

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

**UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :
Série :

THESE

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

Par

Mme. BELBACHE Hanene épouse BOURAOUI

**Investigation phytochimique et biologique de
Centaurea sempervirens L. (Asteraceae)**

Devant le jury :

Mr. ZAITER Lahcene, Pr.	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Président
Mme. BENAYACHE Fadila, Pr.	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse, Rapporteuse
Mr. SEGHIRI Ramdane, Pr.	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinateur
Melle. BITAM Fatma, Pr.	Université Mostefa Benboulaïd, Batna 2	Examinatrice
Mme. BENAÏSSA Ouahiba, MCA.	Université Mostefa Benboulaïd, Batna 2	Examinatrice
Mme. SOBHI Widad, MCA.	Université Ferhat Abbas, Sétif 1	Examinatrice

15 Octobre 2018

Dédicaces

A la mémoire de mon admirable père

A ma très chère mère

A mon cher mari Yacine

A mes petits chéris Houdheifa et Belsem

A mon frère et mes sœurs ainsi que leurs familles

A toute ma famille

A tous mes amis

Je dédie ce modeste travail

Hanene

Remerciements

*Avant tout, je remercie **Dieu** tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la persistance et m'a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à ma directrice de thèse, la Professeure **BENAYACHE Fadila**, de m'avoir suivie et dirigée tout au long de la réalisation de cette thèse. Je la remercie aussi pour ses précieux conseils, ses critiques constructives et sa grande patience pour transmettre le savoir.*

*Je remercie spécialement **Mr. ZAITER Lahcene**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Je souhaite également remercier **Mr. SEGHIRI Ramdane**, Professeur, à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses encouragements et d'avoir bien voulu accepter de siéger dans ce jury.*

*Ma gratitude va également à **Mme. BITAM Fatma**, Professeure à l'université de Batna 2, **Mme. BENAÏSSA Ouahiba** Maître de conférences à l'université de Batna 2 et **Mme. SOBHI Widad** Maître de conférences à l'université de Ferhet Abbes (Sétif), pour l'importance qu'elles ont accordée à mon travail en acceptant d'être membres de ce jury.*

*Même s'il n'est pas parmi les membres du jury comme dans les autres thèses, je tiens à remercier **Mr. BENAYACHE Samir**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour ses efforts à la tête de notre Unité de Recherche ainsi que pour son orientation vers cette plante, je vous souhaite une bonne continuation.*

*Je remercie **Mr. THOMAS Olivier** et **Mr. VIERLING Pierre**, Professeurs à l'université de Nice Sophia Antipolis (France) de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire pour effectuer une partie de ce travail.*

*J'exprime toute reconnaissance à **Melle. MEKKIOU Ratiba**, Professeure à l'université Frères Mentouri Constantine 1 et **Mr. KERKATOU Messaoud**, Maitre de conférences à l'université Frères Mentouri Constantine 1 ; pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs encouragements.*

*J'adresse mes remerciements à **Mr. BENSOUICI Chawki**, Maitre chercheur au centre de recherche (CRBT) de Constantine pour son aide, sa sympathie et sa gentillesse. Soyez assuré de toute ma gratitude.*

*Je tiens à remercier **Mr. KITOUNI Rachid**, Maitre-assistant à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour sa disponibilité lors de mon séjour à l'étranger où il a assuré ma charge pédagogique. Soyez assuré de toute ma gratitude.*

*Je remercie infiniment mes amies et collègues : **CHEBBAH Kaouther**, **BELOUM Zahia**, **HAMLAOUI Mouna**, **ZAABAT Nabila** et **LARIT Farida**. Soyez assurées de mon amitié.*

*Je ne saurai oublier de remercier l'équipe de l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques particulièrement **Yasmine**, **Halima** et **Hanene Achoub**.*

*Je remercie également **Mr. BOURAOUI Rida** pour son aide pendant la récolte de la plante*

*Je remercie **Melle. BOUCHLOUKH Warda**, enseignante au département de Microbiologie, à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour son aide dans les tests de recherche de l'activité antibactérienne.*

*Un grand merci aux membres de ma famille qui m'ont toujours encouragée à terminer cette thèse, en particulier mon mari **Yacine**, ton soutien a été formidable.*

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Liste des abréviations

Techniques chromatographiques

CCM : Chromatographie sur couche mince

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CG : Chromatographie gazeuse

CG/SM : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Phenylhexyle : Silice greffée sur les groupes silanols par des résidus phenylhexyles

Détermination structurale

RMN: Résonance magnétique nucléaire

RMN¹³C: Résonance magnétique nucléaire du carbone 13

RMN¹H : Résonance magnétique nucléaire du proton

COSY : Correlated spectroscopy

HMBC: Heteronuclear multiple bonding connectivity

HSQC: Heteronuclear single bonding connectivity

δ_C : Déplacement chimique du carbone en ppm

δ_H : Déplacement chimique du proton en ppm

ESI : Electrospray ionization (ionisation par électronubélisation)

λ_{max} : Longueur d'onde maximale

μg : Micro-gramme

UV : Ultra-Violet

Glc : Glucose

Rha : Rhamnopyranose

HE : Huile essentielle

ACN : Acétonitrile

Activités biologiques

EC : Extrait chloroforme de *Centaurea sempervirens*

EAE : Extrait acétate d'éthyle de *Centaurea sempervirens*

EB : Extrait *n*-butanol

DPPH 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

BHA : ButylHydroxyAnisole

BHT : ButylHydroxyToluene

CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

I% : Pourcentage d'inhibiton

Liste des figures

N°	Titre	Page
	Chapitre I : Aperçu bibliographique sur la famille Asteraceae et le genre <i>Centaurea</i>	
1	Le capitule des Astéracées	04
2	Quelques espèces du genre <i>Centaurea</i>	05
	Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles	
II-1	Extraction par expression à froid	25
II-2	La technique d'enfleurage	26
II-3	Schéma d'extraction par solvants	27
II-4	Montage d'hydrodistillation	28
II-5	Schéma montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau	29
II-6	Quelques structures de molécules dérivées fonctionnalisées	30
	Chapitre 3 : Généralités sur les activités antioxydante et antibactérienne	
III-1	Structure de l'acide ascorbique	39
III-2	Structure de la vitamine E	39
III-3	Les structures des caroténoïdes	40
III-4	Structure des antioxydants synthétiques	41
III-5	La forme libre et réduite du DPPH	42
III-6	Réduction du complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}\text{-NC}_2$	43
	Chapitre IV: Matériel et méthodes	
IV-1	Photos de l'espèce <i>Centaurea sempervirens</i> L.	47
IV-2	Squelette flavonique des composés isolés de <i>Centaurea sempervirens</i> L.	48

IV-3	Screening phytochimique	50
IV-4	Description des différentes étapes de l'extraction	55
IV-5	Aperçu chromatographique de la fraction F ₁₃	59
IV-6	Chromatogramme de la séparation de la fraction F ₁₃	60
IV-7	Chromatogramme de la séparation de la fraction F ₂₀	61
IV-8	Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle	62
IV-9	Aperçu chromatographique de la fraction F ₉	65
IV-10	Chromatogramme de la séparation de la fraction F ₉	66
IV-11	La colonne de l'extrait chloroforme	67
IV-12	. Le composé C ₇ sous lumière wood et avec les vapeurs de l'ammoniac	70
IV-13	Représentation de la fraction F _{30'} sous UV et après révélation	71
IV-14	Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait chloroforme	72
IV-15	Les souches bactériennes testées	79
Chapitre V: Résultats et discussion		
V-1	Spectre RMN- ¹ H du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	84
V-1'	Etalement 1 du spectre RMN- ¹ H du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	84
V-1''	Etalement 2 du spectre RMN- ¹ H du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	85
V-2	Spectre HSQC du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	85
V-2'	Etalement du spectre HSQC du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	86
V-3	Spectre HMBC du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	87
V-3'	Etalement 1 du spectre HMBC du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	88
V-3''	Etalement 2 du spectre HMBC du composé A ₁ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	88

V-4	Les différentes corrélations entre carbones et protons voisins	89
V-5	Le spectre RMN- ¹³ C du composé A₁ (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	89
V-6	Structure du composé A₁	90
V-7	Spectre de masse HR-ESI-MS (+) du composé A₂	91
V-8	Spectre RMN- ¹ H du composé A₂ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	92
V-8'	Etalement 1 du spectre RMN- ¹ H du composé A₂ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	93
V-8''	Etalement 2 du spectre RMN- ¹ H du composé A₂ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	93
V-9	Spectre HSQC du composé A₂ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	94
V-10	Structure du composé A₂	94
V-11	Spectre RMN- ¹ H du composé A₃ (400 MHz, CDCl ₃ + 2 gouttes de CD ₃ OD, δ ppm)	96
V-12	Spectre RMN- ¹³ C du composé A₃ (100 MHz, CDCl ₃ + 2 gouttes de CD ₃ OD, δ ppm)	96
V-13	Spectre HSQC du composé A₃ (100 MHz, CDCl ₃ + 2 gouttes de CD ₃ OD, δ ppm)	97
V-14	Spectre HMBC du composé A₃ (400 MHz, CDCl ₃ + 2 gouttes de CD ₃ OD, δ ppm)	98
V-14'	Etalement du spectre HMBC du composé A₃ (400 MHz, CDCl ₃ + 2 gouttes de CD ₃ OD, δ ppm)	98
V-15	Structure du composé A₃	99
V-16	Spectre RMN- ¹ H du composé A₄ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	100
V-16'	Etalement 1 du spectre RMN- ¹ H du composé A₄ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	101
V-17	Spectre HSQC du composé A₄ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	102
V-18	Spectre COSY du composé A₄ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	102
V-16''	Etalement 2 du spectre RMN- ¹ H du composé A₄ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	103
V-18'	Les corrélations des signaux du sucre sur le spectre COSY du composé A₄	104
V-17'	Attribution des atomes du sucre sur le spectre HSQC du composé A₄	105

V-19	Spectre HMBC du composé A₄ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	106
V-17''	Corrélations entre les protons des groupements méthyle, méthoxyle et leurs carbones sur le spectre HSQC du composé A₄	107
V-20	Spectre RMN- ¹³ C du composé A₄ (100 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	108
V-21	Position du méthoxyle, ester et hexose	109
V-22	L'attribution de l'intégralité des carbones de la molécule sur le spectre RMN- ¹³ C	109
V-23	Structure du composé A₄	111
V-24	Spectre RMN- ¹ H du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	113
V-25	Spectre RMN- ¹³ C du composé A₅ (100 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	113
V-24'	Etalement du spectre RMN- ¹ H du composé 5 (400, CD ₃ OD, δ ppm)	114
V-26	Corrélation entre le H6''a et le H-6''b sur le spectre COSY du composé A₅	114
V-26'	Spectre relative à l'expérience COSY du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	115
V-27	Spectre HSQC du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	116
V-27'	Etalement 1 du spectre HSQC du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	117
V-25'	Etalement 1 du spectre RMN- ¹³ C du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	117
V-26''	Etalement 1 du spectre COSY du composé A₅ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	118
V-27''	Etalement 2 du spectre HSQC du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	119
V-25''	Etalement 2 du spectre RMN- ¹³ C du composé A₅ (100 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	120
V-27'''	Etalement 3 du spectre HSQC du composé A₅ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	121
V-28	Spectre HMBC du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	122
V-28'	Etalement 1 du spectre HMBC du composé A₅ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	123
V-28''	Etalement 2 du spectre HMBC du composé A₅ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	123

V-29	Structure du composé A₅	124
V-30	Spectre RMN- ¹ H du composé A₆ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	126
V-30'	Étalement 1 du spectre RMN- ¹ H du composé A₆ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	126
V-31	Spectre HSQC du composé A₆ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	127
V-32	Spectre HMBC du composé A₆ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	128
V-33	Spectre RMN- ¹³ C du composé 6 (100 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	129
V-34	Spectre COSY du composé A₆ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	130
V-30''	Étalement 2 du spectre RMN- ¹ H du composé A₆ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	130
V-30'''	Étalement 3 du spectre RMN- ¹ H du composé A₆ (400, CD ₃ OD, δ ppm)	131
V-35	Entités présentes dans la molécule du composé A₆	132
V-33'	La présence d'un ester, d'un acide et un carbone quaternaire sur le spectre RMN- ¹³ C	132
V-36	Les différentes corrélations du substituant en C-6'' du composé A₆	133
V-32'	Étalement de l'expérience HMBC du composé A₆ (400 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	134
V-37	La forme de substituant en C-6'' du composé A₆	135
V-33''	L'intégralité des carbones de la molécule du composé A₆	135
V-38	Structure du composé A₆	137
V-39	Spectre RMN- ¹ H des composés C₅ et C₆ en mélange (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).	138
V-39'	Étalement 1 du spectre RMN- ¹ H des composés C₅ et C₆ en mélange (400, CDCl ₃ , δ ppm)	139
V-39''	Étalement 2 du spectre RMN- ¹ H des composés C₅ et C₆ en mélange (400, CDCl ₃ , δ ppm)	139
V-40	Spectre RMN- ¹³ C des composés C₅ et C₆ en mélange (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).	140
V-39'''	Étalement 3 du spectre RMN- ¹ H des composés C₅ et C₆ en mélange (400, CDCl ₃ , δ ppm)	140

V-41	Spectre HSQC des composés C₅ et C₆ en mélange (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	141
V-42	Structure du composé C₅	141
V-43	Structure du composé C₆	141
V-44	Spectre RMN- ¹ H des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	143
V-45	Spectre HSQC des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	144
V-46	Spectre COSY des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	145
V-45'	Etalement du spectre HSQC des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	146
V-46'	Etalement du spectre COSY des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	146
V-44'	Etalement du spectre RMN- ¹ H des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	147
V-47	Spectre HMBC des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	148
V-48	Spectre RMN- ¹³ C des composés C₁ et C₂ en mélange (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	149
V-48'	Etalement du spectre RMN- ¹³ C des composés C₁ et C₂ en mélange (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	149
V-49	Structure du composé C₁	150
V-50	Structure du composé C₂	150
V-51	Spectre RMN- ¹ H du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm)	151
V-52	Spectre HSQC du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm)	152
V-53	Spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm)	153
V-53'	Attributions des protons (H-6, H-5, H-7, H-8, H-9a et H-9b) sur le spectre COSY du composé C₃	155

V-53''	Etalement 1 du spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm)	156
V-53'''	Retour vers le spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm)	157
V-53''''	Etalement 2 du spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD ₃) ₂ O, δ ppm).	158
V-52'	Attribution des carbones selon spectre HSQC du composé C₃	159
V-54	Configuration de la double liaison C(4)-C(5) du composé C₃	160
V-55	Configurations des doubles liaisons C(4)-C(5) et C(1)-C(10) du composé C₃	160
V-56	Structure plane du composé C₃	160
V-57	Structure du composé C₃	161
V-58	Spectre RMN- ¹ H du composé C₇ (400 MHz, CD ₃ Cl, δ ppm)	163
V-59	Spectre HSQC du composé C₇ (400 MHz, CD ₃ Cl, δ ppm)	164
V-60	Spectre RMN- ¹³ C du composé C₇ (400 MHz, CD ₃ Cl, δ ppm)	165
V-61	Structure du composé C₇	165
V-62	Spectre d'absorption ultraviolette du composé C₈	167
V-63	Spectre HR-ESI-MS (+) du composé C₈	167
V-64	Spectre RMN- ¹ H du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	169
V-64'	Etalement du spectre RMN- ¹ H du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	169
V-65	Spectre HSQC du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	170
V-65'	Etalement du spectre HSQC du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	170
V-66	Spectre HMBC du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	171
V-66'	Etalement du spectre HMBC du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	172
V-67	Spectre RMN- ¹³ C du composé C₈ (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)	172
V-68	Structure du composé C₈	173
V-69	Spectre RMN- ¹ H du composé C₉ (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	175

V-69'	Étalement du spectre RMN- ¹ H du composé C₉ (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	175
V-70	La série spectrale UV-Visible du composé C₉ .	176
V-71	Structure du composé C₉	178
V-72	Spectre RMN- ¹ H du composé C₁₀ (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	179
V-72'	Étalement du spectre RMN- ¹ H du composé C₁₀ (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm)	179
V-73	La série spectrale UV-Visible du composé C₁₀	180
V-74	Structure composé C₁₀	181
V-75	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>C. sempervirens</i> L.	182
V-76	Diagramme des pourcentages de différents groupes chimiques d'huile essentielle de <i>C. sempervirens</i> L.	184
V-77	Les teneurs des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les trois extraits	186
V-78	Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de <i>C. sempervirens</i> et les trois standards en fonction de la concentration.	187
V-79	L'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) des extraits de <i>Centaurea sempervirens</i> et des standards.	190

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
	Chapitre I : Aperçu bibliographique sur la famille Asteraceae et le genre <i>Centaurea</i>	
1	Distribution géographique de quelques espèces du genre <i>Centaurea</i> dans le monde	06
2	Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	07
3	Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre <i>Centaurea</i>	11
4	Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	16
5	Quelques lignanes isolés du genre <i>Centaurea</i>	19
	Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles	
II-1	Exemples des huiles essentielles avec propriétés et composition	23
II-2	Constituants volatils majoritaires des huiles essentielles des espèces du genre <i>Cenaturea</i>	34
	Chapitre IV: Matériel et méthodes	
IV-1	Classement botanique de la plante	47
IV-2	Les flavonoïdes isolés de <i>Centaurea sempervirens</i> L.	49
IV-3	Rendements de l'extraction des différents extraits de <i>C. sempervirens</i>	54
IV-4	La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait AcOEt	56
IV-5	Conditions chromatographique de la séparation de F ₁₃	59
IV-6	Résultats de la séparation de la fraction F ₁₃	60
IV-7	Conditions chromatographique de la séparation de F ₂₀	61
IV-8	Résultats de la séparation de la fraction F ₂₀	61
IV-9	La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme	63
IV-10	Conditions chromatographique de la séparation de la fraction F ₉	66

IV-11	Résultats de la séparation de la fraction F ₉	66
IV-12	La deuxième séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.	68
Chapitre V: Résultats et discussion		
V-1	Résultats du screening phytochimique de <i>Centaurea sempervirens</i> L.	81
V-2	Données relatives aux spectres RMN- ¹ H et ¹³ C du composé A ₁	90
V-3	Analyse de la composition élémentaire des ions	92
V-4	Les données relatives au spectre de RMN ¹ H et ¹³ C du composé A ₂	95
V-5	Attribution des signaux des spectres RMN- ¹ H et ¹³ C du composé A ₃	99
V-6	L'ensemble des données relatives aux spectres RMN- ¹ H et ¹³ C du composé A ₄	110
V-7	Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé A ₅	124
V-8	Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé A ₆	136
V-9	Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C des composés C ₅ et C ₆ en mélange	142
V-10	Les données relatives aux spectres RMN- ¹ H et ¹³ C des composés C ₁ et C ₂ en	150
V-11	Les données relatives aux différentes expériences RMN du composé C ₃	161
V-12	Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé C ₇ .	166
V-13	Analyse de la composition élémentaire des différents ions.	168
V-14	Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé C ₈ .	173
V-15	Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé C ₉ .	177
V-16	Données relatives au spectre RMN- ¹ H du composé C ₉	177
V-17	Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé C ₁₀	180
V-18	Données relatives au spectre RMN- ¹ H du composé C ₁₀	181
V-19	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. sempervirens</i> L.	183
V-20	Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de <i>C. sempervirens</i>	185

V-21	Pouvoir d'inhibition CI_{50} des trois extraits de <i>C. sempervirens</i> et des standards.	187
V-22	Inhibition du CUPRAC par les extraits de <i>Centaurea sempervirens</i> L.	189
V-23	Résultats de l'activité antioxydante de L'EAE et des contrôles positifs utilisés	190
V-24	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits EC, EAE et EB de <i>C. sempervirens</i>	192

Sommaire

Introduction générale	1
Données bibliographiques	
Chapitre I : Aperçu bibliographique sur la famille Asteraceae et le genre <i>Centaurea</i>	
I.1. Introduction.....	3
I.2. Généralité sur la famille des Astéracées (Composées).....	3
I.3. Présentation botanique et géographique de la famille.....	3
I.4. Utilisation.....	4
I.5. Le genre <i>Centaurea</i>	4
I.5.1. Présentation botanique et géographique du genre <i>Centaurea</i>	5
I.5.2. Importance phytochimique et pharmaceutique du genre <i>Centaurea</i>	6
I.5.3. Métabolites secondaire du genre <i>Centaurea</i>	6
I.6. Conclusion.....	20
Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles	
II.1. Introduction.....	21
II.2. Définition.....	21
II.3. L'utilisation des huiles essentielles.....	22
II.4. Répartition des huiles essentielles dans la plante	23
II.5. Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	24
II.5.1. Choix de la méthode d'extraction.....	24
II.5.2. Extraction par expression à froid.....	24
II.5.3. Enfleurage.....	25
II.5.4. Extraction par les solvants organiques.....	26
II.5.5. Extraction par distillation.....	27

II.5.5.1. Hydrodistillation.....	27
II.5.5.1. Entraînement à la vapeur d'eau.....	28
II.5. 6. Extraction par le CO ₂	29
II.6. La composition chimique des huiles essentielles.....	30
II. 7. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	31
II.7.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	31
II.7.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	32
II.8. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	33
II.9. La composition chimique des huiles essentielles du genre <i>Centaurea</i>	33
II.10. Conclusion.....	36

Chapitre III : Généralités sur les activités antioxydante et antibactérienne

III.1. Introduction.....	37
III.2. Activité antioxydante.....	37
III.2.1. Stress oxydatif.....	37
III.2.2. Le system pro- oxydant (les radicaux libres).....	37
III.2.3. Le système antioxydant.....	38
III.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques.....	38
III.2.3.2. Les antioxydants non enzymatiques (naturels d'origine alimentaire).....	38
III.2.3.3. Les antioxydants synthétiques.....	41
III.2.4. Les méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	42
III.2.4.1. Méthode du DPPH.....	42
III.2.4.2. Méthode de réduction de cuivre (CUPRAC).....	43
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	44
III.3.1. Les bactéries.....	44
III.3.2. Méthode de diffusion de disques.....	44

III.3. 3. Les souches bactériennes.....	44
III.3.3.1. Cocci gram positif	45
III.3.3.2. Bacilles gram négatif	45
III.4. Conclusion.....	45

Chapitre IV: Matériel et méthodes

IV.1. Introduction.....	46
IV.2. L'espèce <i>Centaurea sempervirens</i> L.....	46
IV.2.1. Description botanique de la plante.....	46
IV.2.2. Place dans la systématique.....	47
IV.3. Les travaux antérieurs	48
IV.4. Le Screening (criblage) phytochimique	50
IV.4.1. Recherche des alcaloïdes.....	50
IV.4.2. Recherche des coumarines.....	50
IV.4.3. Recherche des substances polyphénoliques (tanins).....	51
IV.4.4. Recherche des triterpènes, stérols et terpènes.....	51
IV.4.4.1. Identification des terpènes et stérols.....	51
IV.4.4.2. Identification des triterpènes.....	52
IV.4.5. Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes.....	52
IV.4.6. Recherche des saponines.....	53
IV.4.7. Recherche des anthocyanes.....	53
IV.4.8. Recherche des quinones.....	53
IV.5. Etude de la plante <i>Centaurea sepervirens</i> L.....	53
IV.5.1. Matière végétale.....	53
IV.5.2. Macération et extraction	53

IV.5.3. Traitement des extraits.....	56
IV.5.3.1. Séparation chromatographique sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle	56
IV.5.3.1.1. L'étude des fractions de la phase acétate d'éthyle	58
IV.5.3.1.2. Etude des fractions F ₃ et F ₄	58
IV.5.3.1.3. Etude de la fraction F ₆	58
IV.5.3.1.4. Etude des fractions F ₇ et F ₁₁	58
IV.5.3.1.5. Etude de la fraction F ₁₃	58
IV.5.3.1.6. Etude de la fraction F ₂₀	60
IV.5.3.1.7. Résumé de la séparation de la phase acétate d'éthyle.....	62
IV.5.3.2. Séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.....	63
IV.5.3.2.1. L'étude de la fraction F ₉	65
IV.5.3.3. Deuxième séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.....	67
IV.5.3.3.1. L'étude des fractions de la deuxième colonne chromatographique.....	69
IV.5.3.3.2. Etude de la fraction F' ₁₀	69
IV.5.3.3.3. Etude de la fraction F' ₂₆	70
IV.5.3.3.4. Etude de la fraction F' ₂₉	70
IV.5.3.3.5. Etude de la fraction F' ₃₀	71
IV.5.3.3.6. Etude des fractions F' ₃₄ et F' ₃₅	71
IV.5.3.3.7. Résumé de la séparation de la phase chloroforme.....	72
IV.5.4. Les huiles essentielles de <i>Centaurea sempervirens</i> L.	73
IV.5.4.1. La méthode d'extraction	73
IV.5.4. 2. Propriétés Organoleptiques.....	73
IV.5.4.3. Analyse par Chromatographie gazeuse/Détecteur à Ionisation de Flamme (GC-FID).....	73
IV.5.4.4. Analyse par Chromatographie gazeuse / Spectrométrie de Masse (GC/MS).....	74

IV.5.5. Etude biologique.....	74
IV.5.5.1. Dosages des polyphénols.....	74
IV.5.5.2. Dosages des Flavonoïde.....	75
IV.5.5.3. Activité antioxydante.....	76
IV.5.5.3. 1. Activité anti radicalaire DPPH.....	77
IV.5.5.3. 2. La capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	78
IV.5.5.4. Activité antibactérienne.....	78
IV.5.5.4.1. Souches bactériennes.....	78
IV.5.5.4.2. Préparation des dilutions des extraits	79
IV.5.5.4.3. Protocole d'évaluation de l'activité.....	79
IV.6. Analyses statistiques.....	80
IV.7. Conclusion.....	80

Chapitre V: Résultats et discussion

V.1. Introduction.....	81
V.2. Le screening phytochimique.....	81
V.3. Détermination structurale des composés isolés de la phase acétate d'éthyle.....	82
V.3.1. Identification du composé A₁	83
V.3.2. Identification du composé A₂	91
V.3.3. Identification du composé A₃	95
V.3.4. Identification du composé A₄	100
V.3.5. Identification du composé A₅	111
V.3.6. Identification du composé A₆	125
V.4. Détermination structurale des composés isolés de la phase chloroforme.....	137
V.4.1. Identification des composés C₅ et C₆	137

V.4.2. Identification des composés C₁ et C₂	142
V.4. 3. Identification du composé C₃	151
V.4.4. Identification du composé C₇	162
V.4.5. Identification du composé C₈	166
V.4.6. Identification du composé C₉	174
V.4.7. Identification du composé C₁₀	178
V. 5. Interprétation des résultats de l'étude de l'huile essentielle de <i>Centaurea sempervirens</i>	182
V.6. Résultats de l'étude biologique des extraites de <i>Centaurea sempervirens</i>	185
V.6.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	185
V.6.2. Activité antioxydante.....	186
V.6.2.1. Activité antiradicalaire DPPH	186
V.6.2.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	188
V.6.3. Activité antibactérienne.....	191
V.7. Conclusion.....	193
Conclusion générale	194
Références bibliographique.....	196

Introduction générale

Introduction générale

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands-parents (Sévent *et al.*, 1994), cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres.

Dans le monde, près de 80% de la population ont recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits, mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (Mukherjee et Wahil, 2006).

Vu sa position géographique et la richesse de sa flore, l'Algérie avec plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques (Quezel et Santa, 1963) occupe une place importante en matière de plantes médicinales. Dans ce lot de plantes la famille des astéracées (composées) est largement représentée. Ainsi les espèces de cette famille et notamment celles du genre *Centaurea* ont fait l'objet de nombreuses recherches phytochimiques et pharmacologiques durant plusieurs années dans notre laboratoire (Seghiri *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2012; Bicha *et al.*, 2013; Zater *et al.*, 2016; Kolli *et al.*, 2012). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail ayant comme objectif l'investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Centaurea sempervirens*, synonyme: *Cheirolophus sempervirens* L. Pomel. Les critères du choix de cette espèce, reposent essentiellement sur le fait que très peu de travaux ont été réalisés sur cette plante.

