55, s
2'; 6'	8,14, d(8,8)	8,16, d(8,0)	8,20, d(7,0)	7,65, d(8,0)
3'; 5'	6,87, d(8,8)	7,10, d(8,0)	7,04, d(7,0)	7,15, d(8,0)
OMe	3,86	3,84, s ; 3,85	3,84, Barron, 1988r s	



Kaempférol

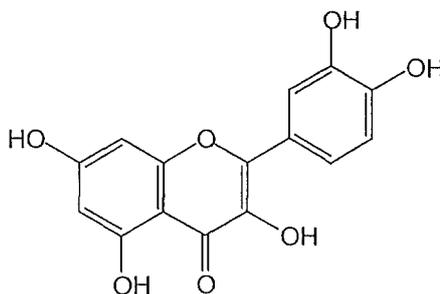
- | | | |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Quercétine | 7. 3,7,4'-trisulfate | 13. 7,3',4'-triméthylether-3-sulfate |
| 2.. 3'-sulfate | 8. 3,7,3',4'-tetrasulfate | 14. 3-acétyl-7,3',4'-trisulfate |
| 3. 3,3'-disulfate | 9. 7,4'-disulfate | 15. 3-méthylether-5-glc-3'-sulfate |
| 4. 3,4'-disulfate | 10. 7-méthylether-3-sulfate | 16. Quercitrine (Q-3-rhamnosyl |
| 5. 7-sulfate | 11. 7-méthylether-3,3'-disulfate | 17. Quercitrine 3'-sulfate |
| 6. 3,7,3'-trisulfate | 12. 3,7-diméthylether-4'-sulfate | |

ref. N°	1	2	3	4	5	6	7
	Op de beck,1998	Seabra,1991	Barron,1987c	Barron,1987c	Barron,1987b	Cabrera,1976	Barron,1987b
	*	*	**	**	***	****	***
6	6,17, d(1,6)	6,14, d(1,8)	6,16, d(2,0)	6,20, d(1,9)	6,5, d(1,9)	6,58, d(2,0)	6,47, d(2,0)
8	6,40, d(1,7)	6,39, d(1,5)	6,38, d(2,0)	6,43, d(1,9)	6,95, d(1,9)	6,92, d(2,0)	6,93, d(2,0)
2'	7,66, d(1,8)	7,99, d(2,4)	7,87, d(2,2)	ca 7,6-7,8,m	7,67, d(1,9)	7,96, d(2,5)	7,90, d(2,0)
5'	6,87, d(8,5)	6,93, d(7,5)	6,87, d(8,6)	7,31, d(9,2)	6,84,d(8,5)	6,90, d(8,5)	7,31, d(8,6)
6'	7,53, dd(8,4)	7,80, dd(2,4/7,6)	8,03, dd(2,2/8,6)	ca 7,6-7,8,m	7,61, dd(8,9/1,9)	8,03, dd(2,0/8,5)	7,70, dd(8,6/2,0)

ref. N°	8	9	10	11	12	13	14
	Kuntze,1972	Barron,1987b	Mann,1999	Mann,1999	Mann,1999	Mann,1999	Mann,1999
	*****	***	***	***	***	***	***
6	6,78, d(2,5)	6,54, d(1,9)	6,35, d(2,1)	6,36, d(2,1)	6,36, d(2,1)	6,36, d(2,1)	6,37, d(1,9)
8	7,13, d(2,5)	6,94, d(1,9)	6,67, d(2,1)	6,73, d(2,0)	6,69, d(2,1)	6,76, d(2,0)	6,77, d(1,9)
2'	7,95, d(2,0)	7,64, d(2,2)	7,67, d(2,0)	7,91, d(1,8)	7,62, d(2,0)	8,09, d(2,0)	8,05, d(2,0)
5'	7,66, d(8,5)	7,33, d(8,4)	6,81, d(8,5)	6,92, d(8,7)	7,02, d(9,0)	6,89, d(8,5)	7,09, d(8,8)
6'	8,16, dd(2,0/8,5)	7,69, dd(8,4/2,2)	7,62, dd(8,5/2,0)	8,12, dd(8,7/1,8)	7,78, dd(9,0/2,0)	7,69, dd(8,5/2,0)	7,80, dd(8,8/2,0)
OMe			3,86, s	3,88,s	3,85, s / 3,87, s	3,85, s / 3,87, s	3,85, s/3,85, s/3,87, s

ref. N°	15	16	17
	Cabrera,1976	Op de beck,1998	Op de beck,1998
	*****	*	*
6	6,58, d(2,0)	6,20, d(2,0)	6,20, d(2,1)
8	6,80, m	6,38, d(2,0)	6,39, d(2,0)
2'	7,90, m(2,0)	7,29, d(1,9)	7,76, d(2,0)
5'	6,80, m	6,86, d(8,3)	6,96, d(8,1)
6'	8,05, q(2,0)	7,52, dd(8,4/2,2)	7,52, dd(8,5/2,3)
OMe	2,50, s		
1"		5,24, d(1,1)	5,2, Barron,1988r, s
2"		3,96, Barron,1988r, s	3,98, Barron,1988r, s
3"		3,50, dd(8,6/3,1)	3,55, m
4"		3,21-3,29 nd	3,1 nd
5"		3,08-3,21 nd	3,0-3,3 nd
6"		0,81, d(5,5)	0,8, d(5,7)

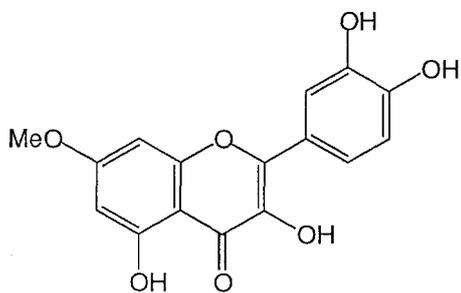
Conditions : * 200 MHz; DMSO-d₆
 ** 80 MHz; DMSO-d₆
 *** 400 MHz; DMSO-d₆
 **** 100 MHz; DMSO-d₆
 *****60 MHz; D₂O
 *****60 MHz; DMSO-d₆



