

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



N° d'ordre :168/DS/2017
Série :25/CH/2017 .

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie Organique
Option : Phytochimie

Par

Hanène ZATER

**Constituants chimiques, propriétés cytotoxiques,
antifongiques et antibactériennes de l'extrait chloroforme de
Centaurea diluta Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire**

Devant le jury :

Pr. BENAYACHE Samir	Université Frères Mentouri, Constantine	Président
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine	Directrice de thèse, Rapporteur
Pr. AMEDDAH Souad	Université Frères Mentouri, Constantine	Examineur
Pr. LEGSEIR Belgacem	Université Badji Mokhtar, Annaba	Examineur
Pr. BOUDJERDA Azzeddine	Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examineur
Pr. KHELILI Smail	Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examineur

15/07/2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ
صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ

Dédicaces

♥ *A L'âme de ma grande -mère & mon grand-père & Ami Djamel...*

♥ *A mes chers parents Akila & Abderrazek...*

♥ *A mes chères sœurs : Amel, Ibtissem, Schehra, Lamia, Faiza Mouna*

♥ *A mon frère Ahmed Souheil.*

♥ *A mes neveux.*

♥ *A mes oncles & tantes...*

♥ *A tous mes amis & collègues !!!*

♥ *A tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation !!!*

Je dédie ce modeste travail.

Hanène

Z.H



Remerciements

En préambule, je souhaite rendre grâce au bon Dieu « ALLAH », le Clément et Miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Au terme de ce travail de recherche qui a été réalisé à la Faculté de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles (ULB), je souhaiterais adresser mes remerciements aux personnes et institutions qui ont contribué à son accomplissement.

Je remercie vivement le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien qui m'a fait bénéficier d'une bourse de type PNE.

*Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse **Mme Fadila BENAYACHE**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, de m'avoir suivie et dirigée tout au long de la réalisation de cette thèse et pour toute l'aide, la patience, la disponibilité, les conseils précieux, les critiques constructives et le soutien humain, à la fois dans le développement de cette thèse comme dans tous les processus administratifs. Recevez ici mon profond attachement, ma gratitude et ma sincère reconnaissance & Merci pour tout...*

*Je remercie tout particulièrement et j'exprime toute ma gratitude à mon co-directeur de thèse **Mr.Pierre DUEZ** Professeur à l'Université de Mons (UMONS) actuellement, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir initié et encadré ce travail coté biologique, pour m'avoir témoigné de sa confiance en mettant tout en œuvre pour que ce travail soit réalisé dans son laboratoire. J'ai eu le temps d'apprécier son esprit scientifique.*

*Je remercie également **Mme Caroline STEVIGNY**, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles (ULB) pour la générosité humaine qui a accompagné sa participation à ce travail, pour m'avoir offert tant de possibilités. Je la remercie pour tout le soutien, les encouragements, la sympathie, le suivi journalier, l'énergie, le dévouement et les précieux conseils scientifiques en matière de botanique.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à **Mr. Samir BENAYACHE**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Toute ma gratitude va aussi à **Mme Joëlle HUET**, Docteur du Laboratoire des Biopolymères et des Nanomatériaux Supramoléculaires de l'ULB qui m'a enseigné tout ce que je sais au sujet des tests antifongiques. Merci pour votre aide et pour votre sympathie. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre patience, votre dévouement, votre disponibilité et pour l'amitié que vous m'avez témoignée tout au long de l'année.*

*Ma gratitude va également à tous les membres du jury **Mme Souad AMEDDAH** Professeur de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, **Mr. Belgacem LEGSEIR** Professeur de l'Université Badji Mokhtar Annaba, **Mr. Azzeddine BOUDJERDA** Professeur de l'Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), **Mr. Smaïn KHELILI** Professeur de l'Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel) qui, malgré leurs multiples occupations, ont accepté d'examiner cette thèse et juger ce travail.*

J'ai pu bénéficier pour réaliser ce travail de l'accueil et de l'aide de certains laboratoires que je remercie de tout cœur :

*Haut-Commissariat au Développement de la Steppe « **HCDS** » & Conservation des Forêts Djelfa, Algérie (la récolte de la plante étudiée) ; Laboratoire Biodiversité et Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences Biologiques Université Ferhat Abbas Sétif, Campus El-Baz, Setif, Algérie (identification de l'espèce végétale étudiée : **Pr. Mohamed KAABECHE**) ; Herbarium du jardin Botanique de Meise, Bruxelles , Belgique (authentification & dépôt de l'herbier : **Mme Bibiche Mato**) ; Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie de l'ULB (tests cytotoxiques : **Pr. Véronique MATHIEU et Thierry GRAS**), Unité de Microbiologie Pharmaceutique et Hygiène de l'ULB (tests antibactériens directs & indirects : **Pr. Véronique FONTAINE et Dr. J. NGEZAHAYO**) ; CHU Charleroi (tests antimicrobiens : **G. LARSON et D. FAMMEREE**) ; Centre Wallon de Biologie Industrielle, Bio-Industrie Unité Gembloux Agro-BioTech ; Université de Liège, de Gembloux (tests antifongiques : **Pr. Marc ONGENA et Dr. J. HUET**) ; Service du Laboratoire de RMN de l'ULB (enregistrement de spectres de RMN : **Pr. M. LUHMER, Dr. L. POTIER**), Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses*

*Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Constantine, Algérie (enregistrement de spectres UV) ; Laboratoire de Chimie Pharmaceutique Organique de l'ULB (enregistrement des spectres de masse : **Dr. C. DELPORTE**) ; Institut Meurice – Service de Chimie Organique Haute Ecole Lucia de Brouckère Avenue Emile Gryzon, Bruxelles (Mesure des pouvoirs rotatoires : **Dr. E. GICQUEL** et **J. VANCAUTENBERG**).*

*Je voudrais exprimer ma gratitude au Pr. **Ali CHOKRI** recteur de l'Université de Djelfa, à **Mr. Abdallah TOUNSI** Vice-consul d'Algérie à Bruxelles pour l'aide précieuse dans la procédure de la prolongation de mon séjour.*

*Mes remerciements vont à toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition Humaine: à **Marie FAES** et **Olivier VAILLANT** pour votre disponibilité et le matériel que vous avez mis à ma disposition. A vous mes chers collègues chercheurs et stagiaires (Laurent, Jérémie, Philippe, Léocadie, Carole, Valérian, Sofia, Jacob, Naïma, Fatiha, Sihem, Jallel, Ahmed, Amel, Bakari, Albert). Merci pour vos encouragements et, tout particulièrement, pour la bonne ambiance que votre présence a créée au laboratoire.*

J'ai autour de moi tout un réseau d'amis et de proches qui, de diverses manières, m'ont aidé à aller jusqu'au bout de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je cite en particulier : Hafida, Housseem, Sandra, Schehrazed, Eva, Sabrina, Ouahiba, Sana, Lamia, Sarah, Rebiha, Salima, & Fatima Zohra...

A tous ceux, que je n'ai pas nommé, et qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je remercie chaleureusement toute ma famille, arrières grand-mères, grands-parents, oncles, tantes et tous mes cousins, de tout cœur pour leur soutien.

Merci 
Z.H

Liste des abréviations & acronymes

- AB : Antibiotique
- AcOH : acide acétique
- ADN : Acide desoxyribonucléique
- A431 : lignée cellulaire humaine modèle (carcinome épidermoïde)
- A549 : carcinome humain du poumon non à petites cellules
- AcOEt : acétate d'éthyle
- AlCl₃ : chlorure d'aluminium
- Alg. Mar. : Algérien Marocain
- *ans* : anthères
- ARN : Acide ribonucléique
- ATCC : American Type Culture Collection
- ATM : (Ataxia Telangiectasia Mutated) est la protéine mutée dans le syndrome
- $[\alpha]_D^{20}$: Pouvoir rotatoire
- B16-F10 : lignée cellulaire de cancer murin
- BMR : bactérie multirésistante aux antibiotiques
- BuOH : *n*- butanol
- C: capitule.
- CH₂Cl₂: Dichloromethane
- CHCl₃: Chloroforme
- CH₃COCH₃: Acétone
- CDCl₃ : Chloroforme deutéré
- CD₃OD : Méthanol deutéré
- CoA : coenzyme A
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DMSO-*d*₆ : diméthylsulfoxyde deutéré
- CC : chromatographie sur colonne
- CCC: très commun.
- CCM : chromatographie sur couche mince
- CO₂ : dioxyde de carbone
- CFU : Colonies Forming Units

- CMB: Concentration Minimale Bactéricide
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
- CFU : *Colonies Forming Units*
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- ^{13}C : carbone 13
- CDC25 : Cycle cellulaire
- COSY: Correlated Spectroscopy
- CP : chromatographie sur papier ; - *cp* : capitule
- *d* : doublet
- *dd* : doublet de doublet
- DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfert
- DO : densité optique
- DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
- δ (ppm) : Déplacement chimique en partie par million
- E : Est
- ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EDTA: Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid (Acide Éthylène Diamine Tétracétique ; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)
- ESI : Ionisation par l'électronébulisation ou electrospray
- EtOH: Ethanol
- Ex : Exemple
- F : fraction
- *f, f'* : sous- fraction
- FBS : Fetal Bovin Serum (sérum fœtal bovine)
- *Fdt* : un faux doublet de triplets
- FBC : *Fractional Bactericidal Concentration*
- FIC : *Fractional Inhibitory Concentration*
- FAB : ionisation par bombardement d'atomes accélérés (Fast Atom Bombardment)
- glu : glucose
- GC : chromatographie phase gazeuse
- GC-MS : chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

- GPS : Global Positioning System
- ^1H : proton
- H_2O : Eau
- H_3BO_3 : Acide borique
- HCl : Acide chlorhydrique
- HepG-2 : carcinome hépatocellulaire
- HEC-1 : adénocarcinome endométrial humain ; utérus; Endomètre
- HeLa : cellules proviennent d'une tumeur du col utérin prélevée chez une patiente
- HRESI-QTOF-MS : spectre de masse à haute résolution en mode électrospray positif
- Hybridations : SP , Sp^2 , SP^3
- Hs683 : Gliome humain
- H_2SO_4 : Acide sulfurique
- NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance /pression
- IC_{50} : concentration inhibitrice à 50% (Inhibitory concentration 50%)
- J (Hz) : Constante de couplage exprimé en hertz
- KLE : lignée cellulaire humain dérivée d'un carcinome endométrial mal différencié
- l : ligule
- LC : chromatographie en phase liquide
- LC-MS : HPLC couplée avec la masse
- LDL : low Density Lipoprotéins ou l'oxydation de lipoprotéines de faible densité
- m : multiplet
- m/z : Masse / charge électrique
- M : masse
- MCF7 : Michigan Cancer Foundation - 7; lignée de cellules tumorales mammaires
- Me : méthyl
- MeOH: Méthanol
- MEM : minimum essential d'Eagle
- MHA : Mueller Hinton Agar
- MHB : Mueller Hinton Broth
- MgSO_4 : Sulfate de magnésium
- MKK : Mitogen-activated protein kinase

- MRSA : Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* «*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline»
- MTT : Méthyltétrazolium
- N : Nord
- NaOAc : acétate de sodium
- NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen (Nicotinamide Adenosine Dinucleotide Phosphate)
- NaOH : hydroxyle de sodium
- NaCl : chlorure de sodium
- NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma (Les cancers bronchiques non à petites cellules)
- OH : hydroxyle
- OMe : méthoxyle
- P : pétale
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- PC3 : Carcinome humain de la prostate (Cellules prostatique3)
- PDA : Pomme de terre Dextrose Agar
- PI3K : phosphoinositide 3-kinase
- *pp*: pappus
- PF : point de fusion
- KATO III : Lignée cellulaire de carcinome gastrique humain
- K₂HPO₄: Hydrogénophosphate de potassium
- rpm : rotation par minute
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
- R: rare
- R_f : facteur de retardement (retardation Factor)
- *q* : quadruplet
- qsp : quantité suffisante pour
- Q-TOF: Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry (quadrupôle (Q) temps de vol)
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- ROESY: Rotating Fram Overhauser Effect Spectroscopy
- *s* : singulet
- *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

- SARM : staphylococcus aureus résistant à la méticilline
- SD : standard deviation (en anglais), écart-type
- SM : spectroscopie de masse ; - *sm*, stigmat
- *st* (S) : style
- *t* : triplet
- Tell. : tellienne
- UV : Ultra-Violet.
- U373 : Glioblastome astrocytaire humain

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

- [] : Concentration (évaporation)
- °C : température en degrés Celsius
- cm : centimètre
- g : gramme
- h : heure
- Hz : hertz
- Kg : kilogramme
- MHz : méga Hertz
- M : mol/L
- mg : milligramme
- min : minute
- mL : millilitre
- mM : millimol/L
- ppm : partie par million
- µg : microgramme
- µM : micromol/L
- V : volume
- % : Pourcentage

Note :

Les références bibliographiques sont placées à la fin de chaque chapitre

SOMMAIRE

Table des matières

Remerciements	ii
Liste des abréviations & acronymes	v
Travaux publiés	x
Introduction générale.....	1
Références bibliographiques	5
Table des figures	g
Table des tableaux	j
Table des spectres.....	l

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La famille des Astéracées & le genre *Centaurea*

Généralités sur les métabolites secondaires

I. La Famille des Astéracées (Asteraceae)	9
I.1. Généralités	9
I.2. Distribution géographique de la famille Asteraceae	10
I.4. Caractéristiques de la famille Asteraceae	10
I.4.1. Appareil végétatif.....	10
I.4.1.1. Habitus	10
I.4.1.2. Feuilles	10
I.4.1.3. Appareil reproducteur	11
I.4.1.4. L'inflorescence en capitule	12
I.4.1.2. Feuilles	12
I.4.1.5. Description	12
I.4.1.6. Évolution du capitule	12
I.4.1.7. La fleur	15
I.4.1.7.1. Le calice	15
I.4.1.7.2. La corolle	16
I.4.1.7.3. L'androcée	16
I.4.1.7.4. Le gynécée	16

I.4.1.7.5. La pollinisation	16
I.4.1.8. Fruit.....	17
I.5. Utilisation de la famille Asteraceae	17
I. 5. Le genre <i>Centaurea</i>	17
I. 5. 1. Introduction	17
I. 5. 2. Description mythologique et botanique du genre <i>Centaurea</i>	18
I. 5.3. Caractéristiques du genre <i>Centaurea</i>	19
I.5.4. Les propriétés biologiques et pharmacologiques des Centaurées.....	19
I.6. Généralités sur les métabolites secondaires	20
I.6.1. Du végétal au médicament.....	20
I.6.2. Rôle des métabolites secondaires	21
I.6.3. De la médecine traditionnelle au médicament moderne	23
I.6.4. Classification des métabolites secondaires	24
I.6.4.1. Les Molécules Phénoliques	26
I.6.4.2. Le rôle des composés phénoliques.....	28
I.6.4.2.1. Pour l’homme.....	28
I.6.5. Généralités sur les flavonoïdes	28
I.6.5.1. Chimie des flavonoïdes.....	28
I.6.5.2. Biosynthèse des flavonoïdes	29
I.6.5.3. Classes de flavonoïdes	31
I.6.5.4. Rôle dans les plantes.....	32
I.6.5.5. Importance dans l’alimentation.....	32
I.6.5.6. Propriétés chimiques et activités biologiques	32
I.6.5.7. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	33
I.6.5.8. Analyse structurale des flavonoïdes par spectrométrie de masse	34
I.6.5.8.1. Eléments d’identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse.....	35
I.6.5.8.2. Nomenclature	35
I.6.5.8.3. Fragmentation de la génine en mode positif.....	35
I.6.6. lignoïdes : Introduction et classification	37
I.6.6.1. Définition	37
I.6.6.2. Origine biosynthétique.....	39
I.6.6.2. A. Origine de la diversité chimique	39
I.6.6.2. B. Biosynthèse des lignanes <i>stricto sensu</i>	39
I.6.6.3. Biosynthèse des lignanes : dimérisations.....	41

I.6.6.4. Classification et structure.....	42
I.6.6.5. Principaux types de lignanes	43
Références bibliographiques	45

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre II : Étude des activités biologiques *in vitro*

II. Étude des activités biologiques.....	50
II.1. Préparation de l'échantillon d'extrait chloroforme.....	50
II.2. Etude de l'activité cytotoxique (test MTT)	50
a) Les Réactifs	51
b) Les équipements et appareillages	51
c) Les lignées cancéreuses utilisées	51
II.2.1.1 Test de viabilité.	56
II.3. L'activité antibactérienne directe et indirecte par la méthode de microdilution et par la méthode de CCM-Bioautographie	58
II.3.1. Etude de l'activité anti-microbienne.....	58
II.3.1.1. les antibiotiques β -Lactamines	58
II.3.1.2. Les antibiotiques β -Lactamines.....	59
II.3.1.3. Structure chimique.....	60
II.3.2. Classification des β -Lactamines	61
II.3.2.1. Pénames	61
II.3.2.2. Les pénicillines	62
II.3.2.3. Pénicillines du groupe G.....	62
II.3.2.5. Pénicillines du groupe M.....	63
II.3.2.6. Pénicillines du groupe A.....	63
II.3.2.7. Les céphalosporines (céphems)	63
II.3.2.8. Les carbapénèmes.....	64
II.3.2.9. Les monobactames « azactam» (seule molécule).....	64
II.3.10. β -lactamases.....	65
II.3.11. Staphylococcus aureus résistant à la méticilline.....	66
II.4. Micro-organismes (Souches microbiennes & fongiques pathogènes des plantes).....	67

a) Réactifs et matériel	68
b) Souches microbiennes & fongiques (pathogènes des plantes)	68
(1) Bactéries Gram-positif	68
(2) Bactéries Gram-négatif	68
(3) Souches fongiques « Champignons pathogènes des plantes »	68
(4) Souches fongiques	68
II.4. 1. Activité antibactérienne directe	69
a) Préparation du sel de tétrazolium MTT	69
b) Préparation de l'antibiotique (128 µg/mL).....	69
c) Ensemencement et incubation	70
II.4. 1.4. Préparation de l'inoculum standardisé	71
II.4. 1.5. Préparation des dilutions des substances antimicrobiennes (extrait CHCl ₃ & produits isolés) et inoculation de la microplaque	71
i) Incubation	74
ii) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	74
iii) Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	75
II.3.2. Activité antibactérienne indirecte	76
II.3.2.2. Recherche de synergie entre extraits de plantes et antibiotiques	77
II. 3.3. CCM-Bioautographie	78
II.3.4. Activité antifongique	79
Références bibliographiques	83

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Etude phytochimique de

l'espèce *Centaurea diluta* Aiton subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire

III. Etude phytochimique de l'espèce <i>Centaurea diluta</i> Aiton subsp. <i>algeriensis</i> (Cosson & Durieu) Maire	85
III.1. Critères du choix de l'espèce <i>C. diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.) Maire ...	85
III.2. Place dans la systématique (botanique).....	86
III.2.1. Description de l'espèce	86
III.2.2. Description macroscopique	87
III.2.3. Répartition géographique	88

III.2.4. Description microscopique.....	89
III.2.4.3. Composition et préparation du réactif de Steimetz	89
III.2.4.3. Composition et préparation du réactif de Steimetz	89
III.2.4.3.1. Réactif A	89
III.2.4.3.2. Réactif B.....	89
III.2.4.3.3. Mode d'emploi	90
III.2.4.3.4. Observation	90
III.2.4.3.5. Eléments observés	90
III.3. Réactifs et matériels utilisés (partie phytochimique)	94
III.3.1. Appareillages.....	94
III.3.2. Matériel	94
III.3.3. Réactifs et solvants.....	95
III.4. Récolte du matériel végétal	95
III.5. Protocole expérimental	98
III.5.1. Extraction	98
III.5.2. Criblage phytochimique préliminaire	100
III.5.2.1. Tanins	100
III.5.2.2. Saponines	101
III.5.2.3. Alcaloïdes.....	101
III.5.2.4. Anthraquinones	101
III.5.2.5. Flavonoïdes	101
III.5.2.6. Terpénoïdes	102
III.5.2.7. Résumé du criblage des chromatographies sur couche mince	102
III.5.1. III.6. Séparation & purification chromatographique	104
III.6.1. Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme	104
III.6.2. Séparation sur colonne	104
III.6.3. Etude des fractions de la colonne mère (C1).....	106
III.6.3.1. Etude de la fraction F3 : 26,2 mg	106
III.6.3.2. Etude de la fraction F8 : 44,4 mg	106
III.6.3.3. Etude de la fraction F10 : 19,60 mg	106
III.6.3.4. Etude des fractions F4, F5, F6	107
III.6.3.5. Etude des fractions F15 et F16	108
III.6.3.6. Etude de la fraction F17: 67,50 mg	110
III.6.3.7. Etude de la fraction F20: 123,80 mg	110

Références bibliographiques	112
-----------------------------------	-----

Chapitre IV : Résultats & discussions

(Élucidation structurale)

IV. Identification des produits isolés de l'extrait CHCl ₃ de l'espèce <i>Centaurea diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.)	115
IV.1. Généralités (Méthodes Physico-chimiques).....	115
IV.1.1. Analyses par LC/MS	115
IV.1.2. Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire RMN	115
IV.1.3. Analyses par UV –Visible.....	116
IV.1.4. Mesure des points de fusion.....	116
IV.1.5. Pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{20}$)	116
IV.2.1. Elucidation structurale du composé 1 (ZH3-3)	116
IV.3. Elucidation structurale du composé 2 (ZH6-3).....	124
IV.4. Elucidation structurale du composé 3 (ZH6-4).....	146
IV.5. Elucidation structurale du composé 4 (ZHF8).....	153
IV.6. Elucidation structurale du composé 5 (ZH10)	170
Références bibliographiques	184

Chapitre V : Résultats & discussions

(Screening phytochimique & biologique)

V. Résultats et discussion.....	190
V.1. Extraction et screening phytochimique	190
V.1.1. Rendements de l'extraction	190
V.1.1. Résultat du screening (criblage) phytochimique	191
V.2. L'activité cytotoxique.....	191
V.2 .1. L'activité cytotoxique de l'extrait CHCl ₃ de <i>C. diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i>	191
V.2 .2. L'activité cytotoxique des composés isolés	192
V.3. L'activité anti-microbienne	194
V.3.1. Activité antifongique et activité antibactérienne directe	194
V.3.2. Activité antibactérienne indirecte	196

V.3.3. CCM-bioautographie.....	198
Références bibliographiques	202
Conclusion générale et Perspectives	203
Résumé graphique	205
Perspectives.....	205
Références bibliographiques	206

Table des figures

Figure I.1 : Appareil végétatif des Astéracées	11
Figure I.2 : Le capitule chez les Astéracées. Schémas traduisant l'évolution	12
Figure I.3 : Bleuet	13
Figure I.4 : Arnica (Astéroïdées).	14
Figure I.5 : Coupe de la fleur des Astéracées	15
Figure I.7: De la médecine traditionnelle au médicament moderne	23
Figure I.6-1: Voies du métabolisme secondaire des plantes	25
Figure I.6-2: Une source de biosynthèse de certaines variétés de produits	26
Figure I.8 : La molécule phénolique	26
Figure I.9: Structure de base des flavonoïdes	29
Figure I.10: Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes.....	30
Figure I.11 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes	30
Figure I.12: Les diverses classes de flavonoïdes d'après Bruneton	31
Figure I.13 : Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones, flavonols et flavanones.....	36
Figure I.14 : Figure I.14 : Spectre MS/MS de la lutéoline (a) et du kaempférol (b) obtenus par ESI en mode positif (analyseur TQ équipé d'une source d'ionisation FAB, CID de basse énergie).....	36
Figure I.15 : Squelette de lignane.....	37
Figure I.16 : structure générale d'un phénylpropanoïde	38
Figure I.17 : principaux dérivés issus de couplages oxydatifs de l'alcool coniferylque.....	38
Figure I.18 : Unités en C6-C3 impliquées dans la biosynthèse des lignanes.....	39
Figure I.19 : Biosynthèse des lignanes : dimérisations	40
Figure I.20: Biosynthèse des lignanes : exemple du (+)-pinorésinol et apparentés	41
Figure I.21 : Structure de lignanes	42

Figure I.22: Structure de Néo- lignanes	42
Figure I.23: Structure de Lignoïdes ou "lignanes hybrides"	43
Figure I.24: Principaux types de lignanes	44
Figure I.25: Exemples de structures de néolignanes	44
Figure II.1 : solution de l'extrait dans DMSO	50
Figure II.2 : Compteur de cellules utilisé(coulter Beckman©)	51
Figure II.3 : Préparation des dilutions de l'extrait CHCl ₃ allant de [100 -0,01] µg/mL	54
Figure II.4 : Préparation des dilutions des composants chimique isolés de [10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁸] M ..	55
Figure II.5 : Protocole MTT montre le traitement de toxique après 72h.	55
Figure II.6 (a):Structure du MTT et sa réduction en formazan.	56
Figure II.6 (b) & Figure II.6(b'):Plaques de 96 puits (microdilution)	57
Figure II.6 (c):Courbe dose-réponse pour rechercher la valeur de l'IC ₅₀	58
Figure II.7 : Année de développement des premières pénicillines de semi-synthèse [8].	60
Figure II.8 : Noyaux bêta-lactame & péname	61
Figure II. 8: Structure plane générale développée des pénicillines [11]	61
Figure II. 9 : Structure générale développée des pénicillines [11].....	62
Figure II.10: Structure chimique de la pénicilline G	62
Figure II.11: Classes d'antibiotiques à base d'anneau β-lactame [13].....	64
Figure II.12: Classes d'antibiotiques à base d'anneau β-lactame [14].....	65
Figure II.13: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase [12].....	65
Figure II.14 : Ensemencement de l'agar	70
Figure II.15 : Travail en zone stérile (autour de la flamme du bec Bunsen) ou flux laminaire	70
Figure II.16 : Activité directe par la méthode de microdilution et inoculation	73
Figure II.16-1: Méthode de microdilution et inoculation montre les concentrations (µg/mL)	73
Figure II.17 : Etapes du test antibactérien direct par la méthode de microdilution.	74
Figure II.18 : Schéma utilisé pour déterminer la CMB de l'extrait/produits	75
Figure II.19 : Activité indirecte par méthode de microdilution	76
FigureII.20 : Protocole de l'activité antifongique sur les champignons sporulants	80
Figure II.21 : Protocole de l'activité antifongique sur les champignons non-sporulants	81
Figure II.21-1 : Protocole de microdilution sur les plaques multi-puits de 96 puits	81
Figure III.1 : Bractées de <i>C. diluta</i>	87
Figure III.2 : Poudre de <i>Centaurea diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.)	89
Figure III.3 : Microscope optique utilisé (CHK-B145 OLYMPUS CH-2).....	90

Figure III.4: Eléments microscopiques de la poudre des parties aériennes de <i>Centaurea diluta</i> Aiton subsp. <i>algeriensis</i> (Cosson & Durieu) observés dans le réactif de Steimetz	94
Figure III.5 : Les parties aériennes de <i>C. diluta</i> Aiton subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.) Maire(1934).....	96
Figure III.6 : Carte géographique de l'Algérie indiquant le lieu de la récolte	96
Figure III.7 : Ain maabed, la région exacte de la récolte de <i>C. diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.) Maire.....	96
Figure III.8 : Voucher de <i>Centaurea diluta</i> Aiton subsp. <i>algeriensis</i> (Cosson & Durieu)	97
Figure III.9 : Protocole d'extraction de <i>C. diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.) M... ..	99
Figure III.10 : Etape préliminaire de criblage phytochimique	100
Figure III.11 : Précipité noirâtre représentatif d'un test positif à la présence de tanins.....	100
Figure III.12: Test positif à la présence de saponosides	101
Figure III.13 : Profil chromatographique de screening phytochimique de l'extrait CHCl ₃ ...	103
Figure III.14 : Schéma de de différentes séparations chromatographique	111
Figure IV.1 : Amas isotopique du composé 1	117
Figure IV.1-1 : MS/MS, amas isotopique de l'ion 153,0544	118
Figure IV-2: Vanilline	120
Figure IV.3 : Amas isotopique du composé 2	125
Schéma IV.1 : Résumé des données de la RMN 13C et DEPT 135 du composé 2	127
Schéma IV.2: squelette d'un lignane de type dibenzylbutyrolactone	129
Figure IV.3.1 : Structure partielle du composé 2	137
Figure IV.4 : Structure plane du composé 2	142
Figure IV.5 : (-)- Arctigenine.....	145
Figure IV.8: Amas isotopique du composé 3	147
Figure IV.8-1 : MS/MS, amas isotopique de l'ion 153,0544 du composé 3	148
Figure IV.9: Paridol.....	152
Figure IV.10: Structure préliminaire du composé 4	153
Figure IV.11 : Structure partielle du composé 4 selon HR- QTOF-ESIMS (+).. ..	156
Figure IV.12 : Structure partielle du composé 4	161
Figure IV.13: Eupatiline.....	165
Figure IV.14: Structure préliminaire du composé 5	172
Figure IV.15: Structure partielle du composé 5 selon les données UV-Vis.....	174
Figure IV.16: Structure du composé 5	177
Figure IV.17: jacéosidine.. ..	182

Figure V.1 : Histogramme schématique des résultats obtenus pour l'extraction des 1500 g de poudre sèche de la plante étudiée. Les rendements sont présentés par ordre d'extraction...	190
Figure V.2: Les microplaques après MTT de l'extrait CHCl ₃ sur les 3 lignées humaines ...	192
Figure V.3 : Effets cytotoxiques (IC ₅₀) de l'extrait CHCl ₃ sur les 3 lignées humaines.....	192
Figure V.4 : Effets cytotoxiques (IC ₅₀) de l'extrait CHCl ₃ et des composés isolés sur différentes lignées de cellules tumorales.....	193
Figure V.5: CMI (µg/mL) de l'extrait CHCl ₃ de <i>C. diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i>	196
Figure V.6 : Test direct CCM-bioautographiedes composés (1 - 5)..	198
Figure V.7 : Test direct CCM-bioautographie des composés (4 &5)..	198
Figure V.8: Mesure de la zone d'inhibition	199
Figure V.9 : Détermination de la CMB del'extrait CHCl ₃	199
FigureV.10: Analyses de la susceptibilité à la jacéosidine (5) et à la streptomycine.....	200
Résumé graphique.....	205

Table des tableaux

Tableau II.1 : préparation de l'extrait chloroformique (solution stock) des tests biologiques .	50
Tableau II.2 : préparation des produits (solution stock) des tests biologiques	50
Tableau II.3 : Origine et type histologique des lignées cellulaires cancéreuses utilisées.	52
Tableau II.4 : Ensemencement (Cellules/mL).....	53
Tableau II.5 : Concentration de l'extrait CHCl ₃ sur la microplaque 96.	53
Tableau II.6 : Ensemencement (cellules/mL).	54
Tableau II.7 : Concentration de l'extrait CHCl ₃ sur la microplaque 96.	54
Tableau II.8 : Structures chimiques des AB (β-lactamines) utilisés.	67
Tableau II.9: Schéma utilisé pour les tests antimicrobiens, notamment la CMI.....	72
Tableau III.1 : Classification botanique de l'espèce étudiée.....	86
Tableau III.2 : Tableau des solvants.....	95
Tableau III.3: Tableau des phases stationnaires	95
Tableau III.4 : Révélateurs	95
Tableau III.5 : Résumé des directives et observations pour le criblage des groupes chimiques en CCM	102
Tableau III.6: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de <i>Centaurea diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.) M.	105

Tableau III.7: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne du mélange F4, F5 et F6.....	107
Tableau III.8: Résultats du fractionnement par CC du mélange H	109
Tableaux IV.1 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 1 , calcul de la masse exacte	117
Tableau IV.1-1 : Données liste des ions adduits du composé 1	118
Tableau IV.2 : Liste des pics fragments de l'ion quasi-moléculaire du composé 1	119
Tableau IV.3: Les données spectroscopiques de la RMN(¹ H& ¹³ C) (CDCl ₃ , 300 MHz) du Vanilline	123
Tableau IV.6: Données correspondant au calcul de la masse exacte du composé 2	125
Tableau IV.6-1 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 2	125
Tableau IV.6-2 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS/MS (+) du composé 2	126
Tableau IV.7 : Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé 2	144
Tableaux IV.8 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 3 , calcul de la masse exacte.....	146
Tableau IV.9 : Ions quasi-moléculaires du composé 3	147
Tableau IV.10 : Liste des pics fragments de l'ion quasi-moléculaire du composé 3	148
Tableau IV. 11 : Les données spectroscopiques de la RMN (¹ H& ¹³ C) (CDCl ₃ , 300 MHz) du Paridol.	151
Tableau IV.12 : Liste des ions adduits HR- QTOF-ESIMS (+) du composé 4	154
Tableau IV.13 : Calcul de la masse exacte du composé 4	155
Tableau IV.14 : Données (valeurs; λ _{max} , nm) de la série spectrale UV-Vis du composé 4 .	156
Tableau IV.15: Les données spectroscopiques de la RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 300 MHz) de l'Eupatiline.	167
Tableau IV.16: Les données spectroscopiques de la RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75 MHz) de l'Eupatiline.	168
Tableau IV.17: Données liste des pics quasi-moléculaires du composé 5	171
Tableau IV.18 : Calcul de la masse exacte du composé 5	171
Tableau IV.19 : Données (valeurs; λ _{max} , nm) de la série spectrale UV-Vis du composé 5 .	174
Tableau IV.20: Les données spectroscopiques de la RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 300 MHz) du composé 5 jacéosidine.....	181

Tableau V.1 : Rendements des extraits	190
Tableau V.2: Criblage phytochimique des extraits chloroformique et aqueux.....	190
Tableau V.3 : Effets cytotoxiques de l'extrait CHCl ₃ de <i>C. diluta</i> Ait.subsp. <i>algeriensis</i> (données de 3 expériences réalisées en triplicate).....	191
Tableau V.4: Effets cytotoxiques (IC ₅₀) de composés isolés sur les différentes lignées cellulaires de cancer humain et de souris (données de 3 expériences en triplicate).....	193
Tableau V.5 : CMI (µg/mL) de l'extrait chloroformique	195
Tableau V.6: Impact de l'extrait CHCl ₃ (200 µg /mL) sur la sensibilité du MRSA envers divers antibiotiques bêta-lactames.	197
Tableau V.7 : Activité antibactérienne des composés purifiés (1-5) mesurée par la méthode indirecte (CCM-bioautographie)	199
Tableau V.8 : Activité antibactérienne de l'eupatiline 4 et de la jacéosidine 5 , mesurée par une CCM-bioautographie sur des taches de différentes concentrations.	199
Tableau V.9 : Analyses de la susceptibilité au jacéosidine (5) et à la streptomycine (CMI µg/mL).....	200

Table des spectres

Spectre 1: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 1	117
Spectre 1-2 : Spectre HR-ESIMS/MS (+) du composé 1	118
Spectre 2 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 1	120
Spectre 2-1 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 1 , étalement	121
Spectre 2-2 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 1 , étalement de la zone aromatique.121	
Spectre 3 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 1 , étalement de la zone aromatique	122
Spectre 4 : RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 1	122
Spectre 5 : HRESI-QTOF-MS (+) du composé 2 (ZH6-3).....	125
Spectres 5-1: Spectre HR-ESIMS/MS/MS (+) du composé 2	126
Spectre 6 : RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 2	128
Spectres 7 : Expérience DEPT 135 (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 2	128
Spectre 8: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	130
Spectre 8-1: RMN ¹ H (600 MHz, , CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	130
Spectre 8-2: RMN ¹ H (600 MHz, , CDCl ₃ , δ _{ppm}), du composé 2 , la zone aliphatique.....	131
Spectre 8-3: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 2 , la zone aromatique.....	131

Spectre 9 : Expérience HSQC (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	132
Spectre 9-1: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	132
Spectre 10 : Expérience COSY (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	133
Spectre 9-2: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	134
Spectre 9-3: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	135
Spectre 11: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	135
Spectre 11-1: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	136
Spectre 10-1 : Expérience COSY (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	137
Spectre 11-2: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	138
Spectre 9-3: Expérience HSQC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	138
Spectre 11-3: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	139
Spectre 11-4: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	140
Spectre 9-4: Expérience HSQC (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	140
Spectre 12 : Expérience ROESY (600 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), étalement du composé 2	141
Spectre 13 : RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), (attribution) du composé 2	143
Spectre 13-1 : DEPT 153 (150 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}), (attribution) du composé 2	143
Spectre 14: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 3	147
Spectre 14-1: Spectre HRESI-QTOF-MS/MS (+) du composé 3	148
Spectre 15 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 3	149
Spectre 15-1 : RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 3 , la zone aromatique	150
Spectre 16 : RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm}) du composé 3	151
Spectre 17 : Spectre HR- QTOF-ESIMS (+) du composé 4	154
Spectres 18: Série spectrale UV-Visible du composé 4 (ZHF8).....	157
Spectre 19: Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8)..	158
Spectre 19-1: Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement.....	159
Spectre 20: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8).....	159
Spectre 21: COSY (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8).....	160
Spectre 21-1: COSY (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8), étalement.....	160
Spectre 20-1: HSQC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement..	161
Spectre 20-2: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement..	162
Spectre 21-1: Spectre HMBC (400 MHz, , DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement	163
Spectre 21-2: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement..	164

Spectre 21 ; 21-2: Spectres HMBC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 , étalement..	164
Spectre 21-3: Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8)..	165
Spectres 22 : Série spectrale UV-Visible du composé 4 (ZHF8).....	166
Spectre 23 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 ..	166
Spectre 24 : Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 (ZHF8)..	167
Spectre 24-1 : Spectre RMN ¹³ C, J mod (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ _{ppm}) du composé 4 ..	167
Spectre 25: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 5	171
Spectres 26 : Série spectrale UV-Vis du composé 5	173
Spectre 27: RMN ¹ H (400 M Hz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 (ZH10).	175
Spectre 28: HSQC (400 M Hz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 (ZH10).....	176
Spectre 28-1: HSQC (400 M Hz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 (ZH10)	176
Spectre 29-1 : Expérience HMBC (400 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 , étalement	177
Spectre 29: Expérience HMBC (400 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 , étalement	179
Spectre 29-2 : Expérience HMBC (400 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 (ZH10)	179
Spectre 30: RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5	180
Spectres 31; 31-1: RMN ¹³ C & Jmod (100 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 , étalement ..	180
Spectre 32: RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD, δ _{ppm}) du composé 5 , étalement	181

❖ **Publication internationale**

1. Hanene Zater, Joëlle Huet, Véronique Fontaine , Samir Benayache, Caroline Stévigny, Pierre Duez, Fadila Benayache . Chemical constituents, Cytotoxic, antifungal and Antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.). Maire. 2016, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. Volume 9, Issue 6, 554-561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.016>

❖ **Communications internationales**

1. H. Zater, A. Boudjerda, J. Huet, S.O. Ribeiro, S. Benayache, V. Fontaine, C. Stévigny, P. Duez, F. Benayache. Antimicrobial effects of aerial parts from Algerian centaury. in "62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung - GA)" , Guimarães, Portugal, 2014. *Planta Medica* 2014; 80 - P1L96. DOI: 10.1055/s-0034-1394753.
2. Zater H, Huet J, Benayache S, Kaabeche M, Stevigny Caroline, Ongena M, Benayache F, Duez Pierre, "Study of the antifungal activity of different extracts of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (coss. & durieu)" in AFERP & STOLON International Symposium, Brussels, Belgium, 2013 (2013)
3. Zater H, Huet J, Benayache S, Ngezahayo J., Fontaine V., Stevigny Caroline, Ongena M, Benayache F, Duez Pierre, "Antifungal activity and direct antimicrobial effect of different extracts of *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (coss. & dur.)" in European Life Sciences Summit, Biomedica 2013, Aachen, Germany, 2013 (2013).

Introduction générale

Introduction générale

La transmission du savoir-faire, par nos anciens, en matière de soin par des plantes s'est interrompue avec la médecine « moderne ». Cependant, ces dernières décennies, la plante médicinale effectue un retour en force, s'appuyant sur les connaissances et des valeurs sûres, testées de longues dates par nos ancêtres. Ainsi, il s'avère que les plantes médicinales constituent un trésor d'informations pour ceux et celles qui ont décidé d'aborder leurs maux quotidiens différemment, en tournant le dos à l'arsenal chimique de la médecine actuelle [1].

L'Algérie dispose d'énormes potentialités végétales, elles sont représentées par 3139 espèces végétales comprenant 314 espèces assez rares, 30 espèces rares, 330 très rares et 600 endémiques, dont 64 sont typiquement sahariennes. Parmi elles, 226 espèces sont menacées d'extinction et que la loi protège [2]. De part sa situation géographique, l'Algérie chevauche entre deux empires floraux: l'Holarctis (est le plus grand Royaume floristique du monde. Il contient la plupart de l'hémisphère Nord. Holarctis est situé en Europe, une grande partie de l'Asie et l'Amérique du Nord, également de la marge nord de l'Afrique) et le Paleotropis (Paleotropis couvre grande partie de l'Afrique (à l'exception de ses extrémités nord et au sud du continent), l'Inde, l'Asie du Sud et l'Indonésie - Paleotropis comprend toutes les régions tropicales de l'Ancien Monde. Cette zone est très riche dans le côté botanique; nous pouvons trouver ici 40 familles endémiques. Environ 50% de toutes les espèces tropicales est situé juste dans cette région floristique). Cette position lui confère une flore très diversifiée en matière d'espèces appartenant à différents éléments géographiques. Sur les 3139 espèces (5402 taxons en comptant les sous espèces, les variétés et les formes) décrites par Quezel et Santa (1962, 1963) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Zeraia (1983) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques. Le taux d'endémisme en Algérie est de 12,6 %. Parmi les espèces endémiques, nous pouvons distinguer 165 endémiques nord-africaines, 270 endémiques algériennes, alors que l'UICN (Union Internationale de la Conservation de la Nature) et l'ANN (Agence Nationale pour la Conservation de la Nature) ne signalent que 168 endémiques spécifiques à l'Algérie. Les endémiques sahariennes sont en nombres de 64, les endémiques algéro-tunisiennes au nombre de 50 et les endémiques algéro-marocaines au nombre de 104. La flore saharienne se caractérise par un endémisme développé, sur 650 espèces du Sahara septentrional, occidental et central 162 espèces sont endémiques, soit 25 %. La répartition des espèces entre familles et entre genres montre que 7 familles comptent plus de 100 espèces chacune. Il s'agit des composées (Asteraceae), légumineuses, poacées, crucifères, caryophyllacées, labiées et ombellifères avec respectivement 433, 411, 289, 171, 142, 142, 132 espèces [3].

Introduction générale

Les familles les mieux représentées dans la flore nationale sont celles des Asteraceae, citons à titre d'exemple la région steppique [4], l'ouest d'Alger [5], la Kabylie et les Babors [6].

Le genre *Centaurea* (tribu Cynareae) de la famille des astéracées est l'un des genres les plus répandus dans le monde, il compte environ 700 espèces [7]. En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 localisées au sud [8-10]. Bien qu'à notre meilleure connaissance, aucune utilisation ou étude pharmacologique traditionnelle ne soit rapportée jusqu'à présent pour l'espèce *Centaurea diluta* (*C. diluta*), plusieurs espèces de ce genre sont reconnues comme ayant des vertus médicinales. On peut citer à juste titre le bleuet (*Centaurea cyanus*) qui est encore utilisé comme remède oculaire (conjonctivite : l'infusion filtrée est employée en bains d'yeux et les pétales sont appliqués en cataplasme), mais son efficacité est contestée. Les pétales possèdent une action fortifiante, amère et stimulante ; ils facilitent la digestion, renforcent l'activité du foie et la résistance à l'infection. Les graines servent de laxatif léger chez l'enfant. Les feuilles, en décoction, soulagent les douleurs rhumatismales. En Turquie, les fleurs séchées de *C. cyanus* sont utilisées dans l'infusion pour soulager la diarrhée, gagner de l'énergie, augmenter l'appétit et pour soulager l'oppression thoracique. Une espèce voisine, *C. scabiosa*, plante de dimension supérieure, servait au moyen âge à fabriquer un onguent pour cicatriser les blessures et traiter les infections cutanées [11]. L'espèce *C. calcitrapa* est utilisée (infusion) comme une fébrifuge ; *C. jacea* est utilisée pour réduire la fièvre, commencer la menstruation, soulager la constipation et augmenter l'appétit [12,13]. En Tunisie, *C. furfuracea*, espèce endémique des régions désertiques du nord de l'Afrique [8], est utilisée comme astringent et diurétique [15], tandis qu'en Algérie les racines de *C. incana* sont employées dans le secteur des Aurès pour le traitement des affections hépatiques [16] et *C. pullata* est utilisé dans la préparation d'un plat traditionnel à base de couscous et d'herbes sauvages appelé «El Hammama» [17].

Plusieurs espèces de ce genre ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités comme le traitement du cancer [18], des infections microbiennes [19,20] et comme stimulant, tonique [21,22], antidiabétique [13-25], diurétique [23] antirhumatismale [26,27] analgésique [28], cytotoxique [29], antibactérien [30] et antifongique [31]. Des tests de recherche d'activité biologique des extraits chloroforme des espèces algériennes *C. musimomum*, *C. furfuracea*, *C. granata* et *C. maroccana* ont montré des activités cytotoxique et antiparasitaire [32].

Introduction générale

Le genre *Centaurea* présente une grande diversité structurale dans les principaux composés bioactifs, y compris les triterpènes, les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les lignanes et les lactones sesquiterpéniques [33-41]. Les études chimiques des espèces de ce genre ont montré également leur richesse en stéroïdes [42] et alcaloïdes [43,44]. Ces derniers sont largement présents dans le règne végétal et représentent une catégorie douée de propriétés biologiques multiples. Dans notre unité de recherche, plusieurs centaurées ont été étudiées, ces travaux ont mené à des résultats conformes à ceux de la littérature. En effet, ils ont montré des composantes sesquiterpéniques [21-24] et flavoniques [25-29] très importantes. Concernant *C. diluta*, dans le spécimen cultivé dans le jardin botanique de l'université technique de Braunschweig, Allemagne, des composés polyacétyléniques ont été rapportés [45-47]. Dans l'huile essentielle des parties aériennes *C. diluta* Aiton, poussant en Sicile, Italie, les composés les plus abondants étaient des acides gras et dérivés notamment l'acide hexadécanoïque (21,3%) et le (Z,Z)-9,12-octadécadiénoate de méthyle (12,2%), suivie par des hydrocarbures (15,3%), les terpénoïdes étant présents en faible quantité (2,8%) [48].

Compte tenu de l'intérêt pharmacologique et phytochimique de genre *Centaurea*, le présent travail est consacré à une sous-espèce relativement inconnue, *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Durieu) Maire [49] endémique à l'Algérie et au Maroc [7]. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche lancé par notre unité de recherche et ayant pour but la valorisation de la flore algérienne par la recherche et la détermination structurale de molécules bioactives accumulées par des espèces du genre *Centaurea* et consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification structurale de leurs métabolites secondaires ainsi que la recherche d'activités biologiques des extraits et des molécules isolées.

Dans le cadre de cette thèse, l'objet de notre travail concerne l'étude des propriétés antimicrobienne, antifongique et cytotoxique de l'extrait moyennement polaire (extrait chloroforme) obtenu à partir de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. Les résultats biologiques obtenus nous ont encouragés à procéder au fractionnement de cet extrait et à la réalisation de tests de recherche d'activités cytotoxique et antimicrobienne des composés isolés et identifiés.

Introduction générale

Le travail réalisé est reporté dans ce manuscrit sous forme de **cinq chapitres**.

- ⇒ Dans **le premier chapitre**, nous reportons des données sur la famille Asteraceae en général et sur le genre *Centaurea* en particulier. Nous abordons notamment certains groupes de métabolites secondaires accumulés par ce genre en développant la classe des flavonoïdes et la classe des lignanes. Nous reportons leurs différents squelettes, leur biogénèse, leurs diversités structurales et leurs intérêts thérapeutiques.
- ⇒ Nous consacrons **le second chapitre** à l'étude des activités biologiques avec la description des matériels et méthodes.
- ⇒ **Le troisième chapitre** renferme une présentation botanique et géographique de *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire suivie par une description macroscopique et microscopique. Nous détaillons par la suite nos travaux d'extraction, de séparation et de purification des métabolites secondaires.
- ⇒ **Le quatrième chapitre** renferme l'identification structurale des composés isolés par la combinaison des méthodes spectroscopiques modernes (UV-Visible, RMN mono et bidimensionnelle (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY) et de spectrométrie de masse à haute résolution à ionisation par électro-ébulisaison (electrospray) en mode positif [ESI-HRMS (+)].
- ⇒ **Le cinquième chapitre** reporte la discussion des résultats des tests de recherche d'activités biologiques.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives.

Références bibliographiques

- [1] Hseini S, Kahouadji A. Etude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental) *Lazaroa* 2007 ; 28: 79-93.
- [2] Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture Deuxième rapport national sur l'état des ressources, Algérie INRAA Juin 2006 ; p12, 18.
- [3] Chouaki S, Bessedik F, Chebouti A, Maamri F, Oumata S, Kheldoun S, Hamana M.F, Douzene M, Bellah F, Kheldoun A. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. INRAA / Juin 2006.
- [4] Benkhattou A, Azouzi B, Djili K, Benkhattou M, Zedek M, Saadi R. diversité floristique du massif du Nador en zone steppique (Tiaret, Algérie) *European Scientific Journal* July 2015;11(21) ISSN: 1857-7881(Print) e- ISSN 1857- 7431.
- [5] Siab-Farsi B, Kadid Y, Khelifi La H. Flore vasculaire du massif du Mont-Chenoua (Algérie). *Biologie et écologie. Rev For Fr* 2016 LXVIII.
- [6] Gharzouli R, Djellouli Y, Diversité floristique de la Kabylie des Babors (Algérie). *Sécheresse* 2005; 16 (3) : 217-23.
- [7] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963(2) :1030-1032.
- [8] Harborne, J.B. *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge;1994.
- [9] Ozenda P. Flore du Sahara septentrional et central. Paris: CNRS;1958: 450-454.
- [10] Harborne JB, Williams CA. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 2000; 55(6):481-504.
- [11] *Encyclopedia of Medicinal Plants*, Dorling Kindersley Limited, Londres 2001(2): 185.
- [12] Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). *GUJSci* 2004; 17(4):149-164.
- [13] Baytop T. *Türkiyede Bitkilerile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1999; 316.
- [14] Alapetite, GP. Flore de la Tunisie. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne: Tunis ; 1981; P. 1060.
- [15] Jarraya R, Chaeib M, Damak M. Screening des plantes à alcaloïdes au sein de la flore Tunisienne. *Plant Med Phytother* 1993; 26:177-189.

Introduction générale

- [16] Aclinou P, Boukerb A, Bouquant J, Massiot, G, Le Men-Olivier, L. Plantes des Aures : Constituants des racines *Centaurea incana*. Plant Med Phytother 1982; 303–309.
- [17] Djeddi S, Karioti A, Sokovic M, Stojkovic D, Seridi R, Skaltsa H. Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. J Nat Prod 2007; 70(11):1796-1799.
- [18] Grieve, M. A Modern Herbal; Dover Publications, Inc.: New York, NY, USA, 1971.
- [19] Kumarasamy Y, Nahar, L, Cox PJ, Dinan LN, Ferguson FR, Finnie DA, Jaspars M, Sarker SD. Biological activities of lignans from *Centaurea scabiosa*. Pharm Biol 2003; 41: 203-206.
- [20] Panagouleas C, Skaltsa H, Lazari D, Skaltsounis AL, Sokovie M. Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. Mixta, growing wild in Greece. Pharm Biol 2003; 41: 266-270.
- [21] Bitar IE, Mofradat Al-Adwiah Wa Al-Agzia; Al-Zharia Press: Cairo, Egypt, 1980; p. 148.
- [22] Wat JM, Breyer-Brandwijk, MG. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, E. & S. Livingstone Ltd.: Edinburgh, London, UK, 1962(2):210.
- [23] Monya M, Racz G. Content of flavonosides in some species of the genus *Centaurea* L.I. Chromatographic studies. Plant Med Phytother 1974; 8: 126.
- [24] Masso JL, Bertran MN, Adzet T. Contribution to the chemical and pharmacologic study of some species of *Centaurea* (Compositae). Plant Med. Phytother 1979; 13: 41-45.
- [25] Kaij-A-Kamb M, Amoros M, Girrel L. Chemistry and biological activity of the genus *Centaurea*. Pharma Acta Helv 1992; 67:178-188.
- [26] Gonzalez AG, Bermejo J, Caberar I, Galido A, Masenet GM. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifera*. Ann Quim 1977; 73, 86.
- [27] Negrette RE, Latorre I, Backhouse N, Delpote C. Guaianolides from *Centaurea scoparia*. Plant Med Phytother 1988; 53: 503.
- [28] Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. J Appl Sci Res 2012; 8(6):2876-2880.
- [29] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia 2005; 76:744-746.
- [30] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. J Serb Chem Soc 2011; 76:27-34.

Introduction générale

- [31] Skaltsa H , Lazari D, Panagouleas C, Georgiadou E, Garcia B, Sokovic M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry* 2000; 55(8):903-908.
- [32] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 2005; 76: 744-746.
- [33] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, et al. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett* 2009; 2:114-118.
- [34] Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *J Braz Chem Soc* 2012; 23(5):977-983.
- [35] López-Rodríguez M, García V P, Zater H, Benayache S, Benayache F. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Cryst* 2009; E65: o1867-o1868.
- [36] Shoeb M, MacManus SMM, Nahar L, Jaspars M, Celik S, Sarker SD, et al. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Braz J Pharmacog* 2007; 17:155–159.
- [37] Shoeb M, Jaspars M, MacManus S, Celik S, Kong-Thoo-Lin P, Sarker S. Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from *Centaurea dealbata*. *Ars Pharm* 2006; 47(4):315-322.
- [38] Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin PK, et al. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry* 2006; 67(21):2370-2375.
- [39] Gousiadou C, Skaltsa H. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochem Syst Ecol* 2003; 31:389-396.
- [40] Flamini G, Bulleri C, Morelli I. Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochem Syst Ecol* 2002; 30(11):1051-1054.
- [41] Öksüz S, Serin S. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry* 1997; 46(3):545-548.
- [42] Negrete RE, Backhouse N, Prieto P, Mejias H, Camargo RC, Cassels BK, Breitmaier E, Hartmann R. Steroids, A lignan and A flavonoid from *Centaurea melitensis* L. *Plantes médicinales et phytothérapie* 1989; (23)4:293-304.

Introduction générale

- [43] Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry* 2001;57(8):1273-12.
- [44] Kumarasamy Y, Fergusson M E, Nahar L, Sarker SD. Bioactivity of Moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharm Biol* 2002; 40(4): 307-310.
- [45] Bohlmann F, Postulka S, Ruhnke J. Polyacetylenverbindungen, XXIV. Die Polyine der gattung *Centaurea* L. *Chem Ber* 1958; 91:1642-1656.
- [46] Bohlmann F, Rode KM, Zdero C. Polyacetylenverbindungen, CXVII. Neupolyine der gattung *Centaurea*. *Chem Ber* 1966; 99:3544-3551.
- [47] Bohlmann F, Wotschokowsky M, Laser J, Zdero C, Bach KD. Polyacetylenverbindungen, 15 1. Über die Biogenese von Tri- und Tetraacetylenverbindungen. *Chem Ber* 1968; 101(6):2056-2061.
- [48] Ben Jemia M, Senatore F, Bruno M, Bancheva S. Components from the Essential oil of *Centaurea aeolica* Guss. and *C. diluta* Aiton from Sicily, Italy. *Rec Nat Prod* 2015; 9: 580-585.
- [49] Jahandiez E, Maire R. Catalogue des plantes du Maroc. Tome III. Dicotylédones et Supplément aux volumes I et II. *Cat Pl Maroc* 1934; 3: 813-814.

Chapitre I



La famille des Astéracées

& le genre Centaurea

Généralités sur les

métabolites secondaires



I. La Famille des Astéracées (Asteraceae)

Dans cette partie nous allons présenter des informations bibliographiques, nécessaires sur la famille des Asteraceae, le genre *Centaurea*.

I. 1. Généralités

Nom scientifique : Asteraceae → <u>Martynov</u> (1820)	} [1]
Synonyme : Compositae → <u>Giseke</u> (1792)	

Astéracées (Astérales) du genre *Aster* (nom grec et latin de diverses fleurs en étoile, du grec *astêr*, astre). Il s'agit de la famille la plus vaste dans toutes les flores du monde et principalement dans les régions tempérées et la plus importante des plantes à ovaires.

A l'échelle de notre planète, elle comprend près de 25000 espèces connues, groupées en 1500 genres environ repartis en 17 tribus répandues à travers le monde [2,3]. Elles sont caractérisées par des fleurs formant des inflorescences très denses, avec des anthères adhérentes les unes aux autres. En Algérie, elle est représentée par 109 genres et plus de 408 espèces [4].

Les Astéracées sont une des plus belles réussites de l'évolution. Un fait le prouve sans conteste : le grand nombre de ses espèces. En effet, dès que la nature a réalisé un type d'organisation biologiquement réussi, elle multiplie ce type à un très grand nombre d'exemplaires; et inversement, on peut dire que les familles véritablement archaïques sont toujours de petites familles, peu homogènes et mal délimitées[5].

Famille numériquement la plus importante des angiospermes cesont une grande famille de plantes dicotylédones, appelées aussi Composées (qualifie une feuille formée de plusieurs folioles, ou une inflorescence formée par la répétition d'inflorescence élémentaires identiques. (→ feuille, inflorescence [6]; se dit d'une feuille dont le limbe est divisé en sous-unités individualisées : ces divisions distinctes ou folioles, sessiles ou pétiolulées, ressemblant à autant de petites feuilles sont attachées au pétiole commun reconnaissable à ce qu'il est le seul à posséder à sa base un bourgeon axillaire et éventuellement des stipules. Exemple feuilles de l'Acacia ; se dit d'un tissu constitué de plusieurs types cellulaires en citant par exemple : tissu conducteur constitué de xylème et de phloème ; Qualifie un ovaire avec deux ou plusieurs carpelles (ovaire pluricarpellé), libres ou soudés entre eux ; se dit aussi d'une inflorescence dont l'axe principal porte lui-même des ramifications. Exemple : ombelle composée (d'ombellules) des Apiacées [7].

En effet, ce que l'on prend à première vue pour des « fleurs » chez ces plantes est en réalité composé de fleurs minuscules, réunies en inflorescences appelées capitules.

I.2. Distribution géographique de la famille Asteraceae

La famille a une distribution mondiale, des régions polaires aux tropiques, colonisant une grande variété d'habitats. Elle est plus fréquente dans les régions arides à semi-arides de latitudes subtropicales et tempérées inférieures. Les astéracées peuvent représenter jusqu'à 10% de la flore autochtone dans de nombreuses régions du monde. Moins fréquentes dans les forêts tropicales humides[8].

I.3. Description botanique de la famille Asteraceae

Botaniquement, Ce sont très majoritairement des plantes herbacées, renferment dans leurs tissus des cellules ou des canaux sécréteurs résineux, laticifères ou oléifères [9], des arbustes des arbres ou des lianes. Latex souvent présent (Lactucoïdeae surtout). Ce sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces avec cependant quelques espèces arborescentes. A peu près toutes les formes végétales y sont connues [10].

I.4. Caractéristiques de la famille Asteraceae

I.4.1. Appareil végétatif

I.4.1.1. Habitus

Herbes érigées ou grimpantes, parfois arbustes ou arbres (*Vernonia*). Parfois Latex blanc. Les *Senecion* et *Espeletiades* hautes montagnes tropicales sont des arbustes monocaules terminés par un mouchet de feuilles (modèles de Corner) [8].

On y trouve surtout des plantes herbacées, vivaces. (Figure I.1). En prenant le genre Sèneçon (1 300 espèces) comme exemple, on trouve :

- des herbes annuelles : des jardins;
- des herbes vivaces : de plaine, comme le Sèneçon Jacobée ;
- des arbustes et des arbres (Sèneçons arborescents des montagnes africaines ou andines);
- des Sèneçons tropicaux plus ou moins cactiformes;
- des lianes [11].

I.4.1.2. Feuilles

Alternes, rarement opposées ou verticillées, exstipulées, parfois en rosettes basales (ou terminales chez les arbustes monocaules), simples, entières ou découpées, parfois composées. Pas de stipules [8,11].

Les Astéracées sont pourvues d'un appareil sécréteur ordinairement bien développé :

- **Cellules et canaux sécréteurs à essence, poils sécréteurs.** Certaines espèces sont ainsi très aromatiques et utilisées comme telles (Camomille, Armoise, Estragon...).
- **Laticifères** comme chez le groupe des *Chicorées* et plantes affines (Pissenlit, Laiterons...). Lorsqu'on brise la tige de ces plantes, il s'exsude un suc blanchâtre (pendant la dernière guerre, les Russes ont extrait du caoutchouc à partir de certains Pissenlits.)

Les Astéracées sont riches en polyacétyléniques et en lactones sesquiterpéniques [12]. Abandonnant les alcaloïdes de types classiques ainsi que les iridoïdes, auxquelles les prédateurs avaient eu le temps de s'adapter, les Astéracées ont été les premières (avec les Apiacées, autre famille évoluée) à utiliser ces composés, ce qui a favorisé leur suprématie actuelle. Leurs organes de réserve contiennent de **l'inuline** (Les inulines sont des polysaccharides «sucres simples de type fructose liés entre eux» produits naturellement par de nombreux types de plantes); exemple : les tubercules de Topinambour [8].

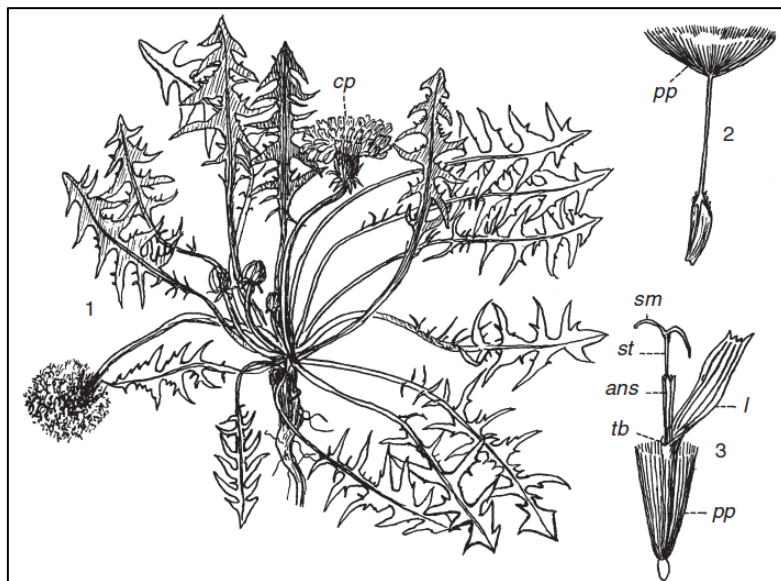


Figure I.1 : *Pissenlit*. 1, port de la plante; *cp*, capitule; 2, akène; 3, fleur ligulée à 5 dents; *pp*, pappus; *sm*, stigmat; *ans*, anthères soudées en un tube autour du style, *st*; *l*, ligule [11].

I.4.1.3. Appareil reproducteur

Les Astéracées sont caractérisées par :

- ✓ l'inflorescence en capitule;
- ✓ les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entre elles «synanthérées»;
- ✓ le fruit, un akène généralement surmonté d'un pappus [8].

I.4.1.4. L'inflorescence en capitule

I.4.1.5. Description

L'inflorescence élémentaire des Astéracées est le capitule. Un capitule (Figure I.2) comprend un réceptacle sur lequel sont insérées de la base au sommet, en ordre spiralé :

- d'abord des bractées stériles « La disposition de ces bractées est fréquemment utilisée dans la diagnose des espèces » vertes (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses) formant un involucre,

- ensuite des petites bractées fertiles (Le capitule des Astéracées (comme celui des Jasiones, Scabieuses et Knauties) dérive vraisemblablement d'une inflorescence en cyme comme cela est encore visible dans le groupe des Ambrosies «chez lesquels les anthères ne sont également pas soudées». Non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur.

L'ensemble forme une « fleur composée », d'où l'ancien nom de la famille.

Les capitules élémentaires (parfois isolés : Pâquerette) sont généralement à leur tour diversement groupés en grappe, cyme, ou encore en corymbe.

I.4.1.6. Évolution du capitule

On doit considérer un capitule comme étant une inflorescence très condensée dont toutes les fleurs sont devenues sessiles et groupées sur un axe court et aplati (Figure I.2).

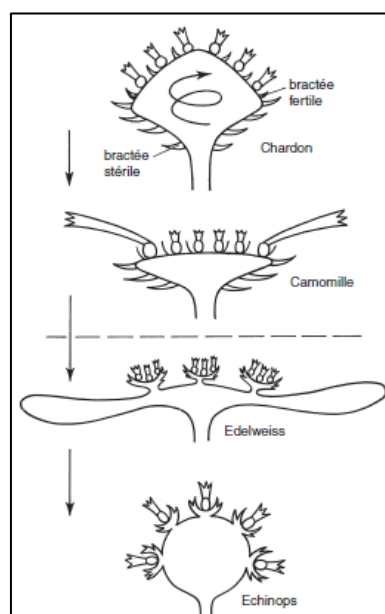


Figure I.2 : Le capitule chez les Astéracées. Schémas traduisant l'évolution [11]

Chez les espèces les plus primitives :

- le réceptacle est encore bombé;
- les bractées sont toutes présentes et ont la forme d'écailles;
- les fleurs élémentaires sont toutes semblables, hermaphrodites ou de même sexe, soit régulières et tubuleuses ou « fleuron », soit zygomorphes à corolle bilabée, soit zygomorphes et à pétales tous déjetés vers l'extérieur (fleurs ligulées) ou « demi-fleuron ». Puis :

- le réceptacle devient de plus en plus plat;
- les bractées se réduisent à des paillettes et même disparaissent;
- les fleurs du pourtour se modifient : soit légèrement : chez le Bleuet, les fleurs externes sont plus grandes à tube coudé et à pétales extérieurs légèrement plus grands (Figure I.3);

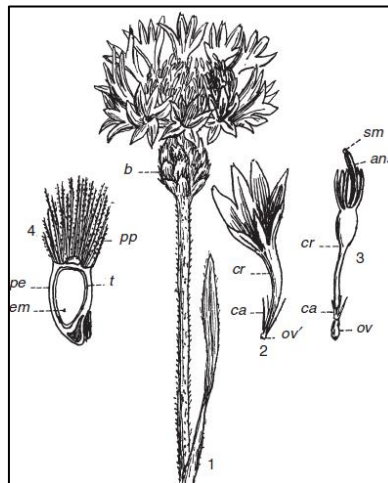


Figure I.3 : *Bleuet*. 1, capitule; 2, fleur périphérique; 3, fleur centrale; 4, coupe longitudinale de l'akène; *b*, bractée de l'involucre; *ca*, calice; *cr*, corolle; *ans*, anthères soudées; *ov*, ovaire; *ov'*, ovaire avorté; *sm*, stigmate; *pp*, pappus; *pe*, péricarpe; *t*, tégument séminal; *em*, embryon.

• soit plus profondément : les fleurs deviennent différentes de celles du centre par leur forme (elles sont ligulées, alors que les fleurs centrales sont tubuleuses) par leur sexualité (fleurs mâles, femelles ou hermaphrodites) et souvent par leur couleur (blanche, bleue, rouge... qui tranche sur celle des fleurs du centre, généralement jaunes (Figure I.4)) [11].

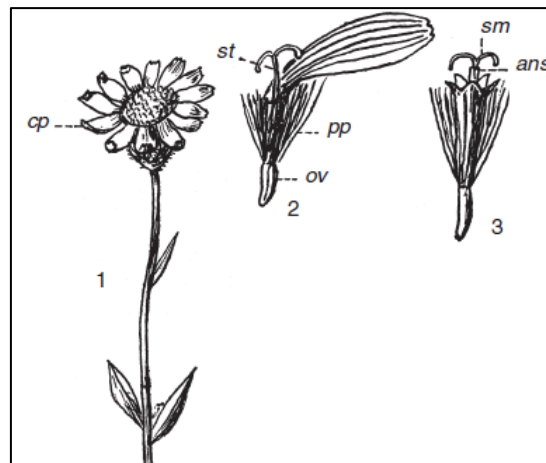


Figure I.4 : *Arnica* (Astéroïdées). 1, extrémité de la tige florifère; 2, fleur ligulée à 3 dents (demi-fleuron) de la périphérie du capitule; 3, fleur du centre, tubuleuse (fleuron); cp, capitule; sm, stigmate; st, style; ans, androcée synanthère; pp, pappus; ov, ovaire.

Ces fleurs, dont le rôle est essentiellement attractif, sont d'ailleurs souvent stériles (fleurs coudées des Bleuets (Figure I.3-2), fleurs ligulées des Marguerites).

Le capitule est alors comparable, biologiquement, à une fleur unique dont il prend l'aspect. Chez la « fleur de Marguerite », l'involucre simule le calice, les fleurs blanches du pourtour, une corolle et les fleurs du centre jaune, un androcée. Mais ici le nombre de bractées et des fleurs ligulées est indéterminé.

Au contraire, chez la Millefeuille, où les bractées sont encore nombreuses, il n'y a plus que cinq fleurs en forme de languette simulant une corolle pentamère et quelques fleurs tubulées au centre. Ainsi l'évolution, à partir de fleurs simples primitivement disposées en grappe, les condense en capitules... qui prennent à nouveau l'aspect de fleur : l'évolution a parcouru un cycle (notion de *pseudocycle*: Euphorbiacées).

Par *surévolution* (Figure I.2), un second cycle peut s'amorcer; il consiste à simplifier les capitules, à les grouper en capitules de capitules qui ressembleront à nouveau à des « fleurs » :
 - Chez l'Edelweiss, l'inflorescence est formée de deux à dix petits capitules, entourés de cinq à dix grandes bractées étalées; ce capitule de capitules simule une « fleur simple » [11].

- Chez les Echinops (sortes de Chardons à fleurs bleues), les capitules, réduits à une seule fleur entourée de plusieurs bractées, sont groupés en un capitule de capitules qui, s'il n'y avait pas l'involucre de bractées entourant chaque fleur, pourrait être pris pour un capitule simple.

I.4.1.7. La fleur

La fleur de type floral 5-5-5-2 a des anthères soudées et un ovaire infère uniloculaire (Figure I.5). Elle est petite, comme toutes les fleurs groupées en inflorescence contractée.

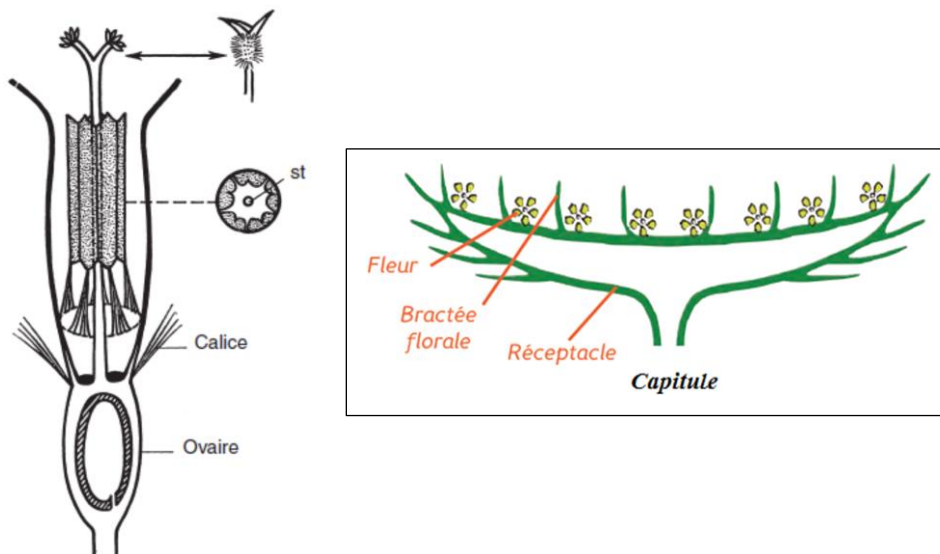


Figure I.5 : Coupe de la fleur des Astéracées mettant en évidence l'androcée synanthère (en grisé) et l'ovaire infère; st, style en haut et à droite, stigmates présentant à leur base un renflement de poils servant à collecter les grains de pollen.

Fleur : elle est pentamère 5S, 5P, 5St, 2C. Cyclique, hétérochlamyde, gamopétales, actinomorphe ou zygomorphe, isotémone, épigyne, bisexuée ou stérile [8].

I.4.1.7.1. Le calice

Le calice est très réduit, représenté par un simple bourrelet annulaire, des écailles ou des soies. Mais après la fécondation, comme chez les Valériacées, les soies s'allongent en forme d'aigrette, qui peut même devenir pédicellée par étirement du bourrelet calicinal (Figure I.1-2). Le *pappus* facilite la dissémination par les animaux ou par le vent.

I.4.1.7.2. La corolle

La corolle peut être régulière en tube ou irrégulière, soit bilabiée 2/3 ou 1/4 (comme chez les Lamiacées dans un groupe important surtout sud-américain, soit à une seule lèvre. Elles sont alors dites ligulées : la ligule se termine parfois en trois dents ou cinq dents, suivant que trois pétales ont été seulement déjetés en avant avec avortement des deux postérieurs ou que les cinq pétales ont été tous déjetés.

I.4.1.7.3. L'androcée

Les cinq étamines sont soudées :

- ✓ d'une part, à la corolle, par la base de leur filet;
- ✓ d'autre part, entre elles par leurs anthères (Cette soudure des cinq étamines par leurs anthères, fait que la dissymétrie de la corolle (fleurs bilabées ou ligulées) n'entraîne jamais l'avortement de l'étamine supérieure, ainsi qu'il est de règle chez les Astéridées à corolle zygomorphe). Les anthères réunies forment ainsi un manchon autour du style; leurs fentes de déhiscence sont tournées vers l'intérieur.

I.4.1.7.4. Le gynécée

L'ovaire est infère, uniloculaire et, bien que formé par la soudure de deux carpelles «ouverts», uniovulé (Très rarement et à titre exceptionnel, on peut trouver deux ovules, un par carpelle, chez quelques espèces du groupe des Artichauts : cela prouve qu'autrefois chacun des deux carpelles avait un ovule). Le style se termine par deux stigmates, qui portent une brosse de poils généralement sur leur sommet, parfois à leur base (Figure I.5).

I.4.1.7.5. La pollinisation

La pollinisation est très généralement entomophile (Elle est anémophile chez quelques genres : Armoises. Cette dernière est *Ambrosia* responsable de graves pollinoses). Un disque nectarifère se trouve au-dessus de l'ovaire [11].

I.4.1.8. Fruit

Akène surmonté généralement d'un pappus (cypsèle) provenant du développement du calice après fécondation. Graine a embryon droit, sans Albumen [8].

I.5. Utilisation de la famille Asteraceae

- Plantes alimentaires : tournesol (*Helianthus annuus*), rutabaga (*Helianthus tuberosus*), laitue (*Lactuca sativa*), endive et chicorée (*Cichorium endiva* et *Cichorium intybus*), artichaut et cardons (*Cynara cardunculus* et *Cynara scolymus*) et épices (*Artemisia dracunculus* L). Divers *Artemisia* sont utilisés en liquoristerie et en Ingrédient de liqueur comme: (*Artemisia plur. sp.*; *Artemisia genepi*, ; *Artemisia absinthium*), condiment comme l'Estragon (*Artemisia dracunculus*). Herbicide puissant comme le Pyrèthre (*Tanacetum cinerariifolium*).

En pharmacie : Semon contra (capitules d'*Artemisia nana* à santonine) vermifuge contre les Ascaris, teinture d'*Arnica montana* vulnéraire, infusion de Camomille (*Anthemis nobilid*) stomachique... La poudre de Pyrèthre (*Chrysanthemum pyrethrum*) est insecticide. L'huile de grain de Tournesol (*Helianthus annuus*) est siccative.

- Plante ornementale: De très nombreuses Composées sont horticoles : Souci (*Calendula*), Immortelle (*Helichrysum*), Œillet d'Inde (*Tagetes Chrysanthemum*, *Dahlia*, *Aster*, *Tanacetum*, *Rudbeckia*, *Tanacetum*, *Zinnia*, *Cosmos*, *Callistephus*, etc, mais il faut aussi y inclure de très «mauvaises herbes» [5].

- Quelques Composées fournissent des produits varies : caoutchouc naturel (*Taraxacum*), colorants, médicaments (*Artemisia*, *Anthemis nobilis* L., *Arnica montana* L.), insecticides (*Chrysanthemum cineraria Trev*) [5,6].

I. 5. Le genre *Centaurea*

I.5.1. Introduction

Le genre *Centaurea* (tribu Cynareae) de la famille des astéracées est l'un des genres les plus répandus dans le monde, il est distribué aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe méridionale, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et sur le continent Américain [9,13,14], compte environ 700 espèces [15]. Selon Mabberley [16], le genre *Centaurea* est distribué en Asie, Afrique tropicale, Europe et au Nord Américain.

En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 d'entre eux sont localisés au sud «Sahara» [17-19].

I. 5. 2. Description mythologique et botanique du genre *Centaurea*

Selon la mythologie, en XIV^{ème} siècle *Centoire* encore au XVII^{ème} siècle. Emprunté du latin *Centaurea*, « plante du centaure », ainsi nommée parce que ses propriétés médicinales auraient été découvertes par le centaure Chiron. *Centaurea* provient du grec *Kentaurion* qui signifie "Centaure". C'est une allusion au sage Chiron, un centaure érudit et guérisseur qui, d'après la légende, savait user des propriétés médicinales des Centaurées. *Centaurea* a été utilisée pour soigner la blessure au pied du sage Centaure Chiron, l'enseignant du dieu Grec de médecine «Esculape» causée par la flèche d'Hercule [20-23]. Selon Discordide, les latins on appelait les Centaurées par les noms «Unefera» ou «Phellerae» qui vient des mots latins "fel" "terrae" qui signifient "bile de laterre"; ce nom lui a été attribué à cause de son amertume [21] .

En matière botanique ; *Centaurea* Lest assez proche des chardons, mais qui s'en distinguent par les feuilles alternes polymorphes non épineuses. Capitules multiflores à fleurs homomorphes ou dimorphes. Involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Bractées soit homomorphes soit dimorphes, soit polymorphes. On y distingue pour la classification : les bractées extérieures (ou inférieures)' plus courtes; les bractées moyennes (dont la morphologie sera particulièrement exploitée); les bractées internes ou supérieures. Les bractées sont surmontées ou non par un appendice différencié. Cet appendice, très utilisé en systématique, peut être carieux ou non, penné, pectiné, triangulaire, décurrent (se prolongeant sur le corps de la bractée), armé, constitué par une ou plusieurs épines, etc.

Réceptacle plan ou subplan, garni de soies abondantes. Fleurs marginales généralement neutres et souvent rayonnantes; celles du disque hermaphrodites et \pm irrégulières. Anthères sagittées à la base. Style à branches courtes. Akènes oblongs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non. Aigrette soit absente, soit présente et simple ou double, persistante ou caduque. Plante herbacées, annuelles ou vivaces. La délimitation du genre varie considérablement suivant les auteurs. Nous en avons séparé les genres: *Serratula*, *Crupina*, *Rhaponticum*, *Stephanochilus*, *Volutaria* (Amberboa), etc., dont on trouvera les caractères

différentiels dans la clé générale des Cynarées. De nombreux hybrides ont été signalés dans notre dition. Ils sont mentionnés après la clé générale [24].

I. 5.3. Caractéristiques du genre *Centaurea*

Les Centaurées se caractérisent par leurs graines qui produisent un élaïosome ou éléosome (du grec Elaios = "huile" et Soma = "corps"), c'est à dire une substance ou sécrétion riche en sucres et en graisses, qui vont attirer les fourmis. Ces dernières vont transporter les graines jusqu'à leur nid ou la déplacer jusqu'à ce que la partie comestible se détache. C'est ce que l'on appelle la myrmécochorie "dissémination (des graines ou des organes) par l'intermédiaire des fourmis. (Du grec Myrmécos = "fourmis" ; Chor = "disséminer". Certaines Centaurées complètent ce dispositif par un pappus «Extension de poils située sur le fruit, destinée à faciliter sa dispersion par le vent. (Synonyme = "aigrette")» permettant un transport par le vent, c'est l'anémochorie (méthode de dissémination des graines ou des organes, par le vent. (Du grec Anemos = "vent" ; Chor = "disséminer") [25].

I.5.4. Les propriétés biologiques et pharmacologiques des Centaurées

(Voir introduction dans les pages 2 & 3).

I.6. Généralités sur les métabolites secondaires

Dans cette partie I.6, nous nous intéresserons essentiellement aux flavonoïdes & les lignanes ces classes étant les plus fréquemment rencontrées et notamment dans le cadre de nos travaux personnels.

I.6.1. Du végétal au médicament

La vie est apparue il y a 3,5 milliards d'années, d'abord dans l'eau puis à l'interface eau-terre. Vers -900 000 000, la vie s'est développée sur la terre ferme [26].

Le milieu de la terre primitive est un milieu hypermutagène (UV, pas d'ozone, radicaux libres, ...). Au début, il n'y avait pas d'O₂, donc les organismes vivants étaient anaérobies [27]. Puis l'O₂ est apparu et avec lui la couche d'ozone, ce qui a nécessité pas mal d'adaptations de la part des organismes, devenus ainsi aérobies. Peu à peu deux mondes se sont développés : celui des animaux et celui des végétaux. Il y a une co-évolution entre ces deux mondes, chaque espèce devant survivre et s'adapter aux autres espèces et à leurs changements.

Le but des végétaux est de se reproduire, se nourrir (élaborer de substances) afin de s'imposer dans un écosystème. Les végétaux sont immobiles, ils ont donc développé des systèmes de communication chimique, qui sont le résultat de sélections successives sous-tendues non pas par une finalité précise mais par le hasard [28].

Les lipides, glucides et protides sont des composés élaborés résultant du métabolisme primaire (photosynthèse, glycolyse, cycle de Krebs) [29].

Des erreurs se sont produites dans ce métabolisme : des mutations sporadiques ont permis l'apparition de nouveaux composés. Les composés les plus intéressants pour la plante sont conservés (sélection) et peu à peu la production s'affine (Figure I-6 & Figure I-7).

Ces substances particulières sont les métabolites non-primaires ou secondaires.

Les premiers phytochimistes pensaient que ces substances ne jouaient pour les végétaux qu'un rôle marginal. On s'est rendu compte que cela était faux et qu'au contraire elles exerçaient une action biologique essentielle pour les végétaux [30].

Ces substances sont de structures très variables. Les précurseurs de ces substances sont directement pris du métabolisme primaire [31].

Les métabolites secondaires sont donc asservis au métabolisme primaire, ce qui explique les variations qualitatives et quantitatives observées quand on étudie les plantes médicinales. En effet, le métabolisme primaire varie au cours du cycle végétatif et en fonction des paramètres physico-chimiques imposés (altitude, température, eau, rayonnement) ; cela engendre de grandes variations au niveau des substances primaires et donc au niveau des substances secondaires également [32].

Si on veut des métabolites secondaires standards (c'est à dire constants au niveau quantitatif et qualitatif), il faut standardiser les conditions de culture.

Comment comprendre que des substances élaborées par le végétal puisse agir sur nos systèmes à nous ?

Il existe des récepteurs communs chez les animaux et chez les végétaux, par exemple le récepteur au glutamate (transmission nerveuse chez les animaux, transmission du signal lumineux chez les végétaux). En fait, on a mis pas mal de récepteurs (donc de gènes car les récepteurs sont des protéines codées par des gènes) communs aux végétaux et aux animaux.

Les plantes ne peuvent pas accumuler dans leurs cellules de substances qui leur seraient toxiques mais ces substances peuvent être toxiques pour les animaux (par exemple *Conium maculatum*) [9].

Chez les animaux, l'action du métabolite secondaire se manifeste vis-à-vis de systèmes physiologiques et biochimiques (système nerveux, système respiratoire, système cardiovasculaire), qui font la différence avec les végétaux (qui ne possèdent pas de systèmes comme ceux-là).

I.6.2. Rôle des métabolites secondaires → Avantages évolutifs

➤ **Au niveau du métabolisme primaire**, par exemple :

La chlorophylle a un spectre d'absorption limité. La présence de pigments accessoires comme les caroténoïdes et les flavonoïdes permettent d'avoir un spectre d'absorption disponible pour les synthèses plus élevé. La plante peut ainsi croître dans de meilleures conditions.

→ Amélioration des synthèses

Certains pigments, par exemples les anthocyanes, qu'on retrouve dans les plantes de montagne permettent de protéger la plante des UV (car quantité d'UV ↑ quand altitude↑).

→ Amélioration de la protection contre les UV

Les pigments permettent aussi à la plante de résister à l'action oxydative des substances actives dérivées de l'oxygène : les caroténoïdes et les flavonoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres.

→ Amélioration de la protection contre les radicaux libres.

Chez l'Homme, de nombreuses pathologies (vieillesse, cancer, ...) sont liées aux phénomènes d'oxydation. Si les caroténoïdes et les flavonoïdes sont des anti-oxydants chez les végétaux, pourquoi n'exerceraient-ils pas la même action anti-oxydante chez les animaux ?