Les travaux que nous avons réalisés en vue de travaux sur cette plante sont reportés dans ce manuscrit sous forme de cinq chapitres :

- Le premier chapitre, repporte des généralités sur la famille des astéracées et le genre *Centaurea*.
- Le deuxième chapitre, comprend des généralités sur les huiles essentielles et particulièrement une bibliographie sur les huiles essentielles du genre *Centaurea*.

- Le troisième chapitre traite des généralités sur les activités antioxydante et antibactérienne.
- Le quatrième chapitre est consacré à la partie expérimentale où l'on retrouve tous les protocoles et toutes les méthodes, mis en jeu lors de cette étude.
- Le cinquième chapitre, décrit les interprétations des résultats et les discussions relatives aux travaux phytochimiques et biologiques réalisés.

Le manuscrit est terminé par une conclusion générale.

Données bibliographiques

Chapitre I

Aperçu bibliographique sur la famille Astéracea et le genre Centaurea

I.1. Introduction

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés bioactives, qu'ils utilisent pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotique et abiotique qu'ils peuvent subir.

I.2. Généralités sur la famille des Astéracées (Composées)

❖ Nom scientifique de la famille

Asteraceae Martynov (1820) ou Compositae Giseke (1792).

I.3. Présentation botanique et géographique de la famille

C'est la plus vaste famille de la division des spermatophytes avec près de 17 tribus, 1000 genres et au moins 25000 espèces répandues à travers le monde (Guignard, 1994 ; Gausсен et Leroy, 1982). En Algérie elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (Quezel et Santa, 1963).

Les astéracées connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale (Guignard, 1994).

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur (Crète, 1965). Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir une inflorescence en capitule, c'est-à-dire une multitude de fleurs sans pédoncule regroupées sur un réceptacle et entourées de bractées florales (Figure I-1). Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre (Barkely *et al.*, 2006). Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de marguerite, de pissenlit,..... n'est en réalité pas une fleur mais un capitule de fleurs entouré de bractées blanches ou jaunes.

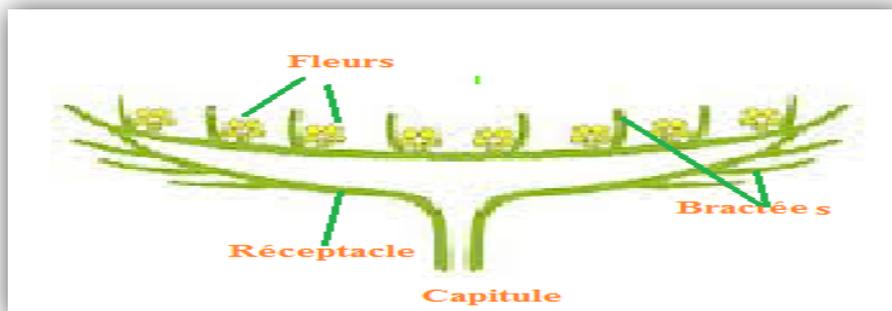


Figure I-1. Le capitule des Astéracées

Pour identifier la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défloris, portant des fruits mûrs ou au moins déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante (Bremer, 1987).

I.4. Utilisation

La famille des composées est anciennement connue pour ses propriétés médicinales et pharmacologiques elle était utilisée comme remède en médecine traditionnelle (Evenari, 1980). Cette famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'arnica (*Arnica montana* L.), la camomille allemande (*Matricaria chamomilla* L.), la camomille romaine (*Chamaemelum nobile* L.), le pied de chat (*Antennaria dioica* Gartn.), le tussilage (*Tussilago farfara* L.) (Gausson et Leroy, 1982). Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressées au genre *Centaurea* de la famille Asteraceae.

I.5. Le genre *Centaurea*

D'après la mythologie grecque, le genre *Centaurea* a été utilisé pour soigner la blessure au pied du sage Centaure Chiron, l'enseignant du dieu Grec de médecine «Esculape» causée par la flèche d'Hercule (Fabre, 1956). La douleur de la plaie de Chiron n'avait jamais cessée ni guérie, ce qui a obligé ce dernier à se retirer de son immortalité et mettre fin à ses tourments,

il tenait en grande estime cette plante qu'il avait baptisée Kentaurion, mais qui n'était pas forcément identique aux Centaurées actuelles.

I.5.1. Présentation botanique et géographique du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les astéracées les fleurs ou les fleurons sont disposées en capitules multiflores homomorphe ou di morphe, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Dans le cas du genre *Centaurea*, les fleurs sont toutes tubulées, multiflores homomorphes ou dimorphes, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en 5 lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. (Figure I-2)



Figure I-2. Quelques espèces du genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* présente une large distribution géographique dans le monde, Selon Mabberley (1997) il est distribué en Asie, Afrique tropicale, Europe et au Nord-Américain. En Algérie, ce genre est représenté par 45 espèces (Quezel et Santa, 1963) dont 7 d'entre eux sont localisés au Sahara (Ozenda, 1977). Le tableau 1 indique la distribution de quelques espèces du genre *Centaurea* dans le monde.

Tableau I-1. Distribution géographique de quelques espèces du genre *Centaurea* dans le monde.

Localisation	Espèces
Région méditerranéenne	<i>C. calcitrapa</i> , <i>C. hololeuca</i>
Afrique du Nord	<i>C. chamaerhaponticum</i> , <i>C. pullata</i>
Toute l'Europe	<i>C. maroccana</i> , <i>C. ptosimopappa</i>
Sahara	<i>C. omphalotricha</i> , <i>C. tougourensis</i>
L'Europe de l'est	<i>C. solstitialis</i> , <i>C. diffusa</i>
Algérie	<i>C. pubescens</i> , <i>C. musimonum</i>

I.5.2. Importance phytochimique et pharmaceutique du genre *Centaurea*

Les espèces appartenant au genre *Centaurea* sont très riches en métabolites secondaires. Ces métabolites constituent de bons protecteurs contre les herbivores (Olson et Kelsey, 1997 ; Susanna et Garcia-Jacas, 2009) et ont une bonne activité antimicrobienne (Karioti, 2002 ; Ugur *et al.*, 2009). Ces métabolites sont essentiellement composés de substances lipophiliques, spécialement les lactones sesquiterpènes (Tarasov *et al.*, 1975 ; Koukoulista *et al.*, 2005; Karamenderes *et al.*, 2007a). On trouve aussi les flavonoïdes (Hammoud *et al.*, 2012 ; Bicha *et al.*, 2013) et les phénols (Bubenchikov *et al.*, 1992). Plusieurs espèces appartenant au genre *Centaurea* ont été largement utilisées en médecine traditionnelle, pour guérir différentes maladies telles que les hémorroïdes, les abcès et le rhume commun (Baytop, 1999 ; Kargioglu *et al.*, 2008 ; Sezik *et al.*, 2001). Elles ont aussi été utilisées comme anti-diarrhéiques, antipyrétiques, dimétiques, cholérétiques, anti-inflammatoires, et antibactériens (Arif *et al.*, 2004 ; Kargioglu *et al.*, 2010; Zengin *et al.*, 2011).

I.5.3. Métabolites secondaires du genre *Centaurea*

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* ont été étudiées par rapport à leurs propriétés curatives et leurs compositions chimiques qui consistent en l'accumulation des lactones sesquiterpéniques qui appartiennent essentiellement au groupe des germacranolides et des guainolides d'une part (Bellakhdar, 1997) et la présence de flavonoïdes, de stéroïdes et de lignanes. En effet, on signale que près de 80 taxons ont été étudiés pour leur contenu en composés flavonoidiques isolés à partir des feuilles, des parties aériennes et parfois des racines et identifiés comme flavones, flavonols et leurs *O*-et *C*-glycosides (Mishio *et al.*, 2006). Dans ce sens quelques exemples de métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Centaurea* sont reportés dans les tableaux 2, 3, 4 et 5.

Tableau I-2. Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea*

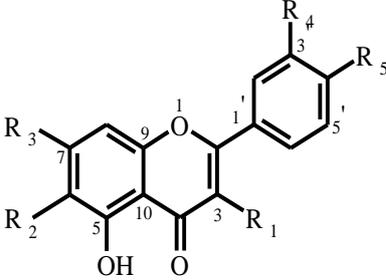
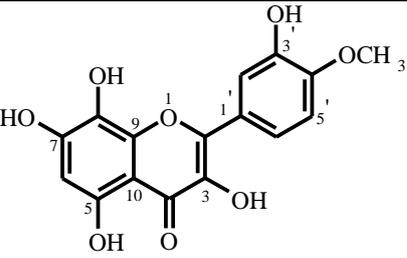
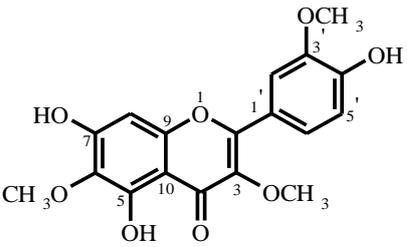
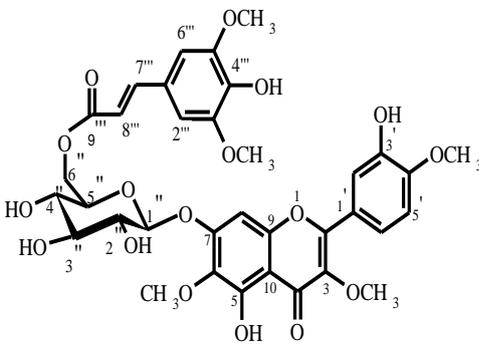
Nom	Structure	Espèce	Réf.
Patulétine $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OH$ $R_4=OH, R_5=OH$. Patulétine 7- <i>O</i> - glucoside $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=O-$ Glc $R_4=OH, R_5=OH$ Patulétine 3,7-di- <i>O</i> - glucoside $R_1=OGlc, R_2=OCH_3,$ $R_3=OGlc$ $R_4=OH, R_5=OH$ Quercétagétine $R_1=OH, R_2=OH, R_3=OH$ $R_4=OH, R_5=OH$		<i>C. ruthenica</i>	Mishio <i>et al.</i> , 2006
4'-methoxygossypétine Jaceidine Algerianine	  	<i>C. africana</i>	Seghiri <i>et al.</i> , 2009

Tableau I-2. Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

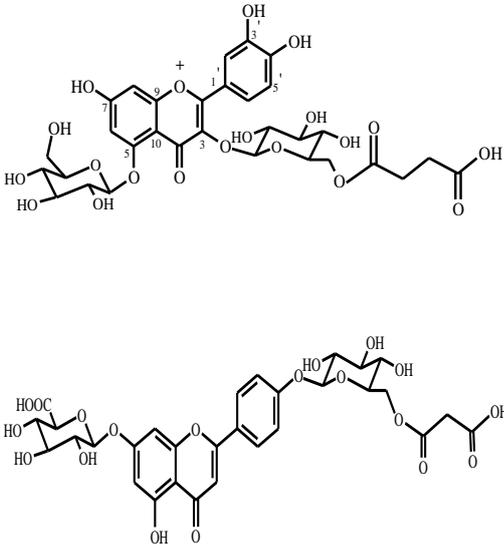
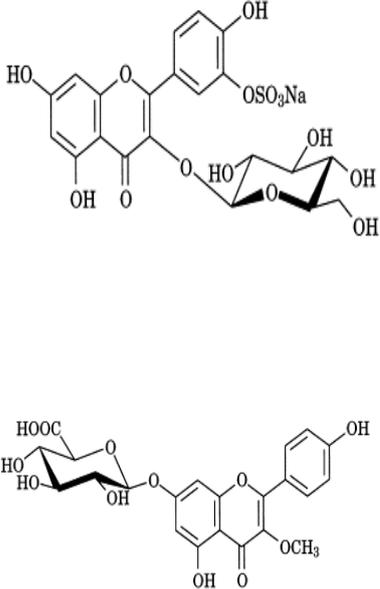
Nom	Structure	Espèce	Réf.
<p data-bbox="209 409 531 524">Cyanidine 3-<i>O</i>-(6-<i>O</i>-succinyl-glucoside)-5-<i>O</i>-glucoside</p> <p data-bbox="217 763 523 878">Apigénine 7-<i>O</i>-glucuronide-4'-<i>O</i>-(6-<i>O</i>-manolyglucoside)</p>		<i>C. cyanus</i>	Takeda <i>et al.</i> , 2005
<p data-bbox="272 1189 469 1218">Centabractéine</p> <p data-bbox="293 1563 448 1592">Bractéoside</p>		<i>C. bractéata</i> Scop.	Flamini <i>et al.</i> , 2001

Tableau I-2. Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

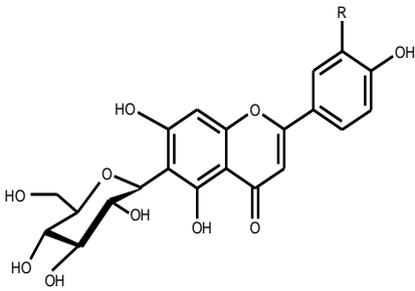
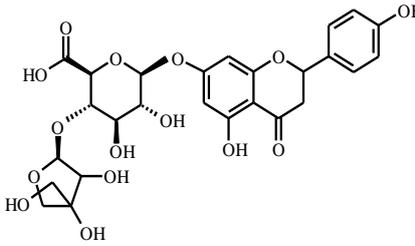
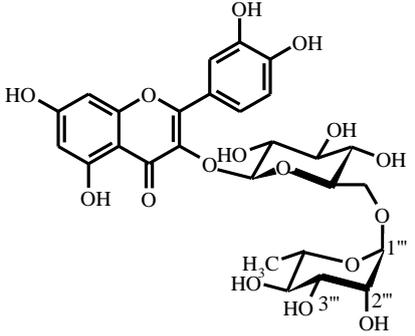
Nom	Structure	Espèce	Réf.
6-C-glucosyl-lutéoline (Isoorientine) R = OH 6-C-glucosyl-apigénine (Isovitexine) R = H		<i>C. macrocephala</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2002
Montanoside		<i>C. montana</i>	Shoeb <i>et al.</i> , 2006a
Rutine		<i>C. incana</i>	Akkal <i>et al.</i> , 1997

Tableau I-2. Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

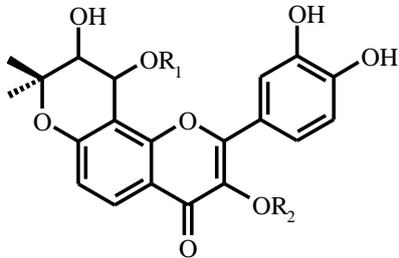
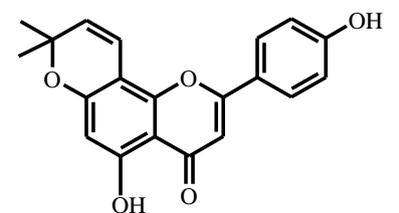
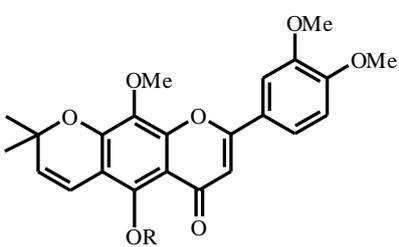
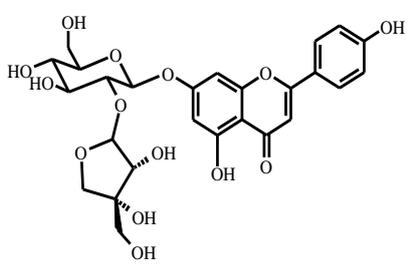
Nom	Structure	Espèce	Réf.
<p>3',4'-dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acetoxy)-2'', 2''-diméthylpyrano- (5'',6'': 7,8) – flavone-3-O-β-D – glucopyranoside R₁= Ac, R₂= Glc</p> <p>3,3',4'-trihydroxy-(3'',4''-dihydro-3'', 4''-dihydroxy)-2'', 2''-diméthylpyrano- (5'',6'':7,8)- flavone R₁=H, R₂=H</p> <p>Atalantoflavone</p> <p>5-hydroxy-3',4',8-triméthoxy-2'', 2''-diméthylpyrano (5'',6'': 6,7)-flavone R = H</p> <p>3',4', 5,8-tétraméthoxy-2'',2''-diméthylpyrano- (5'',6'': 6,7)-flavone R = CH₃</p>	  	<i>C. scoparia</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 2014
<p>Apiine</p>		<i>C. scabiosa</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 1970

Tableau I-2. Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

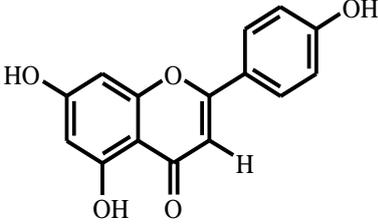
Nom	Structure	Espèce	Réf.
Apéginine		<i>C. aspera</i>	Picher <i>et al.</i> , 1984
		<i>C. affinis</i>	Janačković <i>et al.</i> , 2004
		<i>C. calcitrapa</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 1970
		<i>C. glomerata</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 1970
		<i>C. depressa</i>	Bandyukova <i>et al.</i> , 1969
		<i>C. furfuracea</i>	Akkal <i>et al.</i> , 2003

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea*

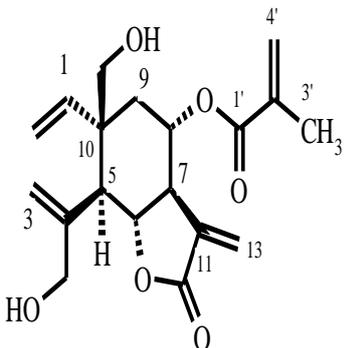
Nom	Structure	Espèce	Réf.
Hierapolitanine A		<i>C. hierapolitana</i>	Karamenderes <i>et al.</i> , 2007a

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea* (suite)

Nom	Structure	Espèce	Réf.
Hierapolitanine B		<i>C. hierapolitana</i>	Karamenderes <i>et al.</i> , 2007a
Santamarine		<i>C. acaulis</i>	Bentamene <i>et al.</i> , 2005
β -cyclocostunolide			
Kandavanolide $R_1 = H, R_2 = COCH_3$			
Zaluzaline D $R_1 = COCH_3, R_2 = CH_2$			
14-chloro-10 β -hydroxy-10(14)-dihydrozaluzanine D			

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea* (suite)

Nom	Structure	Espèce	Réf.
Salonitenolide R= H 8 α -angeloylsalonitenolide			
R =			
8 α -(5'-hydroxyangeloyl)-salonitenolide R =			
11 β , 13-dihydrosalonitenolide		<i>C. aspera</i>	Marco <i>et al.</i> , 2005
Sténophylloïde R= CH ₂ Dihydrosténophylloïde R= H, α Me			
Methyl 8 α -(Z-2-hydroxymethyl-4-acetoxybut-2-enoyloxy)-6 α , 15-dihydroylema-1,3,11 β (13)-trien-12-oate			
R =			
Elemacarmaine R =			

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea* (suite)

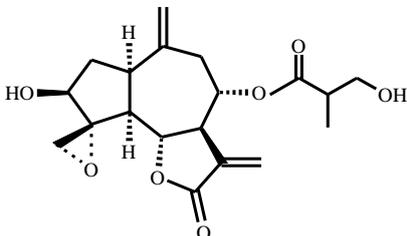
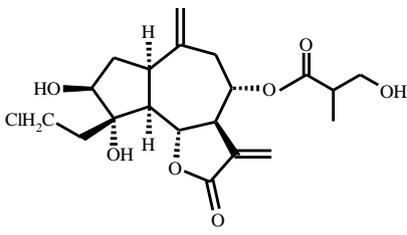
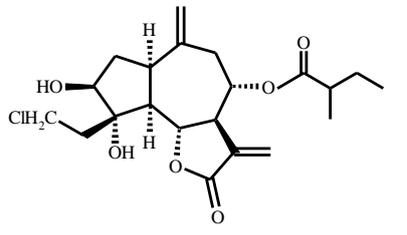
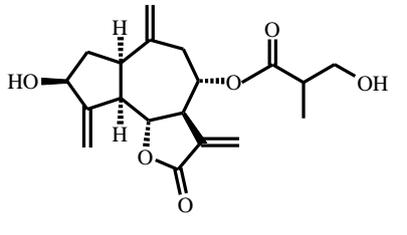
Nom	Structure	Espèce	Réf.
Janérine			
Chlorojanérine		<i>C. hermannii</i>	Öksüz et al., 1994
19-désoxy-15-chlorojanérine			
Cynaropicrine			

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpènes isolées du genre *Centaurea* (suite)

Nom	Structure	Espèce	Réf.
(1R, 4R, 5R, 6R, 7R, 8S, 10R)-1-Hydroxy-8-methacryloxy-15-oxoeudesm-11(13) en-6,12-olide			
(1R, 4S, 5R, 6R, 7R, 8S, 10R) methyl 1,6-dihydroxy-8 methacryloxyeudesm-11(13)-en-15-oic acid-12-oate		<i>C. tweediei</i>	Fortuna <i>et al.</i> , 2001
(6S, 7R, 8S)-8-(4-hydroxymethacryloxy)-15-oxohelianga-1(10), 4, 11(13)-trien-6, 12-olide			
(1R, 4S or R, 5R, 6S, 7R, 8S)-15-Hydroxy-8-(4-hydroxymethacryloxy)-10(14), 11(13)-guaiadien-6,12-olide			

Tableau I-3. Quelques lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea* (suite)

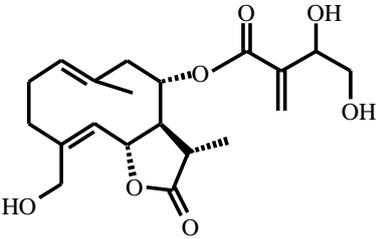
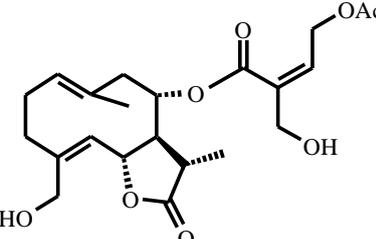
Nom	Structure	Espèce	Réf.
11 β , 13-dihydrocnicine		<i>C. pullata</i>	Benayache <i>et al.</i> , 1992 ;
8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)- 11 β , 13-dihydrocnicine			Djeddi <i>et al.</i> , 2007

Tableau I-4. Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre *Centaurea*

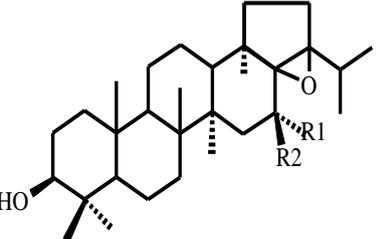
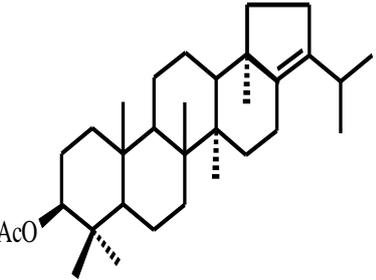
Nom	Structure	Espèce	Réf.
17 β , 21 β -epoxy-16 α -ethoxyhopan-3 β -ol R ₁ = OCH ₂ CH ₃ , R ₂ = H		<i>C. ptosimopappoides</i>	Öksüz <i>et al.</i> , 1997
17 β , 21 β -epoxyhopan-3 β -ol R ₁ = R ₂ = H			
3 β -acetoxyhop-17(21)-ene			

Tableau I-4. Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

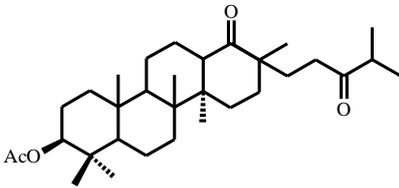
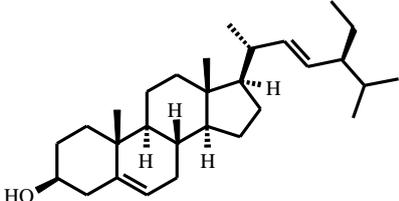
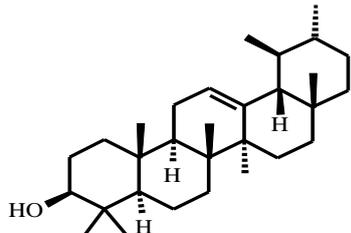
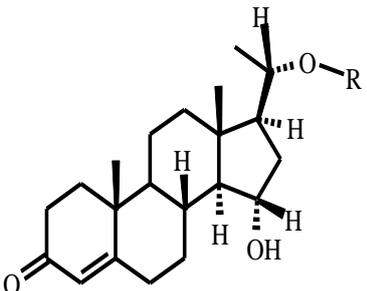
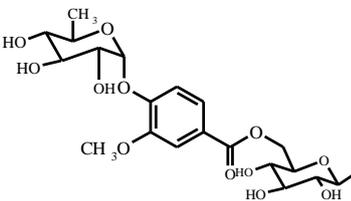
Nom	Structure	Espèce	Réf.
3 β -acetoxy-17,24-dioxobaccharane			
Stigmasterol		<i>C. ptosimopappoides</i>	Öksüz <i>et al.</i> , 1997
α -amyrine			
Moschatine		<i>C. Moschata</i>	Sarker <i>et al.</i> , 1998
R =			

Tableau I-4. Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

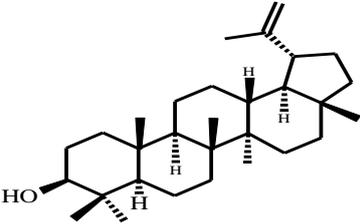
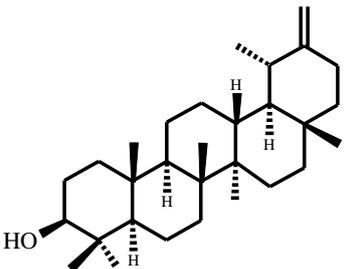
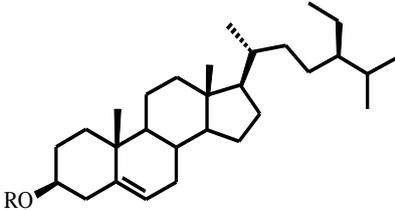
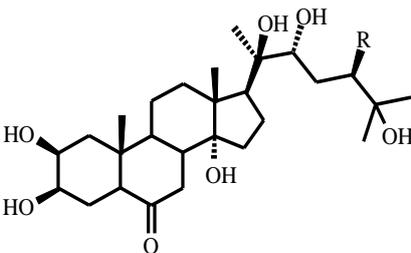
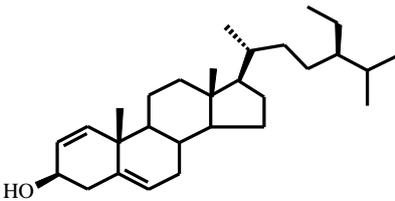
Nom	Structure	Espèce	Réf.
Lupeol		<i>C. omphalotricha</i>	Mouffok <i>et al.</i> , 2012
Taraxasterol			
β-Sitosterol R = H Daucosterol R = Glu			
20-hydroxyecdysone R = H Makisterone R = Me		<i>C. americana</i>	Shoeb <i>et al.</i> , 2006b
Stigmast-1,5-dien-3-ol		<i>C. iberica</i>	Dumlu <i>et Gürkan</i> , 2006

Tableau I-5. Quelques lignanes isolés du genre *Centaurea*

Nom	Structure	Espèce	Réf.
<p>Americanine R=<i>D</i>-(3-<i>O</i>-caffeoyl)-glucopyranosyl R' = Me Arctiine R=<i>D</i>-glucopyranosyl R' = Me Matairesinoside R=<i>D</i>-glucopyranosyl R' = H Matairesinol R=H R' = H Arctigenine R= H R' = Me</p>		<i>C. americana</i>	Shoeb <i>et al.</i> , 2006b
Lappaol A			
Trachelogenine		<i>C. moesiaca</i>	Trendafilova <i>et al.</i> , 2007
Thujaapplicatine methyl ether		<i>C. nigra</i>	Middleton <i>et al.</i> , 2003

I.6. Conclusion

A l'issue de cette recherche bibliographique, il est à relever aisément que les flavonoïdes, les lactones sesquiterpéniques, les triterpènes, les stéroïdes et les lignanes constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferment les espèces du genre *Centaurea*. Ces métabolites sont particulièrement caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques à savoir (RMN 1D et 2D, SM, UV, IR.).