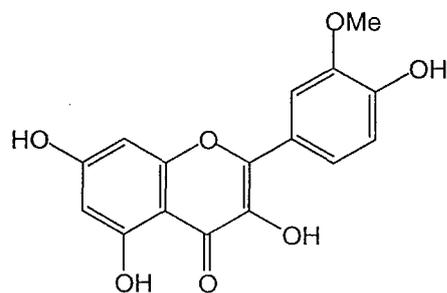
Quercétine

1. Rhamnétine 3,4'-disulfate
 2. Isorhamnétine 3,7-disulfate
 3. 3,4'-disulfate
 4. 3,7,4'-trisulfate
 5. 3-O-(4''-sulfatylrutinosyl)

	1	2	3	4	5
ref.	Barron,1988c	Cabrera,1977	Ahmed,1987b	Ahmed,1987b	Li,1996
N°	299,9 MHz DMSO-d ₆	60 MHz D ₂ O	90 MHz CCL ₄	90 MHz CCL ₄	500 MHz DMSO-d ₆
6	6,25	6,5, d(2,5)	6,2, d(2,5)	6,2, d(2,5)	6,18, d(8,0)
8	6,56	6,5, d(2,5)	6,5, d(2,5)	6,5, d(2,5)	6,41, d(2,0)
2'	ca7,64-7,69	7,30, d(2,0)	7,4, d(2,5)	7,4, d(2,5)	7,81, d(2,0)
5'	7,30, d(9,1)	6,7, d(10,0)	6,9, d(9,0)	6,9, d(9,0)	6,90, d(8,5)
6'	ca7,64-7,69		7,20, d(2,0)	7,20, d(2,0)	7,52, dd(8,5/2,0)
OMe	3,83, s				
3'-OMe		3,6, s	3,6, s	3,6, s	3,84, s
1''					5,40, d(8,0)
2''					3,28, dd(8,5/8,0)
3''					3,53, t(8,5)
4''					3,73, t(9,5)
5''					3,43, m
6''					3,76, dd(13,0/3,0)
1'''					4,36, d(1,5)
2'''					3,35, m
3'''					3,23-3,17, m
4'''					3,03, t(8,5)
5'''					3,23-3,17, m
6'''					0,97, d(6,0)



Rhamnétine

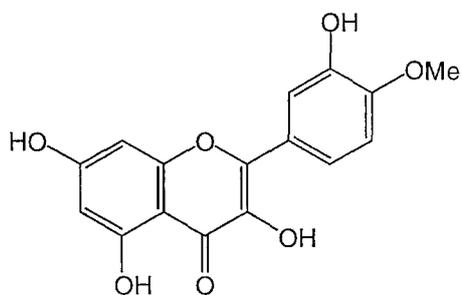


Isorhamnétine

Tamarixétine

1. 3-sulfate
2. 4'-sulfate
3. 3,3'-disulfate
4. 7,7,3'-trisulfate

ref.	1	2	3	4
N°	Barron,1988c 299,9 MHz DMSO-d ₆	Barron,1987b 400 MHz DMSO-d ₆	Barron,1988d 100,1MHz DMSO-d ₆	Barron,1987b 400 MHz DMSO-d ₆
6	5,34 , d(1,9)	6,50, d(2,0)	5,5	6,48, d(1,9)
8	5,45, d(1,9)	6,94, d(2,0)	5,59	6,82, d(1,9)
2'	ca 6,95-6,98, m	7,60, d(2,2)	7,93, d(2,3)	8,06, d(2,3)
5'	6,56, d(8,2)	7,01, d(8,9)	6,99, d(8,8)	7,07, d(8,9)
6'	ca 6,95-6,98, m	7,84, dd(8,9/2,2)	8,02, dd(8,8/2,3)	8,12, dd(8,9/2,3)
OMe	3,78, s	3,85	3,80, s	3,83

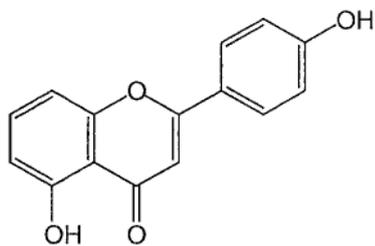


Tamarixétine

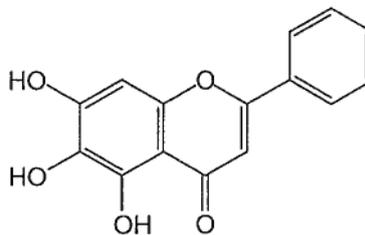
ANNEXE 6
Données RMN ¹³C de flavonoïdes sulfatés

1. 5,4'-Dihydroxyflavone
2. 5,4'-Dihydroxyflavone-4'-sulfate
3. Baicaléine-6-O- β -glucosyl-7-sulfate

ref. N°	1	2	3
	Ibrahim,1989 DMSO-d ₆	Ibrahim,1989 DMSO-d ₆	Abe,1990 DMSO-d ₆
2	164,7	164,2	163,8
3	103,3	104,6	104,8
4	182,9	183,1	182,4
5	159,8	157,2	152,3 ou 151,7 ou 151,8
6	110,8	110,9	129,7
7	135,7	135,8	152,3 ou 151,7 ou 151,8
8	107,4	107,5	98,9
9	155,8	155,9	152,3 ou 151,7 ou 151,8
10	109,9	110,0	106,4
1'	120,9	124,5	130,5
2'	128,8	127,9	126,5
3'	116,0	120,0	129,1
4'	161,5	159,8	132,1
5'	116,0	120,0	129,1
6'	128,8	127,9	126,5
1''			103,5
2''			73,6
3''			76,0
4''			71,5
5''			76,0
6''			171,1