➤ **Au niveau des relations avec le monde extérieur**

Certains métabolites sont des messagers chimiques véhiculant des informations à l'encontre des végétaux et des animaux avoisinants. C'est la biocommunication.

Les plantes possèdent des moyens sophistiqués de défense contre les agresseurs : les messagers chimiques peuvent limiter la propagation d'autres espèces végétales, écarter les éventuels prédateurs, conférer une résistance contre l'invasion par des micro-organismes (certaines substances élaborées ont une action antibactérienne ou antifongique), ... Ex : la galle du chêne (épaississement des parois cellulaires et production d'enzymes et de phytoalexines qui bloquent le développement des parasites).

Les phytoalexines sont des substances sécrétées suite à une situation de stress (+ métabolisme primaire et secondaire). Elles peuvent être synthétisées sous forme inactives dans la plante et acquérir leur toxicité une fois à l'extérieur du végétal.

Ex : les hétérosides cyanogènes contenus dans des vésicules chez certaines plantes ne révèlent leur toxicité que lorsqu'un prédateur mange la plante.

La toxicité des phytoalexines apparaît en général en présence de micro-organismes et/ou de prédateurs. Ex : le resvératrol (IS dans l'eau) qu'on retrouve dans la peau du grain de raisin et qui a des propriétés anti-oxydantes et anti-tumorales (on en trouve beaucoup dans le vin rouge).

Dans les forêts tropicales, il y a compétition pour atteindre la lumière. Les plantes font donc de grandes et longues tiges pour atteindre la canopée. A la canopée (l'étage supérieur de la forêt), la production de phytoalexines est activée. → Les substances élaborées par la même plante en-dessous et au niveau de la canopée sont différentes (souvent, les substances synthétisées au niveau de la canopée sont plus actives).

- défense contre les herbivores (insectes, vertébrés ...).

- défense contre les moisissures et les bactéries.

- défense contre les virus.
- défense contre les autres plantes qui rivalisent pour lumière, eau et éléments nutritifs (ex : allélopathie).
- composés du signale attirer pollinisateur et les animaux disperser les graines disséminateur signaux pour communication entre plantes et micro-organisme symbiotique (rhizobium fixe N ou moisissures du mycorhize).
- la protection contre les rayons UV ou autre stress physique
- A sélectionné des fonctions physiologiques [33,34].

I.6.3. De la médecine traditionnelle au médicament moderne

On peut utiliser (Figure I.8):

- plante entière (tisanes, infusions, ...)
 - partie de la plante (tisanes, infusions, ...)
 - extrait (teintures, ...)
 - constituants actifs (alcaloïdes de la belladone par exemple)
 - constituants actifs purifiés (hyoscyamine, scopolamine)
- + héli-synthèses qui permettent de modifier les 2 alcaloïdes

Ex : - la butylscopolamine est non résorbée, donc son action est intestinale et pas centrale.

- l'isopropylatropine est indiquée dans le traitement de l'asthme [37,38].

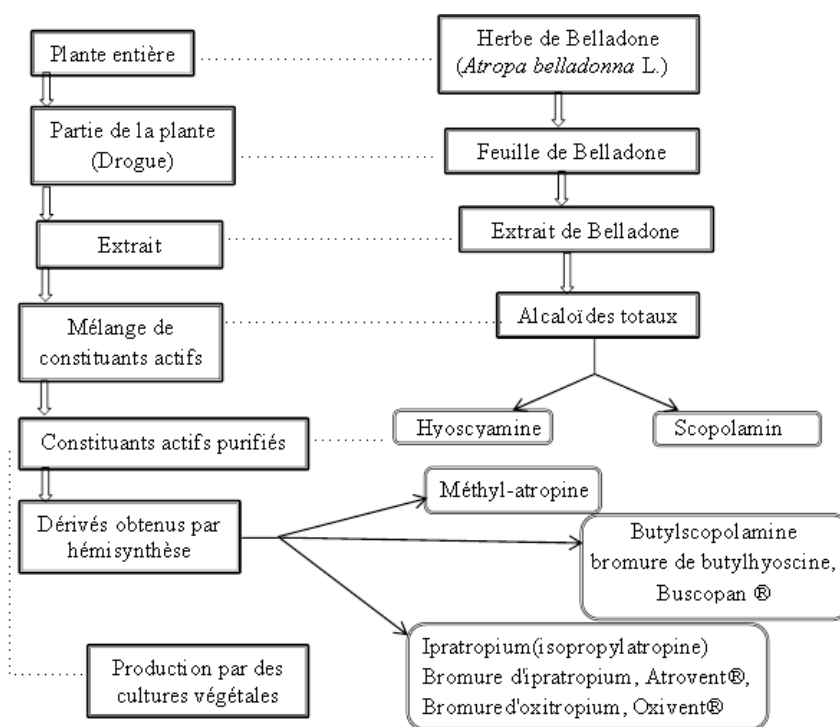


Figure I.7: De la médecine traditionnelle au médicament moderne

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante qui n'est pas encore parfaitement élucidé.

Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entre pas dans le métabolisme générale (primaire), ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétale (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétale lui – même, rôle de défense, rôle de résistance [35].

I.6.4. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité des composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine.

Les plantes photosynthétiques convertissent le dioxyde de carbone (CO₂) en métabolites primaires, qui sont nécessaires pour leur vitalité.

Les composés du métabolisme secondaire sont classés en 3 grandes classes (Figure I-6-1):

- les alcaloïdes et composés azotés
- les composés phénoliques
- les composés terpéniques (Figure I-6-2).

Ces molécules très diversifiées qui permet les tentatives d'une classification chimique des végétaux au chimiotaxonomie. Cette classification consiste à établir les corrélations entre la présence de certains types de métabolite secondaires et les entités taxonomique [35].

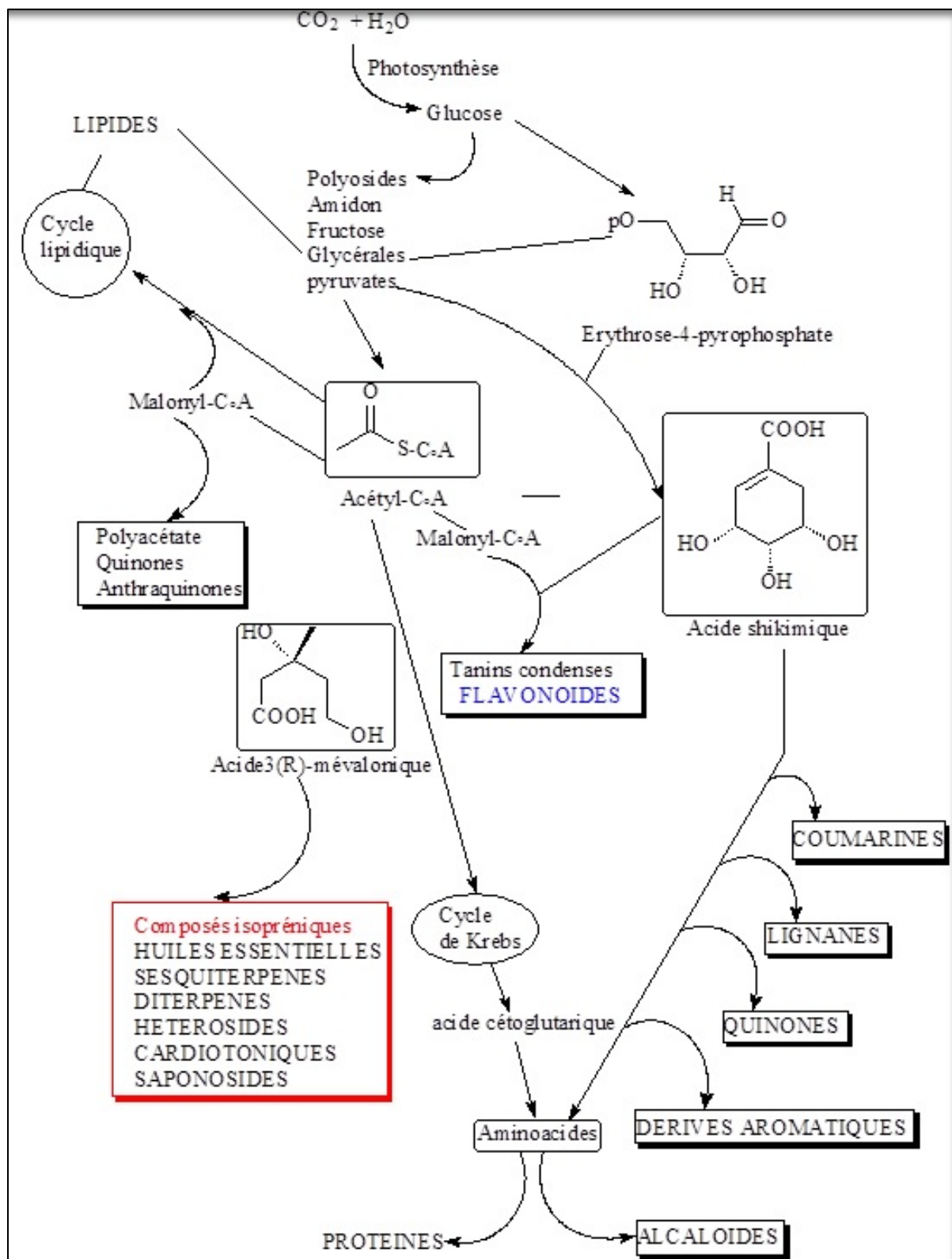


Figure I-6-1: Voies du métabolisme secondaire des plantes qui produisent les trois types généraux de composés secondaires : produits azotés, composés phénoliques et terpénoïdes. La relation avec le métabolisme primaire est également indiquée [36].

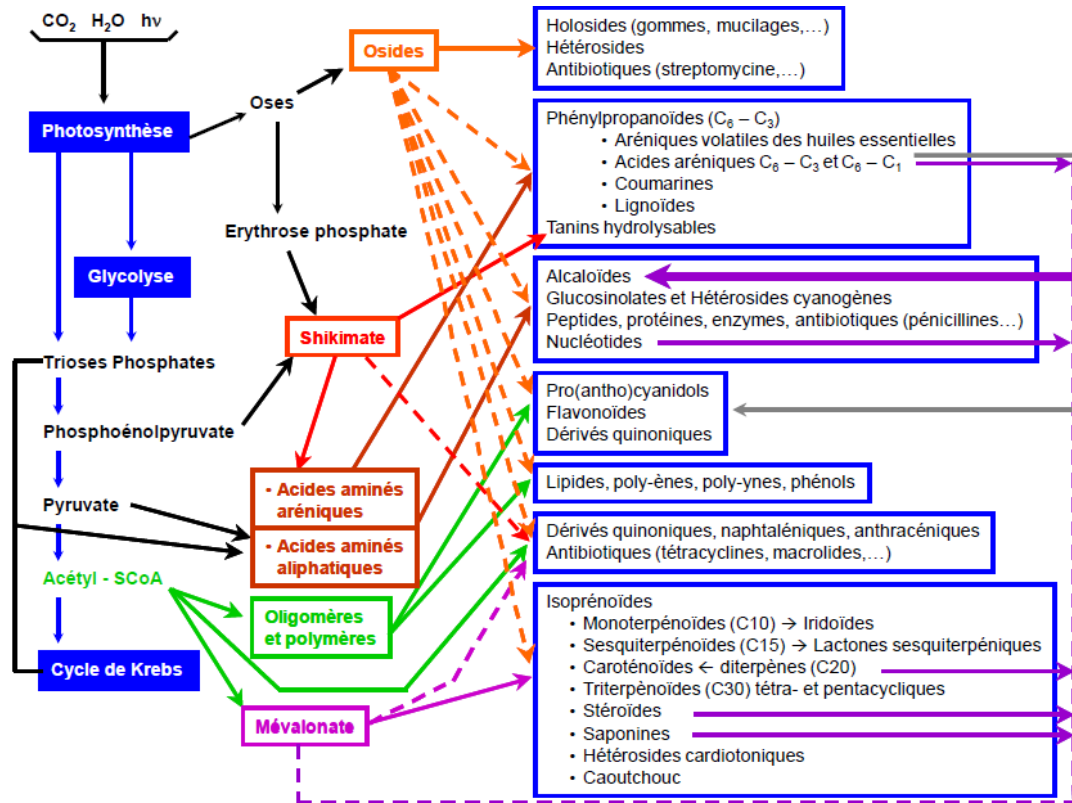


Figure I-6-2: Une source de biosynthèse de certaines variétés de produits du métabolisme secondaire

I.6.4.1. Les Molécules Phénoliques

Parmi les classes de molécules phénoliques qui nous intéresse

- ✓ Lignines: Rôle structurel ;
- ✓ Lignanes: Défense des pathogènes, antioxydants ;
- ✓ Flavonoïdes: Pigments, produits de défense, molécules signal [36].

Les molécules phénoliques sont des composés qui contiennent un groupe phénol «anneau aromatique avec un groupe hydroxyle» (Figure I.8). Ils peuvent avoir plusieurs différents substituants.

Dans l'air ces groupes sont facilement oxydés. Ils peuvent former des complexes avec les protéines et donner beaucoup de problèmes dans les extractions des protéines ou de l'ADN.

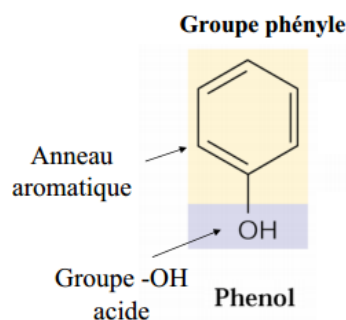


Figure I.8 : La molécule phénolique.

Parmi les composés phénoliques que nous avons isolés : la vanilline.

La vanilline est le composant primaire de l'extrait des gousses de vanille [36'] . L'extrait naturel de vanille est un mélange de centaines de composés.

La demande en arôme vanille a depuis longtemps dépassé la production en arôme naturel. En 2010, la demande annuelle était supérieure à 15000 tonnes et seulement 2000 tonnes de vanilline naturelle ont été produites. La différence est issue de la synthèse.

L'arôme artificiel de vanille, d'origine synthétique est une alternative à la vanilline pure. Sa production selon le procédé ex-catéchol, donne une vanilline extra pure. Elle répond aux critères les plus sévères pour l'application alimentaire et peut donc être utilisée en toute sécurité. La Vanilline confère l'arôme et l'odeur de vanille si populaire. Utilisée seule ou en formulation, la vanilline est l'arôme ou la fragrance la plus répandue dans le monde, elle est essentielle dans de nombreuses applications telles que la confiserie, les chocolats, la cuisine, les boissons mais aussi les parfums, la cosmétique et les détergents.

La molécule de la vanilline a des propriétés intéressantes et est utilisée comme intermédiaire de synthèse en pharmacie et agrochimie.

Les chimistes ont montré que l'arôme de vanille provient en grande partie de la vanilline, composé aromatique très puissant. Les gousses de vanille contiennent peu de vanilline: dans 1 kg de gousses, il y a 25 g de vanilline. Le prix de revient de la vanille est élevé: les extraits de vanille naturelle coûtent plus de 1500 € / kg! C'est pourquoi la vanilline naturelle est souvent remplacée par la vanilline synthétisée. Cette molécule à l'air d'être identique à celle extraite des gousses de vanille mais ne l'est pas. Cependant elle présente l'avantage de ne coûter que 15 € / kg environ.

La vanilline est utilisée dans de nombreuses applications:

- Formulation d'arômes alimentaires : chocolats, confiseries, pâtisseries, boissons, laitages, produits frais.
- Parfums et fragrances, masquant d'odeur (pneus, plastiques, ...), parfums d'ambiance
- Formulations pour la cosmétique, la maison, les détergents, ...
- Alimentation pour animaux
- Intermédiaires pour la pharmacie et l'agrochimie [36'].

I.6.4.2. Le rôle des composés phénoliques

I.6.4.2.1. Pour l'homme

Les métabolites secondaires des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés sont en grande mesure illustrés en thérapeutique [39].

En médecine les composés phénoliques qui font la base des remèdes pour l'homme :

En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, sommeil et désordre nerveux.

- Systèmes cardiovasculaires.
- Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoire.
- Contre le diabète.
- Les maladies du stress : ces métabolites ont une activité antioxydante tels le thé noir le thé vert, le cacao sont riches en composés phénoliques parmi lesquels le résvératrol et la procyanidine [40].

I.6.5. Généralités sur les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes [41].

I.6.5.1. Chimie des flavonoïdes

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure I-7). **A** est un cycle benzénique condensé avec **C**, hétérocycle pyramique qui peut porter un groupement carbonyle en position 4 auquel cas le noyau est appelé noyau 4-oxoflavonoïde, **B** est un noyau phénolique substituant de **C** soit en position 2 (flavonoïdes) soit en position 3 (isoflavonoïdes) (Figure I.9) [42- 44]. Ainsi, le nombre, la position et la nature des substituants déterminent différentes sous-classes de flavonoïdes (selon le degré de substitutions sur le noyau flavonoïde). Parmi celles présentant le plus d'intérêt, on peut citer les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les dihydroflavonols et les chalcones (groupement carbonyle en position 4) et les anthocyanidines [45].

Pour désigner chacun des flavonoïdes, plutôt que d'utiliser les terminaisons en «ol» (par exemple : quercétol, cyanidol), nous avons généralement préféré celles en «ine» (quercétine, cyanidine) qui sont les traductions directes de la nomenclature anglaise et qui ont l'avantage d'éviter des équivoques (par exemple en ne confondant pas le catéchol, phénol simple, et la catéchine qui est l'un des flavonoïdes). Dans certains cas cependant comme celui du kaempférol, on a gardé la désignation consacrée par l'usage, aussi bien en français qu'en anglais [46].

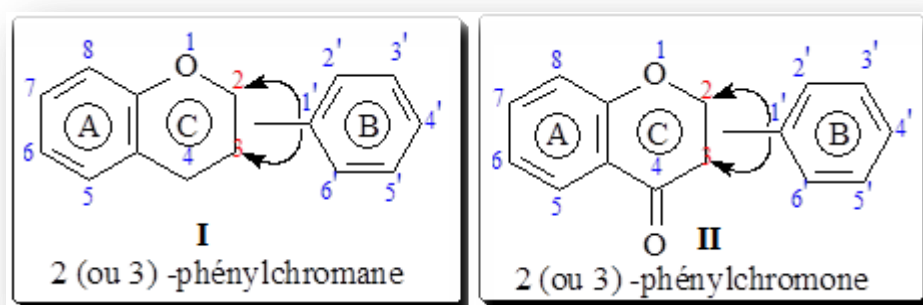


Figure I.9: Structure de base des flavonoïdes, noyau flavane (I) et noyau 4-oxo-flavonoïde (II).

I.6.5.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose.

Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figures I.10 & I.11). Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(*S*)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [47].

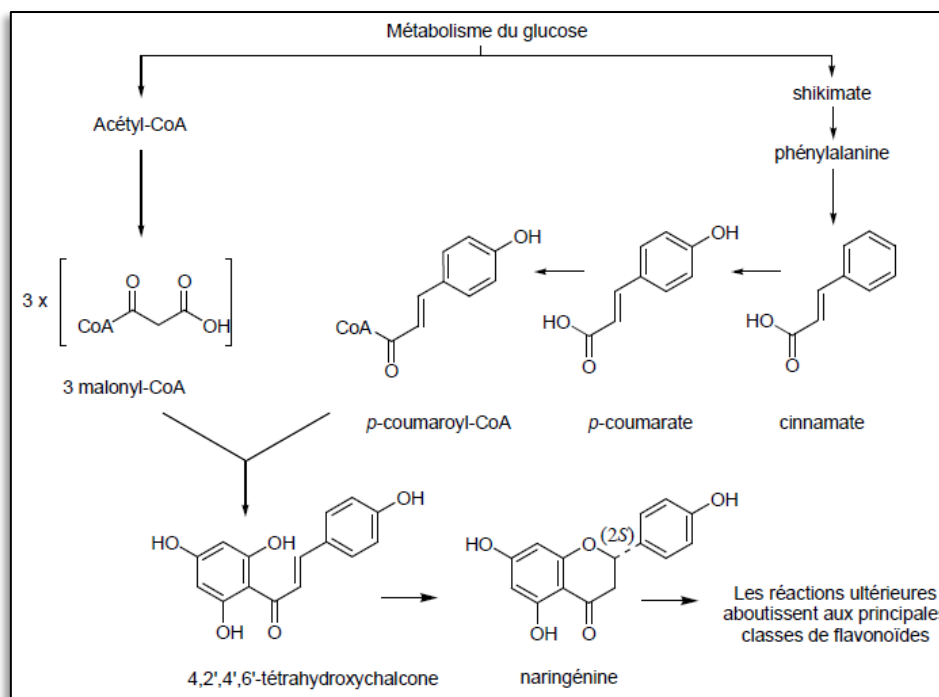


Figure I.10: Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes

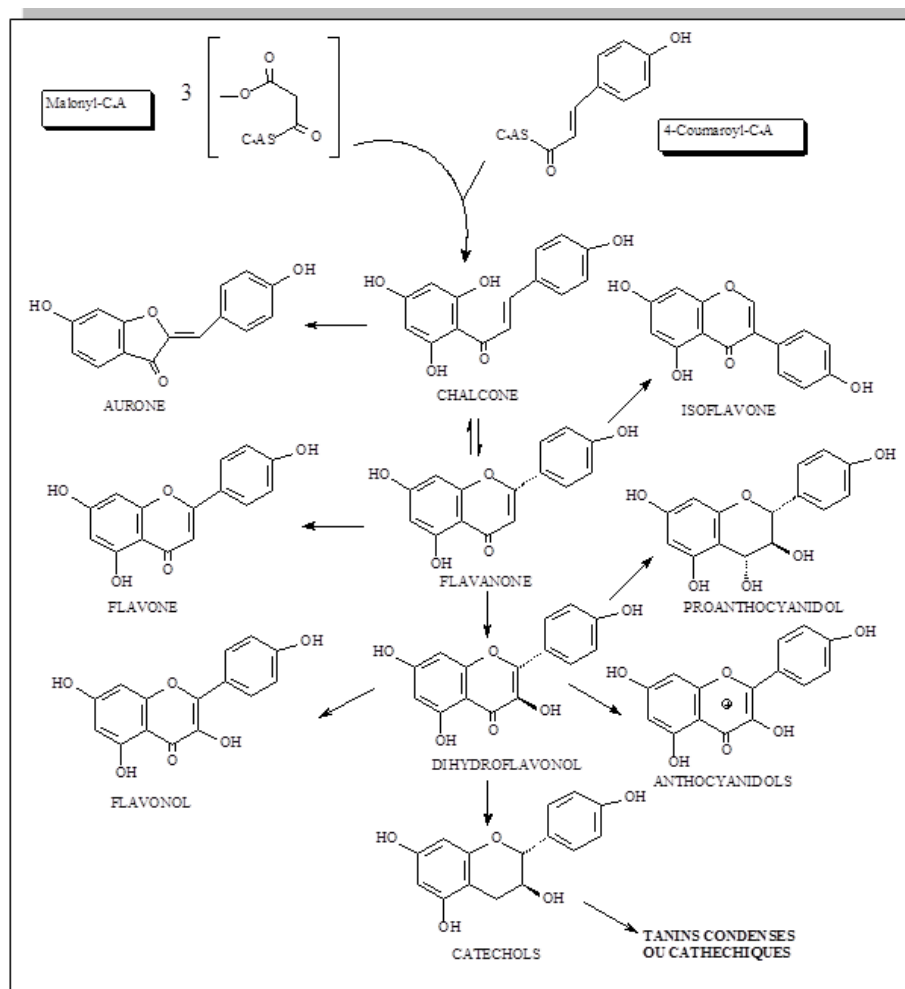


Figure I.11 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine d'après Heller et Forkmann [47].

I.6.5.3. Classes de flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées figure I-5, nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Figures I.12) [48]. Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [49].

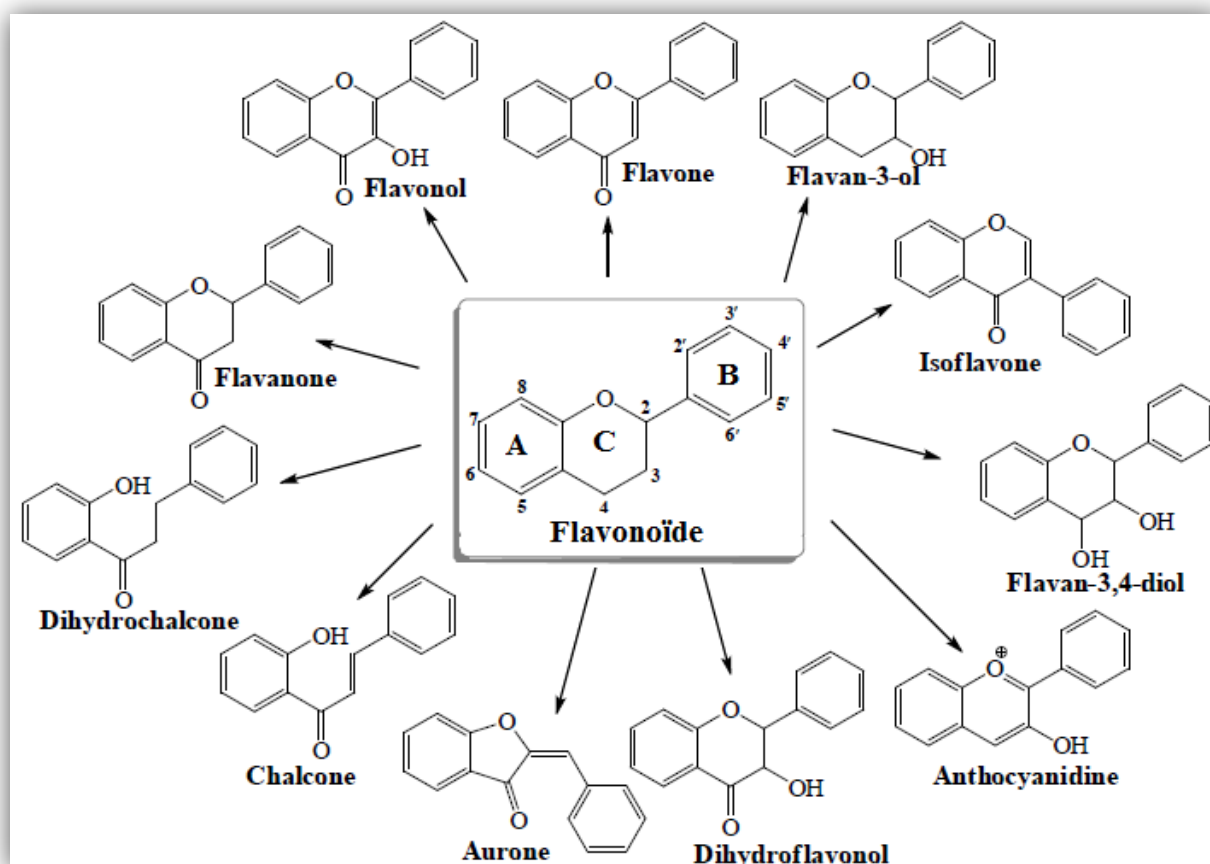


Figure I.12: Les diverses classes de flavonoïdes d'après Bruneton [49].

I.6.5.4. Rôle dans les plantes

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouges et bleues des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines). Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [50, 51].

I.6.5.5. Importance dans l'alimentation

La contribution au régime alimentaire humain des flavonoïdes est très importante : de 50 à 800 mg/jour en fonction de la consommation de fruits et légumes mais aussi de boissons comme le thé ou le vin rouge (environ 200 mg par verre ou tasse) [51]. On trouve également des flavonoïdes dans de nombreuses plantes médicinales et des préparations à base de plantes contenant de flavonoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle partout dans le monde [52].

I.6.5.6. Propriétés chimiques et activités biologiques

La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

- **Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux : suppression de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) [50].**

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ($O_2 \bullet$). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [50].

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques ($OH\bullet$). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer [52].

- **Piégeage de radicaux**

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène [50]. L'oxyde nitrique qui forme, en se combinant avec le radical superoxyde, le très délétère peroxyde est également piégé par les flavonoïdes. Le radical flavonoïde ainsi formé est stable et interrompt les événements de dégradation cellulaire initiés par l'attaque radicalaire [53].

I.6.5.7. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

- **les composés phénoliques et la santé**

L'organisme humain ne peut pas assurer la biosynthèse de tous les antioxydants en particulier ceux de nature phénolique, l'ingestion des polyphénols dans la ration journalière est un facteur nutritionnel important. Les composés phénoliques sont présents dans plupart des organes végétaux : graines (soja, moutard, riz, café, cacao) fruits (raisin, citrus, olive) feuilles (thé, nombreuse épices, romarin, thym) ou autres organes (oignon, jeune germination de blé et d'avoine, patate douce) ils se trouvent plus au moins transformés dans les produits industriels issus de ces végétaux : jus de fruits, bière, vin, thé, chocolat, huile d'olive et dérivés des céréales [46].

- **Action et intérêt des polyphénols**

En tant qu'antioxydants, tous les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infection, etc.) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ingerés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromoléculaires) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que cancers, maladies cardio-vasculaires ou ostéoporose.

Ils peuvent aussi interagir de manière spécifique avec des récepteurs cellulaires tels que les récepteurs des œstrogènes pour les isoflavones du soja, et induire ainsi des effets plus spécifiques sur l'organisme (par exemple inhibition par les isoflavones des bouffées de chaleur pour femme ménopausée) [54].

- **La prévention des maladies cardio-vasculaires**

La consommation des polyphénols se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation de lipoprotéines de faible densité (low Density Lipoproteins ou LDL) qui est l'un des facteurs clés du processus physiologique de

l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués).

Les polyphénols :

1. agissent pour inhiber l'oxydation des LDL par l'augmentation de la vasodilatation.
2. limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus.
3. agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères.

Deux études cliniques réalisées au Etats-Unis et au Chili ont montré que les polyphénols améliorent le fonctionnement de l'endothélium, la couche cellulaire qui tapisse les surfaces des vaisseaux sanguins et qui joue un rôle essentiel dans le contrôle du bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risque d'athérosclérose [54].

▪ La prévention du cancer

Parmi les propriétés biologiques intéressantes des polyphénols, la prévention du cancer. En effet, un certain nombre de recherches menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les polyphénols pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies cancéreuses [55].

De nombreuses études ont montré que trois types de cancers (sein, prostate et digestif) peuvent être fortement influencés par l'alimentation notamment l'apport en lipides et en antioxydants.

Note : Dans cette partie I.6.4, nous nous intéresserons essentiellement aux flavonoïdes de types flavone, flavonol, ces classes étant les plus fréquemment rencontrés et notamment dans le cadre de nos travaux personnels.

I.6.5.8. Analyse structurale des flavonoïdes par spectrométrie de masse

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse des flavonoïdes s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités d'échantillons bruts.

L'ESI et l'APCI sont des techniques qui génèrent principalement des ions moléculaires pour des métabolites relativement petits tels que les flavonoïdes [56]. Pour de nombreux auteurs, ce sont les techniques les plus adéquates pour l'étude des flavonoïdes [57,58].

I.6.5.8.1. Eléments d'identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse

L'interprétation de la fragmentation des flavonoïdes par spectrométrie de masse permet d'accéder à de nombreux éléments utiles pour leur détermination structurale, cela permet notamment d'établir la distribution des fragments générés entre les cycles A et B de la génine. L'étude minutieuse des schémas de fragmentation peut aussi aider à déterminer la nature, l'enchaînement et le site d'attache des oses portés par la génine.

I.6.5.8.2. Nomenclature

Dans ce chapitre, pour décrire les fragments de flavonoïdes obtenus par spectrométrie de masse, on utilisera le système de nomenclature proposé par Ma *et al.*, désormais communément utilisé [59]. Pour les génines, les notations $^{ij}\mathbf{A}^\pm$ et $^{ij}\mathbf{B}^\pm$ sont utilisées pour désigner les ions primaires produits contenant les cycles, respectivement A et B, intacts (i et j désignant les liaisons qui ont été scindées).

I.6.5.8.3. Fragmentation de la génine en mode positif

En mode positif, les fragmentations les plus utiles en terme d'identification de la génine sont celles qui ont lieu entre les liaisons C-C 1 et 3, 0 et 2 ou 0 et 4 sur le cycle C (Figures I-11), aboutissant à la formation des ions informateurs/diagnostiques $^{ij}\mathbf{A}^+$ et $^{ij}\mathbf{B}^+$ [16]. La fragmentation dépend de la classe de flavonoïdes étudiée et la valeur m/z des ions $^{ij}\mathbf{A}^+$ et $^{ij}\mathbf{B}^+$ indique clairement les substitutions respectives des cycles A et B [56].

Ma *et al.* ont étudié les voies de fragmentation en mode positif des génines de flavones et flavonols (en ionisation FAB sur un spectromètre à triple quadripôle (TQ), énergie CID : 30 eV) et ont permis de mettre en évidence les fragments caractéristiques de ces deux classes de flavonoïdes en interprétant les valeurs m/z de ces fragments [59] (Figure I-11).

L'ion $^{1,3}\mathbf{A}^+$, observé pour tous les groupes de flavonoïdes est le fragment le plus abondant. Dans le cas le plus fréquent où les positions 5 et 7 sont hydroxylées, $^{1,3}\mathbf{A}^+$ a une valeur de m/z 153 ou, en absence de cétone en position 4, c'est-à-dire pour les flavanes ou les flavanols, m/z 139. d'informations sont ceux résultant d'un clivage C-C sur le cycle C. La formation de ces ions peut [56]. Il existe des ions diagnostiques de certaines classes de flavonoïdes (Figure I-6). Typiquement, la fragmentation caractéristique en mode positif d'une flavone est le résultat de trois voies de fragmentation qui coexistent, dont deux correspondent à des réactions de rétro Diels-Alder. Elles produisent les ions $^{1,3}\mathbf{A}^+$, $^{1,3}\mathbf{B}^+$, $^{0,2}\mathbf{B}^+$, $^{0,4}\mathbf{B}^+$ et ($^{0,2}\mathbf{B}^+ - \text{H}_2\text{O}$). Comparés

aux flavones, les spectres CID des flavonols en mode positif sont beaucoup plus complexes car la présence d'un groupement OH en position 3 offre plus de possibilités de fragmentations [59]. On observe alors les ions $^{1,3}A^+$, $^{0,2}A^+$, $^{0,2}A^+ - CO$, $^{1,4}A^+ + 2H$ et $^{1,3}B^+ - 2H$ - [56,59]. Tous ces ions caractéristiques, ainsi que ceux des flavanones, sont illustrés (Figure I.13).

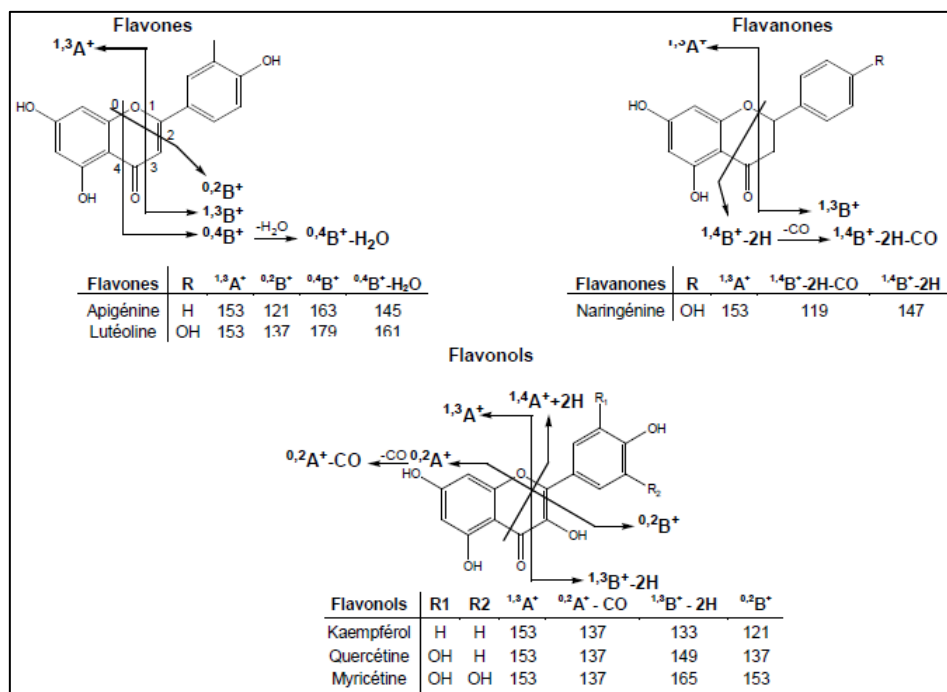


Figure I.13 : Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones, flavonols et flavanones (obtenues sur spectromètre Q-TOF avec source d'ionisation APCI ou trappe d'ion (IT) avec source ESI, énergie CID : 20-40 eV) d'après Wolfender *et al* [56].

L'étude de ces ions fragments permet de faire la distinction entre deux génines isomères appartenant à des classes différentes. A titre d'exemple, la figure I.14 présente les spectres MS/MS de la lutéoline (génine flavone) et du kaempférol (génine flavonol) donnant tous les deux un ion *quasi*-moléculaire à m/z 287.

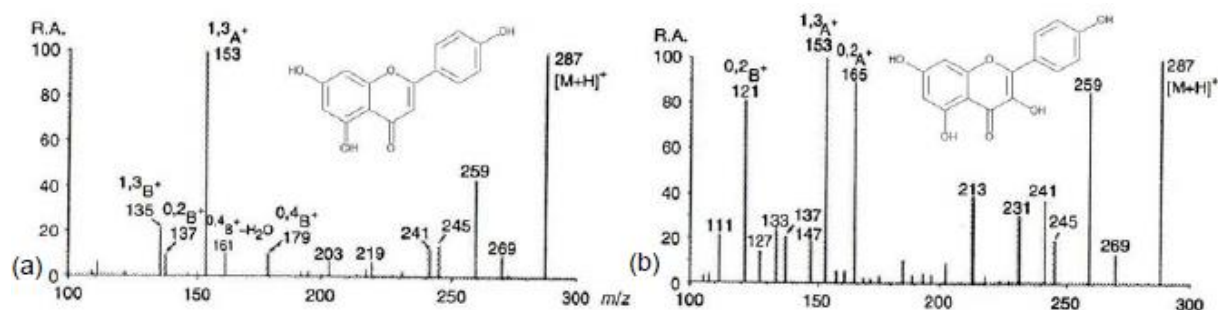


Figure I.14 : Spectre MS/MS de la lutéoline (a) et du kaempférol (b) obtenus par ESI en mode positif (analyseur TQ équipé d'une source d'ionisation FAB, CID de basse énergie).

En plus de la valeur m/z des fragments, leur intensité relative peut apporter des informations. Par exemple, il a été clairement démontré par Ma *et al.* [59] que l'énergie de collision employée pour la

fragmentation joue directement sur les abondances relatives des ions $^{1,3}\text{A}^+$, $^{0,2}\text{A}^+$ et $^{0,2}\text{B}^+$ [59]. En ESI ou APCI, une énergie de collision basse de 30 eV est optimale pour obtenir un maximum de fragments d'intensités exploitables [60].

I.6.6. lignoïdes : Introduction et classification

- Dérivés impliquant l'association d'unités phénylpropaniques (C6-C3)
- Très répandus
- Précurseurs de la lignine

Les lignanes ont été identifiés dans des arbres déjà au XIXe siècle [61,62]. Dans cette famille regroupant plus de 3 000 substances naturelles, il est historiquement possible de distinguer quatre groupes de composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques : lignanes, neolignanes, « oligomères » et norlignanes. De plus, il est d'usage courant de rattacher à cet ensemble les lignoïdes ou *lignanes hybrides* (flavanolignanes du chardon-Marie par ex.). Cependant, le terme lignane doit aujourd'hui être admis dans un sens plus large, ce qui permet d'englober un nombre important de cas particuliers autrement inclassables [63].

I.6.6.1. Définition

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936 [64], désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8') (Figure I.15).

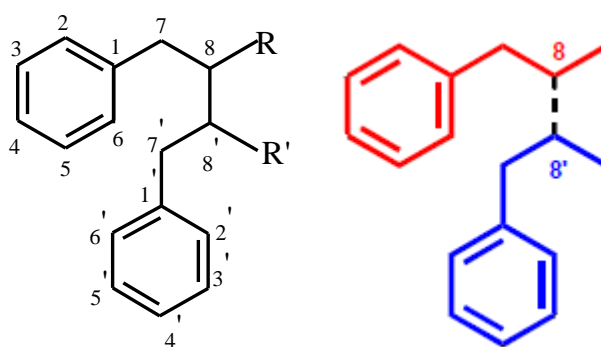


Figure I.15 : Squelette de lignane

Ces composés sont très répandus dans le règne végétal et possèdent de nombreuses activités biologiques, qui leur confèrent une importance non négligeable en thérapeutique. Ils ont montré des propriétés: antibactérienne, antifongique, antioxydante, antitumorale, antivirale, antihépatotoxique (flavanolignanes des akènes du chardon-Marie), anti-PAF, insecticides et oestrogéniques [65]

Lignanes : liaison 8-8' (carbones latérauxβ) de 2 unités C6-C3 \Rightarrow **Squelette C18**

(Figure I.16 & Figure I.17).

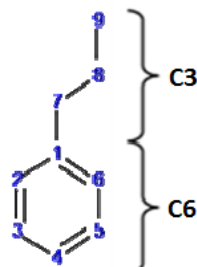


Figure I.16: structure générale d'un phénylpropanoïde

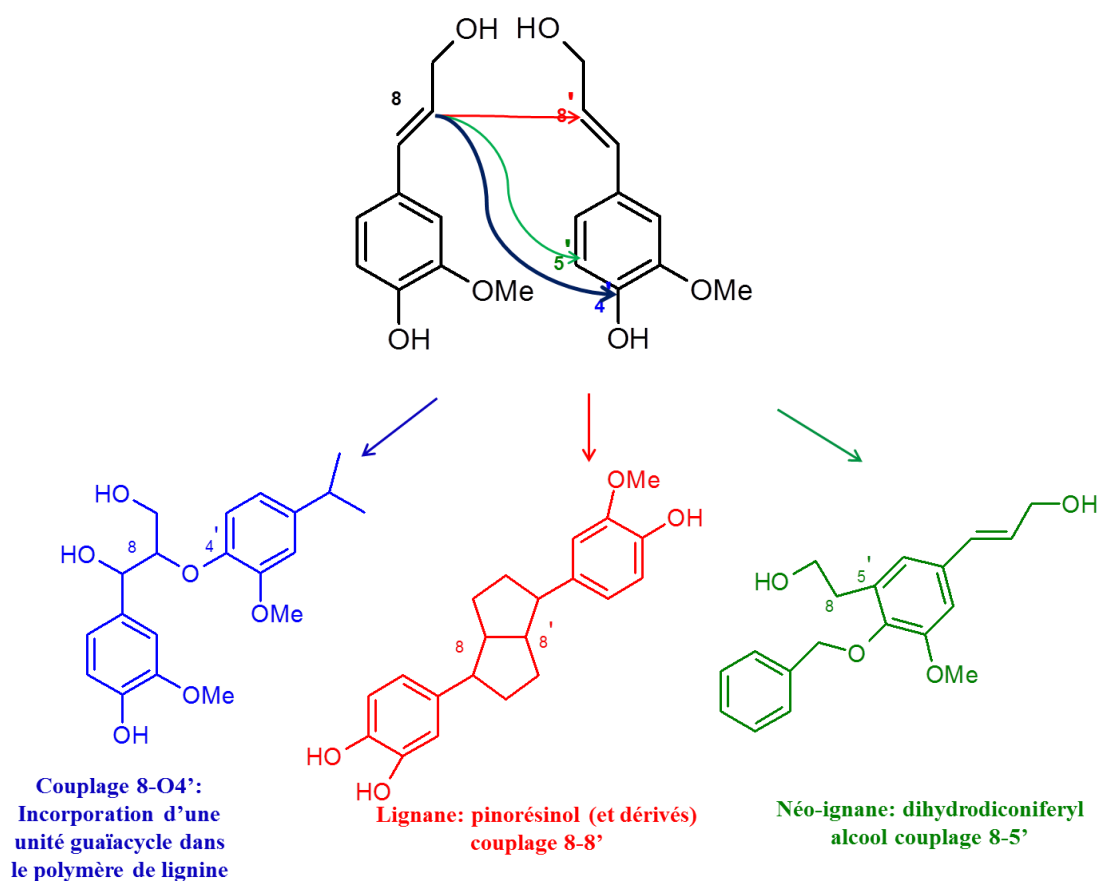


Figure I.17 : principaux dérivés issus de couplages oxydatifs de l'alcool coniferyl

I.6.6.2. Origine biosynthétique

I.6.6.2. A. Origine de la diversité chimique

La dimérisation d'unités en C6-C3 de types monolignols par des réactions de couplage radicalaire selon plusieurs schémas -cinq d'entre eux sont particulièrement importants -est à l'origine de la diversité de ces substances naturelles.

En théorie, il est possible de concevoir que l'oxydation sous l'effet d'oxydases (peroxydases, laccases) d'un précurseur, par exemple l'alcool coniférylique, conduise à un radical qui peut exister sous quatre formes mésomères limites. Ceci implique un grand nombre de couplages possibles parmi lesquels cinq sont fréquents (8-8', 8-1', 8-3', 8-O-4', 3-3') Les trois carbones de la chaîne latérale sont notés 7, 8 et 9 ou α , β , γ : la première de ces notations est fréquemment utilisée pour les lignanes *lato sensu* qui sont évoqués ici, la seconde est celle couramment admise quand on traite de la chimie de la lignine). même si d'autres sont également décrits. Quand l'électron est localisé sur le carbone 8, la molécule révèle un motif quinone-méthide hautement réactif du fait de son caractère électrophile très marqué (en comparaison des quinones correspondantes) (Figure I.18).

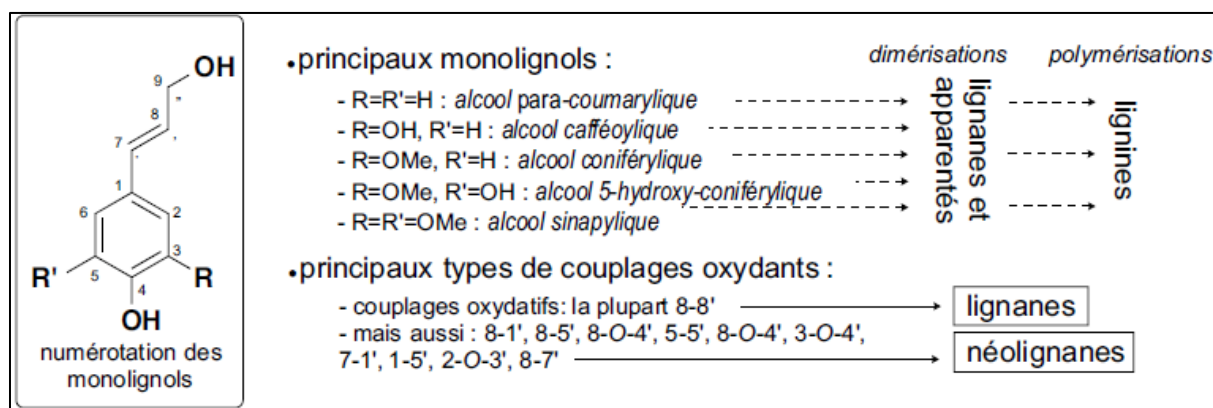


Figure I.18 : Unités en C6-C3 impliquées dans la biosynthèse des lignanes

I.6.6.2. B. Biosynthèse des lignanes *stricto sensu*

➤ L'étape-clé : une liaison carbone-carbone entre deux unités

Le terme de lignane désigne historiquement (il a été introduit par Haworth en 1937) et habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement - on verra qu'il est de nature radicalaire, d'une liaison entre les carbones 8 des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phenylpropane (liaison 8-8'). On dit aussi que ce sont des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques.

Les données expérimentales sont incomplètes et l'on ne peut donc présenter, sauf pour quelques molécules particulières, que des hypothèses partiellement vérifiées. Les lignanes

étant optiquement actifs, ils résultent d'un couplage stéréospécifique des carbones C-8 (cela a d'ailleurs été démontré la première fois chez des *Forsythia* spp.).

Des protéines particulières appelées « protéines dirigeantes », sans activité enzymatique et indépendantes des oxydases — elles sont probablement universelles chez les végétaux, prennent en charge les monomères oxydes sous forme radicalaire en assurant, dans le cas présent, le couplage 8-8' (qui n'est d'ailleurs pas thermodynamiquement le plus favorable). Que deux protéines portant chacune une unité en C6-C3 sous forme radicalaire s'associent ou comme propose récemment- qu'un même site actif au sein d'une même protéine puisse accueillir deux radicaux libres, le résultat est un rapprochement spatial dans un environnement chiral permettant la formation de la liaison carbone-carbone de façon stéréosélectivité tel qu'illustre avec la biosynthèse du (+)-pinoresinol à partir de l'alcool coniférylique (page ci-contre). De façon similaire, les lignanes dépourvus d'oxygène en positions C-9 et C-9' résultent probablement d'une même logique biosynthétique (couplage d'unités de type isoeugenol par exemple) (Figure I.19) [63,67].

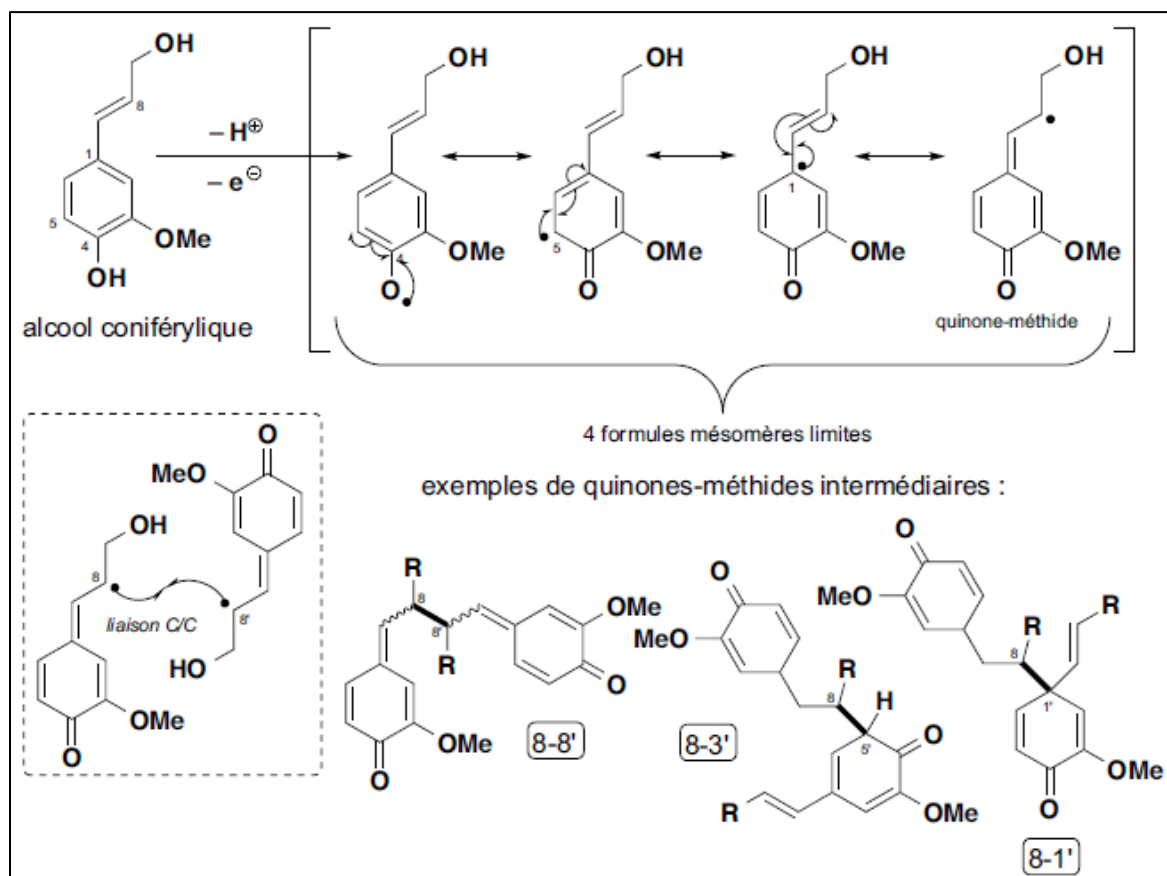


Figure I.19 : Biosynthèse des lignanes : dimérisations

I.6.6.3. Biosynthèse des lignanes : dimérisations

La réactivité des intermédiaires, notamment les méthides quinones, engendres après l'étape fondamentale de formation de la liaison carbone-carbone entre les deux monolignols et/ou des étapes enzymatiques supplémentaires, engendreront des cyclisations (On trouve alors parfois le terme de «cyclolignane» pour qualifier ces molécules possédant un cycle supplémentaire.) et modifications supplémentaires (réductions, oxydations, lactonisations, etc). Cela permet, chez les lignanes proprement dits, de distinguer habituellement six groupes structuraux fondamentaux. Les plus simples sont des dibenzylbutanes (liaison 8-8') qui, par cyclisation, peuvent engendrer trois types de lignanes monofuraniques (cyclisation 9-O-9', 7-O-9', ou 7-O-7') et des butyrolactones. La cyclisation peut impliquer un carbone aromatique (arylnaphtalenes) ou deux (dibenzo-cyclooctanes) (Figure I.20) [63].

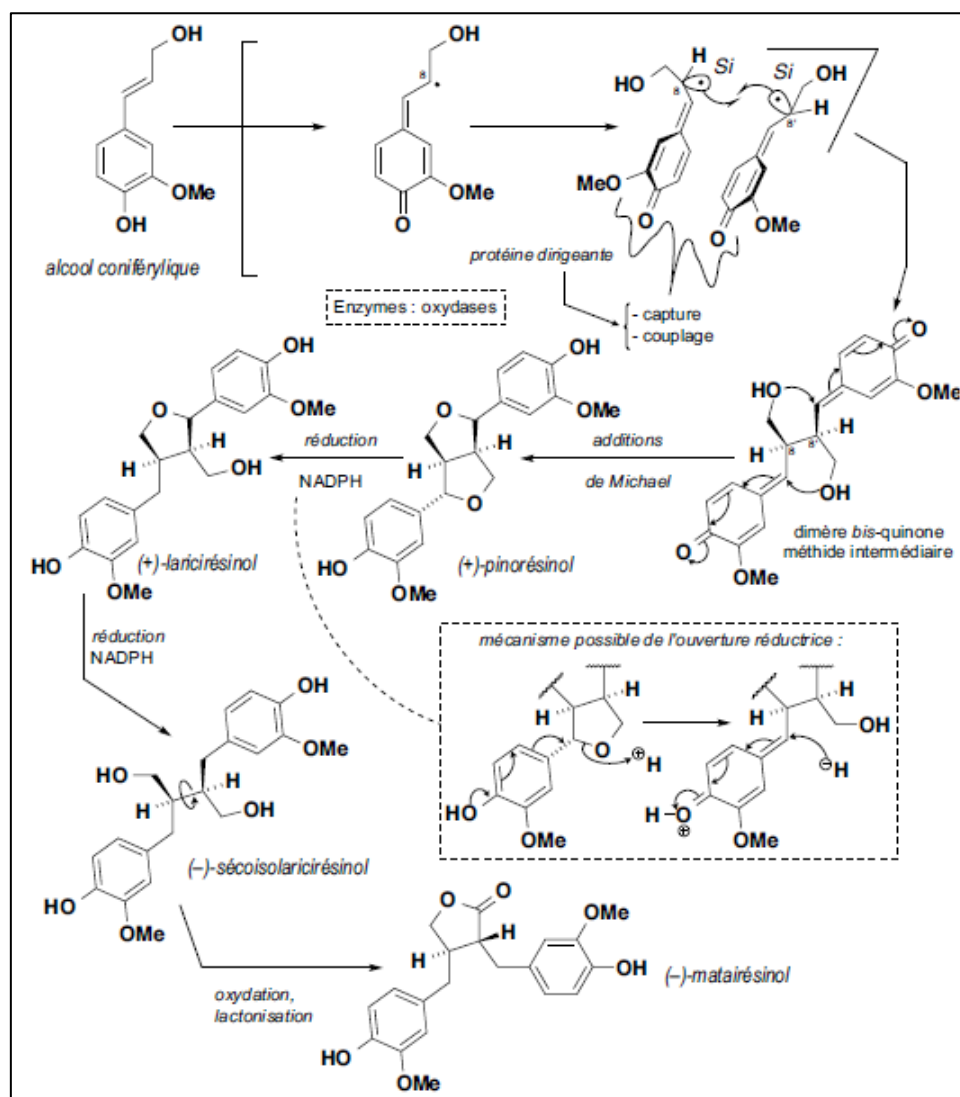


Figure I.20: Biosynthèse des lignanes : exemple du (+)-pinorésinol et apparentés [63]

double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furano-furaniques. Pour chaque type de lignane, le degré d'oxydation varie, aussi bien sur les noyaux que sur les chaînes latérales. Quelques lignanes peuvent ne pas être oxydés en C-9 ou C-9'; certains seront présents sous forme d'hétéroside (ex. glucosides de sesaminol).

I.6.6.4. Classification et structure

La figure I.21 montre le couplage de deux unités dérivées du 1-phenylpropane (liaison 8-8')

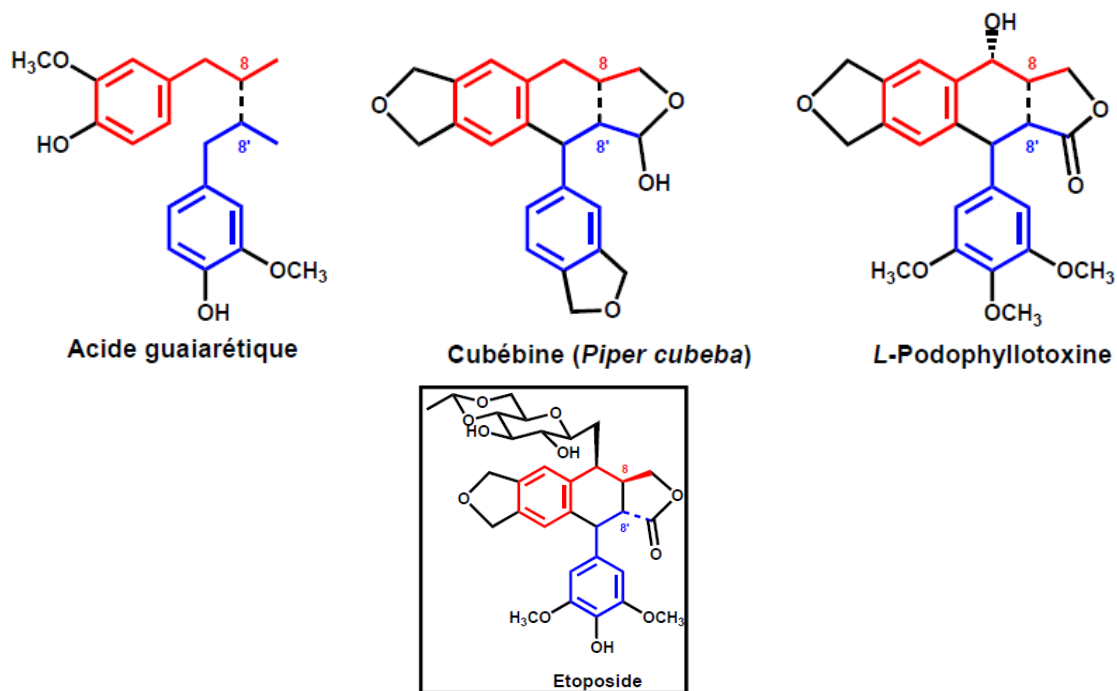


Figure I.21 : Structure de lignanes

- Néo-lignanes : la liaison n'implique au maximum qu'un seul carbone latéral β (Figure I.22)

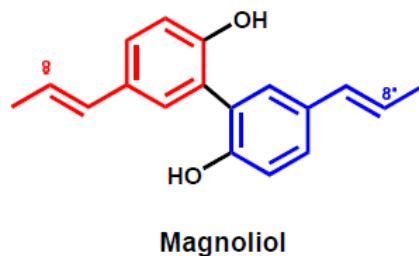


Figure I.22: Structure de Néo- lignanes

Oligomères : condensation de 2 à 5 unités phénylpropanes

Nor-lignanes : lignanes déméthylés \Rightarrow Squelette C17

Lignoïdes ou "lignanes hybrides" : structures hybrides (e.g. lignoflavonoïdes ; Figure I.23)

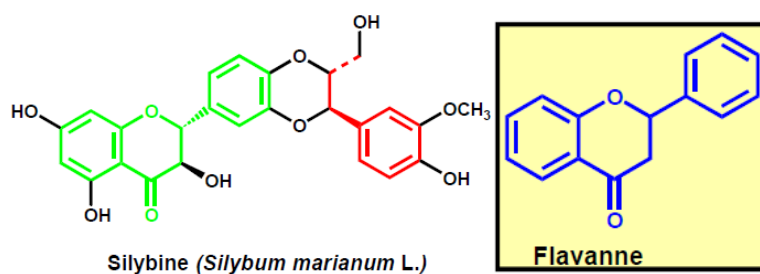


Figure I.23: Structure de Lignoïdes ou "lignanes hybrides"

I.6.6.5. Principaux types de lignanes

Également des produits de condensation d'unités phenyl-propaniques, dimères d'allylou de propenylphenols dont la liaison, variable, n'implique au maximum qu'un seul carbone C-8 (liaison 8-3' : dihydrophenanthrenes ; 8-1' : octahydrobenzofuranes ; 3-3' : biaryles ; 8-O-4' : benzodioxine, etc. (Quand la liaison entre les deux unités implique une liaison éther (x-O-y), le terme d'oxynéolignane est parfois utilisé). Beaucoup de ces dernières structures sont le résultat de cyclisations complémentaires, conséquence d'un couplage radicalaire supplémentaire (par ex. 2-4') ou d'une ré-aromatisation finale après formation de «methides» intermédiaires telles que celles évoquées précédemment quand la position C-8 est impliquée (par ex. 7-O-2', 7-O-3') : on parle parfois de cyclolignanes pour désigner ces molécules.

Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes (Figure I.24) ont été caractérisés chez différentes familles du règne végétal. Les plus simples sont les dibenzylbutanes (liaison 8-8' (**1**)) qui, par cyclisation, peuvent engendrer trois types de lignanes monofuraniques (cyclisation 9-O-9', 7-O-9', ou 7-O-7' (**2-3**)) et des butyrolactones (**4**), la cyclisation peut impliquer un carbone aromatique (aryl-naphtalène (**5-7**)) ou deux dibenzocyclooctanes (**7**). La double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furanofuraniques (**8**) ; (Figure I.24) [46,50]. La figure I.25 montre des exemples de structures de néolignanes.

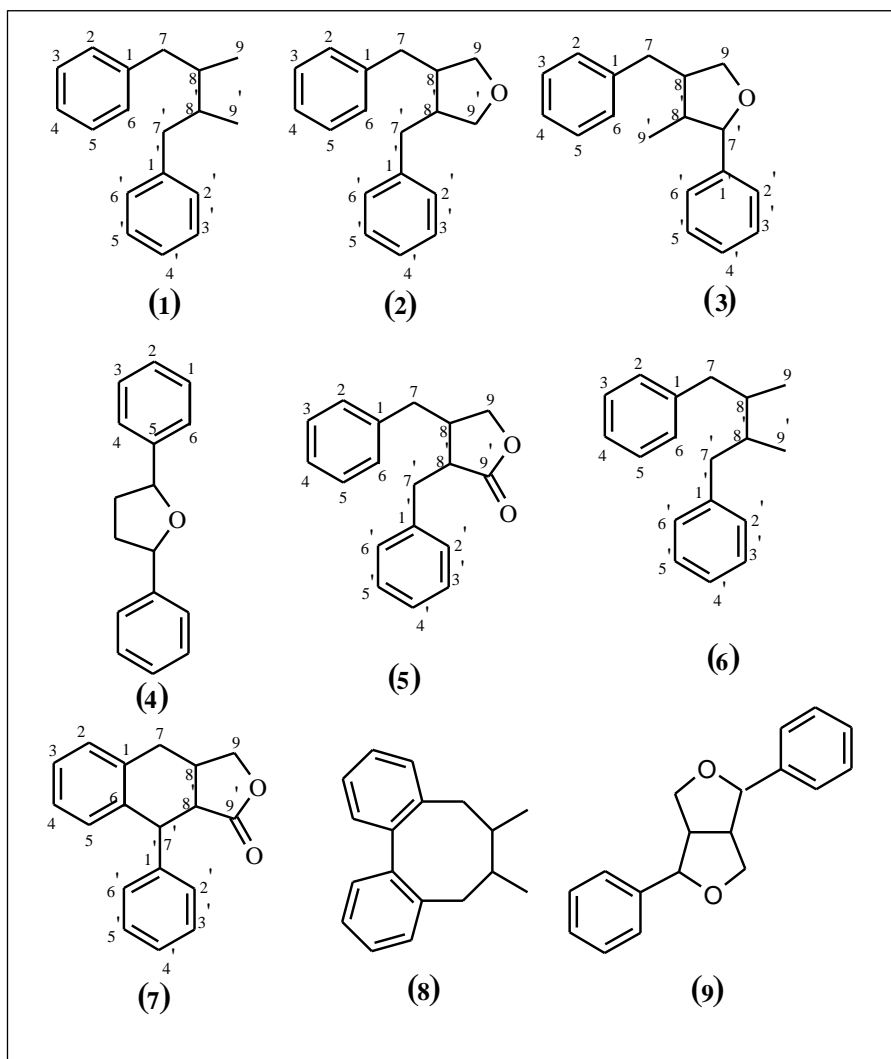


Figure I.24: Principaux types de lignanes [68]

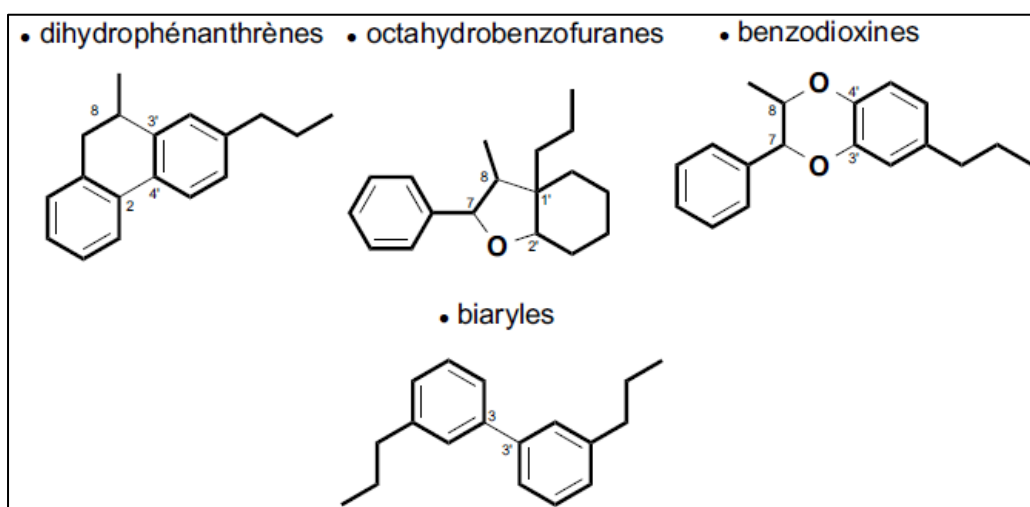


Figure I.25: Exemples de structures de néolignanes

Références bibliographiques

- [1] Takhtajan A. Flowering Plants. 2^{ème} édition © Springer Science+Business Media B.V. 2009 (2): 501.
- [2] Crete P. Précis de botanique. V.2: Systématique des angiospermes. Masson, Paris. 1965(2): 429.
- [3] Guignard J L. Abrégé botanique: Abrégés de pharmacie. in8 Broche 9^{ème} édition Masson. Paris. 1994(9): 203-204.
- [4] Quezel P. et Santa, S, 1963, Nouvelle Flore D'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, CNRS, Paris; 1963(2).
- [5] Dupont F, Guignard JL. Botanique Systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée. Elsevier Masson SAS. 2007 (14): 248.
- [6] Douzet R. Petit Lexique De Botanique A L'usage Du Débutant. Station Alpine Joseph Fourier UJF - Bât D - BP 53 - 38041 Grenoble cedex 9. 2007. P. 5.
- [7] Marouf A, Reynaud J. La botanique de A à Z : 1 662 définitions. Dunod. BTS. IUT. Licence 2007:65.
- [8] Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat-Hug M, Jeanmonod D. Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3^{ème} édition PPUR presses polytechniques 413 pages, 2002 (3): 348.
- [9] Bruneton J. Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2^{ème} édition ; EDITIONS TEC & DOC Paris 1999(2):153.
- [10] Abbayes H. Des, Chadeaud M, De Ferre Y, Feldmann J, Gausson H, Grasse P P, Leredde M C, Ozenda P, Prevost A R. Botanique: anatomie, cycles évolutifs, systématique. Précis de Sciences Biologiques publiés sous la direction du pr. Grassé PP. Edition Masson et Cie, Paris. VI^e + 1040 pp (impr. Brodard-Taupin).1963(4):891.
- [11] Dupont F, Guignard JL. Botanique Systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée. Elsevier Masson SAS. 2007 (14): 249-257.
- [12] Guignard J-L. Biochimie végétale. 2^{ème} édition. Dunod. 274 pages 2004(2):193.
- [13] Mabberley D. The Plant-Book, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK. 1997(2):138.

- [14] Ducombs G. Lactones Sesquiterpeniques Et Plantes. Rev Ft Allergol 1999;39(4) : 295-298.
- [15] Trease GE, Evans WC. Textbook of Pharmacognosy. 12th edn. Balliere Tindall and Company Publisher, London. 1983; 12: 224, 514.
- [16] Mabberley D. The Plant-Book, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK. 1997(2):69.
- [17] Harborne J.B. The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge; 1994.
- [18] Ozenda P. Flore du Sahara septentrional et central. Paris: CNRS; 1958: 450-454.
- [19] Harborne JB ,Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000; 55(6):481-504.
- [20] Carnoy A. Dictionnaire étymologique des noms grecs de plantes. Bibliothèque du Muséon Louvain. 1959(46) :70.
- [21] Berendes J. Des Pedianos Diaskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre, Stuttgart 1902. Réédité par Dr. Martin Sandig. Wiesbaden 1970: 90.
- [22] Beniston NT-WS. Fleurs D'Algérie. Entreprise nationale du livre Alger. 1984: 95.
- [23] Beloued A. Etymologie des noms de plantes du bassin méditerranéen. Édition : Office des publications universitaires. 1998 : 22.
- [24] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963(2) :1016.
- [25] http://cabanedetellus.free.fr/05_Asterac%C3%A9es_bleues-pourpres_Tellus.html; site consulté le 27/04/2017.
- [26] Voet D, Voet J. G. Biochimie 2^{ème} édition. De Boeck & Larcier s.a ; Bruxelles ,1600 pages. 2005 (2) :29.
- [27] De Duve C. A l'écoute du vivant Poche. Odile jacob, Paris ; 2005 : 71.
- [28] Reddy GV, Guerrero A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. Trends Plant Sci. 2004; 9(5):253-61.
- [29] Carpentier A, Celle F, Chareyron P, Daoust G, Deyme P, Froissard H, Geray L, Mémeteau C, Olive C, Picoche J-M, Rebulard S, Salomon L, Seguin A, Seyed R, Thomas D, Woehrlé A. Livre du professeur. © Éditions Belin. Paris. 2012 :218.
- [30] Viel C. Évolution des méthodes extractives et analytiques en phytochimie, du XVI^e siècle à la seconde moitié du XIX^e Revue d'histoire de la pharmacie. 2001 ; 89 (331) 287-302.

- [31] Bermudze-Torres K, Legal L, Lieutier F. Exploitation des métabolites secondaires de la plante hôte (Book Chapter in French). Chapitre 19. Chemical ecology 2013.
- [32] Denis R. Les drogues. Editeur : ARMAND COLIN. Collection : 128, paru le : 07/2005.
- [33] Wink M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological of secondary metabolites. In Wink M (ed) Biochemistry of plant secondary metabolism. Wiley-Blackwell, Oxford . 2010.
- [34] Bernard JL, Alabouvette C, Ambolet B, Choné E, Dattée Y, Descoins C, Esquerré-tugayé MT, Gracien P, Le buanec B, Levêque C, Pernollet JC, Regnault-Roger C, Ricroch A, Vincent C. Biocontrôle en Protection des cultures Périmètre, Succès, Freins, Espoirs Académie d'Agriculture de France. Avril 2014 - Janvier 2016.
- [35] Merghem R. Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine. 2009.
- [36] Lincoln T, Zeiger E. Secondary Metabolites and Plant Defense in: Plant Physiology, Fourth Edition, Sinauer Associates, chap. 13.700 pages. 2006(4): 286.
- [36'] Reimer K. Ueber eine neue Bildungsweise aromatischer Aldehyde. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1876; 9(1): 423-424.
- [37] Reed CE. New therapeutic approaches in asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology 1986; 77(4): 537-543.
- [38] Cheyne L, Irvin-Sellers MJ, White J. Tiotropium versus ipratropium bromide for chronic obstructive pulmonary disease (Review). Cochrane Database of Systematic Reviews 2015(9) Art. No.: CD009552. DOI: 10.1002/14651858.CD009552.pub3.
- [39] Baborun T. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias. 1997:83-94.
- [40] Lee K W, Hur H J , Lee C Y. Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. J Agric Food Chem 2005; 53(6) :1990-1995.
- [41] Agrawal PK, Markham KR. Carbon-13 NMR of flavonoids. 1989. Elsevier. Amsterdam.
- [42] Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G. Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomed Pharmacother. 2002; 56 :200-207.
- [43] Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. 2002; 18(1):75-81.
- [44] Cook N C, Samman S. 1996. "Review: Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardio-protective effects and dietary sources, J Nutr Biochem 1996; 7(2): 66-76.
- [45] Heller W, Forkmann G. Biosynthesis of Flavonoids. In The Flavonoids: Advances in

- research since 1986. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. 1993: 499.
- [46] Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.2005 :6.
- [47] Harborne J.B. The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall. London. 1988.
- [48] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Technique & Documentation. Paris. 1999.
- [49] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A A, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences 1999; 65(4): 337-353.
- [50] Pietta P. Flavonoids as Antioxidants. J Nat Prod 2000; 63(7):1035-1042.
- [51] Hollman PCH, Arts ICW . Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agr 2000; 80(7):1081-1093.
- [52] Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J Mass Spectrom 2004; 39(4), 1-15.
- [53] Hollman P.C.H., and Katan M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed Pharmacother 1997; 51(8): 305-310.
- [54] Basdevant A, Laville M. Lerebours E. Traité de nutrition clinique de l'adulte. Flammarion Médecine – sciences. 2001:165-177.
- [55] Stagos D, Amoutzias G D , Matakos A , Spyrou A , Tsatsakis A M, Kouretas D. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. Food Chem Toxicol 2012; 50(6) :2155-2170.
- [56] Wolfender JL, Waridel P, Ndjoko K, Hobby KR, Major HJ, Hostettmann K. Evaluation of Q-TOFMS/ MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. Analusis 2000; 28(10): 895-906.
- [57] de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C., and Brinkman U.A.T. Liquid
- [58] Prasain JK, Wang CC, Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. Free Radic Biol Med 2004; 37(9): 1324-1350.
- [59] Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1997; 11(12):1357-1364.

- [60] Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004; 39(4):1-15.
- [61] Lindsey JB, Tollens B. *Ann*1892; 267:341.
- [62] Bamberger M. *Monatsh* 1894; 15: 505.
- [63] Bruneton J. *Pharmacognosie phytochimie- plantes médicinales LAVOISIER S.A.S.* 2016 (5) : 389-393.
- [64] Haworth RD. *Ann Rep Prog Chem*1936; 33: 266.
- [65] Ayres, D.C., Loike, J.D .1990. *Lignans: chemical, biological and clinical properties,* Cambridge universty prsess.
- [66] UmezawaT. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2003; 2: 371–390.
- [67] Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., Wähälä, K. 2002. Review Enterolignans. *Journal of Chromatography B.* 777 (1-2) 29-43.
- [68] Bruneton J. *Pharmacognosie phytochimie- plantes médicinales* Edition : Paris, Editions Tec et Doc.1999 (3).

Chapitre II

Étude des activités

biologiques invitro

II. Étude des activités biologiques

Dans cette section portant sur les activités biologiques, l'activité cytotoxique a été évaluée par le test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) sur des lignées cellulaires cancéreuses. L'activité antibactérienne directe et indirecte a été estimée par la méthode de micro-dilution et par la méthode de CCM-Bioautographie. L'activité antifongique sur des champignons isolés des plantes a été appréciée par la méthode de micro-dilution.

II.1. Préparation de l'échantillon d'extrait chloroforme

Pour réaliser les tests biologiques (cytotoxique «T₁», antibactériens «T₂» & antifongique «T₃») *in vitro*, des aliquotes (Tableaux II.1 et II.2) de l'extrait chloroforme (Figure II.1) et des produits isolés sont dissouts dans du DMSO. À chaque solution on ajoute un volume du milieu de culture (RPMI10 %, MHB, PDA) successivement de façon à ce qu'il y ait toujours une concentration de DMSO de 2 % v/v (n'excédant pas 5%) dans la concentration finale (solution mère).

Tableau II.1 : préparation de l'extrait chloroformique (solution stock) des tests biologiques

Extrait CHCl ₃	Poids (mg)
T ₁	5,0
T ₂	16,3
T ₃	5,0



Figure II.1 : solution de l'extrait dans DMSO

Tableau II.2 : préparation des produits (solution stock) des tests biologiques

Produits isolés	Codes	Poids (mg)	DMSO (mL)	P.M (g/mol)	Concentrations (M)
1	ZH3-3	1,200	0,395	152	10 ⁻²
2	ZH6-3	0,600	0,320	372	10 ⁻²
3	ZH6-4	0,900	0,789	152	10 ⁻²
4	ZHF ₈	3,500	0,581	344	10 ⁻²
5	ZH10	1,480	0,424	330	10 ⁻²

II.2. Etude de l'activité cytotoxique (test MTT)

Le test colorimétrique du MTT est une technique principale utilisée pour déterminer le pouvoir cytotoxique d'une molécule ou d'un extrait de plante. L'estimation du taux de la croissance globale des cellules a été utilisée pour évaluer l'effet antiprolifératif de l'extrait CHCl₃ et des composés isolés.

a) Les Réactifs

Trypsine à 0,5% d'EDTA (Gibco®-Invitrogen); RPMI1640 phénol red Gibco® Invitrogen (Merelbeke, Belgique) + 10% de FBS (sérum fœtal bovin) ; produit M.T.T 98% (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) Sigma Aldrich® (Bornem, Belgique) à une concentration de 0,5mg/mL ; DMSO (diméthylsulfoxyde) Merck® (Overijse, Belgique) ; eau RNase free Braun® (Machelen, Belgique).

b) Les équipements et appareillages

Plaques multipuits (96 puits) à fond plat Sarstedt® (Essen, Belgique); Micropipette multi-canaux réglable de 50 à 300µL/8canaux Sarstedt® (Essen, Belgique) ; agitateur pour microplaques type Vortex ; centrifugeuse ; Spectrophotomètre (microplate reader Model 680XR, Bio-Rad®, Nazareth Eke, Belgique) ; incubateur à 5% de CO₂ et sous atmosphère humide; compteur de cellules coulter^(s) Beckman (Analis®, Suarlée, Belgique) Figure II.2 ; microscope optique type MOCP Axiovert S100 (Zeiss®, Nederlands); hotte à flux laminaire class II (IKS®, Leerdam, Nederlands).



Figure II.2 : Compteur de cellules utilisé(coulter Beckman©)

c) Les lignées cancéreuses utilisées

Les lignées cancéreuses utilisées proviennent soit de l'American Type Culture Collection (ATCC) soit de l'European Collection of Cell Culture (ECACC) soit de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Le code correspondant à chaque lignée ainsi que le type histologique sont repris dans le tableau II. 3.

On note bien que, toutes les lignées cellulaires testées sont humaines sauf la lignée cancéreuse (B16-F10) qui est une lignée cellulaire du cancer murin.

Tableau II.3 : Origine et type histologique des lignées cellulaires cancéreuses utilisées.

Lignée Cellulaire	Fournisseur	Code	Type Cellulaire	Mode de Croissance
A549	DSMZ	ACC107	Carcinome humain du poumon	Adhérent
U373	NSCLC	ECACC 08061901	Glioblastome astrocytaire humain	Adhérent
PC3	DSMZ	DSMZ ACC465	Carcinome humain de la prostate	Adhérent
Hs683	ATCC	ATCC HTB-138	Gliome humain	Adhérent
MCF7	DSMZ	DSMZ ACC115	Adénocarcinome humain du sein	Adhérent
B16-F10	ATCC	CRL-6475	Mélanome murin	Adhérent

Les cellules sont cultivées à 37°C dans un environnement saturé en eau et contenant 5% de CO₂. Les lignées sont cultivées soit dans du milieu MEM (*minimum essential de Eagle*) enrichi avec 5% de sérum fœtal bovin, soit dans du milieu de Moore (RPMI 1640) enrichi avec 10% (RPMI 10%) de sérum veau fœtal. Dans chaque milieu il est rajouté de la glutamine (4mM), de la pénicilline streptomycine (200µg/mL) et de la gentamicine (100µg/mL).

II.2. 1. Préparation des cultures cellulaires

Le milieu de culture, les suppléments et la trypsine-EDTA(8). Toutes les lignées utilisées sauf les primocultures sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 contenant 10% de FBS (fœtal bovine sérum) inactivé et 0,6 mg/mL de glutamine. On supplémente le milieu en antibiotiques à raison de 200 IU/mL de pénicilline, 200IU/mL de streptomycine et 0,1 mg/mL de gentamicine. Les cellules sont cultivées dans des boîtes stériles de 25 cm² que l'on place à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ et saturée en eau. Toutes ces lignées sont adhérentes et cultivées en monocouche, le milieu est changé deux fois par semaine. Quand la monocouche cellulaire atteint la confluence, le milieu est enlevé, les cellules sont rincées puis incubées une à cinq minutes à 37°C avec de la trypsine-EDTA. Grâce à celle-ci, les cellules se détachent de leur support, ensuite l'action de la trypsine est

stoppée par ajout du milieu de culture contenant du sérum et les cellules sont repiquées à un taux variable selon la lignée.

Le milieu RPMI 10% est composé de nutriments essentiels au développement cellulaire et contient des acides aminés, des vitamines, des sels organiques, du glutathion réduit et du rouge de phénol (utilisé comme indicateur de PH) ainsi que du D-glucose.

Les antibiotiques ajoutés évitent la contamination bactérienne du milieu. Tous les produits sont conservés à 4°C et sont préalablement thermostatisés à 37°C dans un bain-marie avant d'être manipulés sous une hotte à flux laminaire en milieu stérile

- Trois lignées cellulaires ont été utilisées pour tester l'extrait CHCl_3 . Il s'agit de :

U373 : une lignée ligne de glioblastome spécifique des cellules de cancer du cerveau

A549: Lignée établie de cellules de carcinome du poumon humain.

MCF7: adénocarcinome du sein.

Le tableau II.4 reporte l'ensemencement de ces cellules

Tableau II.4 : Ensemencement (Cellules/mL)

LIGNEES	MILIEUX	V(mL)	Ensemencement (Cellules/mL)
U373	RMP 10%	60	18000
A549	RMP 10%	60	12000
MCF7	RMP 10%	60	25000

Le volume de chaque suspension cellulaire : U373, A549, MCF7 est : 1,60 mL; 0,86 mL; 2,95mL respectivement.

Les dilutions ont été réalisées selon le protocole reporté dans la figure (Figure II.3) et la concentration de l'extrait dans le puits 3 jusqu'à 11 sont indiqués dans le Tableau II.5.

Tableau II.5 : Concentration de l'extrait CHCl_3 sur la microplaque 96

3→11	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[Concentrations] $\mu\text{g/mL}$	100	50	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01

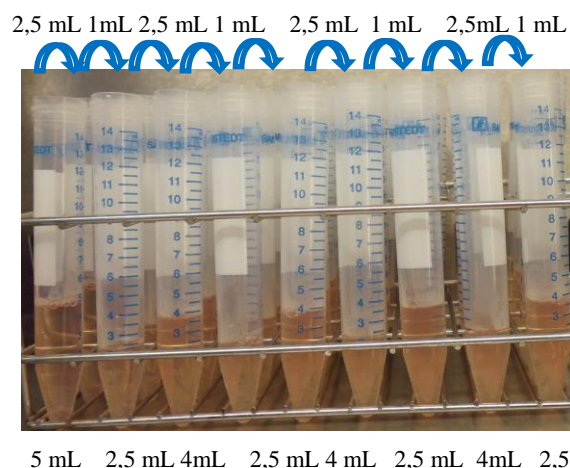


Figure II.3 : Préparation des dilutions de l'extrait CHCl₃ allant de 100 µg/mL au 0,01 µg/mL

• Six lignées cellulaires ont été utilisées pour tester les composés isolés. Il s'agit de : U373, A549, MCF7, PC3, HS638, B16F10.