Ces composés possédant des activités biologiques intéressantes (anti-oxydante, anti-bactérienne, Antifongique, anti-inflammatoire,etc.), sont des marqueurs chimio taxonomiques des espèces du genre *Centaurea* en particulier et de la famille des astéracées en général.

Chapitre II

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles

II.1. Introduction

L'aromathérapie scientifique est une science qui utilise les méthodes et les techniques scientifiques du laboratoire pour mettre en évidence la relation entre la structure des molécules actives des huiles essentielles et leurs activités biologiques.

Le terme « aromathérapie » a été formulé en 1928, par M. Gattefossé, bâtisseur de la recherche scientifique sur les huiles essentielles. À partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins (tels que Valnet et Belaiche) ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques. (Zahiri, 2006)

II.2. Définition

Il existe plusieurs expressions pour définir une huile essentielle. La norme française, AFNOR (l'Association Française de Normalisation) (Paris et Hurabielle, 1981), donne comme définition « produit généralement odorant, obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certaines *Citrus* ». Cette définition exclut les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction.

La définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante « huile obtenue suite à l'extraction de la matière végétale à la vapeur d'eau ». Cette huile est composée d'un mélange des substances volatiles obtenues par Co-distillation avec la vapeur d'eau. Celle-ci libère des substances renfermées dans les glandes de la plante, à des températures plus basses que leur propre point d'ébullition grâce à la contribution de la pression partielle de la vapeur d'eau (Guenther, 1972). Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et possèdent des caractéristiques hydrophobes.

Bruneton (1993, 1999), définit les termes les plus couramment utilisés dans ce domaine tels que :

➤ **Pommade florale**

Corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par enfleurage à froid, soit par enfleurage à chaud.

➤ **Résinoïde**

Extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux.

➤ **Absolue**

Produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un Résinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires.

➤ **Epices**

Produits végétaux naturels ou mélanges de ceux-ci, sans matières étrangères, qui sont utilisés pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments; le terme s'applique à la fois au produit entier et au produit en poudre.

➤ **Concrète**

Extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par des procédés physiques.

II.3. L'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées principalement comme fragrance pour parfumer une pièce ou un produit cosmétique, mais aussi comme médicaments et comme un exhausteur de goût dans les condiments. Elles peuvent être utilisées pour usage externe (inhalations, compresses, massages, bains aromatisés, soins des cheveux, etc.) ou interne (infusions, sirops, pastilles, etc.). Chaque huile essentielle a ses caractéristiques et ses fonctions qui lui sont propres (Bruneton, 1993). Le tableau II-1. Représente quelques exemples d'huiles et leurs utilisations.

Tableau II-1. Exemples d'huiles essentielles avec propriétés et composition (Turgeon, 2001)

Huile essentielle	Propriétés et utilisations	Composition chimique
<i>Achillea millefolium</i> (Achillée millefeuille) 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflammatoire • Cicatrisante • Anti-hémorragique 	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterpènes (15 à 30%) • Sesquiterpènes (12 à 18%) • Oxydes (5 à 10%)
<i>Anthemis nobilis</i> (Camomille Noble) 	<ul style="list-style-type: none"> • Antispasmodique • Anti-inflammatoire • Calmante du système nerveux 	<ul style="list-style-type: none"> • Esters (70 à 90 %) • Cétones (1 à 15 %) • Monoterpénols (2 à 5 %) • Monoterpènes(2 à 5 %)
<i>Myristica fragrans</i> (Noix de muscade) 	<ul style="list-style-type: none"> • Antiseptique et anti-parasitaire • Antalgique • Tonique digestive, • Utérotonique 	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterpènes (60 à 70%) • Triesters (9 à 15%) • Phénols et oxydes,
<i>Hyssopus officinalis</i> var. <i>montana</i> (Hysope couchée) 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-infectieuse ORL et broncho-pulmonaire (antivirale et antibactérienne) • Anti-asthmatique • Anti-inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxydes (50 à 55%) • Monoterpènes (20 %) • Sesquiterpènes (3 à 8%) • Cétones (2 à 10%)

II.4. Répartition des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles telle que : les Labiateae (Mann, 1987; Katsiotis *et al.*, 1990 ; Amatri *et al.*, 2010), les Asteraceae (Lorenzo *et al.*, 2002), les Myrtaceae (Gazim *et al.*, 2008 ; Benayache *et al.*, 2001) et les Apiaceae (Chaverri, 2005; Djarri *et al.*,2006). Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal (Oroojaliana *et al.*, 2010; Lamendin, 2004): les sommités fleuries (ex: lavande, menthe...), dans les racines ou rhizomes (ex: vétiver, gingembre), dans les écorces (ex: cannelle), le bois (ex: camphrier), les fruits (ex: citron), les graines (ex: muscade) et sont

contenues dans des structures spécialisées à savoir: les poils, les canaux sécréteurs et les poches (Rafi *et al.*, 1995).

II.5. Les procédés d'extraction des huiles essentielles

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle. L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate. Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur; il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide.

II.5.1. Choix de la méthode d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte (Fernandez et Cabrol-Bass, 2007).

II.5.2. Extraction par expression à froid

Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. C'est une méthode artisanale qui est totalement abandonnée. Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange, etc.) de l'écorce ou des fruits (Benjilali, 2004). Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique (Figure II-1). La rupture de la paroi des poches oléifères fait intervenir trois procédés :

- Une technique qui agit sur le fruit entier, elle utilise des machines exerçant une action abrasive.
- Une technique qui agit sur le fruit sans endocarpe. Elle utilise des machines exerçant une pression suffisante pour libérer l'essence.
- Un troisième procédé permet d'extraire en une seule opération l'essence et le jus sans

mélanger les deux produits (Garnero, 1991).

Le produit obtenu se nomme « essence » et non huile essentielle, car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a lieu (Couic-Marinier et Lobstein, 2013; Lamendin, 2004).



Figure II-1. Extraction par expression à froid

II.5.3. Enfleurage

L'enfleurage est une technique qui date de l'antiquité égyptienne, elle est complexe et très coûteuse, qui n'est plus tellement pratiquée de nos jours en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite (Buronzo, 2008), cependant elle permet d'obtenir des huiles essentielles de grande qualité. Elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) qui ne supportent pas la chaleur entraînée par la distillation, sur une couche de graisse animale qui se sature en essence. On épuise ensuite le corps gras par l'alcool qui récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide (France-Ida, 1996). Ce procédé dure plusieurs jours le temps que l'huile essentielle soit absorbée par la graisse. (Figure II- 2).

Les huiles essentielles obtenues par enfleurage sont destinées à l'industrie de la parfumerie et non pas à l'usage aromathérapique, car elles ne satisfont pas aux normes d' « huiles essentielles aromatiques à usage thérapeutique » (Grosjean, 1993).



Figure II-2. La technique d'enfleurage

II.5.4. Extraction par les solvants organiques

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Sachant que les essences sont solubles dans les solvants organiques, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à «l'absolue» (Duraffourd, 1990). On utilise comme solvant organique volatil l'hexane, qui est le plus utilisé actuellement; le benzène très utilisé dans le passé mais interdit pour des raisons de toxicité ; le propane ; le toluène, etc... (Peron et Richard, 1992; Stagliano, 1992).

L'extraction s'effectue en plusieurs étapes. On lave la matière avec le solvant plusieurs fois, La matière épuisée retient une proportion importante de solvant. Il faut donc concentrer la solution en évaporant le solvant qui est recyclé pour d'autres lavages. La récupération du solvant atteint couramment 94 à 96 % de la quantité retenue (Georges, 1979). De ce fait une proportion résiduelle de solvants reste dans les concrètes d'où un risque de toxicité non négligeable (Bruneton, 1999). Pour cette raison, cette technique est limitée à l'industrie des parfums. Un schéma représentant une méthode d'extraction par solvant est reporté dans la figure II-3.

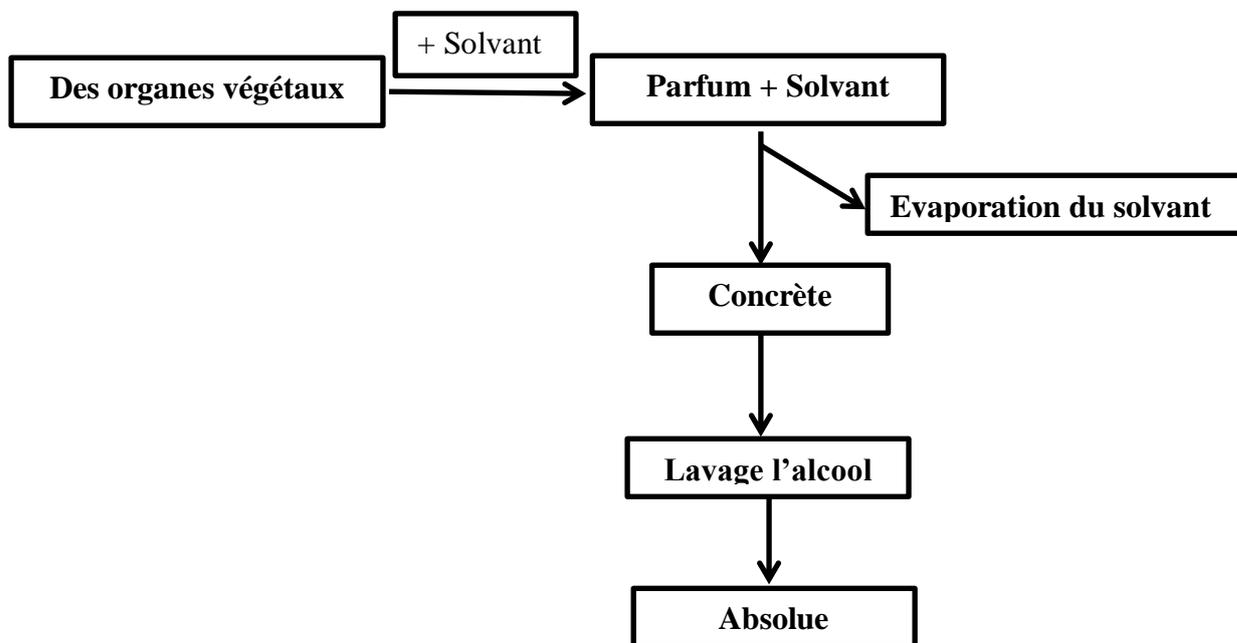


Figure II-3. Schéma d'extraction par solvant

II.5.5. Extraction par distillation

De manière générale, la distillation est une technique de séparation qui se base sur la différence de densité entre un liquide et la vapeur engendrée (Garnero, 1991). Elle implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes.

Il existe en effet, deux différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

II.5.5.1. Hydrodistillation

Mot composé de hydro- en grec « eau » et de -distillation qui vient du latin *stilla*, « goutte » et de *distillare* (latin savant), « tomber goutte à goutte ». Ce procédé d'extraction date de l'époque de la révolution industrielle (au XIX^{ème} siècle).

Dans ce cas, le matériel végétal est en contact direct avec l'eau (Figure II-4). Le procédé consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un récipient rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1993). Parfois un additif ionique est ajouté, il s'agit souvent de NaCl qui permet d'augmenter la force ionique de l'eau et donc d'obtenir un meilleur rendement en huile essentielle (Pistelli, 2015).

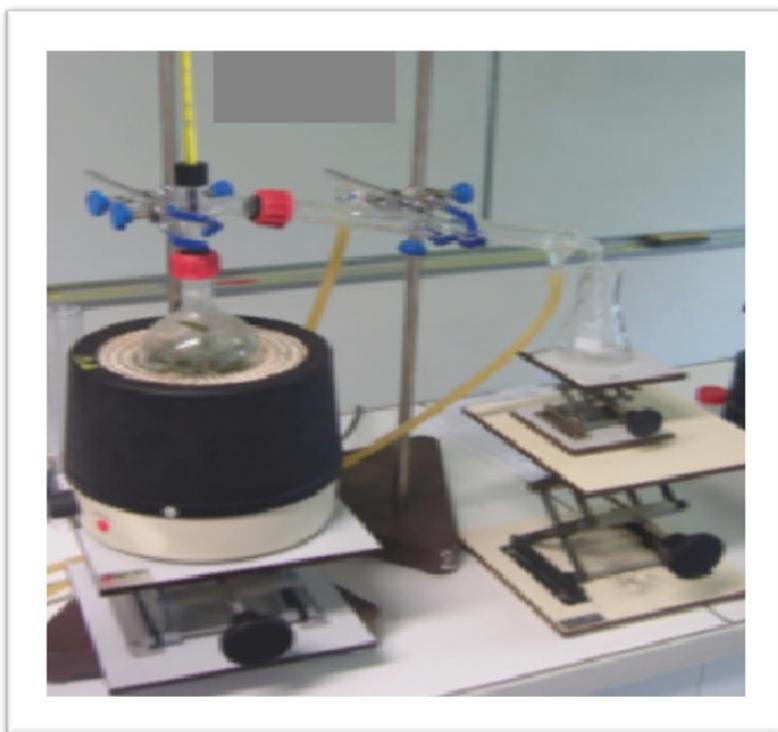


Figure II-4. Montages d'hydrodistillation

II.5.5.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Il s'agit de l'un des procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit dans un distillateur ou « alambic ». Le matériel végétal est supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation (Figure II-5). Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Benjilali, 2004;). Les parties insolubles sont séparées de l'eau par décantation pour donner l'huile essentielle (Garnero, 1991).

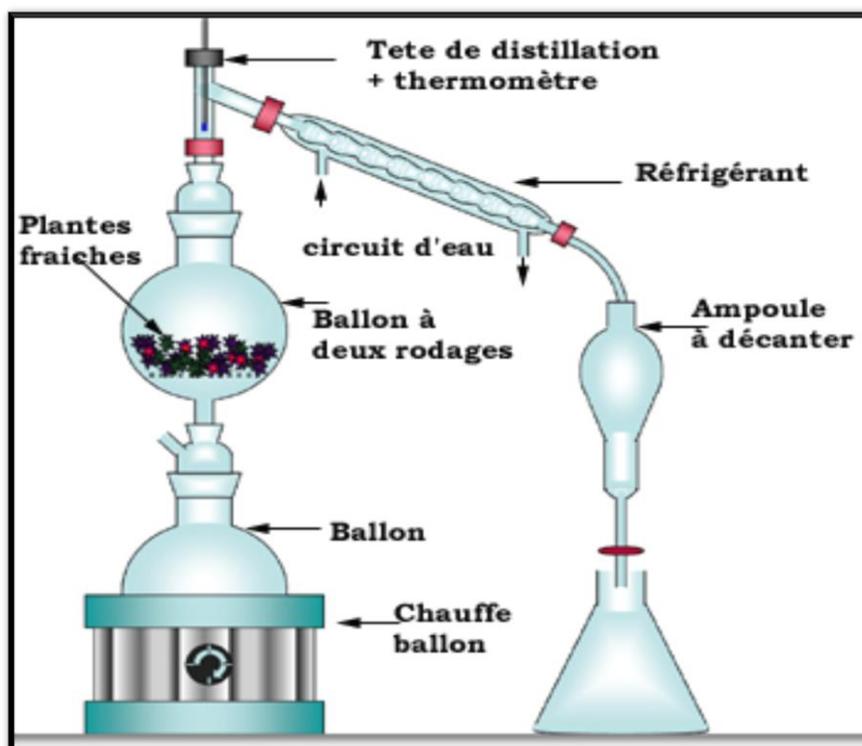


Figure II-5. Schéma du montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau

II.5.6. Extraction par le CO₂

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO₂ en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique ($P = 72.8$ bars et $T = 31.1^{\circ}\text{C}$) (Lorrain, 2013). A l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux ((Peron et Richard, 1992). Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- Le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux (Wichtel et Anton, 1999).
- La séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO₂ à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse (Bruneton, 1999).
- L'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Scheffer, 1996).

II.6. La composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes volatils et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Bruneton, 1999). On note ici que plusieurs milliers de composés appartenant au premier groupe ont à ce jour, été identifiés dans les huiles essentielles (Modzelewska *et al.*, 2005).

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des différents types de terpènes (monoterpènes, les sesquiterpènes et quelques diterpènes) explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol), des cétones (carvone), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des esters (acétate de géranyl), des phénols (thymol), etc. (Figure II-6)

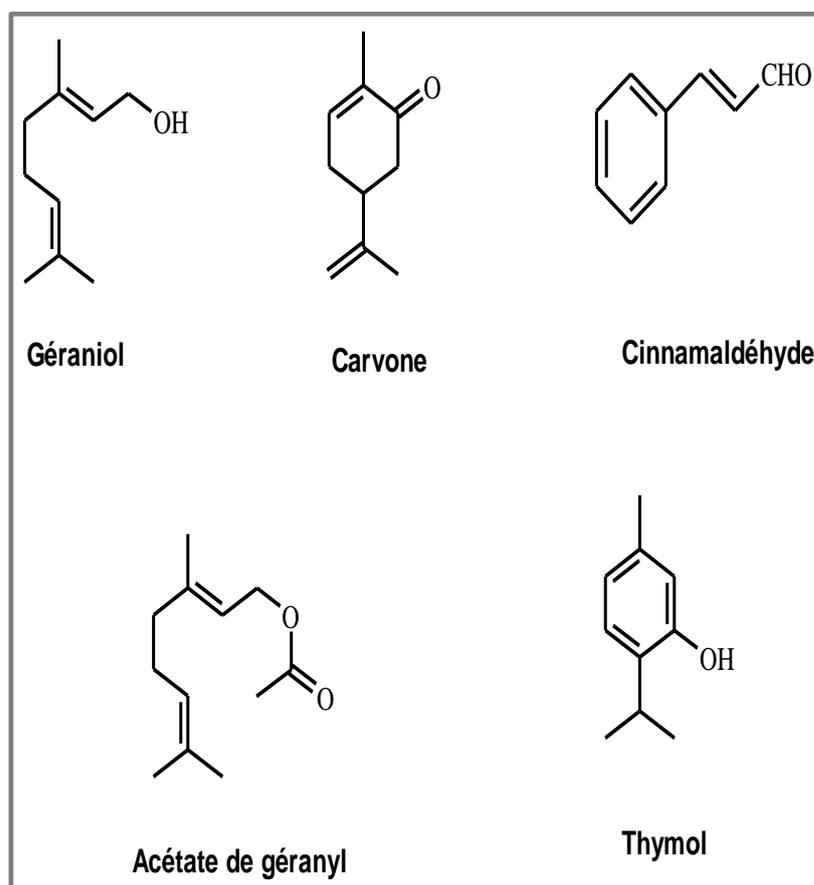


Figure II-6. Quelques structures de molécules dérivées fonctionnalisées

❖ Le chémotype

En fonction du biotope (ensoleillement, climat, composition du sol, altitude....) une même variété botanique peut sécréter des essences biochimiquement très différentes. Ces variations de composition biochimique des huiles essentielles engendrent la notion chémotype (CT). Deux chémotypes de la même huile essentielle présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri., 2005)

Exemple

Thymus vulgaris **CT thujanol** : Très sûr d'emploi, bien toléré par la peau.

Thymus vulgaris **CT thymol** : Dermacaustique et hépatotoxique à dose élevées et prolongées.

Donc, le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif. Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation plus précise et plus efficace.

II.7. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (Joulain, 1994). La méthode qui est la plus couramment employée, est l'utilisation d'un couplage d'une technique chromatographique généralement la chromatographie en phase gazeuse CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou quelques fois, la spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF).

II.7.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative et qualitative à partir d'un volume d'injection réduit. Le principe de cette méthode

est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur (Audigie *et al.*, 1995).

L'identification des constituants des huiles essentielles ne peut être effectuée que sur la base des temps de rétention, ces derniers s'avèrent extrêmement utiles. Comme ces temps de rétention risquent de changer avec la température, la nature du gaz vecteur, les minimales variations de pression en tête de colonne et avec la colonne elle-même, il est devenu courant d'utiliser à la place de l'indice de rétention, un autre indice c'est l'indice de KOVATS (I_K) ou indices de rétention (I_R). (Kovâts, 1965). Pour calculer les I_K , on établit la comparaison à deux hydrocarbures aliphatiques normaux dont les pics encadrent celui du composé étudié. On utilise la formule suivante :

$$I_K = 100 \left[n + \frac{t_R(x) - t_R(C_n)}{t_R(C_{n+1}) - t_R(C_n)} \right]$$

n : nombre d'atomes de carbone de la paraffine éluee avant le produit inconnu x .

$t_R(x)$: temps de rétention du produit inconnu x .

$t_R(C_n)$: temps de rétention de la paraffine à n atomes de carbone éluee avant le produit x .

$t_R(C_{n+1})$: temps de rétention de la paraffine à $n+1$ atomes de carbone éluee après le produit x .

Il est ensuite comparé avec ceux des produits de référence (décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes. C'est pourquoi la comparaison des indices de rétention sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire (Van Den Dool et Kratz, 1963).

II.7.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le but de combiner la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse en mode impact électronique (IE) CPG-SM(IE), après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique (De Maack et Sablier, 1994). Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables chargés positivement dont la séparation

sera en fonction de leur masse (Bruneton, 1999; Desjobert *et al.*, 1997). Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier, ainsi que celles élaborées de manière interne en laboratoire (Mc Lafferty et Stauffer, 1991; Adams, 1995)

II.8. Les activités biologiques des huiles essentielles

L'huile essentielle d'une plante ne se limite pas à une seule propriété, à cause de sa composition très complexe elle peut contenir plus de 60 composés, dont le majoritaires peuvent constituer jusqu'à 85% de l'HE.

Les huiles essentielles présentent des propriétés antioxydante (Edris, 2007 ; Braga *et al.*, 2006), anti-inflammatoire (Dordevic *et al.*, 2007), anti-fongique (Barel *et al.*, 1991 ; Unlu *et al.*, 2002), anti-tumorales (De Sousa *et al.*, 2004), antibactériennes (Burt, 2004 ; Delaquais *et al.*, 2002).

L'activité antibactérienne, est probablement la propriété la plus reconnue pour la plupart des huiles essentielles du point de vue thérapeutique. Cette activité est observée et étudiée depuis plusieurs dizaines d'années, par de nombreux chercheurs (Inouyea *et al.*, 2001). Les constituants des HE de type terpénoides et phénoliques sont principalement responsables de cette propriété (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee *et al.*, 2000), il faut noter que même les composés mineurs pourraient avoir un rôle essentiel en produisant un effet combiné (Burt, 2004).

L'activité antibactérienne est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba *et al.*, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004).

II.9. La composition chimique des huiles essentielles du genre *Centaurea*

Des études dans le monde ont été signalées dans la littérature sur les constituants volatils des huiles essentielles de différentes espèces du genre *Centaurea* : en Algérie (*C. pullata*, *C. Affinis*, *C. grisebachii*) (Djeddi *et al.*, 2011); *C. solstitialis* (Lograda *et al.*, 2013); *C. choulettiana* (Azzouzi *et al.*, 2016), en Italie (*C. aeolica*, *C. diluta*) (Ben Jemia *et al.*, 2015);

C. cineraria subsp. *umbrosa* (Senatore *et al.*, 2003); *C. nicaeensis*, *C. parlatoris* (Senatore *et al.*, 2008), en Iran *C. depressa* (Esmaeili *et al.*, 2005), en Turquie *C. patula* (Zengin *et al.*, 2016); *C. armena*, *C. sessilis* (Yayli *et al.*, 2005), *C. appendicigera*, *C. helenioides* (Yayli *et al.*, 2009); *C. mucronifera*, *C. chrysantha* (Dural *et al.*, 2003); *C. paphlagonica* (Kose *et al.*, 2009); *C. stenolepis* (Polatoglu *et al.*, 2014a); *C. dichroa* (Altintas *et al.*, 2004) *C. saligna* (Altintas *et al.*, 2009); *C. hadimensis*, *C. pseudoscabiosa* (Flamini *et al.*, 2002); *C. kilea*, *C. cuneifolia* (Polatoglu *et al.*, 2014b), en Bulgarie *C. euxina* (Rosselli *et al.*, 2009). Le tableau 2 rapporte les composants majoritaires de 14 espèces du genre *Cenaturea* déjà citées précédemment.

Tableau II-2. Constituants volatils majoritaires des huiles essentielles des espèces du genre *Cenaturea*

Composé	Pourcentage (%)						
	<i>C. pullata</i>	<i>C. grisebachii</i>	<i>C. affinis</i>	<i>C. solstitialis</i>	<i>C. stenolepis</i>	<i>C. saligna</i>	<i>C. diluta</i>
Spathuléol	-	12,2	-	-	-	-	-
Oxide de caryophyllène	38,5	8,0	2,7	5,03	-	-	-
β-eudesmol	-	10,1	-	-	-	-	-
Acide hexadécanoïque	-	-	-	12,79	38,4	41,9	21,3
Acide 9,12-octadécanoïque	-	-	-	-	-	-	12,2
Germacrène D	-	-	-	-	2,5	-	-
Phytol	-	-	-	-	12,9	8,2	-
Heptacosane	-	-	-	-	-	5,2	-
Tetracosane	-	-	7,8	-	-	-	-
Heneicosane	8,6	-	-	17,30	-	-	-
Pentacosane	-	-	-	5,64	-	-	7,1
Eicosane	-	-	5,4	-	-	-	-
Tricosane	-	-	-	10,51	-	-	-
Dodécanol	-	-	6,7	-	-	-	-
Thymol	-	-	6,7	-	-	-	-
Bensaldehyde	5,0	-	-	-	-	-	-
6,10,14 triméthylpentadécane-2-one	-	12,9	-	-	-	-	-

Tableau II-2. Constituants volatils majoritaires des huiles essentielles des espèces du genre *Cenaturea* (suite)

Composé	Pourcentage (%)						
	<i>C. patula</i>	<i>C. appendicigera</i>	<i>C. helenioides</i>	<i>C. paphlagonica</i>	<i>C. euxina</i>	<i>C. kilea</i>	<i>C. dichroa</i>
Spathuléol	14,6	-	5,1	-	10,8	-	5,8
Oxide de caryophyllène	-	17,1	18,2	9,2	6,2	-	9,8
β -eudesmol	-	-	-	-	-	3,2	-
Acide hexadécanoïque	13,4	-	-	28,9	20,3	55,5	11,8
Acide dodecanoïque	-	-	-	22,8	-	-	-
Acide tétradécanoïque	-	-	-	-	-	2,8	-
Germacrene D	-	-	7,3	-	-	-	-
Phytol	12,4	-	6,2	-	-	-	-
β -caryophyllène	-	17,5	-	-	-	-	-
δ -Gurjunène	-	7,6	-	-	-	-	-
Pentadécène	13,1	-	-	-	-	-	-

Le signe (-) désigne l'absence du composé dans l'HE ou bien un pourcentage très faible.

D'après le tableau 2, on remarque que la composition chimique des 14 espèces du genre *Centaurea* est très riche, on note que seuls les composés majoritaires sont mentionnés dans le tableau. Trois composés sont présents en un pourcentage élevé pour un nombre important des espèces citées :

❖ L'acide hexadécanoïque (Acide palimétrique)

Ce composé est présent dans la composition des huiles essentielles de neuf espèces avec un pourcentage très important où l'espèce *C. kilea* se place en tête de liste suivie par *C. saligna*, *C. stenolepis*, *C. paphlagonica*, *C. dilata*, *C. euxina*, *C. patula*, *C. solstitialis* et en dernier *C. dichroa*. Les pourcentages respectivement (55,5 ; 41,9 ; 38,4 ; 28,9 ; 21,3 ; 20,3 ; 13,4 ; 12,79 et 11,8). Ces valeurs indiquent l'abondance et l'importance de cette molécule dans la composition chimique des huiles des espèces du genre *Centaurea*.

❖ Oxyde de caryophyllène

Les espèces *C. pullata*, *C. helenioides* et *C. appendicigera* renferment le pourcentage le plus élevé de ce composé avec (38,5 ; 18,2 et 17,1), suivies par les espèces *C. dichroa*, *C. paphlagonica* et *C. euxina* avec (9,8 ; 9,2 et 6,2).

❖ Spathuléol

Les huiles essentielles des espèces *C. paluta* (14,6%), *C. grisebachii* (12,2%), *C. euxina* (10,8%), *C. dichroa* (5,8%), *C. helenioides* (5,1%), sont plus au moins riches en Spathuléol par rapport aux autres espèces.