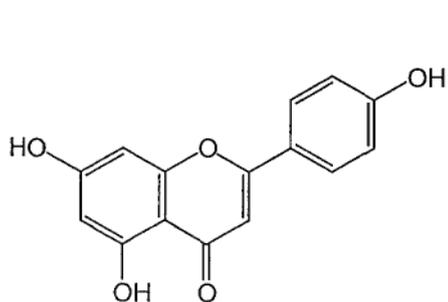
5,4' dihydroxyflavone



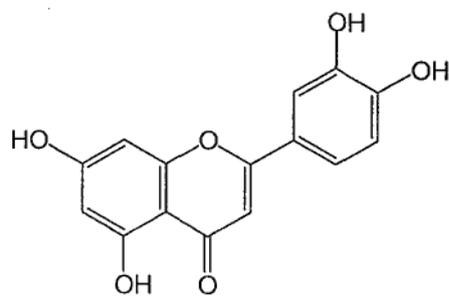
Baicaléine

1. Apigénine-7-sulfate 4. Lutéoline-7-sulfate 7. Isoscutellarétine 4'-méthylether-8-O-β-D-glucosyl-2''-sulfate
 2. 4'-sulfate 5. 7,4'-disulfate
 3. 7,4'-disulfate 6. 7,3',4'-trisulfate

ref.	1 Agrawal, 1989	2 Barron,1988c	3 Agrawal,1989	4 Agrawal,1989	5 Agrawal,1989	6 Barron,1988d	7 Gudej,1991
N°		75,43 MHz DMSO-d ₆				100,1 MHz DMSO-d ₆	CD ₃ OD
2	165,7	162,8	164,6	165,8	164,0	163,7	165,1
3	103,5	102,8	103,2	101,2	102,3	102,7	104,5
4	182,9	181,3	182,8	181,7	181,9	181,8	183,5
5	161,1	161,5	161,3	160,8	160,9	162,5	158,4
6	103,6	99,7	105,1	102,6	104,3	104,4	100,6
7	159,4	167,3	160,0	159,2	159,6	159,6	158,7
8	99,3	94,5	99,0	98,2	97,6	97,4	125,6
9	157,1	157,7	160,0	156,5	156,4	156,6	151,1
10	106,9	104,0	106,8	106,0	105,9	106,2	105,2
1'	121,1	125,1	125,3	120,6	125,8	124,2	124,4
2'	129,4	127,5	129,5	110,9	114,6	118,3	130,6
3'	117,2	102,2	121,1	147,5	149,9	143,8	116,1
4'	162,9	156,8	157,0	151,8	145,0	147,7	163,9
5'	117,2	120,2	121,1	116,1	121,7	120,1	116,1
6'	129,4	127,5	129,5	120,6	117,0	121,5	130,6
4' OMe							57,0
1''							103,6
2''							80,9
3''							77,1
4''							71,3
5''							78,2
6''							62,3



Apigénine



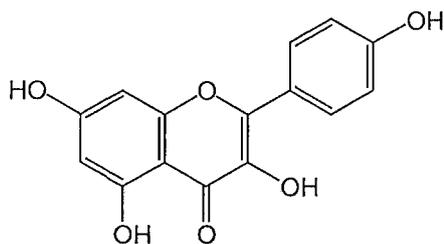
Lutéoline

1. Kaempférol
2. 3-sulfate
3. 7-sulfate

4. 7,4'-disulfate
5. 3,7,4'-trisulfate

6. 7,4'-diméthylether
7. 7,4'-diméthylether-3-sulfate

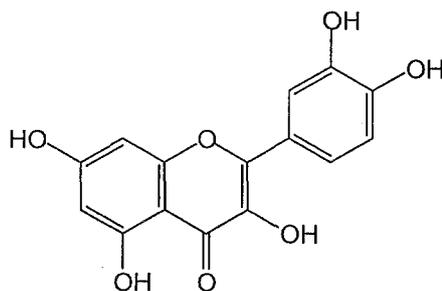
ref. N°	1 Agrawal,1989 DMSO-d ₆	2 Barron,1988c 75,43 MHz DMSO-d ₆	3 Barron,1987b 100 MHz DMSO-d ₆	4 Barron,1987b 100 MHz DMSO-d ₆	5 Barron,1987b 100 MHz DMSO-d ₆	6 Nawwar,1984 DMSO-d ₆	7 Nawwar,1984 DMSO-d ₆
2	146,8	156,4	147,6	146,3	155,6	146,7	156,0
3	135,6	132,2	136,2	-	133,3	136,3	132,8
4	175,9	177,5	176,3	178,2	177,7	176,1	177,9
5	160,7	161,3	159,7	159,9	161,4	160,7	161,2
6	98,2	99,2	101,3	100,9	102,3	97,6	97,6
7	163,9	166,6	159,2	158,7	159,3	165,0	165,0
8	93,5	93,9	97,5	97,5	96,6	92,2	92,2
9	156,2	156,0	155,2	154,2 ou 155,0	155,9 ou 155,6	156,3	156,3
10	103,1	103,3	105,0	105,4	106,7	104,1	105,2
1'	121,7	121,2	121,6	126,6	124,7	123,2	122,7
2'	129,5	130,7	129,6	127,8	129,8	129,5	131,0
3'	115,4	115,2	115,5	119,8	119,2	114,2	113,6
4'	159,2	160,1	159,4	154,2 ou 155,0	155,9 ou 155,6	160,2	161,0
5'	115,4	115,2	115,5	119,8	119,2	114,2	113,6
6'	129,5	130,7	129,6	127,8	129,8	129,5	131,0
OMe						55,9 et 55,3	56,0 et 55,3



Kaempférol

- | | | |
|---------------|-------------------|--------------------|
| 1. Quercétine | 4. 3'-sulfate | 7. 7,4'-disulfate |
| 2. 3-sulfate | 5. 3,3'-disulfate | 8. 3',4'-disulfate |
| 3. 7-sulfate | 6. 3,4'-disulfate | |