Le tableau II.6 reporte l'ensemencement de ces cellules

Tableau II.6 : Ensemencement (cellules/mL)

Lignées utilisées	Milieux	Volume (mL)	Ensemencement
U373	RPMI10%	35	18000
B16F10	RPMI10%	35	10000
Hs683	RPMI10%	35	15000
MCF7	RPMI10%	30	28000
A549	RPMI10%	30	15000
PC3	RPMI10%	30	30000

• Le volume de chaque suspension cellulaire (U373, B16F10, HS638, MCF7, A549 PC3) est : 2,52 mL; 0,52 mL; 1,17 mL ; 4,77 mL ; 1,16 mL ; 1,36 mL respectivement. Les dilutions ont été réalisées selon le protocole reporté dans la figure (Figure II.4) et la concentration de l'extrait dans le puits 3 jusqu'à 11 sont indiqués dans le Tableau II.7.

Tableau II.7 : Concentration de l'extrait CHCl₃ sur la microplaque 96

3→11	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[Concentrations] M	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	5.10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

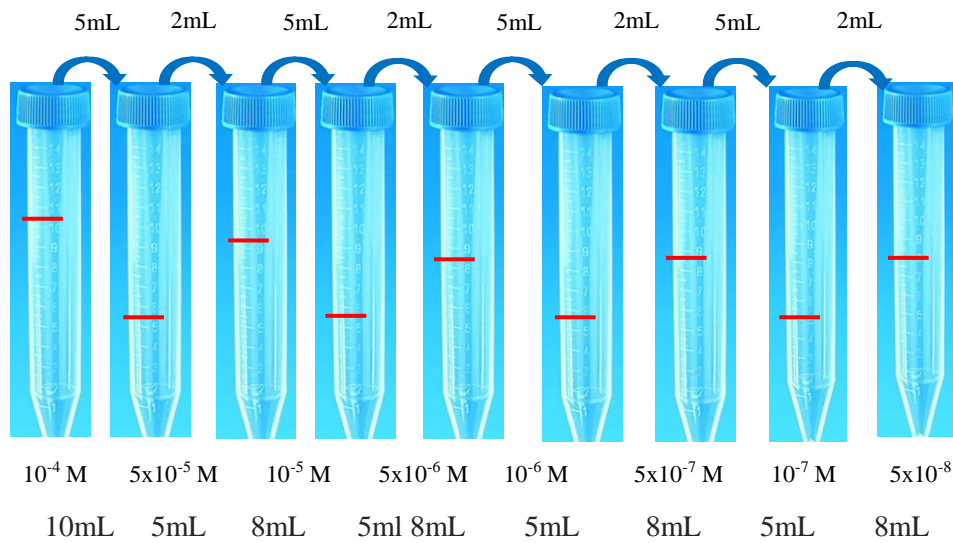


Figure II.4 : Préparation des dilutions des composants chimique isolés allant de 10^{-4} M à 10^{-8} M

Le protocole de micro-dilution sur la plaque multipuits 96 est montré dans la Figure II.5.

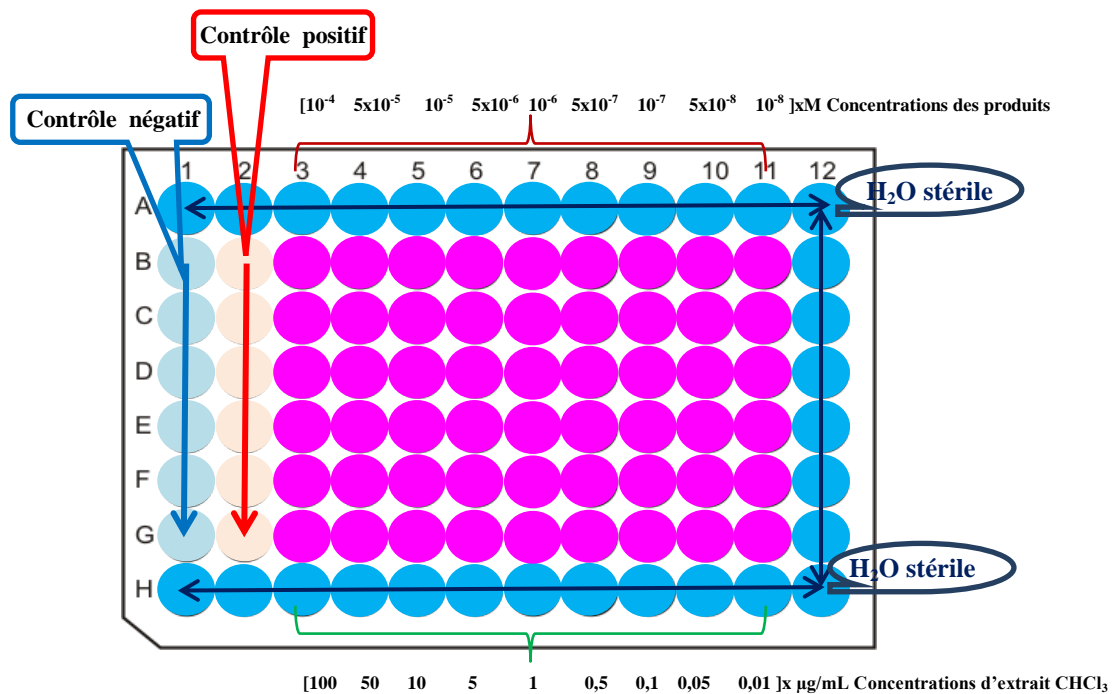


Figure II.5 : Protocole MTT montre le traitement de toxique après 72h

Contrôle négatif (sans cellule): 1B→1G ;
 Contrôle positif (avec cellule): 2B→2G ;
 H₂O stérile : pour éviter les effets de bord et protéger les cellules.

II.2.1.1 Test de viabilité

Le test est basé sur la transformation d'un sel de tetrazolium MTT en formazan par réduction enzymatique (Figure II.1(a)) [1]. Dans ce test l'action de la succinate déshydrogénase sur le MTT provoque la coupure du cycle tétrazolium conduisant à la formation de cristaux de formazan. La coloration du milieu vire alors du jaune au bleu violacé. [2,3]. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé (Figure II.6). L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique

(a)

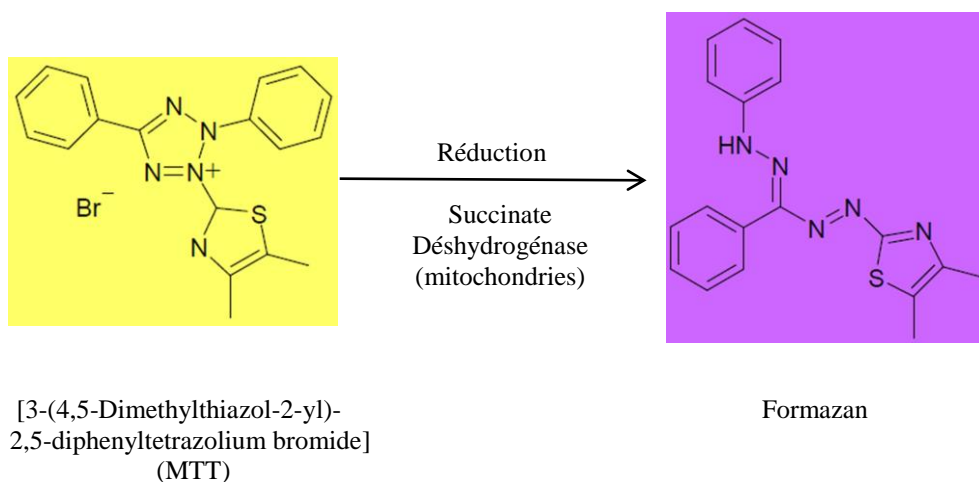


Figure II.6(a): Structure du MTT et sa réduction en formazan.

l'effet cytotoxique de l'extrait trichlorométhane (CHCl_3) et des produits isolés est estimée par la concentration inhibitrice d'un pourcentage donné de la croissance cellulaire globale, pour un temps donné et par rapport au contrôle.. Les cellules en culture sont trypsinisées, comptées et re-suspendues dans le milieu de culture de façon à obtenir une concentration permettant un ensemencement cellulaire de plusieurs milliers de cellules par puits dans des plaques 96 puits. Après 24 h les échantillons (extrait et produits), dissous à l'aide du DMSO et du milieu de culture, sont ajoutés à des concentrations allant de 100 $\mu\text{g/mL}$ à 0,01 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait moyennement polaire (extrait de CHCl_3) et allant de 10^{-4} M à 10^{-8} M pour les composés isolés) puis laissés en contact avec les cellules pendant 72 h. Le milieu est ensuite éliminé puis remplacé par une solution de MTT à 0,5 mg/mL dans du MEM blanc. Les plaques sont incubées (37°C et 5% (v/v) CO_2) au-moins durant 3h, centrifugées à 4000 rpm durant 10 min puis le surnageant est éliminé.

Après avoir ajouté 100 μL de DMSO dans chaque puits, la plaque est lue par un lecteur de plaque (680XR, Bio-Rad®, Nazareth Eke, Belgique) à une longueur d'onde de $\lambda = 570 \text{ nm}$ (Figure II.6(b)). L'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant une activité mitochondriale. Le taux de croissance dans les conditions « traitées » comparé à la condition contrôle « non traitée » peut alors être évalué pour chacune des concentrations d'extrait testées (Figure II.6(c)). Le test MTT est réalisé pour chaque lignée cellulaire en hexaplicata.

Le test a été réalisé en utilisant des microplaques multipuits (96 puits). Les solutions de l'extrait sont préparées en $\mu\text{g/mL}$ (Figure II.1(b) par contre celles des produits isolés purs ont été préparés en mol/L (Figure II.1 (b')). A J0 les cellules sontensemencées puis à J1, elles sont mises en présence ou non de concentrations croissantes du toxique d'intérêt pour une durée de 72h.

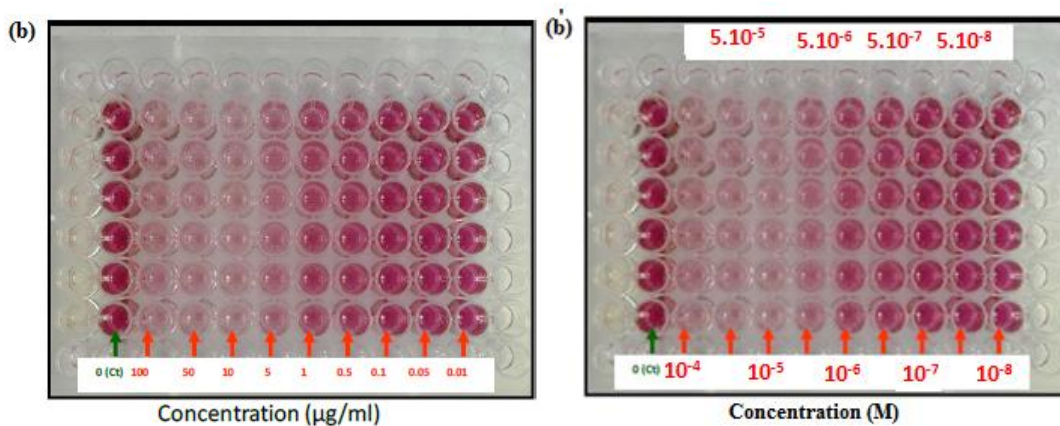


Figure II.6 (b) & Figure II.6 (b') : Plaques de 96 puits (microdilution)

Après 72 h, dans la plaque (b) l'échantillon le toxique est remplacé par la solution de MTT. La plaque est ensuite placée dans un lecteur de plaque pour mesurer l'absorbance et quantifier les effets observés.

La courbe dose-réponse (c) est tracée (Figure II.1(c)) pour rechercher la valeur de l' IC_{50} en utilisant l'équation de la courbe de régression du % d'inhibition (y) en fonction du logarithme de la concentration (x). L' IC_{50} est obtenue en identifiant l'abscisse du point d'intersection de la courbe et de la droite $y = 0,5$ dans le domaine des concentrations testées. La fonction linéaire est privilégiée et utilisée lorsque cela est possible.

$$\text{IC}_{50} = [(X_2 - X_1) \times (50 - Y_1) / (Y_2 - Y_1)] + X_1$$

Où ;

X_1 et X_2 : les concentrations supérieures et inférieures qui bordent la concentration qui réduit la croissance globale de la cellule par la valeur la plus proche de 50%.

Y_1 et Y_2 : sont les pourcentages moyens de cellules viables aux concentrations X_1 et X_2 .

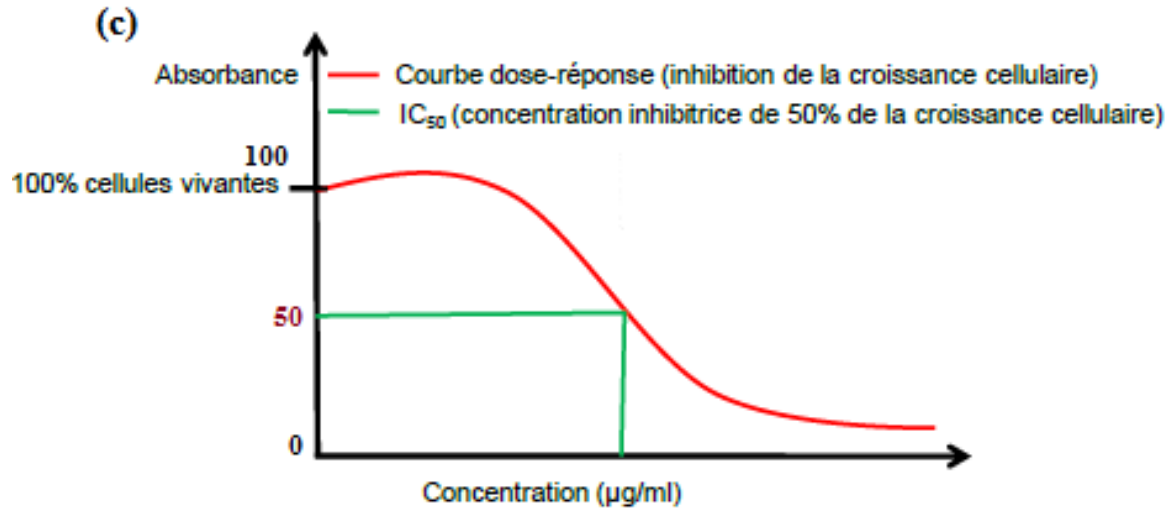


Figure II.6 (c): Courbe dose-réponse pour rechercher la valeur de l' IC_{50}

II.3. L'activité antibactérienne directe et indirecte par la méthode de microdilution et par la méthode de CCM-Bioautographie

II.3.1. Etude de l'activité anti-microbienne

II.3.1.1. les antibiotiques β -Lactamines

L'avènement des bêta-lactamines en médecine humaine et vétérinaire a ouvert l'ère de l'antibiothérapie, complètement révolutionné le pronostic de certaines maladies et entraîné une réduction importante de la mortalité associée aux infections. Les bêta-lactamines sont des antibiotiques antibactériens qui occupent une place importante en médecine vétérinaire.

Leur usage, peut toutefois entraîner la sélection de souches de microorganismes résistants, d'où l'importance de l'usage rationnel des antibiotiques.

Ces bêta-lactamines sont par ailleurs susceptibles de laisser des résidus dans les Denrées Alimentaires d'Origine Animale.

Résidus, craints par le consommateur et par les industriels de la transformation du lait en raison de leurs effets toxiques potentiels et des dangers qu'ils peuvent présenter pour le consommateur et pour les industries laitières de transformation (yaourt, fromage...etc.).

Les antibiotiques (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible. Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes [4]. Plus généralement, pour les microbiologistes et les chimistes, un antibiotique est une substance anti-bactérienne [5].

II.3.1.2. Les antibiotiques β -Lactamines

Les bêtalactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, la plus couramment utilisés en clinique et leur nombre n'a cessé de croître depuis la découverte de la pénicilline G aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle bêtalactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations [6].

Leur mode d'action est intimement lié à la structure de la paroi bactérienne car elles vont inhiber des enzymes indispensables pour sa synthèse et entraîner par divers processus la destruction de cette paroi et la mort bactérienne. En contrepartie, les bactéries ont acquis des mécanismes de résistance de plus en plus complexes et variés mettant en jeu différentes structures de la paroi bactérienne, afin d'échapper à l'effet bactériostatique et bactéricide de ces antibiotiques [7].

Les bêta-lactamines constituent un ensemble d'antibiotiques antibactériens d'origine naturelle ou de semi-synthèse.

- Sur le plan chimique, les bêta-lactamines se caractérisent par la présence dans leur structure d'un noyau bêta-lactame d'où leur appellation.
- Sur le plan biologique, les bêta-lactamines sont doués d'une activité antibiotique bactéricide sur les bactéries en phase de multiplication et d'une très faible toxicité.

En médecine surtout vétérinaire, plusieurs bêta-lactamines sont utilisées. En fonction de leur origine et de leur structure chimique, on distingue :

- Les pénicillines
- Les céphalosporines
- Les Inhibiteurs de bêta-lactamases. (Figure II.7)

Ampicilline	Oxacilline	Amoxicilline	Pivmécillinam	Cloxacilline	Année →
1964....	1971....	1980	1981	1983	

Figure II.7 : Année de développement des premières pénicillines de semi-synthèse [8].

Les bêta-lactamines (β -lactamines) ou antibiotiques β -lactame sont une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la β -lactamase, en bref, tout antibiotique qui contient un noyau β -lactame dans sa structure moléculaire.

Ces molécules possèdent un noyau (cycle bêta-lactame) qui est la partie efficace de la molécule. Des variations au niveau de la chaîne latérale naturelle ou greffée permettant de modifier les propriétés de la molécule antibiotique.

Par exemple l'apport d'une chaîne greffée entraîne une résistance aux acides (suc gastrique) et permet l'ingestion de l'antibiotique par voie orale. Cette méthode augmente la diversité et le spectre d'action en contournant des résistances des bactéries et de leurs enzymes de dégradation (bêta-lactamases).

Parmi les antibiotiques disponibles, c'est le groupe le plus utilisé.

II.3.1.3. Structure chimique

Un noyau bêta-lactame est un lactame contenant trois atomes de carbone et un d'azote dans son cycle (Figure II.8). Le cycle bêta-lactame appartient à divers antibiotiques, tels la pénicilline. Ces antibiotiques sont appelés pour cela antibiotiques bêta-lactamine. Ces antibiotiques agissent par inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire de la bactérie. Ceci a un effet létal sur les bactéries, en particulier celles qui sont Gram-positif. Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques bêta-lactame par l'expression d'une bêta-lactamase.

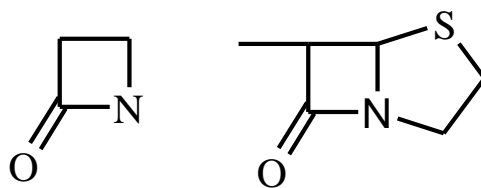


Figure II.8 : Noyaux bêta-lactame & pénème

II.3.2. Classification des β -Lactamines

II.3.2.1. Pénames

Pénicilline G, pénicillines M, pénicilline A, pénicilline V, carboxy-pénicilline et uréido-pénicillines [9].

4 grandes catégories :

- Les pénicillines = pénames (13) (Figure II. 8)
- Les céphalosporines = céphèmes (17)
- Les pénèmes (4)
- Les monobactames (1) [10]

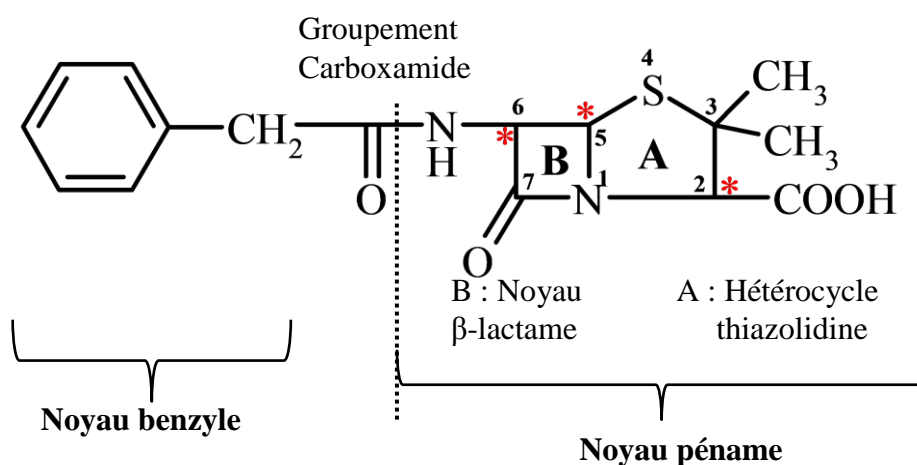


Figure II. 8: Structure plane générale développée des pénicillines [11].

Notez au niveau de la structure des pénicillines, la présence de trois carbones asymétriques (*), les atomes de carbone N°2, 5 & 6.

La présence dans la structure chimique des bêta-lactamines d'un cycle bêta-lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (R) (Figure II.9), portés par la fonction carboxamide, explique la classification des pénicillines. Les β -lactamines possèdent toutes un

noyau β -lactame nitré à quatre sommets (Figure II. 9). Elles comprennent différentes familles, dont les principales utilisées en thérapeutique humaine sont brièvement présentées ci-après.

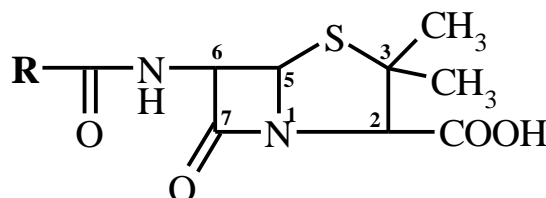


Figure II. 9 : Structure générale développée des pénicillines [11].

II.3.2.2. Les pénicillines

Elles sont dérivées de l'acide amino-6-pénicillanique. Selon la nature de ses différents substituants, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) et les uréidopénicillines (pipéracilline). Le pivmécillinam (prologue du mécillinam) est une amidinopénicilline indiquée dans le traitement des infections urinaires. Selon la nature du substituant variable R, on distingue plusieurs groupes de pénicillines :

II.3.2.3. Pénicillines du groupe G

La pénicilline G (= Benzylpénicilline) se caractérise au niveau de sa structure chimique, par la nature du radical R qui correspond à un groupement benzyle (Figure II.10). La lettre « G » suivant le terme « Pénicilline » signifie « Gold Standard ».

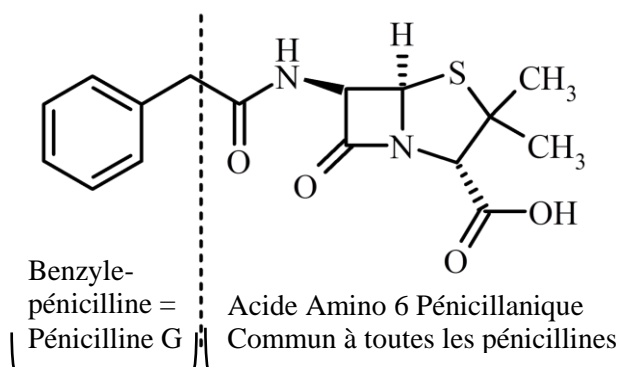


Figure II.10: Structure chimique de la pénicilline G

II.3.2.4. La pénicilline V (=Phénoxyméthylpénicilline)

(Forme administrable par la voie orale). Elle diffère de la pénicilline G par le remplacement du groupement benzyle par un groupement phénoxyméthyle (Tableau II.8).

II.3.2.5. Pénicillines du groupe M

Les pénicillines du groupe M (résistantes aux pénicillinases des germes à Gram +) sont la méthicilline (chef de file), l'oxacilline et la cloxacilline, ces deux derniers composés constituent les isoxazolyl-pénicillines.

II.3.2.6. Pénicillines du groupe A

Les pénicillines du groupe A sont les aminopénicillines. Dans ce groupe, on assiste à l'addition d'un groupement aminé à la structure de la benzylpénicilline, ce qui améliore la stabilité du noyau bêta-lactame (Tableau II.8). L'ampicilline et surtout l'amoxicilline sont les deux principaux représentants.

D'autres groupes de pénicillines existent, mais sont réservés à la médecine humaine, notamment : - Les ureïdopénicillines - Les carboxypénicillines - Les amidinopénicillines.

La complexité de la structure chimique des pénicillines explique leur origine et leur préparation. Les bêta-lactamines dérivent d'un noyau de base commun à tous les constituants de la famille : le noyau bêta-lactame.

II.3.2.7. Les céphalosporines (céphems 1=S)

Elles sont dérivées de l'acide 7-aminocéphalosporanique qui possède un atome de carbone de plus que l'acide amino-6-pénicillanique. On les classe en trois, voire quatre générations.

Groupe 1 : C1G (céfalotine, céfalexine) sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. --

Groupe 2 : C2G (céfuroxime, céfamandole) ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Parmi les céphalosporines se situe une sous-famille que sont les céphamycines ou 7-a-méthoxy-céphalosporines, dont seule la céfoxitine est encore disponible en France.

Groupe 3 : C3G ou oxyimino-céphalosporines (céfixime, céfotaxime, ceftazidime) ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries et sur *P. aeruginosa* pour la ceftazidime. Les

C3G sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries (Figure II.11).

Groupe 4 : C4G (céfépime et ceftioxime) sont des oxyimino-céphalosporines zwitterioniques relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de type AmpC [12].

II.3.2.8. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes, dérivés de la thiénamycine, ont un spectre très large et sont très stables à l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases. Ce sont des molécules utilisées en dernier recours, sur des bactéries multirésistantes ou alors en traitement probabiliste large. Les molécules disponibles sont l'imipénème (en association avec la cilastatine, qui inhibe la dégradation rénale de l'imipénème), l'ertapénème et le mérépénème. Le doripénème est le dernier carbapénème mis sur le marché en Europe [12].

II.3.2.9. Les monobactames « azactam » (seule molécule)

Ce sont des β -lactamines monocycliques, initialement découvertes dans des surnageants de culture de bactéries plutôt que de levures comme dans le cas des autres β -lactamines.

L'aztréonam, seul monobactame commercialisé, n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif [12].

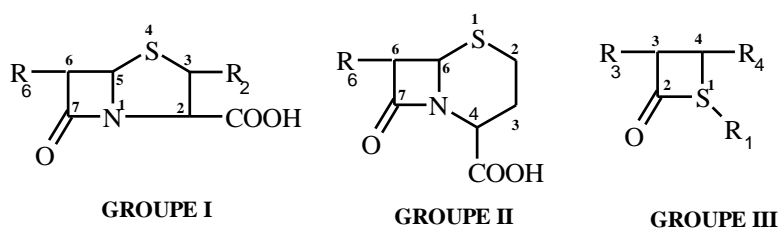


Figure II.11: Classes d'antibiotiques à base d'anneau β -lactame [13]

La caractéristique commune à ces antibiotiques est un noyau β -lactame (Figure II.12).

En dehors des monobactames, l'anneau β -lactame est couplé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes). Au sein d'une classe d'antibiotiques, les chaînes latérales (R, R' et R'') permettent de distinguer les différentes molécules. Il peut exister des chaînes latérales similaires entre différentes classes d'antibiotiques.

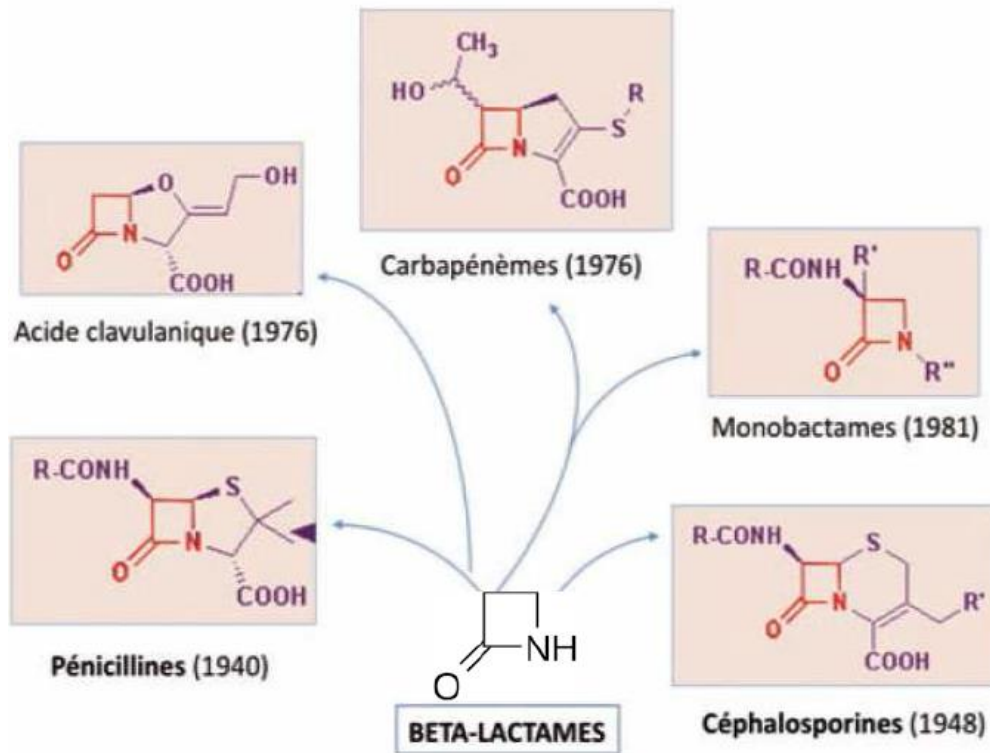


Figure II.12: Classes d'antibiotiques à base d'anneau β -lactame [14]

La caractéristique commune à ces antibiotiques est un noyau β -lactame (en rouge).

En dehors des monobactames, l'anneau β -lactame est couplé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes). Au sein d'une classe d'antibiotiques, les chaînes latérales (R, R' et R'') permettent de distinguer les différentes molécules. Il peut exister des chaînes latérales similaires entre différentes classes d'antibiotiques.

II.3.10. β -lactamases

C'est le mécanisme prédominant de la résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries.

Ce sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (Figure II.13).

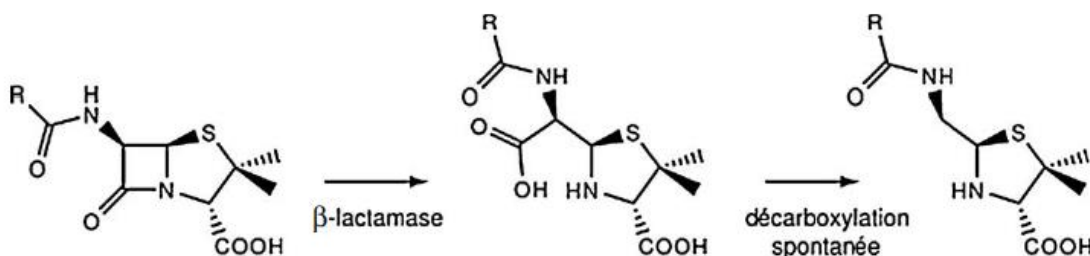


Figure II.13: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase [12].

II.3.11. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

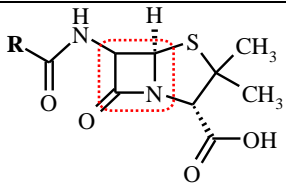
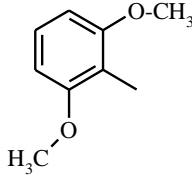
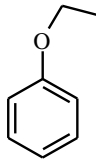
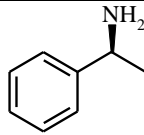
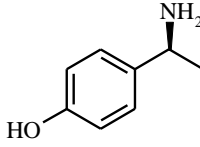
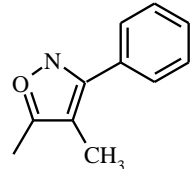
Staphylococcus aureus est une bactérie commune présente sur la peau et les membranes muqueuses chez 20 à 30 % des personnes en bonne santé. Elle peut parfois provoquer des infections chez l'homme, généralement localisées au niveau de la peau ou de plaies, mais qui peuvent parfois avoir de graves effets sur l'organisme. Par ailleurs, certaines souches de cette bactérie ont développé une résistance aux antibiotiques bêta-lactamines, qui comprennent les pénicillines et sont utilisés pour le traitement de nombreuses infections. Ces souches sont appelées *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM).

L'homme contracte le SARM principalement par contact direct entre personnes infectées ou par contact avec des appareils et des équipements médicaux. Le SARM est particulièrement problématique dans les hôpitaux, où les patients dont le système immunitaire est affaibli présentent un risque plus élevé d'infection que la population générale.

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est un *Staphylococcus aureus* (couramment appelé « Staphylocoque doré ») caractérisé par sa résistance à un antibiotique, la méticilline (ou méthicilline) qui est un antibiotique, du genre β lactamine, de la famille des pénicillines résistant à la pénicillinase. La méticilline est une Pénicilline M essentiellement utilisée contre le staphylocoque doré non résistant.

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (Sarm) est une bactérie multirésistante aux antibiotiques (BMR) fréquemment en cause dans les infections nosocomiales (IN). Selon les dernières données disponibles en France, la prévalence des patients infectés à Sarm était de 0,39 % en 2006, soit 8 % des patients avec une IN [15].

Tableau II.8 : Structures chimiques des AB (β -lactamines) utilisés

	
Antibiotiques β -lactame	R
La méticilline	
Pénicilline V	
Ampicilline	
Amoxicilline	
Oxacilline	

II.4. Micro-organismes (Souches microbiennes & fongiques pathogènes des plantes)

Les souches microbiennes ATCC (American Type Culture Collection) utilisées ont été fournies par l'Unité de Microbiologie Pharmaceutique et Hygiène de l'Université Libre de Bruxelles (ULB), tandis que les souches cliniques ont été isolées de prélèvements biologiques et identifiées par les galeries API au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Charleroi (un don généreux) (Mr. Lerson). Les souches C98506, C100459 et ATCC 33591 sont *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA). Les Différents

pathogènes végétaux ont été fournis par le Centre Wallon Biologie Industrielle, Bio-Industrie Unité Gembloux Agro-BioTech, Université de Liège, Gembloux, Belgique (Dr.Ongena).

a) Réactifs et matériel

- Milieu Mueller Hinton Broth (bouillon), «Sigma-Aldrich®»70192
- Milieu Mueller Hinton Agar «Sigma-Aldrich®»70192
- La pénicilline V «Certa SA ACA Pharma NV», l'ampicilline, l'amoxicilline et l'oxacilline «Sigma-Aldrich».
- Chlorure de sodium (NaCl 0,85%, 2mL), api® «Biomérieux»20070
- Agar bactériologique type A, Biokar diagnostics
- Bacto® peptone, Difco Laboratories
- Néphélomètre 1 McFarland , Model Densimat (Biomérieux Italia)
- Microplaques stériles 96 puits « Cellstar® » cat-N°.655 180
- McFarland standard (6 étalons de BaSO₄ 0 ; 5,1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5) «Biomérieux®SA», France
Etalon de 0,5 BaSO₄ : 2,40 10⁻⁵ mo/L
- Plaques pour CCM recouvertes de gel de silice 60F₂₅₄, (Merck Darmstadt, Allemagne).

b) Souches microbiennes & fongiques (pathogènes des plantes)

➤ (1) Bactéries Gram-positif

- Sensible
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus* ATCC 6538) ;
- Résistant
- *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (*S. aureus* ATCC 33591);
- *Staphylococcus aureus* C100450 (*S. aureus* C100450);
- *Staphylococcus aureus* C98506 (*S. aureus* C98506).

➤ (2) Bactéries Gram-négatif

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* ATCC 25922) « couche sensible ».
- *Pseudomonas syringae* DC 3000.

➤ (3) Souches fongiques « Champignons pathogènes des plantes »:

Fusarium oxysporum, *Fusarium oxysporum* sporulent, *Cladosporium*, *cucumerinum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium* & *Pythium aphanidermatum*;

➤ (4) Souches fongiques (levure) : « un agent pathogène des plantes »

Rhodotorula aurantiaca.

II.4. 1. Activité antibactérienne directe

Ce test a été évalué sur des souches sensibles, nous avons utilisé les deux souches : *S. aureus* ATCC 6538 & *E. coli* ATCC 25922.

L'activité antimicrobienne directe a été réalisée par la méthode de microdilution sur bouillon. L'extrait brut et les composés isolés, ont été dissous dans du DMSO (20 mg/240 µL) puis dilués à 5 mL dans du bouillon de Mueller Hinton (MHB), la concentration finale de DMSO n'excédant pas 4 %. Cette solution a été transférée dans des plaques 96 puits (200 µL/puits) et des dilutions ½ en série ont été opérées avec du bouillon de Mueller Hinton. Des cultures microbiennes de 24 h ont été suspendues dans une solution de NaCl 0,9 % de façon à obtenir une turbidité de 0,5 Mc Farland (10^8 bactéries/mL), ces suspensions ont été diluées 1/100, et inoculées dans les plaques 96 puits contenant les dilutions de l'extrait chloroforme ou des composés pur. Après 24 h d'incubation à 37°C, on ajoute une solution aqueuse de MTT 0,8 mg/mL) et l'on ré-incube pendant 4h. la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la plus faible concentration d'extrait qui inhibe complètement la croissance des microorganismes.

a) Préparation du sel de tétrazolium MTT

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est un réactif qui permet de visualiser à l'œil nu l'apparition de la couleur violette, ce qui indique la présence de bactéries. Ce changement de couleur se produit, après avoir ajouté 30 µL de MTT dans chaque puit de la plaque et après, environ 30 min d'incubation.

Pour préparer du MTT, il faut dissoudre 40 mg de celui-ci dans 50 mL d'eau milli-Q (solution aqueuse). À l'aide d'une seringue on filtre ensuite cette solution dans une bouteille stérile.

b) Préparation de l'antibiotique (128 µg/mL)

Peser exactement la poudre de l'antibiotique 1,28 mg, dissoudre avec de l'eau milli-Q en portant le volume à 1 mL. $1,28 \text{ mg/mL} = 1280 \mu\text{g/mL}$, on prélève 200 µL et on dilue (dilution de 1/10) avec 1800 µL de MHB ($1280/10 = 128 \mu\text{g/mL}$) → comme on a prélevé 100 µL de cette solution que l'on a rajouté dans le puit contenant déjà 100 µL de milieu MHB → on a donc une concentration de 64 µg/mL.

c) **Ensemencement et incubation**

Dans la zone stérile dans le flux laminaire ou bec Bunsen, plonger une anse stérile dans une suspension de la souche microbienne à ensemercer, puis faire des stries très serrées sur la moitié de la surface de l'agar sans l'abimer (**A**) ; tourner ensuite la boîte de Pétri d'un angle de 90°, avec la même anse, faire des stries moins serrées sur la moitié de la surface de l'agar (**B**), enfin tourner la boîte de 90° de nouveau, faire des stries très espacées sur le quart de l'agar (**C**) (Figure II.14). Fermer la boîte de Pétri, incuber à 35°C pendant 18 à 24 heures. La boîte est ainsi prête pour le prélèvement des colonies isolées qui se retrouveront au niveau des stries espacées (Figure II.15).

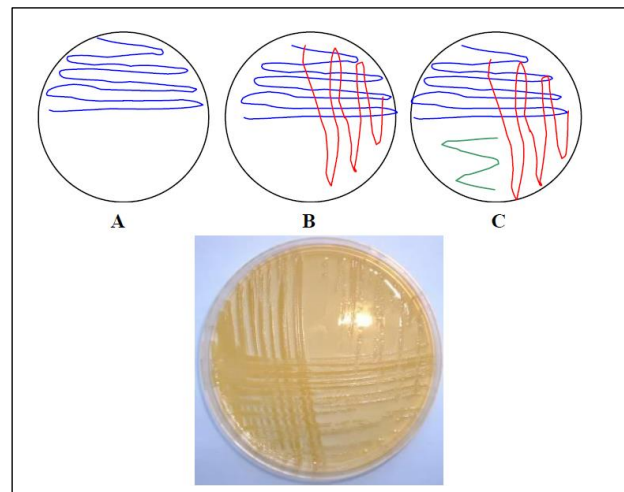


Figure II.14 : Ensemencement de l'agar

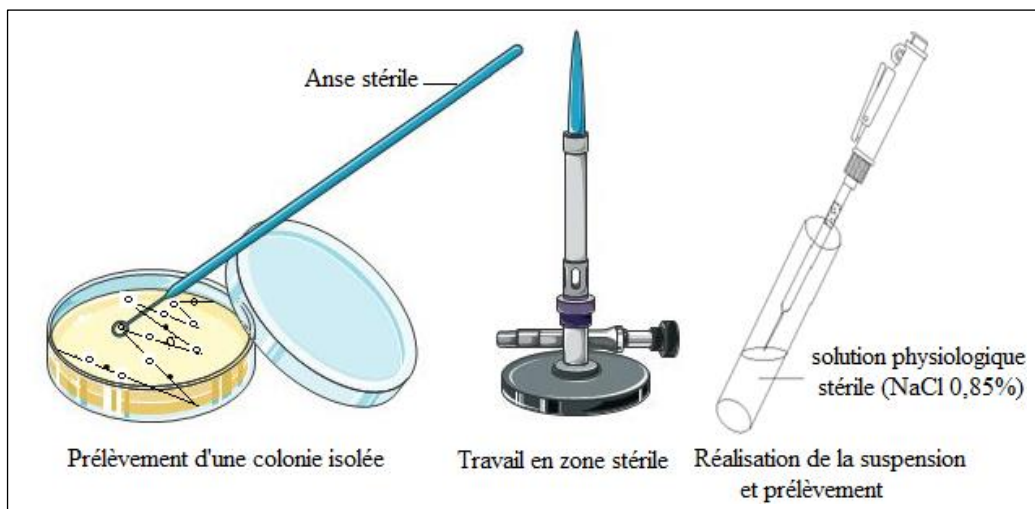


Figure II.15 : Travail en zone stérile (autour de la flamme du bec Bunsen) ou flux laminaire.

II.4. 1.4. Préparation de l'inoculum standardisé

Pour préparer l'inoculum, qui sera utilisé pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) [16], les tests indirects et la CCM-Bioautographie, on commence par prélever des colonies isolées de bactéries qu'on dilue dans une solution physiologique stérile (NaCl 0,85%). Cette suspension réalisée de façon aseptique doit avoir une turbidité de 0,5 Mc Farland, ce qui correspond à environ 10^8 CFU/mL «CFU: (Colony Forming Unit, Unité Formant Colonie de bactéries). Manipuler autour de la flamme du bec Bunsen (zone de sécurité).L'inoculum standardisé ainsi préparé doit être dilué au 1/100 dans du MHB (Mueller-Hinton liquide) et utilisé dans les 15 min [17].

On résume les étapes comme ci-dessous :

- 1/ mesurer la turbidité de l'eau à 0,5 après homogénéisation
- 2/ prélever les colonies isolées bactéries (± 2)
- 3/ diluer dans le NaCl (0,85 %) → eau physiologique
- 4/ vérifier la turbidité (densité des particules Néphélomètre) Mac Farland → ($\pm 0,5$)
- 5/ 200 μ L inoculum + 19,8 mL MHB → 100 μ L/ puits → colonne 1 à 11 (la microplaque).

II.4. 1.5. Préparation des dilutions des substances antimicrobiennes (extrait CHCl_3 & produits isolés) et inoculation de la microplaque

On utilise une microplaque stérile en plastique munie de 96 cupules (8x12), chaque cupule pouvant contenir 0,1 mL (100 μ L) de bouillon. La manière la plus commode de préparation est l'utilisation d'un dispositif dispensant les dilutions des substances antimicrobiennes dans les puits.

On réalise ensuite les dilutions dans une « plaque de préparation » suivant le schéma indiqué dans la figure II.16 et le protocole reporté dans le tableau II.9.

Tableau II.9: Schéma utilisé pour les tests antimicrobiens, notamment la CMI.

		Colonnes										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RANGÉES	Ex.1 A → C	Ex.1/2	Ex.1/ 4	Ex.1/ 8	Ex.1/ 16	Ex.1/ 32	Ex1/64	Ex1/128	Ex1/256	C _d	C+	C-
	Ab. D → E	Ab./2	Ab./4	Ab./8	Ab./1 6	Ab./32	Ab./64	Ab./128	Ab./256	C _d	C+	C-
	Ex.2 F → H	Ext.1/2	Ex.1/ 4	Ex.1/ 8	Ex.1/ 16	Ex.1/ 32	Ex1/64	Ex1/128	Ex1/256	C _d	C+	C-

Légende:

Ex.1 = Premier extrait testé comme produit antimicrobien, réalisé en triplicate, (rangées A, B, C)

Ex.2 = Deuxième extrait testé comme produit antimicrobien, réalisé en triplicate, (rangées F, G, H)

Ab. = Antibiotique, réalisé en duplicate, rangée C et D.

C_d = contrôle du DMSO

C+ = contrôle positif

C- = contrôle négatif

Il faut commencer par mettre 100µL de MHB de la 2^{ème} colonne à la dernière. À la 1^{ère} sera additionné 200 µL des extraits et antibiotiques. Après cela, il faut débiter les dilutions. Pour cela, à l'aide d'une pipette multicanaux, on prélève la moitié du contenu de la colonne qu'on transfère dans la suivante, qui contient préalablement du MHB, en commençant par la première et cela jusqu'à la 10^{ème}. Nous aurons donc à ce stade, 100µL dans chaque puit. Après cela il ne reste qu'à pipeté 100µL de l'inoculum (voir c) dans chaque puit, excepté dans le douzième. La révélation est faite, 18 à 24h après incubation des plaques avec 30 µL de MTT (voir a).

Dans les trois dernières colonnes il n'y a pas de dilutions car elles sont réservées pour les contrôles. La dixième est le contrôle DMSO, qui nous permet de confirmer que le 3% du DMSO utilisé dans la préparation des extraits n'est pas lui-même antibactérien. La 11^{ème} colonne est le contrôle de croissance qui doit, comme dans le cas du C_d, après l'addition du MTT, apparaître violette vu qu'il n'y a pas de produit antimicrobien (les dilutions se sont arrêtées à la 9^{ème} colonne). Cette colonne nous permet donc de voir la viabilité de l'inoculum. La dernière colonne (12^{ème}), quant à elle, est le contrôle de non-croissance, elle ne contient que du MHB et donc après le MTT, tous les puits doivent rester de la couleur du milieu. Si c'est le cas, nous pouvons confirmer que le MHB n'est pas contaminé vu qu'aucune bactérie n'a poussé (Figure II.16, Figure II.16-1 & tableau II.9).

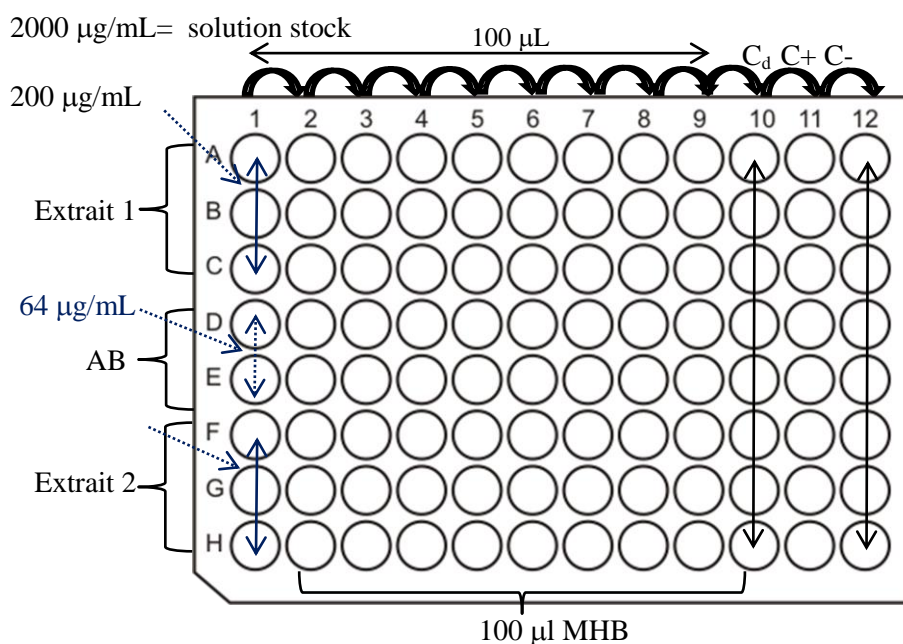


Figure II.16 : Activité directe par la méthode de microdilution et inoculation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EX ₁ 200	EX ₁ 100	EX ₁ 50	EX ₁ 25	EX ₁ 12,5	EX ₁ 6,25	EX ₁ 3,13	EX ₁ 1,56	EX ₁ 0,78	C _d	C+	C-
B	EX ₁ 200	EX ₁ 100	EX ₁ 50	EX ₁ 25	EX ₁ 12,5	EX ₁ 6,25	EX ₁ 3,13	EX ₁ 1,56	EX ₁ 0,78	C _d	C+	C-
C	EX ₁ 200	EX ₁ 100	EX ₁ 50	EX ₁ 25	EX ₁ 12,5	EX ₁ 6,25	EX ₁ 3,13	EX ₁ 1,56	EX ₁ 0,78	C _d	C+	C-
D	AB 64	AB 32	AB 16	AB 8	AB 4	AB 2	AB 1	AB 0,5	AB 0,25	C _d	C+	C-
E	AB 64	AB 32	AB 16	AB 8	AB 4	AB 2	AB 1	AB 0,5	AB 0,25	C _d	C+	C-
F	EX ₂ 200	EX ₂ 100	EX ₂ 50	EX ₂ 25	EX ₂ 12,5	EX ₂ 6,25	EX ₂ 3,13	EX ₂ 1,56	EX ₂ 0,78	C _d	C+	C-
G	EX ₂ 200	EX ₂ 100	EX ₂ 50	EX ₂ 25	EX ₂ 12,5	EX ₂ 6,25	EX ₂ 3,13	EX ₂ 1,56	EX ₂ 0,78	C _d	C+	C-
G	EX ₂ 200	EX ₂ 100	EX ₂ 50	EX ₂ 25	EX ₂ 12,5	EX ₂ 6,25	EX ₂ 3,13	EX ₂ 1,56	EX ₂ 0,78	C _d	C+	C-

Figure II.16-1: Méthode de microdilution et inoculation montre les concentrations (µg/mL)

i) Incubation

Incuber la microplaque inoculée à 37°C pendant 16 à 20 heures, voire 24 heures dans un incubateur à air ambiant. Ne pas entasser les microplaques à plus de quatre pour maintenir la même température d'incubation à toutes les cultures. La microplaque doit avoir un couvercle afin de prévenir la déshydratation.

ii) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance antimicrobienne qui inhibe complètement la croissance des microorganismes dans les cupules de la microplaque, inhibition détectée à l'œil nu. On peut utiliser des dispositifs de visualisation de croissance pour faciliter la lecture des tests de microdilution et enregistrer les résultats aussi longtemps qu'il n'y a pas de compromis sur l'habileté à discerner la croissance dans les cupules. La croissance dans les cupules contenant la substance antimicrobienne doit être comparée à la croissance dans la cupule de contrôle positif. Pour qu'un test soit considéré valide, on doit observer une croissance acceptable dans la cupule de contrôle positif. L'ensemble de ce protocole est résumé dans la figure II.17.

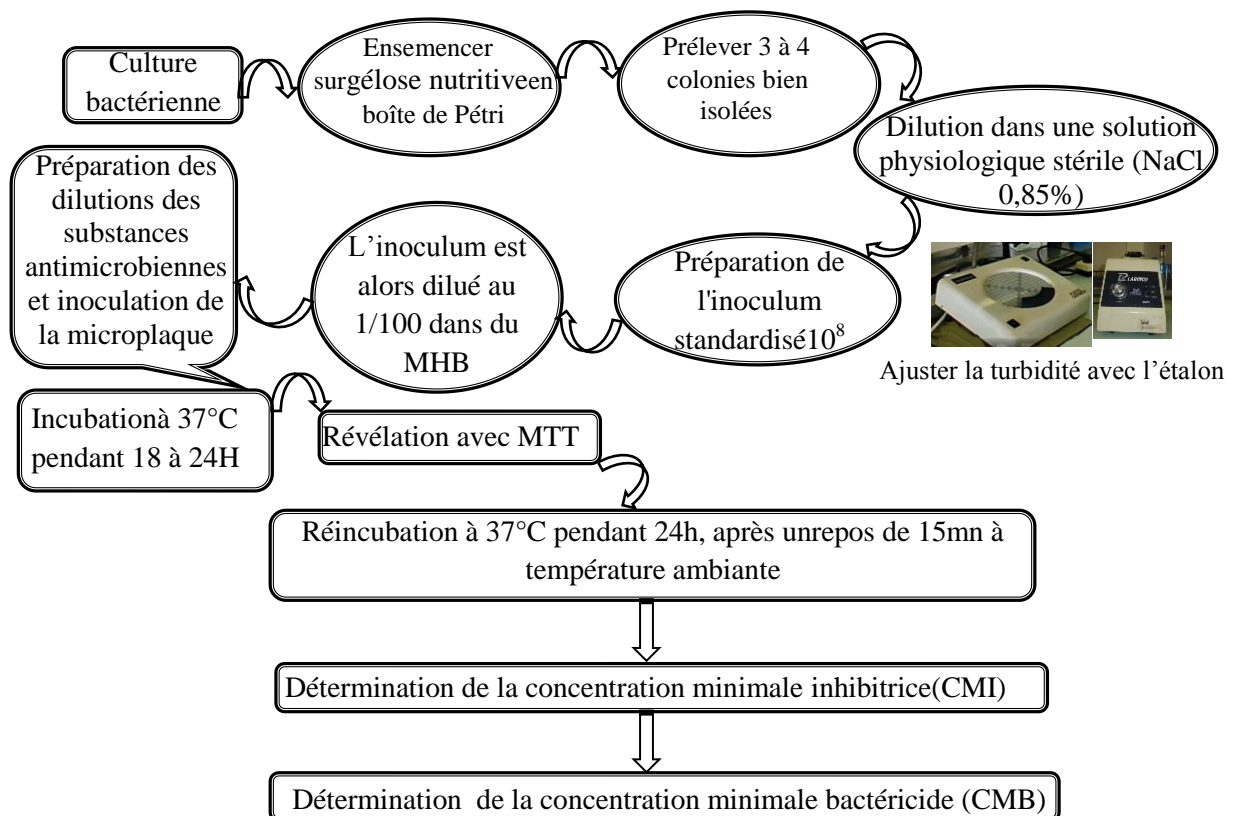


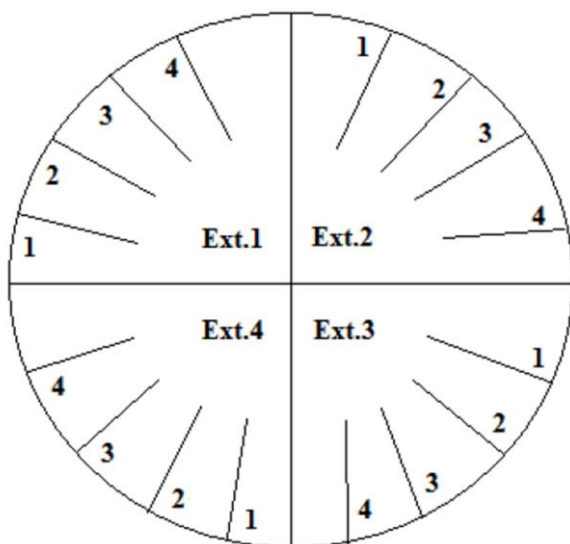
Figure II.17 : Etapes du test antibactérien direct par la méthode de microdilution.

iii) Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est faite en parallèle avec la CMI. En effet, elle est faite après l'incubation des plaques CMI et avant la révélation avec le MTT. En premier lieu, il faut préparer une plaque pour chacune des souches utilisées (Figure II.18). Le procédé consiste à plonger une anse stérile dans les puits de la plaque de la CMI et de faire des stries sur la gélose de MH, dans une boîte de Pétri. Pour chaque extrait le nombre de stries peut varier, tout dépend de la CMI du produit/extrait à tester. On peut utiliser la même anse pour le même extrait en suivant l'ordre des puits. La boîte de Pétri est ensuite placée dans l'incubateur à 37°C durant 18 à 24h. La CMB est déterminée en vérifiant si les bactéries ont poussé sur les stries. La plus faible concentration à laquelle on n'observe pas la croissance du germe est la CMB.

On peut donc dire que celle-ci est la plus petite concentration de l'extrait à laquelle 99,9% des bactéries sont tuées [18].

On peut aussi conclure, après avoir déterminé la CMB et la CMI, si un extrait est bactériostatique (CMB est éloignée de la CMI) ou bactéricide (CMB est proche de la CMI).



Ext.1 (1, 2, 3, 4) = Partie de la plaque destinée aux stries du premier extrait de la plaque 96 puits.

Ext.2 (1, 2, 3, 4) = Partie de la plaque destinée aux stries du deuxième extrait de la plaque 96 puits.

Ext.3 (1, 2, 3, 4) = Partie de la plaque destinée aux stries du troisième extrait de la plaque 96 puits.

Ext.4 (1, 2, 3, 4) = Partie de la plaque destinée aux stries du quatrième extrait de la plaque 96 puits.

Figure II.18 : Schéma utilisé pour déterminer la CMB de l'extrait/produits.

II.3.2. Activité antibactérienne indirecte

Cette activité a été recherchée par la méthode microdilution sur plaques 96 puits (8x12) de la même façon que lors de la détermination de la concentration minimale inhibitrice, mais avec la différence que cette fois ci, la première colonne est entièrement remplie avec des antibiotiques et que l'extrait se trouve incorporé dans le milieu. C'est en comparant les résultats d'une plaque où le milieu contient l'extrait avec une plaque contrôle (milieu sans extrait) que nous pouvons voir si ceux-ci ont une activité antibactérienne indirecte. Au cas où l'effet antibactérien observé est supérieur dans la plaque contrôle, on peut identifier un antagonisme. Les extraits testés pour l'activité antibactérienne indirecte sont ceux qui n'ont pas présenté d'activité directe. Le protocole commence par la préparation de la solution stock avec l'extrait, de façon à ce qu'elle ait une concentration de 4mg/mL. L'extrait CHCl₃ de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire ne possédant pas d'activité antimicrobienne directe sur les souches MRSA (*S. aureus* C100459 et *S. aureus* C98506) et MSSA ATCC6538. Tout le reste de la méthodologie est identique à celle pour la détermination de la CMI, la seule différence étant que l'extrait testé est préalablement incorporé dans le MHB. (Figure II.17).

De façon générale, la technique utilisée pour tester cette activité a été tirée de Okusa (Figure II.19) [19].

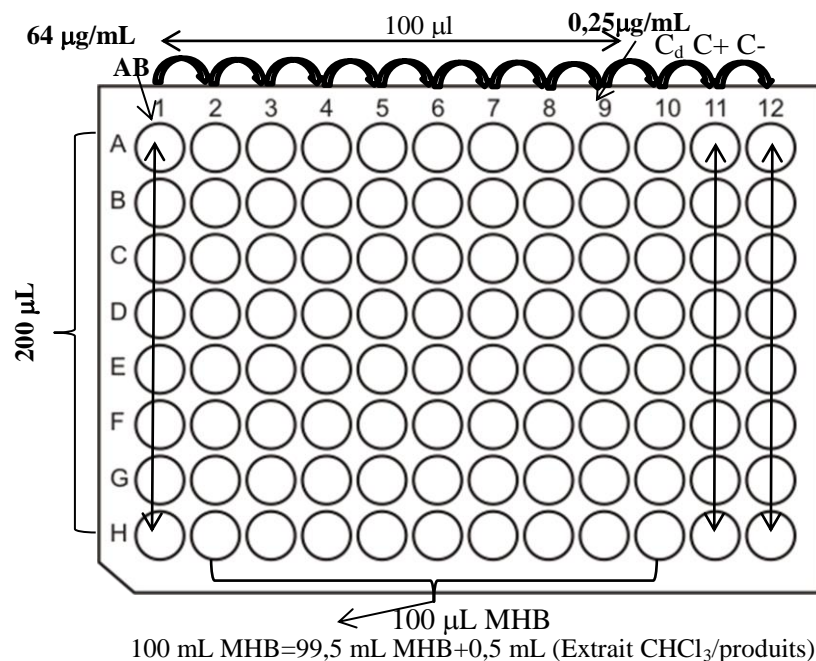


Figure II.19 : Activité indirecte par méthode de microdilution

II.3.2.2. Recherche de synergie entre extraits de plantes et antibiotiques

Pour vérifier s'il existe une synergie entre les extraits et les antibiotiques, il faut voir l'effet de combinaison entre ceux-ci, en comparaison avec l'effet seul des substances antibactériennes. En obtenant les valeurs de CMI nécessaires, on peut alors calculer l'index de FIC (Fractional Inhibitory Concentration) qui nous donne l'effet de combinaison d'une substance A et B dans une proportion 50 :50 [20,21] La solution mère de l'extrait possédait une concentration de 1mg/mL tandis que celle de l'antibiotique utilisé est de 128 µg/mL.

Ainsi on calcule les valeurs suivantes:

$$FIC(A) = \frac{CMI(A \text{ en présence de } B)}{CMI(A \text{ seule})}$$

$$FIC(B) = \frac{CMI(B \text{ en présence de } A)}{CMI(B \text{ seule})}$$

Le FIC index (ΣFIC) est calculé comme suit :

$$\Sigma FIC = FIC(A) + FIC(B)$$

La FBC se calcule de la même façon en remplaçant les CMI par les CMB.

L'évaluation des index FIC et des FBC se fait comme suit :

- Synergie: FIC (FBC) index $\leq 0,5$
- Additive: FIC (FBC) index $> 0,5 \leq 1$
- Indifférence: $1 < FIC (FBC) \text{ index} < 2$
- Antagonisme : FIC (FBC) index ≥ 2 [20].

II. 3.3.CCM-Bioautographie

La CCM-Bioautographie a été réalisée en suivant le protocole décrit par Okusa [22]. C'est une technique simple et efficace pour savoir si les extraits possèdent des composés ayant un effet antibactérien. Pour cela nous avons besoin de préparer un milieu fluide que nous coulerons sur la plaque de silice en combinaison avec les bactéries et qui se solidifiera à température ambiante après le coulage en y maintenant les bactéries réparties de façon homogène. Ce milieu est constitué de 90% de MHB (Mueller-Hinton liquide) et de 10% de MHA (Mueller-Hinton solide), mélangé à 70°C.

Le test commence par la préparation de la plaque chromatographique. Il faut donc déposer la concentration désirée de la solution mère de l'extrait (4mg/mL) sur la plaque de silice, puis l'éluer dans un solvant adéquat. Après la migration terminée, la plaque doit bien sécher afin que les solvants n'aient pas d'effet sur les bactéries; pour cela on la laisse toute la nuit à l'étuve à 50°C. Après séchage, on prépare la suspension bactérienne en mélangeant 1mL de l'inoculum à 9mL du mélange MHB/MHA préparé antérieurement et maintenu à 37°C. La méthode de préparation de l'inoculum est la même que celle vue au point précédent pour la détermination de la CMI. Quand la suspension bactérienne est prête, on la fait couler sur la plaque. Le milieu va se solidifier en contact avec la température ambiante et on place la plaque dans une étuve à 37°C durant 24h. Le lendemain, on procède à la pulvérisation de la plaque avec du MTT (voir **a**) et on l'incube de nouveau à 37°C durant 4h. Si l'extrait déposé sur la plaque possède des produits actifs, des zones d'inhibition, caractérisées par une couleur clair sur un fond sombre, vont apparaître.

II.3.4. Activité antifongique

L'activité antifongique de l'extrait chloroformique de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) M. a été évaluée dans des microplaques de 96 puits contre sept champignons, des bactéries ou des levures.

Trois champignons sporulants ont été testés: *Cladosporium cucumerinum*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* sporulant. Pour faire ceci, une suspension fongique de spores, ajusté à une densité de 5×10^5 spores/mL dans la moitié de la force du milieu : bouillon de dextrose de pomme de terre $\frac{1}{2}$ PDB = PDA «Potato Dextrose Broth ; PDB ; (Difco Laboratories, USA) a été préparée, on compte le nombre de spores après agitation au Vortex à l'aide d'un hématimètre (cellule de Bürker) sous microscope photonique. La concentration est calculée selon la formule suivante : $N = n \times 2,510^5$ ou N: Nombre de spores par mL et $2,510^5$ c'est un facteur correctif du volume de spore (Figure II.20).

Pour les champignons non-sporulants une solution de mycélium broyé a été filtrée et amenée à une densité optique de 0,1 à 620 nm dans le même milieu. 190 μ L de ce suspension a été combiné avec 10 μ L d'une solution stock de l'extrait CHCl_3 (5mg /mL dans la moitié de la PDB avec 20% de DMSO).

Plusieurs dilutions de l'extrait ont été ensuite réalisés dans la plaque multi-puits dans une gamme de concentration allant de 250 à 1,95 μ g / mL.

Pour la bactérie : *Pseudomonas syringae* DC 3000 (gram -) et la levure *Rhodotorula aurantiaca*, on a réalisé une suspension à la moitié du bouillon de dextrose de pomme de terre pour obtenir une densité optique à 620 nm de 0,1 pour les bactéries et de 0,01 pour la levure. Pour les champignons non sporulants, le mycélium a été mélangé et filtré obtenir la suspension la plus homogène avec un DO_{620} nm de 0,1 (Figure II.21, II.21-1). Les plaques inoculées ont été incubées pendant 72 heures à température ambiante. Puis la croissance fongique a été déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm avec un lecteur de microplaques. Toutes les expériences ont été effectuées au moins trois fois. Pour sporulation *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* non sporulant, *Rhodotorula aurantiaca*, *Pseudomonas syringae* DC 3000 et *Botrytis cinerea* la valeur d'IC₅₀ ou du MIC a été évaluée après 72 heures. Pour *Pythium aphanidermatum* on attend 7 jours. Nous avons utilisé comme contrôle (témoin) positif, un mélange contient d'Iturine et de fengycine avec une concentration de 1310 μ g/mL et 573 μ g/mL successivement, comme contrôle négatif, une solution de champignon contenant le même pourcentage de DMSO comme l'échantillon (Figure II.20).

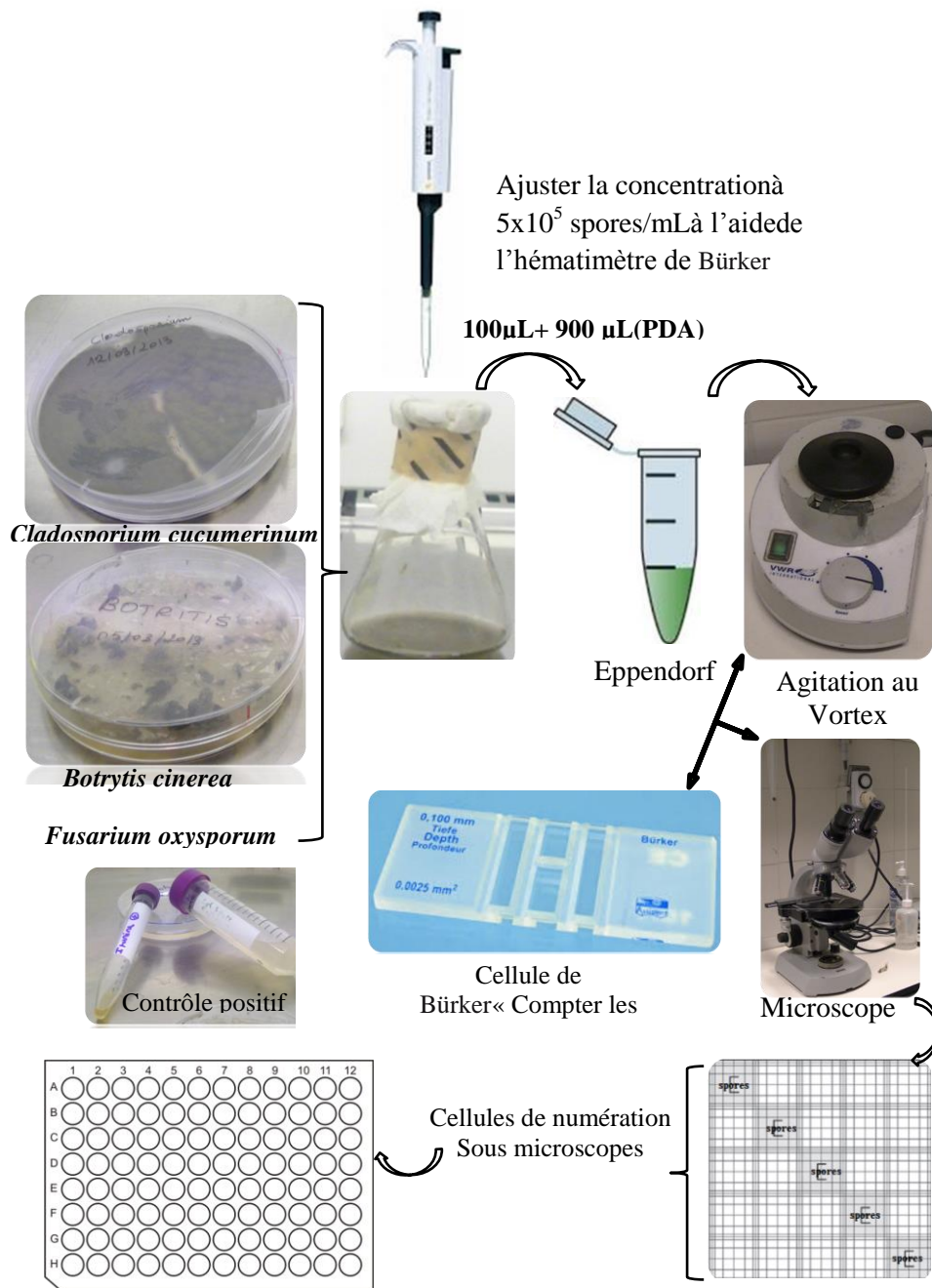


Figure II.20 : Protocole de l'activité antifongique sur les champignons sporulants

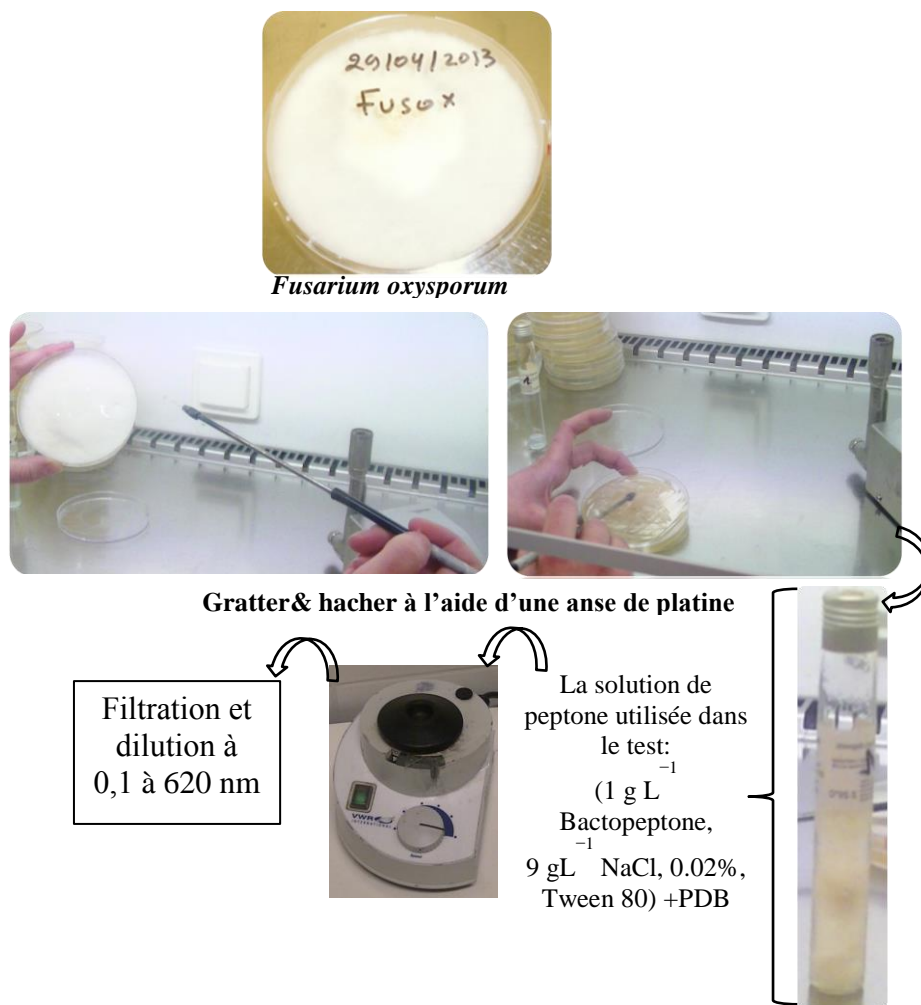


Figure II.21 : Protocole de l'activité antifongique sur les champignons non-sporulants

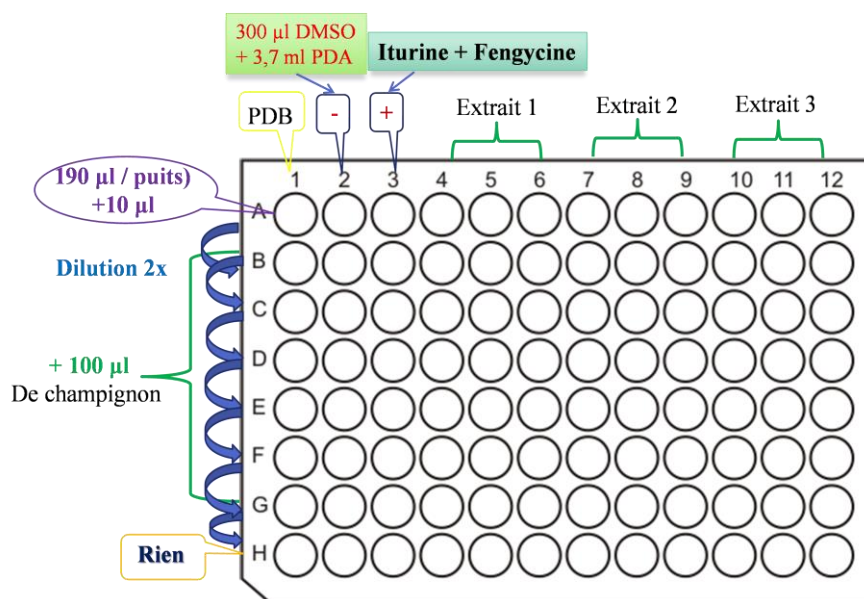


Figure II.21-1 : Protocole de microdilution sur les plaques multi-puits de 96 puits

⇒ Conclusion

Dans ce chapitre nous avons reporté les techniques et méthodes généralement utilisées dans le domaine de la recherche des activités biologiques *in vitro* notamment les activités : cytotoxique par la méthode du MTT, antibactérienne directe et indirecte par la méthode de microdilution et la CCM-Bioautographie, et antifongique par la méthode de microdilution. L'adaptation de ces techniques et méthodes à nos travaux personnels nous a permis de tester la partie soluble dans le chloroforme de l'extrait hydro-méthanolique des parties aériennes de la plante que nous avons sélectionnée pour cette étude.

Les résultats encourageants obtenus au cours de ces tests nous ont incités à procéder à l'investigation phytochimique de notre extrait (voir chapitre III) et de ce fait tester individuellement les composés isolés à la recherche des produits responsables des activités constatées. Les résultats de ces tests sont reportés dans le chapitre V.

Références bibliographiques

- [1] Gosland M P, Lum BL, Sikic B I. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res* 1989; 49: 6901-6905.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- [3] Bury M, Girault A, Mégalizzi V, Spiegl-Kreinecker S, Mathieu V, Berger W, Evidente A, Kornienko A, Gailly P, Vandier C, Kiss R. Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. *Cell Death Dis* 2013; 4 (3): e561; doi:10.1038/cddis.2013.85.
- [4] Avril J-L, Fauchère J-L. *Bactériologie générale et médicale*. Edition Ellipses. 2002: 14.
- [5] Bentley R, Bennett JW. What Is an Antibiotic? Revisited *Adv appl mech* 2003; 52: 303-331.
- [6] Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabe E. Bêtalactamines. *EMC-Maladies infectieuses* 2004 ; 1:129-202.
- [7] Gutmann L, Williamson R. Paroi bactérienne et bêta-lactamines. *Midecine sciences*1987; 2 (3) : 75-81.
- [8] Kastalli S, El Aïdli S. *Pharmacologie des Bêta-Lactamines Classification - Spectre d'activité - Pharmacocinétique*. Centre National de Pharmacovigilance. 2009.
- [9] Smith JT. Penicillinase and ampicillin resistance in a strain of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1963;30:299-306.
- [10] Faoucher M, Sourisse J. *Pharmacologie, Les anti-infectieux, MC VERDIER-LORNE*.2010.
- [11] Puyt JD. Bêta-lactamines. *Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire, bases de l'antibiothérapie*. Edition ONIRIS – Nantes. 2006 : 204.
- [12] Ruppé E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M *Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M Antibiotiques* (2010); 12 :3-16.
- [13] Archambaud M. *Les Antibiotiques*. Laboratoire Bactériologie-HygièneCHU Rangueil Toulouse.2009.
- [14] Comte D, Petitpierre S, Spertini F. Allergie aux b-lactamines. *Rev Med Suisse* 2012 ; 8 : 836-42.

- [15] Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin).
Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006.
Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire, 2009 : 81.
- [16] NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition. Copyright © Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 2006; 26(2):14.
- [17] NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in: *Approved Standard*, Washington.
- [18] Mouton Y, Bingen E, Deboscker Y, Dubreuil L. Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux, John Libbey Eurotext, Paris. France. 2000: 288.
- [19] Okusa PN, Stévigny C, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 476-481.
- [20] Mackay ML, Milne K, Gould IM. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions., *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15:125-129.
- [21] Okusa P N, Stévigny C, Duez P. Medicinal plants: A tool to overcome antibiotic resistance? *Medicinal plants classification biosynthesis and pharmacology*. 2009.
- [22] Okusa PN, Stévigny C, Devleeschouwer M, Duez P. Optimization of the culture medium used for direct TLC–bioautography. Application to the detection of antimicrobial compounds from *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *J Planar Chromatogr* 2010; 23(4): 245-249.

Chapitre III

*Etude phytochimique de
l'espèce Centaurea
diluta Aiton subsp.
Algeriensis (Coss. & Dur.)
Maire*

III. Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea diluta* Aiton subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire

Ce chapitre est consacré à notre étude phytochimique. Il débute par les critères de choix de l'espèce *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Cos. & Dur.) M., sa place dans la systématique botanique, sa répartition géographique, sa description macroscopique et microscopique et le protocole expérimental. Ce dernier comporte IV étapes essentielles, à commencer par la macération, la partition par des solvants de polarité croissante par extraction liquide-liquide, le fractionnement, la séparation et la purification par diverses méthodes chromatographiques jusqu'à l'obtention des composés purs et enfin l'identification structurale que nous reportons dans le chapitre IV.

III.1. Critères du choix de l'espèce *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire

Les critères du choix de cette espèce, repose essentiellement sur le fait que les espèces appartenant au genre *Centaurea* de la famille Asteraceae ont des propriétés thérapeutiques reconnues notamment : des pouvoirs astringents et diurétiques [1], analgésiques [2], antiplasmodial et cytotoxique [3], antibactériens [4], antifongiques [5], anti-inflammatoires [6], antiseptiques, antipyrétiques, antirhumatismal et fébrifuge [7]. En effet, l'espèce *Centaurea cyanus* est utilisée comme plante médicinale, car elle est réputée pour son traitement des affections oculaires. On dit par ailleurs, qu'elle possède des propriétés légèrement antiseptique, calmantes, fortifiantes, antirhumatismales, diurétiques, astringentes, digestives et cholagogues ainsi, la décoction de ses fleurs soigne la toux et les catarrhes et est utilisée en lavage, contre l'inflammation des yeux, des paupières, contre la conjonctivite. Elle est également réputée pour l'utilisation de l'extrait de ses fleurs (un colorant bleu) en peinture, imprimerie, cosmétique et en pharmacie [8,9]. D'autres espèces de ce genre sont utilisées en médecine populaire dans les régions où elles poussent. Elles sont employées seules ou en association avec d'autres plantes [10,11]. Un grand nombre de centaurées sont bien connues dans la tradithérapie.


Du point de vue métabolisme secondaire, les espèces de ce genre sont réputées par l'accumulation d'importantes classes de substances naturelles comme les flavonoïdes, les lactones sesquiterpéniques, les triterpènes et les lignanes [12-15]. Les résultats des investigations phytochimiques réalisées dans notre laboratoire sur des espèces de ce genre, nous ont encouragés à entreprendre cette étude à la recherche de nouvelles molécules

bioactives. Une recherche bibliographique exhaustive sur ce genre montre que seules des études concernant la recherche de produits acétyléniques et la composition chimique de l'huile essentielle ont été réalisées sur *Centaurea diluta* Ait mais aucune étude pharmacologique ni phytochimique n'est reportée sur *C. diluta* Ait sous espèce *algeriensis*. Il faut également et surtout signaler l'endémisme de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire, que l'on trouve essentiellement en Algérie occidentale.

III.2. Place dans la systématique (botanique)

Ce classement se réfère à la classification botanique [1] reportée dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Classification botanique de l'espèce étudiée

Règne	Plantae
Subdivision	Spermatophytae
Division	« Angiospermae » Magnoliophyta Reveal
Classe	« Magnoliopsida Brongn » Dicotyledonae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae « Martinov » [16]
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	<i>Cynarea</i>
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.)
Nom complet	<i>Centaurea diluta</i> Ait. subsp. <i>algeriensis</i> (Coss. & Dur.)
Synonymes (Hétérotypique) [17-20]	= <i>Centaurea algeriensis</i> Coss. & Durieu (Basionyme)
	= <i>Centaurea diluta</i> var. <i>micrantha</i> (Maire) (1923)
	= <i>Centaurea algeriensis</i> var. <i>micrantha</i> Maire (1934)
	= <i>Centaurea acutangula</i> Boiss. & Reut. (1852)
	

III.2.1. Description de l'espèce

Champs et pâturages argileux et pierreux de la plaine et des basses montagnes, jusque vers 1300 m.

Fleurs purpurines, celles de la périphérie plus grandes, rayonnantes, plus foncées ; plante grêle, rameuse, élancée, assez voisine du *C. nicaeensis* ; écailles du périclite à appendices assez longuement décurrents, ciliés ; aigrette égalant la moitié de l'achaine [16, 21].

Épine médiane des appendices des bractées moyennes 4-6 fois aussi longue que les épines latérales; celles-ci en nombre variable et décurrentes sur le corps de la bractée (Figure III.1).

Plante rigide, de 30-60 cm. Feuilles non décurrentes sur la tige; les supérieures sessiles, lancéolées, ± embrassantes. Petites capitules de 1 cm de large sur 2 de long fleurons compris mais sans les épines), non involuqués par des feuilles bractéales. Appendice des bractées moyennes décurrent sur l'écaïlle [17].

Akènes petits, blanchâtres, à aigrette plus courte que le corps

Champs, pâturages argileux et pierreux CCC: Tell: ssp. *algeriensis* Coss. & Dur. Alg. Mar. [16].

Période de la floraison : Mai-juin [16].

Nom commun : «Bou neggar » [17].

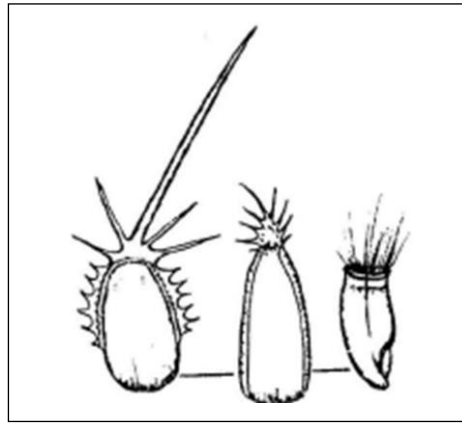


Figure III.1 : Bractées de *C. diluta*

III.2.2. Description macroscopique

Très radiée : disque multiflore, subrégulariflore, androgyniflore, couronne unisériée, ampliatiflore, neutriflore. Péricline très inférieur aux fleurs du disque, ovoïde, formé de squames régulièrement imbriquées, interdilatées, appliquées, coriaces ; les intermédiaires ovales, arrondies au sommet, surmontées d'un appendice décurrent, large, arrondi, concave, scarieux, ayant le milieu épais, presque opaque, les deux cotés minces, membraneux, presque diaphanes, irrégulièrement lacérés, et le sommet échancré, produisant du fond de l'échancrure un filet épais, roide, spiniforme (long sur les squames extérieurs), court sur les intermédiaires, nul sur les squames intérieures). Clinanthe épais, charnu : plan, garni de fimbriilles nombreuses, libres, longues, inégales, filiformes-laminées. Fleurs du disque: ovaire comprimé, pubescent, portant une grande et belle aigrette normale, parfaite

Avec une petite aigrette intérieure. Corolle (purpurine) un peu obringente. Étamines à filets courtement poilus ; appendices apicaux des anthères longs, aigus. Style à deux stigmatophores longs et entrecroisés.