II.10. Conclusion

Les huiles essentielles sont des substances naturelles complexes, possédant des caractéristiques physico-chimiques bien définies, et répondant à des critères de qualité qu'il faut connaître pour éviter tout risque de toxicité qui peut se révéler dangereux pour la santé. Par ailleurs, ces produits présentent une grande variabilité de leurs constituants chimiques, leur attribuant de nombreuses propriétés médicinales et biologiques qu'il convient de connaître et de valoriser. Leur activité antimicrobienne, constituant une de leurs grandes vertues, fait l'objet aujourd'hui de nombreux travaux de recherche, en testant ces huiles sur différents microorganismes (bactéries, champignons, virus...), faisant ainsi de ces extraits naturels des agents antimicrobiens potentiels.

Chapitre III

Généralités sur les activités antioxydante et antibactérienne

III.1. Introduction

La vie en aérobie se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale au niveau de laquelle l'oxygène est normalement transformé en eau (Curtay et Robin, 2000); Cette réaction permet d'apporter à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales.

III.2. Activité antioxydante

L'oxydation est le transfert d'électrons d'un atome à un l'autre, c'est une réaction essentielle pour le métabolisme, car l'oxygène est l'accepteur final dans le système de flux d'électrons qui produit l'énergie sous forme d'ATP (Davis, 1995). Toutefois, des problèmes peuvent survenir lorsque le flux d'électrons est dissocié (transfert d'électrons non appariés simples), générant des radicaux libres parmi ces derniers on a les espèces réactives oxygénées (ERO) ou reactive oxygen species (ROS); qui sont des formes variées et instables de l'oxygène actif, comprennent l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($OH\cdot$), le peroxyde ($ROO\cdot$), l'alcoxyde ($RO\cdot$) (Halliwell et Whiteman, 2004).

III.2.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des pro-oxydants (Almasiova *et al.*, 2012). Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agent oxydants ou d'une altération des mécanismes de défense. (Morena *et al.*, 2002).

Le système pro-oxydant comprend les ERO, une augmentation de la présence de ces derniers est le résultat d'une augmentation de leur production du système antioxydant chargé de les neutraliser.

III.2.2. Le système pro-oxydant (les radicaux libres)

Les radicaux libres appelés pro-oxydant (Halliwell et Gutteridge, 1989) sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) contenant un électron non apparié. La présence de ce dernier permet à ces espèces d'avoir une grande instabilité exprimée par une réactivité extrême et une vie très courte, jouant un rôle d'accepteurs d'électrons, ils soustrairont à

d'autres atomes ou molécules voisines qui deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne.

Les radicaux libres attaquent rapidement les composants cellulaires, les lipides (Esterbauer *et al.*, 1992), les glucides (Barnoud *et al.*, 2007), les protéines (Lacolley *et al.*, 2007) et les acides nucléiques (Halliwell et Gutteridge, 1990); les dommages causés par les radicaux libres sont inévitable et traités par des processus de réparation.

III.2.3. Le système antioxydant

Les antioxydants sont définis par (Halliwell, 1999) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

III.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques

Pour faire face aux attaques des radicaux libres, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

- L'élimination des ERO et les catalyseurs de leur formation
- Induire la synthèse des antioxydants
- L'augmentation de l'activité des systèmes de réparation et l'élimination des molécules endommagées.

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit du superoxyde dismutase (SOD) (Fridovich, 1995), de la catalase (Ichai *et al.*, 2011) et de la glutathion peroxydase (GPX) (Levrant *et al.*, 2003).

III.2.3.2. Les antioxydants non enzymatiques (naturels d'origine alimentaire)

Le régime alimentaire humain contient une matrice de différents composés possédants des activités antioxydantes sur la base de leurs propriétés structurelles. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

❖ Acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique (Figure III-1) est considéré comme l'un des antioxydants les plus puissants, moins toxiques et naturels (Bendich *et al.*, 1986). Il s'agit d'une vitamine soluble dans l'eau qui se trouve en concentrations élevées dans de nombreux aliments et plantes diététiques (Orange, citron, salade et rose mérie). La vitamine C peut mettre fin à la chaîne de réactions radicalaires par transfert d'électrons.

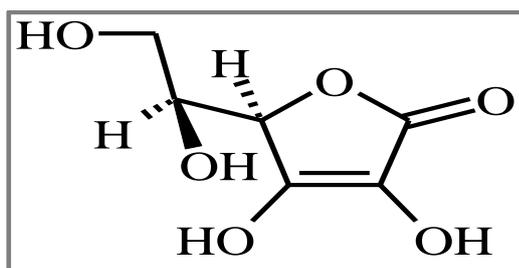


Figure III-1. Structure de l'acide ascorbique

Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. L'acide ascorbique provient essentiellement des fruits et légumes frais (Fain, 2004).

❖ Tocophérols (dont la vitamine E)

Les tocophérols sont des composés liposolubles, ils regroupent quatre substances dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E (Figure III-2) est l'antioxydant majeur, le plus actif biologiquement (Wang *et al.*, 2006). Il est capable de piéger chimiquement l'oxygène singulet et aussi de réagir avec le radical hydroxyl HO[•], mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydés ROO[•] pour former un radical tocophérol (Dellatre *et al.*, 2005).

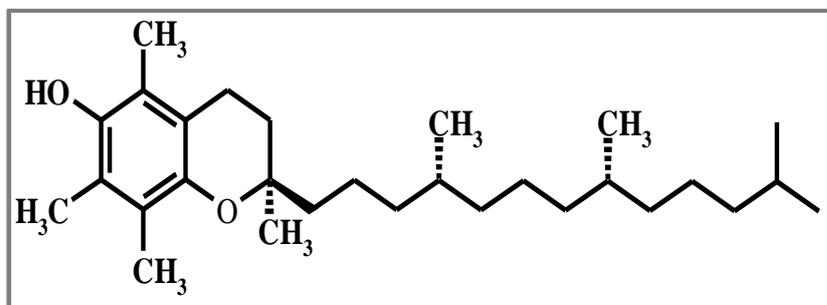


Figure III-2. Structure de la vitamine E

La vitamine E a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires. Elle joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif, dans les symptômes des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer qui récemment a reçu un grand intérêt (Annházi *et al.*, 2007)

❖ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont : le bêta-carotène (1), l'alpha-carotène (2), la lutéine (3), la zéaxanthine (4) et le lycopène (5). Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs (orange, rouge et jaune) (Causse, 2005) (Figure III-3).

La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante, en plus de leur fonction essentielle de protéger les plantes, ils ont des effets bénéfiques sur notre santé (Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004). Ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Packer *et al.*, 1981).

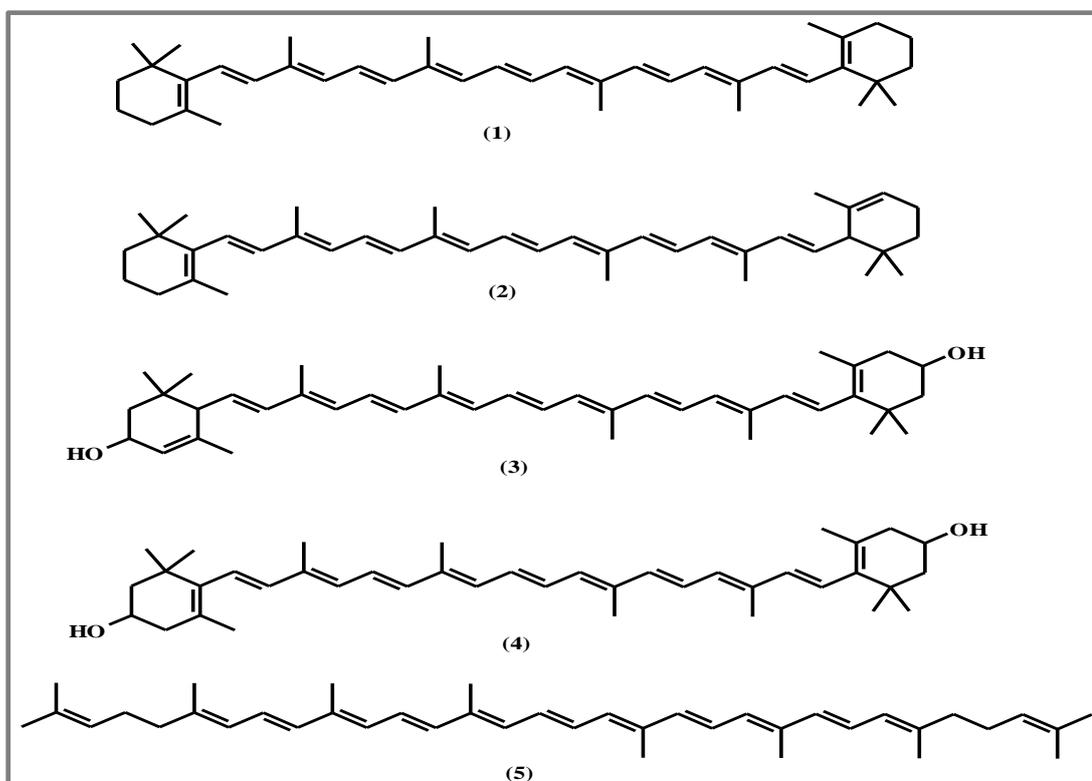


Figure III-3. Les structures des caroténoïdes

❖ Les polyphénols

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les ERO, en fin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu.

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes (Handique et Baruah, 2002; Rolo-Naranjo *et al.*, 2009) :

- Inhibition enzymatique
- Chélation des ions métalliques
- Piégeage des radicaux libres

III.2.3.3. Les antioxydants synthétiques

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (Lee *et al.*, 2009), les antioxydants les plus utilisés sont des composés phénoliques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), la *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), le gallate de propyle (PG) et le syringaldehyde (Figure III-4). Ces antioxydants sont les plus couramment utilisés dans des applications alimentaires et pharmacologiques. Ils sont toujours substitués par des alkyles pour améliorer leur solubilité dans les graisses et les huiles (Hudson, 1990).

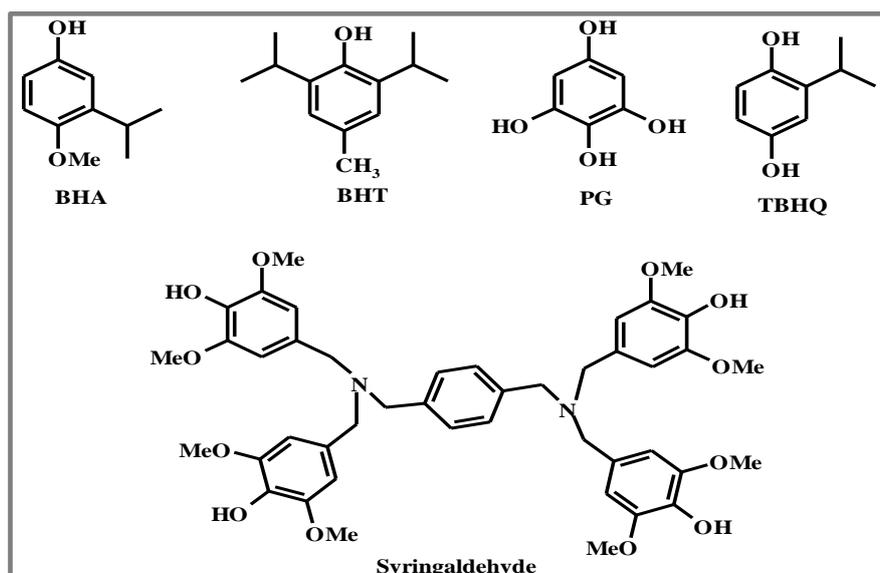


Figure III-4. Structure des antioxydants synthétiques

Même si que le BHT a montré un effet protecteur des cellules neuronales (Duong *et al.*, 2008) et le syringaldehyde possède une activité antioxydante puissante selon le test du DPPH et un effet protecteur des LDL humain contre les attaques des radicaux libres (Lee *et al.*, 2009); les produits naturels apparaissent comme plus sains et plus sûrs que les antioxydants synthétiques (Valenzuela et Nieto, 1996).

III.2.4. Les méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Dans les dernières années, l'importance des antioxydants dans la protection des organismes, des tissus, ou des systèmes non vivants contre le stress oxydatif est devenue évidente (Magalhaes *et al.*, 2009). Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro* et *in vivo*, par piégeage de radicaux différents :

III.2.4.1. Méthode du DPPH

Le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'un des radicaux organiques azotés stables sa couleur est violette foncée en solution. Les antioxydants sont capables de le réduire (par un mécanisme de transfert d'un atome d'hydrogène et par le transfert d'électrons), à une couleur jaune (Figure III-5) qui indique la forme non-radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) (Maataoui *et al.*, 2006). Plus la substance est antioxydante et plus la coloration violette initiale va disparaître.

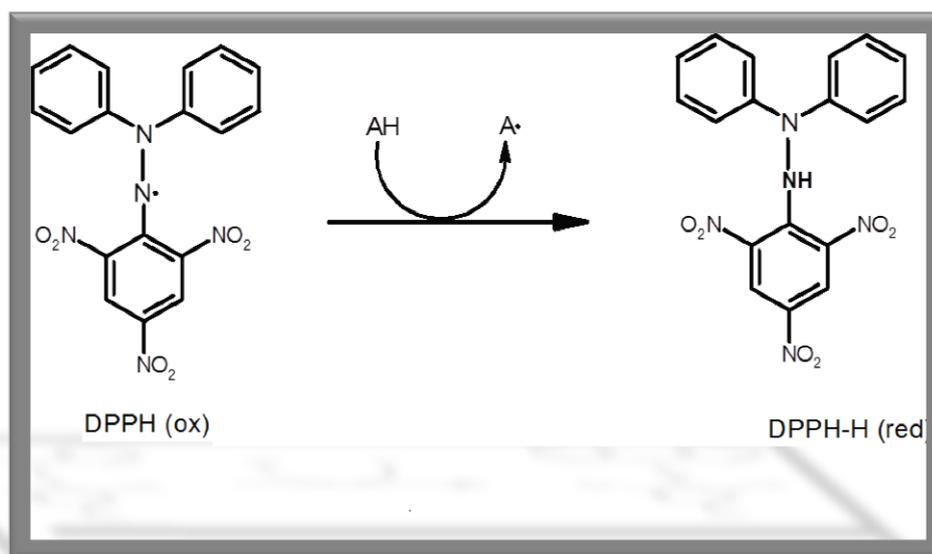


Figure III-5. La forme libre et réduite du DPPH

La capacité de réduire le radical DPPH par les antioxydants peut être évaluée en mesurant la diminution de son absorbance, sachant qu'il montre une absorption maximale à 517 nm.

Le test de décoloration du DPPH a été signalé par Blois (1958), c'est un test simple, rapide et souvent utilisé pour le dépistage antioxydant.

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (Molyneux, 2004).

III.2.4.2. Méthode de réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) a été développée par (Apak *et al.*, 2004). Elle est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe neocuproïne (NC) (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline), cuivre (Cu^{+2}) NC_2 .

En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproïne est réduit en Cu^+-NC_2 , un complexe qui absorbe à 450 nm (Figure III-6). Cette méthode est rapide, économique, sélective et appropriée pour une variété d'antioxydants.

Remarque

Le neocuproïne est un composé organique hétérocyclique et un agent chélateur.

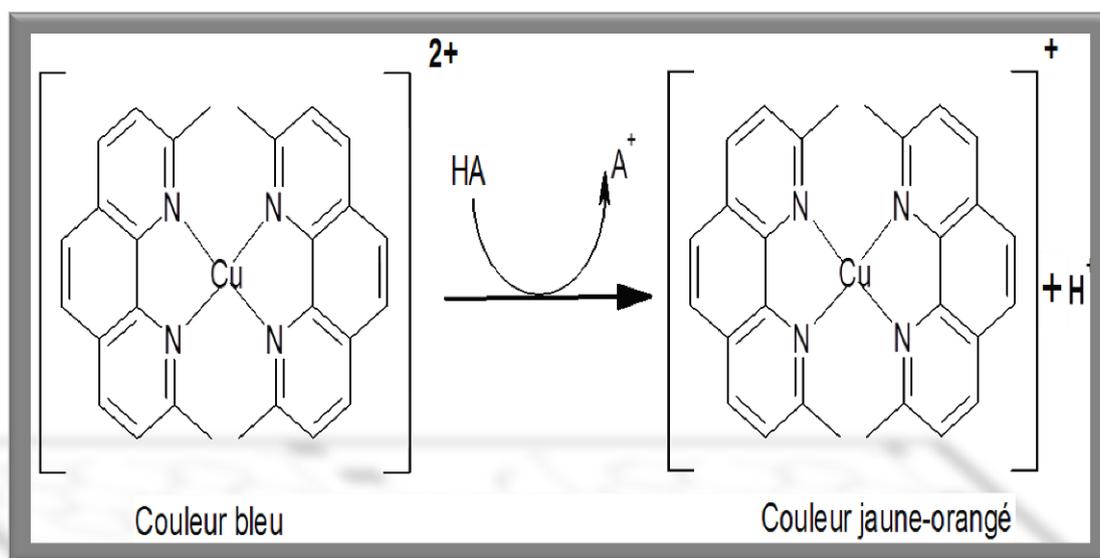


Figure III-6. Réduction du complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}-\text{NC}_2$

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

III.3.1. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants qui ne sont constitués que d'une seule cellule : on dit qu'ils sont unicellulaires. Dotés d'une membrane cellulaire et d'un matériel génétique (ADN), elles sont capables d'assumer les fonctions élémentaires propres au vivant (se reproduire, transmettre l'information génétique, mais aussi tirer matière et énergie de l'environnement (Nauciel et Vildé, 2005).

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de nombreuses maladies infectieuses comme la peste, la tuberculose, le choléra, ...etc. Les bactéries nocives peuvent être combattues par les antibiotiques. Ce sont souvent des molécules synthétiques qui vont détruire ou bloquer la croissance des bactéries, en agissant de manière spécifique sur celles-ci, soit en bloquant la synthèse de la paroi de la cellule ou en inhibant leur métabolisme (Elghozi et Duval, 1992).

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'une plante peut être réalisée par plusieurs méthodes telles que : la méthode de dilution en milieu liquide, la méthode E-test et la plus utilisée c'est la technique de diffusion en milieu gélosé.

III.3.2. Méthode de diffusion de disques

Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées **zones d'inhibition**. Plus le diamètre de la zone est grand, plus la souche bactérienne est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'extrait sur la souche testée (Guerin-Fauble et Carret, 1999).

III.3.3. Les souches bactériennes

Pour notre étude nous nous sommes intéressés à deux types de germes : Cocci gram positif et Bacilles gram négatif.

III.3.3.1. Cocci gram positif

À titre d'exemple on cite

- *Staphylococcus aureus* → Responsable d'intoxications alimentaires
- *Enterococcus faecalis* → Peut causer des infection mortelles.

III.3.3.2. Bacilles gram négatif

À titre d'exemple on cite

- *Klebsiella pneumoniae* → Responsable d'infection pulmonaires, urinaires.
- *Pseudomonas aeruginosa* → Responsable d'infections nosocomiales.

III.4. Conclusion

Le but de nos travaux étant la recherche d'extraits et de composés naturels bioactifs d'origine végétale et notamment des antioxydants et des antibactériens naturels, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des deux activités biologiques précédentes (antioxydante et antibactérienne) des trois extraits de *Centaurea sempervirens* L.

Chapitre IV

Matériel et méthodes

IV.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Centaurea sempervirens*. Les travaux ont concerné un criblage phytochimique du matériel végétal (feuilles + fleurs) de la plante, l'extraction et l'étude de la composition chimique de son huile essentielle, l'investigation phytochimique et une évaluation biologique des extraits chloroforme et acétate d'éthyle dérivés de l'extrait hydroalcoolique obtenu par macération.

IV.2. L'espèce *Centaurea sempervirens* L.

IV.2.1. Description botanique de la plante

Cette plante *Centaurea sempervirens*, synonyme: *Cheirolophus sempervirens* L. Pomel. (Figure IV-1) de 30 à 90 cm de hauteur se trouve en quelques localités du secteur de l'Atlas tellien, dans les champs et les endroits secs et pierreux. En Algérie, l'ouest méditerranéen reste l'aire de répartition privilégiée de cette espèce ; ailleurs elle se trouve éparpillée en une distribution très inégale. Ses capitules de fleurs roses, toutes sensiblement égales entre elles et peu rayonnantes, s'épanouissent fin avril à juin. On reconnaît cette espèce aux feuilles qui sont entières ou dentées, parfois avec deux petits lobes à leur base ; les feuilles inférieures ont un pétiole, les supérieures n'en ont pas mais leur limbe rétrécit insensiblement vers sa base. L'involucre, de forme largement ovoïde, mesure 18 à 25 cm de largeur lorsque le capitule est épanoui. Les bractées de l'involucre sont terminées par un appendice arrondi, fauve et bordé de 5 à 7 cils étalés. Les fruits murs sont de couleur fauve, marbrés de brun, luisants, à aigrette peu développée ou même sans aigrette. Chaque fruit est planté sur le réceptacle commun du capitule par 4 prolongements basilaires dont l'un est plus saillant que les autres. C'est une plante vivace florifère est ligneuse dans sa partie inférieure, striée en long, dressée, rameuse, à feuilles nombreuses, vertes parsemées de petits poils et un peu rudes. La plante se perpétue par des bourgeons qui naissent sur la tige souterraine (Quezel et Santa, 1963).



Figure IV-1. Photos de l'espèce *Centaurea sempervirens* L. Hanene Belbache juin 2011

IV.2.2. Place dans la systématique

Ce classement (tableau IV-1) se réfère à la classification botanique antérieure (Quezel et Santa, 1963).

Tableau IV-1. Classement botanique de la plante

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae (Compositae)
Sous-Famille	Tubiflores
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>sempervirens</i>

IV.3. Les travaux antérieurs

Les travaux effectués sur *Centaurea sempervirens* ont mené à l'isolement et la détermination d'acides sesquiterpénique, de lactones sesquiterpéniques (Marco *et al.*, 1994), de flavonoïdes (Plouvier, 1970) et des polyacétylènes (Bohlmann *et al.*, 1958; Bohlmann *et al.*, 1973). Au sein de notre unité de recherche l'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de cette espèce a permis d'obtenir et d'identifier vingt molécules flavoniques dont trois aglycones de type flavone et dix-sept hétérosides parmi lesquels figurent des structure de type flavone ou flavonol. Les hétérosides étaient essentiellement substitués en C-7 et C-3 et comprennent des mono, di et tri glycosides (Figure IV-2), (Tableau IV-2). (Bouchama, 2003)

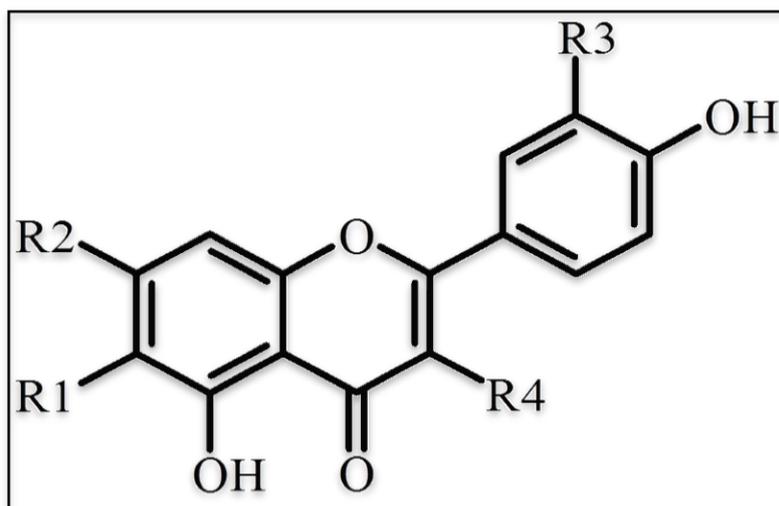


Figure IV-2. Squelette flavonique des composés isolés de *Centaurea sempervirens* L.

Tableau IV-2. Les flavonoïdes isolés de *Centaurea sempervirens* L.

Non du composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Apigénine	H	OH	H	H
Apigénine 7- O-Glu	H	O-Glu	H	H
Apigénine 7-O-Rut	H	O-Glu-Rh	H	H
Apigénine 7-O-Gluc	H	O-Gluc	H	H
Hispiduline 7-O-Glu	OCH ₃	O-Glu	H	H
Scutellareïne 7-O-Glu	OH	O-Glu	H	H
Lutéoline	H	OH	OH	H
Lutéoline 7-O-Glu	H	O-Glu	OH	H
Lutéoline 7-O-Rut-O-Glu	H	O-Glu-Rh-Glu	OH	H
6-Hydroxylutéoline 7-O-Glu	OH	O-Glu	OH	H
Isoorientine 7-O-Glu	O-Glu	O-Glu	OH	H
Lutéoline 7- O-Gluc	H	O-Gluc	OH	H
Chrysoériol	H	OH	OCH ₃	H
Chrysoériol 7- O-Glu	H	O-Glu	OCH ₃	H
Chrysoériol 7- O-Rut	H	O-Glu-Rh	OCH ₃	H
Jacéosidine 7-O-Glu	OCH ₃	O-Glu	OCH ₃	H
Quercétine 7-O-Glu	H	O-Glu	OH	OH
Quercétine 3-O-Glu	H	OH	OH	O-Glu
Quercétine 3-di-O-Glu	H	OH	OH	O-Glu-Glu
Rutine	H	OH	OH	O-Glu-Rh

Glu : Glucose**Rh** : Rhamnose,**Gluc** : Glucuronide**Rut** : Rutinose : Rhamnose + Glucose

IV.4. Le Screening (criblage) phytochimique



Figure IV-3. Screening phytochimique

Le screening d'une plante sert à caractériser les groupes chimiques contenus dans cette plante afin d'expliquer ses effets thérapeutiques (N'guessan *et al.*, 2009).

Les fleurs et les feuilles de *Centaurea sempervirens* L. séchées ont été réduites en poudre au mortier traditionnel. Le protocole réalisé lors de ce screening est reporté ci-après (Harborne, 1998; Sofowora, 2002):

IV.4.1. Recherche des alcaloïdes

La présence des alcaloïdes est établie par la précipitation des sels et la révélation à l'aide du réactif de Dragendorff (solution aqueuses d'iodo-bismuthite de potassium).

- a) Introduire 5 g de la poudre végétale dans un erlen Meyer et ajouter 25 ml de l'acide sulfurique dilué à (10%). Laisser macérer pendant 24 heures et après filtration on procède à un lavage avec de l'eau distillée pour obtenir 25 ml de filtrat.
- b) Prélever 1 ml de filtrat et ajouter 3 gouttes de réactif de Dragendorff.

Observation : L'apparition d'un précipité orangé ou changement de couleur indique la présence des alcaloïdes.

IV.4.2. Recherche des coumarines

1 g de poudre végétale est macérée pendant 24 heures dans 20 ml de l'éther di-éthylique, 5 ml de l'extrait étheré obtenu sont évaporés à l'air libre, puis repris avec 2 ml d'eau chaude. La

solution est divisée en 2 tubes à essai. La présence des coumarines est manifestée après l'ajout de l'ammoniaque à (25%) dans l'un des tubes. Après on observe la fluorescence sous lumière UV 365 nm.

Observation : Une fluorescence intense dans le tube contenant de l'ammoniaque indique la présence des coumarines.

IV.4.3. Recherche des substances polyphénoliques (tanins)

5 g de la poudre végétale sont infusés pendant 30 minutes dans 50 ml d'eau distillée bouillante.

➤ Tanins catéchiques

Dans un tube à essai contenant 2 ml de l'infusé on ajoute quelques gouttes de FeCl_3 à (1%)

Observation : l'apparition de coloration ou la formation d'un précipité indique la présence de tanins catéchiques.

➤ Tanins galliques

2 ml de l'infusé précédent sont prélevés et mis dans un tube à essai, saturés en acétate de sodium puis on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%).

Observation : La formation d'un précipité ou le changement de couleur indique la présence des tanins galliques.