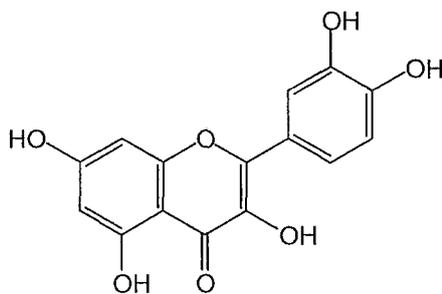
ref.	1	2	3	4	5	6	7	8
N°	Op de beck, 1998 50 MHz DMSO-d ₆	Agrawal, 1989	Agrawal, 1989	Barron, 1987c 100 MHz DMSO-d ₆	Barron, 1987c 100 MHz DMSO-d ₆	Barron, 1987c 100 MHz DMSO-d ₆	Agrawal, 1989	Agrawal, 1989
2	146,7	156,6	148,2	146,1	155,7	155,8	146,2	155,8
3	138,6	132,2	136,9	135,9	132,6	133,1	-	133,1
4	175,8	177,7	176,5	175,9	177,6	177,8	177,8	177,8
5	160,7	161,3	160,0	160,7	161,2	161,2	159,8	161,2
6	98,1	98,4	101,4	98,2	98,6	98,6	100,9	98,6
7	163,6	163,9	159,0	163,9	164,3	164,1	158,9	164,1
8	93,3	93,3	97,7	93,4	93,5	93,5	97,4	93,5
9	156,1	156,1	155,2	156,1	156,1	156,2	155,0	156,2
10	102,9	104,1	105,4	103,1	104,0	104,2	105,4	104,2
1'	121,9	121,6	121,3	122,6	123,1	126,5	127,8	126,5
2'	114,9	115,1	114,9	122,2	121,6	117,3	155,9	117,7
3'	145,0	144,7	145,8	140,8	140,5	148,1	148,7	148,1
4'	147,8	148,3	149,5	151,2	152,0	143,3	142,1	143,3
5'	115,5	115,9	116,1	117,2	116,8	121,6	121,8	121,6
6'	119,9	121,6	120,5	124,9	126,9	120,6	118,2	120,6



Quercétine

1. 3,7,3'-trisulfate 4. -6-méthylether-3-sulfate 7. -4'-méthylether-3,7,3'-trisulfate
 2. 3,7,4'-trisulfate 5. -6-méthylether-3,3'-disulfate 8. Quercitrine
 3. 3,7,3',4'-tétrasulfate 6. -4'-méthylether-3,7-disulfate 9. Quercitrine 3'-sulfate

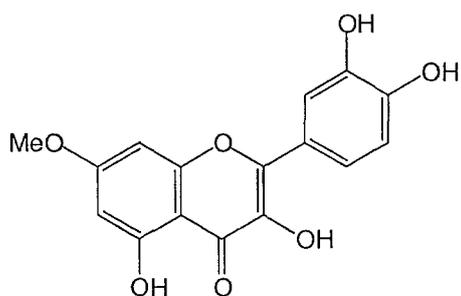
ref.	1 Cabrera,1976	2 Agrawal, 1989	3 Barron,1988d	4 Agrawal, 1989	5 Agrawal, 1989	6 Agrawal, 1989	7 Agrawal, 1989	9 Op de beck,1998	10 Op de beck,1998
N°	25,2 MHz DMSO-d ₆		100,1 MHz DMSO-d ₆					50 MHz DMSO-d ₆	50 MHz DMSO-d ₆
2	154,9	155,6	155,3	156,6	155,7	155,4	155,6	156,4	156,4
3	132,5	133,5	133,3	132,0	132,2	133,1	133,1	134,2	134,5
4	177,6	178,2	178,1	178,0	177,8	178,0	177,7	177,7	177,6
5	159,0 ou 159,9	160,7	160,4	152,5	152,3	160,9	161,5	161,2	161,2
6	102,2	102,3	101,9	131,1	131,4	101,9	102,4	98,6	98,7
7	159,0 ou 159,9	159,6	159,5	157,0	156,2	159,5	159,4	164,1	164,2
8	97,5	97,6	97,4	93,6	93,8	96,9	96,4	93,6	93,6
9	156,6	156,7	156,7	151,3	157,4	156,6	156,2	157,2	156,7
10	106,0	106,7	106,3	104,5	104,1	106,4	106,9	104,0	104,1
1'	123,0	126,3	125,0	121,6	123,1	122,9	122,2	120,7	123,0
2'	120,8	117,3	120,7	115,1	121,6	115,3	121,3	115,4	120,8
3'	140,1	148,4	142,9	144,7	140,5	146,1	141,9	145,1	140,7
4'	152,2	143,6	146,9	148,3	152,0	150,2	153,2	148,4	151,7
5'	116,6	121,6	119,1	115,9	116,8	111,5	112,0	115,8	117,0
6'	126,8	120,9	124,0	121,6	126,9	121,7	126,3	121,0	125,6
6-OMe				60,0	59,8				
4'-OMe						55,6	55,8		
1''								101,8	102,0
2''								70,3	70,1
3''								70,5	70,6
4''								71,1	71,4
5''								70,0	70,1
6''								17,4	17,4