Fleurs de la couronne : Faux ovaire glabre, inaigneté. Corolle (purpurine) extracrescente, à tube long, à limbe liguliforme ou palmatiforme, élargi de bas en haut, divisé en cinq lobes inégales par autant d'incisions, dont l'intérieure, beaucoup plus profonde, descend jusqu'à la base du limbe [36].

Plante tellienne. Epine centrale des bractées moyennes de l'involucre atteignant 20-35 mm de long, accompagnée de 6-8 épines basales plus courtes. Epines soit de même couleur que le corps de la bractée, soit plus pâles. Plante robuste de 30-60 cm.

- Tiges complètement ailées à ailes sinueuses et dentées-épineuses, tomenteuses.
- Capitules de 2,5-3 cm de large, parfois plus (épines non comprises).
- Feuilles linéaires, les inférieures sinuées-dentées et pétiolées.
- Akènes gros (5 mm sur 2), jaunâtres et légèrement pubescents, à aigrette plus courte que le corps et à hile très gros.
- Bractées de l'involucre soit simplement ciliées, soit épineuses mais à épines situées seulement latéralement sur l'appendice, Bractées moyennes de l'involucre à appendice à épines minuscules (2-3 mm) [17].

III.2.3. Répartition géographique

- ✓ Présente depuis 1946-1948 & 1953-1958 à Mostaganem [22].
- ✓ Tell algérien, espèce rare (R) à Oran [21].
- ✓ À Genève ils n'ont qu'un seul échantillon d'herbier de 1948 de la région d'Oran.
- ✓ | Alg. Mar. | [17].
- ✓ Sur sables surtout – Localisée en Algérie occidentale O1-2-3, AS1.

O : Secteur oranais ; O: Sous-secteur des (1 : Sahels littoraux ; 2 : des plaines littorales; 3 : de l'Atlas Tellien, AS1: Sous-secteur de l'Atlas Saharien oranais) vient toutefois à l'est jusqu'à Affreville (Khemis Miliana actuellement) « *Chebreq* ».

Espèce endémique en Algérie occidentale (Oran, Mostaganem, Aïn Defla) [20,24] et en Maroc (entre Taza et Bab Merzouka ; Berkane à Aïn Zedba ; Oujda Bni Yala au SW Guenfouda) [20].

III.2.4. Description microscopique

III.2.4.1. Echantillon

Poudre de parties aériennes de couleur brun-verdâtre (Figure III.2).

Marque du moulin: Culatti ; Modèle CZ13 ; Référence DCFH 48.

III.2.4.2. Réactif utilisé

Réactif de Steimetz : réactif utilisé pour l'examen microscopique de coupe et de poudre végétale [24].

III.2.4.3. Composition et préparation du réactif de Steimetz

III.2.4.3.1. Réactif A

a. Rouge Soudan III : 0,015 g

Ethanol 94 : 20 mL

Hydrate de chloral : 30 g

Dissoudre à froid.

b. Sulfate d'aniline : 1,5 g

Eau : 40 mL

Dissoudre en chauffant légèrement;

après refroidissement, ajouter :

Hydrate de chloral : 30 g

Iodure de potassium : 0,35 g

Sulfite de sodium anhydre : 0,03 g

Mélanger **a** et **b**; laisser reposer au moins 24 h et filtrer.



Figure III.2 : Poudre de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.)

III.2.4.3.2. Réactif B

Sulfate ferrico-ammonique : 4 g

Hydrate de chloral : 20 g

Eau : 20 mL

Dissoudre à froid, puis ajouter :

Glycérol : 20 mL

Laisser reposer au moins 24 h et filtrer.

III.2.4.3.3. Mode d'emploi

Déposer sur une lame, une goutte de **réactif A**; y ajouter une goutte de **réactif B**; bien mélanger puis y introduire l'échantillon à examiner (coupe ou poudre) et recouvrir d'une lamelle.

III.2.4.3.4. Observation

- ✓ Microscope optique (grossissement 200 et 400 x)
- ✓ Marque : CHK-B145 OLYMPUS CH-2 (Figure III.3).

III.2.4.3.5. Eléments observés

Très nombreux poils tecteurs, endothécium, Partie de laineux trichomes (Poils de laine complexes avec tige multicellulaire et une très longue cellule terminale), Pollen, des Fragments de vaisseaux, un parenchyme avec vaisseaux ponctués, tige, stomates et soies de Pappus. Les Figures III.5-1 à III.5-20 montrent les éléments microscopiques de la poudre des parties aériennes de *Centaurea diluta* Aiton subsp. *algeriensis* (Cosson & Durieu) observés dans le réactif de Steimetz [25].

Une description complète reste à établir à partir de ces premiers éléments.



Figure III.3 : Microscope optique utilisé (CHK-B145 OLYMPUS CH-2)

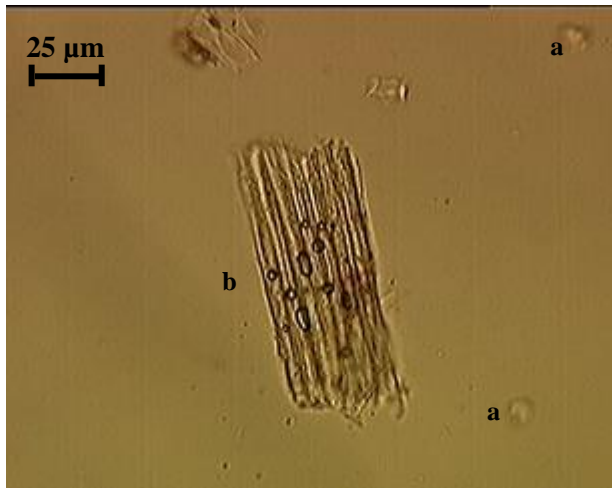


Figure III.4-1 :
a. Fibre Cellules adjacentes, à parois minces en forme de bande d'une balle de feuille [25].
b.tige.

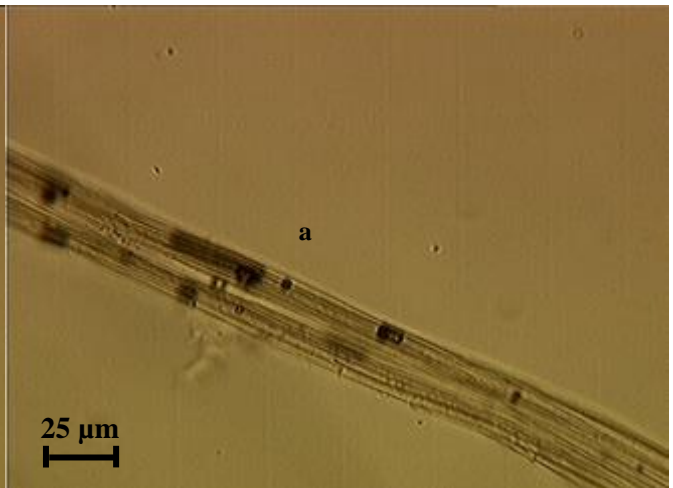


Figure III.4-2 :
a. tige

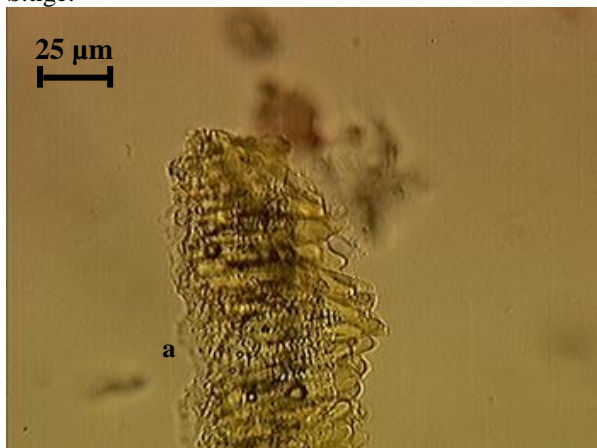


Figure III.4-3 :
a. Fragment de parenchyme épidermique

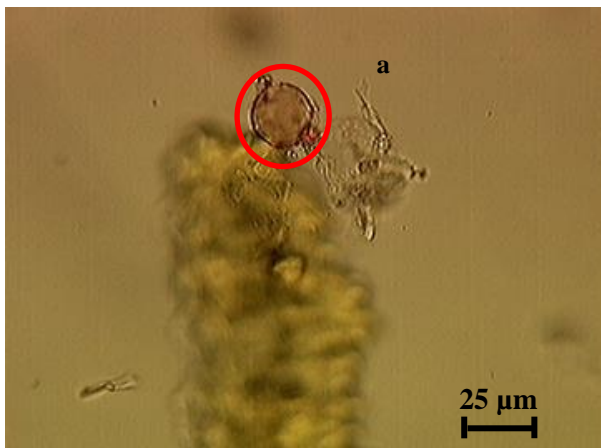


Figure III.4 -4 :
a. pollen



Figure III.4 -5 :
a.Stomate **b.** Parenchyme

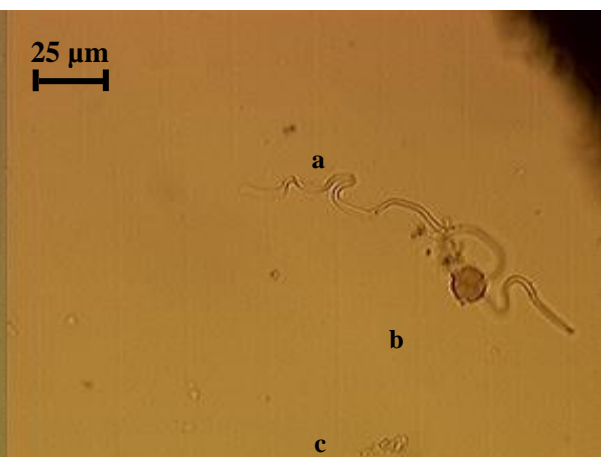


Figure III.4 -6 :
a. Partie de laineux trichomes (Poils de laine complexes avec tige multicellulaire e tune très longue cellule terminale), **b.** Pollen, **c.** Fragments de vaisseaux



Figure III.4-7 : a.Vaisseau ; b.Poil tecteur

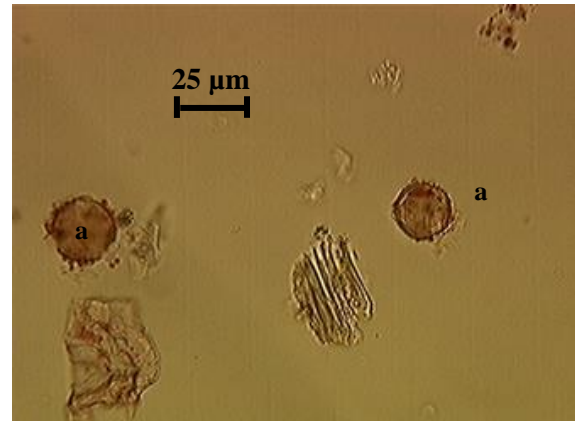


Figure III.4 -8 : a. Pollen

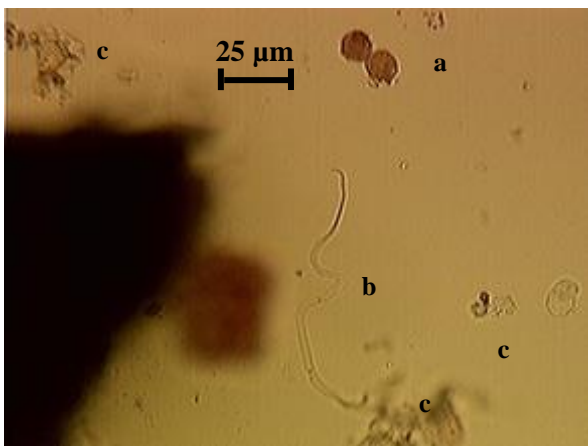


Figure III.4-9 : a. Pollen ; b. Poils de laine complexes avec tige multicellulaire et une très longue cellule terminale ; c. Fragments de vaisseaux ; d.Cristaux d'oxalate de calcium

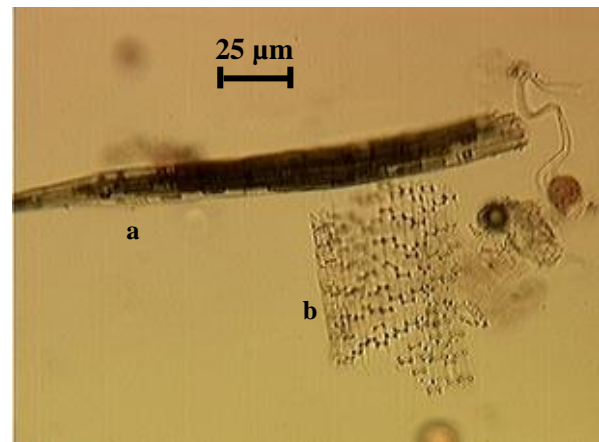


Figure III.4-10 : a.tige ; b. Endothecium

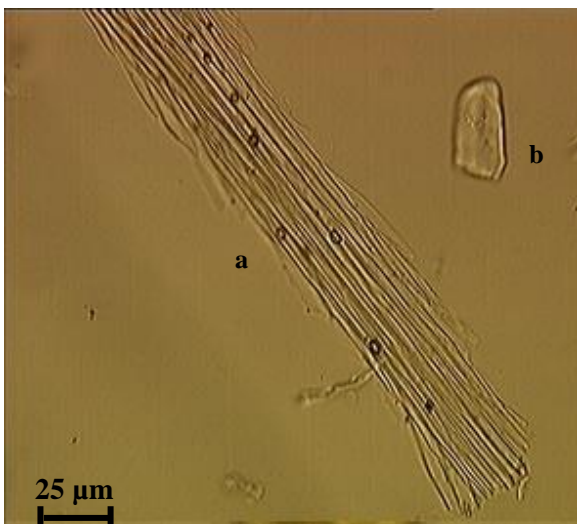


Figure III.4-11 : a. soies de Pappus
b. des fragments de cellules

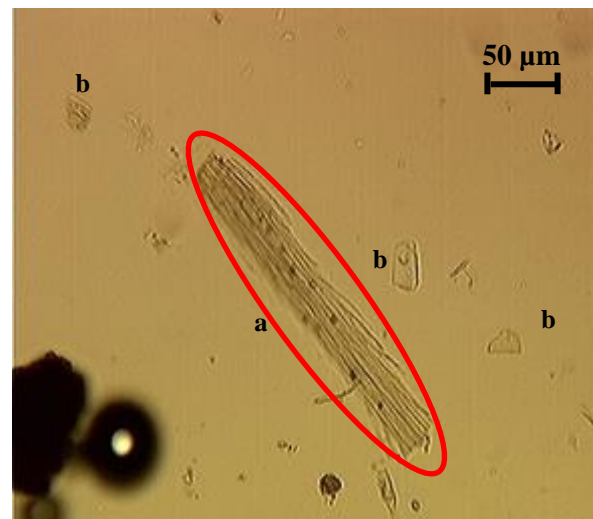


Figure III.4-12 : a. soies de Pappus
b. des fragments de cellules

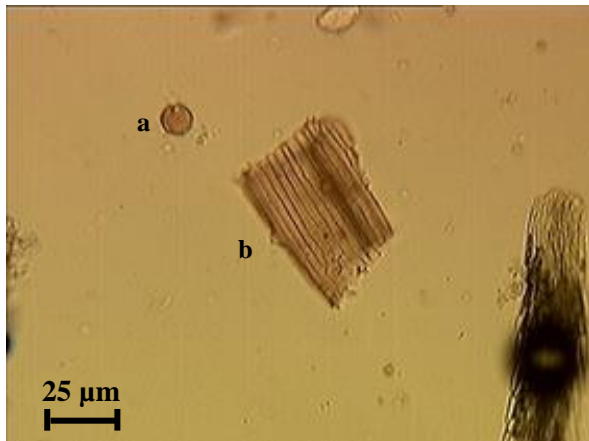


Figure III.4-13 : a. Pollen ; b. Épiderme

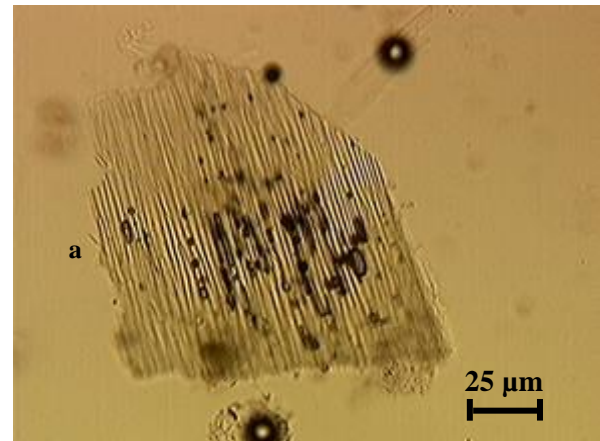


Figure III.4-14 : Épiderme

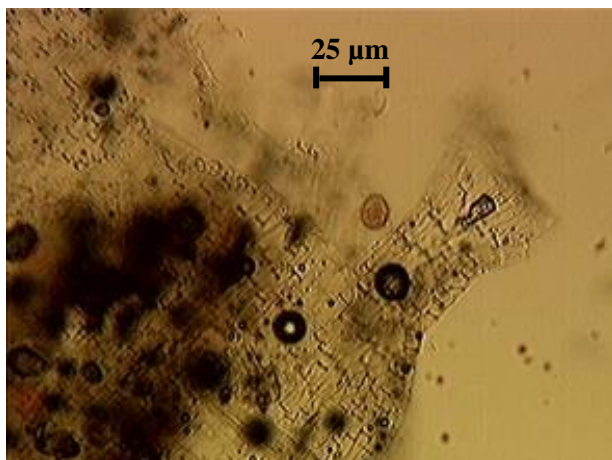


Figure III.4-15 : Endothecium

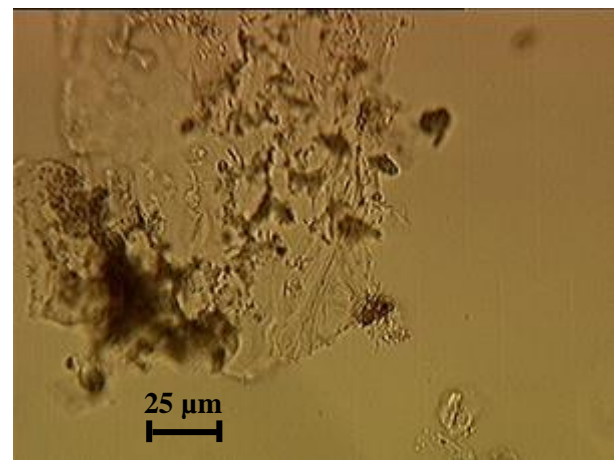


Figure III.4-16 : Fragments de vaisseaux



Figure III.4-17 :
a. Les grains de pollen tricolpate sec, avec exine finement structuré (2 plans de focalisation).

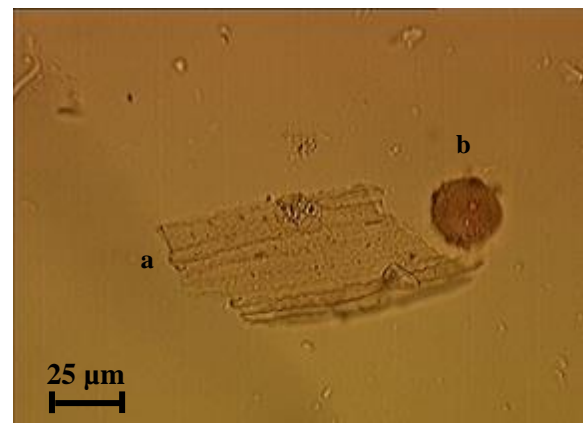


Figure III.4-18 : a. Épiderme de la pointe du tube de la corolle avec des cellules allongées (avec parois cellulaires de consentement) ; b. pollen.

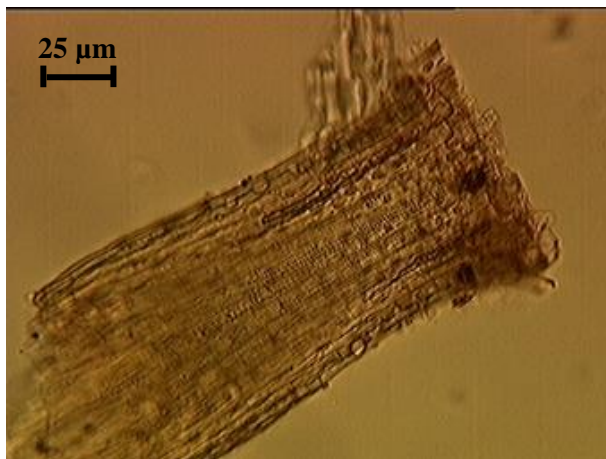


Figure III.4-19 : Parenchyme avec vaisseaux ponctués

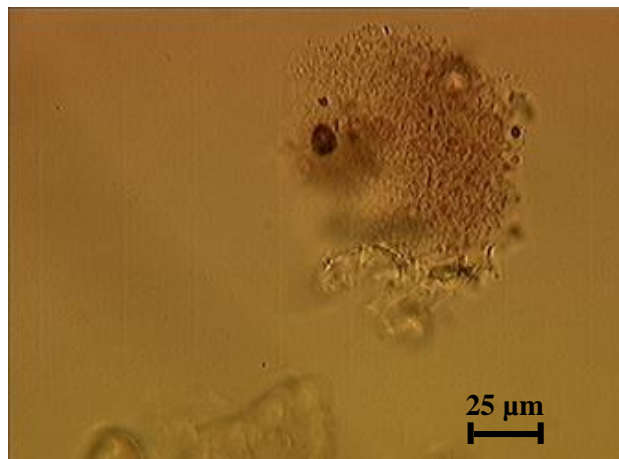


Figure III.4-20 : Fragments de vaisseaux

Figure III.4: Eléments microscopiques de la poudre des parties aériennes de *Centaurea diluta* Aiton subsp.algeriensis (Cosson & Durieu) observés dans le réactif de Steimetz.

III.3. Réactifs et matériels utilisés (partie phytochimique)

III.3.1. Appareillages

- Evaporateur rotatif, Rotavapor 14335, Buchi, Pleuger
- Evaporateur centrifuge Speed Vac VR-1, Heto Lab Equipment
- CombiFlash®Rf 208M20242, Teledyne Isco
- Lampe UV ,CAMAG 254 nm & 366 nm.

III.3.2. Matériel

- Broyeur : Culatti, modèle CZ13, référence DCFH48.
- Ballons rôdés à fond rond
- Flapules munies d'un couvercle à visser
- Cuves pour CCM
- Routine plaques pour chromatographie préparative (PLC) de gel de silice (20 x 20 cm gel de silice 60 PF₂₅₄, Merck)
- Plaques pour CCM recouvertes de gel de silice 60F₂₅₄, Rouleau en plastique 500 x 20 cm (Merck KGaA, Allemagne)
- Tubes à essais de 30 mL et portoirs correspondant
- Colonnes ouvertes en verre de différentes dimensions.

III.3.3. Réactifs et solvants

Les solvants utilisés dans ce travail sont les suivants : Ether de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther diéthylique, la majorité de ces solvants étaient de grade analytique et fournis par CHEMLAB Belgique.

Tableau III.2 : Tableau des solvants

N°	Désignation	Qualité	Fournisseurs
1	Acétone	analytique	CHEMLAB Belgique
2	Dichlorométhane	analytique	CHEMLAB Belgique
3	Cyclohexane	analytique	CHEMLAB Belgique
4	Ether de pétrole	analytique	CHEMLAB Belgique
5	Chloroforme	analytique	CHEMLAB Belgique
6	Acétate d'éthyle	analytique	CHEMLAB Belgique
7	<i>n</i> -butanol	analytique	CHEMLAB Belgique
8	DMSO	analytique	Merck® (Overijse, Belgique)

Tableau III.3: Tableau des phases stationnaires

N°	Désignation	Références	Fournisseurs
1	CCM gel de silice 60 F ₂₅₄	Merck KGaA 1.09385.1000	Merck Germany
2	PLC gel de silice 60 F ₂₅₄	Merck	VWR Belgique
3	Gel de silice pour CC 230–400 mesh ASTM	645524-2,5	Sigma Aldrich Belgique
4	SF10-4g Septra Si 50 µm Colonne RediSep: Silica 12 g	SN: E04101AFC5AA7 Lot: 1811179020X	Interchim France
5	Sable de mer (see sand)	Merck KGaA 1.07712.1000	Merck Germany

Tableau III.4 : Révélateurs

N°	Désignation	Fournisseurs
1	vanilline sulfurique a 10%	Merck Germany
2	anisaldehyde	VWR Belgique
3	MTT	Sigma Aldrich Belgique

III.4. Récolte du matériel végétal

La plante (Figure III.5) a été récoltée dans sa période de la floraison durant le mois de juillet 2012 de la région d'Aïn Maabed à Djelfa « Figure III.6 ; III.7 », (l'endroit est connu pour une formation géologique remarquable appelée Rocher Salt [26].

Les coordonnées GPS [système mondial de positionnement (littéralement) ou Géo-positionnement par satellite] sont données pour une altitude à 1038 m et une position (34° 53' 39,6" N, 3° 3' 56.3" E).



Figure III.5 : Les parties aériennes de *Centaurea diluta* Aiton subsp. *algeriensis* (Cosson & Durieu) Maire (1934)

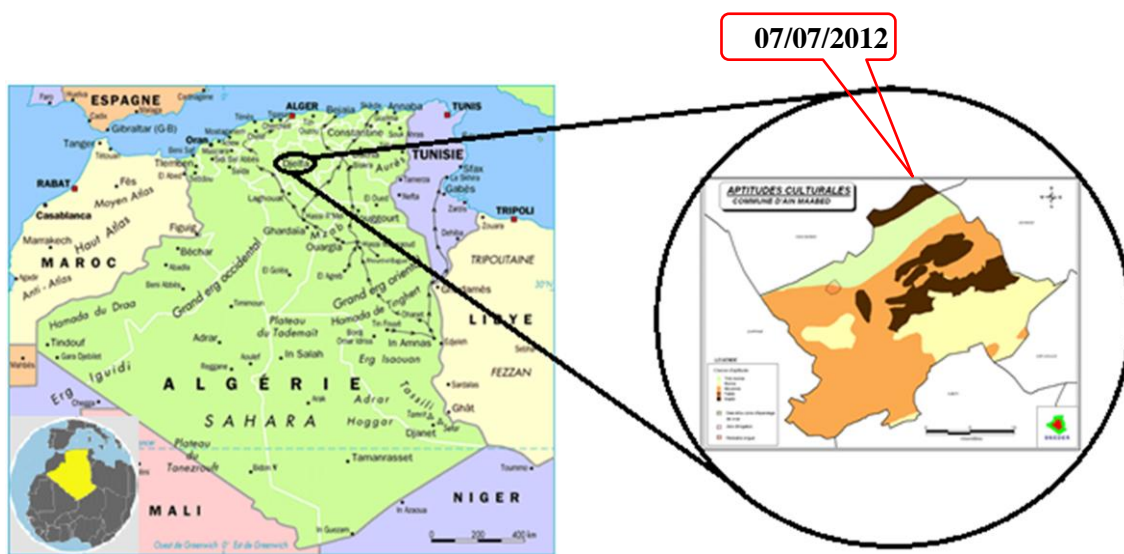


Figure III.6 : Carte géographique de l'Algérie indiquant le lieu de la récolte

Figure III.7 : Ain maabed, la région exacte de la récolte de *C. diluta* Ait.subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire

La détermination botanique de l'espèce a été réalisée par le professeur Kaabeche Mohamed (Figure III.8 ; voucher localisé au-dessus), spécialiste de l'identification des espèces algériennes du genre *Centaurea* (Laboratoire Biodiversité et Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences biologiques, Campus El-Baz, Université Ferhat Abbas Sétif, Algérie). Il s'est avéré qu'il s'agit d'une espèce endémique à l'Algérie occidentale et au Maroc [20,27]. Un voucher a été déposé dans l'herbier du jardin botanique de Meise en Belgique pour y être conservé. Il est enregistré sous la référence BR0000013666187 (Figure III.8 ; voucher localisé au-dessous).

Les parties aériennes de la plante (Figure III.6) sont séchées pendant plusieurs jours à l'abri de la lumière directe du soleil, pesées et conservées soigneusement à température ambiante et à l'abri de l'humidité jusqu'au moment de l'analyse où elles sont broyées finement à température contrôlée jusqu'à 35°C.



Figure III.8 :

Voucher (au-dessus) déposé au Laboratoire : Biodiversité et Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences Biologiques Campus El-Baz, Université Ferhat Abbas, Setif, Algérie.
Voucher (au-dessous) de *Centaurea diluta* Aiton subsp. *algeriensis* (Cosson & Durieu) Maire, déposé dans l'herbier du Jardin Botanique de Meise, Belgique (N°BR0000013666187).

III.5. Protocole expérimental

III.5.1. Extraction

Les parties aériennes (1500 g de feuilles et fleurs) séchées et broyées en poudre (Broyage léger à température contrôlée, jusqu'à 35 ° C) sont soumises à une extraction mécanique avec un mélange méthanol-eau (77 : 23, v/v, 25 L) pendant 48 heures à température ambiante. Après filtration, le marc est ré-extrait encore trois fois dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis puis concentrés sous pression réduite à une température n'excédant pas 35 °C. L'extrait obtenu est dilué sous agitation magnétique avec 600 mL d'eau distillée légèrement chauffée et laissé décanter à 4°C pendant une nuit pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, la solution obtenue est successivement soumise à une extraction liquide-liquide avec des solvants de polarités croissante, en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les quatre phases organiques récupérées sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à 40°C à sec et pesées. On obtient : 0,1 g d'extrait éther de pétrole ; 4,00 g d'extrait chloroforme ; 3,6 g d'extrait acétate d'éthyle et 19,6 g d'extrait *n*-butanol [28-32].

La phase aqueuse est finalement concentrée sous pression réduite à sec on obtient 95,2 g.

Les extraits ont été répartis dans plusieurs flacons, préalablement tarés, et sont de nouveau évaporés, cette fois-ci à sec, à l'aide du Speed Vac. Les extraits secs sont conservés au frigo en attendant d'être utilisés pour le criblage phytochimique, la séparation chromatographique et la préparation des solutions d'extraits nécessaires pour l'évaluation de l'activité antifongique, antimicrobienne et tests cytotoxiques (screening biologique).

L'organigramme représenté dans la figure III.9 montre les différentes étapes du processus d'extraction de *Centaurea diluta* Ait.subsp.*algeriensis* (Coss & Durieu) M.

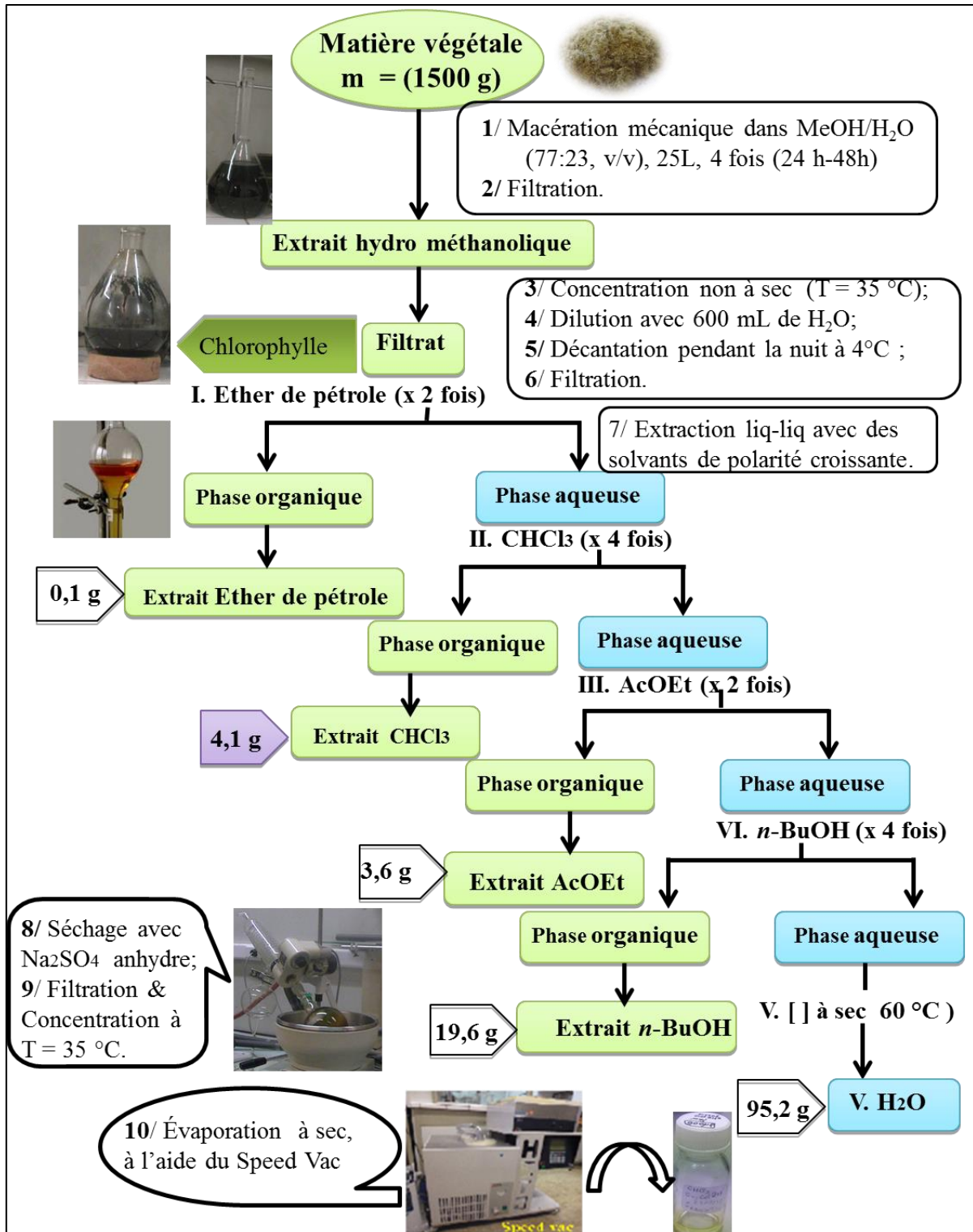


Figure III.9 : Protocole d'extraction de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire

III.5.2. Criblage phytochimique préliminaire

Le criblage phytochimique des extraits pour mettre en évidence la présence des métabolites secondaires a été réalisé par chromatographie sur couche mince en suivant la méthode décrite par Wagner et Bladt [33], ainsi que par des réactions en solution [34, 35]. Pour les chromatographies, il est nécessaire de préparer une solution de l'extrait avec une concentration connue : 5 mg/mL, ce qui nous permet de faire des tests quantitatifs. Notre étude a porté sur l'extrait chloroforme, en mettant 10 μ L de cette solution sur une plaque chromatographique de gel de silice, on sait que les résultats obtenus sont quantitatifs et concernent 50 μ g d'extrait (Figure III.10), si toutefois des étalons et les appareils nécessaires sont disponibles.



Figure III.10 : Etape préliminaire de criblage phytochimique

III.5.2.1. Tanins

La présence des tanins est détectée par une réaction en solution. 5 mL de notre extrait sont mélangés dans un tube à essai avec quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 1%. Une réaction positive est obtenue avec un changement de couleur vers le bleu-noirâtre (Figure III.11).



Figure III.11 : Précipité noirâtre représentatif d'un test positif à la présence de tanins

III.5.2.2. Saponines

Une petite portion de l'extrait à tester est diluée avec 5 mL d'eau dans un tube à essai. La solution est agitée vigoureusement durant 15 secondes, à la suite de quoi, on la laisse reposer. Après 15 minutes, la présence de 1 à 2 cm de mousse, est représentative d'une réaction positive (Figure III.12).



Figure III.12: Test positif à la présence de saponosides

III.5.2.3. Alcaloïdes

La détection des alcaloïdes se fait par CCM de gel de silice. Le système d'élution utilisé est : acétate d'éthyle/méthanol/eau (100 : 13,5 : 10). Selon Wagner e Bladt [33], la visualisation de la présence d'alcaloïdes est possible sans traitement chimique, à 365 nm, où des zones fluorescentes allant de la couleur bleue, blanche à jaune sont observées. Mais pour des résultats plus précis, des révélateurs sont utilisés, en particulier le réactif de Dragendorff qui est préparé avec deux solutions, mélangées dans une proportion de 1:1 afin d'obtenir une solution finale avec laquelle la plaque CCM est pulvérisée. Pour la première solution, il faut dissoudre 0,85g de nitrate de bismuth basique dans 10 mL d'acide acétique glacial et 40 mL d'eau chaude. La deuxième solution est préparée avec la dissolution de 8 g de potassium iodé dans 30 mL d'eau. Dans ce cas, le système d'élution de la plaque est constitué par l'acétate d'éthyle/méthanol (90:10) et les zones représentatives des alcaloïdes apparaissent avec une teinte orange-brunâtre (Figure III.13).

III.5.2.4. Anthraquinones

Phase mobile : acétate d'éthyle/méthanol/eau (100: 13,5: 10)

Révélation : pulvérisation avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 % dans l'éthanol. La présence des anthraquinones est visualisée à 365 nm où des zones de couleur rouge apparaissent (Figure III.13).

III.5.2.5. Flavonoïdes

Phase mobile: l'acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100: 11: 11: 26). Observation sous UV à 365 nm et/ou utiliser un révélateur pour augmenter la sensibilité, qui pour ce groupe est le PEG (polyéthylène glycol). Pour cela, la plaque est d'abord pulvérisée par le réactif de Neu ou « Naturstoffreagenz A » (une solution méthanolique de l'acide diphenylborique β -aminoéthylester 1%) [34] et ensuite avec après révélation, on observe à

365 nm, des zones de couleur jaune-orange ou jaune-vert, ce qui indique la présence de flavonoïdes comme les flavones, les flavonols et les flavanones (Figure III.13).

Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes; le type de flavonoïde est identifié selon la couleur obtenue [35].

III.5.2.6. Terpénoïdes

Le système d'élution utilisé est toluène/chloroforme/éthanol (40: 40: 10). Sans traitement chimique, on peut observer les terpénoïdes sous UV à 365 nm. On peut utiliser également faire appel à un traitement chimique, dans ce cas le révélateur est l'anisaldéhyde-sulfurique, qui est préparé en mélangeant 0,5 mL de *p*-anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde), 10 mL d'acide acétique glacial, 85 mL de méthanol et 5 mL d'acide sulfurique concentré. Après avoir pulvérisé la plaque avec ce mélange, on la chauffe à 100 °C durant 5-10 min. On observe la plaque sous UV à 365 nm. En présence de terpénoïdes, des zones de couleur rouge-violette apparaissent. D'après Stahl, le réactif à l'anisaldéhyde peut être préparé en mélangeant 0,5 mL de *p*-anisaldéhyde, 1 mL d'acide sulfurique et 50 mL d'acide acétique glacial. Les plaques ont été trompées dans ce réactif, puis chauffées à 105 °C; l'apparition de taches violettes, visibles à l'œil nu, indique la présence de sesquiterpènes lactones [35].

III.5.2.7. Résumé du criblage des chromatographies sur couche mince

De façon plus résumée, le tableau III.5 reprend la phase mobile, le révélateur et la couleur des taches observées pour chaque groupe chimique testé en chromatographie sur couches minces. On note bien que la phase stationnaire est bien le gel de silice.

Tableau III.5 : Résumé des directives et observations pour le criblage des groupes chimiques en CCM

Métabolites secondaires	Phase mobile	Révélation	Observation à 365 nm
Alcaloïdes	AcOEt/CH ₃ OH (90:10)	Réactif de Dragendorff	Orange-brunâtre
Anthraquinones	AcOEt/CH ₃ OH/Eau (100: 13,5: 10)	KOH 10% dans EtOH	Rouge
Flavonoïdes	AcOEt/HCO ₂ H/AcOH/Eau (100: 11: 11: 26)	PEG	Jaune-vert ou jaune-orange
Terpénoïdes	Toluène/CHCl ₃ /EtOH (40: 40: 10)	Anisaldéhyde sulfurique	Rouge-violet

Lampe UV (254 nm et 366 nm CAMAG)

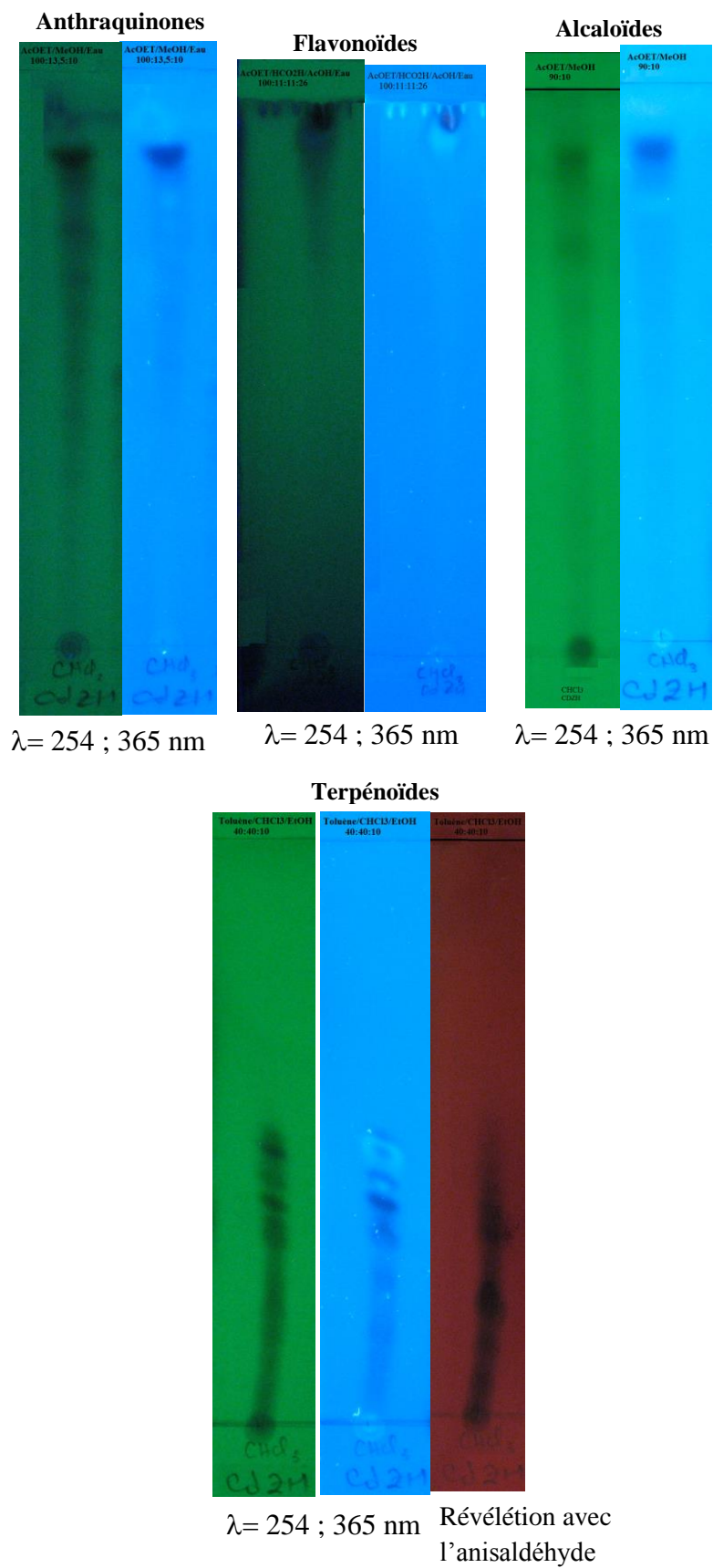


Figure III.13 : Profil chromatographique de screening phytochimique de l'extrait CHCl_3

III.6. Séparation & purification chromatographique

La chromatographie est une méthode analytique largement utilisée pour la séparation des produits selon leur polarité.

III.6.1. Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposé sur une feuille d'Aluminium, plusieurs tests ont été effectués pour rechercher le système de séparation optimale de l'extrait chloroforme. La meilleure séparation a été obtenue avec le système : **dichlorométhane/acétate d'éthyle/MeOH** (6:3:1).

III.6.2. Séparation sur colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution **dichlorométhane/acétate d'éthyle/MeOH** en gradient de polarité. Une masse d'environ 4,0 g d'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM) (120 g) préparée dans de le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système **dichlorométhane/acétate d'éthyle/MeOH** en commençant par de le dichlorométhane pur et en terminant par de le méthanol pur avec un fractionnement tous les 25 mL.

Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.6.

Tableau III.6: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) M.

Lot de pots	N° de la fraction	Remarques	Système d'éluion			Poids de la fraction (mg)
			% CH ₂ Cl ₂	% AcOEt	% CH ₃ OH	
1	F ₀	gras	100,0	0,0	0,0	0,10
2	F ₁	chlorophylles	100,0	0,0	0,0	01,00
3	F ₂	2 spots majoritaires	98,0	2,0	0,0	12,20
4-6	F ₃		98,0	2,0	0,0	26,20
7	F ₄	Mélange	98,0	2,0	0,0	12,20
8-10	F ₅	Mélange	98,0	2,0	0,0	13,00
11-12	F ₆	Mélange	95,0	5,0	0,0	28,50
13-14	F ₇	Précipité blanc	95,0	5,0	0,0	44,40
15-17	F ₈	Précipité jaunes	95,0	5,0	0,0	64,90
18-22	F ₉	2 spots majoritaires	90,0	10,0	0,0	61,50
23-28	F ₁₀		87,5	12,5	0,0	19,60
29-31	F ₁₁	/	87,5	12,5	0,0	05,40
32-37	F ₁₂		85,7	14,3	0,0	12,40
38-50	F ₁₃	Mélange	83,3 ; 80,0	16,7 ; 20,0	0,0	93,50
51-59	F ₁₄	Mélange	75,0 ; 67,0	25,0 ; 34,0	0,0	286,70
60-67	F ₁₅	Mélange	50,0 ; 34,0	50,0 ; 67,0	0,0	560,00
68-76	F ₁₆	Sous forme huileux verte	34,0 ; 25,0	67,0 ; 75,0	0,0	1017,70
77-84	F ₁₇	Précipité blanc	20,0 ; 16,7	80,0 ; 83,3	0,0	67,50
85-89	F ₁₈	Mélange complexe	14,3 ; 12,5	85,7 ; 87,5	0,0	260,50
90-94	F ₁₉		10,0	90,0	0,0	91,60
95-96	F ₂₀		0,0	100,0	0,0	123,80
97	F ₂₁		0,0	0,0	100,0	511,40
98	F ₂₂		0,0	0,0	100,0	396,70
99-100	F ₂₃		0,0	0,0	100,0	172,00

III.6.3. Etude des fractions de la colonne mère (C1)

III.6.3.1. Etude de la fraction F₃ : 26,2 mg

La fraction F₃ (26,2 mg, CH₂Cl₂ / AcOEt ; 98 :2) a subi une séparation chromatographique sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système (éther de pétrole /CH₂Cl₂ /AcOEt ; 6:3:1), pour donner le produit ZH3-1 (19,6 mg) et ZH3-3 (3,5 mg) sous forme de cristaux blancs. Le produit ZH3-3 est reporté dans ce travail comme étant le composé **1**. Le produit ZH3-1 a été reporté comme étant le composé **6**.

III.6.3.2. Etude de la fraction F₈ : 64,9 mg

La fraction F₈ (CH₂Cl₂ / AcOEt ; 95: 5) (64,9 mg), insoluble dans le méthanol, a donné après concentration un composé jaunâtre, ce dernier a subi une recristallisation dans un mélange dichlorométhane et un peu de méthanol. Les cristaux jaunes obtenus sont lavés plusieurs fois avec du méthanol pour obtenir un produit ultra-pur ZHF₈ (7,5 mg) sous forme d'aiguilles (composé **4**). Testé par les vapeurs d'ammoniac sur plaque CCM, il donne une coloration jaune, caractéristique d'un flavonoïde.

III.6.3.3. Etude de la fraction F₁₀ : 19,60 mg

La fraction F₁₀ (CH₂Cl₂ / AcOEt ; 87,5: 12,5) (19,60 mg) chromatographiée sur des plaques préparatives de gel de silice éluées par le système : (CH₂Cl₂ / AcOEt ;4: 1) a permis d'isoler un produit pur ZH10 (5,0 mg) sous forme d'une poudre jaunâtre (composé **5**) qui apparaît sous forme d'un spot unique sur plaque analytique de gel de silice. La coloration de ce produit sur plaque CCM exposé à des vapeurs d'ammoniac est jaune, indiquant un flavonoïde. Les autres produits issus de cette séparation, sont sous forme de mélange et en très faible quantité.

III.6.3.4. Etude des fractions F4, F5, F6

$F_4 + F_5 + F_6 = F' = 53,7$ mg.

D'après les résultats des tests analytiques sur plaque CCM de gel de silice avec comme système d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{AcOEt}$, les fractions F_4 , F_5 et F_6 sont très similaires du point de vue composition chimique.

Les fractions : F_4 (12,2 mg) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{AcOEt}$ 98: 2), F_5 (13,0 mg) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{AcOEt}$ 98: 2) et F_6 (28,5 mg) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{AcOEt}$ 95: 5) ont été combinées (53,7 mg) et rechromatographiées sur une 2^{ème} colonne (C2) (1 cm x 50 cm) de gel de silice 230-400 mesh (600 mg) préparée dans l'éther de pétrole et éluee ensuite par le CH_2Cl_2 enrichi progressivement par l'acétate d'éthyle.

Le suivi de la colonne et le rassemblement des fractions ont été effectués sur plaques analytiques révélées sous les radiations UV 254 et 365 nm et par pulvérisation avec des révélateurs (vanilline sulfurique à 10% et anisaldéhyde) et chauffées pendant 3 à 5 mn à 100-110°C. Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le tableau III.7.

Tableau III.7: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne du mélange F_4 , F_5 et F_6 .

Lot de pots	Sous-fractions	Remarques	Système d'éluion			Poids (mg)
			% Ep	% CH_2Cl_2	% AcOEt	
1	F'_0	traces	100,0	0,0	0,0	0,3
2-10	F'_1	Graisse	95,0	2,5	2,5	0,1
11-14	F'_2	chlorophyll e	90,0	5,0	5,0	0,3
15-16	F'_3	spot	80,0	10,0	10,0	8,2
17-20	F'_4	spot	70,0	15,0	15,0	12,7
21-26	F'_5	traces	60,0	20,0	20,0	0,1
27-60	F'_6	traces	50,0	25,0	25,0	0,1
61-66	F'_7	traces	40,0	30,0	30,0	0,1
67-73	F'_8	traces	30,0	35,0	35,0	0,1
74	F'_9	traces	20,0	40,0	40,0	0,1
75-77	F'_{10}	traces	10,0	45,0	45,0	0,1
96-100	F'_{11}	traces	0,0	50,0	50,0	0,1
101-111	F'_{12}	traces	0,0	40,0	60,0	0,1
112-117	F'_{13}	traces	0,0	30,0	70,0	0,1
118-125	F'_{14}	Mélange complexe	0,0	20,0	80,0	20
126-131	F'_{15}		0,0	10,0	90,0	
132-137	F'_{16}		0,0	0,0	100,0	
138	F'_{17}		0,0	0,0	100,0	
139	F'_{18}		0,0	0,0	100,0	

Ce fractionnement a mené à l'obtention de 21 sous-fractions (F'_1 - F'_{21}) selon les profils CCM analytiques.

La sous-fraction F'_3 (8,2 mg) (cyclohexane /AcOEt /acétone ; 6:6:2) a donné le produit ZH6-3 (3,2 mg) sous forme d'une poudre blanche (composé **2**).

La sous-fraction F'_4 (cyclohexane/AcOEt /acétone ; 5:2,5:2,5) a donné le produit ZH6-4 (4,5 mg) sous forme d'une poudre blanche (composé **3**).

III.6.3.5. Etude des fractions F_{15} et F_{16}


Ces deux fractions ayant des profils chromatographique très similaires, ont été combinées pour donner la fraction H de masse 1,6 g. Cette fraction H a été mélangée à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une 3^{ème} colonne (C3) (3 cm x 55 cm) de gel de silice 230-400 Mesh (53 g) préparée dans un mélange (cyclohexane/ $(CH_3)_2CO$; 85 :15).

L'élution a été réalisée par le système (cyclohexane/ $(CH_3)_2CO$; 85 :15) enrichi progressivement en acétone, avec introduction du méthanol vers la fin. Des pots de volume 20 mL sont recueillis durant tout le fractionnement.

Les pots sont regroupés en fractions suivant la similitude de leur profil chromatographique sur plaques analytiques de gel de silice qui après développement dans des cuves en verre avec les systèmes adéquats, ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées par la vanilline et l'acide sulfurique à 3 % dans l'EtOH et chauffées pendant 3-5 mn à 100°C.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.8

Tableau III.8: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne du mélange H

Lot de pots	N° des fractions	Système d'élution			Poids (mg)
		 %	(CH ₃) ₂ CO %	MeOH %	
1-6	H ₁	85,0	15,0	0,0	0,7
7-10	H ₂	80,0	20,0	0,0	0,3
11-16	H ₃	75,0	25,0	0,0	1,0
17-29	H ₄	70,0	30,0	0,0	3,0
30-36	H ₅	65,0	35,0	0,0	2,7
39-45	H ₆	60,0	40,0	0,0	43,2
46-52	H ₇	60,0	40,0	0,0	2,8
53-60	H ₈	60,0	40,0	0,0	2,5
61-68	H ₉	55,0	45,0	0,0	10,7
69-73	H ₁₀	55,0	45,0	0,0	25,3
74-77	H ₁₁	50,0	50,0	0,0	12
78-90	H ₁₂	50,0	50,0	0,0	42
91-98	H ₁₃	50,0	50,0	0,0	15
99-105	H ₁₄	45,0	55,0	0,0	77,5
106-112	H ₁₅	45,0	55,0	0,0	113
113-115	H ₁₆	40,0	60,0	0,0	142
116-119	H ₁₇	30,0	70,0	0,0	20
120-123	H ₁₈	35,0	65,0	0,0	69
124-126	H ₁₉	25,0	75,0	0,0	50
127-130	H ₂₀	20,0	80,0	0,0	25
131-140	H ₂₁	20,0	80,0	0,0	163
141-145	H ₂₂	20,0	80,0	0,0	69
146-148	H ₂₃	20,0	80,0	0,0	20,0
149-160	H ₂₄	20,0	80,0	0,0	34,8
161-166	H ₂₅	10,0	90,0	0,0	64
167-190	H ₂₆	10,0	90,0	0,0	40,7
191-200	H ₂₇	10,0	90,0	0,0	123
201-207	H ₂₈	0,0	00,0	100,0	112
208-212	H ₂₉	0,0	0,0	100,0	125
213-219	H ₃₀	0,0	0,0	100,0	145

III.6.3.6. Etude de la fraction F₁₇: 67,50 mg

Cette fraction a donné précipité blanc jaunâtre. Après concentration, ce produit a été lavé plusieurs fois avec du méthanol pour obtenir le produit pur ZH17 (6,0 mg) soluble dans le chloroforme (composé **8**).

III.6.3.7. Etude de la fraction F₂₀: 123,80 mg

La colonne 4 (C4) a été faite avec un modèle CombiFlash®Rf qui utilise une méthode de radio-identification (RFID - Radio Frequency Identification) afin de collecter des fractions, le plus purifié possible. Pour cela, il possède un programme automatisé qui permet de définir une courbe des solvants, et comme il y a une lecture spectrophotométrique des produits qui sortent, on peut avoir un seul produit dans un tube. Donc cette méthode rentabilise notre temps et la quantité de matériel utilisé. Par cette technique la fraction F₂₀ a donné le produit ZH20 (6,0 mg) à l'état pur (composé **9**).

Echantillon: F₂₀Cd

Colonne RediSep: Silica 12g

SN: E04101AFC5AA7 Lot: 1811179020X

Débit: 30 mL/min

Volume d'équilibration: 100,8 mL

Volume initial jeté: 0,0 mL

Air Purge: 0,5 min

Solvant: A1 Dichloromethane

Solvant: B1 Acétone

Volume des tubes pic: 25 mL

Volume des tubes non pic: 28 mL

Injection d'échantillon: Pré-colonne sans pause

Largeur pic: 1 min

Seuil niveau: 0,20 AU

Seuil niveau: 0,20 AU

La Figure III.14 résume les étapes de séparations et leurs types pour obtenir les 9 produits purs à l'état natif et en quantité appréciable. Tous ces produits a été soumis à l'analyse structurale, mais actuellement 5 ont été identifiés sans ambiguïté. Les travaux relatifs à l'analyse structurale de ces composés sont reportés et détaillés dans le chapitre IV.

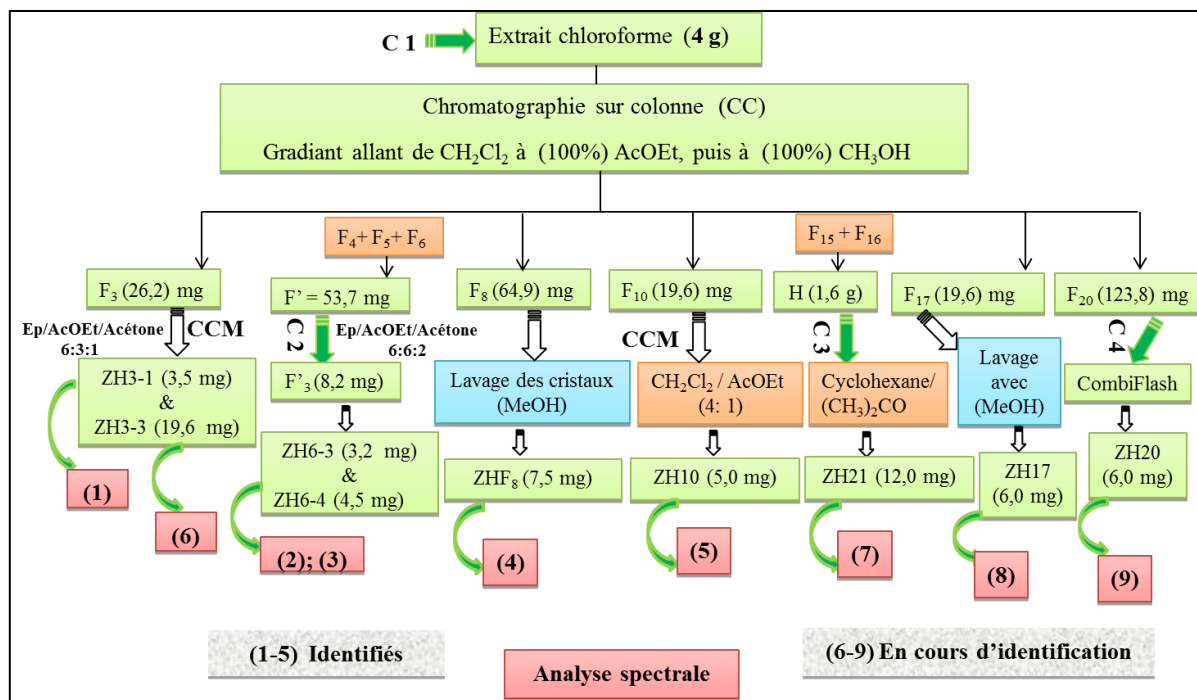


Figure III.14 : Schéma de de différentes séparations chromatographique

⇒ Conclusion

Cette étude expérimentale constituant les travaux personnels concernant la partie phytochimique, a permis d'isoler 09 produits en quantité appréciable de la partie soluble dans le chloroforme de l'extrait hydro-méthanolique des parties aériennes de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. Diverses techniques de la chromatographie liquide ont été mises en jeu lors de la séparation et la purification des composants chimiques de cet extrait. L'investigation phytochimique de cet extrait a été réalisée suite aux résultats encourageant obtenus lors des tests de recherche d'activités biologiques *in vitro* notamment cytotoxique et antibactérienne.

Références bibliographiques

- [1] Fakhfakh JA, Damak M. Sesquieneolignans from the flowers of *Centaurea furfuracea*, Coss. et Dur. (Asteraceae). Nat Prod Res 2007; 21(12): 1037-1041.
- [2] Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. J Appl Sci Res 2012; 8(6): 2876-2880.
- [3] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia 2005; 76: 744-746.
- [4] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. J Serb Chem Soc 2011; 76: 27-34.
- [5] Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H. VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. J Comput Aid Mol Des 2005; 19(8): 617-623.
- [6] Orallo F, Lamela M, Camiña M, Uriarte E, Calleja J M. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corubionensis*. Planta Med 1998; 64(2):116-9.
- [7] Arif R, K'upeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). GU J Sci 2004; 17(4): 149-164.
- [8] Pallet K, Cole J, Oberwalder C, Porch J Performance of potential non-crop or wild species under OECD 208 testing guideline study conditions for terrestrial non-target plants. Pest Manag Sci 2007; 63(2):134-140.
- [9] Garbacki N, Gloaquen V, Bodart P, Tits M, Angenot L. Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. J Ethnopharmacol 1999; 15;6(1-3):235-241.
- [10] Battandier J A. Algérie. Plantes médicinales. Alger- Mustapha: Giralt. 1900 :6.
- [11] Bianchini F, Corbetta F. Atlas des Plantes médicinales. Ed. Nathan, 1975 :16.
- [12] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. Flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. Phytochem Lett 2009; 2:114-118.
- [13] Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, Brouard I, Bermejo J, Benayache S. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. J Braz Chem Soc 2012; 23(5): 977-983.

- [14] Shoeb M, MacManus SMM, Nahar L, Jaspars M, Celik S, Sarker SD, Lin KT
P. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents.
Braz J Pharmacogn 2007; 17: 155-159.
- [15] Shoeb M, Jaspars M, MacManus S, Celik S, Kong-Thoo-Lin P, Sarker S. Bioactivity of
the extracts and the isolation of lignans from *Centaurea dealbata*. Ars Pharm 2006;
47(4): 315-322.
- [16] Jahandiez E, Maire R. Catalogue des plantes du Maroc. Tome III. Dicotylédones et
Supplément aux volumes I et II .1934; 3: 813-814.
- [17] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.
Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963(2):1030,1032.
- [18] Fennane M, Ibn Tattou M. Bocconeia 8: Catalogue des plantes vasculaires rares,
menacées ou endémiques du Maroc; 1998: 27.
- [19] Ibn Tattou M, Fennane M. Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie. Trav Inst
Sci Univ Mohammed V; 2009(2) Sér. Bot 39: 39.
- [20] Fennane M, Ibn Tattou M, Mathez J, Ouyahya A, El oualidi J. (éd.). Flore Pratique du
Maroc 2014(3) Trav Inst Sci Univ. Mohammed V; Sér Bot 3: 147.
- [21] Battandier J A, Trabut M. Flore de l'Algérie. Dicotyledones. [1-184] Monocotyledones
1888 ; 1(2) : 500.
- [22] Dubuis A, Simonneau P. Travaux des sections pédologie et agrologie, Bulletin n° 5.
1959, Catalogue des Végétaux observés sur la Station d'étude des Sols Salins
d'Hamadema, Experimentation Divers N° II Clairbois Birmandreis (Banlieue d'Alger);
1959:13.
- [23] Cosson E. Conspectus Florae Atlanticae ou Énumération méthodique des plantes. 1891.
- [24] Steimetz E. Réactif pratique pour l'analyse des coupes végétales. Réactif pratique pour
l'analyse des coupes végétales, B Soc Bot Fr 1934; 81(2) 296-297.
- [25] Bettina Rahfeld, Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen. Auflage ©spektrum
Akademischer Verlag ist ein imprint von Springer. 2011(2): 73, 161.
- [26] Susanna A, Garcia-Jacas N. In Systematics, Evolution and Biogeography of
Compositae; Funk V. A, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ. Editions: International
Association for Plant Taxonomy: Vienna, Austria. 2009: 293-313.
- [27] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.
Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963(2) :1016-1032.

- [28] Hammoud L, Seghiri R, Benayache S, Mosset P, Lobstein A, Chaabi M, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. . Natural Product Research 2012;26(3):203-208.
- [29] López-Rodríguez M, García V P, Zater H, S. Benayache S, Benayache F. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. Acta Cryst 2009; E65: o1867-o1868.
- [30] Aliouche L, Zater H, Zama D, Bentamene A, Seghiri R, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. Chem Nat Compd 2007; 43(5): 618- 619.
- [31] Bentame A, Benayache S, Creche J, Petit G, Bermejo B, Leon J, Benayache F. A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. Biochem Syst Ecol 2005; 33: 1061-1065.
- [32] Boudjerda A, Zater H, Benayache S, Chalchat JC, Gonzalez-Platas J, Leon F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*. Biochem Syst Ecol 2008; 36: 461-466.
- [33] Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Hendrickson Publishers, Berlin.1996.
- [34] Neu R. Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkaminen als Reagenz für den Nachweis von Oxyphenyl-benzo-gamma-pyrenen. Naturwissenschaften. 1957(44):181–182.
- [35] Stahl E. Thin Layer Chromatography. Berlin–Heidelberg–New York.1969: 264-268.
- [36] Par plusieurs professeurs du jardin du roi, et des principales écoles à paris. Dictionnaire des sciences naturelles. Cuvier F G. Editeur, à Strasbourg et rue de la Harpe, N°81 à Paris, 1828 ; Tome L V(55) : 351.

Chapitre IV

Résultats & discussions
(Élucidation structurale)

IV. Identification des produits isolés de l'extrait CHCl₃ de l'espèce *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.)

Ce chapitre concerne les élucidations structurales des 9 composés isolés dans le cadre de nos travaux. Elles ont été réalisées par la combinaison de tout l'arsenal des méthodes physicochimiques d'analyse et des méthodes spectroscopiques modernes (UV-Visible, RMN mono et bidimensionnelle (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY) et de spectrométrie de masse à haute résolution à ionisation par électronebulisation (electrospray) en mode positif [ESI-HRMS (+)] et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles rapportées dans la littérature.

IV.1. Généralités (Méthodes Physico-chimiques)

IV.1.1. Analyses par LC/MS

Les molécules isolées ont été dissoutes soit :

- ⇒ dans du chloroforme (ZH3-3 « vanilline », **1**) et et ZH6-4 « 4-hydroxy benzoate de méthyle », **3**) ou du méthanol (ZH6-3 « arctigénine », **2**) ZH10 « jacéosidine », **5**) pour une concentration de 1 mg/ml. Ces solutions ont ensuite été diluées 10 fois par un mélange méthanol/ acide formique (0,1 %) (50:50). Pour les produits dissous dans du chloroforme, la dilution est faite uniquement avec le méthanol car l'ajout de l'acide provoque la formation de deux phases.
- ⇒ dans du diméthylsulfoxyde DMSO (ZHF8 « eupatiline », **4**) pour une concentration de 2 mg/mL et cette solution a été diluée 20 fois dans l'acétonitrile.

Les spectres de masse ont été obtenus *via* le spectromètre à haute résolution avec option masse exacte ; avec un analyseur Q-TOF 6520 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) muni d'une source ESI en mode positif (plateforme analytique; Faculté de Pharmacie : ULB).

IV.1.2. Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire RMN

Les échantillons ont été séchés et dissous dans un solvant deutéré,

- 1/ Le CDCl₃ (chloroforme deutéré) pour « la vanilline, **1** ; paradiol, **3**, et l'arctigénine, **2**».
- 2/ Le CD₃OD « jacéosidine, **5** ».
- 3/ Le DMSO-*d*₆ pour « eupatiline , **4**».

Les spectres RMN¹H, ¹³C et DEPT135 ont été obtenus à l'aide d'un appareil RMN Bruker

Avance 300 à respectivement 300 MHz et 75 MHz avec le TMS comme standard interne. Les analyses en RMN bidimensionnelle COSY, HSQC, HMBC, NOESY & ROESY ont été réalisées sur les appareils Varian Unity 400 et/ou 600 MHz à 25°C. Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.

IV.1.3. Analyses par UV –Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible des flavonoïdes aglycones (**4** & **5**) ont été enregistrés en milieu méthanolique (Méthanol ultra pur pour analyse spectroscopique) sur un spectrophotomètre Thermo Electron Corporation evolution 300.

IV.1.4. Mesure des points de fusion

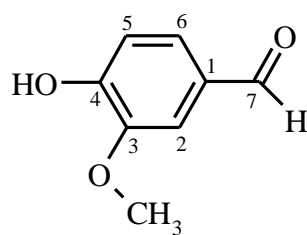
Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil SMPIOD; Stuart marque : BIOCOTE.

IV.1.5. Pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{20}$)

Le pouvoir rotatoire des composés présentant un ou plusieurs carbones asymétriques a été déterminé avec un polarimètre Perkin-Elmer modèle 241. La rotation α de la lumière polarisée des produits dissous dans EtOH (composé **2**) a été mesurée dans une microcellule de 10 cm de long, capacité 1mL, à température ambiante. La raie D du sodium (λ_{Na} , 589 nm) a été utilisée comme source de lumière incidente.

IV.2. Elucidations structurales

IV.2.1. Elucidation structurale du composé **1** (ZH3-3)



1

Le composé **1** se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans le chloroforme et le dichlorométhane ; point de fusion (PF) = 82°C. Son spectre d'absorption UV montre les bandes à λ_{max} (nm): 230, 279, 309.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode électrospray positif HRESI-QTOF-MS (Spectre1) montre des pics quasi-moléculaires à : $m/z = 153,0545$ correspondant à $[M+H]^+$ (calculé pour $C_8H_9O_3$: 153,0546); $m/z = 175,0372$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_8H_8O_3Na$:

175,0366) ; $m/z = 191,0216$ $[M+K]^+$ (calculé pour $C_8H_8O_3K$: 191,0105). La masse exacte mesurée : $m/z = 152,0471$ (calculée pour $C_8H_8O_3$: 152,0473) (Tableaux IV.1 ; Figure IV.1 ; Tableau IV.1-1), indiquant une formule brute $C_8H_8O_3$, soit une molécule renfermant 5 insaturations.

Tableaux IV.1 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé **1**, calcul de la masse exacte

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	MFG Formula	DB Formula
Cpd 1: C8 H8 O3	0.166	152.0471	92448	C8 H8 O3	152.0473	-1.57	C8 H8 O3	C8 H8 O3

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C8 H8 O3	153.0545	0.166	Find By Formula	152.0471

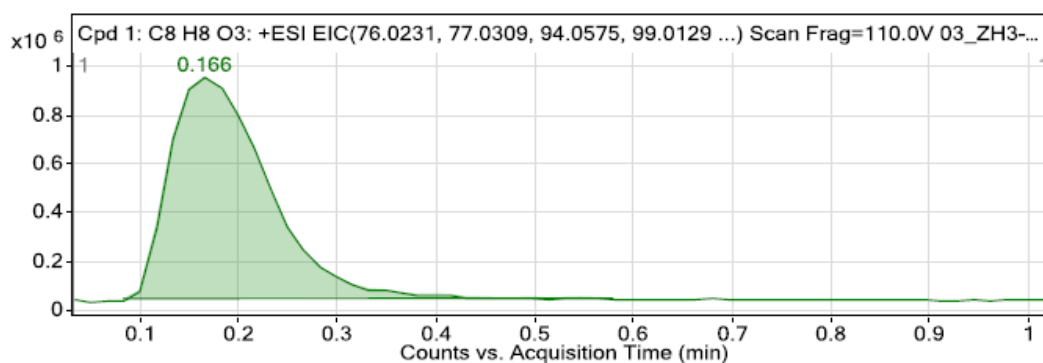
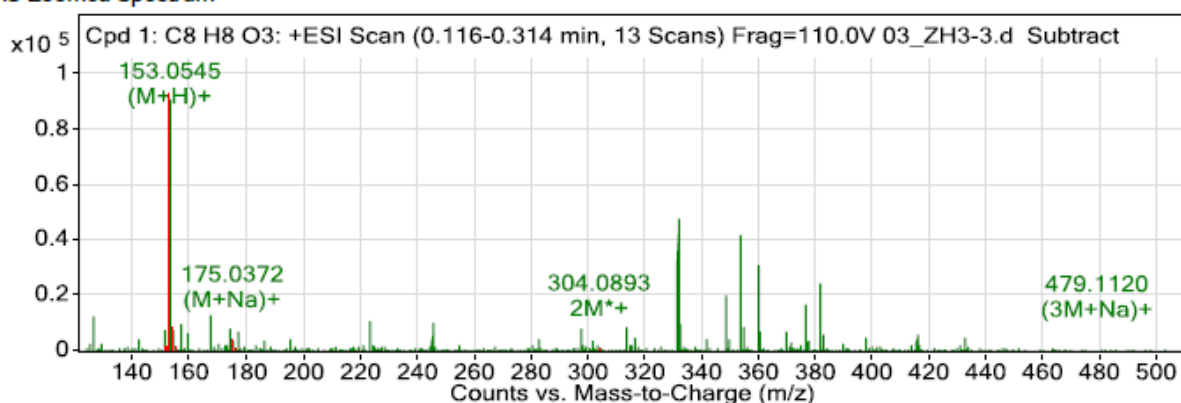


Figure IV.1 : Amas isotopique du composé **1**

MS Zoomed Spectrum



Spectre 1: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé **1**

Tableau IV.1-1 : Données liste des ions adduits du composé 1

MS Spectrum Peak List						
<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff(ppm)	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
152.0374	152.0468	-61.97	1	1209.78	C ₈ H ₈ O ₃	M ⁺
153.0545	153.0546	-0.99	1	92447.62	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
154.0579	154.058	-0.87	1	7562.79	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
155.0636	155.0598	24.29	1	1242.37	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
175.0372	175.0366	3.55	1	3684.27	C ₈ H ₈ NaO ₃	(M+Na) ⁺
176.0378	176.04	-12.16	1	377.41	C ₈ H ₈ NaO ₃	(M+Na) ⁺
191.0216	191.0105	58.16	1	190.31	C ₈ H ₈ KO ₃	(M+K) ⁺
304.0893	304.0941	-15.9	1	494.95	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	2M ⁺
322.1119	322.1285	-51.43	1	137.69	C ₁₆ H ₂₀ NO ₆	(2M+NH ₄) ⁺
327.0779	327.0839	-18.25	1	126.55	C ₁₆ H ₁₆ NaO ₆	(2M+Na) ⁺
479.112	479.1313	-40.1	1	111.87	C ₂₄ H ₂₄ NaO ₉	(3M+Na) ⁺

Les données de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) du composé 1 (spectre 1-2, Figure IV.1-1, Tableau IV.2) orientent vers un noyau aromatique comportant des substituants hydrocarbonés et oxygénés notamment un groupement hydroxyle.

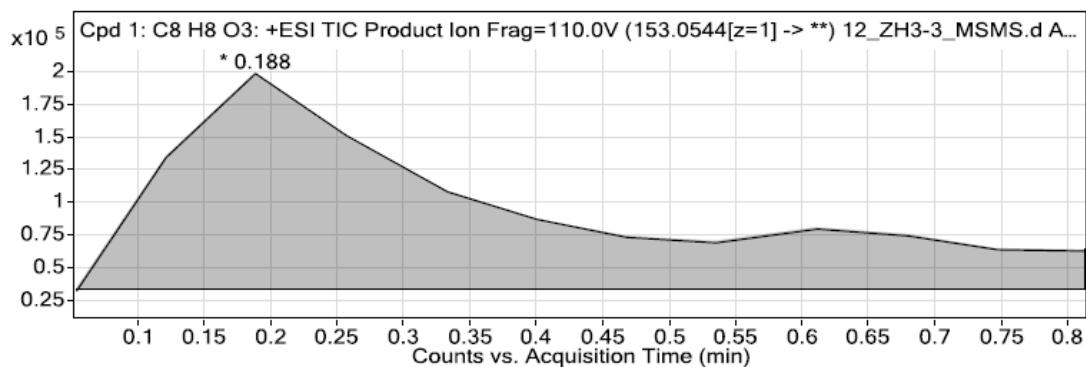
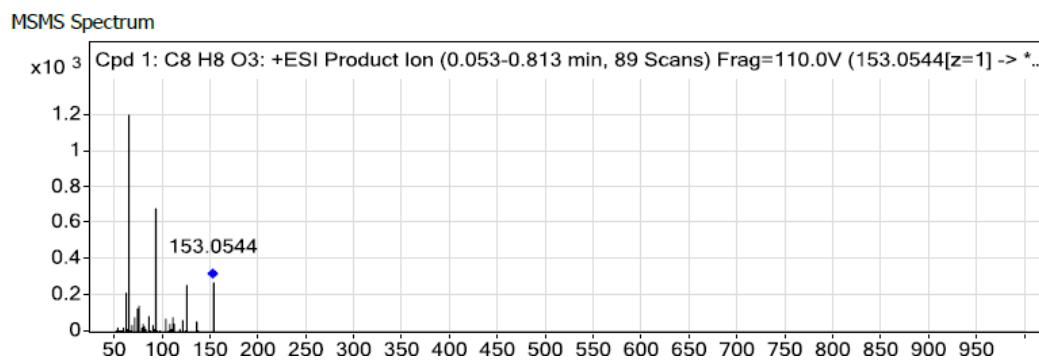


Figure IV.1-1 : MS/MS, amas isotopique de l'ion 153,0544



Spectre 1-2 : Spectre HR-ESIMS/MS (+) du composé 1

Tableau IV.2 : Liste des pics fragments de l'ion quasi-moléculaire du composé 1

MS/MS Spectrum Peak List				
<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff (ppm)	Abund	Formula
60.9877			213.25	
65.0396	65.0386	-15.16	1236.88	C5 H5
70.9803			80.08	
72.9873			129.12	
75.0032			149.86	
84.9602			89.29	
93.0342	93.0335	-7.11	684.52	C6 H5 O
102.9984			69.68	
110.0364	110.0362	-1.33	79.47	C6 H6 O2
121.0086			61.98	
125.0599	125.0597	-1.62	259.75	C7 H9 O2
153.0544			280.39	

L'étude du spectre RMN ^1H (Spectre 2 & Tableau IV.3) de ce composé 1 a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence de 3 protons résonant à δ_{H} 7,43 ; 7,42 et 7,04 ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J = 9,0$; 1,8 Hz), d'un doublet ($J = 1,8$ Hz) et d'un doublet ($J = 9,0$ Hz), respectivement. Ces constantes de couplage sont en faveur d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4. De ce fait :

- Le 1^{er} signal est attribuable à H-6.
- Le second est attribuable à H-2.
- Le 3^{ème} est attribuable à H-5.

Ce spectre montre également un signal d'intégration 3H à δ_{H} 3,98 ppm attribuable à un groupement méthoxyle et un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H, à δ_{H} 9,83 ppm caractéristique d'un groupement aldéhyde.

En tenant compte des résultats la spectrométrie de masse et notamment la formule brute, il apparaît clairement que cette molécule n'est autre que le benzaldéhyde substitué par un groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle. La présence de ce groupement hydroxyle et d'ailleurs claire sur le spectre RMN ^1H qui montre la présence d'un singulet large d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,26$ ppm ainsi que les données de la spectrométrie en tandem (MS/MS). Le carbone du groupement formyle sera numéroté C-7, quant à celui qui le porte, il sera numéroté C-1.

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Spectre 4) et la comparaison avec les données de la littérature permettent de localiser le carbone C-7 à 190,86 ppm, C-1 à 130,33 ppm, C-2 à

108,75 ppm, C-3 à 147,05 ppm, C-4 à 151,62 ppm, C-5 à 114,04 ppm, C-6 à 127,45 ppm, OCH₃ à 56,40 ppm [1-3]. Cette analyse a permis également de conclure qu'il s'agit de la vanilline plutôt que l'isovanilline (Figure IV-1).