IV.4.4. Recherche des triterpènes, stérols et terpènes

La recherche se fait sur une macération de 5 g de matière végétale pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange méthanol/eau (v/v 80:20), l'extrait hydro alcoolique obtenu après filtration est soumis à une évaporation à sec puis repris avec 20 ml de l'éther di éthylique après refroidissement afin de dissoudre les composés apolaire.

IV.4.4.1. Recherche des terpènes et stérols

La phase étherée obtenue est évaporée à sec, puis reprise par 15 ml de chloroforme. La solution ainsi obtenue est divisée en 3 parties :

➤ La première partie : laissée comme Témoin

- **La deuxième partie** : à cette solution on a rajouté 3 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré.
- **La troisième partie** : on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique.

Observations :

- a) Pour la deuxième partie un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés, cette couleur devenue vert foncé montre la présence des terpènes
- b) Pour la troisième partie l'apparition de la couleur rouge cerise montre la présence des stérols insaturés.

IV.4.4.2. Recherche des triterpènes

Un volume de 10 ml d'extrait hydroalcoolique est évaporé à sec résidu obtenu est dissous dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, la solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec où on rajoute 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré au fond du tube.

Observation : La formation d'un anneau marron à la zone de contact des deux liquides révèle la présence de triterpènes.

IV.4.5. Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes

5 g de la poudre végétal sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, après filtration on introduit 6 ml du filtrat dans 3 tubes chacun contient 2 ml on ajoute dans :

- 1^{er} tube : 1 ml de NaOH (1N)
- 2^{ème} tube : 1 ml d'eau distillée
- 3^{ème} tube : 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium

Observation :

- a) En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.
- b) La coloration rouge au 3^{ème} tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

IV.4.6. Recherche des saponines

5 g de matériel végétal sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes puis ils sont soumis à une agitation pendant quelques minutes.

Observation : L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

IV.4.7. Recherche des anthocyanes

5 g de matière végétale est infusé dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 mn, l'infusé est complété avec l'eau à 50 ml.

A 5 ml de l'infusé on a ajouté 5 ml d'acide sulfurique à (10%) puis 5 ml de l'ammoniaque à (10%).

Observation : La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

IV.4.8. Recherche des quinones

5 g de poudre végétal humectée avec quelques gouttes de HCl puis macérées avec 10 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. A cette solution, on ajoute 2 ml de NaOH (10%) à 2 ml du filtrat obtenu.

Observation : La coloration rouge –violet indique la présence de quinones.

IV.5. Etude de la plante *Centaurea sempervirens* L.

IV.5.1. Matière végétale

La plante a été récoltée en juin 2011 de la région de Djebel El Ouahch à Constantine latitude: N 36°27'59'', longitude: E 6°44'13''. La matière végétale est séchée à l'abri de soleil et de la chaleur.

IV.5.2. Macération et extraction (Figure IV-4)

Après séchages dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes de la plante (fleurs/ feuilles) sont pesées (2500 g/ 1500 g) et mises à macérer séparément pendant 24 heures à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/ Eau) avec les proportions (70/30: V/V). La macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du

solvant et dure 48, 72 heures respectivement. Cette opération a été effectuée à froid pour éviter la dégradation des produits thermolabiles. Après filtration, les extraits obtenus sont concentrés à environ (800 ml pour les fleurs et 500 ml pour les feuilles) sous pression réduite et une température de 35°C, puis repris avec l'eau distillée (1000 et 600 ml respectivement). Les solutions obtenues sont épuisées successivement par des solvants de polarité croissante: l'éther de pétrole, Chloroforme, acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Les phases organiques sont concentrées à sec. Le tableau 3 reporte les rendements de la macération de la plante.

Tableau IV-3. Rendements de l'extraction des différents extraits de *Centaurea sempervirens*

Extrait	Ether de pétrole		Chloroforme		Acétate d'éthyle		<i>n</i> -butanol	
	Fleurs	Feuilles	Fleurs	Feuilles	Fleurs	Feuilles	Fleurs	Feuilles
Poid(g)	0,10	0,25	9,20	6,10	10,36	12,27	60,1	23,0
Rendement(%)	0,004	0,016	0,36	0,40	0,41	0,81	2,50	1,53

Les analyses par CCM des extraits fleurs et feuilles obtenus ont montré que les extraits étaient très similaires

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme suivant :

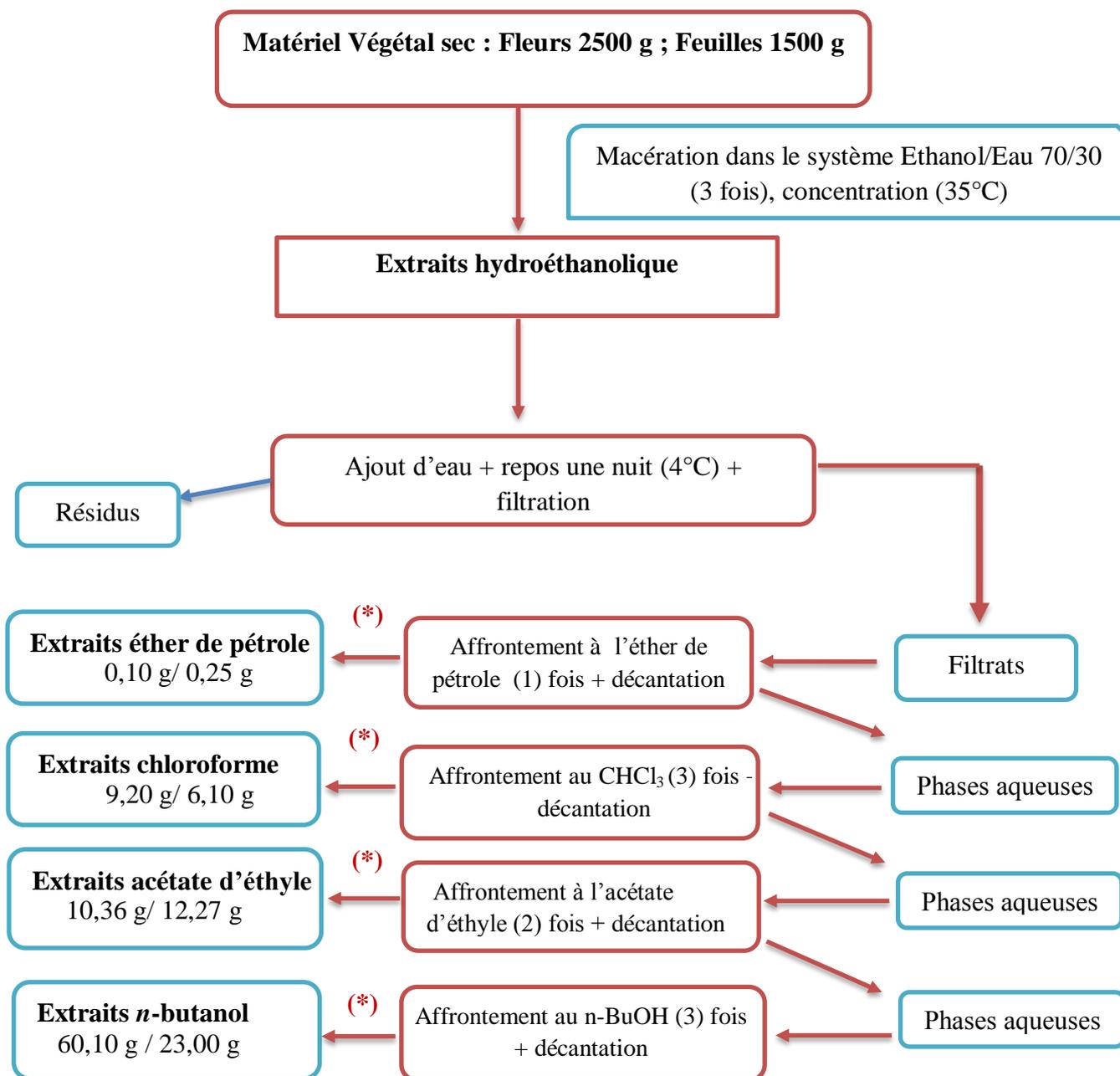


Figure IV-4. Description des différentes étapes de l'extraction

(*) Phases organiques séchées à l'aide de Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées à sec à pression réduite.

IV.5.3. Traitement des extraits

Vu l'étude antérieure annoncée plus haut concernant l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Centaurea sempervirens*, notre investigation phytochimique a été orientée vers les extraits acétate d'éthyle et chloroforme des fleurs.

IV.5.3.1. Séparation chromatographique sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle

5 g de l'extrait acétate (Fleurs) sont dissous dans un mélange (CH₂Cl₂-MeOH 1/1) puis additionnés à quelques grammes de gel de silice greffée (diol) puis évaporés à sec afin d'obtenir un extrait solide sous forme de poudre homogène. La poudre est déposée sur une colonne de gel de silice (diol, 155 g) préparée dans le dichlorométhane. L'éluion a été réalisée avec du dichlorométhane et un gradient d'acétone avec introduction graduelle de méthanol jusqu'à 100 %. 32 fractions de 100 ml ont été recueillies, évaporées et pesées. Le tableau 4 résume le suivi de la colonne chromatographique.

Tableau IV-4. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice diol

Nom de la fraction	Eluant				Poids (mg)
	CH ₂ Cl ₂ %	Acétone %	MeOH %	Volume de l'éluant	
F ₁	100	0	0	100	3,47
F ₂	100	0	0	100	99,01
F ₃	90	10	0	100	18,20
F ₄	90	10	0	100	7,50
F ₅	80	20	0	100	382
F ₆	80	20	0	100	409
F ₇	70	30	0	100	254
F ₈	70	30	0	100	251
F ₉	60	40	0	100	164
F ₁₀	60	40	0	100	179

Tableau IV-4. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice diol
(suite)

F ₁₁	50	50	0	100	108
F ₁₂	50	50	0	100	149
F ₁₃	40	60	0	100	104
F ₁₄	40	60	0	100	135
F ₁₅	30	70	0	100	123
F ₁₆	30	70	0	100	103
F ₁₇	20	80	0	100	107
F ₁₈	20	80	0	100	50,78
F ₁₉	10	90	0	100	57,28
F ₂₀	10	90	0	100	41
F ₂₁	0	100	0	100	19,34
F ₂₂	0	100	0	100	18,26
F ₂₃	0	90	10	100	14,63
F ₂₄	0	90	10	100	25,87
F ₂₅	0	75	25	100	20,40
F ₂₆	0	75	25	100	17,66
F ₂₇	0	50	50	100	9,83
F ₂₈	0	50	50	100	9,96
F ₂₉	0	25	75	100	4,28
F ₃₀	0	25	75	100	4,53
F ₃₁	0	0	100	100	2,84
F ₃₂	0	0	100	100	5,42

IV.5.3.1.1. L'étude des fractions de la phase acétate d'éthyle

Les fractions obtenues ont été analysées par HPLC sur une colonne analytique Phényl hexyl 5 μm en mode gradient ECIMAR 90-10 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) et regroupées sur la base de leurs chromatogrammes. Les fractions les moins complexes et les plus abondantes ont été sélectionnées pour étude. Sur cette base les fractions F_3 , F_4 , F_6 , F_7 , F_{11} , F_{13} et F_{20} ont été choisies.

IV.5.3.1.2. Etude des fractions F_3 et F_4

Les fractions F_3 et F_4 montrant la formation de précipités ont été filtrées, les poudres de couleur jaune obtenues ont été rincées aux MeOH. Après des tests par CCM de gel de silice 60 et co-chromatographie en utilisant plusieurs systèmes de solvants, les deux produits issus de ces deux fractions se sont avérés un seul et même produit pur. Nous le reportons sous le code A_1 (20 mg).

IV.5.3.1.3. Etude de la fraction F_6

Une quantité de la fraction F_6 (409 mg), a subi une séparation chromatographique sur plaques préparatives de gel de silice 60 avec le système d'élution chloroforme/acétate d'éthyle (8/2) menant à l'obtention du composé F_{6-6} . Sa purification ultime a été réalisée sur colonne de gel de Sephadex LH20 donnant ainsi un produit pur que nous reportons sous le code A_2 (8 mg).

IV.5.3.1.4. Etude des fractions F_7 et F_{11}

Les fractions F_7 (254 mg) et F_{11} (108 mg) montrant la formation de précipités ont été filtrées, les poudres de couleur jaune obtenues ont été rincées aux Et_2O . Après des tests par CCM de gel de silice 60 et co-chromatographie en utilisant plusieurs systèmes de solvants, les deux produits issus de ces deux fractions se sont avérés un seul et même produit pur. Nous le reportons sous le code A_3 (57 mg).

IV.5.3.1.5. Etude de la fraction F_{13}

L'étude de la fraction F_{13} a été réalisée par HPLC semi-préparative, la figure IV-5 reporte son Aperçu chromatographique.

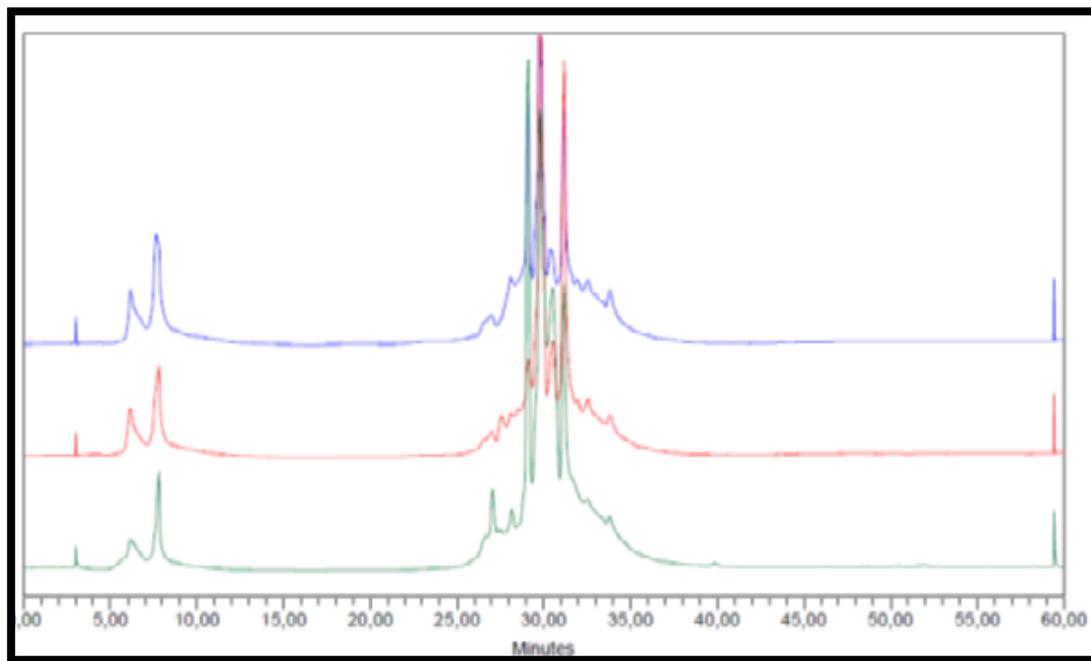


Figure IV-5. Aperçu chromatographique de la fraction F₁₃

Après plusieurs tests, la séparation de F₁₃ (Figure IV-6) d'une masse de 104 mg a été effectuée en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- ❖ Colonne semi- préparative XSELECT CSH de phenylhexyle.
- ❖ Phase mobile : H₂O/ACN (tableau 5)
- ❖ La concentration de la fraction : 100 mg/ml dans mélange MeOH/ CH₂Cl₂ (1/1).
- ❖ Le volume injecté : 50 µl.
- ❖ Longueur d'onde de détection $\lambda = 213$ nm.

Tableau IV-5. Conditions chromatographique de la séparation de F₁₃

	Temps (min)	Débit (ml/min)	H ₂ O %	ACN%
1		3,00	70	30
2	5,00	3,00	70	30
3	25,00	3,00	30	70
4	25,50	3,00	0	100
5	30,00	3,00	0	100

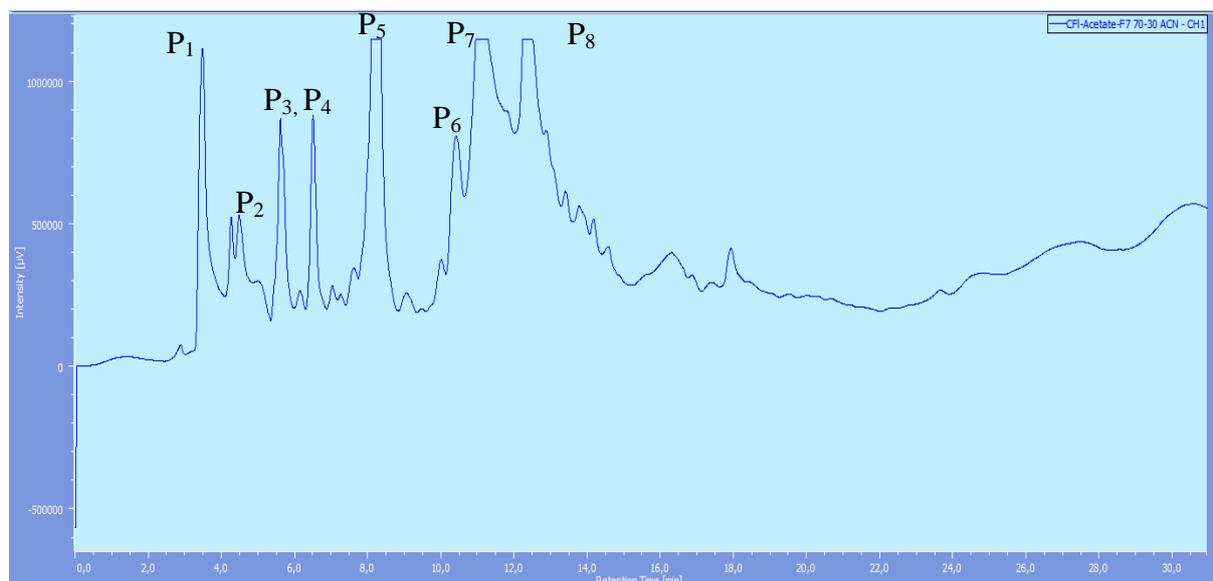


Figure IV-6. Chromatogramme de la séparation de la fraction F₁₃

En fin de séparation de la fraction F₁₃, d'après des analyses RMN-¹H on a eu plusieurs mélanges de composé et un composé à l'état pur c'est le composé F_{13-P8} reporté sous le code de **A₄**, le tableau 6 rassemble les résultats de cette séparation.

Tableau IV-6. Résultats de la séparation de la fraction F₁₃

Pic	P ₁	P ₂	P ₃ +P ₄	P _{4bis}	P ₅	P ₆ +P ₇	P ₈ (A₄)
Poids (mg)	2,5	5,25	5,04	1,6	6	9,7	5,1
	/	/	Mélange	/	Non pur	Mélange	Pur

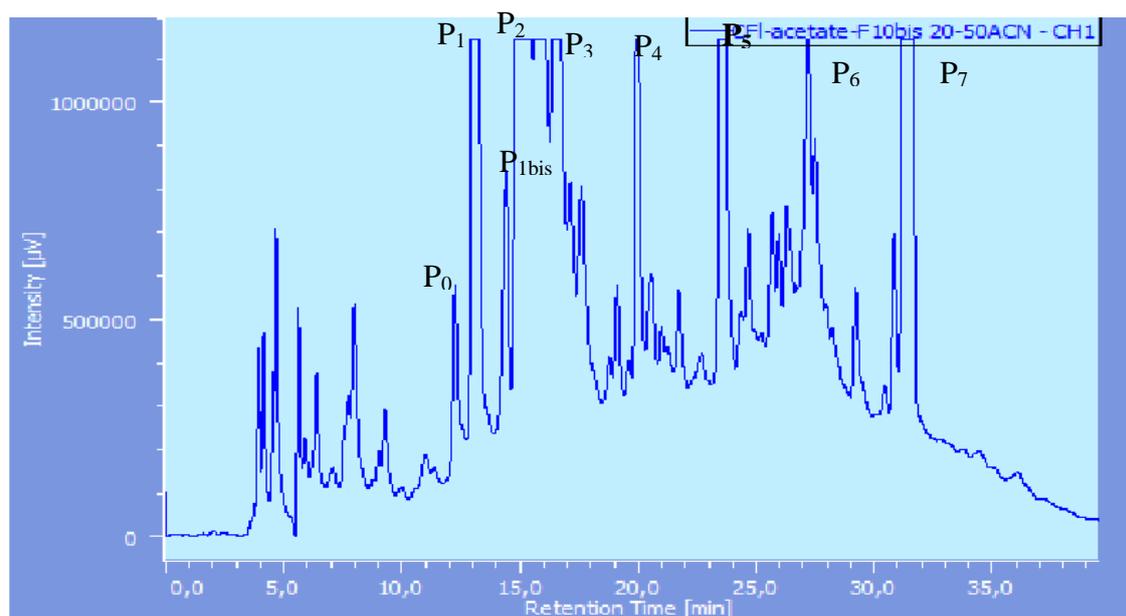
IV.5.3.1.6. Etude de la fraction F₂₀

La fraction F₂₀ d'une masse de 41 mg a été séparée par HPLC (Figure IV-7) dans les conditions chromatographiques suivants :

- ❖ Colonne semi- préparative de phenylhexyle.
- ❖ Phase mobile en mode gradient 80(H₂O+TFA)/ 20% ACN (tableau IV-7).
- ❖ La concentration de la fraction : 100 mg/ml.
- ❖ Le volume injecté : 50 µl.
- ❖ Débit : 3 ml/min.
- ❖ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Tableau IV-7. Conditions chromatographique de la séparation F₂₀

	Temps (min)	Débit (ml/min)	H ₂ O % + TFA	ACN%
1		3,00	80	20
2	5,00	3,00	80	20
3	35,00	3,00	50	50

Figure IV-7. Chromatogramme de la séparation de la fraction F₂₀

La séparation de cette fraction a mené à l'isolement de trois composés : F_{20-P1} sous le code de A₅, F_{20-P3} sous le code de A₆ et F_{20-P5} sous le code de A₇ (tableau IV-8).

Tableau IV-8. Résultats de la séparation de la fraction F₂₀

Nom de pic	P ₀	P ₁ (A ₅)	P _{1bis}	P ₂	P ₃ (A ₆)	P ₄	P ₅ (A ₇)	P ₆	P ₇
Poids (mg)	0,55	1,34	19	3,11	2	0,78	0,86	2,76	2,79
	/	Pur	/	Mélange	Pur	Mélange	Pur	Mélange	Mélange

IV.5.3.1.7. Résumé de la séparation de la phase acétate d'éthyle

L'étude de la phase acétate (Fleurs) s'est avérée être compliquée suite à la présence de produits majoritaires. Nous avons pu isoler sept produits à l'état purs il s'agit de : **A₁**, **A₂**, **A₃**, **A₄**, **A₅**, **A₆**, **A₇** (Figure IV-8) résume les différentes étapes de séparation et purification des composés isolés de la phase acétate d'éthyle de *Centaurea sempervirens*.

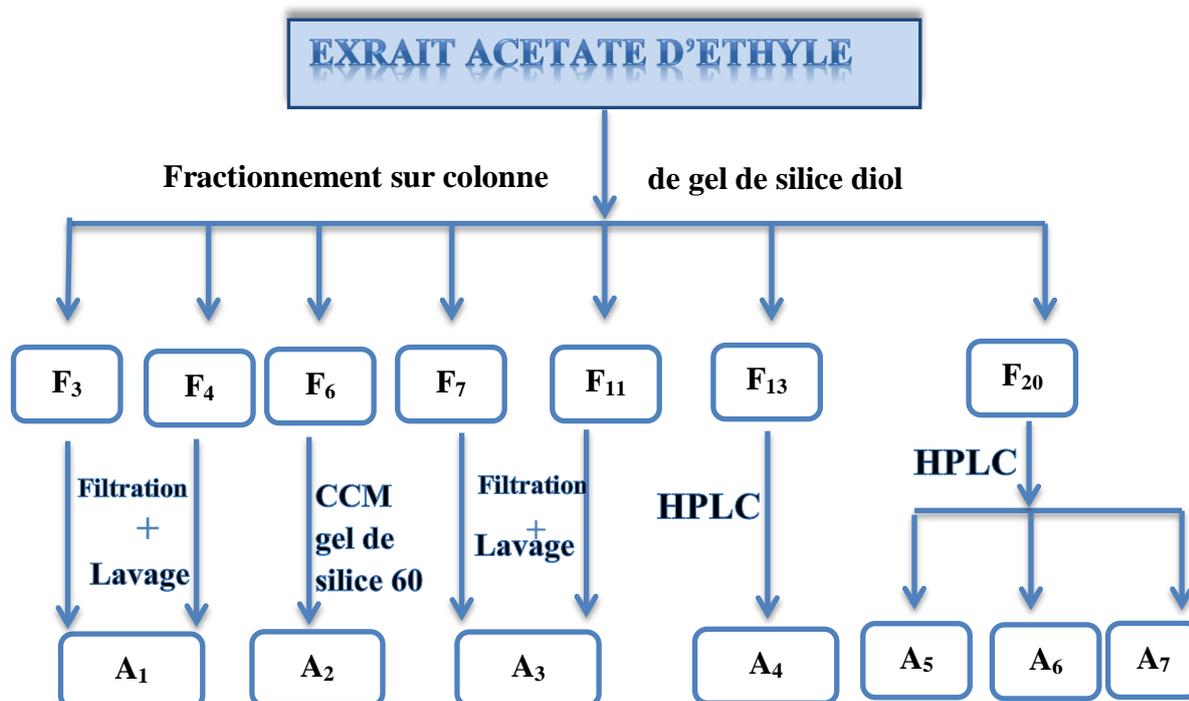


Figure IV-8. Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle

IV.5.3.2. Séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme

5 g de l'extrait chloroforme (Fleurs) ont été dissous dans un mélange (CH_2Cl_2 -MeOH 1/1) puis additionnés à quelques grammes de gel de silice greffée (diol) puis évaporé à sec afin d'obtenir un extrait solide sous forme de poudre homogène.

La poudre a été déposée sur une colonne de gel de silice (diol, 155 g) préparée dans l'éther de pétrole. L'élution a été réalisée avec de l'éther de pétrole et un gradient d'acétone avec une incorporation graduelle de méthanol jusqu'à 100 % de MeOH. 32 fractions de 100 ml ont été recueillies, évaporées, pesées et analysées par HPLC. Le tableau IV-9 résume le suivi de la colonne chromatographique.

Tableau IV-9. La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.

Nom de la fraction	Eluant				Poids (mg)
	Ether de pétrole %	Acétone %	MeOH %	Volume de l'éluant	
F ₁	100	0	0	100	17,96
F ₂	100	0	0	100	73,62
F ₃	90	10	0	100	20,47
F ₄	90	10	0	100	95,52
F ₅	80	20	0	100	21,26
F ₆	80	20	0	100	64,75
F ₇	70	30	0	100	84,26
F ₈	70	30	0	100	168,46
F ₉	60	40	0	100	314,52
F ₁₀	60	40	0	100	104,40
F ₁₁	50	50	0	100	37,13
F ₁₂	50	50	0	100	25,90
F ₁₃	40	60	0	100	23,39

Tableau IV-9. La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme. (Suite)

F ₁₄	40	60	0	100	2,83
F ₁₅	30	70	0	100	18,88
F ₁₆	30	70	0	100	12,34
F ₁₇	20	80	0	100	20,96
F ₁₈	20	80	0	100	74,27
F ₁₉	10	90	0	100	49,47
F ₂₀	10	90	0	100	41,76
F ₂₁	0	100	0	100	29,85
F ₂₂	0	100	0	100	46,00
F ₂₃	0	90	10	100	9,50
F ₂₄	0	90	10	100	35,30
F ₂₅	0	75	25	100	32,95
F ₂₆	0	75	25	100	24,20
F ₂₇	0	50	50	100	22,37
F ₂₈	0	50	50	100	20,14
F ₂₉	0	25	75	100	10,03
F ₃₀	0	25	75	100	8,20
F ₃₁	0	0	100	100	3,30
F ₃₂	0	0	100	100	2,00

Remarque

Lors de la récupération de l'extrait chloroforme, on a remarqué la présence de cristaux blancs au fond du ballon, après un lavage avec du MeOH et quelques gouttes de chloroforme, les cristaux (45 mg) ont été testés sur CCM avec plusieurs systèmes d'élution. L'analyse de ces cristaux par RMN mono et bi dimensionnelle a montré qu'il s'agit d'un mélange de deux composés. Nous les reportons sous les codes **C₁** et **C₂**.