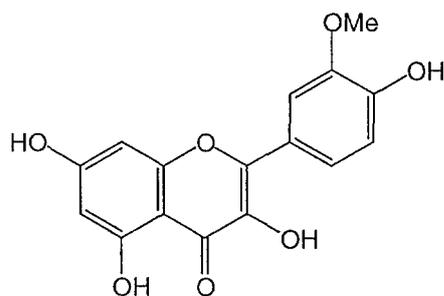
Quercétine

1. Rhamnétine-3,4'-disulfate
2. Isorhamnétine-3O-rutinosyl
3. Isorhamnétine-3O-rutinosyl -4''-sulfate

ref. N°	1	2	3
	Barron, 1988c 75,43 MHz DMSO-d ₆	Li, 1996 500 MHz DMSO-d ₆	Li, 1996 500 MHz DMSO-d ₆
2	155,5	156,4	156,7
3	133,5	133,0	133,1
4	177,6	177,2	177,3
5	163,2	161,3	161,3
6	98,2	99,0	98,8
7	165,0	165,0	164,3
8	90,8	94,0	96,9
9	156,7	165,5	156,6
10	106,1	103,8	104,0
1'	126,6	121,0	121,9
2'	117,5	113,2	113,3
3'	148,6	149,5	149,5
4'	143,3	147,0	146,9
5'	121,5	115,0	115,3
6'	120,4	122,5	122,4
OMe	55,9	56,4	56,1
1''		101,0	100,9
2''		74,4	74,2
3''		76,3	75,4
4''		70,4	75,6
5''		76,1	74,0
6''		67,0	66,9
1'''		101,5	101,0
2'''		70,6	70,3
3'''		70,4	70,6
4'''		71,9	71,8
5'''		68,2	68,4
6'''		18,5	18,5



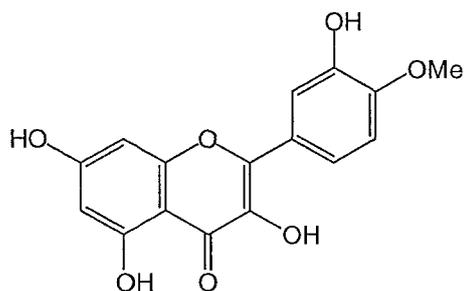
Rhamnétine



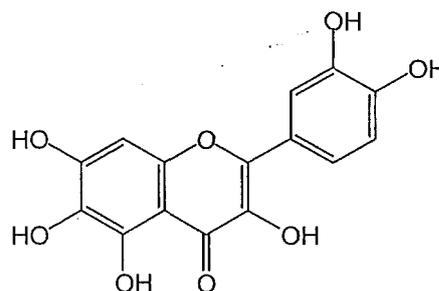
Isorhamnétine

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| 1. Tamarixétine-3-sulfate | 4. 3,7,3'-trisulfate |
| 2. 3,7-disulfate | 5. Patulétine |
| 3. 3,3'-disulfate | 6. 3,3'-disulfate |

ref.	1	2	3	4	5	6
N°	Barron,1988c	Barron,1987b	Barron,1988d	Barron,1987b	Agrawal,1989	Barron,1987c
	75,43 MHz	100 MHz	100,1	100 MHz	20 MHz	100 MHz
	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	MHz DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆
2	154,7	155,4	154,2	155,6	115,7 ou 115,2	155,7
3	131,1	133,1	133,1	133,1	135,5	132,2
4	178,6	178,0	177,6	177,7	176,1	177,8
5	160,7	160,9	160,9	161,5	151,8 ou 151,4	152,3
6	97,8	101,9	99,1	102,4	130,9	131,4
7	164,7	159,5	164,6	159,4	157,2	156,2
8	95,6	96,9	95,9	96,4	93,7	93,8
9	157,7	156,6	157,6	156,2	151,8 ou 151,4	151,4
10	102,6	106,4	102,6	106,9	103,5	104,1
1'	124,8	122,9	123,3	122,2	122,1	123,1
2'	116,8	115,3	121,1	121,3	147,8 ou 147,1	121,6
3'	146,0	146,1	141,6	141,9	145,1	140,5
4'	152,0	150,2	152,4	153,2	147,8 ou 147,1	152,0
5'	110,4	111,5	111,8	112,0	115,7 ou 115,2	116,8
6'	123,5	121,7	125,7	126,3	120,1	126,9
OMe	55,0	55,6	55,7	55,8	60,3	59,8



Tamarixétine



Patulétine

ANNEXE 7
Spectres UV de flavonoïdes sulfatés

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+ H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	+NaOMe	+HCl
Baicaléine-6-O-β-glucosyl-7-sulfate	Abe,1990	275, 306 sh	275, 306 sh		247 sh, 287, 329			
Apigénine								
4'-sulfate	Barron,1988c	265, 315	274, 355	267, 320	280, 327, 375	280, 327, 375	275, 360	
7-sulfate	Barron,1987b	265, 330	265, 340, 390 sh	265, 330	273, 290 sh, 340, 380	273, 290 sh, 340, 380	263, 385	
7,4'-disulfate	Barron,1987b	265, 330	265, 330	265, 300	275, 290 sh, 320, 375	273, 290 sh, 320, 375	265, 300 sh	
Hispiduline-7-sulfate	Ahmed,1987b	280, 330	255 sh, 275, 390	270, 335	280 sh, 300, 355	285 sh, 300, 350	270, 315, 360 sh	280, 330
Isoscutellarétine								
4'-méthylether-8-O-b-D-glucoside-2"-sulfate	Gudej,1991	273, 300, 327	282, 303, 360	273, 305, 330	280, 308, 347, 394	281, 308, 343, 393	282, 303, 360	
Lutéoline								
3'-sulfate	Barron,1988d	267, 330	273, 385	267, 340	272, 300 sh, 337, 375 sh	270, 300 sh, 340, 375 sh		
4'-sulfate	Barron,1988c	267, 325	272, 360	265, 355 sh	272, 343, 380 sh	272, 343, 380 sh	272, 380	
7-sulfate	Barron,1987b	250, 262 sh, 340	250, 262 sh, 343	252, 362	265, 290 sh, 320, 375	265, 290 sh, 337, 375 sh	260, 382	
7,4'-disulfate	Barron,1987b	265, 320	265, 310	265, 320	275, 287 sh, 325, 380	275, 287 sh, 325, 375	265, 315	
7,3',4'-trisulfate	Barron,1988d	265, 305	267, 305 sh	265, 305	280, 320, 375 sh	275, 320, 375 sh	267, 305 sh	
Hypoalétine								
7-sulfate-8-glucoside	Williams,1998	276, 255, 346	274, 255, 351	264, 378	276, 356, 415	277, 355, 415		
7-glucuronide sulfate	Williams,1998	233, 276, 343	265, 376	266, 277	274, 315, 434	243, 274, 354		
7-glucoside sulfate	Williams,1998	272, 340	272, 342	271, 349				
7-galactoside sulfate	Williams,1998	272, 340	272, 342	271, 349				
7-méthyl-3'-glucuronide sulfate	Williams,1998	274, 339	274, 340	274, 341				
7-méthyl-3'-galactoside sulfate	Williams,1998	252, 271, 301	252, 271	346				
Tricétine-7,3'-disulfate	Williams,1976	255, 267, 348	255, 267, 350	252, 369				