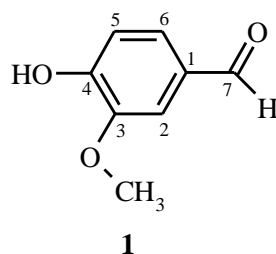
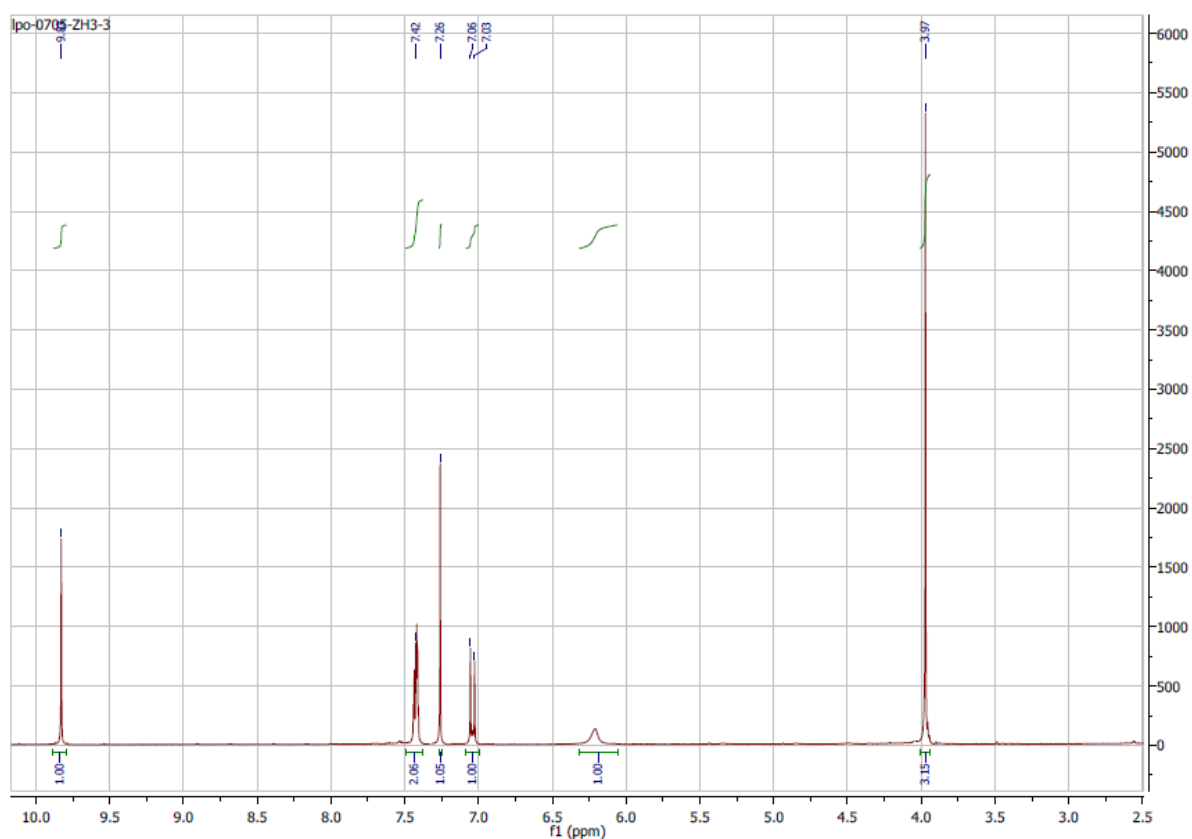
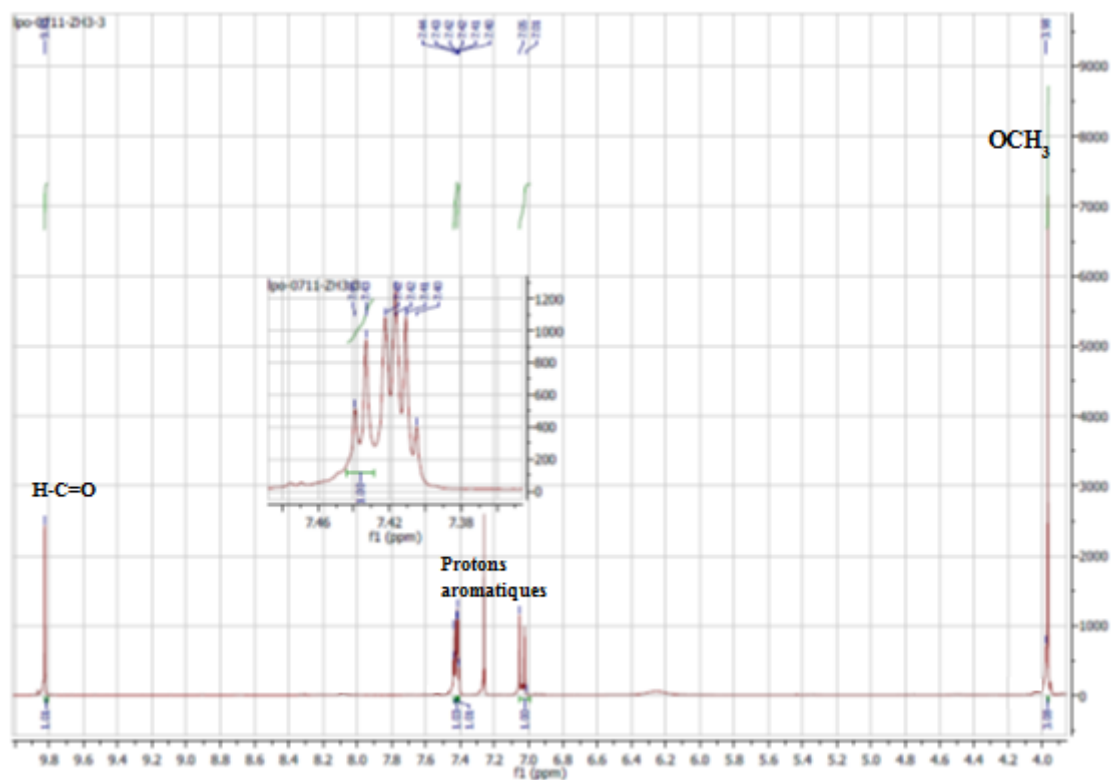
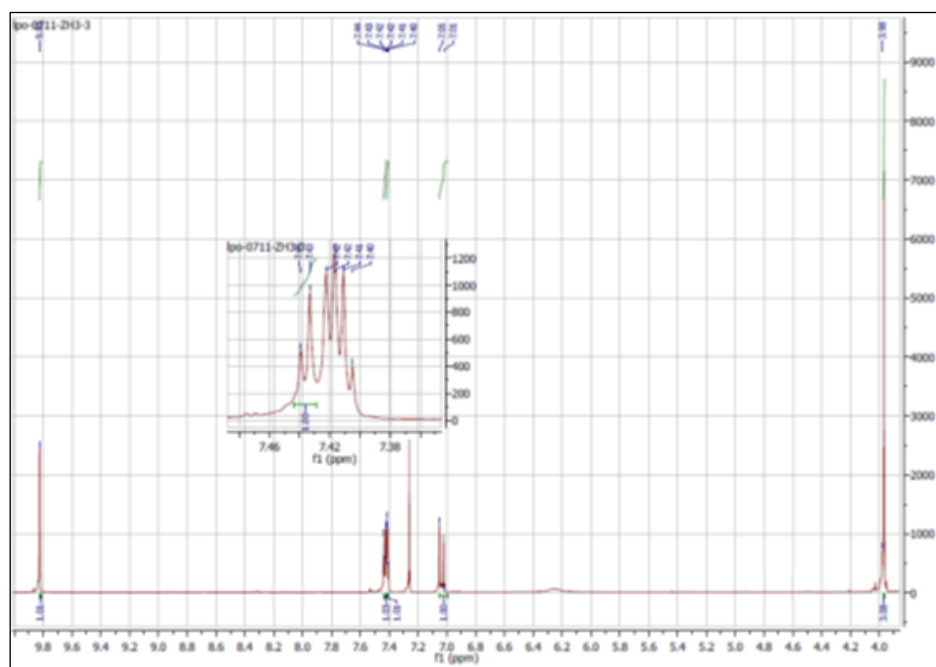
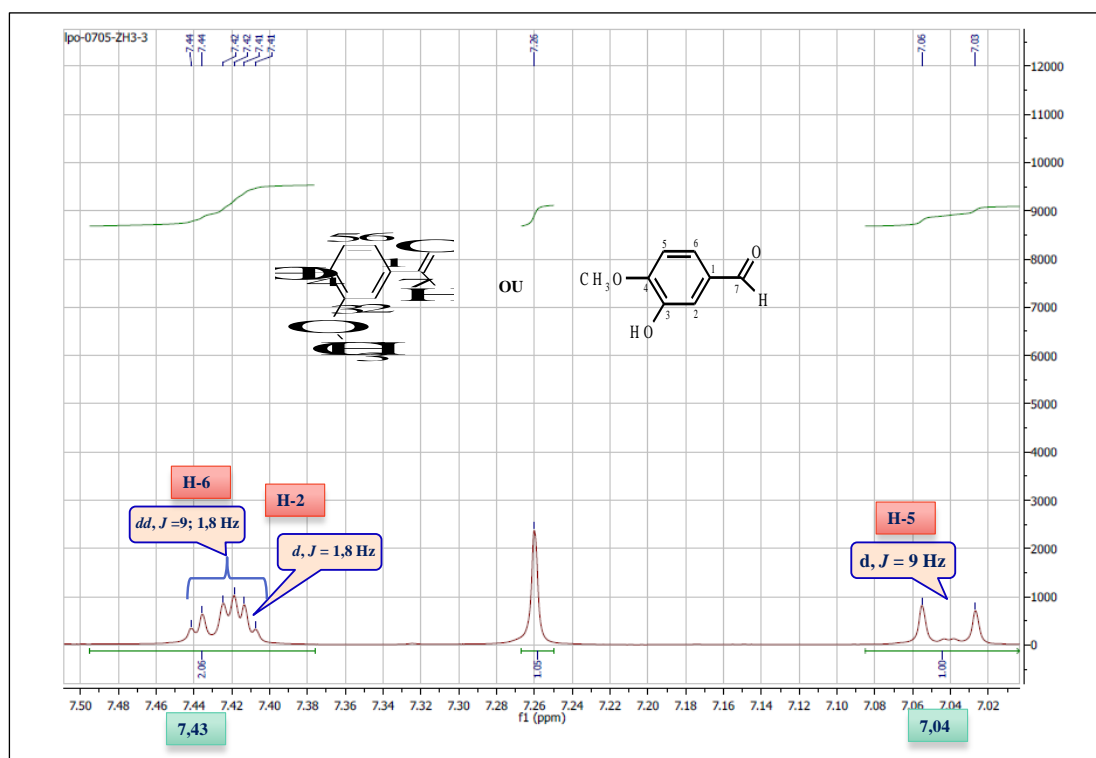
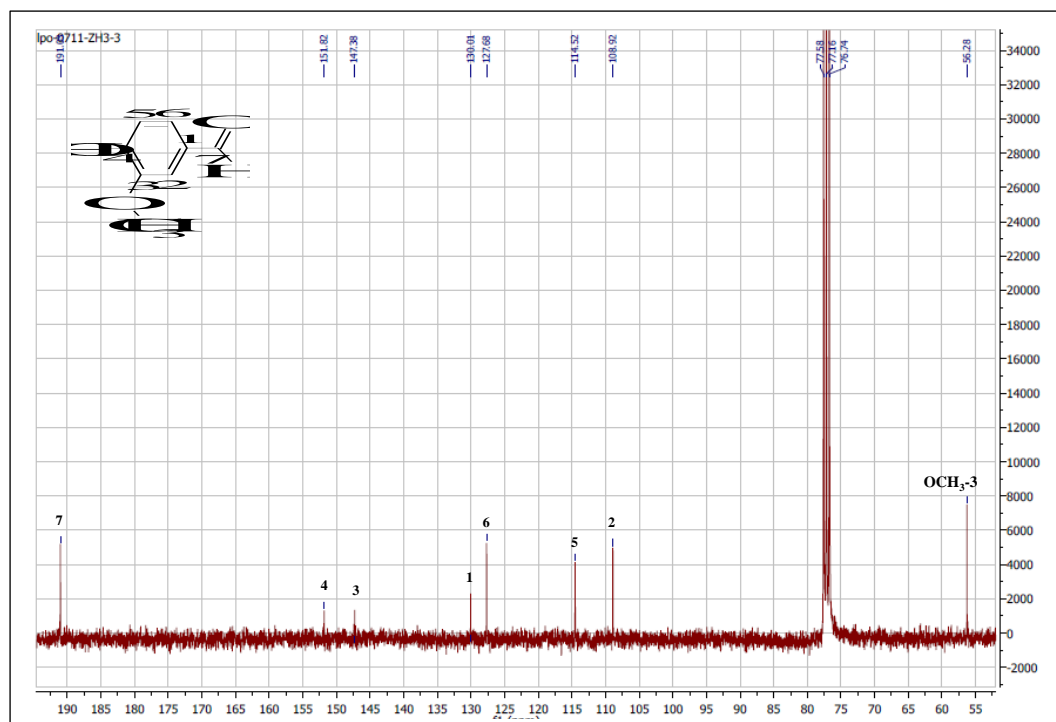


Figure IV-2: Vanilline

Spectre 2 : RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **1**

Spectre 2-1 : RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **1**, étalementSpectre 2-2 : RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **1**, étalement de la zone aromatique

Spectre 3 : RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **1**, étalement de la zone aromatiqueSpectre 4 : RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **1**.

Toutes les données de RMN ^1H et ^{13}C sont reportées dans le tableau IV.3

Tableau IV.3: Les données spectroscopiques de la RMN $^{(1\text{H}\&13\text{C})}$ (CDCl_3 , 300 MHz) du Vanilline

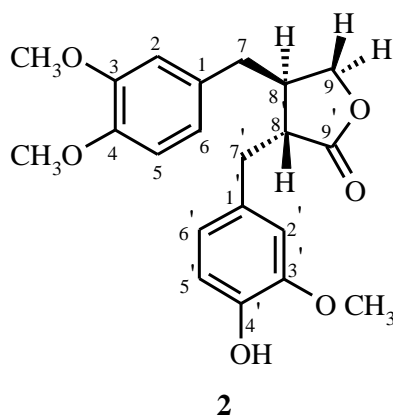
^1H	Intégration	δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	$^{13}\text{C}^{\&}$	δ (ppm)
H-7	1	9,83	<i>s</i>	/	7	190,86
H-6	1	7,43	<i>dd</i>	9,0 ; 1,8	4	151,62
H-2	1	7,42	<i>d</i>	1,8	3	147,05
H-5	1	7,04	<i>d</i>	9,0	1	130,33
4-OH	1	6,62	<i>brs</i>	/	6	127,45
OCH ₃ -3	3	3,98	<i>s</i>	/	5	114,04
/	/	/	/	/	2	108,75
/	/	/	/	/	OCH ₃ -3	56,40

Cette molécule est également connue sous les noms :

- ✓ Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- ; Vanillin (8CI); 4-Formyl-2-methoxyphenol;
- ✓ 2-Methoxy-4-formylphenol; 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyde; 4-Hydroxy-3-methoxy-benzylaldehyde; 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; 4-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyde; *p*-Hydroxy-*m*-methoxybenzaldehyde; *p*-Vanillin.
- ✓ 4-Hydroxy-*m*-anisaldehyde; H 0264; Lioxin; NPLC 0145; Rhovanil; Vanillaldehyde; Vanillic aldehyde; Vanillum; *m*-Methoxy-*p*-hydroxybenzaldehyde.

Cette molécule a été aussi isolé de: *Zingiber zerumbet* [4], *Anacyclus cyrtolepidioides* [5], *Saccocalyx satureioides* Coss. & Dur. [6].

IV.3. Elucidation structurale du composé 2 (ZH6-3)



Le composé **2** se présente sous forme de poudre de couleur blanchâtre, soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane; point de fusion (PF) = 103°C.

$[\alpha]_D^{20} = -17,27^\circ$ (EtOH, c 0,145 g/100 mL).

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électrobulbation positive (HRESI-QTOF-MS positive) (Spectre 5 & Tableau IV.6) montre des pics quasi-moléculaires correspondant à des ions adduits à :

$m/z = 373,1655$ $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{21}H_{25}O_6$: 373,1646) ;

$m/z = 395,1478$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{21}H_{24}O_6Na$: 395,1467) ;

$m/z = 390,1932$ $[M+NH_4]^+$ (calculé pour $C_{21}H_{28}O_6N$: 390,1967). La masse exacte mesurée apparaît à $m/z = 372,1569$ (calculée pour $C_{21}H_{24}O_6$ 372,1577) (Tableau IV.6 ; Figure IV.3 ; Tableau IV.6-1).

Ces données permettent de déduire une formule brute $C_{21}H_{24}O_6$ et par conséquent la présence de 10 degrés d'insaturation dans cette molécule. L'examen du spectre (HRESI-QTOF-MS/MS positive) (Spectre 5-1 & Tableau IV.6-2) montre un pic fragment à $m/z = 355,1540$ correspondant à $[M+H-H_2O]^+$ signifiant la présence d'un groupement OH dans cette molécule.

Tableau IV.6: Données correspondant au calcul de la masse exacte du composé 2

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Formula	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula
Cpd 1: C21 H24 O6	0.232	372.1577	C21 H24 O6	C21 H24 O6	-1.21	C21 H24 O6

Compound Label	<i>m/z</i>	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C21 H24 O6	390.1932	0.232	Infusion Molecular Feature Extractor	372.1577

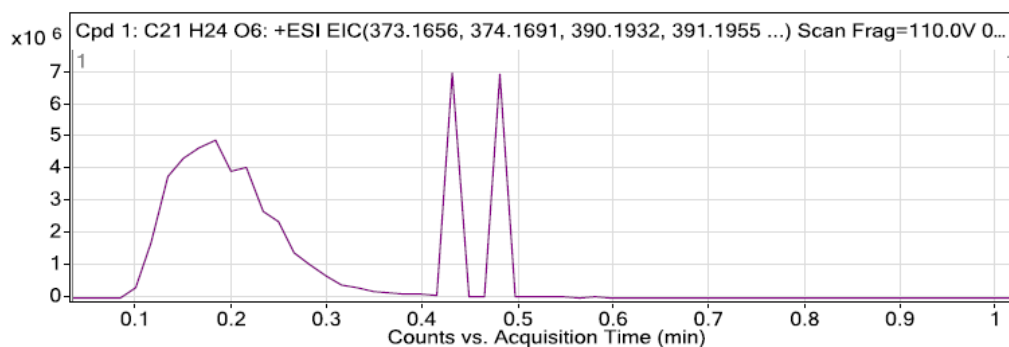
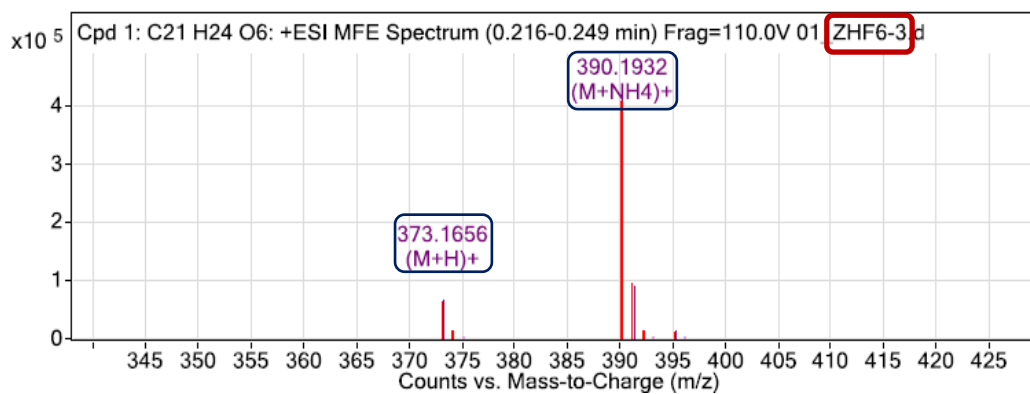


Figure IV.3 : Amas isotopique du composé 2

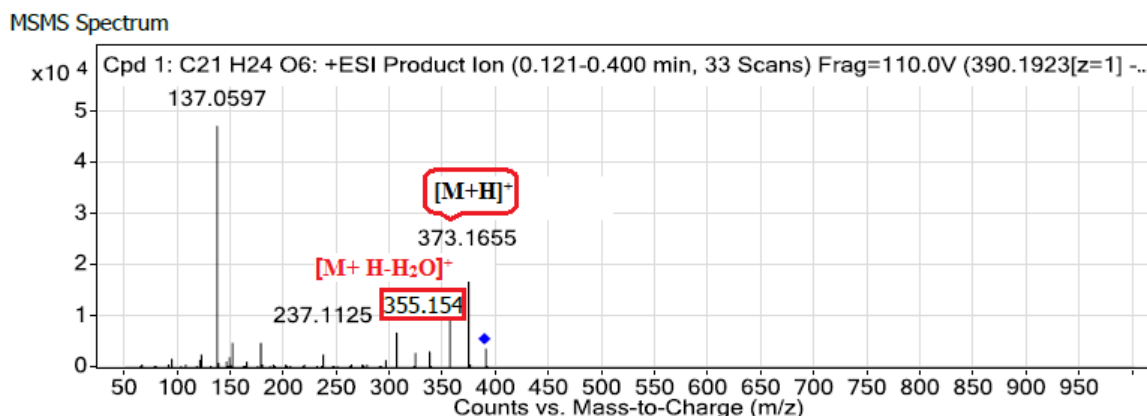


Spectre 5 : HRESI-QTOF-MS (+) du composé 2 (ZH6-3)

Tableau IV.6-1 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 2

MS Spectrum Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Ion
373.1656	1	70278.48	(M+H)+
374.1691	1	14515.97	(M+H)+
390.1932	1	422283.94	(M+NH4)+
391.1955	1	93381.75	(M+NH4)+
392.1983	1	12878	(M+NH4)+
395.1478	1	17333.83	(M+Na)+



Spectres 5-1: Spectre HR-ESIMS/MS/MS (+) du composé 2

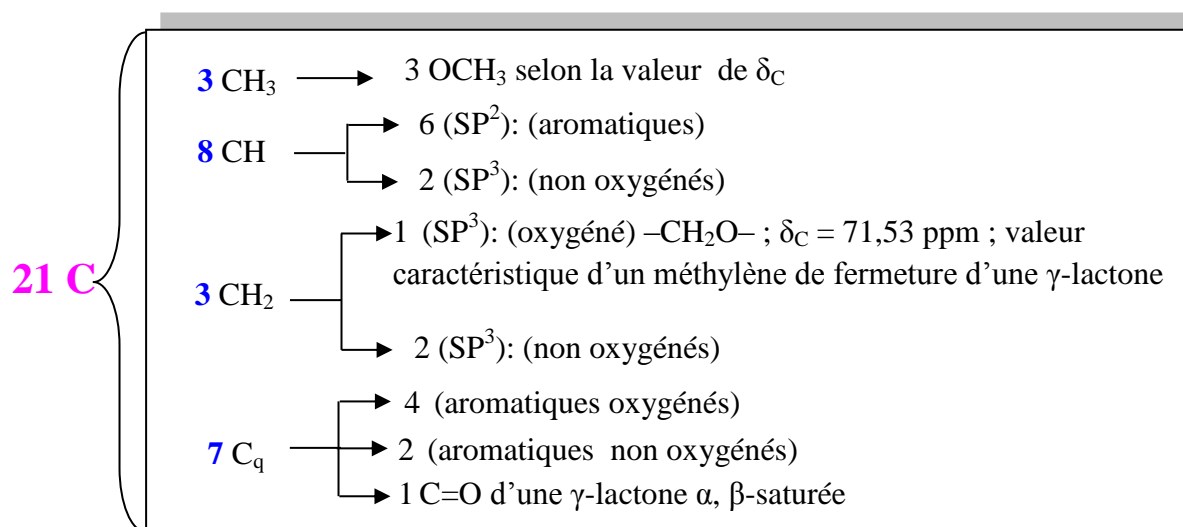
Tableau IV.6-2 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS/MS (+) du composé 2

MS/MS Spectrum Peak List				
<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff (ppm)	Abund	Formula
122.0363	122.0362	-0.56	2710.18	C ₇ H ₆ O ₂
137.0597	137.0597	0.28	47286.83	C ₈ H ₉ O ₂
151.0753	151.0754	0.63	4931.17	C ₉ H ₁₁ O ₂
177.0907	177.091	1.99	4856.79	C ₁₁ H ₁₃ O ₂
237.1125	237.1121	-1.74	2418.48	C ₁₃ H ₁₇ O ₄
305.1177			6715.18	
323.1284			2701.43	
337.1447	337.1493	13.76	3054.37	
355.1556	355.154	-4.4	9773.7	C ₂₁ H ₂₃ O ₅
373.1655	373.1646	-2.56	17530.79	C ₂₁ H ₂₅ O ₆
390.1915			3746.38	

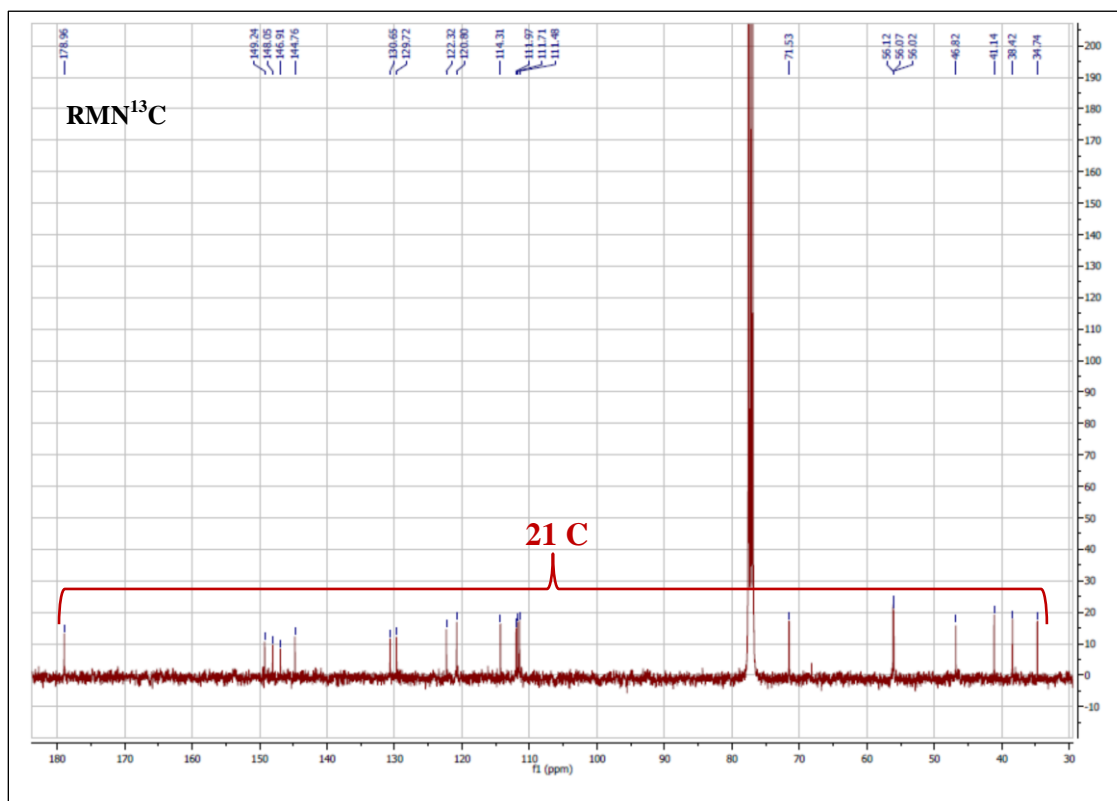
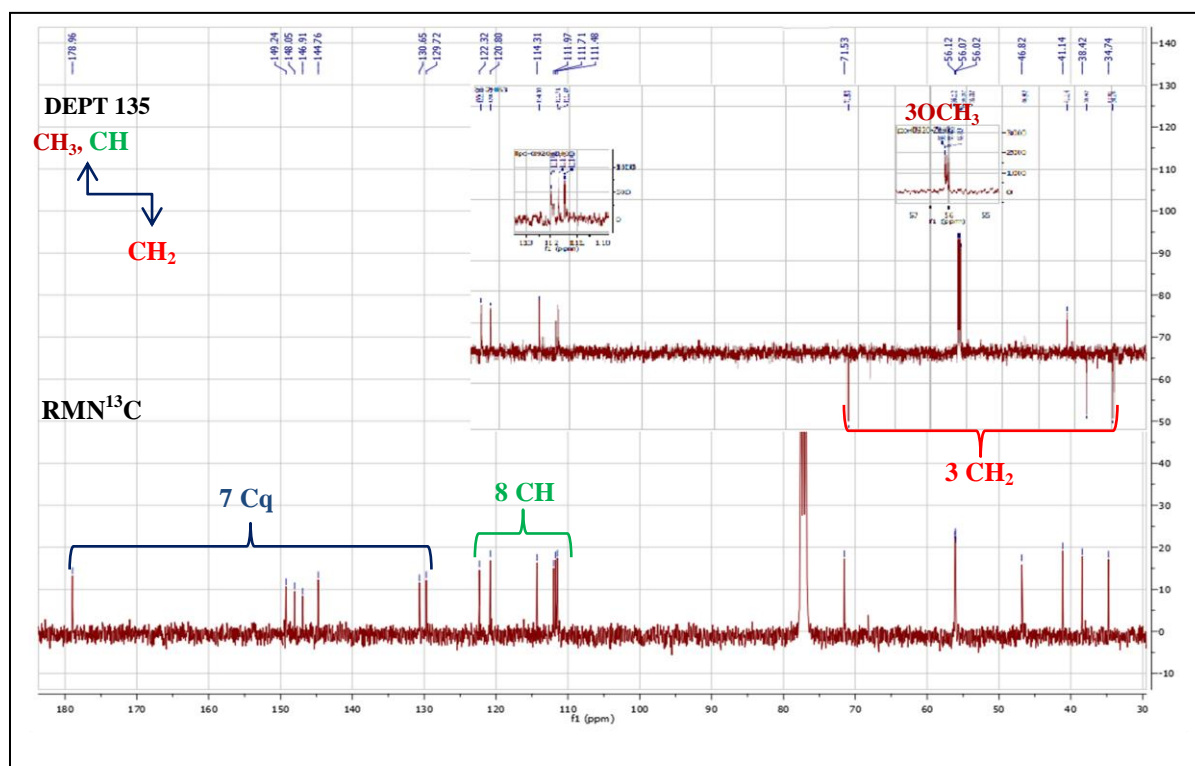
L'examen des spectres de RMN¹³C, DEPT 135 (Spectres 6 & 7) confirme la présence de 21 atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- ✓ Sept carbones quaternaires (7 C_q) dont :
 - 4 carbones aromatiques oxygénés à $\delta = 149,24$; $148,05$; $146,91$ et $144,76$ ppm.
 - 2 carbones aromatiques non oxygénés à $\delta = 130,65$ ppm et $129,72$ ppm.
 - 1 carbone à $\delta = 178,96$ ppm caractéristique d'un carbonyle d'une γ -lactone α , β -saturée ou d'une fonction acide d'après la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Huit groupements méthynes (8 CH) dont :
 - 6 aromatiques à $\delta = 122,32$; $120,80$; $114,31$; $111,97$; $111,71$; $111,48$ ppm.
 - 2 hybridés sp³ et non oxygénés à $\delta = 46,82$ et $41,14$ ppm.

- ✓ Trois groupements méthylènes (CH_2) hybridés sp^3 dont :
 - 1 oxygéné à $\delta = 71,53$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce groupement CH_2 oriente vers un CH_2 de fermeture d'une γ -lactone ce qui exclut la présence de la fonction acide de cette molécule.
 - 2 non oxygénés à $\delta = 38,42$ ppm et $34,74$ ppm.
- ✓ Trois groupements méthyles (3 CH_3), vu la valeur de leurs déplacements δ ($\delta = 56,12$ ppm; $\delta = 56,07$ ppm et $\delta = 56,02$ ppm), il s'agit de 3 groupements méthoxyles).

Schéma IV.1 : Résumé des données de la RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **2**

Ces données orientent vers la présence dans cette molécule, de deux noyaux aromatiques portant trois groupements méthoxyles et un groupement hydroxyle dont la présence a été détecté par spectrométrie de masse.

Spectre 6 : RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé 2Spectres 7 : Expérience DEPT 135 (150 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé 2

Vu les valeurs des déplacements chimiques des carbones (Spectre 6) autres que ceux des deux phényles, la γ -lactone α , β -saturée signalée dans cette molécule ne peut effectivement avoir comme point de fermeture que le groupement méthylène à $\delta_C = 71,53$ ppm.

Vu la formule brute de cette molécule $C_{21}H_{24}O_6$ et la présence de trois groupement méthoxy et un groupement hydroxyle, il apparait clairement que le squelette de cette molécule admet comme formule brute $C_{18}H_{14}O_2$. Par ailleurs nos données montrant la présence de 2 noyaux aromatiques et la présence de 6 groupements carbonés dont ceux faisant partie de la γ -lactone α , β -saturée orientent vers un squelette de type $(C_6-C_3)_2$ soit donc un squelette résultant de la combinaison de deux acides phénoliques et donc un lignane. La présence de la γ -lactone α , β -saturée indique donc que cette molécule est un lignane de type dibenzylbutyrolactone (Schéma IV.2) [8].

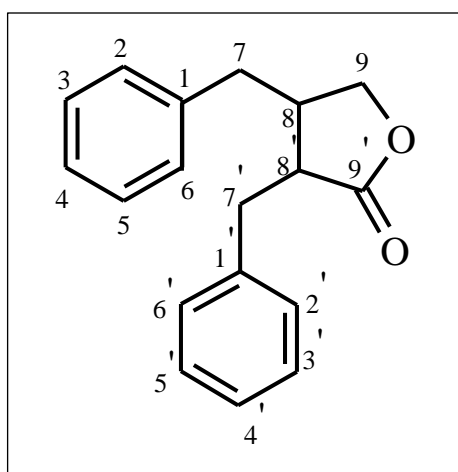
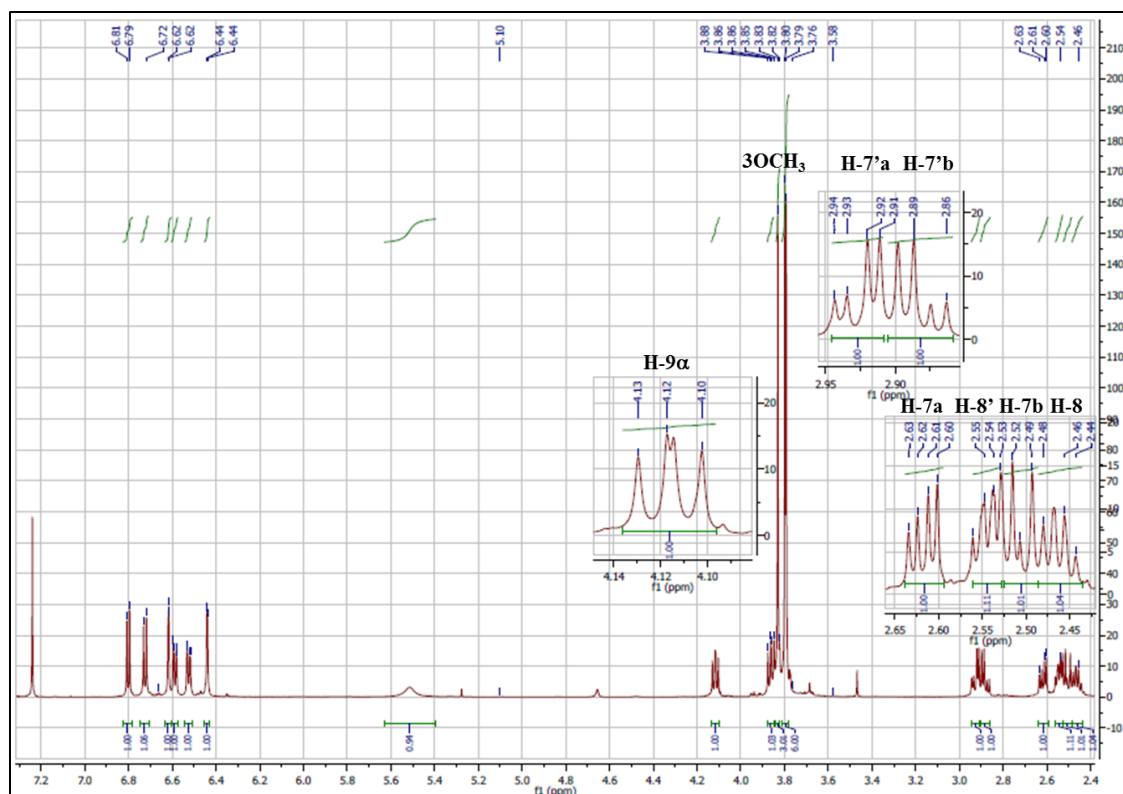
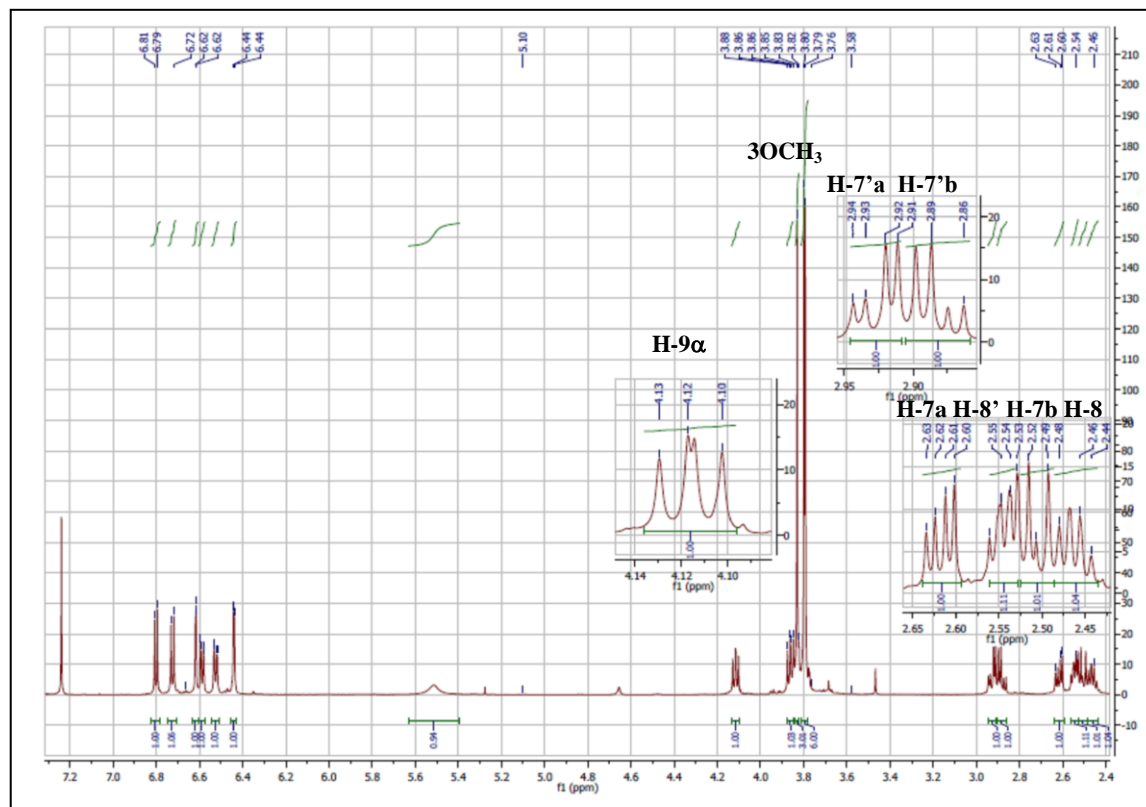
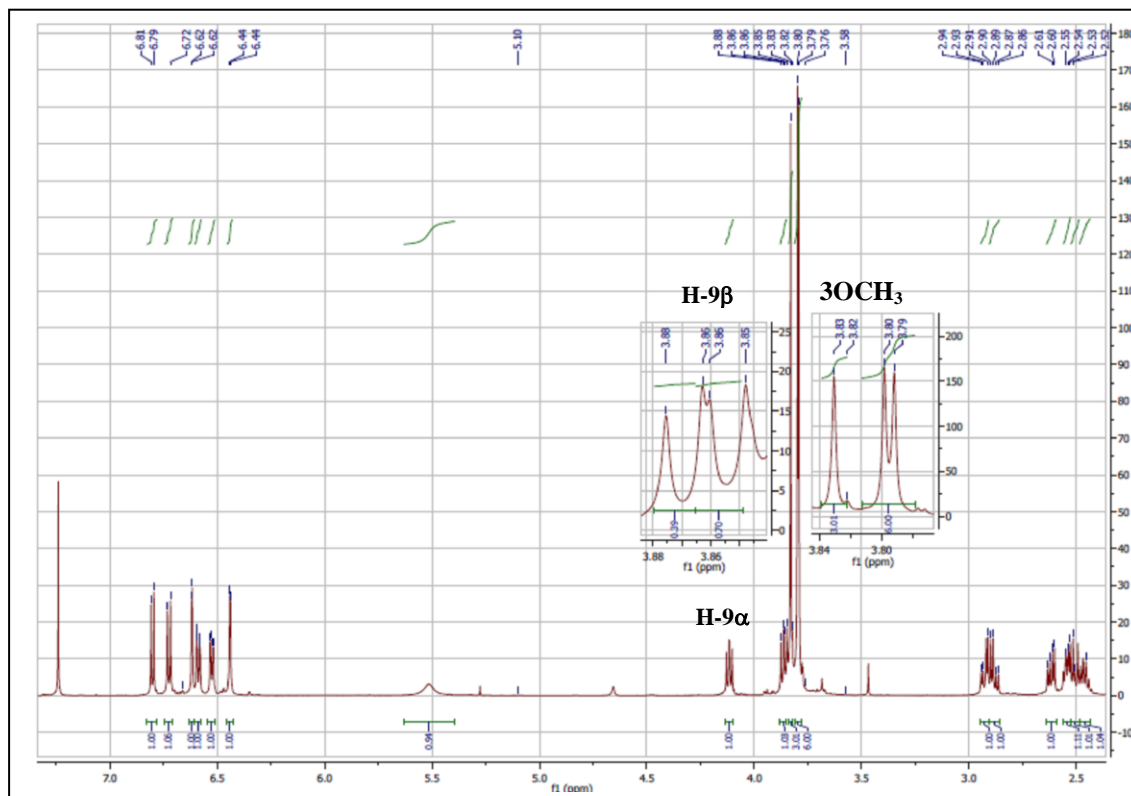


Schéma IV.2: squelette d'un lignane de type dibenzylbutyrolactone

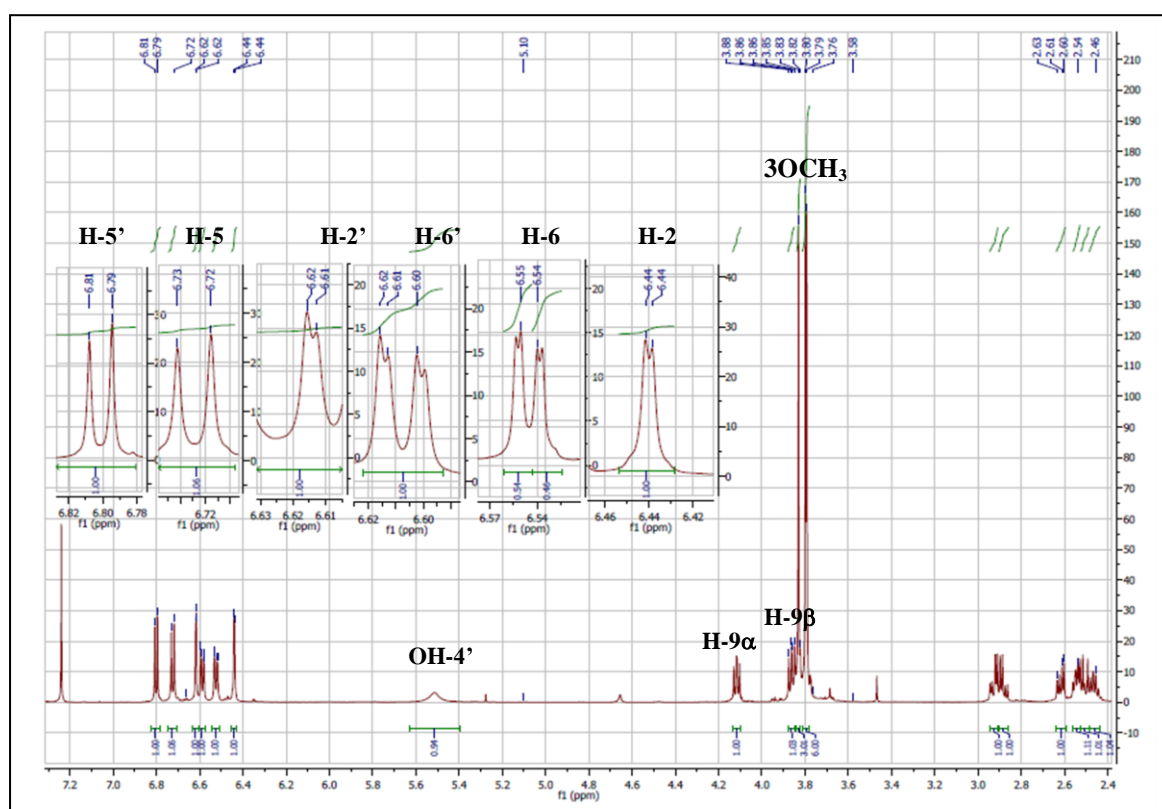
Le spectre RMN¹H de cette molécule et ses étalements (Spectres 8, 8-1, 8-2, 8-3) montre :

- Deux signaux sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 4,12$ ppm ($J = 9,0 ; 7,4$ Hz) et à $\delta_H = 3,87$ ppm ($J = 9,0 ; 7,6$ Hz), ces deux protons corrélerent sur le spectre HSQC (Spectre 9 ; 9-1) au carbone du méthylène à $\delta_C = 71,53$ ppm. Sachant que ce carbone n'est autre que le carbone de fermeture de la γ -lactone α , β -saturée et tenant compte de la numérotation propre aux lignanes de ce type, ces deux protons sont attribués aux noyaux H-9a et H-9b et par conséquent le carbone qui les porte sera attribué au C-9. Sur le spectre RMN¹H et ses étalement (Spectre 8 ; 8-1 ; 8-2 ; 8-3) et grâce au spectre HSQC (Spectre 8) on observe bien la présence :

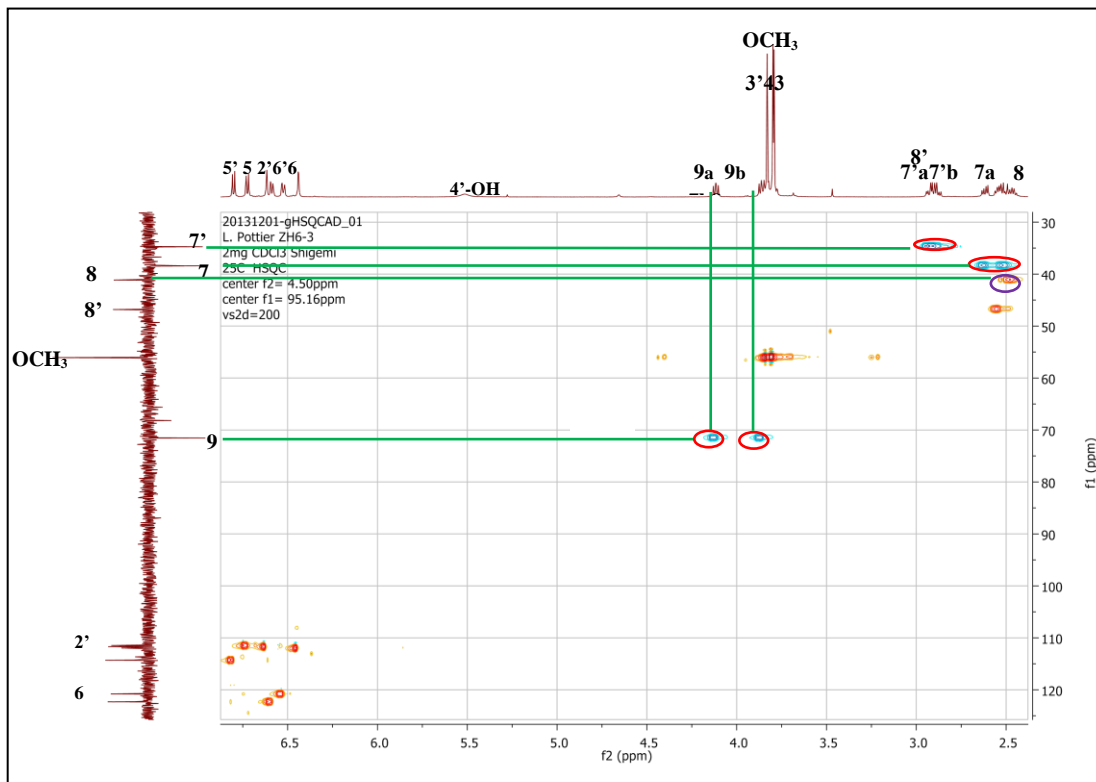
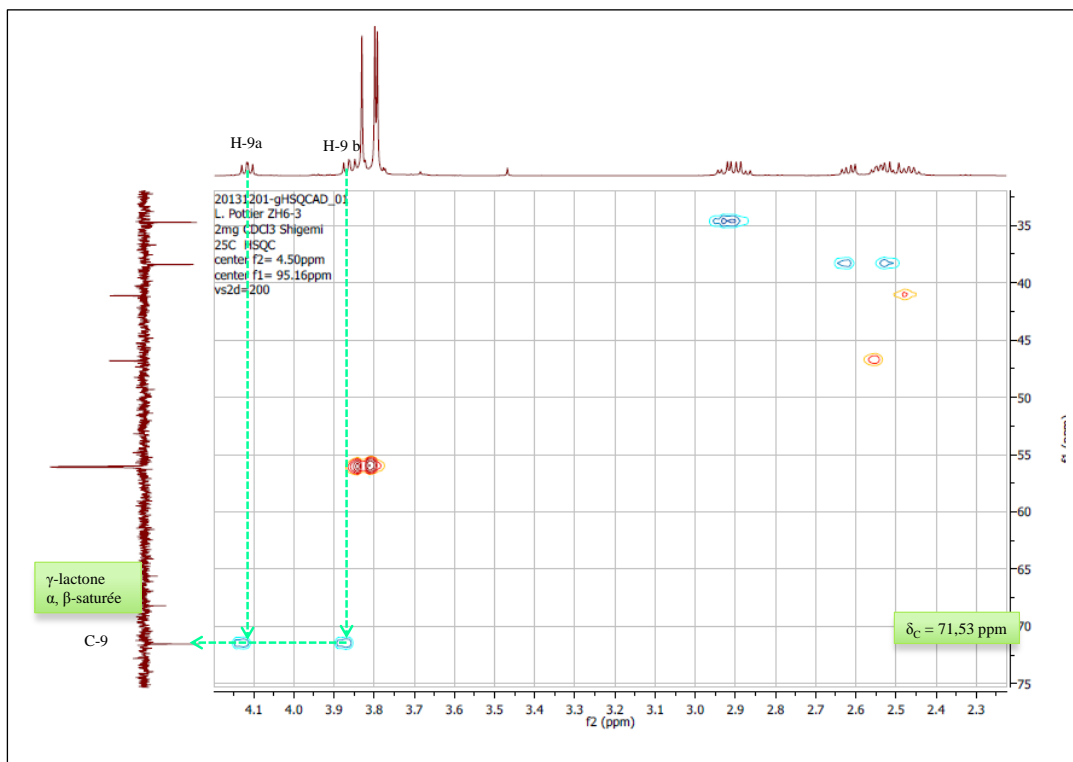
Spectre 8: RMN¹H (600 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}), étalement du composé 2Spectre 8-1: RMN¹H (600 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}), étalement du composé 2



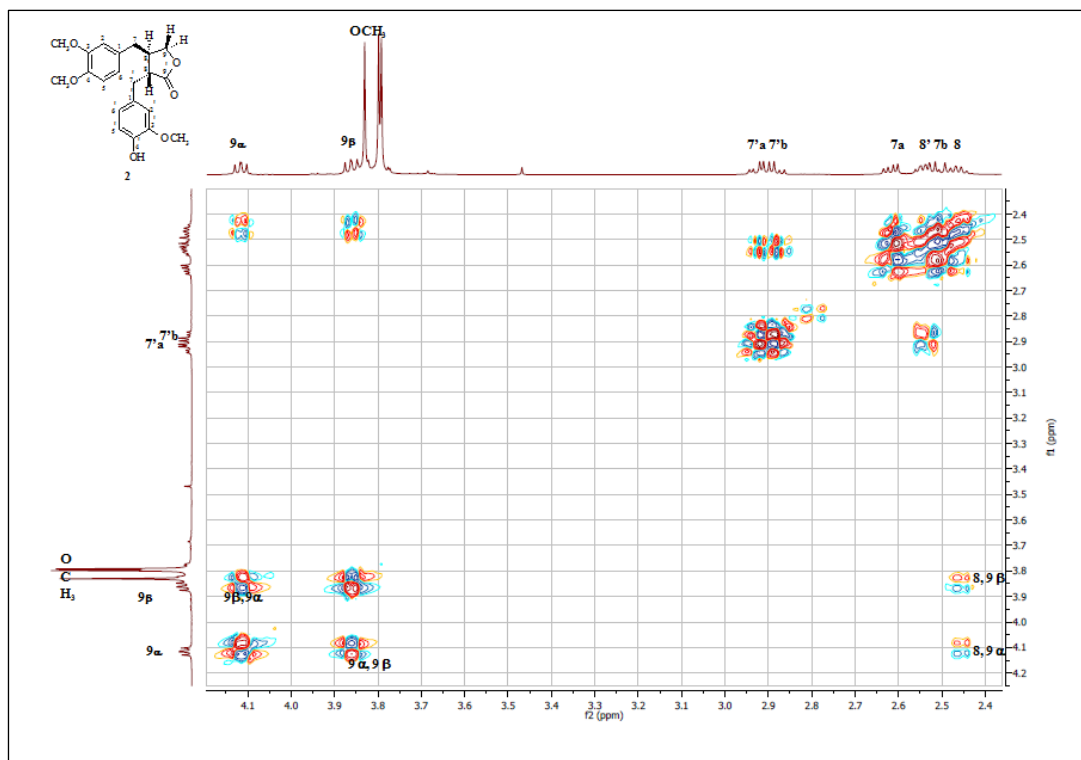
Spectre 8-2: RMN¹H (600 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}), du composé **2**, étalement de la zone aliphatique



Spectre 8-3: RMN¹H (600 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **2**, étalement la zone aromatique.

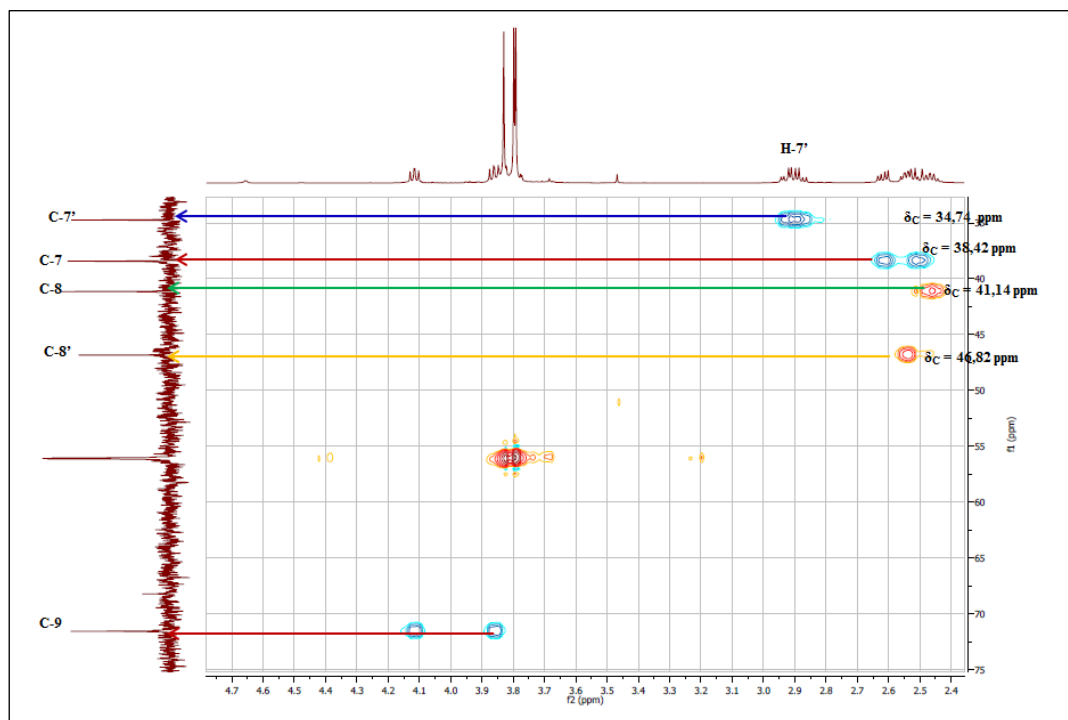
Spectre 9: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}) du composé **2**.Spectre 9-1: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

- Un signal sous forme de multiplet d'intégration 1H à $\delta_H = 2,46$ ppm. Ce proton corrèle sur le spectre HSQC au carbone à $\delta_C = 41,14$ ppm et sur le spectre COSY (Spectre 10) aux deux protons H-9a et H-9b. Cette observation permet d'attribuer ce proton au noyau H-8 du lignane en question, le carbone à $\delta_C = 41,14$ ppm sera donc attribué à C-8.



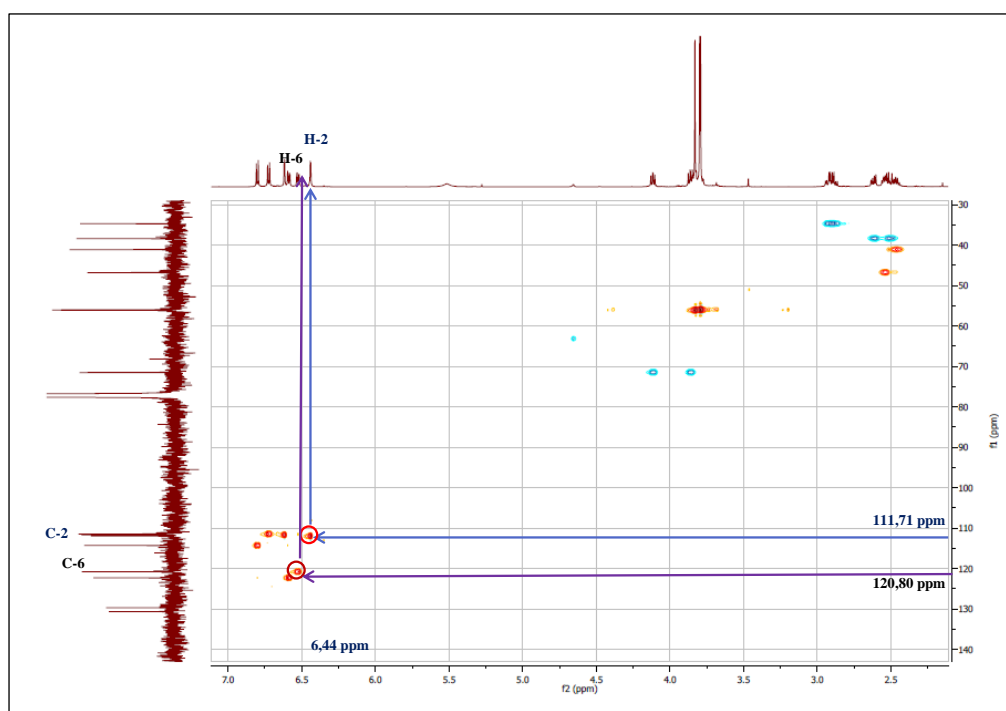
Spectre 10 : Expérience COSY (600 MHz, $CDCl_3$, δ_{ppm}), étalement du composé **2**

- Deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier sous forme de doublet de doublets à $\delta_H = 2,61$ ppm ($J = 14,7 ; 7,4$ Hz) et le second à $\delta_H = 2,52$ ppm sous forme de multiplet. Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC (spectre 8-2) au carbone du méthylène à $\delta_C = 38,42$ ppm et sur le spectre COSY au proton H-8, cette donnée permet d'attribuer ces deux protons aux noyaux H-7a et H-7b.

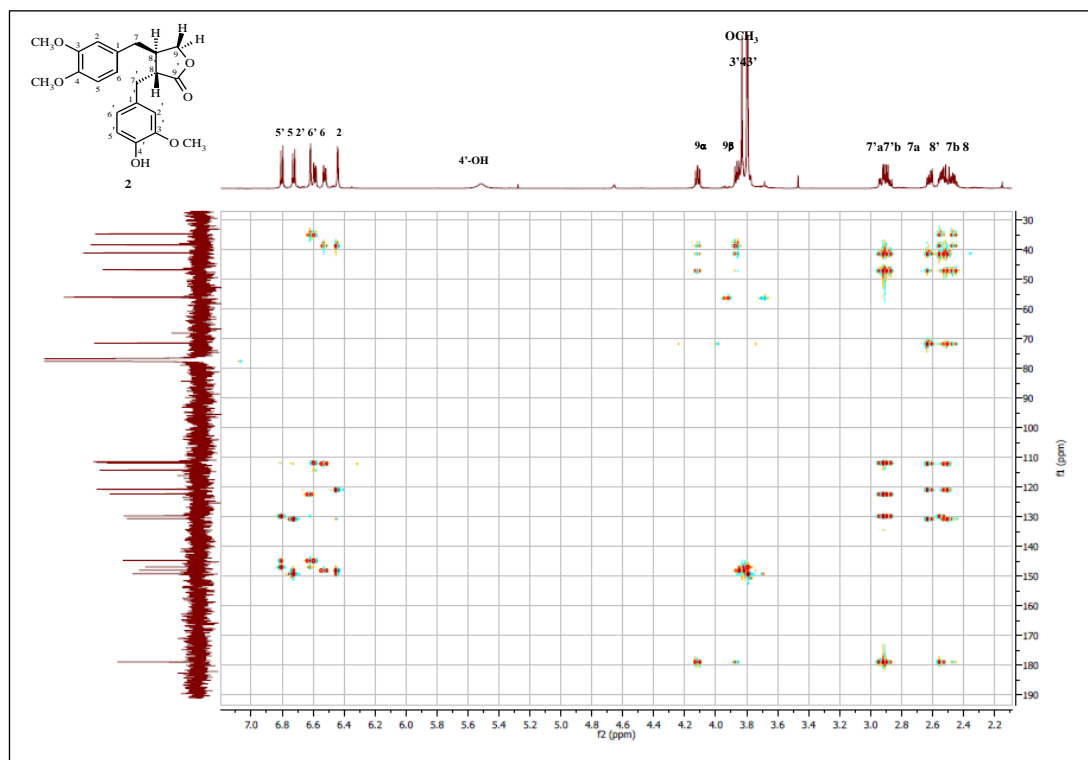


Spectre 9-2: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**

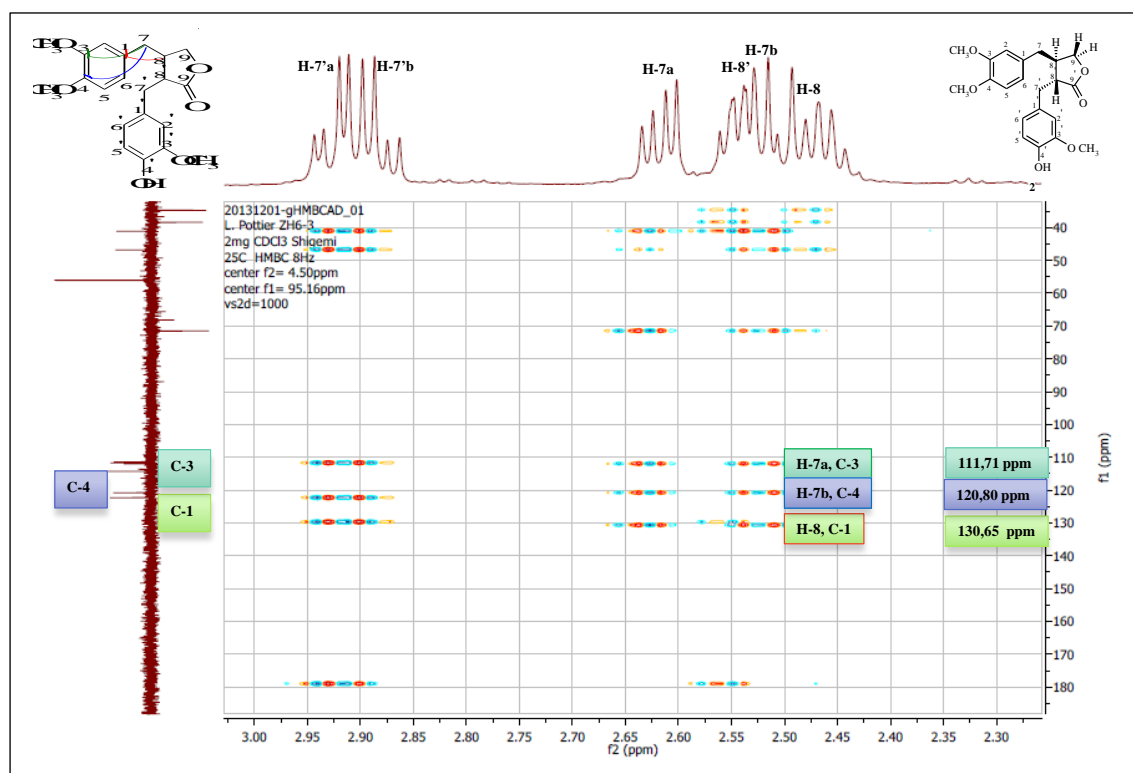
- Un signal d'intégration 1H sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}} = 2,54$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 46,82$ ppm, HSQC). Le proton relatif à ce signal corrèle sur le spectre COSY (spectre 10) au proton H-8. Cette donnée permet d'attribuer H-8' du lignane en question, sachant que pour ce type de molécule, la jonction entre les deux acides phénoliques se fait par le biais d'une liaison reliant C-8 à C-8'[8].
- Deux signaux sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta_{\text{H}} = 2,92$ ppm ($J = 14,1 ; 5,3$ Hz) et le second à $\delta_{\text{H}} = 2,89$ ppm ($J = 14,1 ; 7,1$ Hz), Ces deux protons corrélerent sur le spectre HSQC au carbone du méthylène à $\delta_{\text{C}} = 34,74$ ppm et sur le spectre COSY au proton H-8', cette donnée permet de les affecter aux noyaux H-7'a et H-7'b.

Spectre 9-3: Expérience HSQC (150 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}) du composé **2**.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 11) les deux protons H-9 montrent les taches de corrélation avec le carbone du carbonyle de la γ -lactone confirmant ainsi son point de fermeture en C-9. Toujours sur le même spectre les protons H-7'a, H-7'b, H-8 et H-8' montrent également des taches de corrélation avec le carbone de ce carbonyle, confirmant ainsi le cycle γ -lactonique.

Spectre 11: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}) du composé **2**.

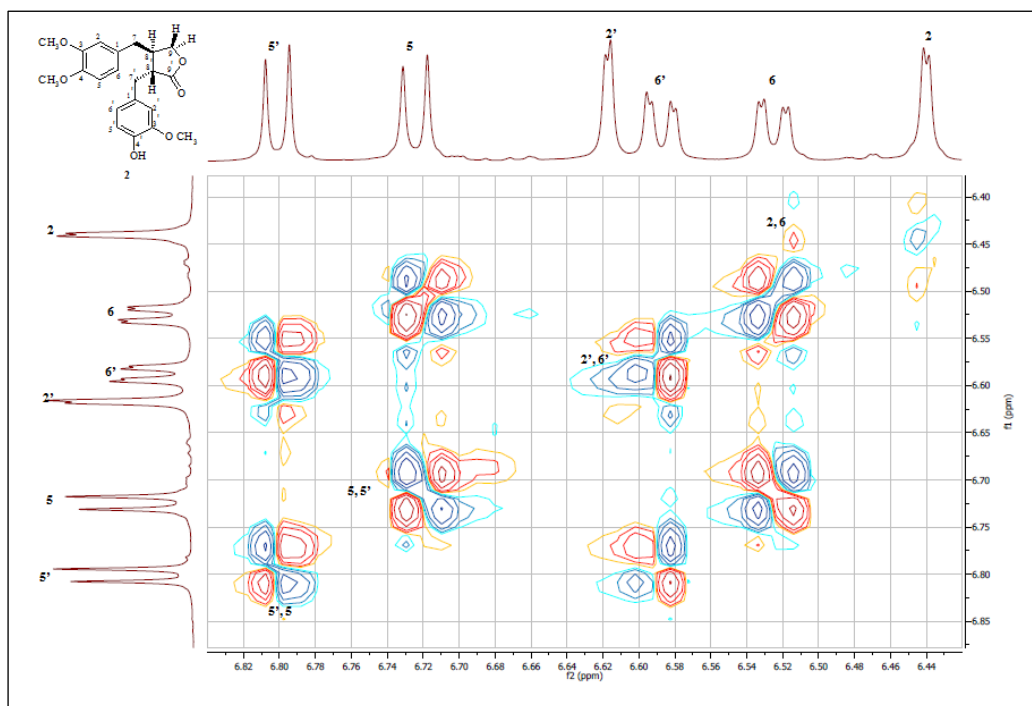
Par ailleurs ce spectre HMBC (Spectre 11-1) montre les taches de corrélation entre le proton H-8 et le carbone aromatique quaternaire à $\delta_C = 130,65$ ppm permettant ainsi son attribution au carbone C-1 du premier noyau aromatique du lignane. Toujours sur le même spectre les protons H-7a et H-7b montrent des taches de corrélation nettes avec les deux carbones des méthynes aromatiques à $\delta_C = 111,71$ ppm et $\delta_C = 120,80$ ppm. Sur le spectre relatif à l'expérience HSQC, le carbone à $\delta_C = 111,71$ ppm corréle avec le proton résonant sous forme d'un doublet à 6,44 ppm (d, $J = 1,7$ Hz) et la carbone à $\delta_C = 120,80$ ppm corréle avec le proton résonant sous forme d'un doublet de doublets à 6,53 ppm (dd, $J = 8,1; 1,7$ Hz). Ces données permettent d'une part d'attribuer ces deux protons aux H-2 et H-6 de ce noyau aromatique respectivement et d'autre part de déduire que ce noyau aromatique est substitué en C-3 et C-4.



Spectre 11-1: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

En effet et toujours sur le spectre HMBC les deux protons H-2 et H-6 montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique à $\delta_C = 146,91$ ppm attribuable au carbone C-4, la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné. Cette oxygénation est claire sur le spectre HMBC car ce carbone montre une tache de corrélation

avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,83$ ppm indiquant ainsi que ce carbone est méthoxylé. Le proton H-5 de ce noyau aromatique est localisé à $\delta_H = 6,72$ ppm (d, $J = 8,1$ Hz) grâce à sa corrélation sur le spectre COSY (Spectre 10-1) avec H-6. Le spectre HSQC permet la localisation de C-5 à $\delta_C = 111,48$ ppm.



Spectre 10-1 : Expérience COSY (600 MHz, $CDCl_3$, δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

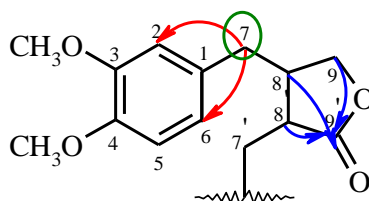
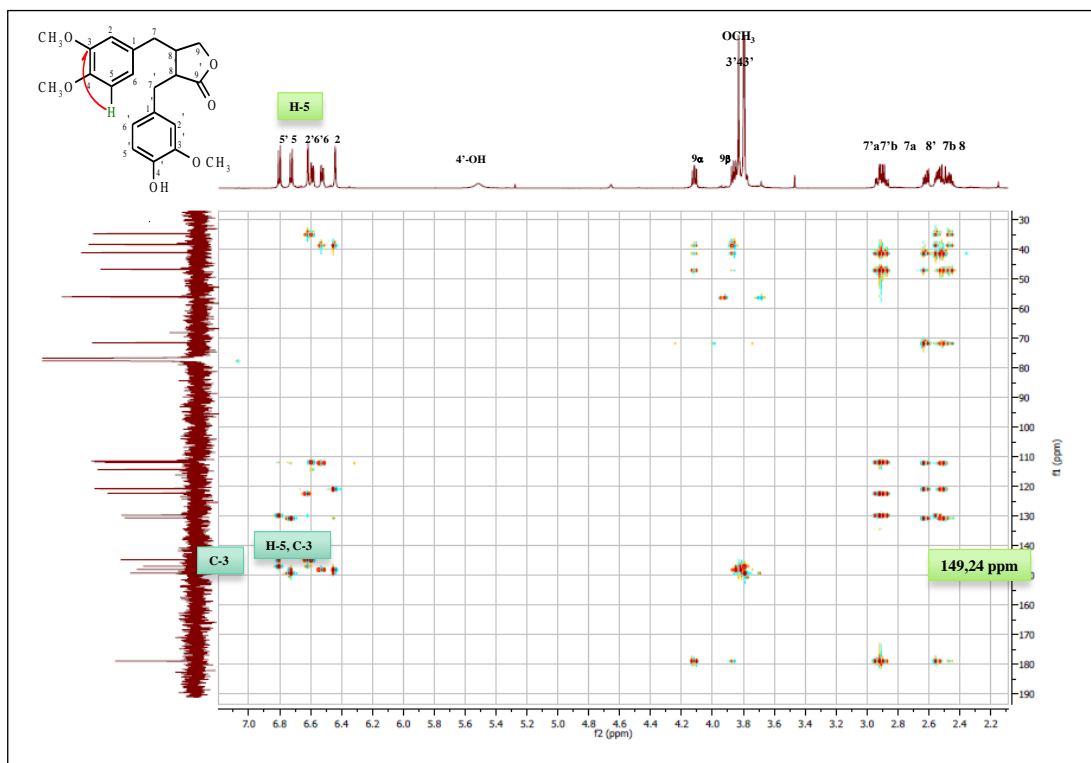
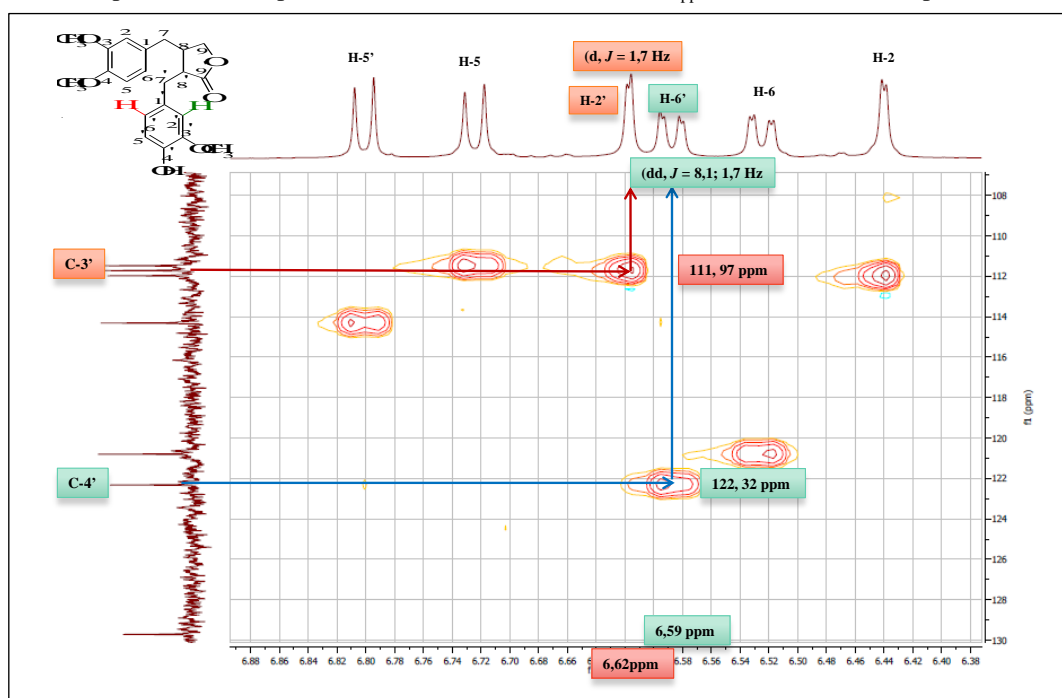


Figure IV.3.1 : Structure partielle du composé **2**.

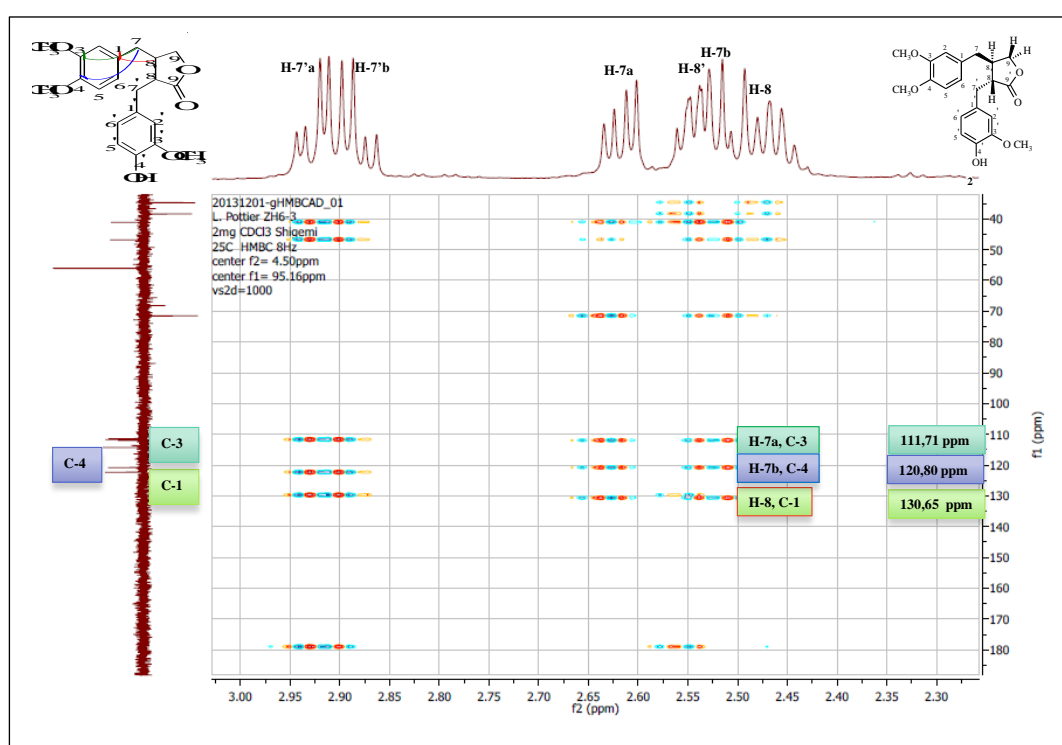
L'attribution de ce proton (H-5) permet la localisation de C-3 de ce noyau aromatique à $\delta_C = 149,24$ ppm grâce à leur tache de corrélation relevée sur le spectre relatif à l'expérience HMBC. Ce carbone C-3 montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à $\delta_H = 3,79$ ppm indiquant également sa méthoxylation.

Spectre 11-2: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.Spectre 9-3: Expérience HSQC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

Un retour vers le spectre HMBC permet de relever une tache de corrélation entre le proton H-8' et le carbone aromatique quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 129,72$ ppm permettant ainsi son attribution au carbone C-1' du deuxième noyau aromatique. Toujours sur le même spectre les protons H-7'a et H-7'b montrent des taches de corrélation nettes avec les deux carbones des

méthynes aromatiques à $\delta_C = 111,97$ ppm et $\delta_C = 122,32$ ppm. Sur le spectre relatif à l'expérience HSQC, le carbone à $\delta_C = 111,97$ ppm corrèle avec le proton résonant sous forme d'un doublet à 6,62 ppm (d, $J = 1,7$ Hz) et la carbone à $\delta_C = 122,32$ ppm corrèle avec le proton résonant sous forme d'un doublet de doublets à 6,59 ppm (dd, $J = 7,9; 1,7$ Hz).

Ces données permettent d'une part d'attribuer ces deux protons aux H-2' et H-6' de ce noyau aromatique respectivement et d'autre part de déduire que ce noyau aromatique est substitué en C-3' et C-4'.

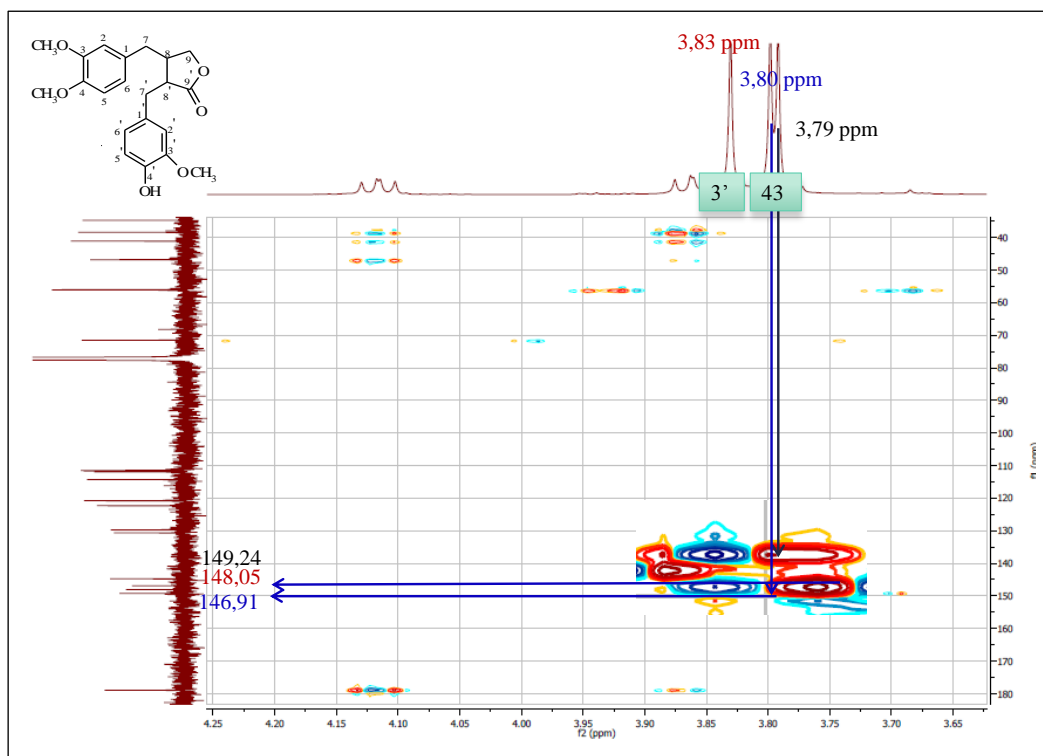


Spectre 11-3: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

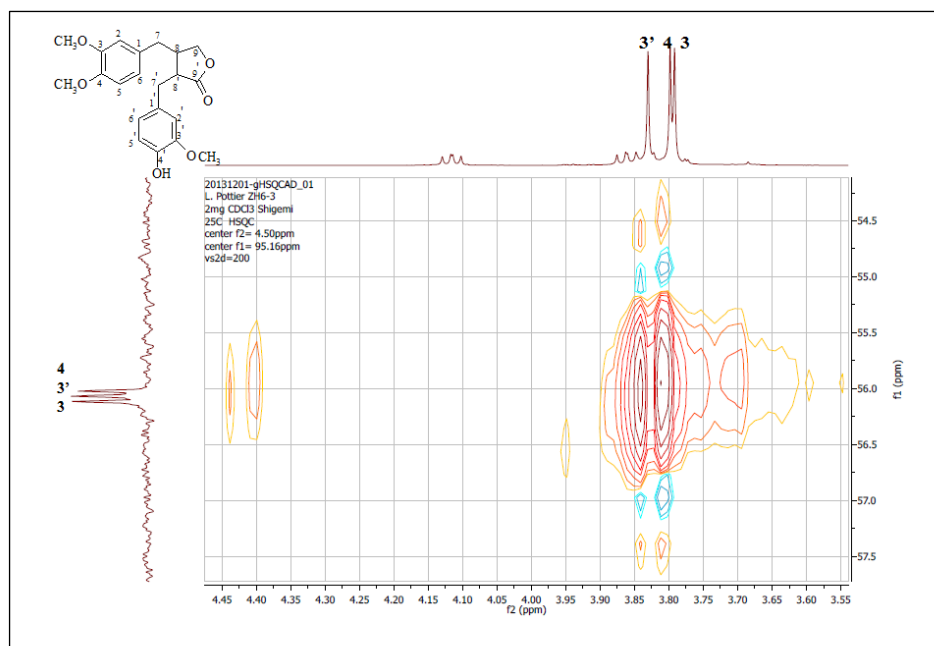
Le proton H-5' de ce noyau aromatique est attribué au signal à $\delta_H = 6,72$ ppm (d, $J = 8,1$ Hz) grâce à sa corrélation sur le spectre COSY (Spectre 10-1) avec H-6'. Le carbone C-5' apparaît à $\delta_C = 114,31$ ppm (HSQC).

La substitution des positions C-3' et C-4' est établie par le biais du spectre HMBC où les deux protons H-2' et H-6' montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique à $\delta_C = 144,76$ ppm attribuable au carbone C-4', la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné. Toujours sur le même spectre ce carbone C-4' ne montre aucune corrélation avec les protons du groupement méthoxyle restant ($\delta_H = 3,80$ ppm ; $\delta_C =$

56,07 ppm). Cette observation permet de placer le groupement hydroxyle en cette position (C-4'). De ce fait la position C-3' sera occupée par ce dernier méthoxyle. La méthylation de C-3' est appuyée par la valeur de son déplacement chimique ($\delta_C = 148,05$ ppm) et surtout par la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC entre les protons du méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,83$ ppm et ce carbone (Spectre 11-4).

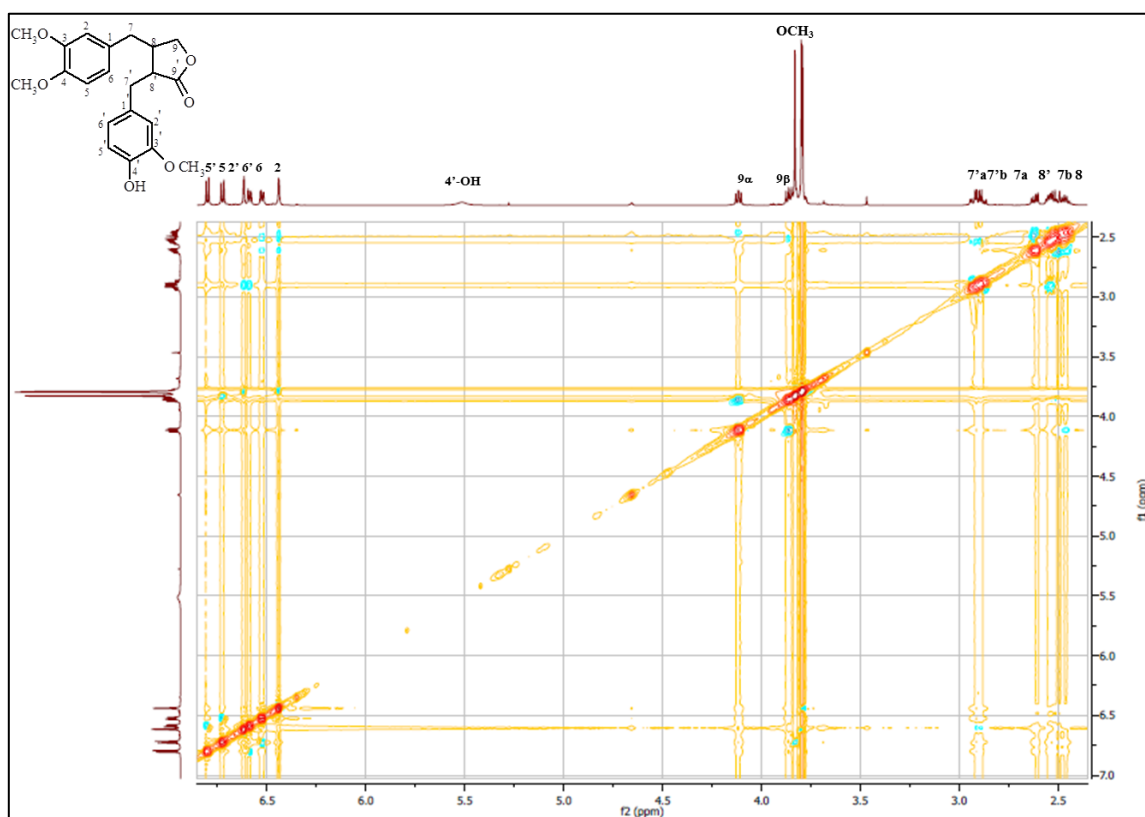


Spectre 11-4: Expérience HMBC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.



Spectre 9-4: Expérience HSQC (600 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

La position des méthoxyles en C-3 & C-4 est confirmée par l'analyse du spectre ROESY (spectre 11) qui montre des corrélations nettes du méthoxyle à $\delta_H = 3,79$ ppm avec H-2 ($\delta_H = 6,44$ ppm ; d ; $J = 1,7$ Hz) indiquant qu'il est en C-3 ($\delta_C = 149,24$ ppm). Le méthoxyle à $\delta_H = 3,80$ ppm, donne une tache de corrélation avec H-5 ($\delta_H = 6,72$ ppm ; d ; $J = 6,8$ Hz) confirmant son positionnement en C-4. Le méthoxyle à $\delta_H = 3,83$ ppm montrant une corrélation nette avec le proton H-2' ($\delta_H = 6,62$ ppm ; d ; $J = 1,7$ Hz) et donc bien en position C-3'.



Spectre 12 : Expérience ROESY (600 MHz, $CDCl_3$, δ_{ppm}), étalement du composé **2**.

L'ensemble de ces données reportées dans le tableau IV.7 mène à la structure plane reportée dans la Figure IV.4.