IV.5.3.2.1. L'étude de la fraction F₉ de l'extrait chloroforme

La fraction F₉ a été injectée et analysée par HPLC sur colonne analytique Phenylhexyle 5 μm en mode gradient ECIMAR 90-10 (H₂O/ ACN), son aperçu chromatographique est reporté dans la figure IV-9.

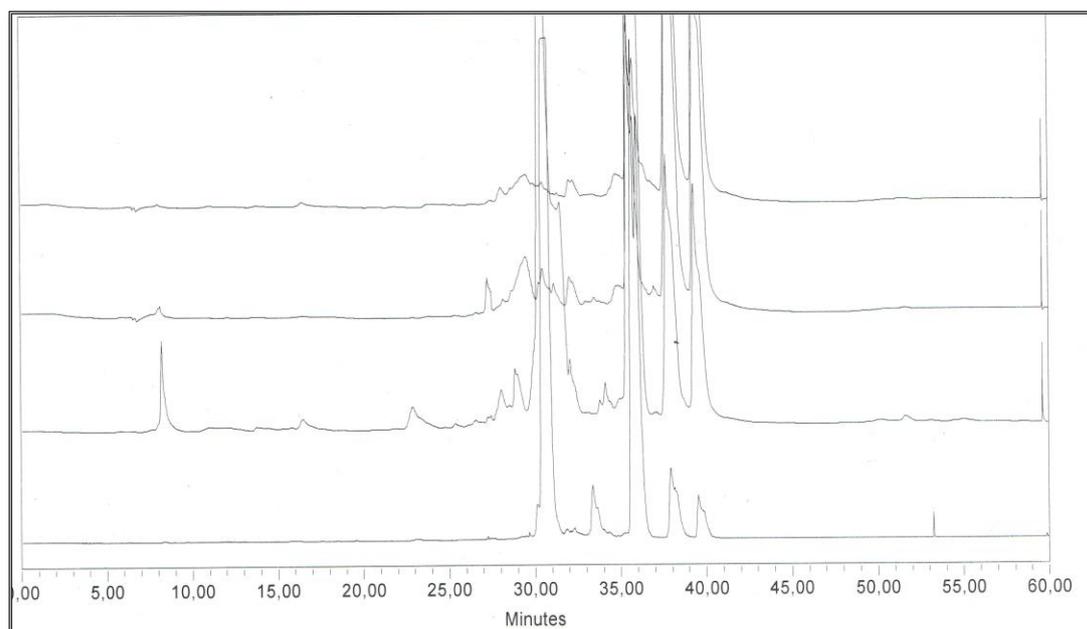


Figure IV-9. Aperçu chromatographique de la fraction F₉

La fraction F₉ d'une masse de 314,52 mg a été séparée par HPLC (Figure IV-10) en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- ❖ Colonne semi- préparative de phenylhexyle.
- ❖ Système d'élution en mode gradient (80% H₂O/ 20% ACN) jusqu'à (30% H₂O/ 70% ACN) (tableau IV-10).
- ❖ La concentration de la fraction : 100 mg/ml.
- ❖ Le volume injecté : 50 μl.

- ❖ Débit : 3 ml/min.
- ❖ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Tableau IV-10. Conditions chromatographique de la séparation de la fraction F₉

	Temps (min)	Débit (ml/min)	H ₂ O %	ACN%
1		3,00	80	20
2	5,00	3,00	80	20
3	35,00	3,00	70	30
4	35,50	3,00	80	20
5	40,00	3,00	80	20

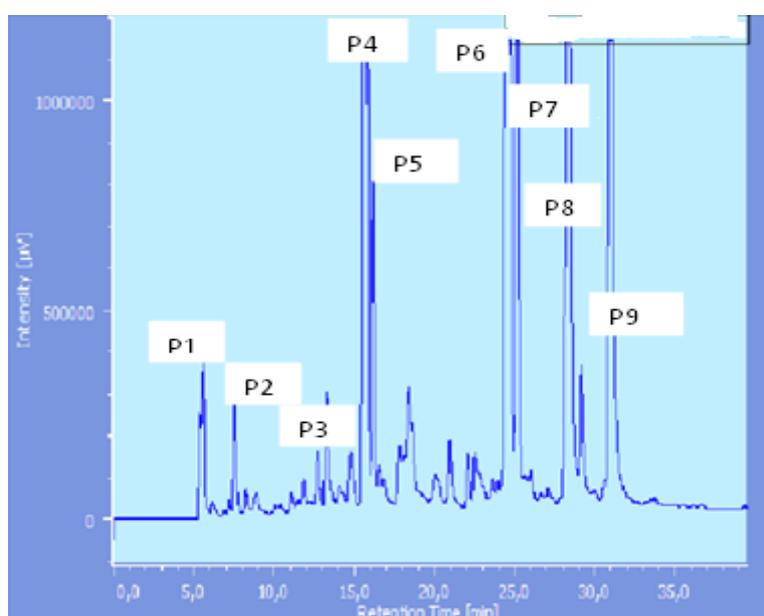


Figure IV-10. Chromatogramme de la séparation de la fraction F₉

En fin de séparation de la fraction F₉, d'après l'analyse RMN-¹H on a eu deux mélanges de composé et deux composés à l'état pur c'est les composés F_{9-P4} et F_{9-P9} reportés sous les codes C₃, C₄ respectivement. Le tableau IV-11 rassemble les résultats de la séparation.

Tableau IV-11. Résultats de la séparation de la fraction F₉

Pic	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄ (C ₃)	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉ (C ₄)
Poids (mg)	0,2	0,3	0,2	2,5	0,5	1,7	0,7	1	1,4
	/	/	/	Pur	/	Mélange	/	Mélange	Pur

Note

Suite à un petit incident on a perdu la majorité des fractions de l'extrait chloroforme et vu la faible quantité et la composition complexe des fractions restantes, nous avons décidé de refaire la séparation chromatographique sur colonne de cet extrait.

IV.5.3.3. Deuxième séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme

Une masse de 10 g de l'extrait chloroforme (Fleurs) a été dissoute dans un mélange (CH_2Cl_2 -MeOH 1/1) additionnés à quelques grammes de gel de silice 60 normale, évaporés et déposés sur une colonne préparée dans l'éther de pétrole et éluée avec le système d'éluant (éther de pétrole/ acétone/ MeOH) (Figure IV-11). Le suivi de la séparation a été effectué par CCM de gel de silice, les plaques ont été visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) ensuite révélées avec un révélateur à base d'anisaldéhyde et chauffées à 100°C. Cette deuxième colonne a permis d'obtenir 43 fractions après le regroupement des lots similaires. Plusieurs fractions ont été étudiées par chromatographie. Le tableau IV-12 résume le suivi de la colonne chromatographique.



Figure IV-11. La colonne de l'extrait chloroforme

Tableau IV-12. La deuxième séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.

Fraction	Ether de Pétrole %	Acétone %	MeOH %	Poids (mg)
F ₁ '	100	0	0	15,40
F ₂ '	100	0	0	21,10
F ₃ '	95	5	0	18,20
F ₄ '	95	5	0	33
F ₅ '	90	10	0	28,70
F ₆ '	90	10	0	36,50
F ₇ '	90	10	0	48,80
F ₈ '	90	10	0	65,50
F ₉ '	90	10	0	100,40
F ₁₀ '	90	10	0	193,40
F ₁₁ '	90	10	0	53
F ₁₂ '	90	10	0	74,70
F ₁₃ '	90	10	0	92,50
F ₁₄ '	90	10	0	37,70
F ₁₅ '	90	10	0	63,30
F ₁₆ '	85	15	0	60,30
F ₁₇ '	85	15	0	27,70
F ₁₈ '	85	15	0	72,60
F ₁₉ '	80	20	0	18,70
F ₂₀ '	80	20	0	45,7
F ₂₁ '	80	20	0	63,70
F ₂₂ '	80	20	0	82,50
F ₂₃ '	80	20	0	87,70
F ₂₄ '	80	20	0	91,20
F ₂₅ '	75	25	0	100,80
F ₂₆ '	75	25	0	182,30

Tableau IV-12. La deuxième séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme (suite)

F' ₂₇	75	25	0	74,40
F' ₂₈	75	25	0	26,60
F' ₂₉	75	25	0	136,10
F' ₃₀	70	30	0	105,80
F' ₃₁	70	30	0	112
F' ₃₂	70	30	0	146,30
F' ₃₃	60	40	0	99,80
F' ₃₄	60	40	0	357,50
F' ₃₅	50	50	0	222
F' ₃₆	30	70	0	85,20
F' ₃₇	15	80	0	52,70
F' ₃₈	0	100	0	37,50
F' ₃₉	0	90	10	23,30
F' ₄₀	0	70	30	18,50
F' ₄₁	0	50	50	16,80
F' ₄₂	0	25	75	10,80
F' ₄₃	0	0	100	5,90

IV.5.3.3.1. L'étude des fractions de la deuxième colonne de l'extrait chloroforme

Les fractions les moins complexes et les plus abondantes ont été sélectionnées pour étude. Sur cette base les fractions F'₁₀, F'₂₆, F'₂₉, F'₃₀, F'₃₄ et F'₃₅ ont été choisies.

IV.5.3.3.2. Etude de la fraction F'₁₀

La fraction F'₁₀ d'une masse de 193,40 mg montre la formation des cristaux blancs. Après filtration et lavage avec du MeOH, Les cristaux obtenus (60 mg) ont été testés sur CCM avec plusieurs systèmes d'élution. L'analyse de ces cristaux par RMN mon et bi dimensionnelle a montré que c'est un mélange de deux composés. Nous les reportons sous les codes C₅ et C₆.

IV.5.3.3. Etude de la fraction F₂₆

Cette fraction (m = 182,30 mg) se présente sous forme de cristaux, mêlés à de la chlorophylle, elle a subi un lavage avec du méthanol et quelques gouttes de CHCl₃, l'opération a été répétée plusieurs fois. Testé sur CCM avec plusieurs systèmes d'élution, ce composé montre un spot unique de couleur noir-violet sous la lumière de Wood et une couleur jaunâtre avec les vapeurs d'ammoniac et le révélateur à base d'anisaldéhyde ce qui oriente vers une molécule de type flavonoïde pour ce composé (36,2 mg). (Figure IV-12).

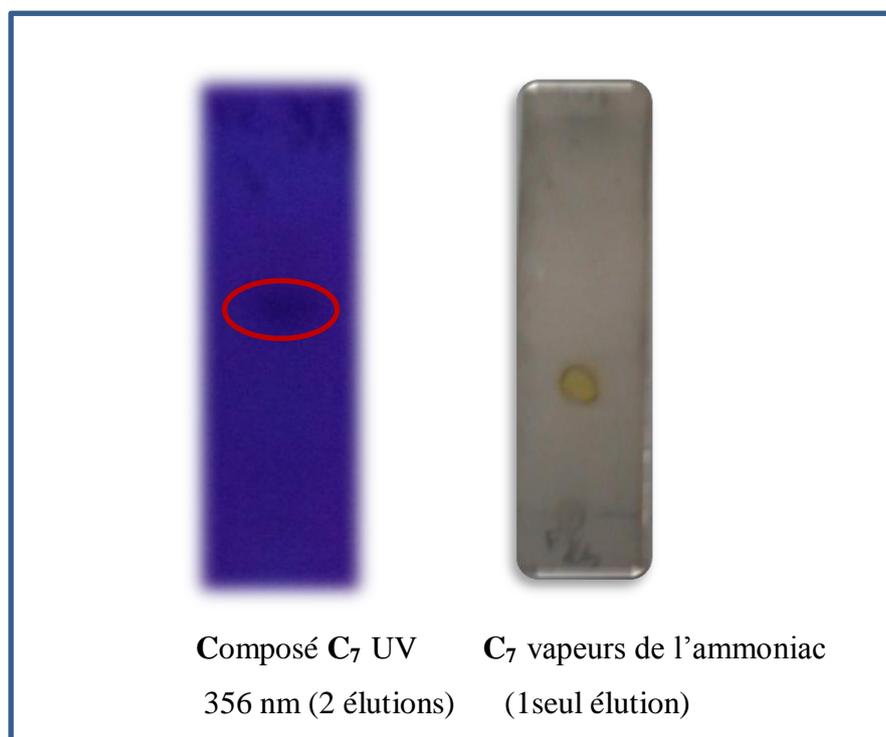


Figure IV-12. Le composé C₇ sous lumière wood et avec les vapeurs de l'ammoniac

IV.5.3.3.4. Etude de la fraction F₂₉

Avec une masse de 136,10 mg la fraction F₂₉ contient visuellement un précipité jaune, après filtration, la poudre a été récupérée et lavée plusieurs fois avec du MeOH et testée avec plusieurs systèmes d'élution sur CCM, pour obtenir le composé C₈ (54,7 mg) soluble dans le DMSO.

IV.5.3.3.5. Etude de la fraction F'₃₀

La plaque analytique de cette fraction d'une masse de 105,80 mg montre la présence de deux spots majoritaires de couleur noir-violette sous la lumière de Wood à 365 nm (Figure IV-13), la séparation sur chromatographie préparative sur CCM avec le système d'éluion (CHCl₃/Acétone) 9/1 a permis l'obtention de deux produits « F'_{30-b}, F'_{30-c}», la purification des deux produits a été réalisée sur gel de Sephadex LH20 et l'éluion avec un mélange (MeOH-CHCl₃) (9/1). A la fin de cette purification deux produits ont été obtenus à l'état pur, le composé F'_{30-c5} et F'_{30-b4}, nous les reportons sous les codes C₉ et C₁₀.

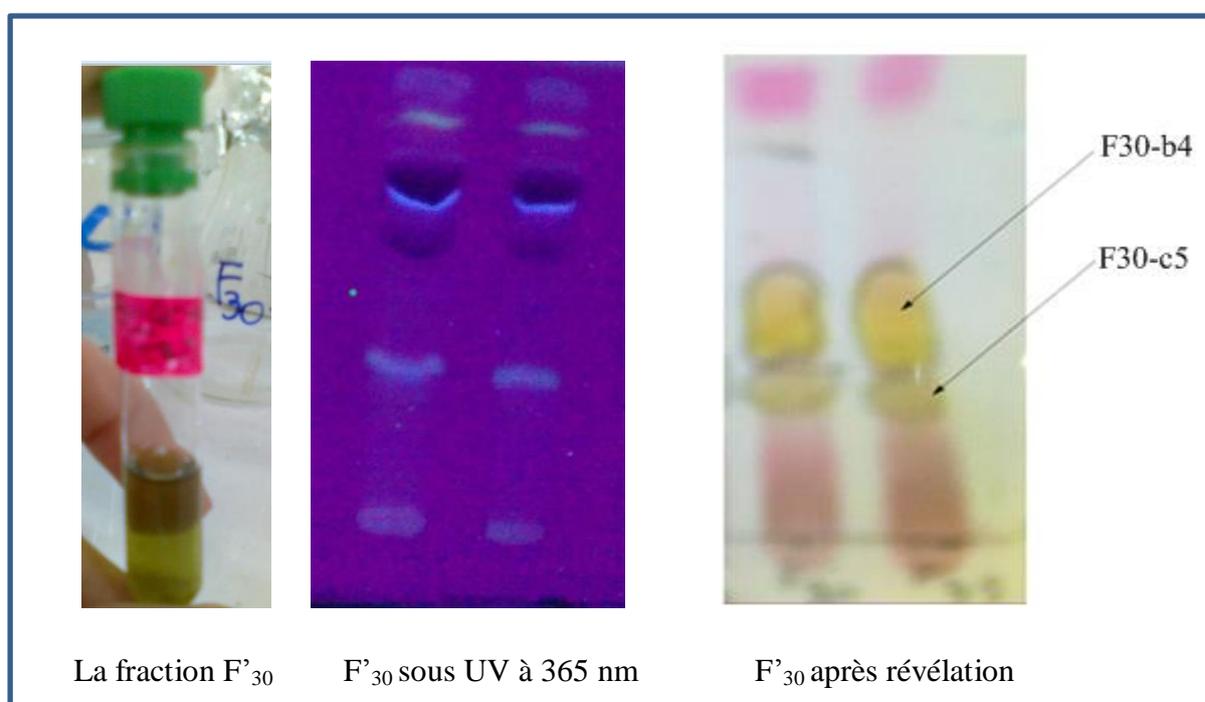


Figure IV-13. Représentation de la fraction F'₃₀ sous UV et après révélation.

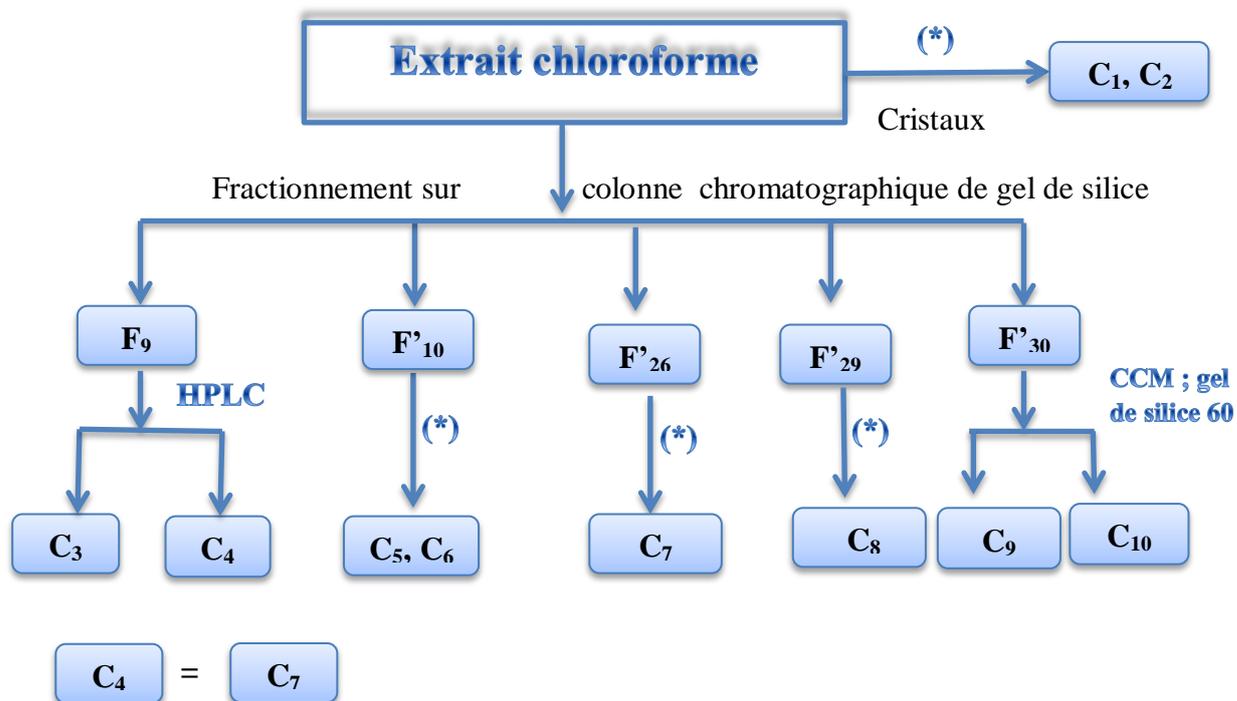
IV.5.3.3.6. Etude des fractions F'₃₄ et F'₃₅

Les fractions F'₃₄ (357,50 mg) et F'₃₅ (222 mg) ont subi une séparation chromatographique sur plaques préparatives avec le système d'éluion éther de pétrole/acétate d'éthyle (1/3) pour la fraction F'₃₄ et le système CHCl₃ /MeOH (9,5/0,5) pour la fraction F'₃₅. Cette séparation a mené à l'obtention de deux composés de la première fraction et un composé de la deuxième.

Malheureusement ces trois composés ont polymérisé, il est en effet, connu que les lactones sesquiterpéniques polymérisent à des températures élevées.

IV.5.3.3.7. Résumé de la séparation de la phase chloroforme

L'étude de la phase chloroforme nous a permis d'isoler dix produits à l'état pur : C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀. La figure 13 résume les différentes étapes de séparation et purification des composés isolés de la phase chloroforme de *Centaurea sempervirens* L.



(*) Filtration + lavage

Figure IV-14. Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait chloroforme

IV.5.4. L'huile essentielle de *Centaurea sempevirens* L.

L'étude des huiles essentielles des parties aériennes de la plante ont été effectués pour la première fois, dans le but de déterminer la nature et les pourcentages des constituants des huiles.

IV.5.4.1. La méthode d'extraction

400 g des parties aériennes de la plante ont été utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, à l'aide d'un appareil de type Kaiser-Lang pendant 3 heures, avec l'usage de 2 l d'eau et une température de 100°C.

IV.5.4.2. Propriétés Organoleptiques

Aspect : Liquide visqueux.

Couleur : Verte.

Odeur : Forte

Rendement : 0,2 %.

Le rendement en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche des parties aériennes de la plante 400 g.

IV.5.4.3. Analyse par Chromatographie gazeuse/Détecteur à Ionisation de Flamme (CG-DIF)

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Agilent 6890 (GC-FID), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS de silice fondue (5% diphényle-95% diméthyl-polysiloxane (25 x 0.25 mm, épaisseur du film 0.25 µm), la programmation de la température consiste en une élévation de 50 °C (5 min) à 250 °C à 3°C/min, puis en palier de 10 min à 250 °C. La température de l'injecteur était de 280 et celle du détecteur de 300 °C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60. La quantité d'huile essentielle a été diluée dans l'acétone à 3.5% (v/v) et 1 µl a été injecté. L'hélium est utilisé comme gaz porteur (1.0 ml/min). Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne. Les solutions d'alcanes standards (C₈-C₂₀) ont été analysées dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention (RI).

IV.5.4.4. Analyse par Chromatographie gazeuse / Spectrométrie de Masse (CG/SM)

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Agilent 7890/5975 (GC-MS), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (25 m x 0.25 mm, épaisseur de film de 0.25 μm) programmé avec les mêmes conditions que pour GC-FID. L'ionisation du spectromètre de masse (MS) a été réglée en mode impact électronique positif à 70 eV, et le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V. Les températures de la source d'ions et le quadripolaire MS étaient de 230 °C et 180 °C respectivement. Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme m/z 33-450. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés en comparant leur spectre de masse et leur indice de rétention (RI) avec ceux des composés de référence (Adams, 1995; Mc Lafferty et Stauffer, 1991).

IV.5.5. Etude biologique

IV.5.5.1. Dosages des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en μg d'équivalent acide gallique par mg d'extrait.

➤ Le principe du dosage

Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR), qui en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleu en présence de polyphénols.

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleu produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

➤ Instrument utilisés

Un spectrophotomètre à cuve de volume 3 ml ou spectrophotomètre de marque DR2800 HACH LANGE avec une cuve forme tube de volume 5 ml.

➤ Réactifs utilisés

- 1- Eau distillée
- 2- FCR (Folin-Ciocalteu réactif)
- 3- Na₂CO₃ de 2 à 7% (Carbonate de sodium)
- 4- Acide gallique (2 mg/ 2ml)
- 5- Extraits de plante

➤ Mode opératoire

Nous avons dosé les extraits : chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Pour un volume de 125 µl de solution d'extrait, 1 mg dans 1 ml d'eau distillée, on ajoute 500 µl d'eau distillée puis 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1250 µl de carbonate de sodium sont additionnés. Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante, la lecture a été faite à 760 nm.

L'acide gallique (50-500 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (même protocole utilisé pour l'extrait) à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

IV.5.5.2. Dosages des Flavonoïdes

➤ Le principe du dosage

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée par la formation d'un complexe avec Al⁺³ (Turkoglu *et al.*, 2007). Une courbe d'étalonnage est établie avec la quercétine comme standard et les résultats sont exprimés en µg équivalent de quercétine par mg d'extrait.

➤ Instrument utilisés

L'utilisation des mêmes spectrophotomètres à cuve déjà utilisés pour le dosage des polyphénols.

➤ Réactifs utilisés

- 1- Méthanol
- 2- Eau distillée
- 3- 10% Aluminum nitrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$)
- 4- 1 M Potassium acétate (CH_3COOK)
- 5- Quercétine (Flavonoïde)
- 6- Extraits de plante

➤ Mode opératoire

Pour un volume de 250 μl d'une solution d'extrait, 1 mg dans 1 ml de méthanol, on ajoute 2550 μl de méthanol puis 100 μl de CH_3COOK (9,80 g dans 100 ml d'eau distillée) et enfin on ajoute 100 μl d'aluminum nitrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$). Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante, la lecture a été effectuée à 415 nm.

La quercétine (25-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavonoïdes totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en μg d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

IV.5.5.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des trois extraits de *Centaurea sempervirens* a été testée par deux méthodes : piégeage du radical libre DPPH et la méthode CUPRAC.

IV.5.5.3.1. Activité anti radicalaire DPPH

➤ Le principe

Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en (2,2 diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune. La capacité d'inhibition est mesurée selon le protocole décrit par Blois (1958).

➤ Instrument utilisés

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 200 µl pour chaque puit

➤ Réactifs utilisés

- 1- Ethanol
- 2- DPPH
- 3- α-tocopherol
- 4- BHA
- 5- BHT
- 6- Extraits de plante

➤ Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée dans le méthanol (6 mg dans 100 ml de méthanol), et gardée à -20°C à l'abri de la lumière.

40 µl de différentes concentrations (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800 µg/ml) des trois extraits de la plante ont été ajoutés à 160 µl de la solution de DPPH, trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT, BHA et l'α-tocophérol ont été utilisés comme normes anti-oxydantes, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \right) \times 100$$

A_{Blanc} est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs sans l'extrait.

A_{Extrait} est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

IV.5.5.3.2. La capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak *et al.*, (2004). Une solution a été préparée avec le mélange des volumes de : 50 µl Cu (II) (10 mM), 50 µl neocuprine (7,5 mM), et 60 µl de solution tampon CH₃COONH₄ (1 M, pH = 7,0). Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial afin de rendre le volume final de 200 µl. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de BHA, BHT, l'α-tocophérol et quercétine. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV.5.5.4. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite **méthode de diffusion des disques**.

IV.5.5.4.1. Souches bactériennes (Figure IV-15)

- Les souches bactériennes testées sont des isolats cliniques :
 - Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) (1)
 - Staphylococcus aureus* (Gram positif) (2)
 - Acinetobacter baumannii* (Gram négatif) (3)
 - Strephococcus groupe d* (Gram positif) (4)
- Ces bactéries ont été mises à incuber dans un premier temps dans du bouillon nutritif dans une étuve à 37°C pendant 18 h. l'incubation des boites à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Elles sont ensuiteensemencées sur un milieu gélosé nutritif de façon à obtenir des colonies bien isolées.

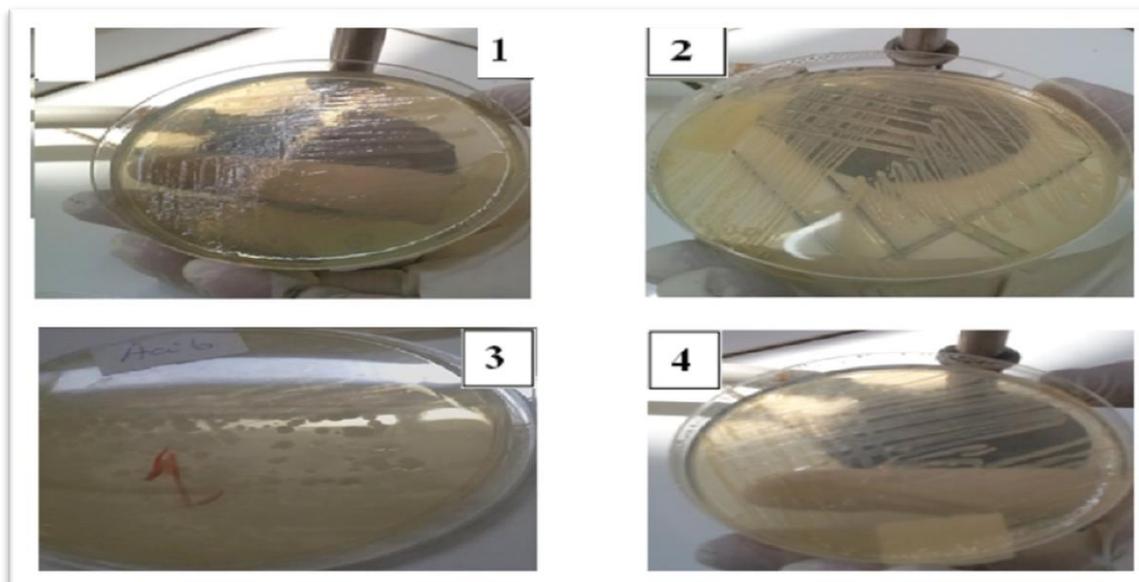


Figure IV-15. Les souches bactériennes testées

IV.5.5.4.2. Préparation des dilutions des extraits

Les extraits ont été dissous dans le DMSO. Le test a été effectué à différentes concentrations des extraits.