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+ H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	MeOH+NaOMe	+HCl
Kaempférol								
3-sulfate	Barron,1988c	265, 337	272, 370	265, 345	275, 300 sh, 343, 385	274, 300 sh, 343, 386	272, 385	
7-sulfate	Barron,1987b	240, 262, 320 sh, 360	225, 350, 430	262 sh, 360	255, 275 sh, 300 sh, 345, 415	255, 275 sh, 300 sh, 345, 416	250, 400	
7,4'-disulfate	Barron,1987b	245, 265, 310, 358	245, 260, 307, 360, 415 sh	262, 310, 358	250, 275 sh, 300 sh, 335, 415	265, 300 sh, 335, 415	250, 265 sh, 350 sh, 410	
3,7,4'-trisulfate	Barron,1987b	265, 335	265, 337	265, 335	275, 330, 390	275, 330, 391	265, 315, 410 sh	
3-O-gentiobioside-6-sulfate	Imporato,1980	267, 298, 345	275, 309, 390	267, 347	276, 305, 350, 400	277, 305, 348, 398	276, 327, 400	
3-O-a-D-(6''sulfatoglucoside)	Imperato,1979	265, 296 sh, 346	273, 302, 375	265, 347,	274, 302, 348, 399	274, 303, 348, 400	276, 324, 401	
4-méthylether	Tomàs-barberà,1990	251sh, 266, 290 sh, 320, 363	275, 300 sh, 385	268, 300 sh, 367	230, 239, 268, 306, 355, 420	230 sh, 239 sh, 267, 305, 345, 417	277, 287 sh, 320 sh, 413	
4-méthylether-3-sulfate	Tomàs-barberà,1990	267, 292 sh, 338	275, 297, 365	267, 290 sh, 345	275, 304, 349, 385 sh	275, 304, 348, 385 sh	276, 295 sh, 336	
6-hydroxykaempférol-3-sulfate	Oksuz,1987	268, 295, 345	273, 300, 355	266, 300, 350	275, 303, 350, 392	269, 290, 335, 376	273, 315, 400	
6-méthoxykaempférol	Barron,1987a	253, 295 sh, 360	268, 295 sh, 370	263, 395 sh, 360	270, 305 sh, 365 sh, 425	270, 305 sh, 360 sh, 420	273, 320, 410	
6-méthoxykaempférol-3-sulfate	Barron,1987a	262, 360	265, 300 sh, 355	262, 335	275, 300 sh, 355	275, 300 sh, 347	270, 325, 390	340

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+ H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	+NaOMe	+HCl
Quercétine								
3-sulfate	Varin,1986	350, 257	407, 267	388, 267	395, 275	365, 268		367, 257
7-sulfate	Barron,1987b	365, 250	375, 250	380, 255	425, 355 sh, 262	415, 350, 260	415, 357	
3'-sulfate	Seabra,1991	260,325 sh, 365	275, 315, 395	267, 325 sh, 364	267, 350, 432	270, 310 sh, 350, 432	280, 323, 425	
4'-sulfate	Barron,1988d	252, 295 sh, 365	270, 315, 383	255, 375	265, 300 sh, 350 sh, 427	262, 300 sh, 345, 420	270, 320, 402	
3,7-disulfate	Ahmed,1987a	250, 270 sh	252, 370, 420 sh	259, 380	275, 330 sh, 430		270, 415	280, 365 sh, 390
3,3'-disulfate	Barron,1988d	265, 340	270, 385	265, 345	272, 300 sh, 345, 395 sh	270, 300 sh, 350, 395 sh	270, 390	
3,4'-disulfate	Barron,1987c	268, 335	278, 320 sh, 360	268, 335	278, 415	278, 358 sh, 407	278, 380	255, 260, 365
7,4'-disulfate	Barron,1987b	250, 265 sh, 300 sh, 360	250, 265 sh, 365, 420 sh	250, 265 sh, 305 sh, 360	262, 300 sh, 345, 422	260, 300 sh, 345, 420	250, 350 sh, 415	
3,7,3'-trisulfate	Cabrera,1985	230 sh, 243 sh, 268, 322 sh, 342	266, 397		234 sh, 256 sh, 276, 300 sh, 340, 387	234sh, 256 sh, 270, 300 sh, 340, 385	243, 267 sh, 272, 300 sh, 391	
3,7,4'-trisulfate	Barron,1987b	265, 335	265, 337	265, 335	275, 330, 390	275, 330, 390	265, 315, 410 sh	
3,7,3',4'-tétrasulfate	Ahmed,1988	283, 320 sh, 337	272, 335	271, 310 sh, 340	280, 300 sh, 405	275, 300 sh, 350, 405		259, 275, 305 sh, 363
3-O-a-L-Rhamn-3'-sulfate	Op de beck,1998	265, 342	268, 344,	269, 342	273, 306, 357, 395	274, 341, 389	372, 324, 392	256, 355
7-méthylether-3,3'-disulfate	Mann,1999	268, 344	268, 358, 399 sh	268, 348	277, 308 sh, 363, 400	277, 302 sh, 353, 396	267, 396	256, 369
3,7-diméthylether-4'-sulfate	Mann,1999	255, 270 sh, 349	256, 348		270, 296 sh, 367 sh, 395	270, 296 sh, 367 sh, 395	270, 377	256, 270 sh
7,3',4'-triméthylether-3-sulfate	Mann,1999	254, 268 sh, 346	254, 349		277, 300 sh, 361sh, 394	277, 300 sh, 361sh, 395	283, 368	255, 269, 368
3-acétyl-7,3',4'-trisulfate	Cabra,1976	241, 266, 344	265, 400		254 sh, 275, 296 sh, 340, 389	254, 296 sh, 340, 389	237, 272, 300 sh, 383	