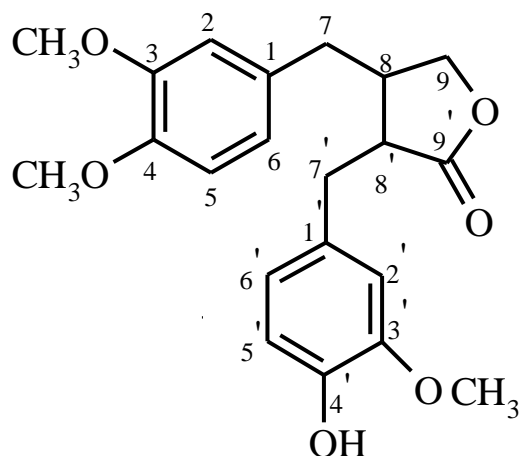


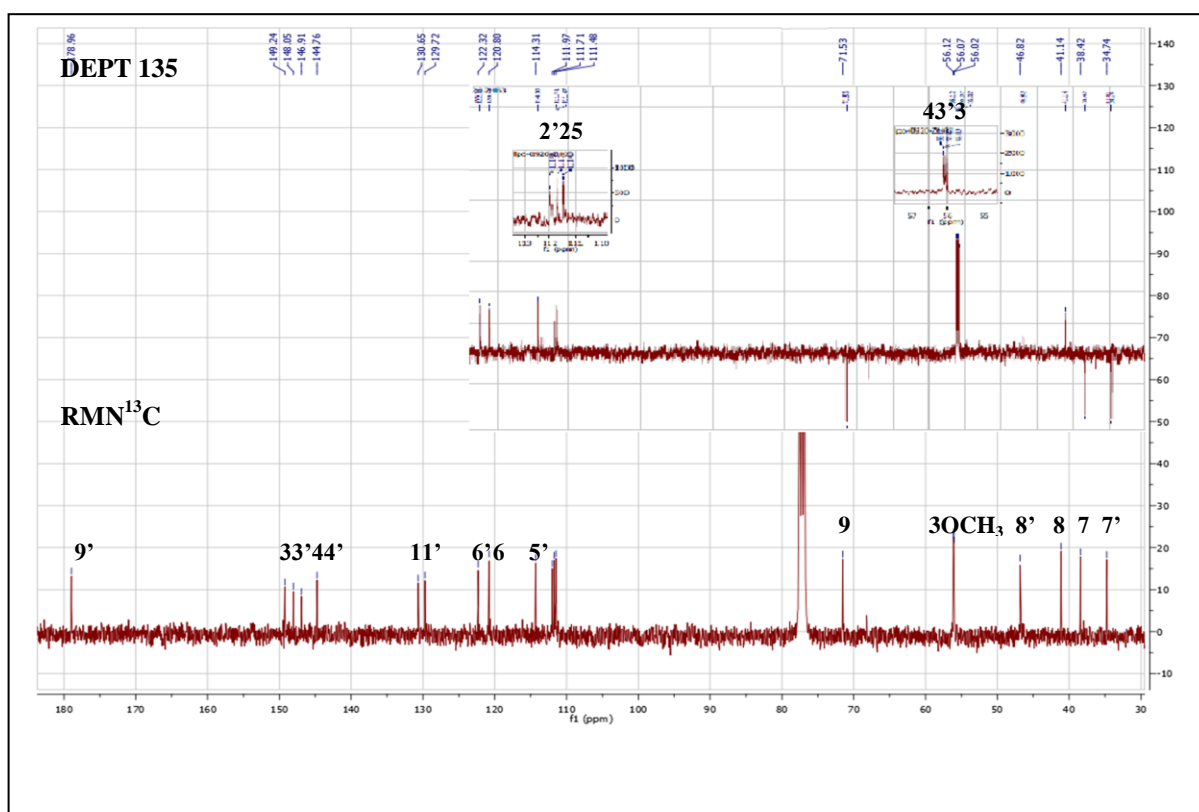
Figure IV.4 : Structure plane du composé 2.

En matière de stéréochimie, il est connu selon la biogénèse des lignanes de type dibenzylbutyrolactones qu'après oxydation, lactonisation (voir chapitre II), les protons : H-8 et H-8' adoptent des orientations α et β respectivement [8]. De ce fait, nous pouvons définir une configuration (8R, 8'R) pour cette molécule.

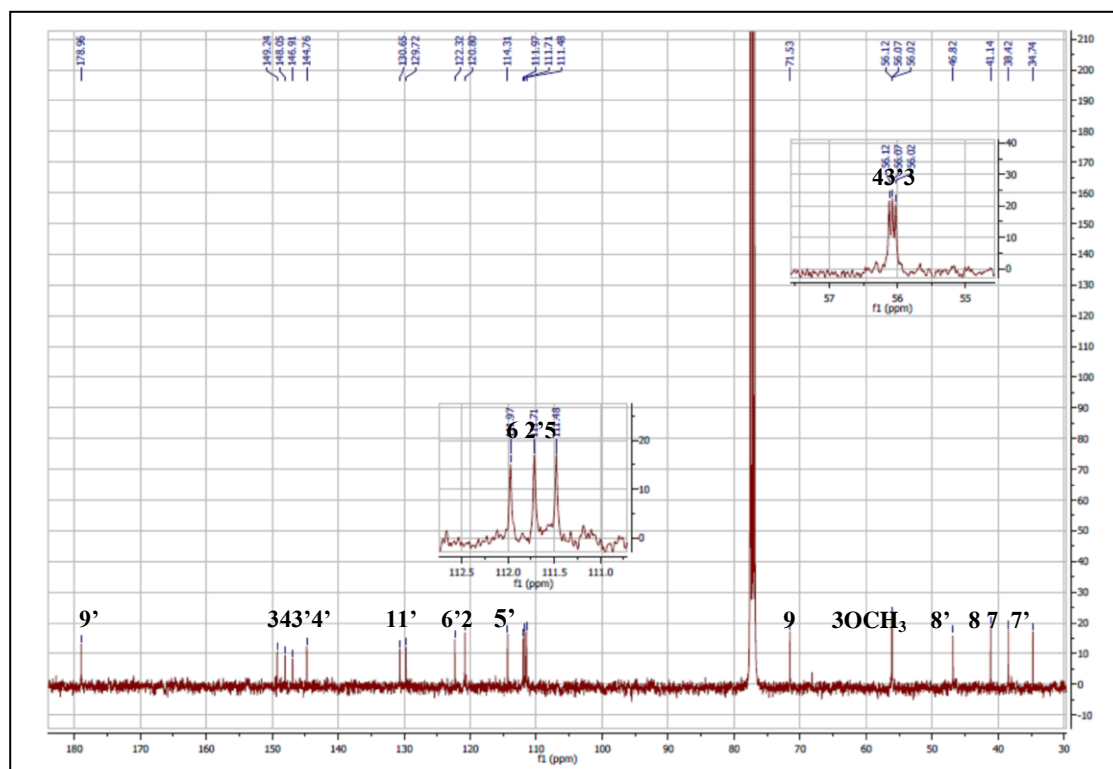
L'examen du spectre ROESY (Spectre 12) permet alors de définir les orientations α ou β des protons H-9a et H-9b. En effet, ce spectre montre une tache de corrélation nette entre le proton H-8' ($\delta_{\text{H}} = 2,54$ ppm ; m) et H-9b ($\delta_{\text{H}} = 3,87$ ppm, dd, $J = 9,0 ; 7,6$ Hz) ce qui permet alors, d'affecter l'orientation β au H-9b et α au H-9a (Figure IV.6).

La mesure du pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule effectuée à 20°C en utilisant la longueur de la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm) dans l'éthanol a donné la valeur $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17,27^{\circ}$ (EtOH, c 0,145 g/100 mL). Le signe du pouvoir rotatoire ainsi que toutes les données spectroscopiques sont reportés dans le tableau (Tableau IV.7).

Les données relatives aux spectres de RMN ^{13}C et DEPT-135 de ce composé sont reportées dans les (Spectre 13 & 13-1).



Spectre 13 : RMN¹³C 153 (150 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}), (attribution) du composé **2**.



Spectre 13-1 : Expérience DEPT 153 (150 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}), (attribution) du composé **2**.

Tableau IV.7 : Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **2**.

^1H	intégration	δ_{H} (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	$^{13}\text{C}^{\chi}$	δ_{C} (ppm)	DEPT $^{\chi}$ & HSQC $^{\varphi}$
H-5'	1	6,80	<i>d</i>	7,9	9'	178,96	C=O
H-5	1	6,72	<i>d</i>	8,1	3	149,24	C
H-2'	1	6,62	<i>d</i>	1,7	3'	148,05	C
H-6'	1	6,59	<i>dd</i>	(7,9; 1,7)	4	146,91	C
H-6	1	6,53	<i>dd</i>	(8,1; 1,7)	4'	144,76	C
H-2	1	6,44	<i>d</i>	1,7	1	130,65	C
4'-OH	1	5,50	<i>brs</i>	-	1'	129,72	C
H-9 α	1	4,12	<i>dd</i>	(9,0; 7,4)	6'	122,32	CH
H-9 β	1	3,87	<i>dd</i>	(9,0; 7,6)	6	120,80	CH
OCH ₃ -3'	3	3,83	<i>s</i>	-	5'	114,31	CH
OCH ₃ -4	3	3,80	<i>s</i>	-	2'	111,97	CH
OCH ₃ -3	3	3,79	<i>s</i>	-	2	111,71	CH
H-7'a	1	2,92	<i>dd</i>	(14,1; 5,3)	5	111,48	CH
H-7'b	1	2,89	<i>dd</i>	(14,1; 7,1)	9	71,53	CH ₂
H-7a	1	2,61	<i>dd</i>	(14,7; 7,4)	OCH ₃ -4	56,12	OCH ₃
H-8'	1	2,54	<i>m</i>	-	OCH ₃ -3'	56,07	OCH ₃
H-7b	1	2,52	<i>m</i> *	-	OCH ₃ -3	56,02	OCH ₃
H-8	1	2,46	<i>m</i>	-	8'	46,82	CH
-	-	-	-	-	8	41,14	CH
-	-	-	-	-	7	38,42	CH ₂
-	-	-	-	-	7'	34,74	CH ₂

$^{\chi}$ RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm) ; $^{\varphi}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm).

*m** : Partiellement chevauché par le signal H-8'.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la Figure IV.6 c'est la (-)- Arctigenine.

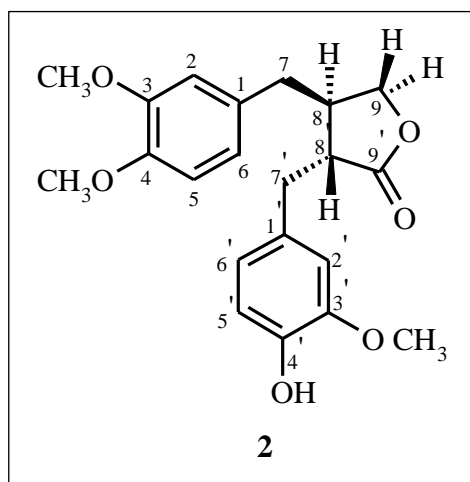


Figure IV.5 : (-)- Arctigenine

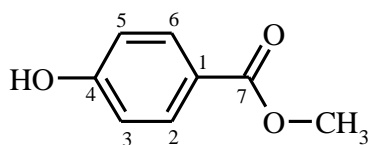
La molécule est également connue sous les noms suivants selon IUPAC :

- ✓ 2(3*H*)-Furanone, 4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]dihydro-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-;
- ✓ (3*R*,4*R*)-2(3*H*)-Furanone, 4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]dihydro-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-;
- ✓ (3*R*-trans)-;
- ✓ (-)-Arctigenine;
- ✓ Arctigenin Deleted CAS Registry Numbers: 26687-78-5, 41328-87-4.

Il s'agit de l'arctigénine, un lignane de type diarylbutyrolactone. Il a été isolé pour la première fois en 1929 [9] avec son glucoside (arctiine) par les semences de *Arctium lappa* L. [10,11].

Par la suite, il a été aussi isolé de: *Onopordon acaulon* [12], *Cupressus lusitanica* [13], *Ipomoea cairica* [14], *Arctium lappa* [15], *Trachelospermum asiaticum* var. *indicu* [16], *Trachelospermum axillare*. [17], *Carthamus tinctorius* [18], *Cynara cardunculus* [19], *Forsythia intermedia* [20], *Jurinella moschus* [21], *Saussurea medusa* [22] et de *Carduus micropterus* ssp. *persinospus* [23].

Chez le genre *Centaurea* il a été isolé de plusieurs Centaurées comme *Centaurea sphaerocephala* ssp. [24]; *Centaurea pullata* & *Centaurea grisebachii* ssp. [25]. *C. cuneifolia* [26], *Centaurea dimorpha* [27], *C. glomerata* [28], *C. tweediei* [29], *C. calcitrapa* [30], *C. macrocephala* [31], *C. dealbata* [32], *C. regia* [33].

IV.4. Elucidation structurale du composé **3** (ZH6-4)**3**

Le composé **3** se présente sous forme de poudre blanche, soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane, son point de fusion (PF) = 128°C.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif HRESI-QTOF-MS (Spectres 14 et Tableau IV.8) du composé **3** montre des pics quasi-moléculaires à : $m/z = 153,0544$, correspondant à $[M+H]^+$ (calculé pour $C_8H_9O_3$: 153,0546); $m/z = 175,0369$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_8H_8O_3Na$: 175,0369); $343,0543$ $[2M+K]^+$ (calculé pour $C_{16}H_{16}O_6K$: 343,0546); (la masse exacte mesurée : $m/z = 152,0472$, calculé pour $C_8H_8O_3$: 152,0473), indiquant une formule brute $C_8H_8O_3$; (Tableau IV.8 ; Figure IV.8 ; Tableau IV.9), soit une molécule renfermant 5 insaturations.

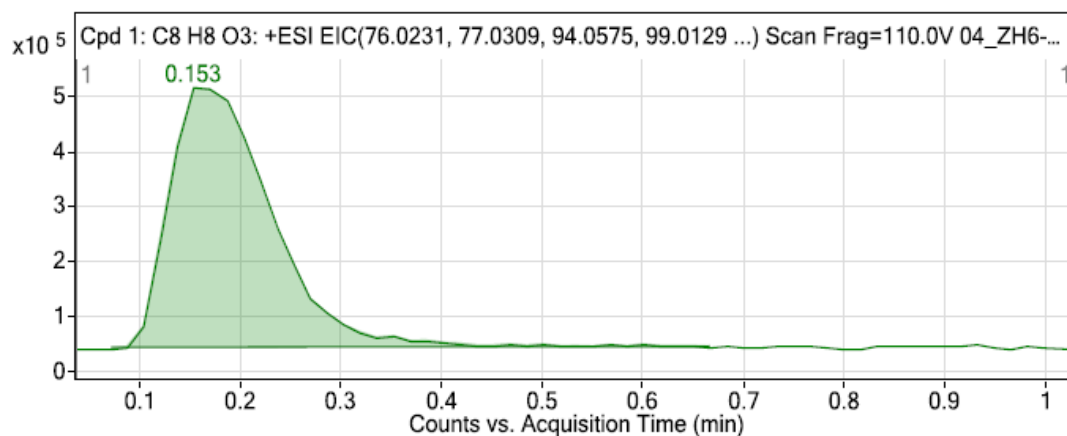
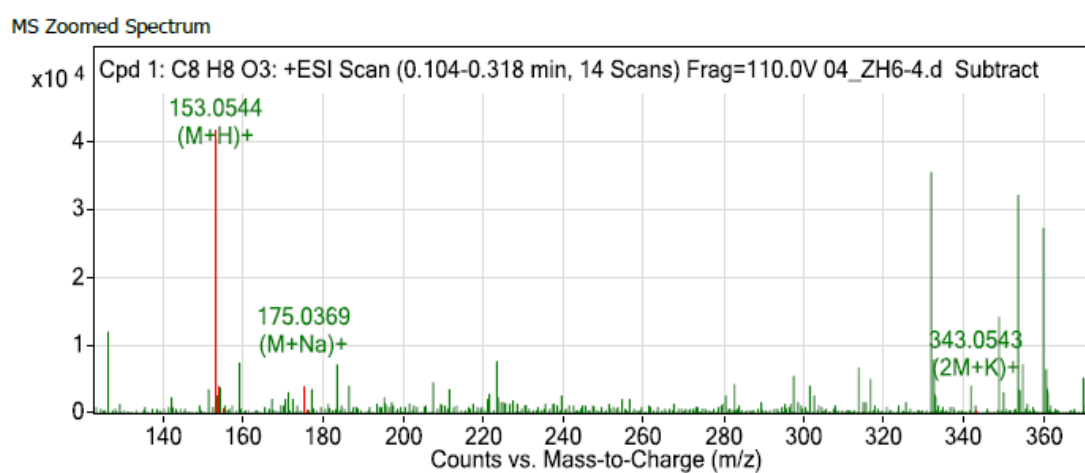
L'examen du spectre HRESI-QTOF-MS/MS (Spectre 14-1) montrant les ions fragments à $m/z = 135,0239$ correspondant à $[M+H-H_2O]^+$; $m/z = 121,0289$ correspondant $[M+H-CH_3OH]^+$, suggère que ce composé renferme un groupement hydroxyle et un groupement méthoxyle (Tableau IV.10).

Tableaux IV.8 : Données du spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé **3**, calcul de la masse exacte

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	MFG Formula	DB Formula
Cpd 1: C8 H8 O3	0.153	152.0472	41233	C8 H8 O3	152.0473	-0.76	C8 H8 O3	C8 H8 O3

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C8 H8 O3	153.0544	0.153	Find By Formula	152.0472

Figure IV.8: Amas isotopique du composé **3**Spectre 14: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé **3**Tableau IV.9 : Ions quasi-moléculaires du composé **3**

MS Spectrum Peak List

<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff(ppm)	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
153.0544	153.0546	-1.58	1	41233.14	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
154.0583	154.058	1.86	1	3825.16	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
155.0631	155.0598	21.5	1	697.46	C ₈ H ₉ O ₃	(M+H) ⁺
175.0369	175.0366	1.81	1	3595.6	C ₈ H ₈ NaO ₃	(M+Na) ⁺
176.0401	176.04	0.97	1	405.13	C ₈ H ₈ NaO ₃	(M+Na) ⁺
343.0543	343.0578	-10.33	1	125.56	C ₁₆ H ₁₆ KO ₆	(2M+K) ⁺

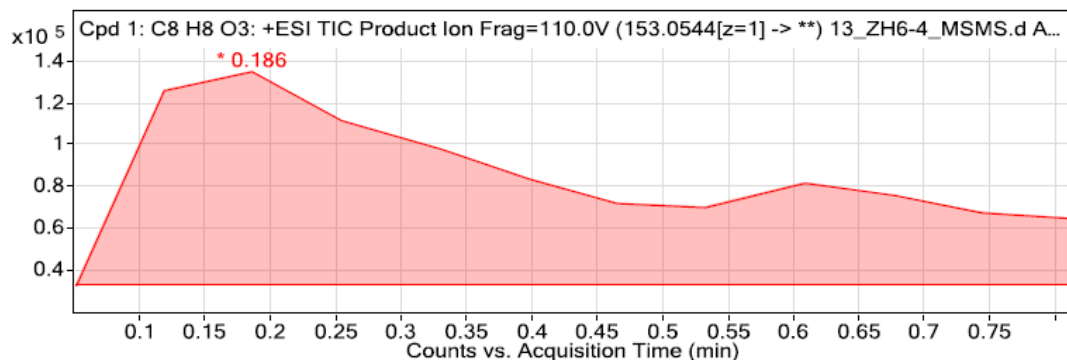
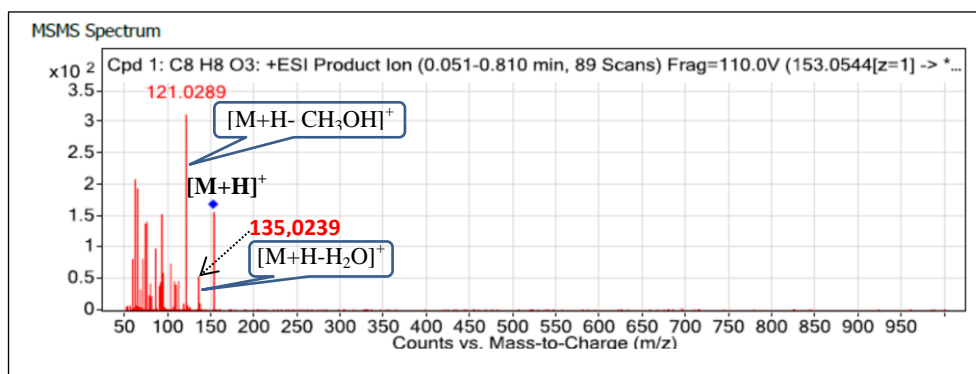


Figure IV.8-1 : MS/MS, amas isotopique de l'ion 153,0544 du composé 3



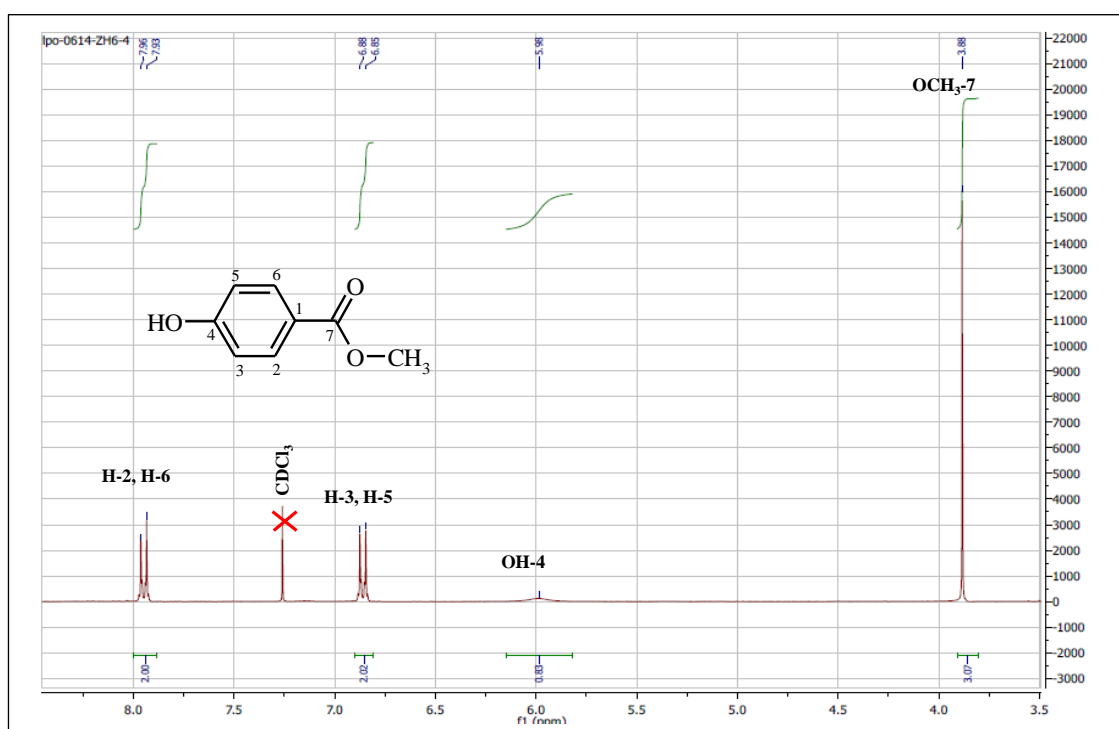
Spectre 14-1: Spectre HRESI-QTOF-MS/MS (+) du composé 3

Tableau IV.10 : Liste des pics fragments de l'ion quasi-moléculaire du composé 3

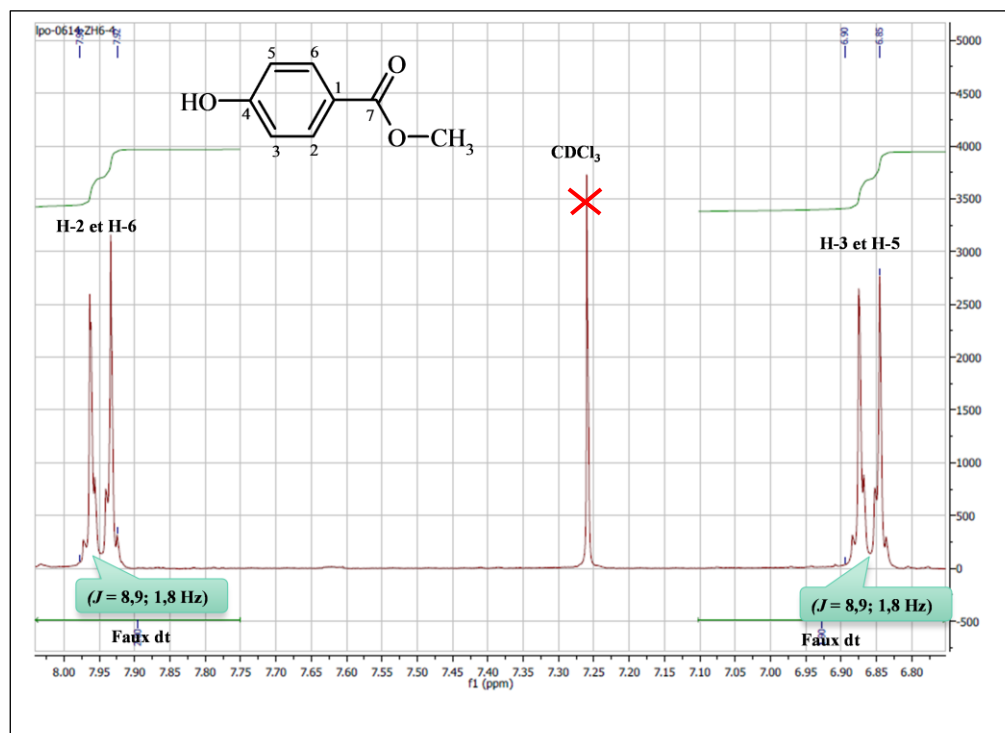
MS/MS Spectrum Peak List				
<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff (ppm)	Abund	Formula
59.0136	59.0128	-13.52	83.55	C2 H3 O2
60.9878			211.69	
65.04	65.0386	-21.76	196.47	C5 H5
68.0179			34.37	
70.9803			83.35	
72.9876			138.12	
73.0661	73.0648	-17.75	33.7	C4 H9 O
75.0033			143.47	
77.0194			19.15	
77.0396	77.0386	-13.59	25.1	C6 H5
78.9978			43.99	
79.0552	79.0542	-12.64	28.16	C6 H7
81.0693	81.0699	7.04	23.17	C6 H9
84.9608			101.52	
88.9828			39.12	
91.0547	91.0542	-5.23	46.07	C7 H7
93.0134			155.46	
93.0342	93.0335	-8.07	132.5	C6 H5 O
94.0422	94.0413	-9.25	60.15	C6 H6 O
102.9981			74.85	
106.9915			15.87	
107.0289			47.79	
107.0486	107.0491	5.41	17.33	C7 H7 O
109.0649	109.0648	-0.64	42.51	C7 H9 O
112.0067			46.82	
121.0289	121.0284	-3.89	312.74	C7 H5 O2
135.0239			55.3	
153.0545			158.44	

L'examen des spectres de RMN de ce composé, donnent des signaux orientant vers l'existence d'un squelette phénolique. En effet, l'étude du spectre RMN ^1H de ce composé **3** et ses étalement (Spectres 15 ; 15-1 ; Tableau IV.4.11) a permis de mettre en évidence la présence d'un système AA'BB' caractéristique d'un noyau aromatique para-substitué notamment les signaux à δH 7,95 et 6,86 ppm relatifs à 4 protons et résonant sous forme de :

- ✓ un faux doublet de triplets ($J = 8,9 ; 1,8 \text{ Hz}$) d'intégration 2H à $\delta\text{H} = 7,95 \text{ ppm}$ attribuables à H-2 et H-6 de ce noyau aromatique
- ✓ un faux doublet de triplets ($J = 8,9 ; 1,8 \text{ Hz}$) d'intégration 2H à $\delta\text{H} = 6,86 \text{ ppm}$ attribuables à H-3 et H-5 de ce noyau aromatique.



Spectre 15 : RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}) du composé **3**



Spectre 15-1 : RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **3**, étalement de la zone aromatique

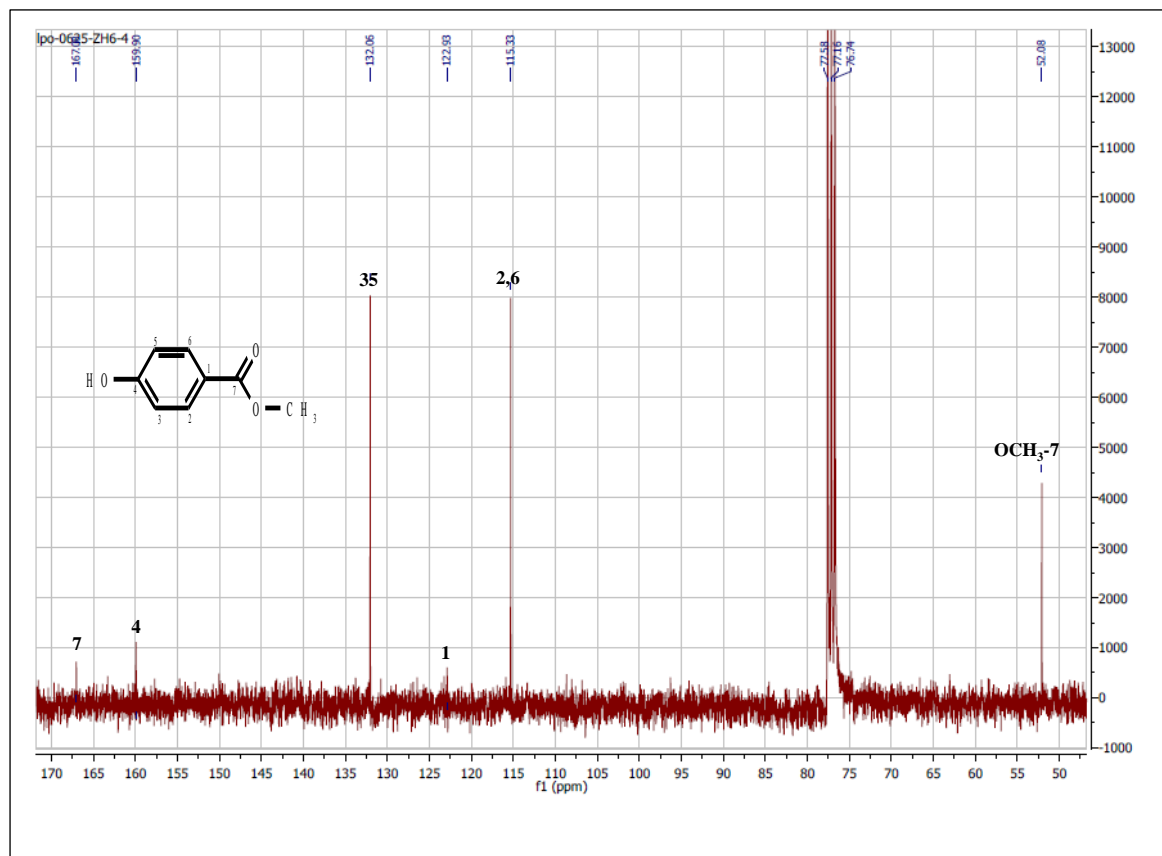
L'examen du spectre RMN ¹³C (Spectres 16 ; Tableau IV.4.11) confirme ces résultats et permet d'attribuer le signal à δ_c = 132,06 ppm aux carbones C-2 et C-6 et le signal à δ_c = 115,33 ppm aux carbones C-3 et C-5 et montre la présence de 4 autres signaux dont :

- Un groupement méthoxyle à δ_c = 52,08 ppm (δ_H = 3,88 ppm).
- Un carbone quaternaire à δ_c = 167,08 ppm, dont la valeur du déplacement chimique indique qu'il s'agit d'un carbonyle d'ester. Vu la présence du méthoxyle précédemment signalé, il est clair que cette molécule est un benzoate de méthyle.
- Un carbone aromatique quaternaire à δ_c = 159,90 ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique, il est clair qu'il est oxygéné. Vu l'attribution du méthoxyle à la fonction ester, ce carbone ne peut donc être porteur que du groupement hydroxyle précédemment signalé, il sera donc numéroté C-4.
- Un carbone aromatique quaternaire à δ_c = 122,93 ppm ne pouvant être que le C-1.

Tenant compte de la numérotation usuelle de ce type de composé le carbone du carbonyle de la fonction ester sera numéroté C-7.

La présence du groupement hydroxyle est confirmé par le spectre proton qui montre un massif d'intégration 1H à δ_H = 5,98 ppm caractéristique d'un OH phénolique.

L'ensemble des données de cette analyse permet de décrire le composé **3** comme étant le *p*-hydroxy benzoate de méthyle (Figure V.9) également connu sous le nom du Paridol [34,35].



Spectre 16 : RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) du composé **3**.

Les données relatives aux spectres de RMN ¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le Tableau IV.11 :

Tableau IV.11 : Les données spectroscopiques de la RMN^(1H&13C) (CDCl₃, 300 MHz) du Paridol.

¹ H	Intégration	δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	¹³ C ^{&}	δ (ppm)
H-2, H-6	2	7,95	<i>d</i>	8,9	7	167,08
H-3, H-5	2	6,86	<i>d</i>	8,9	4	159,90
4-OH	1	5,98	<i>brs</i>	/	2 ; 6	132,06
OCH ₃ -7	3	3,88	<i>s</i>	/	1	122,93
					3 ; 5	115,33
					OCH ₃ -7	52,08

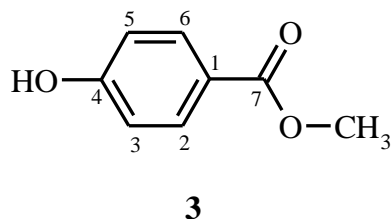
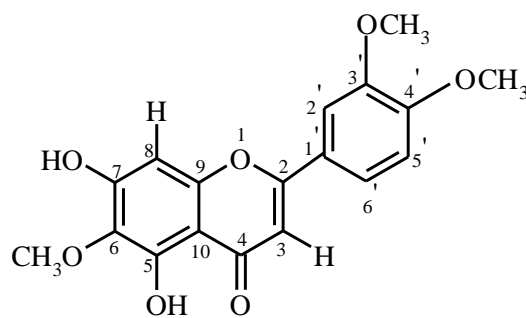


Figure IV.9: Paridol

Une étude bibliographique que nous avons menée sur cette molécule a montré sa présence dans le genre *Centaurea* (Asteraceae) notamment, *Centaurea aspera stenophylla* [36] et *Centaurea cyanus* L.[37]. Cette molécule est utilisée dans les préparations cosmétiques et pharmaceutiques [38,39].



4

IV.5. Elucidation structurale du composé 4 (ZHF8)

Le composé **4** a été isolé sous forme d'aiguilles de couleur jaune, solubles dans le DMSO son point de fusion PF= 236°C. Selon les valeurs des R_f 0,08 et 0,88 obtenues en chromatographie sur papier (CP ; Whatman N°1) avec AcOH à 15 % et avec le solvant de Partridge (un système peu polaire connu sous le nom de «BAW», composé de *n*-butanol/AcOH/Eau ; 4:1:5, v/v, phase organique, où les flavonoïdes aglycones migrent beaucoup en comparaison avec les glycosides qui possèdent des $R_f \leq 0,5$ [40,41]), respectivement , nous constatons clairement qu'il s'agit d'un flavonoïde de type aglycone.

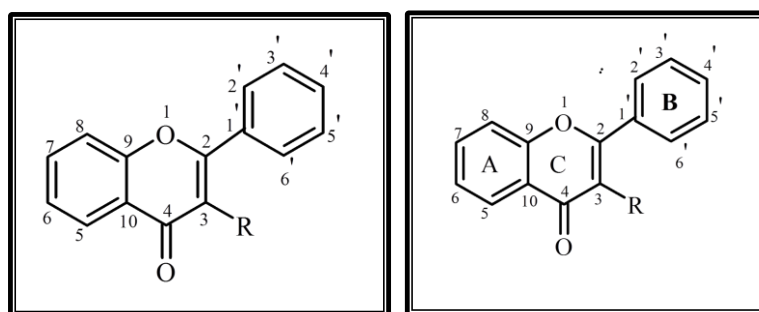
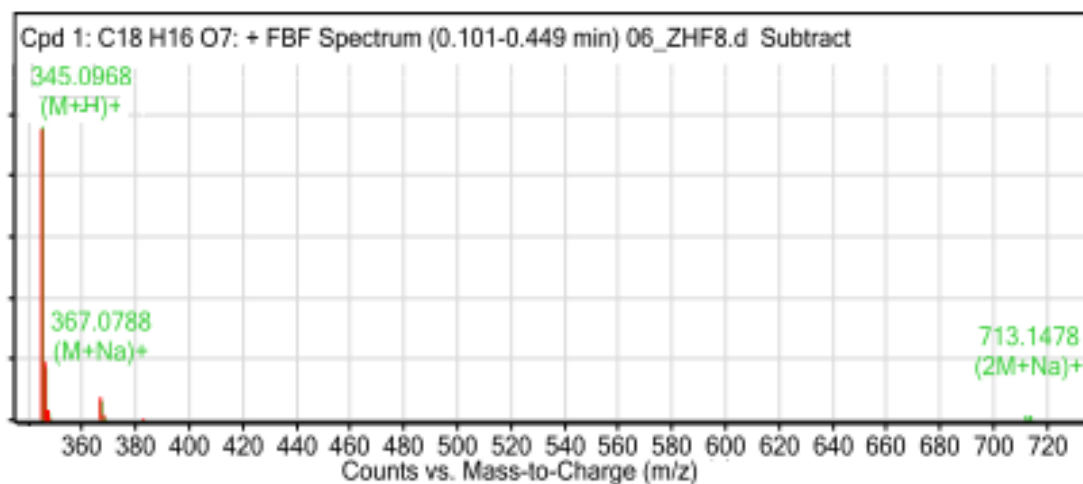


Figure IV.10: Structure préliminaire du composé 4

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode électrospray positif HRESI-QTOF-MS (Spectres :17 ; & Tableau IV.12) du composé **4**, montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 345,0968$ correspondant à $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{18}H_{17}O_7$: 345,0969) et des ions adduits à $m/z = 367,0788$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{18}H_{16}O_7Na$: 367,0788) ; 383,0537 $[M+K]^+$ (calculé pour $C_{18}H_{16}O_7K$: 383,0528) ; 689,1736 $[2M+H]^+$ (calculé pour $C_{36}H_{33}O_{14}$:

689,1865) ; 712,1717 [2M+Na]⁺ (calculé pour C₃₆H₃₂O₁₄Na : 712,1718) ; 727,1077 [2M+K]⁺ (calculé pour C₃₆H₃₂O₁₄K : 712,1424). Toutes ces données ajoutées à la valeur de la masse exacte mesurée : 344,0888 (calculée pour C₁₈H₁₆O₇: 344,0896), indiquent bien une formule brute C₁₈H₁₆O₇, soit une molécule renfermant 11 insaturations.



Spectre 17 : Spectre HR- QTOF-ESIMS (+) du composé 4

Tableau IV.12 : Liste des ions adduits HR- QTOF-ESIMS (+) du composé 4

MS Spectrum Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Ion
345.0968	1	96519.95	(M+H) ⁺
346.1001	1	17783.01	(M+H) ⁺
347.1022	1	2995.1	(M+H) ⁺
348.1045	1	476.61	(M+H) ⁺
362.0977	1	108.32	(M+NH ₄) ⁺
367.0788	1	7108.23	(M+Na) ⁺
368.0818	1	1484.71	(M+Na) ⁺
369.087	1	414.93	(M+Na) ⁺
383.0537	1	718.38	(M+K) ⁺
384.0562	1	190.96	(M+K) ⁺
689.1736	1	98.52	(2M+H) ⁺
706.204	1	120.38	(2M+NH ₄) ⁺
711.1687	1	2075	(2M+Na) ⁺
712.1717	1	921.63	(2M+Na) ⁺
713.1478	1	2207.6	(2M+Na) ⁺
714.1515	1	844.11	(2M+Na) ⁺
727.1077	1	139.48	(2M+K) ⁺

Tableau IV.13 : Calcul de la masse exacte du composé 4

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	MFG Formula	DB Formula
Cpd 1: C18 H16 O7	0.151	344.0888	96520	C18 H16 O7	344.0896	-2.26	C18 H16 O7	C18 H16 O7

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C18 H16 O7	345.0968	0.151	Find By Formula	344.0888

Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365$ nm), ce composé montre une fluorescence noir-violette orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR. Cette donnée additionnée aux résultats de la spectrométrie de masse indique un flavonoïde comportant 3 méthoxyles et 2 hydroxyles (Figure IV.11).

L'enregistrement des spectres d'absorption ultraviolette dans le méthanol en présence de réactifs spécifiques (Spectres 18 : 18-1 à 27-4 & Tableau IV.14) permet de relever les observations suivantes :

Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol (Spectre 18-1) donnant deux bandes d'absorption maximale, à 340 nm (bande I) et 276 nm (bande II) oriente vers la structure d'une flavone.

- l'addition de NaOH (Spectre 18-2) provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +20$ nm) avec un effet hypochrome, indique un 4'-OR.
- l'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\max} = 321$ nm dans ce spectre indique la présence d'un hydroxyle libre en position C-7.
- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ (Spectre 18-3) par rapport à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda = +21$ nm) indique la présence d'un OH libre en C-5 avec une oxygénation en position C-6.
- L'ajout de HCl dans l'échantillon contenant AlCl_3 ne donne aucun changement dans ce nouveau spectre par rapport à celui enregistré en présence d' AlCl_3 indique l'absence d'un système *ortho* di-OH dans cette molécule. Ces observations se

retrouvent bien dans la structure proposé notamment la présence d'un groupement méthoxyle en C-6 et d'un autre en C-4'.

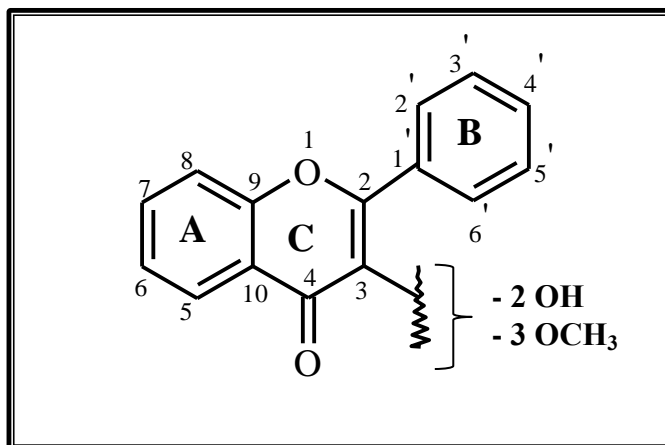
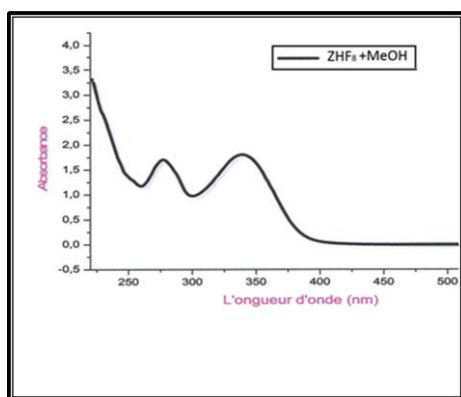
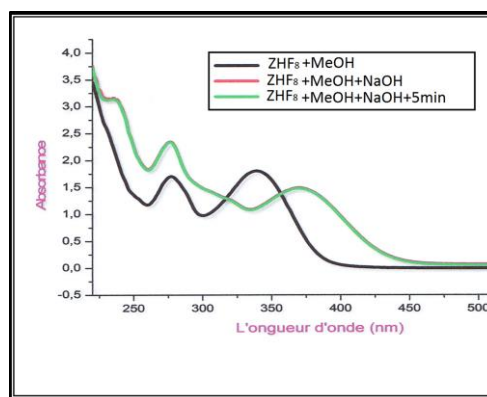
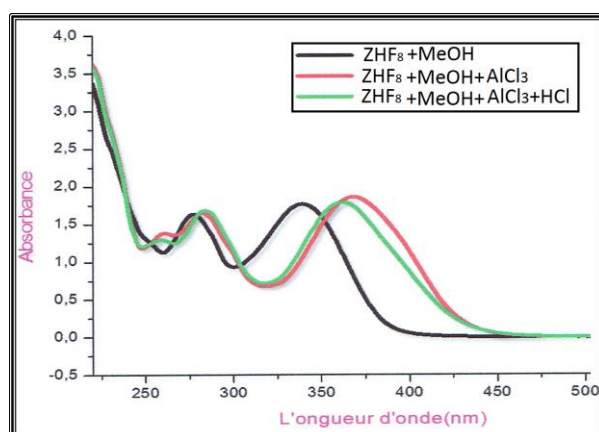
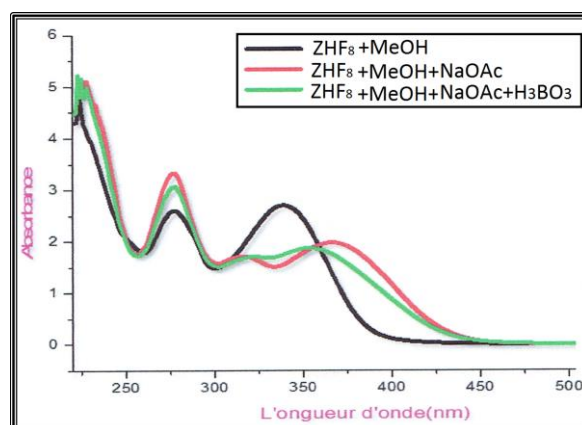


Figure IV.11 : Structure partielle du composé **4** selon HR- QTOF-ESIMS (+) et UV-Vis

Tableau IV.14 : Données (valeurs; λ_{\max} , nm) de la série spectrale UV-Vis du composé **4** (ZHF₈)

Réactifs	Bande I λ_{\max} (nm)	Bande II λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Commentaires
MeOH	340		+20	Flavone ou flavonol (3-OR)
+NaOH	360, effet hypochrome	276		4'-OR, Nouvelle bande à 321 nm 7-OH
+NaOAc	366	277	+1	7-OH, 6-OR
+NaOAc/H ₃ BO ₃	357	276		/
+AlCl ₃	368	282	+21	5-OH & 6-OR
+AlCl ₃ /HCl	361	283		
Spectre stable avec NaOH après 5mn				

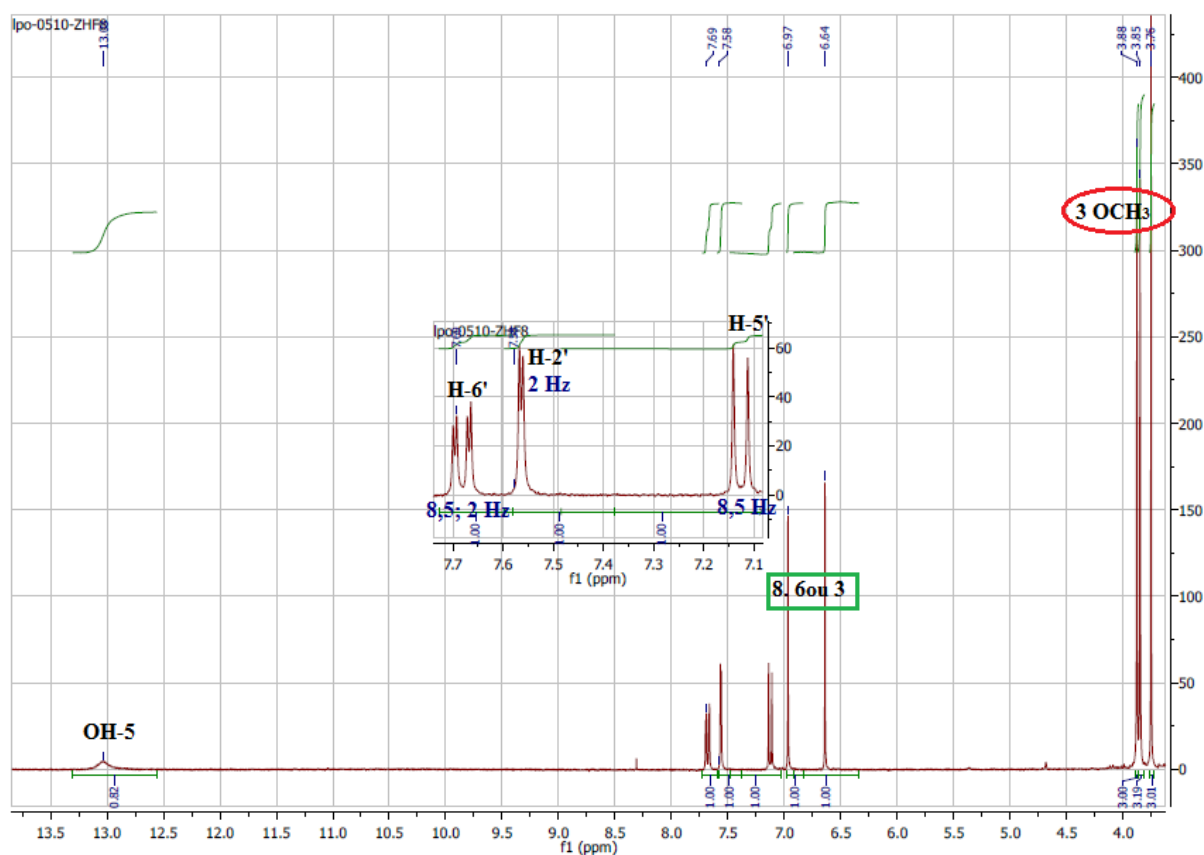
Spectre 18-1 : Spectre UV-Vis du composé **4** (MeOH)Spectre 18-2 : Spectre UV-Vis du composé **4** (MeOH+NaOH)Spectre 18-3 : Spectre UV-Vis du composé **4** (MeOH+AlCl₃) ; MeOH+AlCl₃+HCl)Spectre 18-4 : Spectre UV-Vis du composé **4** (MeOH+NaOAc ; MeOH+ NaOAc +H₃BO₃)

Spectres 18: Série spectrale UV-Visible du composé **4** (ZHF₈)

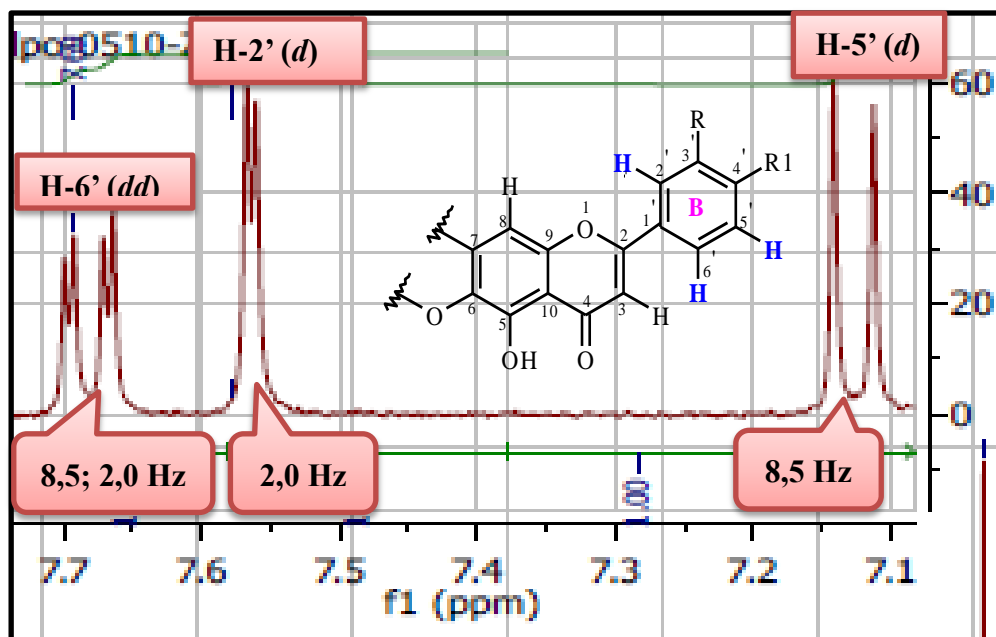
L'examen des spectres RMN (RMN- ^1H) (Spectres 19, 19-1) de ce composé, montre des signaux qui confirment bien l'existence d'un squelette flavonoïde. En effet, l'examen du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 20) montre que le signal correspondant à un proton à $\delta_{\text{H}} = 13,04$ ppm (s) ne corrélant à aucun des carbones de la molécule est bien attribuable à OH-5.

Par ailleurs, on relève les signaux :

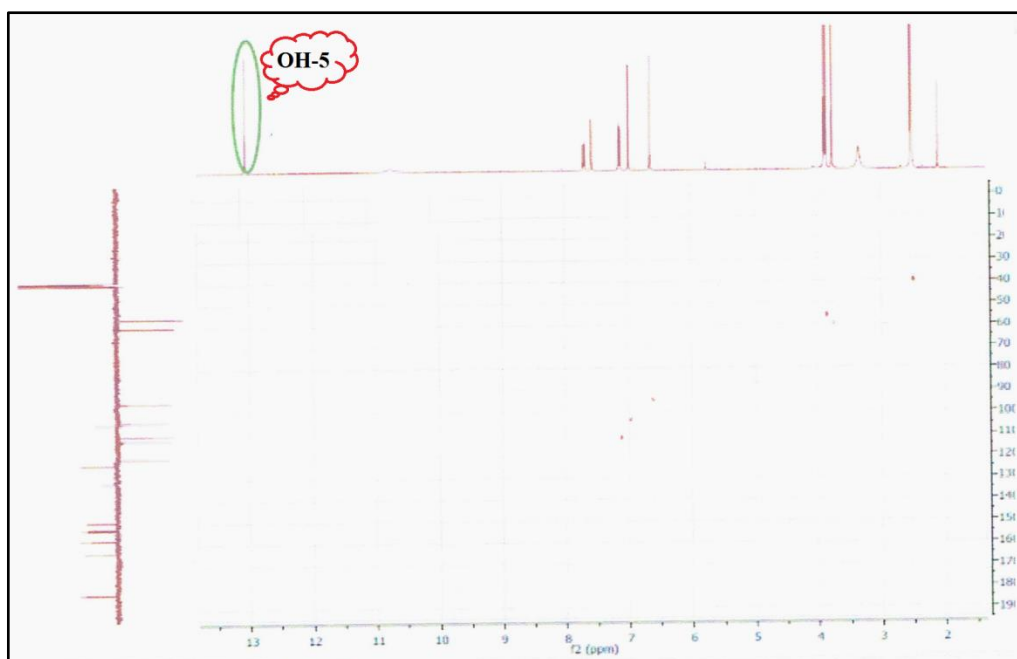
- un doublet de doublets (*dd*) d'intégration 1H, à δ_{H} 7,68 ppm ($J = 8,5 ; 2,0$ Hz) attribuable à H-6' du cycle B.
- un doublet (*d*) d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,56$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-2'.
- un doublet (*d*) d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,13$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5'.
- deux singulets (*s*) d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,97$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,64$ attribuables soit à H-3 et H-6, soit à H-3 et H-8. Cette observation indique qu'il s'agit d'une flavone.
- trois singulets (*s*) d'intégration 3H chacun à ($\delta_{\text{H}} = 3,88 ; 3,85 ; 3,75$) confirmant la présence des trois groupements méthoxyles (3 OCH₃).



Spectre 19: Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé 4 (ZHF₈)

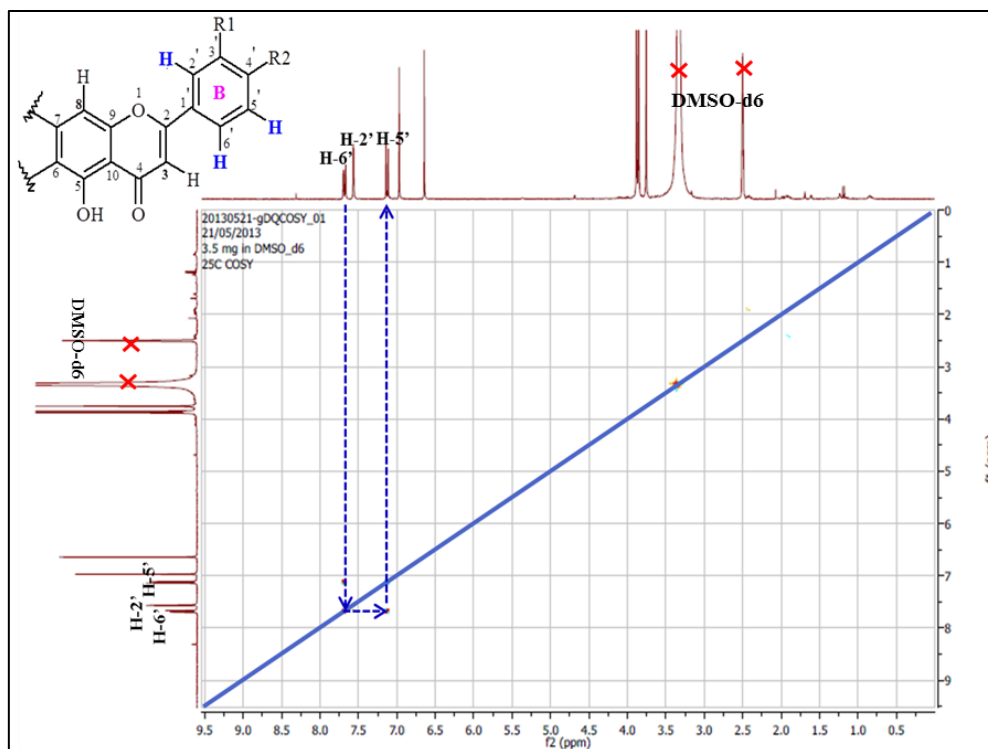
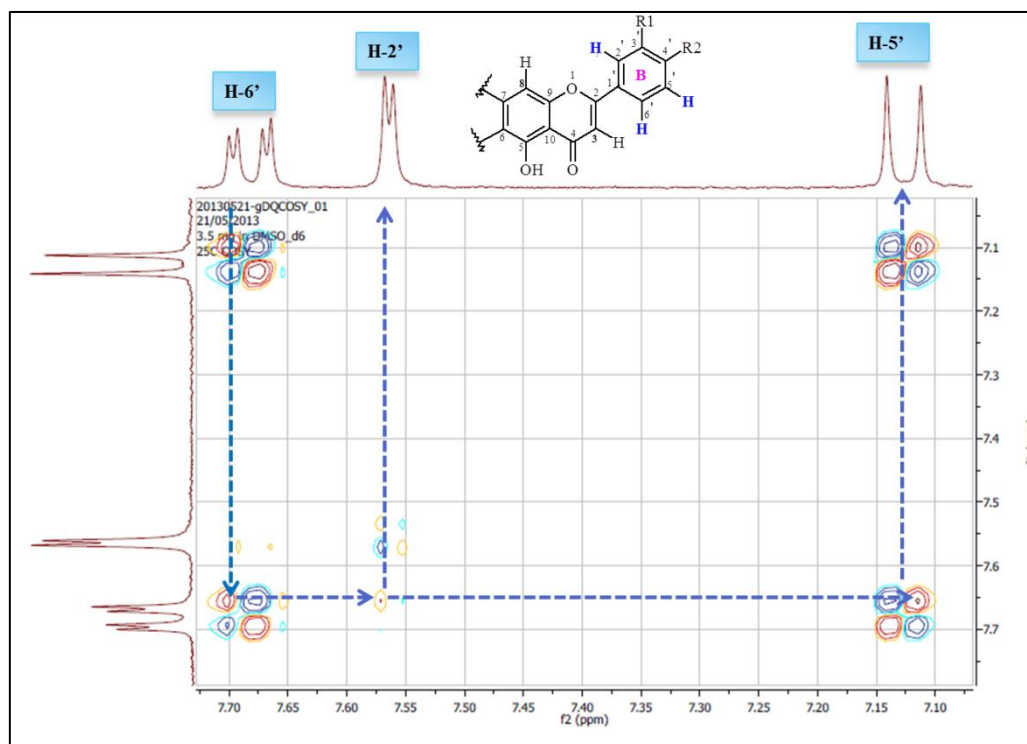


Spectre 19-1: Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈), étalement



Spectre 20: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈)

- L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 21) confirme bien nos attributions par une tache de corrélation entre le proton H-6' et le proton H-2' (couplage *mé*ta) et une tache de corrélation entre le proton H-6' et le proton H-5' (couplage *ortho*).

Spectre 21: COSY (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈)Spectre 21-1: COSY (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈), étalement

Ainsi, le cycle B de ce flavonoïde est substitué dans les positions C-3' et C-4' (Figure IV.12)

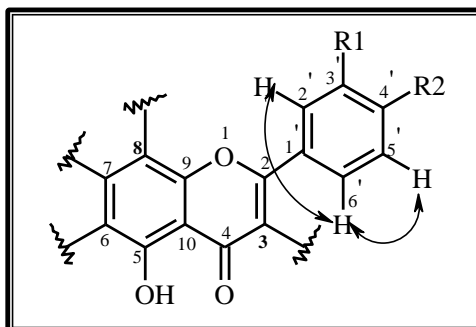
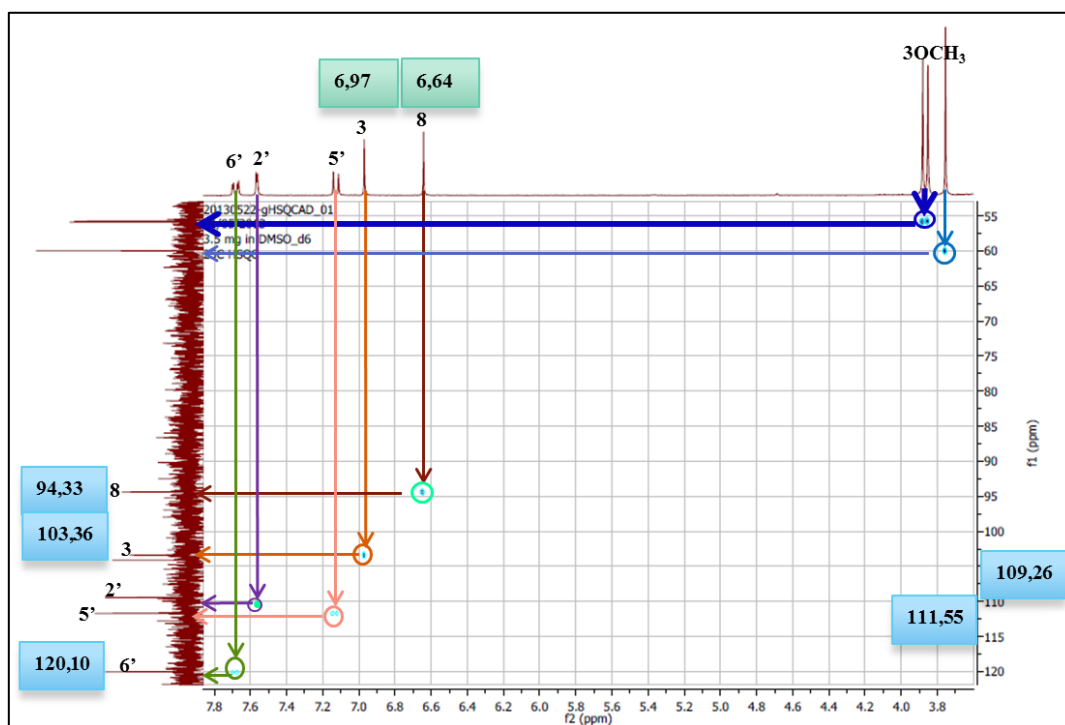
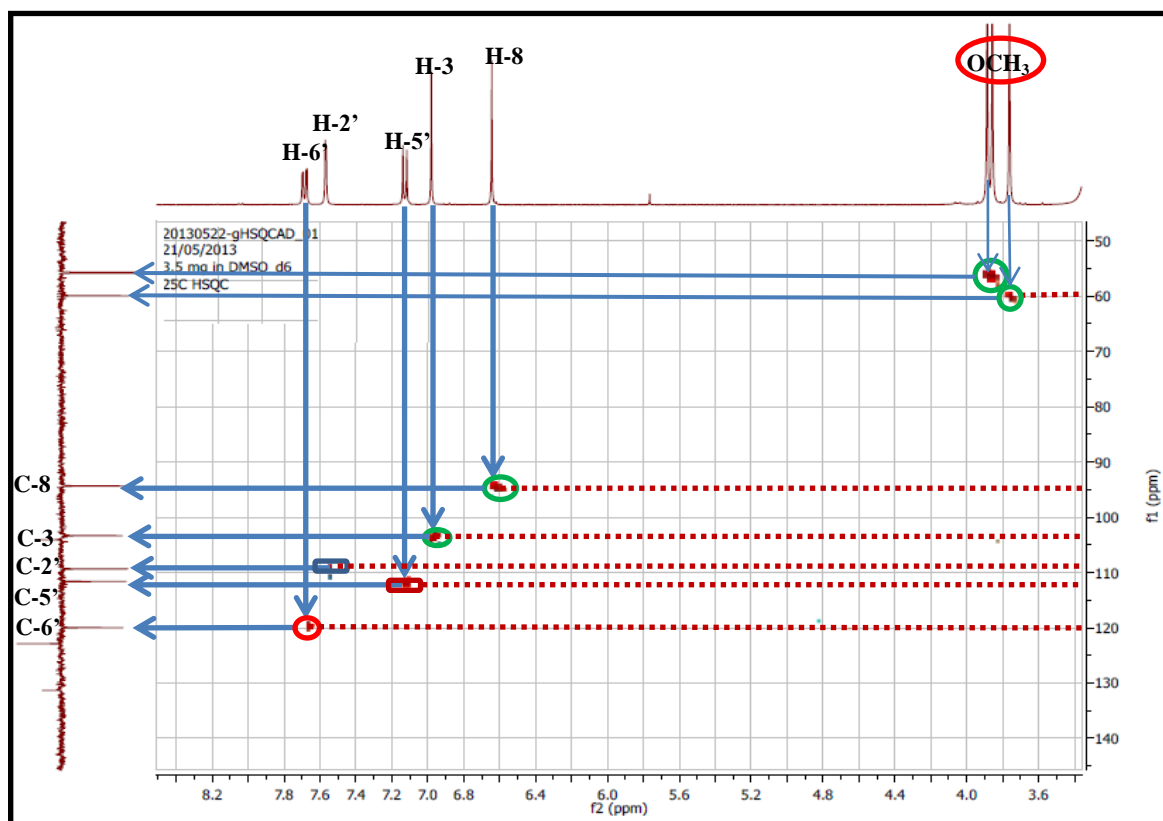


Figure IV.12 : Structure partielle du composé 4

L'examen du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectres 20-1, 20-2) montre que le proton à $\delta_H = 6,64$ ppm corrèle avec le carbone à $\delta_C = 94,33$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique qu'il s'agit du C-8. De ce fait, ce proton sera attribué à H-8. Bien entendu le proton résonant à $\delta_H = 6,97$ ppm sera attribué à H-3. Ce spectre (HSQC) permet alors de localiser C-3 à $\delta_C = 103,36$ ppm. Ce spectre permet également de localiser le C-6' à $\delta_C = 120,10$ ppm, C-5' à $\delta_C = 111,55$ ppm, C-2' à $\delta_C = 109,26$ ppm.

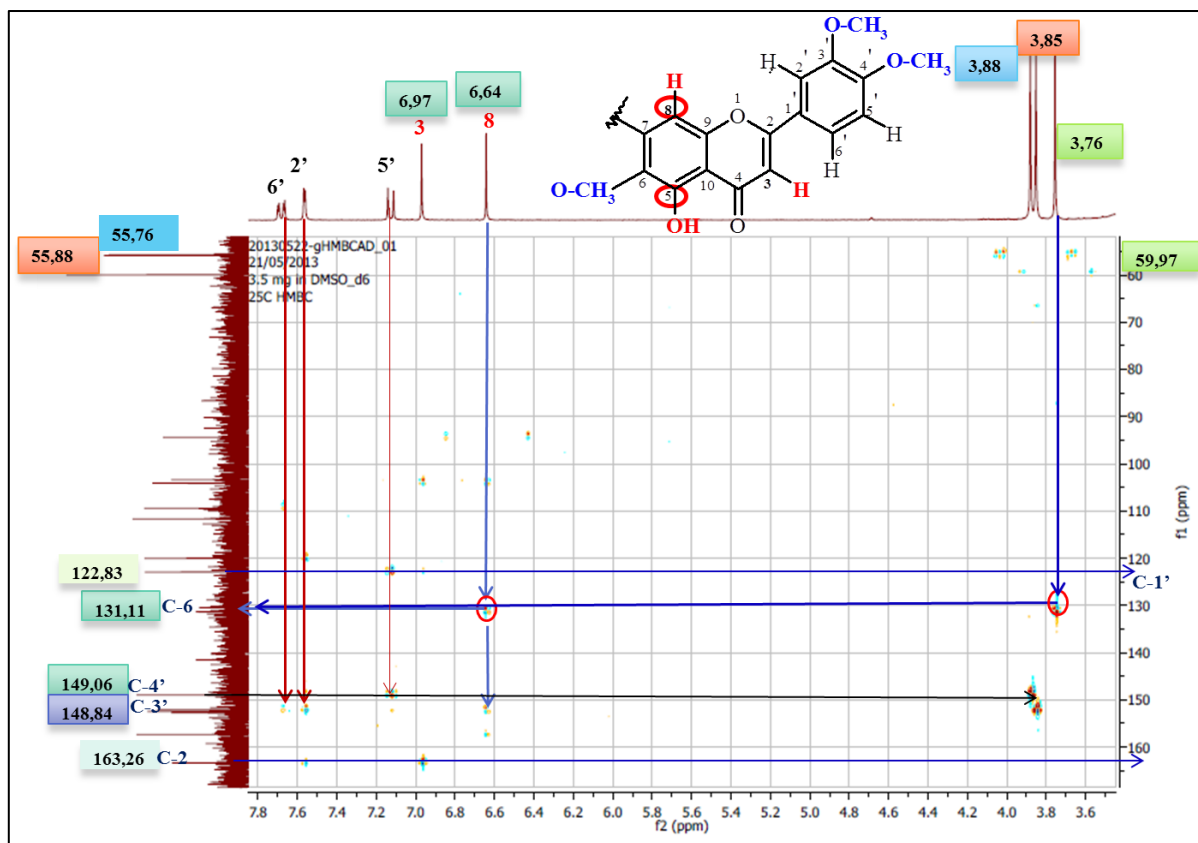


Spectre 20-1: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé 4 (ZHF₈), étalement



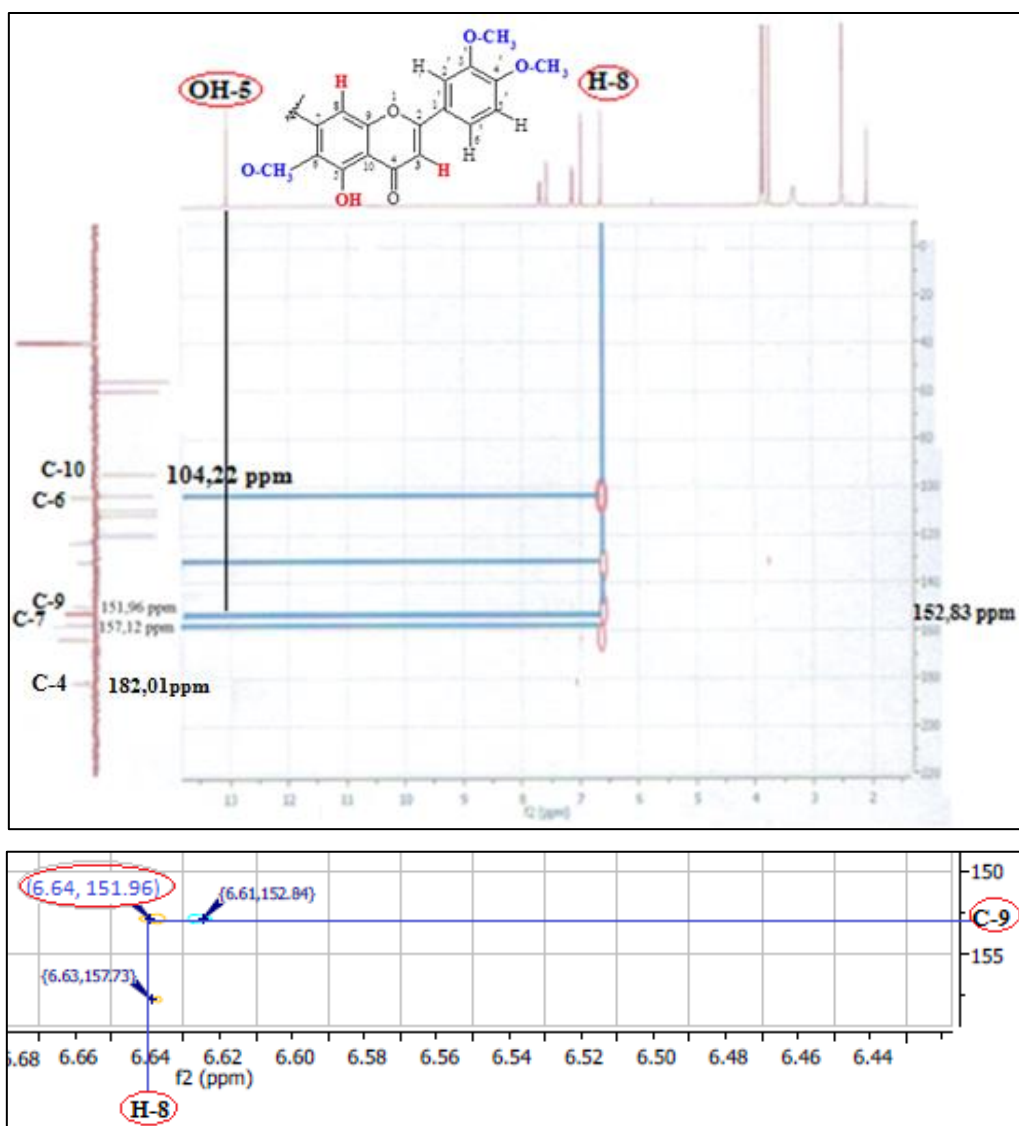
Spectre 20-2: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 4 (ZHF8), étalement

Le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 21-1) montre une tache de corrélation nette entre le proton H-8 et le carbone quaternaire à $\delta_c = 131,11$ ppm ne pouvant être attribué qu'au C-6. Sur le même spectre ce carbone (C-6) montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à $\delta_H = 3,76$ ppm ($\delta_c = 59,97$ ppm) permettant ainsi de placer ce méthoxyle en cette position. Toujours sur le même spectre, les protons H-2', H-5' et H-6' montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné à $\delta_c = 149,06$ ppm ne pouvant être attribué qu'au C-4'. Ce carbone montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à $\delta_H = 3,85$ ppm ($\delta_c = 55,88$ ppm) permettant ainsi de placer ce méthoxyle en cette position (C-4'), on observe également des taches de corrélations entre les protons H-2' et H-5' et le carbone quaternaire aromatique oxygéné à $\delta_c = 148,84$ ppm ne pouvant être attribué qu'au C-3'. Ce carbone montre à son tour une tache de corrélation avec les protons du 3^{ème} méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,88$ ppm ($\delta_c = 55,76$ ppm) permettant ainsi de placer ce méthoxyle en cette position (C-3').

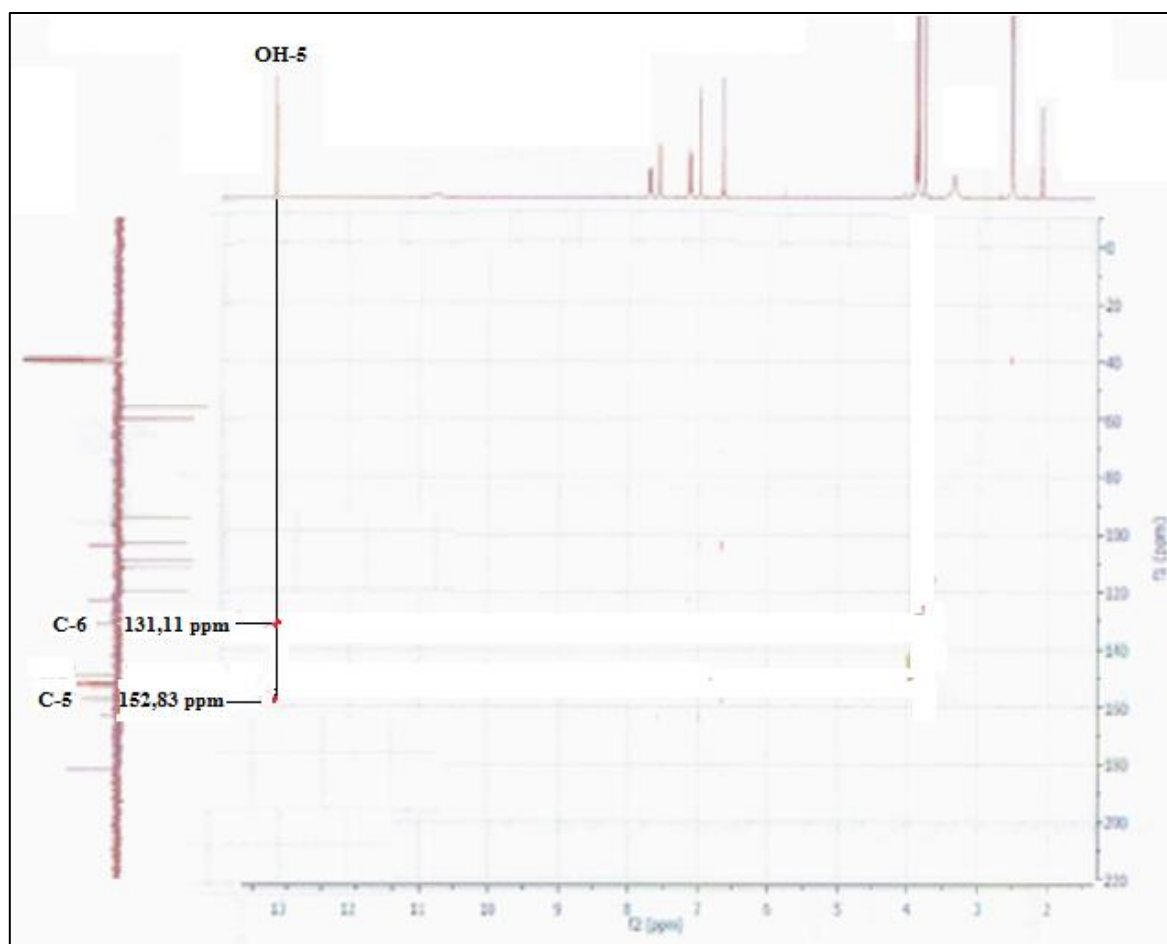


Spectre 21-1: Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈), étalement

Le spectre HMBC (Spectres 21, 21-3) montre également des taches de corrélations entre le proton H-8 et le proton du OH-5 et le carbone quaternaire aromatique non oxygéné à $\delta_c = 104,18$ ppm que nous pouvons alors attribuer qu'au C-10. Le proton du OH-5 montre également une corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné à $\delta_c = 152,83$ ppm attribuable au C-5, la corrélation observée entre ce proton et le carbone à 131,11 ppm confirme l'attribution de C-6. Par ailleurs ce spectre permet de localiser C-9 à $\delta_c = 151,96$ ppm grâce à sa corrélation avec H-8 (Spectre 21-2) ; C-2 à $\delta_c = 163,26$ ppm grâce à ses corrélations avec H-2', H-6' et H-3 ; C-1' à $\delta_c = 118,83$ ppm grâce à ses corrélations avec H-2', H-5', H-6' et H-3 ; C-7 à $\delta_c = 157,12$ ppm grâce à sa corrélation avec H-8 et la valeur de son déplacement chimique et enfin C-4 à $\delta_c = 182,01$ ppm grâce à sa corrélation avec H-3 et la valeur de son déplacement chimique.

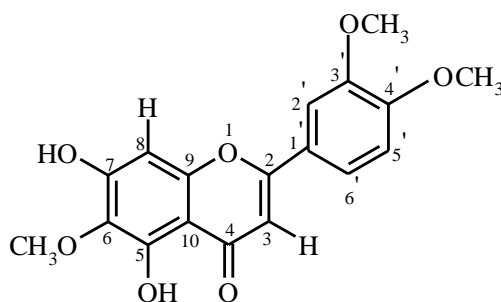


Spectres 21 ; 21-2: Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé 4 (ZHF₈), étalement



Spectre 21-3: Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈)

Toute cette analyse mène à la structure reportée dans la figure (Figure IV.13)

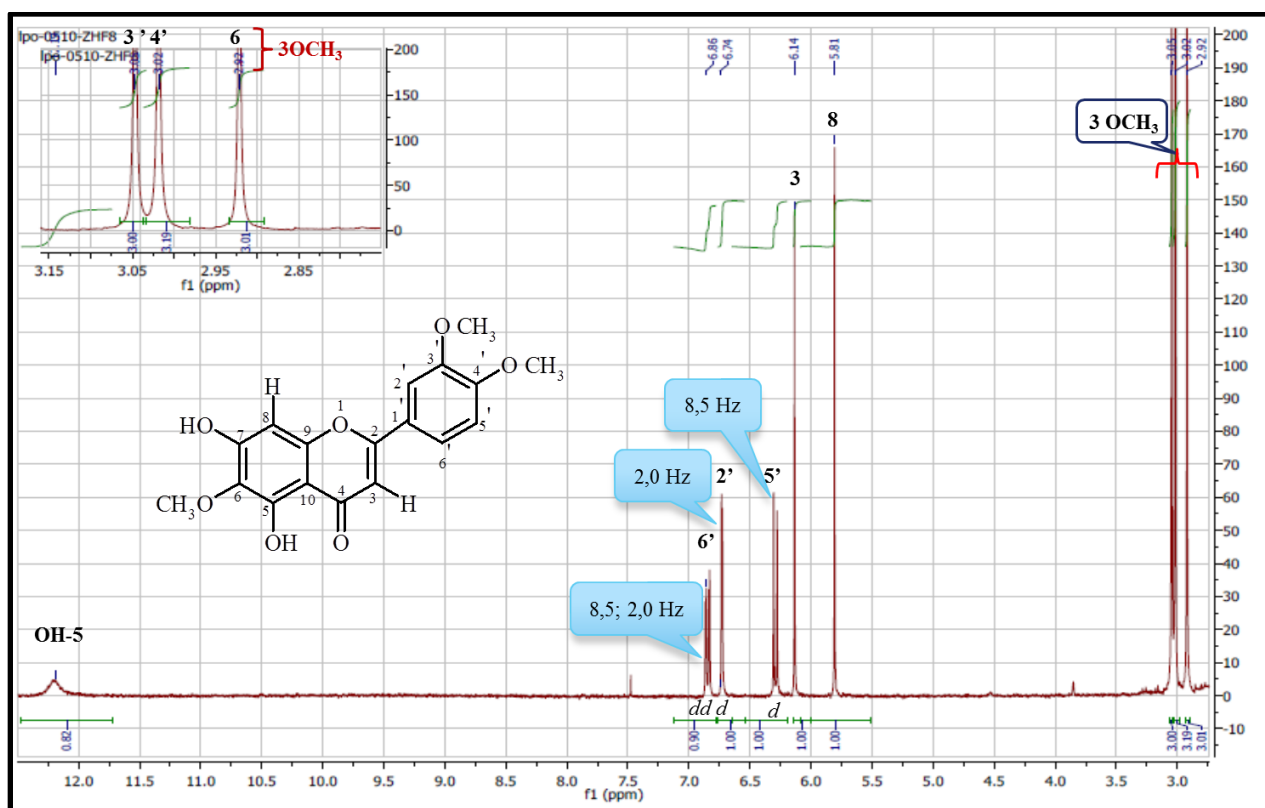


4

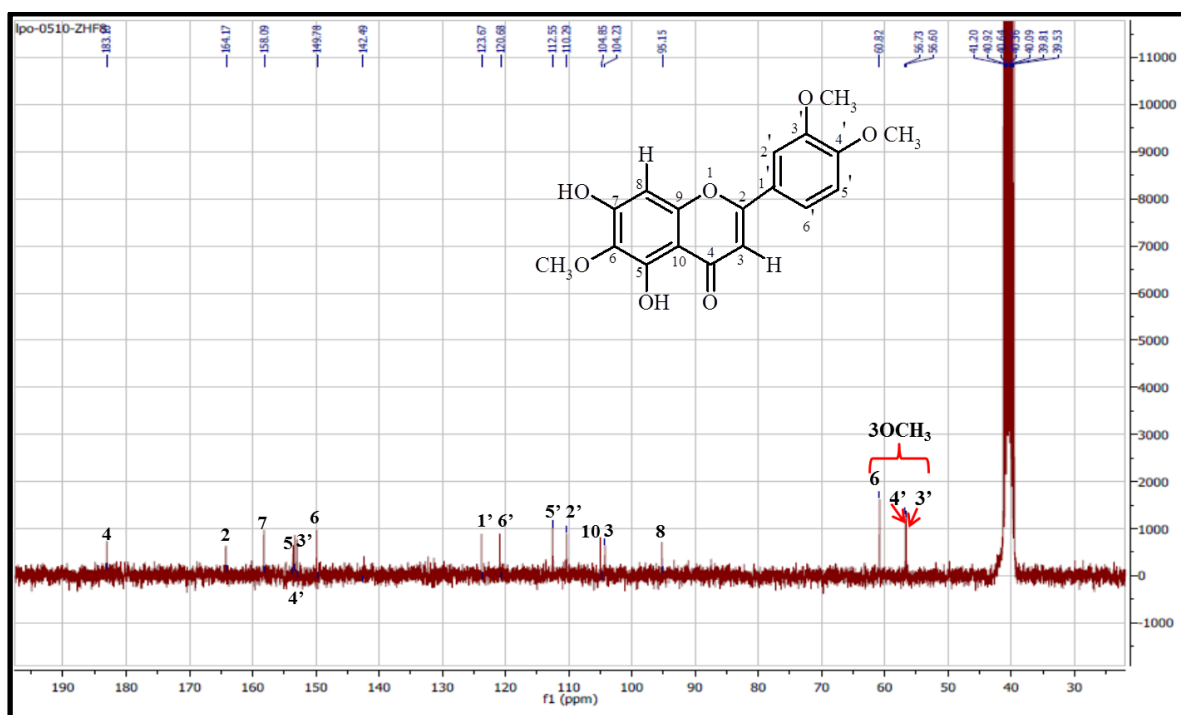
Figure IV.13: Eupatiline

Cette flavone est connue sous le nom d'Eupatiline.