IV.5.5.4.3. Protocole d'évaluation de l'activité

❖ Milieu de culture

Gélose Mueller Hinton, coulée en boîtes de pétri et séchée avant l'emploi.

❖ Ensemencement et dépôt des disques

Les boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton sont inondées par une suspension bactérienne différente. Les disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés ensuite d'une petite quantité des extraits (plus de 20 µl par disque) et déposés sur la surface de la gélose inoculée. Des disques de papier imprégnés de DMSO servant de témoin négatif, sont aussi déposés sur la surface de la gélose inoculée. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

❖ Lecture des antibiogrammes

Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

IV.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de CI_{50} (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par " Student's t-test " et le test ANOVA univarié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

IV.7. Conclusion

L'étude phytochimique, a permis d'isoler 7 produits en quantité appréciable de la phase acétate d'éthyle et 9 produits de la phase chloroforme, cela a été réalisé avec l'utilisation de diverses techniques de chromatographie. L'obtention de l'huile essentielle des parties aérienne de la plante a été effectuée avec la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau.

Pour l'évaluation des activités biologiques nous avons fait appel à deux méthodes pour l'activité antioxydante (DPPH et CUPRAC), ainsi que la méthode de diffusion des disques pour l'activité antibactérienne.

Chapitre V

Résultats et discussion

V.1. Introduction

Cette partie reporte les résultats obtenus et leur discussion, aussi bien du côté phytochimique que du côté identification structurale de 15 composés sur les 16 composés séparés des deux phases (acétate d'éthyle et chloroforme) en utilisant les différentes méthodes d'analyse ainsi que l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de la plante étudiée. Ce chapitre renferme également les résultats des activités biologiques recherchées.

V.2. Le screening phytochimique

Le screening phytochimique est basé essentiellement sur des réactions de précipitation et de réactions de coloration spécifique aux différents métabolites secondaires.

- Une réaction positive est représentée par : (++)
- Une réaction moyennement positive est représentée par : (+)
- L'absence d'une famille de substances naturelles représentée par : (-)

Le tableau V-1 rassemble les résultats du screening des fleurs et des feuilles de *Centaurea sempervirens* L.

Tableau V-1. Résultats du screening phytochimique de *Centaurea sempervirens* L.

Groupes chimiques	Fleurs	Feuilles
Alcaloïdes	-	-
Coumarines	-	-
Terpènes	+	+
Stérols :		
➤ Saturés	++	++
➤ Non saturés	++	++
Triterpènes	+	+
Tanins :		
➤ Catéchiques	+	+
➤ Galliques	-	-
Flavonoïdes	++	++
Leucoanthocyanes	++	++

Tableau V-1. Résultats du screening phytochimique de *Centaurea sempervirens* L. (suite)

Anthocyanes	-	-
Saponines	+	+

L'analyse de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

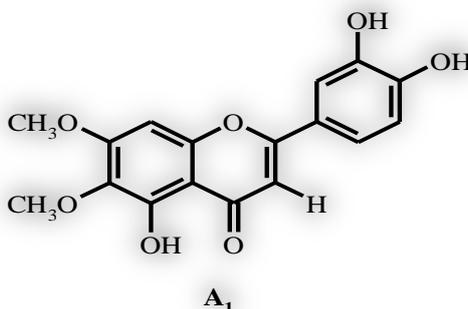
- ❖ La majorité des groupes chimiques testés sont présents dans les deux organes de la plante d'une façon similaire.
- ❖ La présence des flavonoïdes, stérols saturés, stérols insaturés et les leuco anthocyanes est importante.
- ❖ Une présence modérée des terpènes, triterpènes, tanins catéchiques et saponines.
- ❖ L'absence totale des alcaloïdes, coumarines, tanins galliques et des anthocyanes.

Ces résultats sont en accord avec le métabolisme secondaire des espèces du genre *Centaurea* (Bicha *et al.*, 2013). La présence importante des flavonoïdes dans la plante a été confirmée par la suite lors de l'identification structurale des métabolites isolés, où la majorité était de type flavonoïde. Il faut noter que cette présence pourrait impliquer des activités biologiques intéressantes (Ergene, 2006 ; Seghiri *et al.*, 2009).

V.3. Détermination structurale des composés isolés de la phase acétate d'éthyle

La séparation chromatographique de la phase acétate a permis de séparer sept composés dont six ont été identifiés par la combinaison de leurs données spectroscopiques notamment l'analyse des spectres : de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC), de spectrophotométrie UV-Vis avec et sans la présence de réactifs spécifiques ainsi que par spectrométrie de masse à haute résolution en mode d'ionisation par électronebulisation positive (positive HR-ESIMS).

V.3.1. Identification du composé A₁



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, sa fluorescence sous la lumière UV 365 nm est mauve foncé, cette couleur suggère un squelette flavonoïde de type flavone ou flavonol-3-OR.

L'examen du spectre RMN-¹H (Figures V-1, V-1' et V-1'') du composé A₁ enregistré dans le (DMSO-d₆, 400 MHz) indique la présence de :

- ✓ Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_H = 7,47$ ppm ($J = 7,90 ; 1,90$ Hz) partiellement couvert par un autre doublet d'intégration 1H également à $\delta_H = 7,45$ ppm ($J = 1,90$ Hz), ces signaux sont attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- ✓ Un doublet large d'intégration 1H à $\delta_H = 6,91$ ppm ($J = 7,90$ Hz) attribuable à H-5'.
- ✓ Deux singulets d'intégration 1H à $\delta_H = 6,89$ et $\delta_H = 6,74$ ppm attribuables aux protons H-8 et H-3 ou H-3 et H-6 orientant vers une flavone substituée soit en C-6 soit en C-8. Sur le spectre HSQC (Figure V-2), le proton résonant à $\delta_H = 6,89$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_C = 91,98$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du C-8 d'une flavone. De ce fait le proton résonant à $\delta_H = 6,89$ ppm sera attribué au H-8, le proton résonant à $\delta_H = 6,74$ ppm sera attribué au H-3. Cette donnée est en parfait accord avec la valeur du déplacement chimique de C-3 que l'on relève à $\delta_C = 102,99$ ppm sur le spectre HSQC. A ce stade, nous pouvons attendre une flavone substituée entre autre en C-6.
- ✓ Deux singulets correspondant à des groupements méthoxyles (OCH₃) à $\delta_H = 3,4$ et $3,74$ ppm.
- ✓ Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 12,96$ ppm caractéristique du proton d'un groupement OH en C-5 d'un flavonoïde.

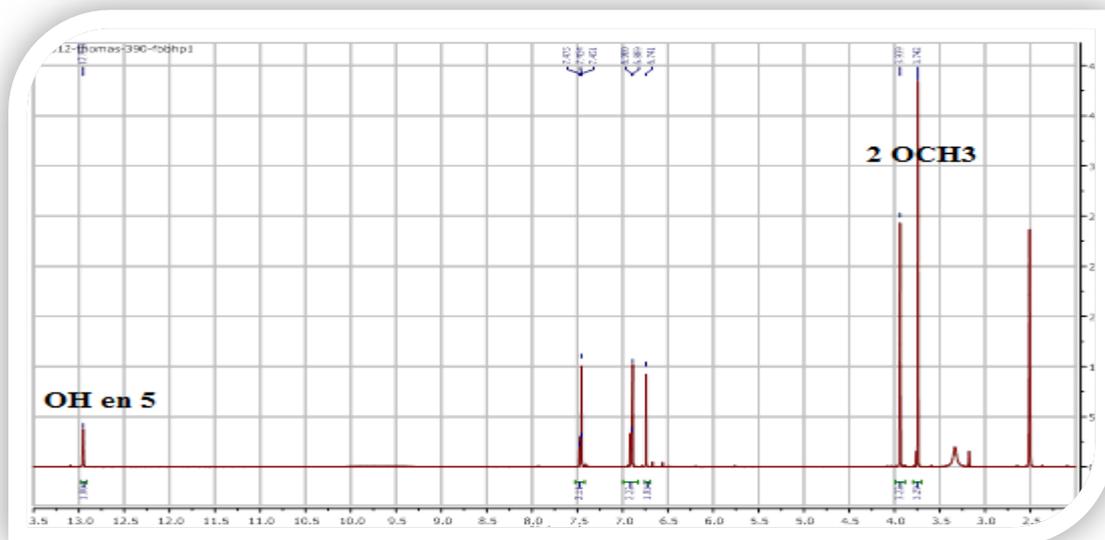


Figure V-1. Spectre RMN- ^1H du composé A_1 (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm)

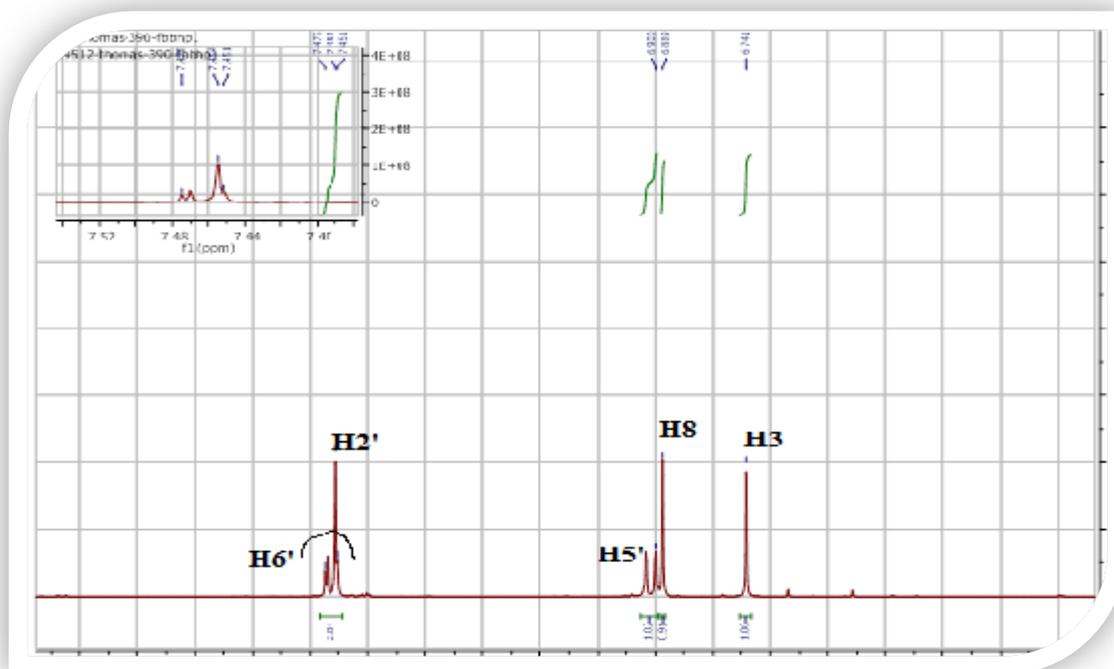


Figure V-1'. Etalement 1 du spectre RMN- ^1H du composé A_1 (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm)

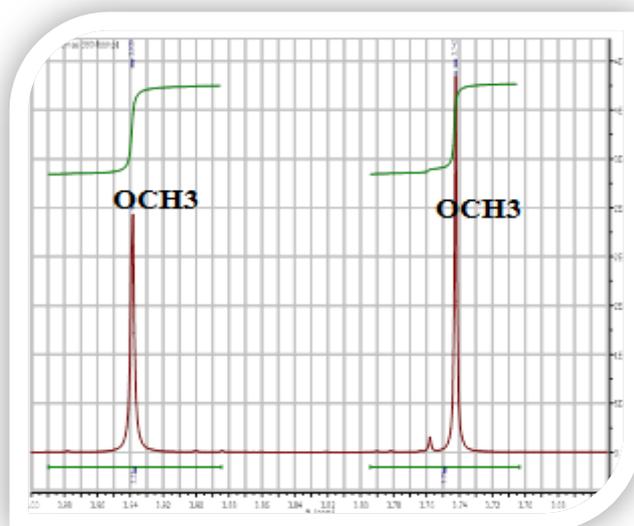


Figure V-1''. Etalement 2 du spectre RMN- ^1H du composé A_1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

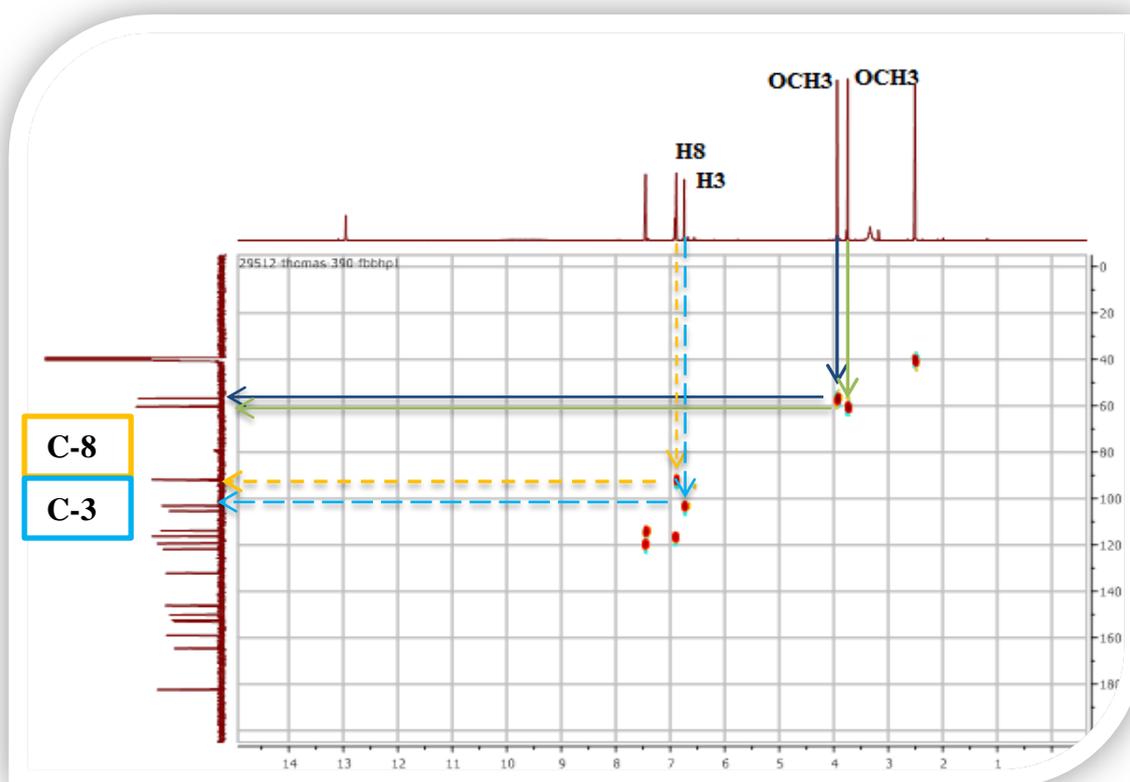


Figure V-2. Spectre HSQC du composé A_1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Le spectre HSQC du composé **A₁** (Figures V-2') reporte les autres données suivantes :

- ✓ Le proton H-2' ($\delta_H = 7,45$ ppm) permet la localisation de la résonance du C-2' à $\delta_C = 113,90$ ppm.
- ✓ Le proton H-5' ($\delta_H = 6,91$ ppm) permet la localisation du signal du C-5' à $\delta_C = 116,37$ ppm.
- ✓ Une corrélation entre le H-6' et le carbone à $\delta_C = 121,16$ ppm attribuable donc à C-6'.
- ✓ Les protons du groupement méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,74$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 60,32$ ppm et ceux du méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,94$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 56,95$ ppm.

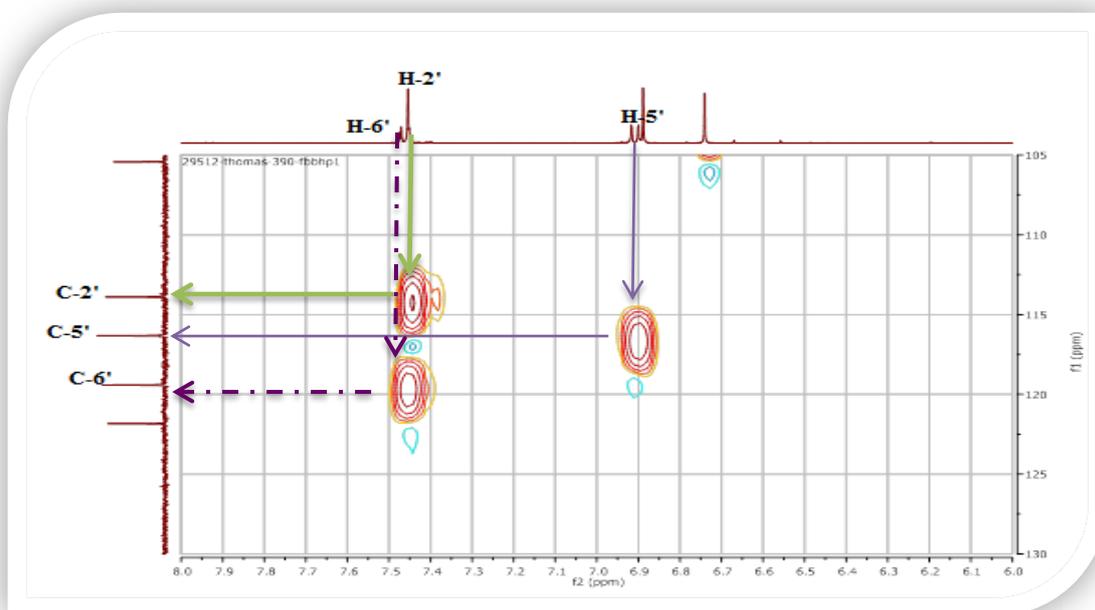


Figure V-2'. Etallement du spectre HSQC du composé **A₁** (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm})

Le positionnement des groupements méthoxyles a été réalisé en se basant sur le spectre de l'expérience HMBC (Figure V-3) où le méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,74$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_C = 132,18$ ppm. La valeur de ce déplacement chimique est en faveur de son attribution au C-6. Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC, l'autre groupement méthoxyle ($\delta_H = 3,94$ ppm) et le proton H-8 montre des taches de corrélation avec le même atome de carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 158,96$ ppm. Cette observation permet l'attribution de ce carbone au C-7.

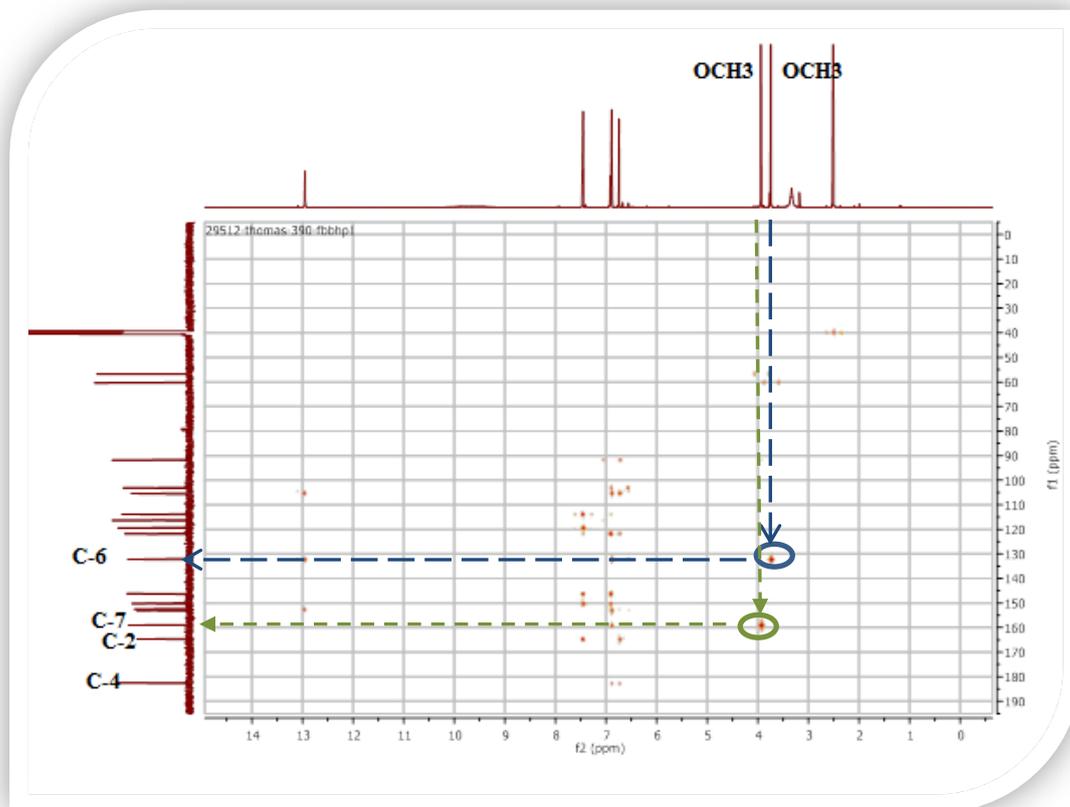


Figure V-3. Spectre HMBC du composé **A₁** (400 MHz, DMSO, δ ppm)

Sur le même spectre HMBC (Figures V-3' et V-3'') on termine l'attribution des carbones de la molécule suite à leurs corrélations avec les protons situés à deux et trois liaisons de ces carbones (Figure V-4). En effet, le proton H-3 permet aisément de confirmer l'attribution du C-4 à la résonance à $\delta_C = 182,66$ ppm. Les protons H-3, H-2' et H-6' permettent la localisation du signal du C-2 à $\delta_C = 164,81$ ppm. Les protons H-2' et H-5' permettent la localisation du signal du C-3' à $\delta_C = 146,04$ ppm. Les protons H-6', H-2' et H-5' permettent la localisation du signal du C-4' à $\delta_C = 150,07$ ppm. Les protons H-3, H-2', H-6' et H-5' permettent la localisation du signal du C-1' à $\delta_C = 121,73$ ppm. Le proton H-8, et le proton du OH-5 permettent la localisation du signal du C-10 à $\delta_C = 105,38$ ppm. Le proton H-8, permet la localisation du signal du C-9 à $\delta_C = 152,94$ ppm. Le proton du OH-5 permet la localisation du signal du C-5 à $\delta_C = 153,17$ ppm.

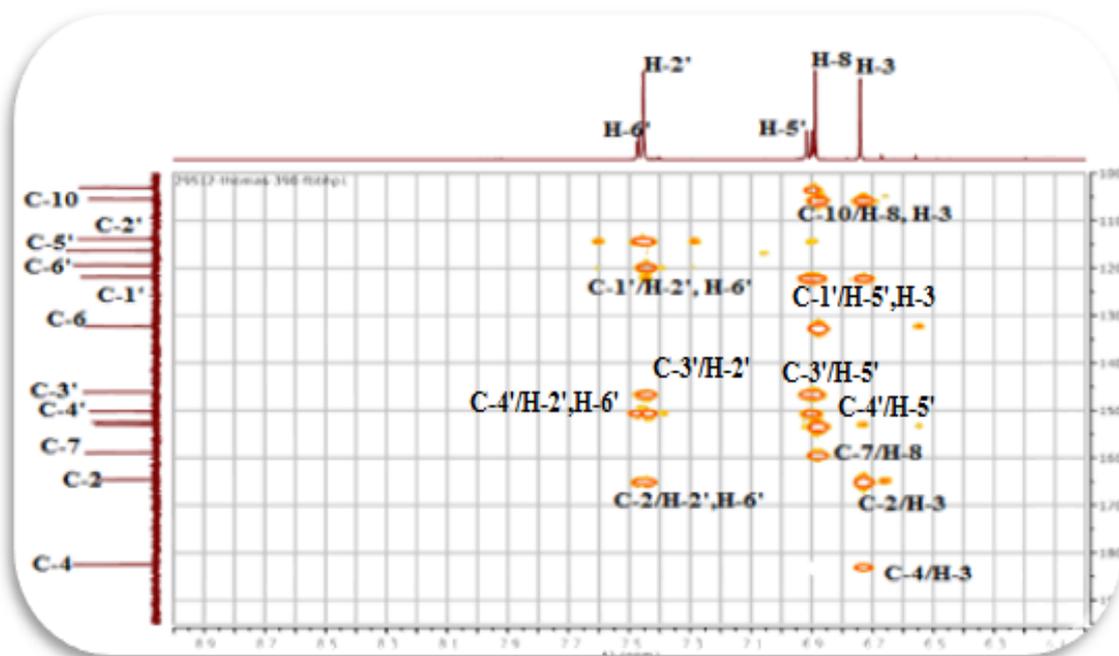


Figure V-3'. Etallement 1 du spectre HMBC du composé A₁ (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm})

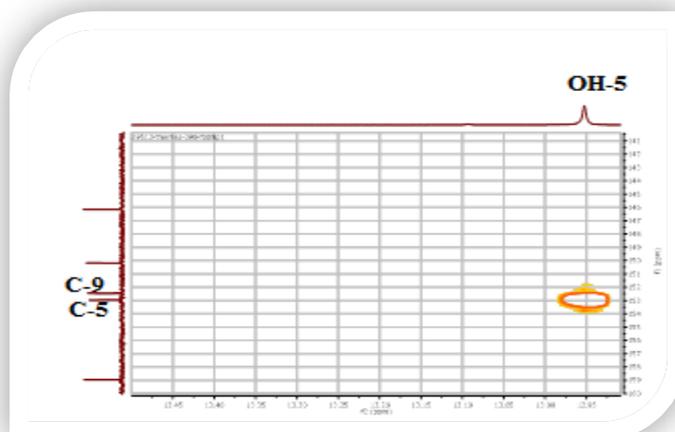


Figure V-3''. Etallement 2 du HMBC du composé A₁ (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm})

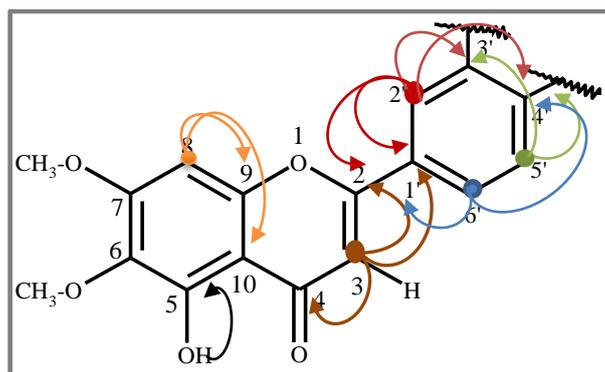


Figure V-4. Les différentes corrélations entre carbones et protons voisins

L'attribution des carbones de la molécule est représentée dans le spectre RMN- ^{13}C (Figure V-5).