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	+NaOMe	+HCl
Eupalitine	Barron,1987a	250, 265 sh, 365	250, 265 sh, 365	250, 265 sh, 355	263, 300 sh, 360 sh, 415	263, 300 sh, 360 sh, 413	264, 405	
3-sulfate	Barron,1987a	270, 335	270, 345, 405 sh	270, 340	280, 300 sh, 362	280, 300 sh, 355	275, 390	355
3,4'-disulfate	Barron,1988c	270, 320	270, 320	270, 320	277, 345	275, 348	270, 320 sh	
Rhamnétine								
3,3'-disulfate	Barron,1988d	265, 340	265, 355, 397 sh	265, 340	272, 300 sh, 345, 390 sh	275, 300 sh, 345, 387 sh	263, 395	
3,4'-disulfate	Barron,1988c	265, 330	265, 330	263, 330	275, 335, 390 sh	275, 335, 390 sh	265, 335 sh	
3,3',4'-trisulfate	Barron,1988d	265, 315	265, 345 sh	265, 320	275, 325, 390 sh	275, 330, 390 sh	268, 280 sh, 345 sh	
Isorhamnétine								
3-sulfate	Varin,1986	252, 347	267, 357	265 sh, 350	272 sh, 365 sh, 395	272 sh, 390 sh, 360		252, 365
3,7'-disulfate	Varin,1986	253, 350	253, 355	253, 353	267, 365 sh, 397	265, 355 sh, 392		253, 365
3,4'-disulfate	Ahmed,1987b	250, 270, 333	272, 360	250, 270, 335	260 sh, 280, 345, 395	261 sh, 280, 345, 395	270 sh, 280, 360	255, 270 sh, 380
3,7,4'-trisulfate	Ahmed,1987b	282, 320 sh, 337	275, 337	270, 312 sh, 342	282, 302 sh, 345, 400	277, 300 sh, 345, 400	282, 320 sh, 385	257, 270, 310 sh, 360
3-O-(4''sulfatylrutinoside)	Li,1996	215, 253, 268 sh, 355	229, 275, 322, 402	229, 253, 268 sh	213, 269, 303, 362 sh, 405	215, 269, 274 sh, 303 sh, 362, 405	225, 271, 331, 410	

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+ H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	+NaOMe	+HCl
Tamarixétine	Tomàs-barberà,1990	254, 267 sh, 300 sh, 368					273, 320 sh, 407	
3-sulfate	Tomàs-barberà,1990	254, 265 sh, 293 sh, 348	275, 315, 371	255, 268, 290 sh, 353	267, 275 sh, 295 sh, 362, 390 sh	265, 275 sh, 295 sh, 359, 390 sh	272, 307 sh, 381	
3,7-disulfate	Barron,1987b	250, 265 sh, 345	250, 265 sh, 350	250, 265 sh, 350	265, 297 sh, 355 sh, 395	265, 297 sh, 350 sh, 390	250, 265 sh, 342	
3,3'-disulfate	Barron,1988d	265, 340	273, 300 sh, 360	265, 340	275, 300 sh, 340, 385 sh	272, 300 sh, 340, 385 sh	273, 300 sh, 360	
3,7,3'-trisulfate	Barron,1987b	265, 340	340, 265	265, 338	275, 295 sh, 342, 390	270, 295 sh, 345, 390	265, 335	
Ombuine	Barron,1988c	252, 360	252, 290 sh, 360, 420 sh	252, 360	257, 300 sh, 420	257, 300 sh, 415	270, 425	
3-sulfate	Barron,1988c	255, 338	255, 345	255, 340	260, 300 sh, 362, 390 sh	257, 300 sh, 360, 390 sh	260, 360	360
Eupatolitine	Barron,1987a	255, 363	255, 370	260, 380	270, 300 sh, 330 sh, 440	265, 300 sh, 370 sh, 420	275, 435	
3-sulfate	Barron,1987a	255, 270 sh, 345	255, 270 sh, 352, 425 sh	262, 370	275, 300 sh, 415	265, 280 sh, 300 sh, 365	272, 405	362
3,4'-disulfate	Barron,1988c	268, 320	269, 320 sh	267, 320	280, 350	280, 350	268, 320 sh	
Spinacétine	Barron,1987a	252, 365	255, 380	252, 365	262, 305 sh, 422	260, 300 sh, 365 sh, 422	275, 395	
3-sulfate	Barron,1987a	253, 270, 345	274, 320 sh, 367	270, 350	275, 300 sh, 372	267, 275 sh, 300 sh, 366	272, 330, 410	365

	ref.	MeOH	+NaOAc	+NaOAc+ H ₃ BO ₃	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ +HCl	+NaOMe	+HCl
Véronicafoline								
3,4'-disulfate	Barron,1988c	270, 325	270, 325	265, 325	255, 282, 350	253, 280, 352	273, 325	
Eupatine	Barron,1987a	253, 360	253, 365, 420 sh	253, 360	263, 300 sh, 365 sh, 418	260, 300 sh, 365 sh, 416	267, 412	
3-sulfate	Barron,1987a	253, 270 sh, 340	253, 270 sh, 340	253, 270 sh, 341	265, 280 sh, 300 sh, 370	260, 280 sh, 300 sh, 360	265, 375	355
7-glucuronide sulfate	Williams,1998	233, 276, 343	265, 376	266, 277	274, 315, 434	243, 274, 354		
7-glucoside sulfate	Williams,1998	272, 340	272, 342	271, 349				
7-galactoside sulfate	Williams,1998	272, 340	272, 342	271, 349				
7-méthyl-3'-glucuronide sulfate	Williams,1998	274, 339	274, 340	274, 341				
7-méthyl-3'-galactoside sulfate	Williams,1998	252, 271, 301	252, 271	346				