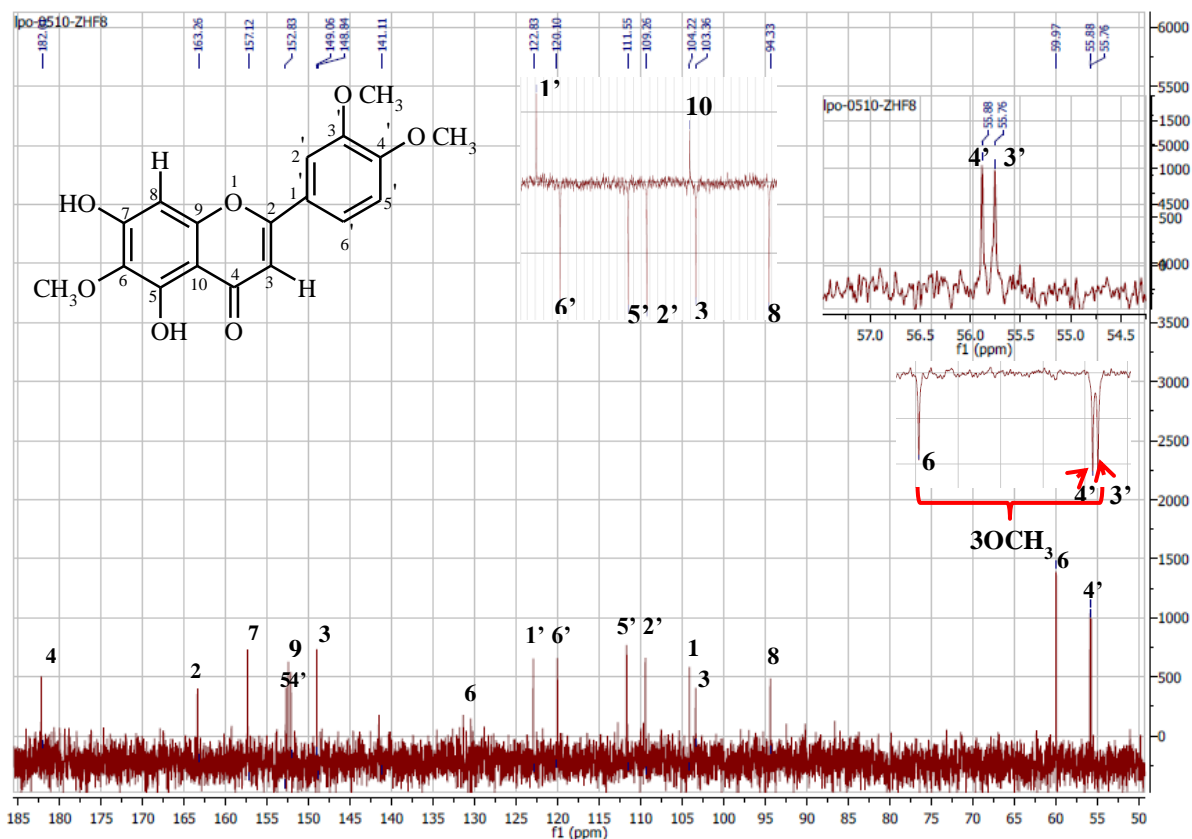
L'ensemble des données spectroscopiques de RMN (^1H & ^{13}C) sont reportées sur les spectres correspondants (Spectres 22, 23 et 24) et tableau IV.15.



Spectre 22 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈)



Spectre 23 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé **4** (ZHF₈)



Spectre 24 : Spectre RMN¹³C, J mod (100 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé 4 (ZHF₈)

Tableau IV.15: Les données spectroscopiques de la RMN¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) de l'Eupatiline.

¹ H Attribution	Intégration	HMBC [‡]	δ _H (ppm)	Multiplicité	J (Hz)
5	1H		13,04	Br s	/
6'	1H	1',5'	7,68	dd	8,5; 2,0
2'	1H	1, 2, 4	7,56	d	2,0
5'	1H	2	7,13	d	8,5
3	1H	1, 2, 4	6,97	s	/
8	1H	9, 7, 4	6,64	s	/
3'-OCH ₃	3H	3',4',5'	3,88	s	/
4'-OCH ₃	3H	6,5,7	3,85	s	/
6-OCH ₃	3H	3',2',4'	3,76	s	/

[‡] : Spectre enregistré à 400 MHz.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la (Figure IV.13), c'est la Flavone :

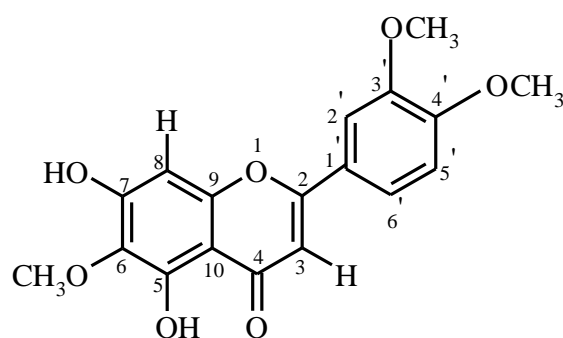
- ✓ 5,7-dihydroxy-3',4',6-trimethoxy-5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone;
- ✓ 5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone.
- ✓ Eupatiline.

Tableau IV.16: Les données spectroscopiques de la RMN¹³C (DMSO-d₆, 75 MHz) de l'Eupatiline.

¹³ C ^{&}	HSQC [‡]	δ (ppm)
4	C	182,01
2	C	163,26
7	C	157,12
5	C	152,83
9	C	151,96
4'	C	149,06
3'	C	148,84
6	C	131,11
1'	C	118,83
6'	CH (sp ²)	120,10
5'	CH (sp ²)	111,55
2'	CH (sp ²)	109,26
10	C	104,18
3	CH (sp ²)	103,36
8	CH (sp ²)	94,33
OCH ₃ -6	CH ₃ (sp ³)	59,97
OCH ₃ -4'	CH ₃ (sp ³)	55,88
OCH ₃ -3'	CH ₃ (sp ³)	55,76

& : Spectre enregistré à 300 MHz.

‡ : Spectre enregistré à 400 MHz.



4

Figure IV.13: Eupatiline

La molécule est également connue sous les noms suivants selon IUPAC :

- ✓ Flavone, 5,7-dihydroxy-3',4',6-trimethoxy .
- ✓ 5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone;
- ✓ Eupatilin; NSC 118413;
- ✓ Stillen.

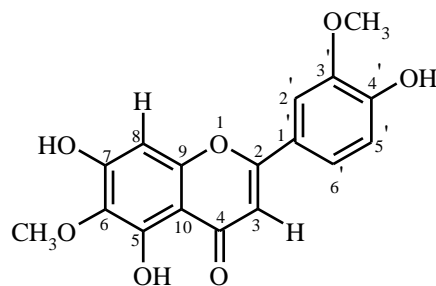
La littérature mentionne la présence de ce flavonoïde dans le genre *Centaurea* (Asteraceae).

Il a été isolé de: *C. calcitrapa* [42] ; *C. parviflora* [43] ; *C. spruneri* Boiss. & Heldr. [44] ; *C. arenaria* [45] ; *C. cuneifolia* [46]; *C. cineraria* subsp. *Umbrosa* [47] ; *C. alexandrina* [48] ; *C. rothmalerana* [49]

Elle a été isolée pour la 1^{ère} fois de l'espèce étudiée. Chez la même famille, cette substance a été identifiée chez une plante coréenne *Artemisia princeps Pampanini* [50]. Des propriétés anti-inflammatoires ont été attribuées à ce flavonoïde [51].

Cependant cette molécule était presque inactive contre les enzymes acétylcholinestérase AChE, alors qu'il a montré une bonne inhibition de la butyrylcholinestérase BChE [52] .

IV.6. Elucidation structurale du composé 5 (ZH10)

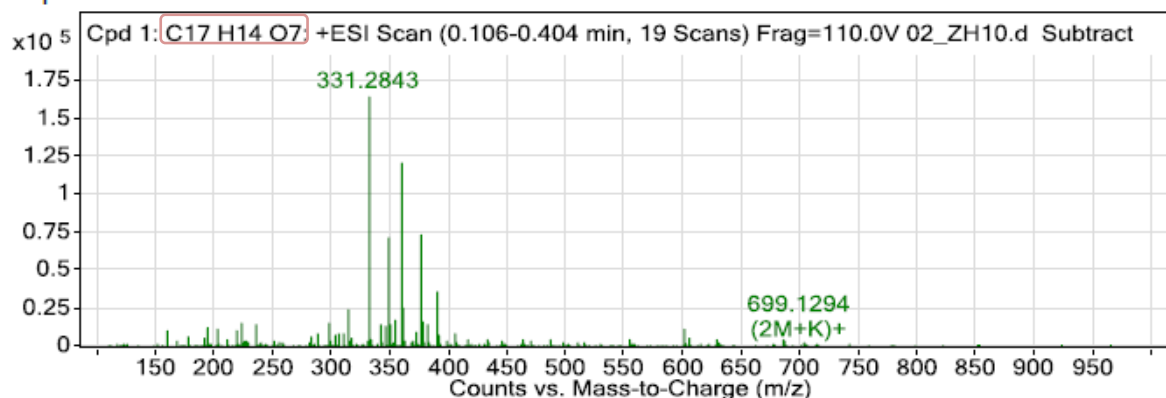


5

Le composé **5** se présente sous forme de poudre de couleur jaunâtre, soluble dans le méthanol, son point de fusion PF = 237°C. Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (chromatographie sur papier Whatman N°1) avec AcOH à 15 % comme éluant (0,09) et avec le solvant de Partridge « Phase de Partridge : *n*-butanol/AcOH/Eau (BAW) 4 :1:5 v/v (0,88) [53], nous constatons clairement qu'il s'agit d'un flavonoïde de type aglycone.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif HRESI-QTOF-MS (Spectre 25 et Tableau IV.17) montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 331,0811$ correspondant à $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{17}H_{15}O_7$: 331,0812) et des pics d'ions adduits à $m/z = 353,0625$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{17}H_{14}O_7Na$: 353,0632) ; 383,0537 $[M+K]^+$ (calculé pour $C_{18}H_{16}O_7K$: 383,0528) ; 689,1736 $[2M+H]^+$ (calculé pour $C_{36}H_{33}O_{14}$: 661,1552), 661,1542 $[2M+ H]^+$ (calculé pour $C_{34}H_{29}O_{14}$: 712,1718); 683,1485 $[2M+ Na]^+$ (calculé pour $C_{34}H_{28}O_{14}Na$: 683,1371) ; 701,0942 $[2M+K]^+$ (calculé pour $C_{34}H_{28}O_{14}K$: 701,1137); 991,2454 $[3M+H]^+$ (calculé pour $C_{51}H_{43}O_{21}$: 991,2291). Le calcul de la masse exacte (Tableau IV.17) donne $m/z = 330,0744$, (calculé pour $C_{17}H_{14}O_7$: 330,0740). Toutes ces données sont en faveur d'une formule brute $C_{17}H_{14}O_7$, soit une molécule renfermant 11 degrés d'insaturation. Exposé à la lumière de la lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm), ce composé montre une fluorescence noir-violette orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR. Cette donnée additionnée aux résultats de la spectrométrie de masse indique un flavonoïde comportant 2 groupements méthoxyles et 3 groupements hydroxyles.

MS Spectrum



Spectre 25: Spectre HRESI-QTOF-MS (+) du composé 5

Tableau IV.17: Données liste des pics quasi-moléculaires du composé 5

MS Spectrum Peak List

<i>m/z</i>	<i>Calc m/z</i>	Diff(ppm)	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
330.0679	330.0734	-16.57	1	774.85	C17H14O7	M*+
331.0811	331.0812	-0.3	1	129519.85	C17H15O7	(M+H)+
331.2843				165114.3		
332.0866	332.0846	5.84	1	23690.85	C17H15O7	(M+H)+
333.0905	333.0868	10.93	1	3898.12	C17H15O7	(M+H)+
334.108	334.0895	55.39	1	833.77	C17H15O7	(M+H)+
353.0625	353.0632	-1.89	1	1923.55	C17H14NaO7	(M+Na)+
354.0647	354.0666	-5.31	1	573.69	C17H14NaO7	(M+Na)+
355.0703	355.0688	4.13	1	879.82	C17H14NaO7	(M+Na)+
661.1542	661.1552	-1.43	1	134.78	C34H29O14	(2M+H)+
662.1564	662.1586	-3.35	1	97.2	C34H29O14	(2M+H)+
678.1754	678.1817	-9.41	1	109.99	C34H32NO14	(2M+NH4)+
683.1485	683.1371	16.69	1	199.56	C34H28NaO14	(2M+Na)+
699.1294	699.1111	26.27	1	1052.58	C34H28KO14	(2M+K)+
700.1234	700.1145	12.75	1	444.14	C34H28KO14	(2M+K)+
701.0942	701.1137	-27.93	1	183.25	C34H28KO14	(2M+K)+
991.2454	991.2291	16.38	1	59.54	C51H43O21	(3M+H)+
992.2565	992.2325	24.15	1	40.89	C51H43O21	(3M+H)+

Tableau IV.18 : Calcul de la masse exacte du composé 5

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	MFG Formula	DB Formula
Cpd 1: C17 H14 O7	0.156	330.0744	129520	C17 H14 O7	330.074	1.48	C17 H14 O7	C17 H14 O7

Compound Label	<i>m/z</i>	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C17 H14 O7	331.0811	0.156	Find By Formula	330.0744

Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol (Spectre 27-1) donnant deux bandes d'absorption maximale, la bande I à $\lambda_I = 346$ nm maximale et la bande II à $\lambda_{II} = 276$ nm oriente vers la structure d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR (Figure IV.14).

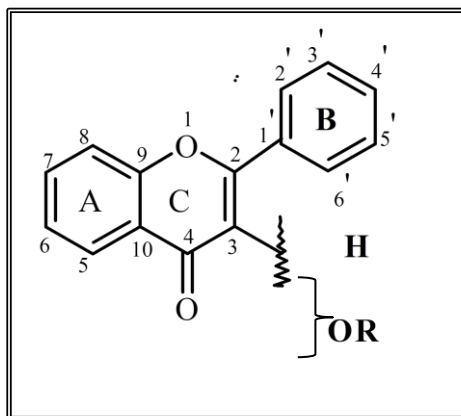
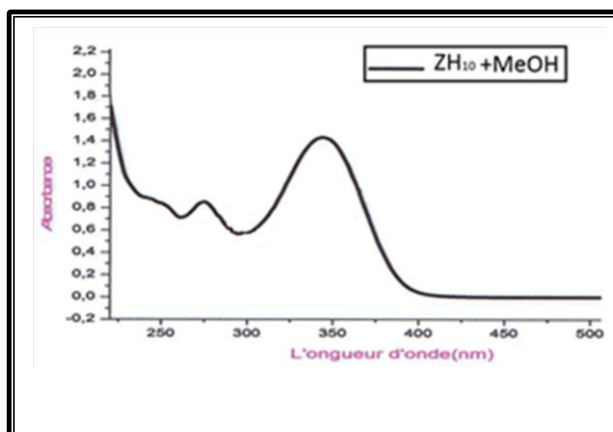


Figure IV.14: Structure préliminaire du composé 5

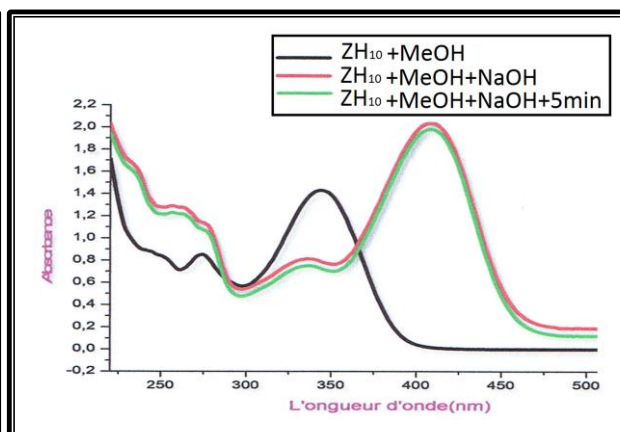
L'enregistrement des spectres d'absorption ultraviolette dans le méthanol en présence de réactifs spécifiques (Spectres 26-2 à 26-4 et Tableau IV.21) permet de relever les observations suivantes :

- L'addition du réactif NaOH, provoquant un déplacement bathochrome de ($\Delta\lambda_I = + 63$ nm) de la bande I, avec un effet hyperchrome indique la présence d'un OH libre en position 4' (4'-OH) [54]. L'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{n\ max} = 332$ nm dans ce spectre indique la présence d'un hydroxyle libre (OH) en position C-7 (7-OH).
- La comparaison du spectre enregistré après addition de $AlCl_3+HCl$ et celui enregistré après addition de $AlCl_3$ ne montrant aucune différence notable ($\Delta\lambda = +7$ nm) entre les deux spectres, indique l'absence de groupements *ortho* di-OH sur le noyau B [54]. La comparaison du spectre en présence de $AlCl_3+HCl$ et celui enregistré dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +15$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en C-6 [55,56].
- Le spectre enregistré de NaOAc montre un faible déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +2$ nm) confirmant ainsi un OH libre en position C-7 et une oxygénation en C-6 [57]. Le spectre de cet échantillon après addition de H_3BO_3 ne montrant aucun déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirme l'absence de groupements *ortho* di-OH dans cette molécule.

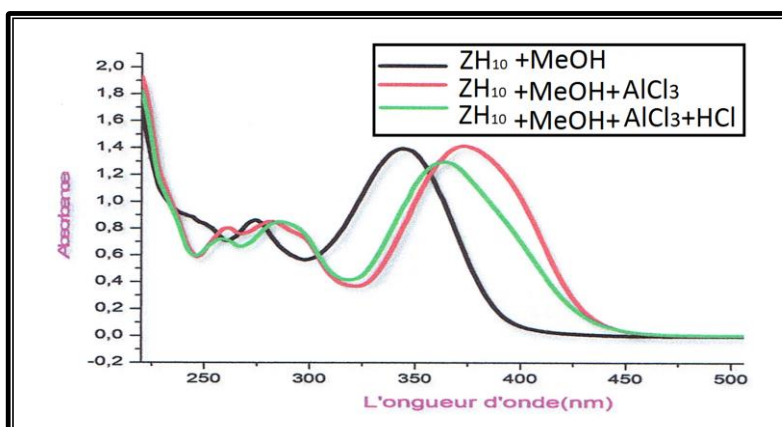
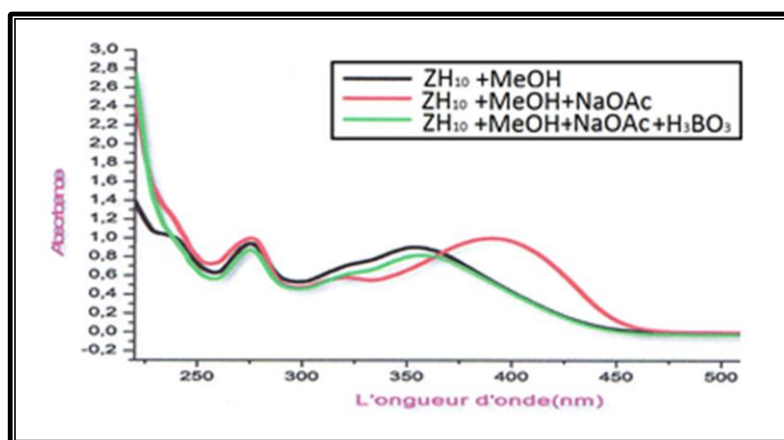
- L'ensemble de ces données mènent à la structure partielle reportée dans la Figure IV.14. Nous pouvons d'ores et déjà placer un groupement méthoxyle en C-6 vu les résultats de la spectrométrie de masse et le fait que cette molécule ne comporte pas de systèmes *ortho* di-OH.



Spectre 26-1 : Spectre UV-Vis du composé 5 (MeOH)



Spectre 26-2 : Spectre UV-Vis du composé 5 (MeOH+NaOH)

Spectre 26-3 : Spectre UV-Vis du composé 5 (MeOH+AlCl₃) ; MeOH+AlCl₃+HCl)Spectre 26-4 : Spectre UV-Vis du composé 5 (MeOH+NaOAc ; MeOH+ NaOAc +H₃BO₃)

Spectres 26 : Série spectrale UV-Vis du composé 5

Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le Tableau IV.19 & (Figure IV.15).

Tableau IV.19 : Données (valeurs; λ_{\max} , nm) de la série spectrale UV-Vis du composé **5** (ZH10)

Réactifs	Bande I λ_{\max} (nm)	Bande II λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Commentaires
MeOH	346	276	+63	Flavone ou flavonol (3-OR)
+NaOH	409	276		4'-OH libre, Nouvelle bande à 332 nm 7-OH
+NaOAc	366	278	+2	7-OH avec 6-OR
+NaOAc/H ₃ BO ₃	357	276		/
+AlCl ₃	368	282	+7 +15	Absence de système orthodi-OH ; 6-OR ; 5-OH
+AlCl ₃ /HCl	361	283		
Spectre stable avec NaOH après 5mn				

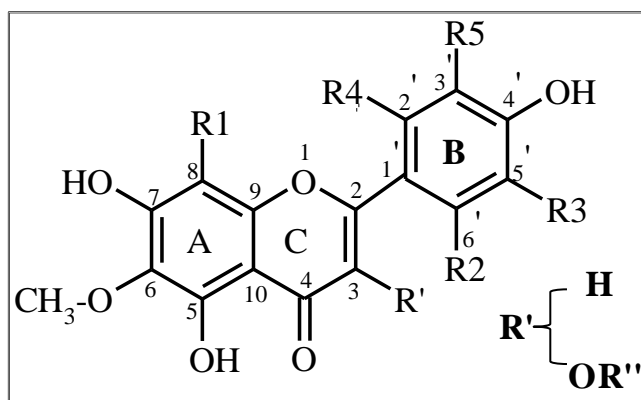
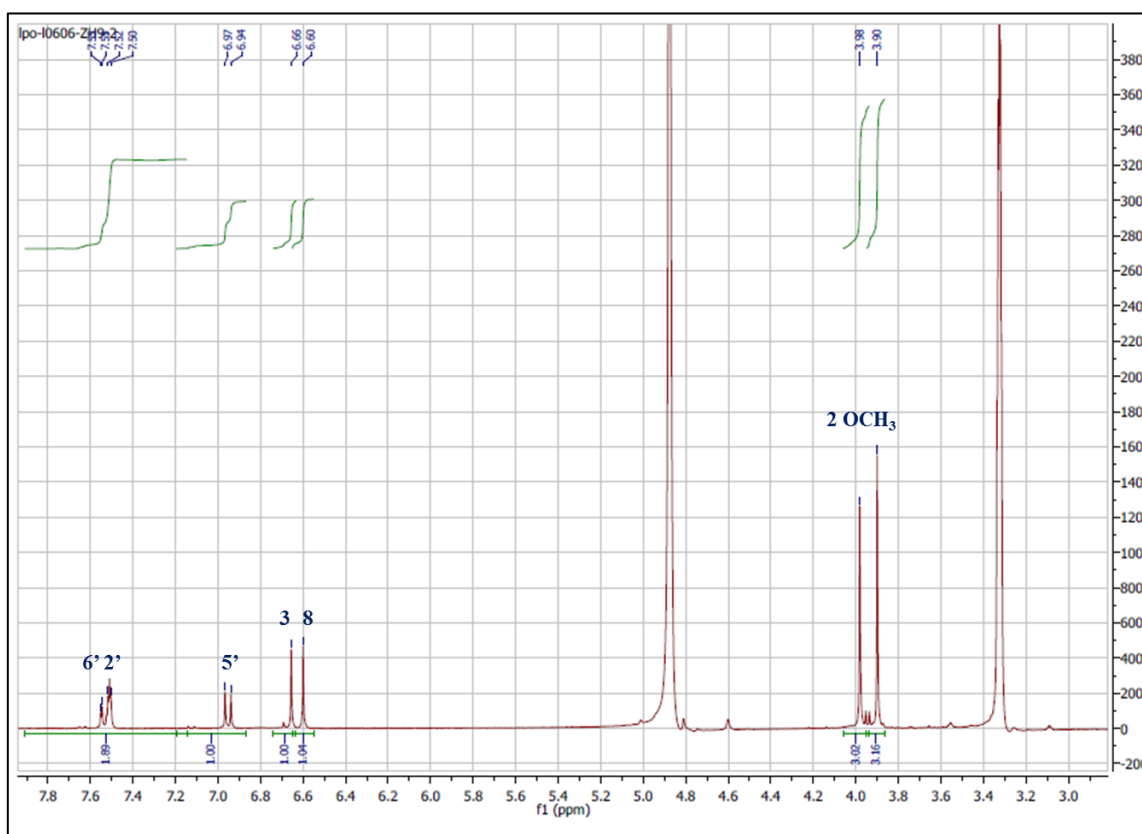


Figure IV.15: Structure partielle du composé **5** selon les données UV-Vis

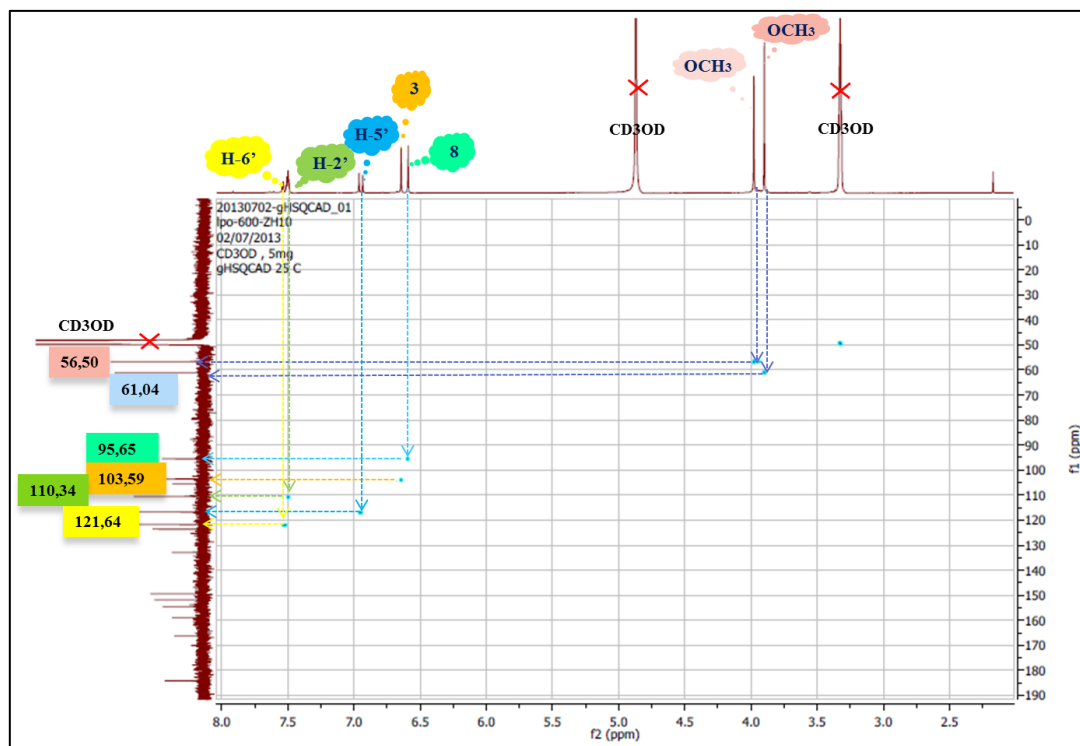
L'examen du spectre RMN ¹H enregistré à 400 MHz dans CD₃OD (Spectre 27) de ce composé, montre qu'il s'agit bien d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par :

- Un signal d'intégration 2H composé d'un doublet de doublets (*dd*) à δ_{H} 7,54 ppm ($J = 8,5$; 2,0 Hz) partiellement recouvert par un doublet à δ_{H} 7,52 ppm ($J = 2,0$ Hz). Ces deux noyaux sont attribuables à H-6' et H-2', respectivement, du cycle B.
- Un doublet (*d*) d'intégration 1H, à δ_{H} = 6,95 ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5' du cycle B.

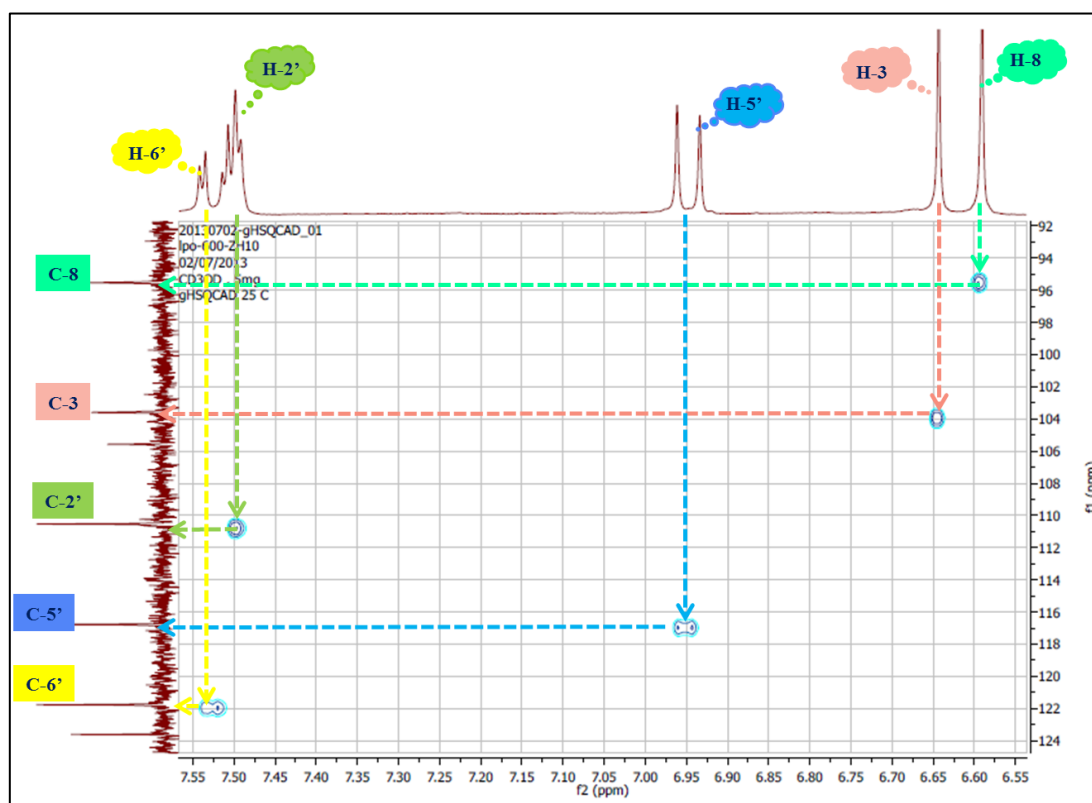
- Deux singulets intégrant chacun pour un proton à $\delta_H = 6,66$ ppm et $\delta_H = 6,60$ ppm attribuables à H-3 et à H-8, respectivement. Ces attributions ont été effectuées sur la base de l'analyse du spectre HSQC (Spectre 28) où l'on relève une corrélation entre le proton à $\delta_H 6,66$ ppm et le carbone à $\delta_C = 103,59$ ppm dont la valeur du déplacement chimique ne peut correspondre qu'au C-3 et une corrélation entre le proton à $\delta_H 6,60$ ppm et le carbone à $\delta_C 95,65$ ppm dont la valeur du déplacement chimique est en faveur du C-8.
- Deux singulets à $\delta_H = 3,96$ ppm et à $\delta_H = 3,88$ ppm intégrant pour 3 protons chacun confirmant la présence de deux groupement méthoxyles. Sur le spectre HSQC les protons de ces méthyles corrélient avec les carbones à $\delta_C = 56,50$ ppm et à $\delta_C = 61,04$ ppm, respectivement.



Spectre 27: RMN¹H (400 M Hz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10).



Spectre 28: HSQC (400 M Hz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10)



Spectre 28-1: HSQC (400 M Hz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10), étalement.

Sur le spectre HMBC (Spectre 29) les protons des méthoxyles à $\delta_H = 3,88$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 132,92$ ppm, ce carbone ne peut être attribué qu'au carbone C-6 du cycle A, vu la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation nette avec le proton H-8 ce qui confirme la méthylation de cette molécule en cette position. Quant aux protons du méthyle à $\delta_H = 3,96$ ppm ils montrent une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 149,44$ ppm, lequel montre une tache de corrélation avec le proton H-5'. Ces observations permettent son attribution à C-3' (Spectre 29-1). L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la (Figure IV.16). Cette molécule est connue sous le nom de jacéosidine [43,62].

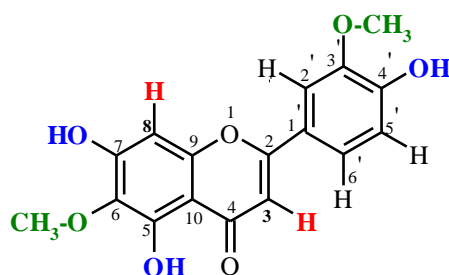
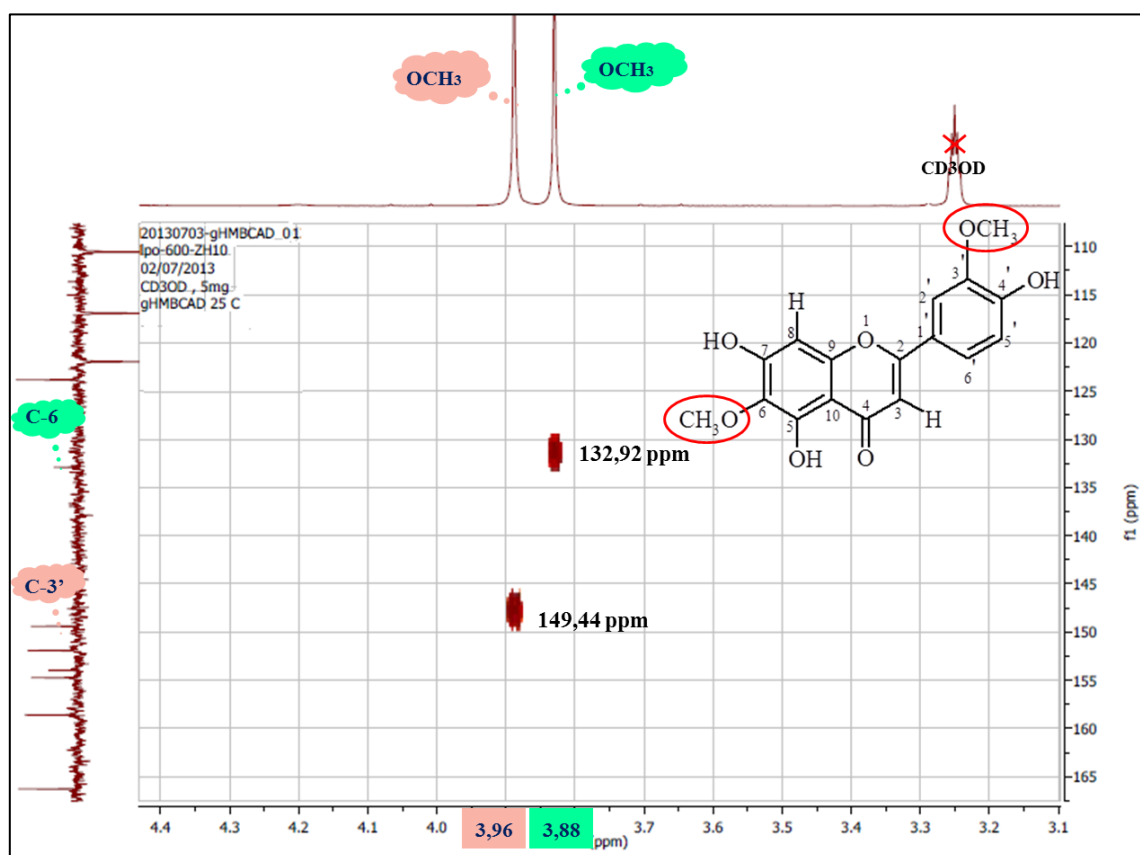
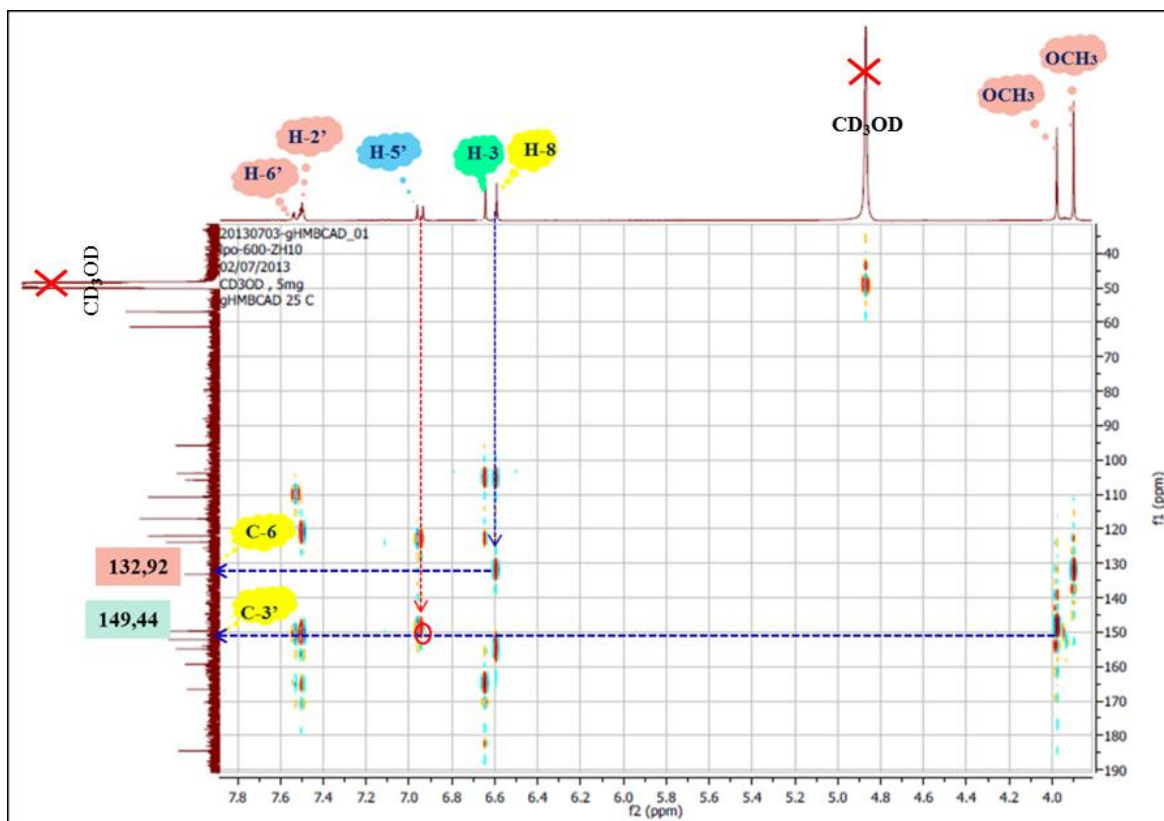


Figure IV.16: Structure du composé 5

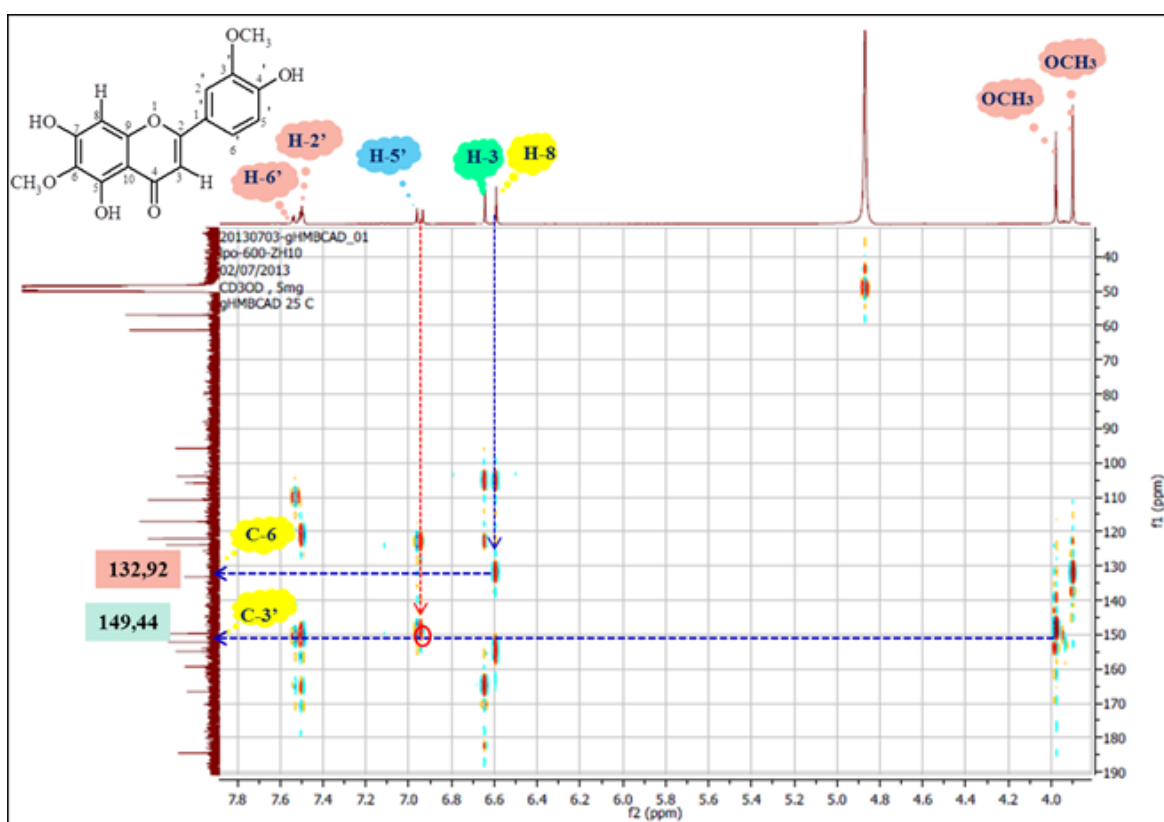
Spectre 29-1 : Expérience HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé 5 (ZH10), étalement.

L'analyse combinée des spectres HSQC (Spectres 28 et ses étalements) et HMBC (Spectres 29 et ses étalements) permet d'attribuer les autres carbones de la molécule notamment :

- ✓ Le C-2' à $\delta_C = 110,34$ ppm grâce à la corrélation avec H-2' δ_H (7,52 ppm) sur le spectre HSQC.
- ✓ Le C-6' à $\delta_C = 121,64$ ppm grâce à la corrélation avec H-6' δ_H (7,54 ppm) sur le spectre HSQC.
- ✓ Le C-5' à $\delta_C = 116,91$ ppm grâce à la corrélation avec H-5' δ_H (6,95 ppm) sur le spectre HSQC.
- ✓ Le carbone C-4' à $\delta_C = 149,06$ ppm, grâce à ses corrélation avec les trois protons : H-2', H-5' et H-6' sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-1' à $\delta_C = 123,90$ ppm, grâce à ses corrélation avec les quatre protons : H-2', H-5', H-6' et H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-2 à $\delta_C = 166,36$ ppm, grâce à ses corrélation avec les trois protons : H-2', H-6' et H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-10 à $\delta_C = 105,58$ ppm, grâce à ses corrélation avec les deux protons : H-8 et H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-7 à $\delta_C = 158,92$ ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-8 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-9 à $\delta_C = 154,70$ ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-8 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone quaternaire aromatique oxygéné restant résonant à $\delta_C = 154,83$ ppm sera par conséquent attribué à C-5.

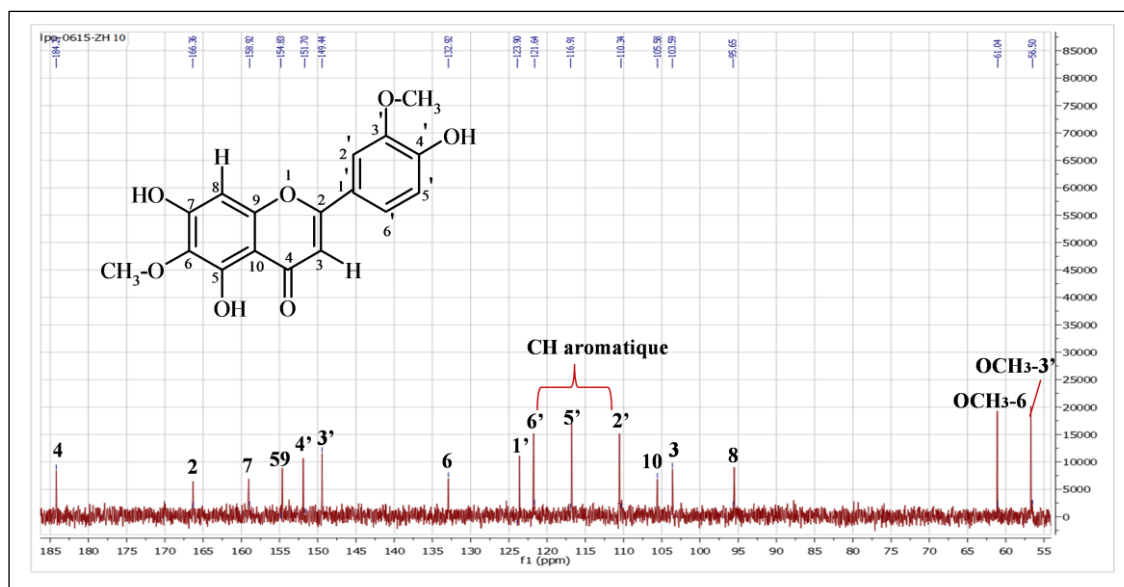


Spectre 29 : Expérience HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10), étalement.

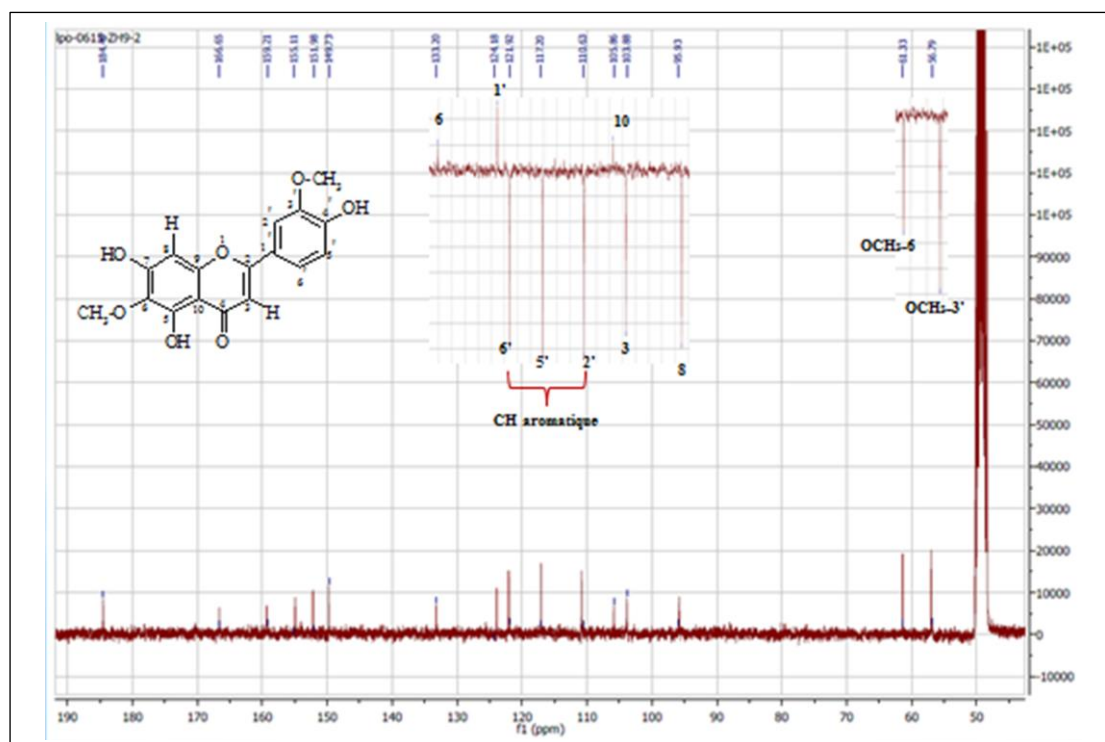


Spectre 29-2 : Expérience HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10)

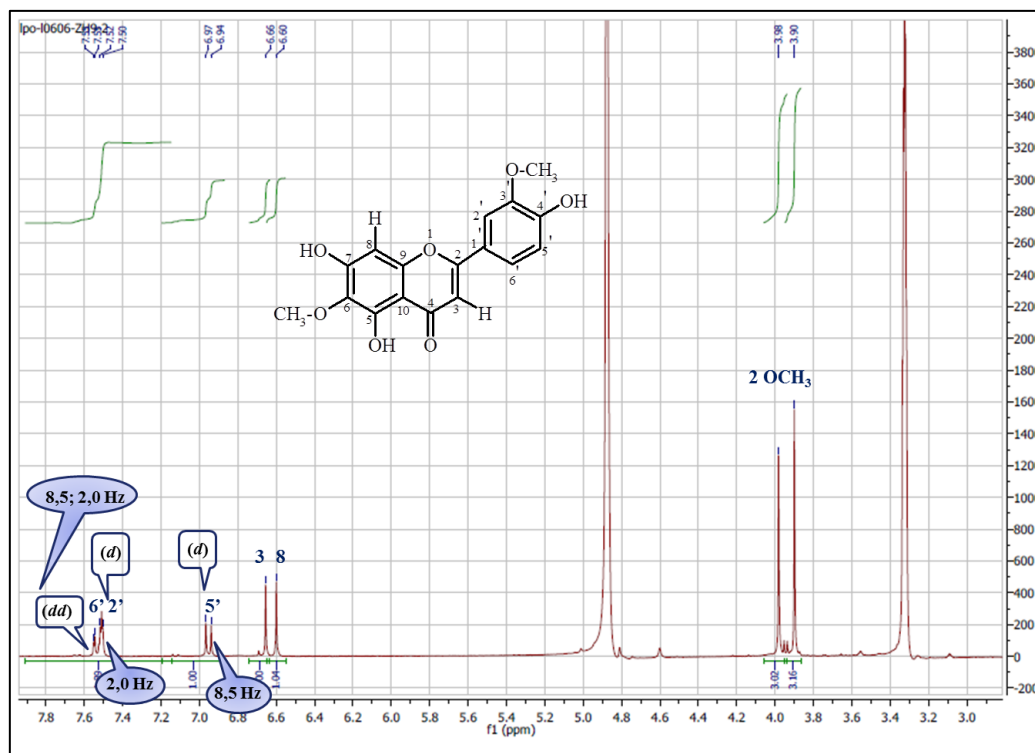
Toutes les données de la spectroscopie RMN (^1H & ^{13}C) sont reportées sur les spectres correspondant (Spectres 30, 31) et dans le tableau IV.20.



Spectre 30: RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé **5**



Spectres 31; 31-1: RMN ^{13}C & Jmod (100 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé **5**, étalé

Spectre 32: RMN¹H (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé **5** (ZH10), étalementTableau IV.20: Les données spectroscopiques de la RMN¹³C (DMSO-d₆, 300 MHz) du composé **5** jacéosidine

¹³ C ^{&}	HSQC [‡]	δ (ppm)	¹ H Attribution	Intégration	δ (ppm)	Multiplicité
4	C	184,21	H-6'	1H	7,54	<i>dd</i>
2	C	166,36	H-2'	1H	7,52	<i>d</i>
7	C	158,92	H-5'	1H	6,95	<i>d</i>
5	C	154,83	H-8	1H	6,66	<i>s</i>
9	C	154,70	H-3	1H	6,60	<i>s</i>
4'	C	151,70	OCH ₃ -3'	3H	3,96	<i>s</i>
3'	C	149,44	OCH ₃ -6	3H	3,88	<i>s</i>
6	C	132,92	-	-	-	-
1'	C	123,90	-	-	-	-
6'	CH (sp ²)	121,64	-	-	-	-
5'	CH (sp ²)	116,91	-	-	-	-
2'	CH (sp ²)	110,34	-	-	-	-
10	C	105,58	-	-	-	-
3	CH (sp ²)	103,59	-	-	-	-
8	CH (sp ²)	95,65	-	-	-	-
OCH ₃ -6	CH ₃	61,04	-	-	-	-
OCH ₃ -3'	CH ₃	56,50	-	-	-	-

& : Spectre enregistré à 300 MHz.

‡ : Spectre enregistré à 400 MHz.

La jacéosidine est également connue selon l'IUPAC sous les noms suivants :

- ✓ 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-diméthoxyflavone ;
- ✓ 4'-demethyleupatiline;
- ✓ 6-hydroxyluteolin 6,3'-dimethyl ether;
- ✓ 6-methoxyluteolin 3'-methyl ether.

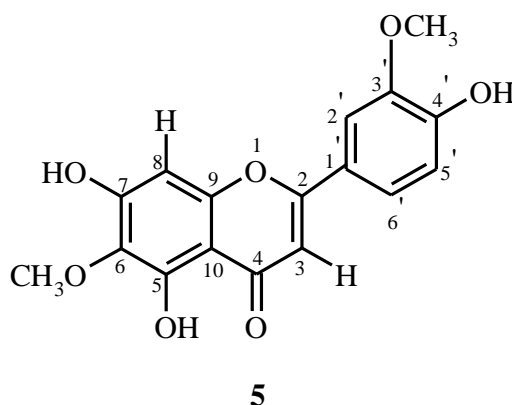


Figure IV.17: jacéosidine

La littérature mentionne ce flavonoïde comme étant un flavonoïde de Surface [58], et reporte sa présence dans le genre *Centaurea* (Asteraceae). La jacéosidine a été isolée de: *C. pallescens* [59], *C. alexandrina* [60-62] *C. cuneifolia* [63] *C. cineraria* ssp. *Umbrosa* [64], *C. aspera* var. *subinermis* [65] *C. nervosa* et *C. phrygia* [66], *C. thessala* ssp. *drakiensis* [67], des racines de *C. jacea* [68], *C. arguta* [69], de *C. hierapolitana* une espèce endémique turque [70], *C. inermis*, *C. kilaea* et *C. virgata* [71], des fleurs de *C. ruthenica* une espèce chinoise [72] de *C. phyllocephala* [73] et de *C. pullata* [74].

Dans la famille Asteraceae, cette substance a été identifiée chez une plante australienne *Helichrysum viscosum* var. *bracteatum* [75]; chez *Helenium radiatum* [76] chez *Artemisia arctica* récoltée en Arizona [77]; chez une plante indienne *Artemisia parviflora* [78]

Des propriétés anti-rhumatismales et anti-inflammatoires ont été attribuées à ce flavonoïde qui souligne l'utilisation de la jacéosidine dans la médecine chinoise [79, 80].

⇒ Conclusion

Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales. Parmi les 9 produits isolés 5 ont été déterminés sans aucune ambiguïté. Il s'agit de deux composés phénoliques (vanilline **1**, paridol **3**), un lignane [(-) - arctigenine **2**] et deux flavonoïdes aglycones (eupatiline **4** et jacéosidine **5**). Les 4 autres produits présentent des profils très purs et d'excellents spectres de RMN 1D & 2D sont toujours en cours de détermination car leurs structures semblent assez complexes. Tous les produits isolés et déterminés sont décrits pour la première fois dans cette espèce.

Les 5 composés identifiés ont été soumis à des tests de recherche d'activités cytotoxique et antimicrobienne *in vitro*. Le protocole de ces activités est décrit dans le chapitre II et les résultats dans le chapitre V.

Références bibliographiques

- [1] Pharmacopée Européenne Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé. EDOM7.7. 2601/2008:20207. 2008(7):26.
- [2] Wang YL, Huang W, Chen S, Chen SQ, Wang SF. Synthesis, structure and tyrosinase inhibition of natural phenols derivatives. *J Chin Pharm Sci* 2011; 20(3): 235-244.
- [3] Mohamad Nasir MI, Mohamad Yusof N, Mohd Salleh N, Coswald SS, Sollehuiddin S. Separation of vanillin from oil palm empty fruit bunch lignin. *Clean* 2008; 36(3): 287-291.
- [4] Jang D S- J, Han A-R, Park G, Jhon G-J, Seo E-K. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. *Arch Pharm Res* 2004; 27(4): 386-389.
- [5] Zardi-Bergaoui A., Harzallah-Skhiri F, Hammami S, Chreaif I, Cheriaa-Issa J., Ben Jannet H, Mighri Z. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from Flowerheads of *Anacyclus cyrtolepidioides* Pomel from Tunisia. *Jeobp* 2008;11(6): 577 – 585.
- [6] Mohamadia S, Zhaob M, Amrania A, Marchionib E, Zamaa D, Benayache F, Benayache S. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. & Dur. *Ind Crop Prod* 2015; 769:910–919.
- [8] Bruneton J. Pharmacognosie phytochimie- plantes médicinales LAVOISIER S.A.S. 2016 (5): 389-393.
- [9] Shinoda J, Kawagoye M. *J Pharm Soc Japan*. 1929; 49: 565-575.
- [10] Liu S, Chen K, Schlemann W, Strack D. Isolation and identification of trace lignans, arctiin and arctigenin, in *Arctium lappa* L. leaves. *Sepu* 2003; 21(1): 52-55.
- [11] Umehara K, Sugawa A, Kuroyanagi M, Ueno A, Taki T. Studies on Differentiation Inducers from *Arctium fructus*. *Chem Pharm Bull* 1993; 41: 1774-1779.
- [12] Cardona L, Alemañ R. A, Garcia B, Pedro J.R. Sesquiterpenes, flavonoids and lignans from *Onopordon acaulon*. *Phytochemistry* 1992; 31(10): 3630-3632.
- [13] Cowan S, Bartholomew B, Watson A. A, Bright C, Latif Z, Sarker S.D, Nash R.J. Lignans from *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae). *Biochem Syst Ecol* 2001; 29: 109-111
- [14] Lima Olga O. de A, Braz-Filho R. Dibenzylbutyrolactone Lignans and Coumarins from *Ipomoea cairica*. *J Braz Chem Soc* 1997; 8(3): 235-238.
- [15] Hirose M, Yamaguchi T, Lin C, Kimoto N, Futakuchi M, Kono T, Nishibe S, Shirai T. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague–Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats *Cancer Lett* 2000; 155:79-88.

- [16] Inagaki I, Hisada S, Nishibe S. Lignan glycosides of *trachelospermum asiaticum* var. *intermedium*. *Phytochemistry* 1971; 10(1): 211-213.
- [17] Nishibe S, Fujimoto T, Nose M, Takeda T, Ogihara Y, Xu G. Lignans from *Trachelospermum axillare*. *Phytochemistry* 1993 ; 32(6): 1579-1581.
- [18] Nose M , Fujimoto T , Nishibe S, Ogihara Y. Structural Transformation of Lignan Compounds in Rat Gastrointestinal Tract; II. Serum Concentration of Lignans and their Metabolites. *Planta Med* 1993; 59(2): 131-134.
- [19] Koubaa I, Damak M, McKillop A, Simmonds M. Constituents of *Cynara cardunculus* *Fitoterapia* 1999; 70(2):212-213.
- [20] Rahman MMAD, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* 1990; 29(6):1971-1980.
- [21] Rustaiyan A, Ganji M.T. Sesquiterpene lactones from *Jurinella moschus* *Phytochemistry* 1987; 26(10): 2857-2859.
- [22] Takasaki M, Konoshima T, Komatsu K, Nishino H. Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. *Cancer Lett* 2000; 158(1):53-59.
- [23] Tundis R, Statti G, Menicheni F, Delle Monache F. Arctinin and onopordopicrin from *Carduus micropterus* ssp. *persinospus*. *Fitoter* 2000; 71 (5): 600-601.
- [24] Margarida M. S. M. Bastos , Anake Kijjoa , José M. Cardoso, Alicia B. Gutiérrez , Werner Herz, Lignans and Other Constituents of *Centaurea sphaerocephala* ssp. *Polyacantha*, *Planta Med* 1990; 56(4): 403-405.
- [25] Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. *J Appl Sci Res* 2012; 8(6): 2876-2880.
- [26] Aslan Ü, Öksüz S. Chemical Constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turk J Chem* 1999; 23:15-20.
- [27] Damak N, Ghorbel H, Bahroun A, Damak M, Mc Killop A, Simmonds M. Contribution to structural investigation of *Centaurea dimorpha* compounds. *J Soc Chim Tunis* 2000; 4: 653-658.
- [28] El-Masry S, Darwish F. A, Abou-Donia A, Abou-Karam M. A., Granz . Sesquiterpene lactones from *Centaurea glomerata* *Phytochemistry* 1985 ; 24(5) : 999-1001.
- [29] Fortuna A. M, Riscalá E. C, Catalan C A.N, Gedris T. E, Herz W, Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochem Syst Ecol* 2001; 29(9): 967–971.


- [30] Marco J.A, Sanz J. F, Sancenon F, Susanna A, Rustaiyan A, Saberi M. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 1992; 31(10): 3527-3530.
- [31] Ribeiro NL, Nahar L, Kumarasamy Y, Mir-Babayev N, Sarker S. D. Flavonoid C-glucosides and a lignan from *Centaurea macrocephala* (Compositae). *Biochem Syst Ecol* 2002; 30(11):1097–1100.
- [32] Shoeb M, Jaspas M, MacManus SM, Thoo-Lin P. K, Celik S, Sarker S. D. Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from *Centaurea dealbata*. *Ars Pharm* 2006; 47(4): 417-424.
- [33] Ulubelen A, Öksüz S, Meriçli A.H. Palmitic acid ester of sitosteril 3β -glucoside from *Centaurea regia*. *Phytochemistry* 1988; 27(12): 3964-3965.
- [34] Gelbrich T, Braun DE, Ellern A, Griesser UJ. Four polymorphs of methylparaben: structural relationships and relative energy differences. *Cryst Growth Des* 2013; 13: 1206-1217.
- [35] Sajan D, Joe H, Jayakumar VS, Zaleski J. Structural and electronic contributions to hyperpolarizability in methyl p-hydroxy benzoate. *J Mol Struct* 2006; 785: 43-53.
- [36] Picher M T, Tortajada A, Seoane E. Monomeric components of cutin from *Centaurea aspera stenophylla*, *Anales de Química, Serie C: Química Organica y Bioquímica* 1983; 79(3):404-406.
- [37] Kus'PM, Jerkovic' I., Tuberoso C I G, Marijanovic' Z. Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters:Chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others, *Food Chemistry* 2014;142:12-18.
- [38] Ling Z Z, Hexian H, Xianhui H, Dongping Z, Shenqing F Z. Method for preparing veterinary tiamulin suspension injection liquid. South China Agricultural University, Peop. Rep. China Patent CODEN:CNXXEV 2013; 9.
- [39] Zhiming Z, Yaohuan W, Long Z, Xiaohua Z, Xiaofang Y, Hao Yu, Miaoying Y, Guanhai Y. Synephrine-loaded multiple emulsion with anti-oxidation and weight losing effects, and preparation method thereof. Hunan Xinli Biotechnology Co Ltd, Peop. Rep.China; Chongqing University 2013.
- [40] Burgot G, Burgot J. L. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et application, méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. TEC & DOC PARIS, 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris. 2011.P., 163.
- [41] Stahl E. Thin Layer Chromatography. Berlin–Heidelberg–New York. 1969: 264-268.

- [42] Kitouni R, Benayache F, Benayache S. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. Chem Nat Compd 2015; 51(4): 762-763.
- [43] Belkacem S, Belbache H, Boubekri C, Mosset P, Rached-Mosbah O, Marchioni E, et al. Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. Res J Pharm Biol Chem Sci 2014;5(3): 1275-1279.
- [44] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. J Serb Chem Soc 2011; 76: 27-34.
- [45] Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. Phytother Res 2010; 24: 1664-1669.
- [46] Aslan Ü, Öksüz S. Chemical Constituents of *Centaurea cuneifolia*. Turk J Chem 1999; 23: 15-20.
- [47] Bruno M, Herz W. Sesquiterpene lactones and flavones from *Centaurea cineraria* subsp. *Umbrosa*, phytochemistry 1988; 27(6):1873-1875.
- [48] Amer M. M. A, Salama, O. M, Omar A. A. Methylated flavonoidal aglycons from *Centaurea alexandrina*, Acta Pharmaceutica Jugoslavica 1984; 34(4) 257-9.
- [49] Santos S.M.B.P, Brito Palma F, Grande M.B. Flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, an endemic species of Portugal. Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols 1992; 16(1):153-6.
- [50] Yang H.G, Kim H.J, Kim H.S, Park S. N. Antioxidative and antibacterial activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts, Korean J Microbiol Biotechnol 2012;40 (3):250-260.
- [51] Min S-W, Kim N-J, Baek N-I, Kima D-H. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice, J. Ethnopharmacol 2009; 125: 497–500.
- [52] Kolak U, Hacibekiroğlu I, Öztürk M, Özgökçe F, Topçu G, Ulubelen A. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. Turk J Chem 2009; 33: 813 - 823.
- [53] Burgot G., Burgot, J. L. 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et application, méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. TEC & DOC PARIS, 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris. P., 163.
- [54] Mabry V. T. J, Markham K. R, Thomas M. B. The Systematic Identification of

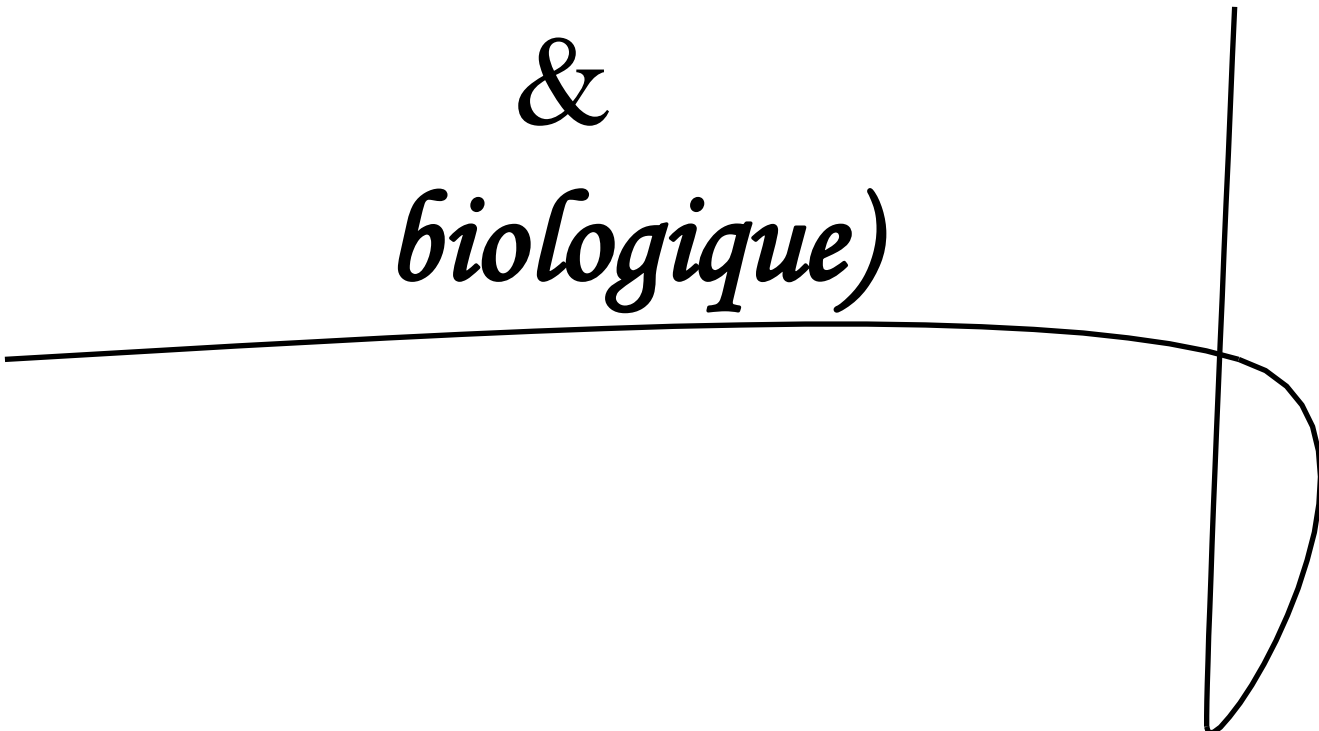
- Flavonoids. Edition Springer-Verlag, Berlin ,Heidelberg ,New York, 1970. P 354.
- [55] Mears J, Mabry T. J. A procedure for the UV detection of hydroxyl and methoxyl groups at C6 in flavones and 3-O-substituted flavonols, *Phytochemistry*1972; 11(1):411-412.
- [56] Sakakibara E, Mabry T. G. A UV procedure for distinguishing 5-hydroxyl-6-methoxyl from 5, 6-dihydroxyl systems in flavones and 3-O-substituted flavonols. *Latinoam. Quim*1977; 8: 99-100.
- [57] Farkas L, Nogradi M, Sudarsanam V, Herz W. Constituents of *Iva* Species. V. Isolation, Structure, and Synthesis of Nevadensin, a New Flavone from *Iva Nevadensis* M. E. Jones and *Iva Acerosa* (Nutt.) Jackson. *J Org Chem*1966; 31(10): 3228–3232.
- [58] Onyilagha J, Grotewold E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. *Recent Res. Devel Plant Sci* 2004; 2: 53-71.
- [59] Ehsan A, Omar A. A, Sarg T. M, Slatkin D. J. Chemical Constituents of *Centaurea pallescens*. *Planta Med* 1987; 53(5):503-504.
- [60] Amer M.M.A, Salama O.M, Omar A.A, Flavonoids and sesquiterpenes lactones constituents of *Centaurea alexandrina* . *Acta Pharm Jugosl*1984; 34:257.
- [61] Ismail S.I, Hammouda F. M, Rimpler H, Abdellah S.M. Flavonoids and sesquiterpene lactones, constituents of *Centaurea alexandrina*. *Planta Med* 1986; 52(6):527.
- [62] Kubacey T. M, Haggag E.G, El-Toumy S. A, Ahmed A. A, El-Ashmawy I.M, Younsn Ma.M. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *Journal of Pharmacy Research* 2012; 5(6): 3352-3361.
- [63] Aslan Ü, Öksüz S. Chemical Constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turk J Chem* 1999; 23:15-20.
- [64] Bruno M, Herz W. Sesquiterpene lactones and flavones from *Centaurea cineraria* subsp. *Umbrosa*. *Phytochemistry*1988; 27(6):1873-1875.
- [65] Cardona M.L, Fernández I, Pedro J. R, Pérez B. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea aspera* . *Phytochemistry*1991; 30(7): 2331–2333.
- [66] Christensen L.P, Lam J. Flavones and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 1991; 30(8):2663–2665.
- [67] Gousiadou C, Skaltsa H. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochemical Biochem Syst Ecol* 2003; 31: 389-396.
- [68] Harborne J. B, Baxter H. The hand book of natural flavonoids. Willey 1999.

- [69] Gadeschi E, Jorge Z.D., Massanet G.M, Luis F.R. Two derivatives of costic acid from *Centaurea argute*. *Phytochemistry*1989; 28(8): 2204–2206.
- [70] Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan I. A. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. *Phytother Res* 2007; 21(5): 488–491.
- [71] Öksüz S, Ayyildiz H, Johansson C. 6-Methoxylated and C-Glycosyl Flavonoids from *Centaurea* Species. *J Nat Prod* 1984; 47 (5): 902–903.
- [72] Mishio T, Honma T, Iwashina T. Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. *Biochem Syst Ecol* 2006; 34: 180-184.
- [73] Twaij H.A.A, Kory A, Al-Khazraji N.K. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. *Phytochemistry*1983; 3: 299–314.
- [74] Medjroubi K, Mezhoud S, Benayache F, Seguin E, Tillequin F. Flavonoids of the Aerial Part of *Centaurea pullata*. *Chem Nat Compd* 2005;41: 226-227.
- [75] Geissman T.A, Mukherjee R, Sim K.Y. Constituents of *Helichrysum viscosum* var. *bracteatum* DC. *Phytochemistry*1967; 6: 1575–1581.
- [76] Herz W, Gast C. M, Subramaniam P. S. Sesquiterpene lactones of *alternijolium* (Spreng.) Cabrera. Structures of brevilin A, Linifolin A and Alternilin. *J Org Chem*1968; 33: 2780-2784.
- [77] Herz W, Bhat S.V, Sunthnam P.S. Coumarins of *Artemisia dracunculoides* and 3',6-dimethoxy-4',5,7-trihydroxyflavone in *A. arctica*. *Phytochemistry*1970 ;9: 981-984.
- [78] Vasanth S. Rao R. B, Purushothaman K. K, Thresiamma S, Govindarajan S. Occurrence of artecanin and jaceosidin in *Artemisia parviflora* Buch-Ham. *Indian J Pharm Sci* 1989; 51(6): 265-266.
- [79] Li G.H, Liu F, Xin Z. Studies on pharmacodynamics actions in *Saussurea medusa*, *Chin Bull Pharma*1979; 14: 86-87.
- [80] Zhao D, Xing J, Li M, Lu D, Zhao Q. Tissue and organ culture 2001; 67: 227-234.

Chapitre V



*Résultats & discussions
(Screening phytochimique
&
biologique)*



V. Résultats et discussion

Ce chapitre renferme les résultats des criblages phytochimique et biologique, de l'extrait étudié ainsi que les résultats obtenus dans les tests de recherche d'activité biologiques *in vitro* de l'extrait et de ses composants isolés.

V.1. Extraction et screening phytochimique

V.1.1. Rendements de l'extraction

Les rendements obtenus pour les 1500g de poudre sèche de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) M. en utilisant la technique de l'extraction solide-liquide suivie concentration et dilution à l'eau puis extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante sont présentés dans la figure V-1. Comme nous pouvons le constater le plus faible rendement a été obtenu avec l'Ether de pétrole (0,007%), suivis des autres extraits : acétate d'éthyle, chloroforme et *n*-butanol. L'extrait aqueux quant à lui, présente le plus grand rendement avec 6,35% (Tableau V.1).

Tableau V.1 : Rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait(s)	Masse (g)	Rendement (%)
1500 g	Ether de pétrole	0,1	0,007
	Chloroforme	4,0	0,27
	Acétate d'éthyle	3,6	0,24
	<i>n</i> -butanol	19,6	1,31
	Aqueux	95,2	6,35

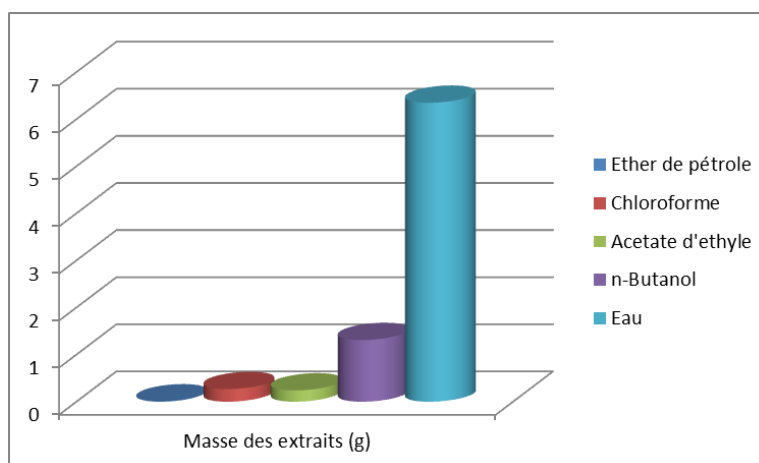


Figure V.1 : Histogramme schématisant les résultats obtenus pour l'extraction des 1500g de poudre sèche de la plante étudiée. Les rendements sont présentés par ordre d'extraction.

V.1.1.1. Résultat du screening (criblage) phytochimique

Pour le criblage phytochimique préliminaire présenté dans le tableau V.2, nous pouvons constater que les groupes phytochimiques les plus abondants dans l'extrait chloroformique sont les flavonoïdes et les terpénoïdes. Les métabolites secondaires les moins présents sont les anthraquinones et les alcaloïdes ou on les retrouve en traces. Finalement, l'extrait aqueux a été testé positif pour les tanins et les saponines.

Tableau V.2: Criblage phytochimique des extraits chloroformique et aqueux

Métabolites secondaires	Extrait CHCl ₃	Extrait aqueux
Alcaloïdes	±	-
Tanins	-	+
Saponines	-	+
Anthraquinones	-	-
Flavonoïdes aglycone	+	-
Terpénoïdes	+	-

- : absence du groupe phytochimique;

± : présence de traces du groupe phytochimique

V.2. L'activité cytotoxique

V.2.1. L'activité cytotoxique de l'extrait CHCl₃ de *C. diluta* Ait.subsp. *algeriensis*

L'extrait de CHCl₃ a montré une activité inhibitrice de la croissance cellulaire contre chacune des 3 variétés de lignées cellulaires humaines examinées (Carcinome du poumon, Adénocarcinome du sein et Glioblastome astrocytaire) dans la gamme de concentration de 21 à 27 µg/mL (Tableau V.3 et Figure V.2 et Figure V.3). Ces résultats concordent avec les données antérieures d'une espèce algérienne de *Centaurea*, testée sur *Plasmodium falciparum*, l'extrait chloroformique brut de *Centaurea musimomum* (*musimonum*) Maire, a montré une activité antiparasitaire (IC₅₀ = 3,16 µg/mL) et a montré sur les cellules KB, une activité cytotoxique avec inhibition de la croissance de 89% à 10 µg/mL et 26% à 1 µg/mL [2].

Tableau V.3 : Effets cytotoxiques de l'extrait CHCl₃ de *C. diluta* Ait.subsp. *algeriensis* (données de 3 expériences réalisées en triplicate)

Lignées cellulaires	A549	MCF7	U373
IC ₅₀ ±SD (µg/mL)	27,0±0,6	25 ± 2	21 ± 3

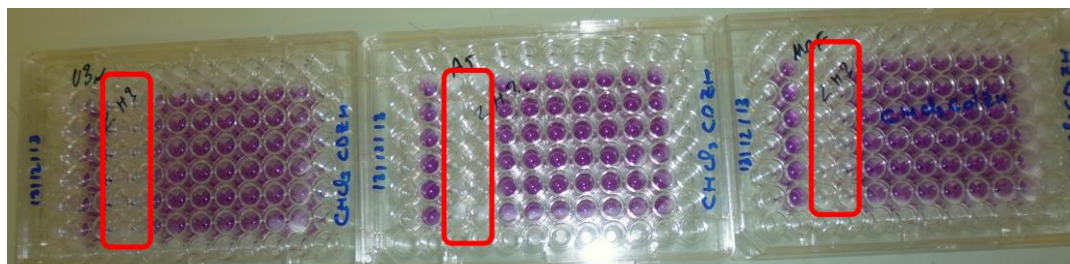


Figure V.2: Les microplaques après MTT de l'extrait CHCl_3 sur les 3 lignées humaines

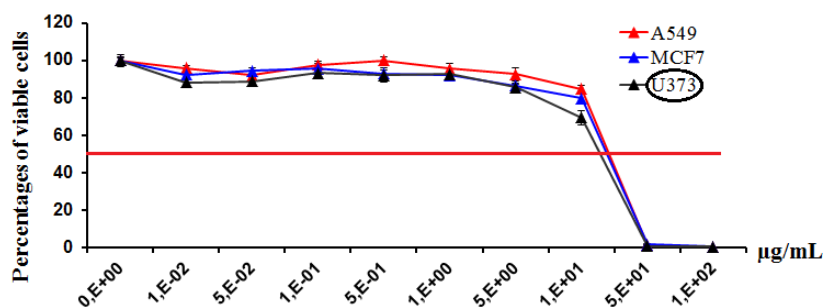


Figure V.3 : Effets cytotoxiques (IC_{50}) de l'extrait CHCl_3 sur les 3 lignées humaines

V.2 .2.L' activité cytotoxique des composés isolés

L'évaluation des composés isolés **1** à **5** indique des activités inhibitrices de croissance cytotoxiques modérées pour l'eupatiline **4** (33 - 85 μM), la jacéosidine **5** (32 à 49 μM) et la (-) – arctigenine **2** (28 - 82 μM) (Tableau V.4 et Figure V.4).

Tableau V.4: Effets cytotoxiques (IC₅₀) de composés isolés sur les différentes lignées cellulaires de cancer humain et de souris (données de 3 expériences en triplicate)

Composés	N°	lignées cellulaires					
		IC ₅₀ ±SD (µM)					
A549	MCF7	U373	B16F10	Hs683	PC3	B16F10	
Vanilline	1	>100	>100	78±1	>100	>100	57±6
(-)-Arctigénine	2	61±3	82±12	>100	28±10	47±3	33±5
Paridol	3	>100	>100	>100	>100	>100	52±4
Eupatiline	4	61±1	82±5	71±2	>100	47±2	33±2
Jacéosidine	5	49±2	45±75	>100	>100	32±1	40±3

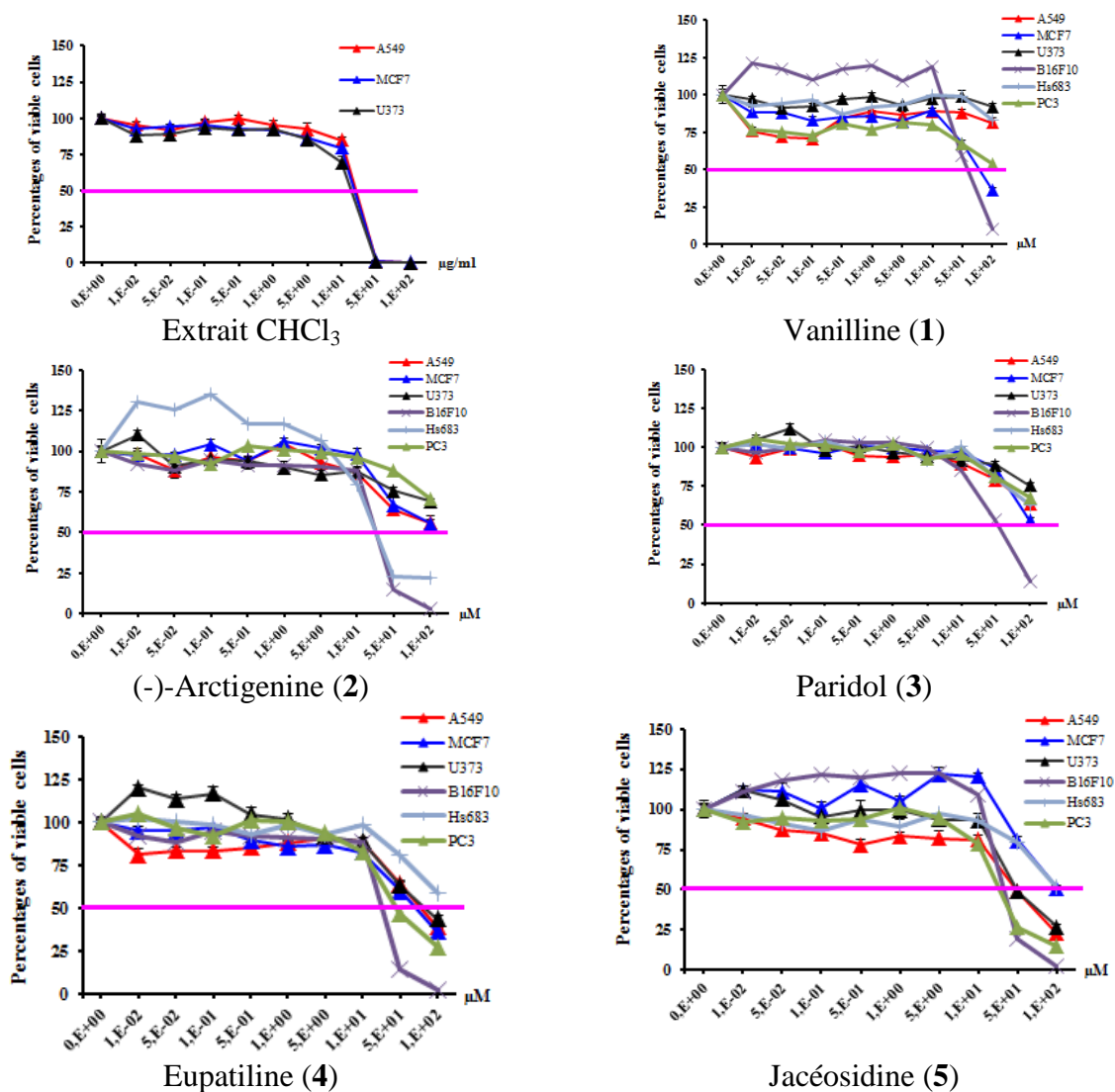


Figure V.4 : Effets cytotoxiques (IC₅₀) de l'extrait CHCl₃ et des composés isolés sur différentes lignées de cellules tumorales.

L'extrait brut de CHCl_3 et les composés isolés ont été évalués pour l'activité cytotoxique. Des effets cytotoxiques modérés ont été observés pour trois composés : (-)-arctigénine **2**, eupatiline **4** et jacéosidine **5**, avec des IC_{50} (s) comprises entre 25 et 50 μM . Nos résultats ont prouvé que l'extrait chloroformique a montré des effets cytotoxiques plus significatifs sur les cellules cancéreuses humaines A549, MCF7 et U373 que les composés purs isolés. Cela pourrait être attribuable aux interactions synergétiques, d'autant plus que l'extrait contient des flavonoïdes dont le rôle dans l'augmentation de l'activité biologique d'autres composés par des mécanismes synergiques ou autres est connu [3].

Nos données ont mené à des résultats conformes à ceux de la littérature. En effet, l'arctigénine (stéréoisomère non spécifié) a montré un effet cytotoxique contre le cancer de poumon (A549), le cancer du foie (HepG2) et le cancer de l'estomac (lignée cellulaire de carcinome gastrique humaine, cellules de KATO III), mais non cytotoxique contre plusieurs variétés de lignées cellulaires normales [4].

Arctigénine a spécifiquement empêché la prolifération des cellules cancéreuses, qui pourraient par conséquent mener à l'induction de l'apoptose et est cytotoxique pour la variétés de lignées cellulaires humaine de carcinome hépatocellulaire, les valeurs de IC_{50} après 12 h, 24 h et 48 h de traitement étaient respectivement 38,29, 1,99 et 0,24 μM [5], l'activité la plus élevée a été démontrée avec des valeurs de IC_{50} (s) de 0,73 μM (HeLa), 3,47 μM (MCF7) et 4,47 μM (A431) [6]. L'eupatiline réduit la prolifération et la migration de cellule musculaire lisse aortique en inhibant les activités PI3K, MKK3/6 et MKK4 (IC_{50} dans les cellules Hec1A et KLE étaient de 82,2 μM et 85,5 μM , respectivement) [7,8] et la jacéosidine peut induire l'arrêt du cycle cellulaire G2/M en inactivant cdc25C-cdc2 par l'intermédiaire de l'activation ATM-Chk1/2 [9].

V.3. L'activité anti-microbienne

V.3.1. Activité antifongique et activité antibactérienne directe

L'activité antifongique sur les pathogènes des plantes et antibactérienne directe a été déterminée par la méthode des microdilution, les résultats sont présentés dans le (Tableau V.5 & la Figure V.5). La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait CHCl_3 a été testée sur les deux souches sensibles utilisées (MSSA ATCC 6538 et *E. coli* ATCC 25922). Les résultats obtenus sont comparés avec la CMI et la CMB de l'antibiotique de référence, la tétracycline. Le tableau V.5 résume ces résultats.

L'extrait CHCl_3 n'a pas montré d'activité antifongique contre les sept souches fongiques examinées et n'a pas montré non plus d'activité antibactérienne directe significative.

Vu que pour toutes les souches que nous avons utilisées à ce stade nous avons obtenu une CMI et une CMB supérieure à 1000 $\mu\text{g/mL}$ (CMI = 2000 $\mu\text{g/mL}$) Figure V.5, nous avons alors utilisé des souches sensibles. On pourrait penser que ces souches sensibles étudiées ont acquis une certaine résistance mais à la vue des résultats obtenus avec la tétracycline, on peut confirmer que ce n'est pas le cas. En effet pour les antibiotiques, les CMI les plus basses ont été enregistrées pour les souches MSSA ATCC 6538 et *E. coli* ATCC 25922. Ces 2 souches ont toutes les deux une CMI de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ avec la tétracycline. On peut alors confirmer que ces souches sont en effet, sensibles.

Tableau V.5 : CMI ($\mu\text{g/mL}$) de l'extrait chloroformique

Microorganismes testés	Nature	CMI $\mu\text{g/mL}$	Extrait CHCl_3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Gram+	2000	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-	2000	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Champignon ^a	^b	-
<i>Fusarium oxysporum</i> sporulant	Champignon ^a	^b	-
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Champignon ^a	^b	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Champignon ^a	^b	-
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Champignon ^a	^b	-
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Champignon ^a	^b	-
<i>Pseudomonas syringae</i> DC 3000	Gram- ^a	^b	-
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Levure ^a	^b	-

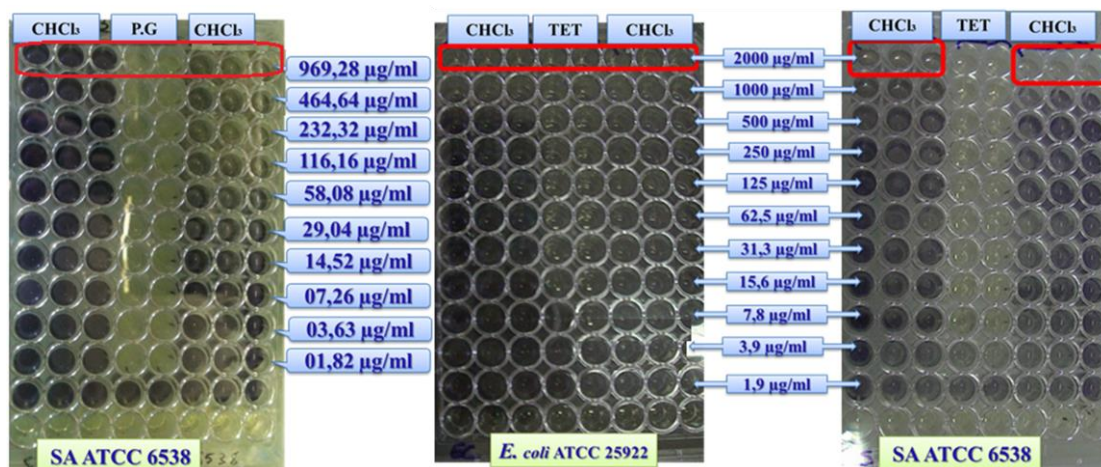
^a Agents pathogènes des plantes (Champignons, bactéries & levure)

^b Aucune effet à 250 $\mu\text{g/mL}$, la concentration maximale testée pour les agents pathogènes

CMI < à 500 $\mu\text{g/mL}$ extrait actif ;

500 \leq CMI \leq 1000 $\mu\text{g/mL}$ l'activité était considérée faible ;

Au-delà de 1000 $\mu\text{g/mL}$ l'extrait était considéré inactif.



PG: pénicilline G; TET: tétracycline.

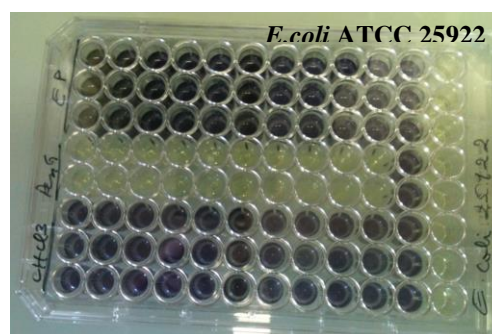
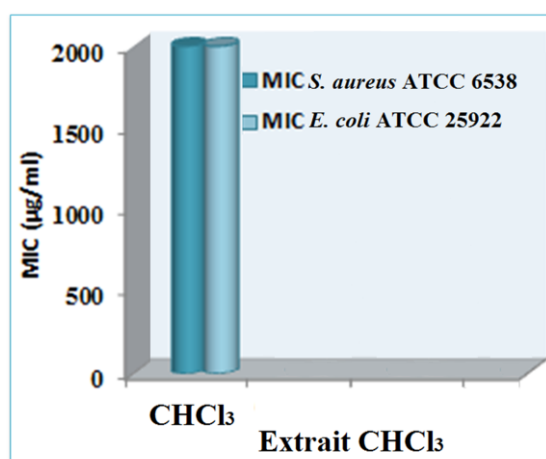


Figure V.5: CMI (µg/mL) de l'extrait CHCl₃ de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Asteraceae)

V.3.2. Activité antibactérienne indirecte

L'activité antibactérienne indirecte a été réalisée sur l'extrait chloroformique, qui n'a pas présenté d'activité antimicrobienne directe. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau V.6. Parmi les quatre antibiotiques testés de type bêta-lactames, l'incorporation de l'extrait CHCl₃ dans le milieu Mueller-Hinton a montré une augmentation dans l'activité ou du moins un maintien de celle-ci.

- ✓ Pour la MRSA C98506, l'extrait CHCl₃ a réduit la CMI des antibiotiques de type β-lactamed'un facteur allant de 2 à 32 fois. La plus grande augmentation de l'activité a

été celle de l'extrait chloroformique (200 µg/mL) en présence de l'oxacilline qui est passée d'une CMI de 16 à 0,5 donc une diminution de la CMI d'un facteur de 32.

- ✓ Pour la souche MRSA C100459 l'association de l'extrait CHCl₃ avec les β-lactames : pénicilline V, oxacilline, ampicilline et oxacilline a diminué la résistance d'un facteur allant de 1 à 4 fois, en comparaison et pour cette souche l'association extrait-pénicilline V s'est montré plus active (diminution de la CMI d'un facteur de 4).

Selon nos résultats l'extrait CHCl₃ est plus actif sur la souche MRSA98506 que sur la souche MRSA100459 en présence de l'oxacilline.

Tableau V.6: Impact de l'extrait CHCl₃ (200 µg /mL) sur la sensibilité du MRSA envers divers antibiotiques bêta-lactames

Mélange testé	CMI de l'antibiotique (µg/mL)	
	MRSA C98506	MRSA C100459
Pénicilline V seule (avec 4 % DMSO)	16	8
Pénicilline V + extrait CHCl ₃ (200 µg/mL)	8	2
Ampicilline seule (avec 4 % DMSO)	16	4
Ampicilline + extrait CHCl ₃ (200 µg/mL)	8	4
Amoxicilline seule (avec 4 % DMSO)	16	8
Amoxicilline+ extrait CHCl ₃ (200 µg/mL)	4	8
Oxacilline seule (avec 4 % DMSO)	16	4
Oxacilline + extrait CHCl ₃ (200 µg/mL)	0,5	2

Les figures V.6 et V.7 montrent les photos des tests directs CCM-bioautographie des composés (1-5) et (4,5) respectivement.

V.3.3. CCM-bioautographie

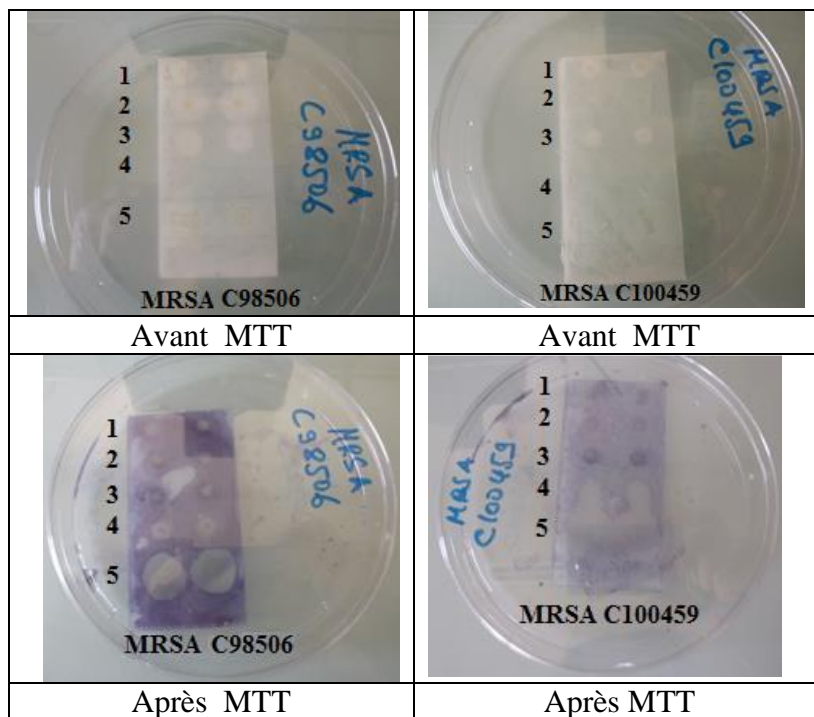


Figure V.6 : Test direct CCM-bioautographie des composés (1 - 5)

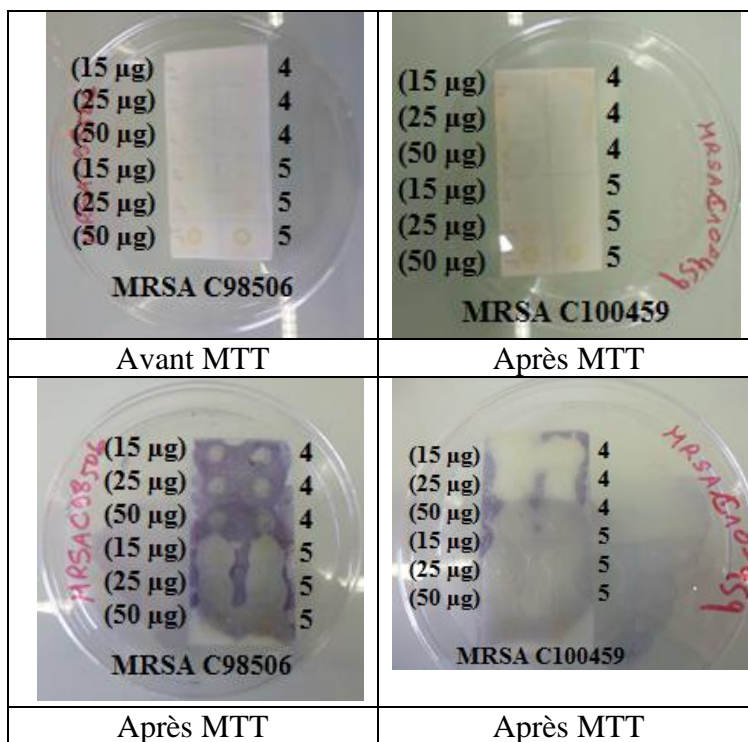


Figure V.7 : Test direct CCM-bioautographie des composés (4 & 5)

Ces figures montrent la méthode de mesure de la zone d'inhibition (Figure V.8 et Figure V.9).

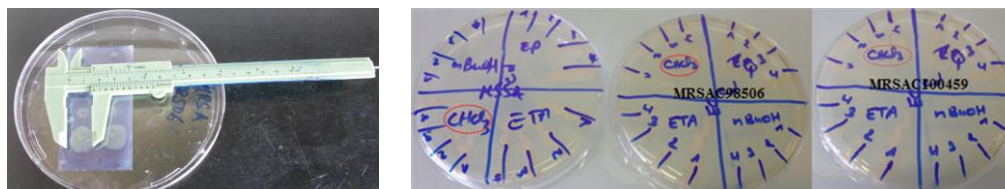


Figure V.8: Mesure de la zone d'inhibition Figure V.9 : Détermination de la CMB de l'extrait CHCl_3

Tableau V.7 : Activité antibactérienne des composés purifiés (1-5) mesurée par la méthode indirecte (CCM-bioautographie)

Composés		Zone d'inhibition en mm MRSA C98546		Zone d'inhibition en mm MRSA C100459	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Vanilline	1	4	4	0	0
(-)-Arctigénine	2	1,5	1,5	0	0
Paridol	3	2	2	0	0
Eupatiline	4	5	5	6	6
Jacéosidine	5	19	19	21	21

Tableau V.8 : Activité antibactérienne de l'eupatiline **4** et de la jacéosidine **5**, mesurée par une CCM-bioautographie sur des taches de différentes concentrations.

Composés		Zone d'inhibition en mm MRSA C98546		Zone d'inhibition en mm MRSA C100459	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Eupatiline	4 (15 μg)	7	8	22	19
Eupatiline	4 (25 μg)	6	8	17	14
Eupatiline	4 (50 μg)	8	9	20	19
Jacéosidine	5 (15 μg)	15	15	> 21	> 21
Jacéosidine	5 (25 μg)	15	17	> 21	> 21
Jacéosidine	5 (50 μg)	> 21	> 21	> 21	> 21

Tableau V.9 : Analyses de la susceptibilité au jacéosidine (5) et à la streptomycine (CMI µg/mL)

Microorganisms	CMI5	CMI streptomycine	CMI5+ streptomycine ^a	CMI5+ streptomycine ^b	FIC index ^c	Evaluation ^d
MRSA C98506	200	4	6,25	2	0,53	Additive
MRSA C100459	200	4	12,5	4	1,06	Indifférence
MRSA ATCC33591	200	2	6,25	2	1,03	Indifférence
MSSA ATCC6538	200	2	>100 = 200	>32 = 64	33	Antagonisme
<i>E. coli</i> ATCC25922	200	2	3,125	1	0,52	Additive

5 : Jacéosidine^a0,4 mg/mL La concentration de la jacéosidine^b 1,8 mg/mL La concentration de la streptomycine^cFIC: Concentration inhibitrice partielleLe FIC index (Σ FIC) est calculé comme suit : Σ FIC = FIC(A) + FIC(B)FIC index = $(CMI(A \text{ en présence de } B)) / (CMI(A \text{ seule}) + (CMI(B \text{ en présence de } A))) / (CMI(B \text{ seule}))$

L'évaluation des index FIC se fait comme suit :

- Synergie : FIC (FBC) index $\leq 0,5$
- Additive : FIC (FBC) index $> 0,5 \leq 1$
- Indifférence : $1 < \text{FIC (FBC) index} \leq 2$
- Antagonisme : FIC (FBC) index ≥ 2 [1].



Figure V.10: Analyses de la susceptibilité à la jacéosidine (5) et à la streptomycine

⇒ Conclusion

Ce chapitre reporte les résultats de nos travaux de recherche d'activités *in vitro*: cytotoxique, antibacérienne directe et indirecte et antifongique de l'extrait et des produits purs isolés. Testé sur 3 lignées cellulaires cancéreuses humaines [le carcinome du poumon non à petites cellules A549 (NSCLC), l'adénocarcinome du sein MCF7 et le glioblastome astrocytaire U373] en utilisant le test colorimétrique du MTT, l'extrait CHCl₃ a réduit la viabilité cellulaire avec des IC₅₀s de 27, 25 et 21 µg/mL sur A549, MCF7 et U373, respectivement. Bien qu'inactif contre 7 des microorganismes testés, cet extrait a pu potentialiser l'effet des antibiotiques β-lactame sur le (*SARM*), en réduisant les concentrations inhibitrices minimales (CMI) par un facteur de 2 à 32 fois. Aucune synergie n'a été trouvée entre l'extrait et la streptomycine. Les 5 composés isolés et identifiés ont été évalués d'une part pour leur activités cytotoxiques sur six lignées cellulaires cancéreuses (A549, MCF7, U373, gliome humain Hs683, prostate humaine PC3 et mélanome murin B16-F10) et d'autre part pour leurs activités antibactériennes directes et indirectes à l'aide de la CCM -bioautographie et des méthodes de microdilution. Des effets cytotoxiques modérés ont été observés pour :

- ⇒ la (-) – arctigénine **2** avec des IC₅₀s : 28 et 33 µM sur Hs683 et B16-F10, respectivement.
- ⇒ l'eupatiline **4** avec des IC₅₀s : 33 et 47 µM sur B16-F10 et PC3, respectivement
- ⇒ la jacéosidine **5** avec des IC₅₀s : 32 et 40 µM sur PC3 et B16-F10, respectivement

Concernant l'activité antibactérienne, parmi les cinq composés isolés et testés, seule la jacéosidine **5** présentait une activité antimicrobienne modérée (MIC de 200 µg/mL sur MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC33591, MSSA ATCC6538, *E. coli* ATCC25922).

Références bibliographiques

- [1] Mackay ML, Milne K, Gould IM. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions., *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15:125-129.
- [2] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 2005; 76: 744-746.
- [3] Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001; 8: 401-409.
- [4] Susanti S, Iwasaki H, Itokazu Y, Nago M, Taira N, Saitoh S, et al. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctiumlappa* L. *J Nat Med* 2012; 66:614-621.
- [5] Lu Z, Cao S, Zhou H, Hua L, Zhang S, Cao J. Mechanism of Arctigenin-Induced specific cytotoxicity against human hepatocellular carcinoma cell lines: Hep G2 and SMMC7721. *PLoS One* 2015; 10(5):e0125727.
- [6] Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, et al. Bioactivity-guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* 2010; 24:1664-1669.
- [7] Cho JH, Lee J G, Yang YI, Kim JH, Ahn JH, Baek NI, et al. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(8):1737-1744.
- [8] Son JE, Lee E, Seo SG, Lee J, Kim JE, Kim J, et al. Eupatilin, a major flavonoid of *Artemisia*, attenuates aortic smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting PI3K, MKK3/6, and MKK4 activities. *Planta Med* 2013; 79(12):1009-16.
- [9] Lee JG, Kim JH, Ahn, JH, Lee KT, Baek NI, Choi JH. Jaceosidin, isolated from dietary mugwort (*Artemisiaprinceps*), induces G2/M cell cycle arrest by inactivating cdc25C-cdc2 via ATM-Chk1/2 activation. *Food Chem Toxicol* 2013; 55:214-221.

Conclusion générale

&

Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Les espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae) constituent un domaine de recherche de substances naturelles intéressant vu les résultats des études que nous avons menées dans notre unité de recherche [1-6] et les résultats reportées dans la littérature [7-13]. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont concerné une espèce de ce genre (*C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. et Dur.), endémique à l'Algérie et au Maroc et qui n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques ni biologiques auparavant.

Après la collecte du matériel végétal en période de floraison, les travaux ont débuté par une macération des feuilles et des fleurs (1,5 kg) dans une solution hydro-alcoolique. L'extrait obtenu après concentration à pression réduite (35°C) est dilué avec de l'eau distillée (600 ml) puis successivement épuisé à l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

Nos investigations ont concerné l'extrait chloroforme et ont débuté par l'évaluation *in vitro* de ses activités antifongique et antimicrobienne directes et indirectes à l'aide des méthodes de microdilution, et cytotoxique sur 3 lignées cellulaires cancéreuses humaines [le carcinome du poumon non à petites cellules A549 (NSCLC), l'adénocarcinome du sein MCF7 et le glioblastome astrocytaire U373] en utilisant le test colorimétrique du MTT. Bien qu'inactif contre 7 des microorganismes testés (*Pseudomonas syringae* DC 3000, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* sporulent, *Cladosporium cucumerinum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotricum lagenarium*, *Rhodotorula aurantiaca*), cet extrait a pu potentialiser l'effet des antibiotiques bêta-lactame sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), en réduisant les concentrations inhibitrices minimales (CMI) par un facteur de 2 à 32 fois. Aucune synergie n'a été trouvée entre l'extrait et la streptomycine. Dans les tests de recherche de cytotoxicité, cet extrait chloroforme a réduit la viabilité cellulaire avec des IC₅₀s de 27, 25 et 21 µg/mL sur A549, MCF7 et U373, respectivement.

Ces résultats biologiques encourageants nous ont incités à procéder à l'investigation phytochimique de cet extrait afin de déterminer le ou les produits responsables de ces activités. Ainsi l'extrait CHCl₃ a été soumis à un fractionnement suivi de séparations et de purifications sur du gel de silice 60 (CC et CCM).

Neuf composés ont été isolés dont cinq ont été caractérisés par la combinaison des analyses spectrales, principalement la HR-ESIMS, la HR-EIMS, l'UV et la RMN (^1H , ^{13}C , COSY, ROESY, HSQC et HMBC) et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles rapportées dans la littérature. Il s'agit de :

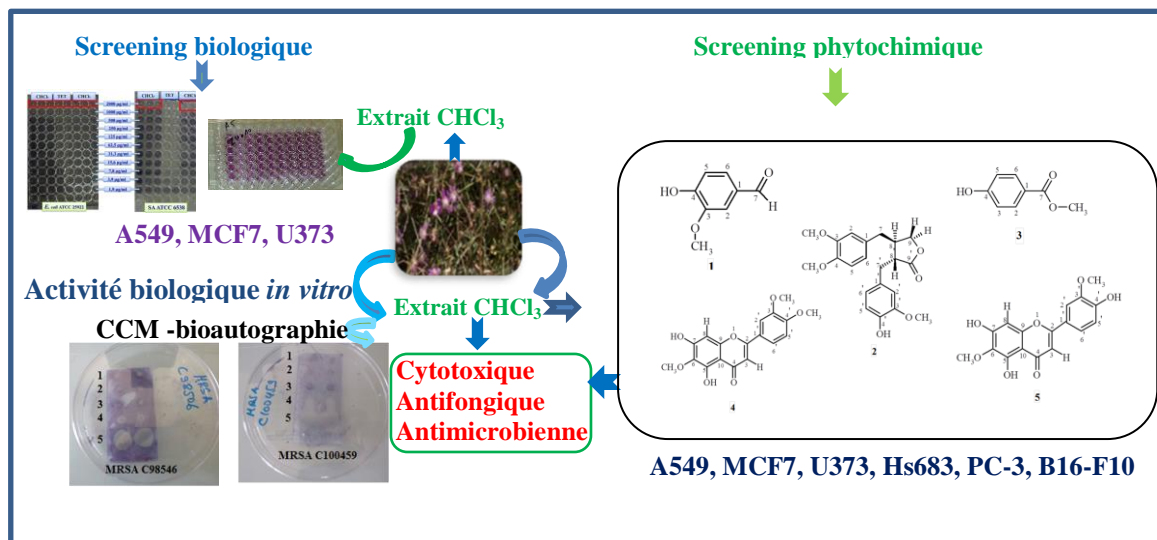
- ⇒ la vanilline **1**
- ⇒ la (-)-arctigénine **2**
- ⇒ le paridol **3**
- ⇒ l'eupatiline **4**
- ⇒ la jacéosidine **5**

Ces 5 composés ont été évalués d'une part pour leur activités cytotoxiques sur six lignées cellulaires cancéreuses (A549, MCF7, U373, gliome humain Hs683, prostate humaine PC3 et mélanome murin B16-F10) et d'autre part pour leurs activités antibactériennes directes et indirectes à l'aide de la CCM -bioautographie et des méthodes de microdilution. Des effets cytotoxiques modérés ont été observés pour :

- ⇒ la (-) – arctigénine **2** avec des IC_{50} s: 28 et 33 μM sur Hs683 et B16-F10, respectivement
- ⇒ l'eupatiline **4** avec des IC_{50} s: 33 et 47 μM sur B16-F10 et PC3, respectivement
- ⇒ la jacéosidine **5** avec des IC_{50} s: 32 et 40 μM sur PC3 et B16-F10, respectivement

Concernant l'activité antibactérienne, parmi les cinq composés isolés et testés, seule la jacéosidine **5** présentait une activité antimicrobienne modérée (MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC33591, MSSA ATCC6538, *E. coli* ATCC25922).

Résumé graphique



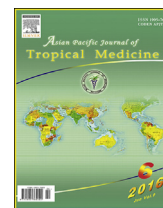
Perspectives

L'identification de cinq composés, la vanilline, la (-) - arctigénine, le paridol, l'eupatiline et la jacéosidine, des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. et Dur.) M. (Asteraceae) est en accord avec la composition chimique des centaurees. Ce résultat et ceux des recherches d'activités biologiques font qu'il est surprenant qu'aucun rapport n'ait été publié jusqu'à présent sur d'éventuelles utilisations ethnomédicales de cette espèce. Cela peut être dû à une faible répartition de cette plante ou à une éventuelle toxicité qui aurait pu décourager son utilisation dans la tradithérapie ; cela justifierait une enquête. Un effet prometteur sur la résistance bactérienne doit être davantage examiné pour identifier le ou les composés capable(s) de renverser la résistance bactérienne du bêta-lactame.

Références bibliographiques

- [1] Benayache F, Benayache S, Medjroubi K, Massiot G, Aclino P, Drodz B, Nowak G. Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata*. *Phytochemistry* 1992; 31, 4360.
- [2] López-Rodríguez M, García V P, Zater H, Benayache S, Benayache F. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Cryst* 2009; E65: o1867-o1868.
- [3] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. Flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett* 2009; 2:114-118.
- [4] Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, Brouard I, Bermejo J, Benayache S. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *J Braz Chem Soc* 2012; 23(5): 977-983.
- [5] Kitouni R, Benayache F, Benayache S. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chem Nat Compd* 2015; 51(4): 762-763.
- [6] Belkacem S, Belbache H, Boubekri C, Mosset P, Rached- Mosbah O, Marchioni E, et al. Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2014; 5 (3): 1275-1279.
- [7] Shoeb M, MacManus SMM, Nahar L, Jaspars M, Celik S, Sarker SD, Lin KT. P. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Braz J Pharmacogn* 2007; 17: 155-159.
- [8] Shoeb M, Jaspars M, MacManus S, Celik S, Kong-Thoo-Lin P, Sarker S. Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from *Centaurea dealbata*. *Ars Pharm* 2006; 47(4): 315-322.
- [9] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J Serb Chem Soc* 2011; 76 (1) 27-34.

- [10] Csapi B, Hajdu Z, Zupko I, Berenyi A, Forgo P, Szabo P, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* 2010; 24: 1664-1669.
- [11] Djeddi S, Karioti A, Sokovic M, Stojkovic D, Seridi R, Skaltsa H. Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. *J Nat Prod* 2007; 70(11):1796-1799.
- [12] Sayed A A , Emadeldin MK. Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Centaurea scoparia*. *The Scientific World Journal* 2014; 1-7.
- [13] Sahin Yaglioglu A, Demirtas I, Goren N. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiiformis* DC. *Phytochem Lett* 2014;8:213-219.



HOSTED BY



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: <http://ees.elsevier.com/apjtm>Original research <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.016>Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) MaireHanène Zater^{1,2,3}, Joëlle Huet⁴, Véronique Fontaine⁵, Samir Benayache¹, Caroline Stévigny³, Pierre Duez^{3,6*}, Fadila Benayache^{1*}¹Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria²Université Ziane Achour, Cité du 5 Juillet, Route Moudjbara BP: 3117, 17000 Djelfa, Algeria³Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Bruxelles, Belgium⁴Laboratoire de Biopolymère et Nanomatériaux Supramoléculaire, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Bruxelles, Belgium⁵Unité de Microbiologie Pharmaceutique et Hygiène, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Bruxelles, Belgium⁶Service de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie, Université de Mons (UMONS), 7000 Mons, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 Feb 2016

Received in revised form 16 Mar 2016

Accepted 8 Apr 2016

Available online 23 Apr 2016

Keywords:

Flavonoids

Lignans

Centaurea diluta

Asteraceae

Cytotoxic activity

ABSTRACT

Objective: To investigate the chemical composition of a moderately polar extract (CHCl₃ soluble part of the MeOH–H₂O extract) obtained from the aerial parts (leaves and flowers) of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire, a species endemic to Algeria and Morocco on which no reports are available to date. To evaluate *in vitro* the cytotoxic, antifungal and antimicrobial activities of this extract and the cytotoxic and antimicrobial activities of its isolated secondary metabolites.

Methods: The cytotoxic effects of the extract were investigated on 3 human cancer cell lines i.e. the A549 non-small-cell lung carcinoma (NSCLC), the MCF7 breast adenocarcinoma and the U373 glioblastoma using a MTT colorimetric assay. Biological data allowed to guide the fractionation of the extract by separation and purification on silica gel 60 (CC and TLC). The isolated compounds which were characterized by spectral analysis, mainly HR-ESIMS, HR-EIMS, UV and NMR experiments (¹H, ¹³C, COSY, ROESY, HSQC and HMBC) and comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature, were evaluated for cytotoxic activities on six cancer cell lines (A549, MCF7, U373, Hs683 human glioma, PC3 human prostate and B16-F10 murine melanoma). The direct and indirect antibacterial and antifungal activities were determined using microdilution methods for the raw extract and TLC-bioautography and microdilution methods against standard and clinical strains for the isolated compounds.

Results: The raw extract reduced cell viability with IC₅₀s of 27, 25 and 21 µg/mL on A549, MCF7 and U373, respectively. Five secondary metabolites: two phenolic compounds (vanillin **1**, paridol **3**), a lignan [(–)-arctigenin **2**] and two flavonoid aglycones (eupatilin **4** and jaceosidin **5**), were then isolated from this extract. Moderate cytotoxic effects were observed for (–)-arctigenin **2** (IC₅₀s: 28 and 33 µM on Hs683 and B16-F10, respectively), eupatilin **4** (IC₅₀s: 33 and 47 µM on B16-F10 and PC3, respectively) and jaceosidin **5** (IC₅₀s: 32 and 40 µM on PC3 and B16-F10, respectively).

Conclusions: All the isolated compounds were described for the first time from this species. Although inactive against 7 tested microorganisms (fungi, bacteria and yeast, human or plant pathogens), the raw extract was able to potentiate the effect of beta-lactam

*Corresponding authors. Pierre Duez, Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Bruxelles, Belgium; Fadila Benayache, Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

Tel/Fax: +213 31 81 11 03

E-mails: pierre.duez@umons.ac.be, fbenayache@yahoo.fr

Peer review under responsibility of Hainan Medical College.

antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), reducing the minimal inhibitory concentrations (MICs) by a factor of 2–32-fold. No synergy was found between the extract and streptomycin. From the five isolated compounds only jaseosidin **5** showed a moderate antimicrobial activity.

1. Introduction

The genus *Centaurea* (tribe Cynareae, family Asteraceae) is one of the most widely distributed plant genera in the world. *Centaurea* includes more than 500 species, 45 of which grow spontaneously in Algeria, with 7 species localized in the Sahara [1,2]. Although, to our best knowledge, no traditional uses or pharmacological studies are reported so far for the species *Centaurea diluta* (*C. diluta*), many other *Centaurea* species are well known in traditherapy. For example, in Turkey, dried flowers of *Centaurea cyanus* are used in infusion to relieve diarrhea, gain energy, increase appetite, and to relieve chest tightness; *Centaurea calcitrapa* is used (infusion) as a febrifuge; *Centaurea jacea* is used to reduce fever, to start menstruation, to relieve constipation and increase appetite [3,4]. In Tunisia, *Centaurea furfuracea*, an endemic species from the desert regions of the North of Africa [5], is used as astringent and diuretic [6], while, in Algeria, the roots of *Centaurea incana* are used in the area of Aurès for the treatment of liver diseases [7] and *Centaurea pullata* is used in the preparation of a local traditional dish called “El Hammama” [8]. Various studies have shown medicinal properties of *Centaurea* species, mainly as analgesic [9], cytotoxic [10], antibacterial [11] and antifungal [12].

Centaurea typically present high structural diversity in major bioactive compounds, including triterpenes, flavonoids, lignans and sesquiterpene lactones [13–21]. In specimens of *C. diluta*, cultivated in the botanical garden of Technical University of Braunschweig, Germany, polyacetylenic compounds have been reported [22–24]. In the essential oil of *C. diluta* Aiton aerial parts, collected from Sicily, Italy [25], the most abundant compounds were fatty acids and derivatives, notably hexadecanoic acid (21.3%) and (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid methyl ester (12.2%), followed by hydrocarbons (15.3%), terpenoids being present in low amounts (2.8%).

Given the interest of *Centaurea* pharmacology and phytochemistry, the present paper concentrates on a relatively unknown subspecies, *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Durieu) Maire [26], endemic to Algeria and Morocco [2].

2. Material and methods

2.1. Chemicals, reagents and general

Solvents were analytical grade. Trypsin 0.5% in EDTA, RPMI1640 red phenol and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco® Invitrogen (Merelbeke, Belgium). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was obtained from Sigma Aldrich® (Bornem, Belgium). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Merck® (Overijse, Belgium). RNase-free water was from Braun® (Machelen, Belgium). The Penicillin V was purchased from

Certa SA ACA Pharma NV, the ampicillin, amoxicillin and oxacillin were purchased from Sigma–Aldrich.

The absorbance of the reaction mixture of MTT test was measured by spectrophotometer microplate reader Model 680XR, Bio-Rad®, Nazareth Eke (Belgium). The cells were counted by Cells Culture Counter, Beckman (Analisis®, Suarlée, Belgium). The following apparatus were also used: optical microscope PCM-type Axiovert S100 (Zeiss, Netherlands) and laminar flow hood class II (IKS®, Leerdam, Netherlands).

Melting points were determined on a SMP10 Büchi B-540 Stuart Biocote apparatus and are uncorrected. Plant material powdering: Mill: Culatti, CZ13 model, Reference DCFH48. TLC: pre-coated aluminum foil silica gel 60 F₂₅₄ & TLC silica gel 60 F₂₅₄ Plastic roll 500 × 20 cm (Merck KGaA, Germany), visualized using UV lamp (CAMAG 254 nm & 366 nm) and by detection with a spraying reagent (vanillin-sulfuric at 10% and/or anisaldehyde) followed by heating at 100 °C for 3–5 min. Column chromatography (CC): silica gel 60 (Merck KGaA, Germany, 230–400 mesh ASTM). Routine preparative thin-layer chromatography (PLC): silica gel plates (20 × 20 cm Silica gel 60 PF₂₅₄, Merck), Optical rotation: Perkin–Elmer 241 polarimeter at λ_{Na} 589 nm.

UV spectra were recorded using a Thermo Electron Corporation evolution 300 spectrophotometer. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300, 400 MHz and Varian 600 MHz; 2D-NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC, NOESY and ROESY) were performed on Bruker Avance 400 MHz or Varian 600 MHz spectrometers. Spectra of compounds **1**, **2** and **3** were recorded in CDCl₃, compound **4** in DMSO-*d*₆ and compound **5** in CD₃OD. A Shigemi tube was used for compound **2**.

High resolution mass spectra in positive mode were recorded by direct infusion using a 6520 series quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) fitted with an electrospray ionization (ESI) source in positive mode. The error between the observed and calculated masses is expressed in ppm; below 5 ppm, the compounds were considered to correspond to predicted formula.

2.2. Plant material

The aerial parts of *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) were collected in the flowering stage in the area of Djelfa (1038 m, 34° 53' 39.6" N, 3° 3' 56.3" E) in June 2012. The plant was authenticated by Professor Mohamed Kaabache, specialist in the identification of Algerian *Centaurea* species (Ferhat Abbas University, Setif, Algeria). A voucher specimen has been deposited in the National Herbarium of Belgium (National Botanical Garden of Meise) under the number BR0000013666187.

2.3. Extraction and isolation

Air-dried aerial parts (leaves and flowers, 1.5 kg) of *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) were powdered (slight grinding with controlled temperature, up to 35 °C) and macerated at room temperature with MeOH–H₂O (77:23, v/v) (25 L) for 48 h, four times. The filtrates were combined, concentrated under reduced pressure, diluted in H₂O (600 mL) under magnetic stirring and maintained at 4 °C for one night to precipitate a maximum of chlorophylls. After filtration, the resulting solution was successively extracted with solvents with increasing polarities (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol) [27,28]. The present study focused on the chloroform soluble part which was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum at room temperature to yield the CHCl₃ extract (4.0 g, yield: 0.27%, w/w). The chloroform extract was fractionated by column chromatography (120 g of silica gel; CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH step gradients) to yield 23 fractions (F₁–F₂₃), combined according to their TLC profiles.

Fraction F₃ (26.2 mg) (CH₂Cl₂/EtOAc 98:2) was subjected to preparative TLC on silica gel; eluting with petroleum ether/EtOAc/acetone (6:3:1) yielded vanillin **1** as white crystals (3.5 mg) [29,30].

Fractions F₄ (12.2 mg) (CH₂Cl₂/EtOAc 98:2), F₅ (13.0 mg) (CH₂Cl₂/EtOAc 98:2) and F₆ (28.5 mg) (CH₂Cl₂/EtOAc 95:5) were combined and rechromatographed by CC (600 mg of silica gel; cyclohexane/EtOAc/acetone step gradients) to yield 21 subfractions (F'₁–F'₂₁) according to TLC profiles. Subtraction F'₃ (cyclohexane/EtOAc/acetone 6:6:2) yielded (–)-arctigenin **2** (3.2 mg) [17,31] and subtraction F'₄ (cyclohexane/EtOAc/acetone 5:2.5:2.5) gave paridol **3** (4.5 mg) [32,33].

Fraction F₈ (CH₂Cl₂/EtOAc 95:5) (44.4 mg) yielded up on concentration a yellowish compound which was washed with MeOH to obtain eupatilin **4** (7.5 mg) as needles [11,34]. Fraction F₁₀ (CH₂Cl₂/EtOAc 87.5:12.5) (19.60 mg) was chromatographed on preparative plates of silica gel eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (4:1) to give jaceosidin **5** as a yellowish powder (5.0 mg) [35,36].

2.4. Cell cultures

The human cancer cell lines included the A549 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ code ACC107), NSCLC carcinoma, the U373 (European Collection of Cell Culture, ECACC 08061901) glioblastoma, the PC3 prostate carcinoma (DSMZ code ACC465), the Hs683 glioma (American Type Culture Collection, ATCC code HTB-138) and the MCF7 (DSMZ code ACC115) breast adenocarcinoma. The murine tumor cell line included the B16-F10 (American Type Culture Collection ATCC code CRL-6475) melanoma.

2.4.1. Viability assay

The cytotoxic properties of the raw chloroform extract and isolated compounds were assessed, using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [37,38]. Briefly, this test is based on the capability of living cells to reduce the yellow MTT to a blue formazan compound, a reaction mediated by the mitochondrial succinate dehydrogenase. Cells were seeded (cells per well, A549: 1500; B16F10: 1000; Hs683: 1500; MCF7: 2800; PC3:

3000; U373: 1800) and allowed to adhere for 24 h before adding test compounds (100 μL; final concentrations from 10⁻⁴ M to 10⁻⁸ M). In the same condition, for the chloroform extract, cells were seeded (cells per well, A549: 1200; MCF7: 2500; U373: 1800; 100 μL; final concentrations from 100 μg/mL to 10⁻² μg/mL). The cells in medium alone without drug were considered as a negative control. After 72 h contact, the culture medium was replaced by a 0.5 mg/mL MTT solution in RPMI medium without phenol red (100 μL/well). After 3 h incubation, the formazan crystals were centrifuged and dissolved in 100 μL/well of DMSO. The absorbance of each well was then measured at 570 nm and 690 nm (reference) wavelength. The IC₅₀ values were calculated as follows:

$$IC_{50} = [(X_2 - X_1) \times (50 - Y_1)/(Y_2 - Y_1)] + X_1, \text{ where.}$$

X₁ and X₂: are the higher and lower concentrations that border the concentration that reduces the global cell growth by the value closest to 50%.

Y₁ and Y₂: are the mean percentages of viable cells at the X₁ and X₂ concentrations.

2.5. Antimicrobial and antifungal assays

2.5.1. Microorganisms

The microorganisms used in the antimicrobial tests were: (1) Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus* ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* C98506 (*S. aureus* C98506), *Staphylococcus aureus* C100459 (*S. aureus* C100459) and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (*S. aureus* ATCC 33591); (2) Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* ATCC 25922) and a plant pathogen: *Pseudomonas syringae* DC 3000; (3) plant pathogen fungi: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* sporulent, *Cladosporium cucumerinum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium* and *Pythium aphanidermatum*; and (4) a plant pathogen yeast: *Rhodotorula aurantiaca*. The ATCC strains were obtained from the American Type Culture Collection; strains C98506 and C100459 were clinical isolates, a generous gift from the Centre Hospitalier Universitaire of Charleroi, Belgium (Mr. Lerson). Strains C98506, C100459 and ATCC 33591 are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The different plant pathogens were provided by the Centre Wallon de Biologie Industrielle, Bio-Industrie Unité Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 5030 Gembloux, Belgique (Dr. Ongena).

2.5.2. Direct and indirect antimicrobial effects

Direct and indirect antibacterial effects were evaluated by a broth microdilution method [39].

The raw extract and isolated compounds, dissolved in DMSO, were further diluted in Mueller Hinton broth (MHB), the final DMSO concentration being maximum 4%. These solutions were transferred into 96-wells plates and serially diluted using MHB. The bacterial inoculum prepared from an overnight culture, diluted in 0.85% NaCl to achieve 0.5 Mc Farland (10⁸ cells/mL), was further diluted 1/100 to be inoculated in the 96-wells plates (100 μL/well). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, added with an aqueous solution of MTT (0.8 mg/mL) and reincubated for 4 h. The minimum inhibitory

concentrations (MIC) were the lowest concentrations that completely inhibited the growth of microorganisms, detected by unaided eyes using the MTT staining.

2.5.3. Direct and indirect antibacterial bioautography

TLC was performed for the extract and the purified compounds on precoated silica gel 60 F₂₅₄ glass plates (Merck, Darmstadt, Germany). Plates were thoroughly dried at room temperature. One mL of 0.5 Mc Farland microorganism suspension was added to 9 mL MH agar (10⁷ CFU/mL) at 37 °C and poured on the TLC plates. After solidification, the plates were incubated overnight at 37 °C. The bioautography was subsequently visualized by spraying MTT (0.8 mg/mL) followed by an additional incubation at 37 °C for 4 h [40].

To study indirect antibacterial activity against MRSA, a sub-inhibitory concentration of penicillin V (1 µg/mL) was incorporated in the mixture of MHB and agar; products with no direct antibacterial activity were selected, chromatographed, and bioautographed with this medium as described above.

3. Results

3.1. Structural elucidation of compounds 1–5

The structures of the isolated compounds were established by spectral analysis, mainly UV–Vis, HRESI-MS, ¹H-, ¹³C-, and 2D-NMR (COSY, ROESY, HSQC and HMBC) as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.

Vanillin 1: White crystals; MP = 82 °C; UV (MeOH) λ_{max}(nm): 230, 279, 309; HRESI-QTOF-MS (positive mode) *m/z*: 153.0545 [M+H]⁺ (calculated for C₈H₉O₃: 153.0546), 175.0372 [M+Na]⁺ (calculated for C₈H₈O₃Na: 175.0366), 191.0216 [M+K]⁺ (calculated for C₈H₈O₃K: 191.0105), measured exact mass: 152.0471 (calculated for C₈H₈O₃: 152.0473), molecular formula C₈H₈O₃; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*/Hz): 9.83 (1H, s, H-7), 7.44 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.41 (1H, dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, H-6), 7.03, (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 6.62 (1H, brs, 4-OH), 3.98 (3H, s, OCH₃-3); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.86 (C, C-7), 151.62 (C, C-4), 147.05 (C, C-3), 130.33 (C, C-1), 127.45 (CH, C-6), 114.04 (CH, C-5), 108.75 (CH, C-2), 56.40 (CH₃, OCH₃-3).

(-)-Arctigenin **2:** White powder; MP = 103 °C; [α]_D²⁰ = -17.27° (EtOH, *c*, 0.145); HRESI-QTOF-MS (positive mode) *m/z*: 373.1655 [M+H]⁺ (calculated for C₂₁H₂₅O₆: 373.1646), 395.1478 [M+Na]⁺ (calculated for C₂₁H₂₄O₆Na: 395.1467), measured exact mass: 372.1569 (calculated for C₂₁H₂₄O₆: 372.1577). These data led to the molecular formula C₂₁H₂₄O₆; HRESI-QTOF-MS/MS: *m/z*: 355.1556 [M+H-H₂O]⁺ (C₂₁H₂₃O₅) which confirm the presence of a hydroxyl group; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*/Hz): 6.80 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5'), 6.72 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.62 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2'), 6.59 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, H-6'), 6.53 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2), 5.50 (1H, brs, 4'-OH), 4.12 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.4 Hz, H-9α), 3.87 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.6 Hz, H-9β), 3.83 (3H, s, OCH₃-3'), 3.80 (3H, s, OCH₃-4), 3.79 (3H, s, OCH₃-3), 2.92 (1H, dd, *J* = 14.1, 5.3 Hz, H-7'a), 2.89 (1H, dd, *J* = 14.1, 7.1 Hz, H-7'b), 2.61 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, H-7a), 2.54 (1H, m, H-8'), 2.52 (1H, m*, H-7b), 2.47 (1H, m, H-8), *: partially overlapped by the signal of H-8'; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

178.96 (C, C-9'), 149.24 (C, C-3), 148.05 (C, C-3'), 146.91 (C, C-4), 144.76 (C, C-4'), 130.65 (C, C-1), 129.72 (C, C-1'), 122.32 (CH, C-6'), 120.80 (CH, C-6), 114.31 (CH, C-5'), 111.97 (CH, C-2'), 111.71 (CH, C-2), 111.48 (CH, C-5), 71.53 (CH₂, C-9), 56.12 (CH₃, OCH₃-4), 56.07 (CH₃, OCH₃-3'), 56.02 (CH₃, OCH₃-3), 46.82 (CH, C-8'), 41.14 (CH, C-8), 38.42 (CH₂, C-7), 34.74 (CH₂, C-7'). Our results which were confirmed by the analysis of the ROESY spectrum experiment complete the spectroscopic data previously reported for this molecule [31,41].

Paridol 3: White powder; MP = 128 °C; HRESI-QTOF-MS (positive mode) *m/z*: 153.0544 [M+H]⁺ (calculated for C₈H₉O₃: 153.0546), 175.0369 [M+Na]⁺ (calculated for C₈H₈O₃Na: 175.0369), 343.0543 [2M+K]⁺ (calculated for C₁₆H₁₆O₆K: 343.0546), measured exact mass: 152.0472, (calculated for C₈H₈O₃: 152.0473), molecular formula C₈H₈O₃.

HRESI-QTOF-MS/MS of [M+H]⁺: 153.0547 [M+H]⁺, 135.0239 [M+H-H₂O]⁺, 121.0289 [M+H-CH₃OH]⁺, these two last ions confirmed the presence of the hydroxyl and methoxyl groups in the molecule; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*/Hz): 7.95 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2 & H-6), 6.86 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3 & H-5), 5.98 (1H, brs, 4-OH), 3.88 (3H, s, OCH₃-7); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.08 (C, C-7), 159.90 (C, C-4), 132.06 (CH, C-2 & C-6), 122.93 (C, C-1), 115.33 (CH, C-3 & C-5), 52.08 (CH₃, OCH₃-7).

Eupatilin 4: Yellow crystals; MP = 236 °C; UV (MeOH) λ_{max}(nm): 276, 340; +NaOH: 276, 320, 360 (with hypochromic effect); +AlCl₃: 282, 368; +AlCl₃ + HCl: 283, 361; +NaOAc: 276, 366; +NaOAc + H₃BO₃: 276, 357; HRESI-QTOF-MS (positive mode) *m/z*: 345.0968 [M+H]⁺ (calculated for C₁₈H₁₇O₇: 345.0969), 367.0788 [M+Na]⁺ (calculated for C₁₈H₁₆O₇Na: 367.0788), 383.0537 [M+K]⁺ (calculated for C₁₈H₁₆O₇K: 383.0528), 689.1736 [2M+H]⁺ (calculated for C₃₆H₃₃O₁₄: 689.1865), 712.1717 [2M+Na]⁺ (calculated for C₃₆H₃₂O₁₄Na: 712.1718), 727.1077 [2M+K]⁺ (calculated for C₃₆H₃₂O₁₄K: 712.1424), measured exact mass: 344.0888 (calculated for C₁₈H₁₆O₇: 344.0896), molecular formula C₁₈H₁₆O₇; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm, *J*/Hz): 13.04 (1H, s, OH-5), 7.68 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.13 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.97 (1H, s, H-3), 6.64, (1H, s, H-8), 3.88(3H, s, 3'-OCH₃), 3.85, (3H, s, 4'-OCH₃) 3.75, (3H, s, 6-OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆); δ (ppm): 182.01 (C, C-4), 163.26 (C, C-2), 157.12 (C, C-7), 152.83 (C, C-5), 151.96 (C, C-9), 149.06 (C, C-4'), 148.84 (C, C-3'), 131.11 (C, C-6), 122.83 (C, C-1'), 120.10 (CH, C-6'), 111.55 (CH, C-5'), 109.26 (CH, C-2'), 104.22 (C, C-10), 103.36 (CH, C-3), 94.33 (CH, C-8), 59.97 (CH₃, OCH₃-6), 55.88 (CH₃, OCH₃-4'), 55.76 (CH₃, OCH₃-3').

Jaceosidin 5: Yellowish powder; MP = 237 °C, UV (MeOH) λ_{max}: 276, 346; +NaOH: 276, 314, 360 (with hyperchromic effect); +AlCl₃: 282, 368; +AlCl₃ + HCl: 283, 361; +NaOAc: 278, 366; +NaOAc + H₃BO₃: 276, 357; HRESI-QTOF-MS (positive mode) *m/z*: 331.0811 (calculated for C₁₇H₁₅O₇: 331.0812), 353.0625 [M+Na]⁺ (calculated for C₁₇H₁₄O₇Na: 353.0632), 661.1542 [2M+H]⁺ (calculated for C₃₄H₂₉O₁₄: 661.1552), 683.1485 [2M+Na]⁺ (calculated for C₃₄H₂₈O₁₄Na: 683.1371), 701.0942 [2M+K]⁺ (calculated for C₃₄H₂₈O₁₄K: 701.1137), 991.2454 [3M+H]⁺ (calculated for C₅₁H₄₃O₂₁: 991.2291), measured exact mass: 330.0744, (calculated for C₁₇H₁₄O₇: 330.0740), molecular formula C₁₇H₁₄O₇; ¹H NMR

(400 MHz, CH₃OH-d₄) δ (ppm, *J*/Hz): 7.52 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.50 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 7.48 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.94 (1H, s, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 3.96 (3H, s, OCH₃-3'), 3.88 (3H, s, OCH₃-6). ¹³C NMR (75 MHz, CH₃OH-d₄) δ (ppm): 184.21 (C, C-4), 166.36 (C, C-2), 158.92 (C, C-7), 154.83 (C, C-5), 154.70 (C, C-9), 151.70 (C, C-4'), 149.44 (C, C-3'), 132.92 (C, C-6), 123.90 (C, C-1'), 121.64 (C, C-6'), 116.91 (CH, C-5'), 110.34 (CH, C-2'), 105.58 (C, C-10), 103.59 (CH, C-3), 95.65 (CH, C-8), 61.04 (CH₃, OCH₃-6), 56.50 (CH₃, OCH₃-3').

3.2. Biological activities

3.2.1. Cytotoxic effects

The CHCl₃ extract showed cell growth inhibitory activity against all 3 tested cell lines in the μ g/mL range (Figure 1). These results are in agreement with previous data from an Algerian *Centaurea* species; the raw chloroformic extract of *Centaurea musimomum* (*musimomum*) Maire showed on KB cells, cytotoxic activity with growth inhibition of 89% at 10 μ g/mL and 26% at 1 μ g/mL [10].

The evaluation of the isolated compounds 1 to 5 indicated moderate growth inhibitory/cytotoxic activities for eupatilin 4

(33–85 μ M), jaceosidin 5 (32–49 μ M), and (–)-arctigenin 2 (28–82 μ M) (Figure 1).

Our results showed that the chloroformic extract displayed more significant cytotoxic effects on cancer cells A549, MCF7 and U373 than the isolated pure compounds. This could be attributed to the synergetic interactions, more especially as this extract contains flavonoids for which it is thought that they may have a role to play in increasing the biological activity of other compounds by synergistic or other mechanisms [42].

3.2.2. Antifungal and antimicrobial activities

Although inactive against 7 tested microorganisms (fungi, bacteria and yeast, human or plant pathogens, Table 1), the raw extract was able to potentiate the effect of beta-lactam antibiotics on methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), reducing the minimal inhibitory concentrations (MICs) by a factor of 2-32-fold (Table 2). In a direct antibacterial TLC-bioautography assay, compound 5 (jaceosidin), showed the highest activity (Tables 3 and 4). This was further investigated in a direct antibacterial assay, but the activity was relatively quite low on Gram positive and negative bacteria (MIC of 200 μ g/mL on MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC 33591, MSSA ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922).

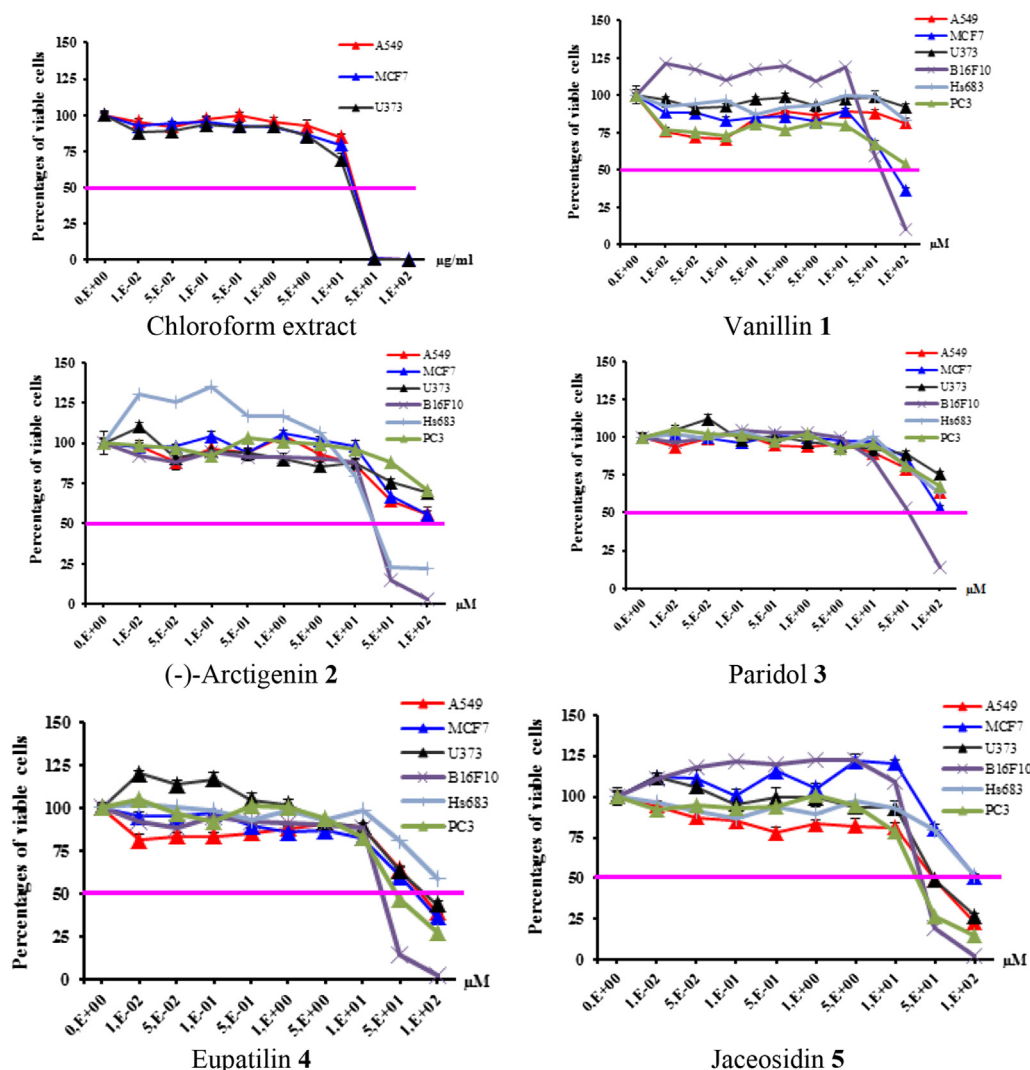


Figure 1. Cytotoxic effects (IC₅₀) of the chloroform extract and the isolated compounds on different tumor cell lines.

Table 1MIC of the chloroform extract ($\mu\text{g/mL}$).

Microorganisms tested		MIC $\mu\text{g/mL}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Gram+	2000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram–	2000
<i>Pseudomonas syringae</i> DC 3000	Gram–	^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fungus	^a
<i>Fusarium oxysporum</i> sporulent	Fungus	^a
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Fungus	^a
<i>Botrytis cinerea</i>	Fungus	^a
<i>Colletotricum lagenarium</i>	Fungus	^a
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Fungus	^a

^a No effect at 250 $\mu\text{g/mL}$, the highest concentration tested for plant pathogens.

Table 2Impact of the chloroform extract (200 $\mu\text{g/mL}$) on the susceptibility of the MRSA towards various beta-lactam antibiotics.

Tested mixture	MIC of the antibiotic ($\mu\text{g/mL}$)	
	MRSA C98506	MRSA C100459
Penicillin V alone (with DMSO 4%)	16	8
Penicillin V + chloroform extract (200 $\mu\text{g/mL}$)	8	2
Ampicillin alone (with DMSO 4%)	16	4
Ampicillin + chloroform extract (200 $\mu\text{g/mL}$)	8	4
Amoxicillin alone (with DMSO 4%)	16	8
Amoxicillin + chloroform extract (200 $\mu\text{g/mL}$)	4	8
Oxacillin alone (with DMSO 4%)	16	4
Oxacillin + chloroform extract (200 $\mu\text{g/mL}$)	0.5	2

Table 3

Antibacterial activity of the purified compounds (1–5) measured by a direct. TLC-bioautography.

Compounds		Inhibition zone in mm MRSA C98546		Inhibition zone in mm MRSA C100459	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Vanillin	1	4	4	0	0
(–)-Arctigenin	2	1.5	1.5	0	0
Paridol	3	2	2	0	0
Eupatilin	4	5	5	6	6
Jaceosidin	5	19	19	21	21

Table 4Antibacterial activity of eupatilin **4** and jaceosidin **5**, measured by a direct. TLC-bioautography with different amounts spotted.

Compounds		Inhibition zone in mm MRSA C98546		Inhibition zone in mm MRSA C100459	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Eupatilin	4 (15 μg)	7	8	22	19
Eupatilin	4 (25 μg)	6	8	17	14
Eupatilin	4 (50 μg)	8	9	20	19
Jaceosidin	5 (15 μg)	15	15	>21	>21
Jaceosidin	5 (25 μg)	15	17	>21	>21
Jaceosidin	5 (50 μg)	>21	>21	>21	>21

4. Discussion

4.1. Phytochemical investigation

We report in this work the isolation, purification and structural elucidation of chemical components of the chloroform soluble part of the MeOH–H₂O (77%) extract obtained from the aerial parts (leaves and flowers) of *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Durieu) Maire (Asteraceae). No report is available so far on the phytochemistry of this species endemic to Algeria and Morocco. The present phytochemical investigation allowed the isolation of a lignan [(–)-arctigenin], flavonoids (eupatilin and jaceosidin) and phenols (vanillin and paridol). These results are in agreement with major studies reported on different *Centaurea* species [14,43–48].

4.2. Biological activities

4.2.1. Cytotoxic effects

The raw extract and the isolated compounds were evaluated for cytotoxic activity. Moderate cytotoxic effects were observed for three compounds, (–)-arctigenin **2**, eupatilin **4** and jaceosidin **5**, with IC₅₀s in the range 25–50 $\mu\text{g/mL}$. These data are in agreement with previous studies. Indeed, arctigenin (unspecified stereoisomer) as tumor specific agent that showed cytotoxicity to lung cancer (A549), liver cancer (HepG2) and stomach cancer (KATO III) cells, but not cytotoxic to several normal cell lines [49]. Arctigenin specifically inhibited the proliferation of cancer cells, which might consequently lead to the induction of apoptosis and is cytotoxic for human hepatocellular carcinoma cell lines, the IC₅₀ values after 12 h, 24 h and 48 h of treatment were respectively 38.29, 1.99 and 0.24 μM [50], the highest activity was demonstrated with IC₅₀ values of 0.73 μM (HeLa), 3.47 μM (MCF7) and 4.47 μM (A431) [46]. Eupatilin reduces aortic smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting PI3K, MKK3/6, and MKK4 activities (IC₅₀, in Hec1A and KLE cells was 82.2 and 85.5 μM) [51,52] and jaceosidin can induce G2/M cell

cycle arrest by inactivating *cdc25C-cdc2* via ATM-Chk1/2 activation [53].

4.2.2. Antifungal and antimicrobial activities

The raw extract and the isolated secondary metabolites were evaluated for antimicrobial activity. Although the raw extract didn't show any antimicrobial effect on various bacteria or fungi, it could potentiate the effect of beta-lactam antibiotics on methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), reducing the minimal inhibitory concentrations (MICs) by a factor of 2-32-fold. Jaceosidin **5** showed a moderate antimicrobial activity (MIC of 200 µg/mL on MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC 33591, MSSA ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922). This is in agreement with previous results [54]. Jaceosidin **5** had the greatest potency (MICs 16–32 µg/mL) against most *S. aureus* isolates [55].

The identification of five compounds, vanillin, (–)-arctigenin, paridol, eupatilin and jaceosidin, from the aerial parts (leaves and flowers) of *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) M. (Asteraceae) emphasized the possible relevance of this plant for Algerian traditional medicine and it is surprising that no report has been published so far on eventual ethnomedical uses of this species. This may be due to a low distribution of this species or to an eventual toxicity that could have discouraged its use in traditherapy; this warrants investigation. A promising effect on bacterial resistance needs to be further investigated to identify the compound(s) able to reverse bacterial beta-lactam resistance.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Algerian government for financial support, HCDS Djelfa for helping us in the process of exploration and the harvest of plant material, professor M. Kaabeche for the identification of the plant material and C. Delporte (Laboratoire de Chimie Pharmaceutique Organique, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB) for the mass spectrometry measurement.

We thank Professor V. Mathieu (Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie, Université Libre de Bruxelles) for access to her laboratory and help in performing the cytotoxicity experiments, Dr. Ongena Marc for access to her laboratory (Centre Wallon de Biologie Industrielle, Bio-Industrie Unité Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 5030 Gembloux, Belgique) and Dr. E. Gicquel and J. Vancautenberg for the measurement of the optical rotation (Institut Meurice – Service de Chimie Organique Haute Ecole Lucia de Brouckère Avenue Emile Gryzon, 11070 Bruxelles).

References

- [1] Ozenda P. *Flore du Sahara septentrional et central*. Paris: CNRS; 1958, p. 450-454.
- [2] Quezel P, Santa S. *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963, p. 1016-1032.
- [3] Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea L.* species (Review). *GU J Sci* 2004; **17**(4): 149-164.
- [4] Baytop T. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999, p. 316.
- [5] Alapetite GP. *Flore de la Tunisie*. Tunis: Imprimerie Officielle de la République Tunisienne; 1981, p. 1060.
- [6] Fakhfakh JA, Damak M. Sesquiterpeneolignans from the flowers of *Centaurea furfuracea*, Coss. et Dur. (Asteraceae). *Nat Prod Res* 2007; **21**(12): 1037-1041.
- [7] Aclinou P, Boukerb A, Bouquant J, Massiot G, Le Men-Olivier L. Plantes des Aures : constituants des racines de *Centaurea incana*. *Plant Med Phytother* 1982; **16**: 303-309.
- [8] Djeddi S, Karioti A, Sokovic M, Stojkovic D, Seridi R, Skaltsa H. Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. *J Nat Prod* 2007; **70**(11): 1796-1799.
- [9] Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. *J Appl Sci Res* 2012; **8**(6): 2876-2880.
- [10] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 2005; **76**: 744-746.
- [11] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J Serb Chem Soc* 2011; **76**: 27-34.
- [12] Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H. VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. *J Comput Aid Mol Des* 2005; **19**(8): 617-623.
- [13] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, et al. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett* 2009; **2**: 114-118.
- [14] Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *J Braz Chem Soc* 2012; **23**(5): 977-983.
- [15] López-Rodríguez M, García V P, Zater H, Benayache S, Benayache F. Cynaratril, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Cryst* 2009; **E65**: o1867-o1868.
- [16] Shoeb M, MacManus SMM, Nahar L, Jaspars M, Celik S, Sarker SD, et al. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Braz J Pharmacogn* 2007; **17**: 155-159.
- [17] Shoeb M, Jaspars M, MacManus S, Celik S, Kong-Thoo-Lin P, Sarker S. Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from *Centaurea dealbata*. *Ars Pharm* 2006; **47**(4): 315-322.
- [18] Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin PK, et al. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry* 2006; **67**(21): 2370-2375.
- [19] Demir S, Karaalp C, Bedir E. Unusual sesquiterpenes from *Centaurea athoa* DC. *Phytochem Lett* 2016; **15**: 245-250.
- [20] Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea L.* taxa from Turkey. *Food Chem* 2013; **141**(1): 91-97.
- [21] Milošević Ifantis T, Solujić S, Pavlović-Muratspahić D, Skaltsa H. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry* 2013; **94**: 159-170.
- [22] Bohlmann F, Postulka S, Ruhnke J. Polyacetylenverbindungen, XXIV. Die Polyine der gattung *Centaurea L.* *Chem Ber* 1958; **91**: 1642-1656.
- [23] Bohlmann F, Rode KM, Zdero C. Polyacetylenverbindungen, CXVII. Neue polyine der gattung *Centaurea*. *Chem Ber* 1966; **99**: 3544-3551.
- [24] Bohlmann F, Wotschokowsky M, Laser J, Zdero C, Bach KD. Polyacetylenverbindungen, 15 1. Über die Biogenese von Tri- und Tetraacetylenverbindungen. *Chem Ber* 1968; **101**(6): 2056-2061.
- [25] Ben Jemia M, Senatore F, Bruno M, Bancheva S. Components from the essential oil of *Centaurea aeolica* Guss. and *C. diluta* Aiton from Sicily, Italy. *Rec Nat Prod* 2015; **9**: 580-585.
- [26] Jahandiez E, Maire R. Catalogue des plantes du Maroc. Tome III. Dicotylédones et Supplément aux volumes I et II. *Cat Pl Maroc* 1934; **3**: 813-814.

- [27] Boudjerda A, Zater H, Benayache S, Chalchat JC, Gonzalez-Platas J, Leon F, et al. A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*. *Biochem Syst Ecol* 2008; **36**: 461-466.
- [28] Aliouche L, Zater H, Zama D, Bentamene A, Seghiri R, Mekkiou R, et al. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. *Chem Nat Compd* 2007; **43**(5): 618-619.
- [29] Wang YL, Huang W, Chen S, Chen SQ, Wang SF. Synthesis, structure and tyrosinase inhibition of natural phenols derivatives. *J Chin Pharm Sci* 2011; **20**(3): 235-244.
- [30] Mohamad Nasir MI, Mohamad Yusof N, Mohd Salleh N, Coswald SS, Sollehuddin S. Separation of vanillin from oil palm empty fruit bunch lignin. *Clean* 2008; **36**(3): 287-291.
- [31] Aslan Ü, Öksüz S. Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turk J Chem* 1999; **23**: 15-20.
- [32] Gelbrich T, Braun DE, Ellern A, Griesser UJ. Four polymorphs of methylparaben: structural relationships and relative energy differences. *Cryst Growth Des* 2013; **13**: 1206-1217.
- [33] Sajjan D, Joe H, Jayakumar VS, Zaleski J. Structural and electronic contributions to hyperpolarizability in methyl *p*-hydroxy benzoate. *J Mol Struct* 2006; **785**: 43-53.
- [34] Kitouni R, Benayache F, Benayache S. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chem Nat Compd* 2015; **51**(4): 762-763.
- [35] Belkacem S, Belbache H, Boubekri C, Mosset P, Rached-Mosbah O, Marchioni E, et al. Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2014; **5**(3): 1275-1279.
- [36] Kubacey TM, Haggag EG, El-Toumy SA, Ahmed AA, El-Ashmawy IM, Youns MM. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *J Pharm Res* 2012; **5**(6): 3352-3361.
- [37] Mathieu V, Wauthoz N, Lefranc F, Niemann H, Amighi K, Kiss R, et al. Cyclic versus hemi-bastadins pleiotropic anti-cancer effects: from apoptosis to anti-angiogenic and anti-migratory effects. *Molecules* 2013; **18**(3): 3543-3561.
- [38] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
- [39] Okusa PN, Stévigny C, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; **112**: 476-481.
- [40] Okusa PN, Stévigny C, Devleeschouwer M, Duez P. Optimization of the culture medium used for direct TLC–bioautography. Application to the detection of antimicrobial compounds from *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *J Planar Chromatogr* 2010; **23**(4): 245-249.
- [41] Damak N, Ghorbel H, Bahroun A, Damak M, Mc Killop A, Simmonds M. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *J Soc Chim Tunis* 2000; **4**: 653-658.
- [42] Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001; **8**: 401-409.
- [43] Yaglioglu AS, Demirtas I, Goren N. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiformis* DC. *Phytochem Lett* 2014; **8**(5): 213-219.
- [44] Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *Eur J Sci Res* 2012; **84**(3): 398-416.
- [45] Erol-Dayi Ö, Pekmez M, Bona M, Aras-Perk A, Arda N. Total phenolic contents, antioxidant activities and cytotoxicity of three *Centaurea* species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptosimopappa* and *C. spicata*. *Free Rad Antiox* 2011; **1**(2): 32-36.
- [46] Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* 2010; **24**: 1664-1669.
- [47] Karamenderes C, Khan S, Tekwani BL, Jacob MR, Khan IA. Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species Growing in Turkey. *Pharm Biol* 2006; **44**(7): 534-539.
- [48] Sarker SD, Kumarasamy Y, Shoeb M, Celik S, Eucel E, Middleton M, et al. Antibacterial and antioxidant activities of three Turkish species of the genus *Centaurea*. *Orient Pharm Exp Med* 2005; **5**(3): 246-250.
- [49] Susanti S, Iwasaki H, Itokazu Y, Nago M, Taira N, Saitoh S, et al. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa* L. *J Nat Med* 2012; **66**: 614-621.
- [50] Lu Z, Cao S, Zhou H, Hua L, Zhang S, Cao J. Mechanism of Arctigenin-Induced specific cytotoxicity against human hepatocellular carcinoma cell lines: Hep G2 and SMMC7721. *PLoS One* 2015; **10**(5): e0125727.
- [51] Cho JH, Lee JG, Yang Y I, Kim JH, Ahn JH, Baek NI, et al. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2011; **49**(8): 1737-1744.
- [52] Son JE, Lee E, Seo SG, Lee J, Kim JE, Kim J, et al. Eupatilin, a major flavonoid of *Artemisia*, attenuates aortic smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting PI3K, MKK3/6, and MKK4 activities. *Planta Med* 2013; **79**(12): 1009-1016.
- [53] Lee JG, Kim JH, Ahn JH, Lee KT, Baek NI, Choi JH. Jaceosidin, isolated from dietary mugwort (*Artemisia princeps*), induces G2/M cell cycle arrest by inactivating cdc25C- cdc2 via ATM-Chk1/2 activation. *Food Chem Toxicol* 2013; **55**: 214-221.
- [54] Song GC, Ryu SY, Kim YS, Lee JY, Choi JS, Ryu CM. Elicitation of induced resistance against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by specific individual compounds derived from native Korean plant species. *Molecules* 2013; **18**(10): 12877-12895.
- [55] Barnes EC, Kavanagh AM, Ramu S, Blaskovich MA, Cooper MA, Davis RA. Antibacterial serrulatane diterpenes from the Australian native plant *Eremophila microtheca*. *Phytochemistry* 2013; **93**: 162-169.

Résumé

Ce travail fait partie d'un programme de notre unité de recherche portant sur l'étude phytochimique et biologique des plantes du genre *Centaurea* (Asteraceae). Les espèces de ce genre sont des réserves potentielles de métabolites secondaires bioactifs.

Le présent travail a concerné en premier lieu l'évaluation *in vitro* des activités cytotoxique, antifongique et antimicrobienne directe et indirecte de la partie soluble dans le chloroforme de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire, espèce endémique pour l'Algérie et le Maroc. D'après une recherche bibliographique exhaustive effectuée sur les espèces du genre *Centaurea*, cette sous-espèce n'a pas fait l'objet d'études phytochimiques ni biologiques auparavant, ce qui constitue un de nos critères de choix de cette plante.

Inactif sur 7 microorganismes testés (agents pathogènes de plante) champignons, bactéries et levure, et inactif aussi dans le test antibactérienne directe, cet extrait a montré une activité cytotoxique significative contre les lignées cellulaires humaines du poumon, du sein et du glioblastome astrocytaire. Cet extrait a également montré une bonne activité dans le test antibactérien indirect surtout sur la souche résistante : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (la SARM C98506), où l'extrait CHCl₃ a réduit la CMI des antibiotiques de type β-lactame d'un facteur allant de 2 à 32. Aucune synergie n'a été trouvée entre l'extrait et la streptomycine. Ces résultats biologiques nous ont encouragés à procéder à l'étude de la composition chimique de cet extrait par des techniques chromatographiques sur gel de silice 60 (CC et CCM). Cette étude a mené à l'isolement de neuf produits à l'état pur et l'identification de cinq d'entre eux, par la combinaison de plusieurs techniques d'analyses spectroscopiques. Il s'agit de deux composés phénoliques (vanilline **1**, paridol **3**), un lignane [(-) - arctigenine **2**] et deux flavonoïdes aglycones (eupatiline **4** et jacéosidine **5**). Tous les composés isolés sont décrits pour la première fois dans cette espèce. Les 5 composés identifiés ont été soumis à des tests de recherche d'activités cytotoxique et antimicrobienne. Les deux flavonoïdes aglycones et le lignane ont montré des effets cytotoxiques modérés sur les six lignées cancéreuses testées (poumon, sein, glioblastome astrocytaire, prostate, gliome, mélanome murin) dans la gamme de IC₅₀s: 28 μM à 40 μM. Dans le test antibactérien direct par CCM-bioautographie, parmi les cinq composés isolés, seule la jaséosidine **5** présentait une activité antimicrobienne modérée mais l'activité était relativement faible sur les bactéries Gram positives et négatives (CMI de 200 μg/mL sur SARM C98506, SARM C100459, SARM ATCC 33591, MSSA ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922).

Mots clés : Flavonoïdes ; Lignanes ; *Centaurea diluta* ; Asteraceae ; Activité cytotoxique ; Activité antibactérienne directe et indirecte ; CCM-bioautographie, CMI.

Abstract

This work is part of our research unit program relating to the phytochemical and biological studies on the plants of the genus *Centaurea* (Asteraceae). The species of this genus are potential reserves of bioactive secondary metabolites.

The present work concerned initially the *in vitro* evaluation of the cytotoxic, antifungal and direct and indirect antimicrobial activities of the chloroform soluble part of the hydro-alcoholic extract of the aerial parts of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire, an endemic species to Algeria and Morocco. According to an exhaustive bibliographical research carried out on *Centaurea* species, no phytochemical nor biological report is available on this subspecies so far; which constitutes one of our selection criteria for this plant.

Inactive against 7 tested microorganisms (plant pathogens) fungi, bacteria and yeast, and also inactive in the direct antibacterial test, this extract displayed significant cytotoxic effects on cancer cells (the A549 non-small-cell lung carcinoma, the MCF7 breast adenocarcinoma and the U373 glioblastoma). In indirect antibacterial tests, the CHCl₃ extract was able to potentiate the effect of β -lactam antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), reducing the minimal inhibitory concentrations (MICs) by a factor of 2-32-fold. No synergy was found between the extract and streptomycin. Biological data allowed to guide the chemical composition of the extract by fractionation, separation and purification on silica gel 60 (CC and TLC). This study led to the isolation of nine components in a pure state and the identification of five of them, by the combination of several spectroscopic analyses. These products were two phenolic compounds (vanillin **1**, paridol **3**), a lignane [(-arctigenin **2**)] and two flavonoid aglycones (eupatilin **4** and jaceosidin **5**). All the isolated compounds are described for the first time for this species. The 5 identified compounds were evaluated for cytotoxic and antimicrobial activities. Moderate cytotoxic effects were observed on the six tested cancer cell lines (A549, MCF7, U373, Hs683 human glioma, PC3 human prostate and B16-F10 murine melanoma) for both the flavonoid aglycones and the lignane with IC₅₀s in the range 28 μ M to 40 μ M. In the direct antibacterial test by TLC bioautography, among the five isolated compounds, only jaceosidin **5** showed a moderate antimicrobial activity but this activity was relatively weak on the positive and negative Gram bacteria (MIC of 200 μ g/mL on MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC33591, MSSA ATCC6538, *E. coli* ATCC25922).

Keywords: Flavonoids; Lignans; *Centaurea diluta*; Asteraceae; Direct and indirect antibacterial activities, TLC- bioautography, MIC.

المخلص

يعد هذا العمل جزء من برنامج مشروع بحث و تنقيب في وحدة بحثنا و الذي يركز على الدراسة الفيتوكيميائية والفحوص البيولوجية لنباتات جنس *Centaurea* قنطريون المنتمية لعائلة (النجميات). أنواع هذا الجنس هي عبارة عن مستودع كامن لتخزين مركبات نواتج الأيض الثانوي (الجزينات الطبيعية) النشطة والفعالة بيولوجيا. و يهتم هذا العمل بالمقام الأول إلى تقييم النشاط البيولوجي (في المختبر أو خارج الحوية)، حيث قمنا بإجراء إختبارات السمية الخلوية، الفعالية المضادة للميكروبات بالفحصين المباشر وغير المباشر ومضاد للفطريات للطور الكوروفورمي للمستخلص الكحولي المميه للأقسام الهوائية لنبته

Centaurea diluta Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire، و هي نبتة أصلية (محلية) مستوطنة في الجزائر والمغرب. و إستنادا للمعطيات المنبثقة عن البيبلوغرافيا المعمقة ومراجع البحث الشاملة التي أثبتت أن هذا النوع لم يحظ بأي دراسة سواء كانت فيتوكيميائية أو بيولوجية وهي واحدة من أهم معايير الاختيار المعتمدة لدينا في إختيارنا لهذه النبتة.

و لقد توصلنا إلى أن المستخلص غير نشط على ال 7 سلالات الفطرية من مسببات الأمراض النباتية وأيضا على السلالات البكتيرية في الفحص المباشر، و لكنه يظهر فعالية معتبرة في إختبارات السمية الخلوية ضد المزارع الخلوية البشرية، وهي : الرئة، الثدي، والخلايا النجمية ورم أرومي، كما أظهر هذا المستخلص أيضا نشاط جيد في الإختبار الغير مباشر المضاد للجراثيم خصوصا على السلالة المقاومة: المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسايين (MRSA C98506) و قد إتضح من النتائج أن مستخلص $CHCl_3$ قام بتخفيض CMI للمضادات الحوية من نوع β لاكتام بعامل يتراوح من 2 إلى 32 مرة ولم يعثر على أي تآزر بين المستخلص والستربتوميسين. وقد شجعت هذه النتائج البيولوجية على المضي قدما في دراسة التركيب الكيميائي لهذا الطور الكوروفورمي بإستخدام عدة تقنيات للفصل الكروماتوغرافي على هلام السيليكا جل 60 (كروماتوغرافيا العمود و كذا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة) و لقد تم في هذه الدراسة عزل 9 مركبات بصفة نقية في صورتها الطبيعية، وتحديد الهياكل الكيميائية لخمس منها، من خلال الجمع بين عدة تقنيات للتحليل الطيفي.

نوعان من الفينول: (vanilline 1, paridol 3)، ومركب لينيان [2 arctigenine - (-)] وإثنين من الفلافونويد أجليكون (eupatiline 4 et jacéosidine 5) و لقد تم وصف جميع المركبات المعزولة لأول مرة في هذا النوع. وقد أخضعت المركبات الخمس التي تم تحديد بنيتها إلى إختبارات للبحث عن نشاط السمية الخلوية، والأنشطة المضادة للميكروبات. أظهرت نتائج إختبار كلا من المركبين من نوع فلافونويد أجليكون والينيان فعالية سمية معتدلة حيث تم فحصهم على ستة مزارع خلوية من الخلايا السرطانية (الرئة، سرطان الثدي، نجمي ورم أرومي، البروستاتا و سرطان الجلد للفئران) حيث تتراوح قيم IC_{50} : من $28 \mu M$ إلى $40 \mu M$. أما بالنسبة لاختبار مضاد للجراثيم المباشر باستعمال تقنية CCM-bioautography والذي أجريناه على جميع المركبات المعزولة. ولقد أظهر المركب 5 jaséosidine نشاطا معتدلا مضادا للميكروبات، ولكن كان النشاط منخفضا نسبيا في البكتيريا بنوعها غرام الموجبة والسالبة ($CMI 200 \mu g / mL$) على هذه الجرثومات التالية:

(MRSA C98506, MRSA C100459, MRSA ATCC33591, MSSA ATCC6538, *E. coli* ATCC25922).

كلمات البحث المفتاحية (الكلمات الدالة): الفلافونويد، لينيان، *diluta*، قنطريون، النجمية، السمية الخلوية، مضاد للجراثيم المباشر وغير المباشر، CCM-bioautography، MIC.