Serment

des

Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



THESE SOUTENUE PAR : PHILIPPE BAL

TITRE : **Etude bibliographique des flavonoïdes sulfatés : répartition, structure et propriétés biologiques**

CONCLUSION

Les flavonoïdes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal, mais leurs dérivés sulfatés sont encore peu connus.

Le but de cette recherche bibliographique a été d'établir une mise à jour des travaux réalisés jusqu'ici sur les flavonoïdes sulfatés, tant sur le plan de leur répartition dans le règne végétal, de leur extraction, de la détermination de leur structure, de leur synthèse que de leurs propriétés biologiques.

Ainsi nous avons constaté leur large distribution au sein du règne végétal. Cela indique que leur présence ne peut pas être considérée comme un critère chimiotaxonomique. Il semble, en effet, que leur présence soit plutôt le résultat d'une adaptation du végétal à son environnement (aquatique, salin ...).

Aux 101 flavonoïdes sulfatés isolés avant 1988, date de la dernière revue sur ce domaine, viennent s'ajouter 18 nouveaux dérivés, et un certain nombre de composés connus mais isolés dans d'autres espèces végétales. Parallèlement à ces composés naturels, les techniques de synthèse enzymatique couplées aux méthodes chimiques ont aussi largement contribué à augmenter le nombre des flavonoïdes sulfatés.

L'extraction, la purification et l'identification de ces composés font appel à des techniques relativement classiques. Cependant, dans le cadre de l'analyse structurale, et après une synthèse et une analyse de toutes les données bibliographiques, nous avons tenté d'établir une corrélation entre l'introduction du groupement sulfate et la modification des caractéristiques spectroscopiques de la molécule. Les tableaux regroupant ces informations en annexes pourront être utiles car très faciles d'accès lors de l'analyse structurale de composés "nouveaux".

Ce travail a également montré que les plantes ne sont pas les seuls organismes à synthétiser des flavonoïdes sulfatés : des microorganismes ont aussi cette faculté.

Chez les plantes, leur biosynthèse fait intervenir plusieurs enzymes comme les flavonol sulfotransférases et les aryl sulfatases.

La sulfatation des flavonoïdes, qui leur confère une certaine hydrophilie est souvent liée à une intensification de leurs activités biologiques.

Ainsi il semble que ces composés jouent un rôle dans la prévention de certaines maladies comme les maladies cardiovasculaires grâce à leur activité antioxydante, le cancer du sein ou la cataracte chez les sujets diabétiques.

Toutefois, ces composés étant plus solubles, ils sont plus rapidement éliminés, et leur activité est donc plus brève.

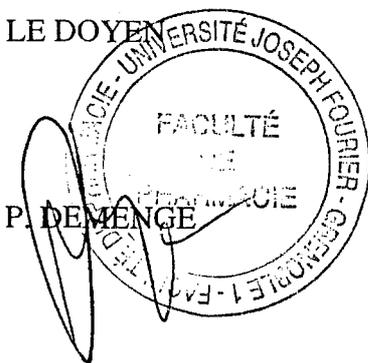
La recherche de ce type de composés dans d'autres plantes et la mise en place de techniques de purification plus rapides permettraient d'exploiter les flavonoïdes sulfatés à des fins médicales dans la prévention de ces maladies. Il serait aussi intéressant de rechercher d'autres propriétés biologiques afin d'étendre les applications potentielles de ces composés.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 1.2.2000

LE DOYEN

P. DEMENGE



LE PRESIDENT DE THESE

Dr. M-G. DIJOUX-FRANCA

TITRE DE LA THESE :

Etude bibliographique des flavonoïdes sulfatés : répartition, structure et propriétés biologiques.

RESUME :

Ce travail constitue une mise à jour des travaux réalisés sur les flavonoïdes sulfatés, tant sur le plan de leur extraction, de la détermination de leur structure, de leur synthèse que de leurs propriétés biologiques.

Aux 101 flavonoïdes sulfatés isolés avant 1988, date de la dernière revue sur ce domaine, viennent s'ajouter 18 nouveaux dérivés.

L'extraction, la purification et l'identification de ces composés font appel à des techniques relativement classiques dans chacun de ces domaines.

Dans le cadre de l'analyse structurale, nous avons cependant tenté d'établir une corrélation entre l'introduction du groupement sulfate et la modification des caractéristiques spectrales.

Les plantes ne sont pas les seuls organismes à synthétiser des flavonoïdes sulfatés : des microorganismes ont aussi cette faculté.

Chez les plantes, leur biosynthèse se fait grâce à plusieurs enzymes comme les flavonol sulfotransférases et les aryl sulfatases.

Les techniques de synthèses enzymatiques, s'ajoutant aux méthodes chimiques, ont contribué à augmenter le nombre de flavonoïdes sulfatés obtenus par synthèse.

La sulfatation des flavonoïdes augmente leur solubilité, et exception faite de l'inhibition des réactions d'hypersensibilité, l'insertion d'un groupement sulfate augmente également leur activité biologique. Ces composés semblent jouer un rôle dans la prévention de certaines maladies cardiovasculaires, grâce à leur activité antioxydante, du cancer du sein ou de la cataracte chez les sujets diabétiques.

MOTS CLEFS :

Flavonoïdes sulfatés, Structure, Activités biologiques, Flavonoïdes, Sulfates.