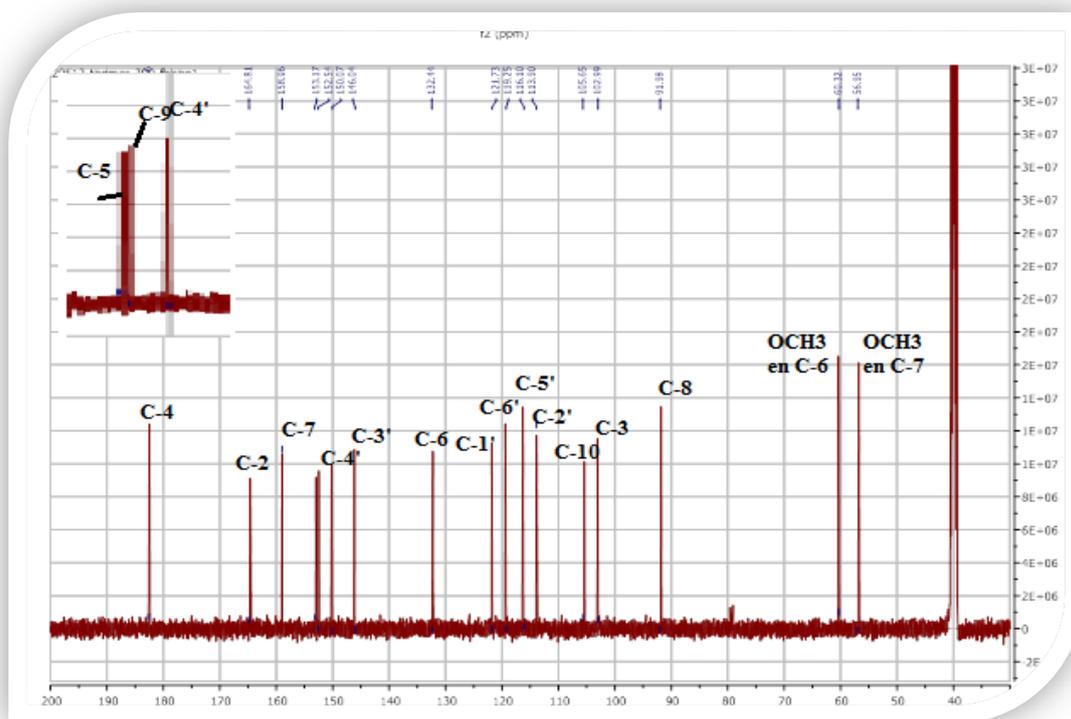


Figure V-5. Le spectre RMN- ^{13}C du composé **A**₁ (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-3', C-4' de ce flavonoïde indiquent qu'ils sont oxygénés, comme tous les carbones du spectre ont été utilisés, il est évident que ces positions sont hydroxylées.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure V-6. Il s'agit du Cirsioliol (Forgo *et al.*, 2012).

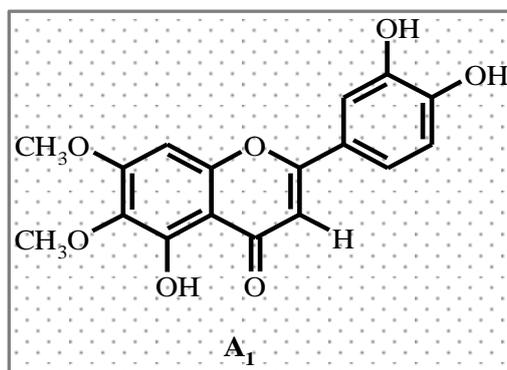


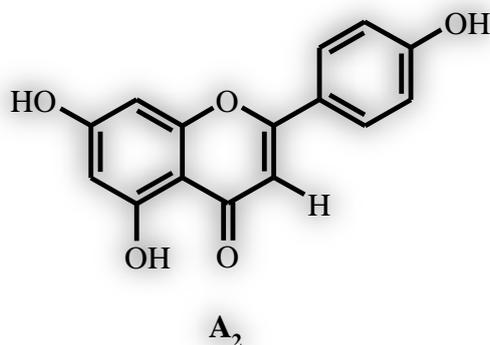
Figure V-6. Structure du composé **A₁**, cirsioliol

Le tableau V-2 reporte l'ensemble des données relatives aux analyses spectroscopiques précédentes

Tableau V-2. Données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C du composé **A₁**

Numérotation	δ_H (ppm), Multiplicité (<i>J</i>)	δ_C (ppm)
2	/	164,81
3	6,74	102,99
4	/	182,66
5	/	153,17
6	/	132,18
7	/	158,96
8	6,98 (S)	91,98
9	/	152,94
10	/	105,38
1'	/	121,73
2'	7,45 (d ; 1,9)	113,90
3'	/	146,04
4'	/	150,07
5'	6,91 (d ; 7,9)	116,37
6'	7,47 (dd ; 7,9, 1,9)	119,25
6-OCH ₃	3,74	56,95
7-OCH ₃	3,94	60,32

V.3.2. Identification du composé A_2



L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Figure V-7) du composé A_2 montre des ions adduits à $m/z = 271,06000$ et $m/z = 293,04179$ correspondant à $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ respectivement. Ces données additionnées à la masse exacte 270,05273 (calculée pour $C_{15}H_{10}O_5$ 270.05282, tableau V-3) mènent à un composé de formule brute $C_{15}H_{11}O_5$ comportant 10 degrés d'insaturation.

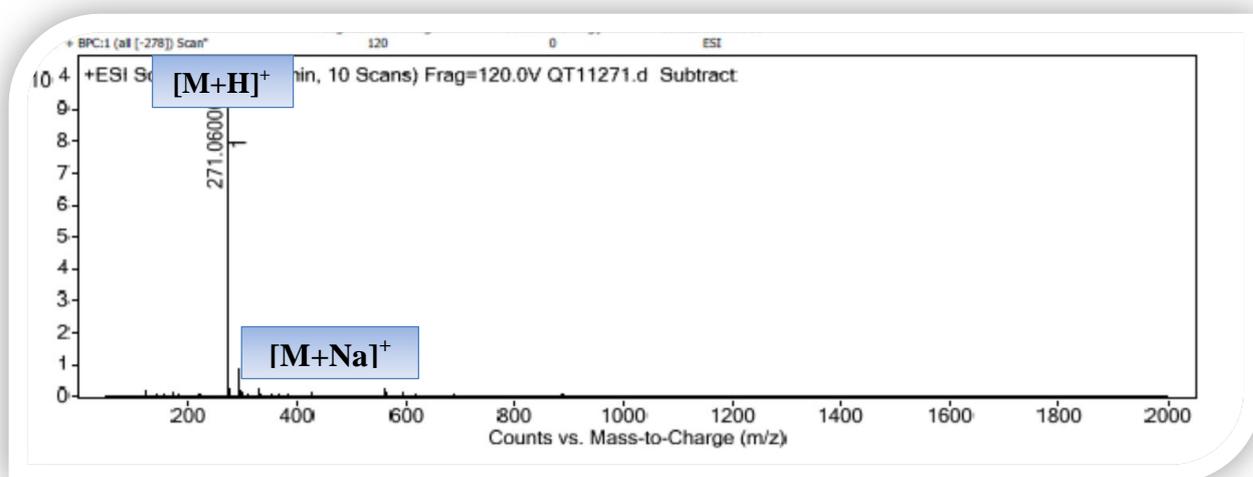


Figure V-7. Spectre de masse HR-ESI-MS (+) du composé A_2

Tableau V-3. Analyse de la composition élémentaire des ions

Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C15 H10 O5		270.05273	270.05282	0.36	271.06	C15 H11 O5	99.66

L'examen du spectre RMN-¹H enregistré dans le CD₃OD (Figures V-8, V-8' et V-8'') montre des signaux caractéristiques d'un flavonoïde par la présence de :

- ✓ Un signal sous forme de doublet d'intégration 2H à $\delta_H = 6,95$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ Un autre doublet d'intégration 2H à $\delta_H = 7,87$ ppm ($J = 8,4$ ppm) attribuable aux protons H-2' et H-6'.
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,53$ ppm attribuable à H-3.
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta_H = 6,23$ ppm ($J = 2,0$ Hz) et le second à $\delta_H = 6,47$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuables à H-6 et H-8 respectivement.

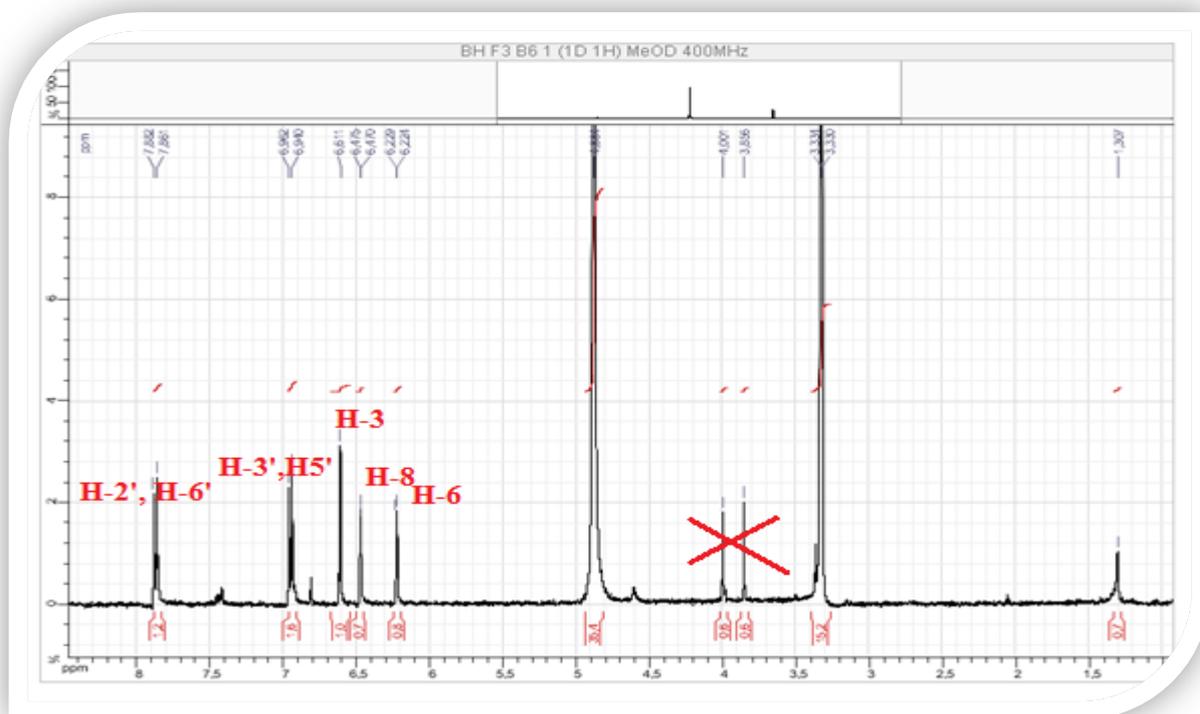


Figure V-8. Spectre RMN-¹H du composé A₂ (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm})

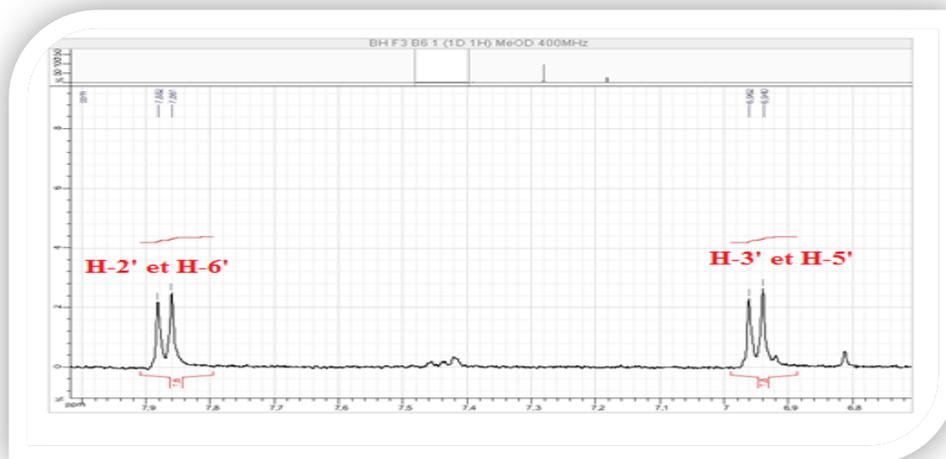


Figure V-8'. Etallement 1 du spectre RMN-¹H du composé **A₂** (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

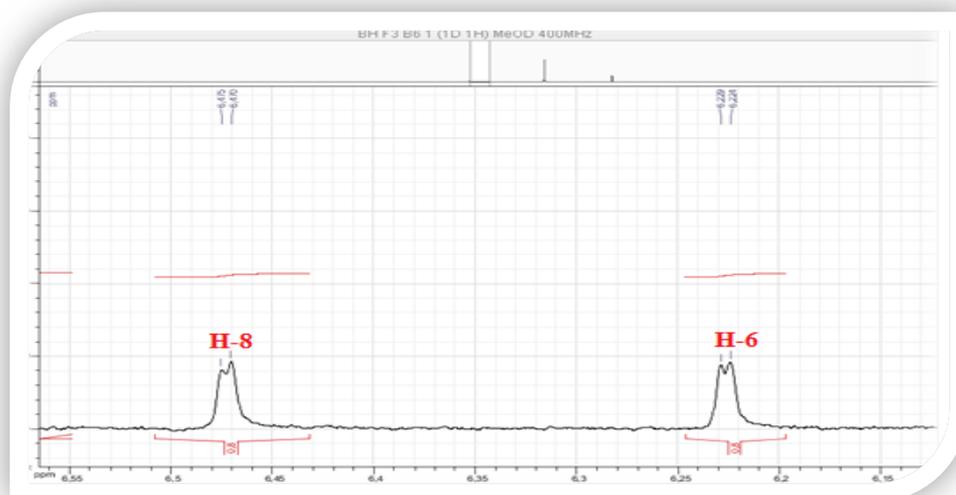


Figure V-8''. Etallement 2 du spectre RMN-¹H du composé **A₂** (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

L'examen du spectre HSQC (Figure V-9) montre :

- ✓ Une corrélation entre le H-8 et le carbone à $\delta_C = 93$ ppm attribuable par conséquent à C-8.
- ✓ Une tache de corrélation entre le H-3 et le carbone qui le porte C-3 à $\delta_C = 102$ ppm.
- ✓ Le proton H-6 corrèle avec le carbone à $\delta_C = 99$ ppm qui indique le carbone C-6.

- ✓ Les protons H-2' et H-6' corrélient avec les carbones C-2' et C-6' résonant à $\delta_C = 128$ ppm.
- ✓ Une dernière corrélation entre les protons H-3' et H-5' et les carbones C-3' et C-5' résonant à $\delta_C = 115,50$ ppm.

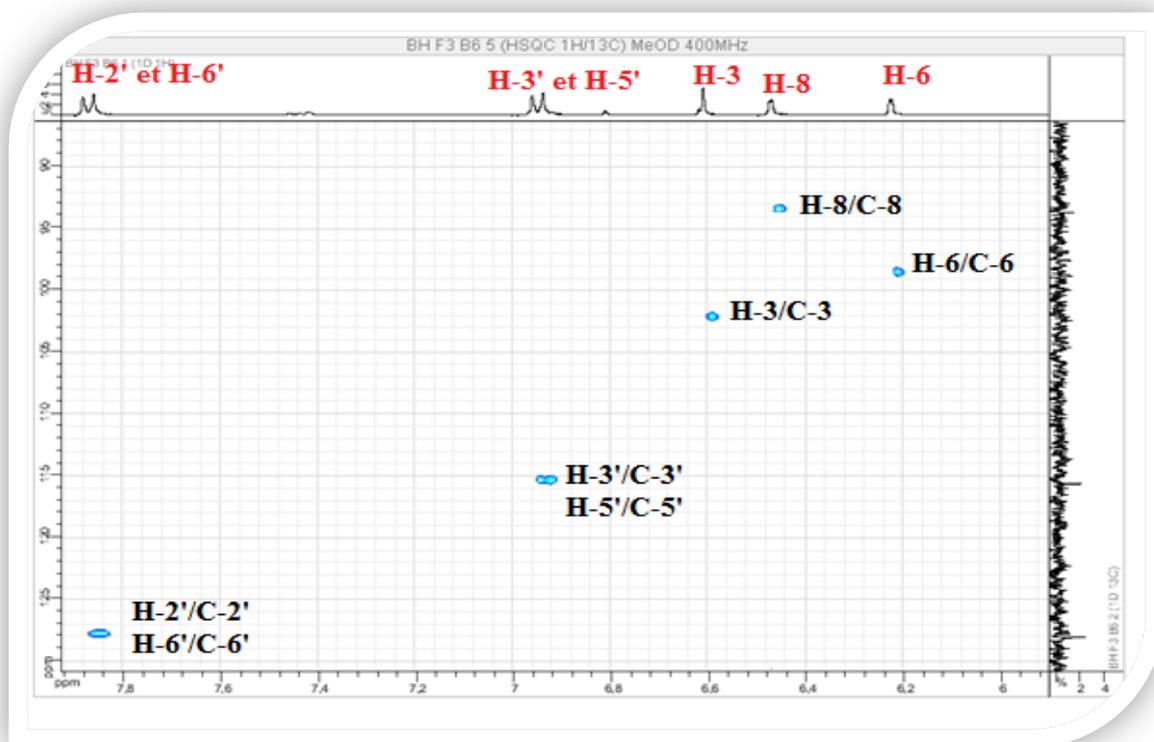


Figure V-9. Spectre HSQC du composé A_2 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Toutes ces données mènent à la structure représentée dans la figure V-10. Il s'agit de la 4', 5, 7- trihydroxyflavone ou apigénine (Kerkatou *et al.*, 2016).

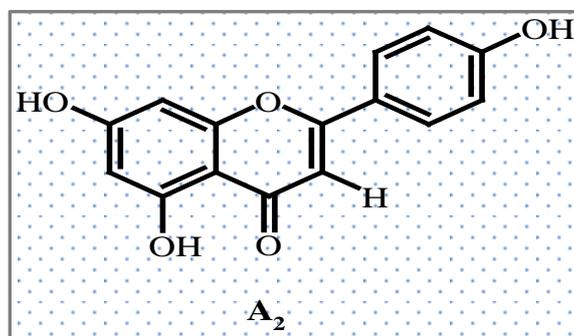


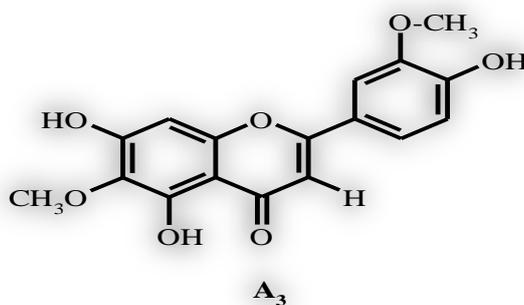
Figure V-10. Structure du composé A_2 , apigénine

L'ensemble des données précédentes sont reportées dans le tableau V-4.

Tableau V-4. Les données relatives au spectre de RMN ^1H et ^{13}C du composé A_2

Numérotation	δ_{H} (ppm), Multiplicité (J)	δ_{C} (ppm)
3	6,53 (s)	102
6	6,23(d, $J = 2,0$ Hz)	99
8	6,47 (d, $J = 2,0$ Hz)	93
2', 6'	7,87 (d, $J = 8,4$ Hz)	128
3', 5'	6,95 (d, $J = 8,4$ Hz)	115,50

V.3.3. Identification du composé A_3



Le composé A_3 possède une coloration mauve foncé, l'examen des spectres RMN- ^1H (Figure V-11) et ^{13}C (Figure V-12), a montré une ressemblance structurale entre ce composé et le composé A_1 .

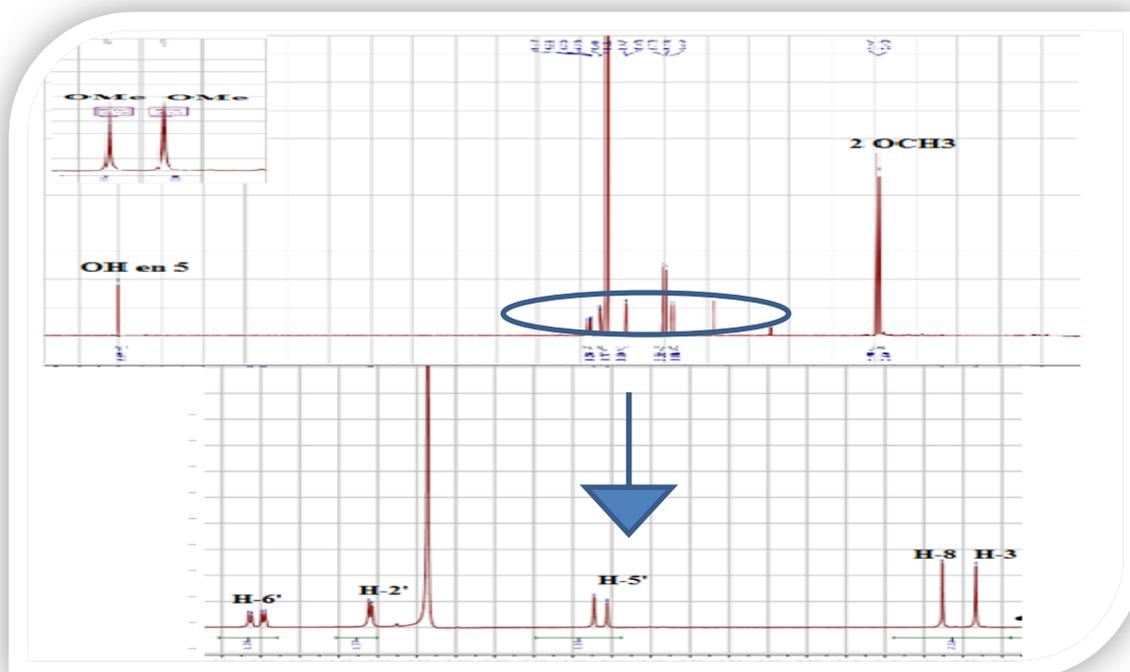


Figure V-11. Spectre RMN- ^1H du composé A_3 (400 MHz, CDCl_3 + 2 gouttes de CD_3OD , δ_{ppm})

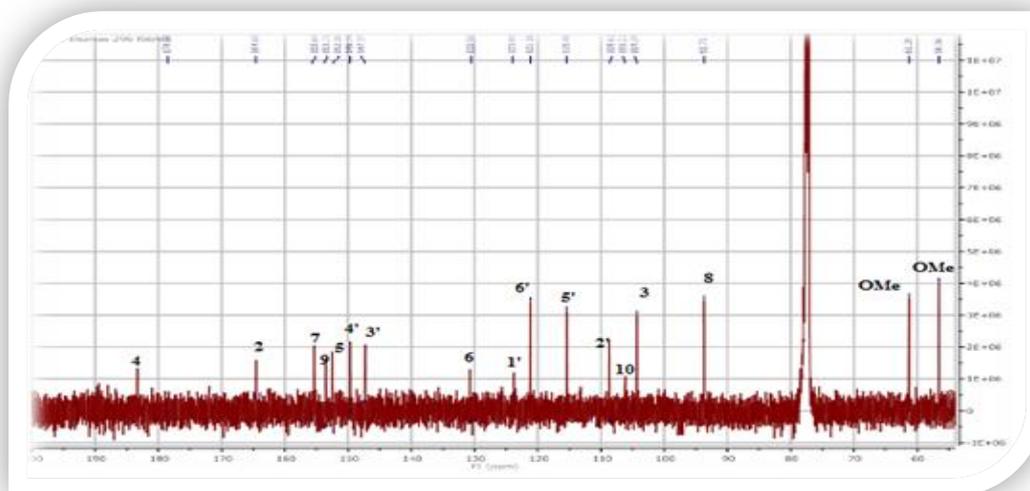


Figure V-12. Spectre RMN- ^{13}C du composé A_3 (100 MHz, CDCl_3 + 2 gouttes de CD_3OD , δ_{ppm})

L'attribution des carbones a été réalisée de la même façon à celle du composé A_1 , à partir d'une combinaison des données de la RMN bi dimensionnelle HSQC (Figure V-13) et HMBC (Figure V-14).

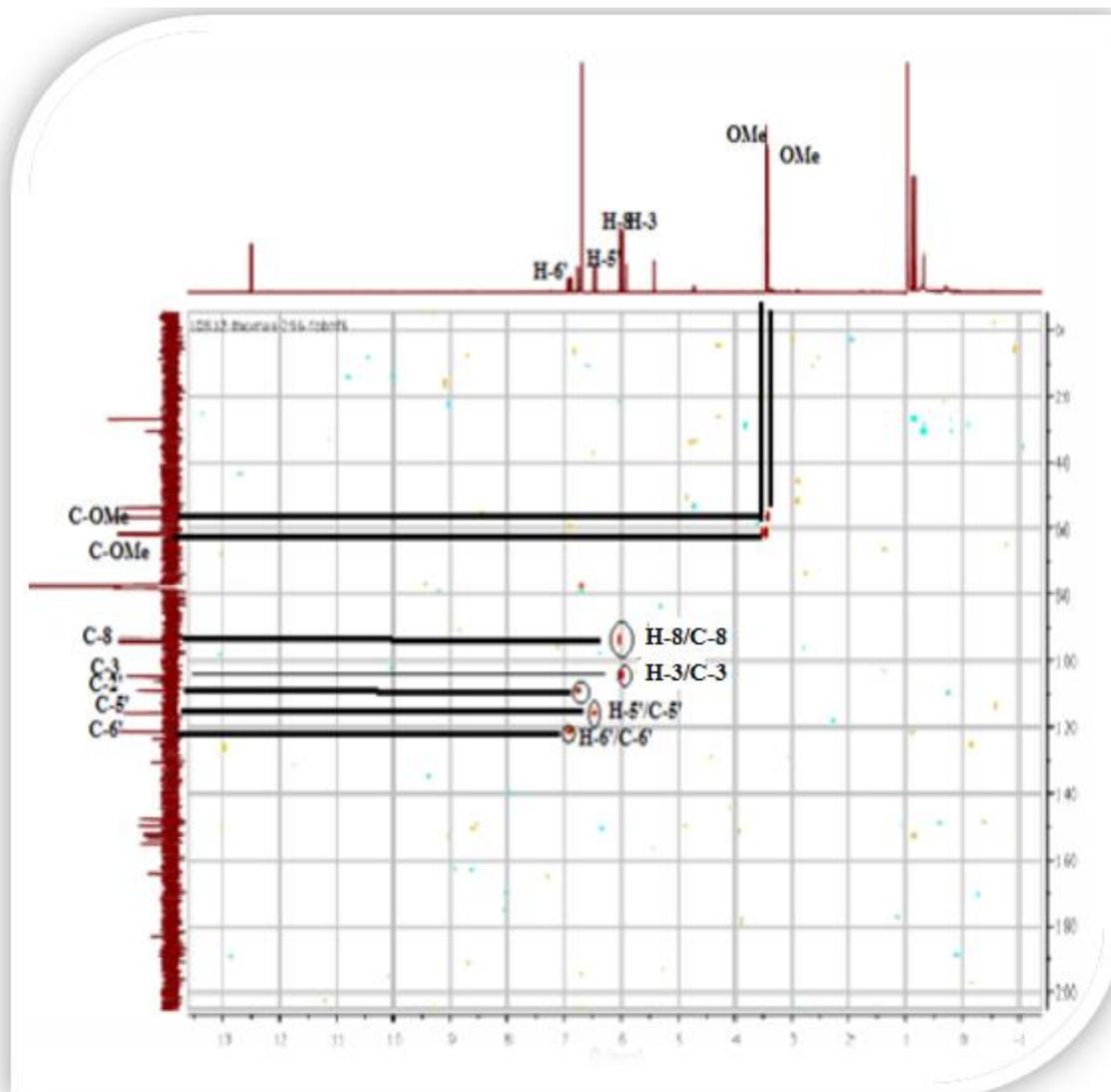


Figure V-13. Spectre HSQC du composé **A₃** (100 MHz, CDCl₃+ 2 gouttes de CD₃OD, δ ppm)

Le positionnement des groupements méthoxyles a été réalisé sur la base des corrélations observées sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Figure V-14') ainsi le méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm est relié au C-3' suite à la tache de corrélation entre ses protons et le carbone C-3' résonant à $\delta_{\text{C}} = 147,37$ ppm facilement repérable grâce à sa corrélation avec H-5'. L'autre groupement méthoxyle dont les protons résonnent à $\delta_{\text{H}} = 3,47$ ppm est relié au C-6 suite à la tache de corrélation observée entre ses protons et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 130,56$ ppm attribuable au C-6 grâce à ses corrélations avec le H du OH-5 et H-8.

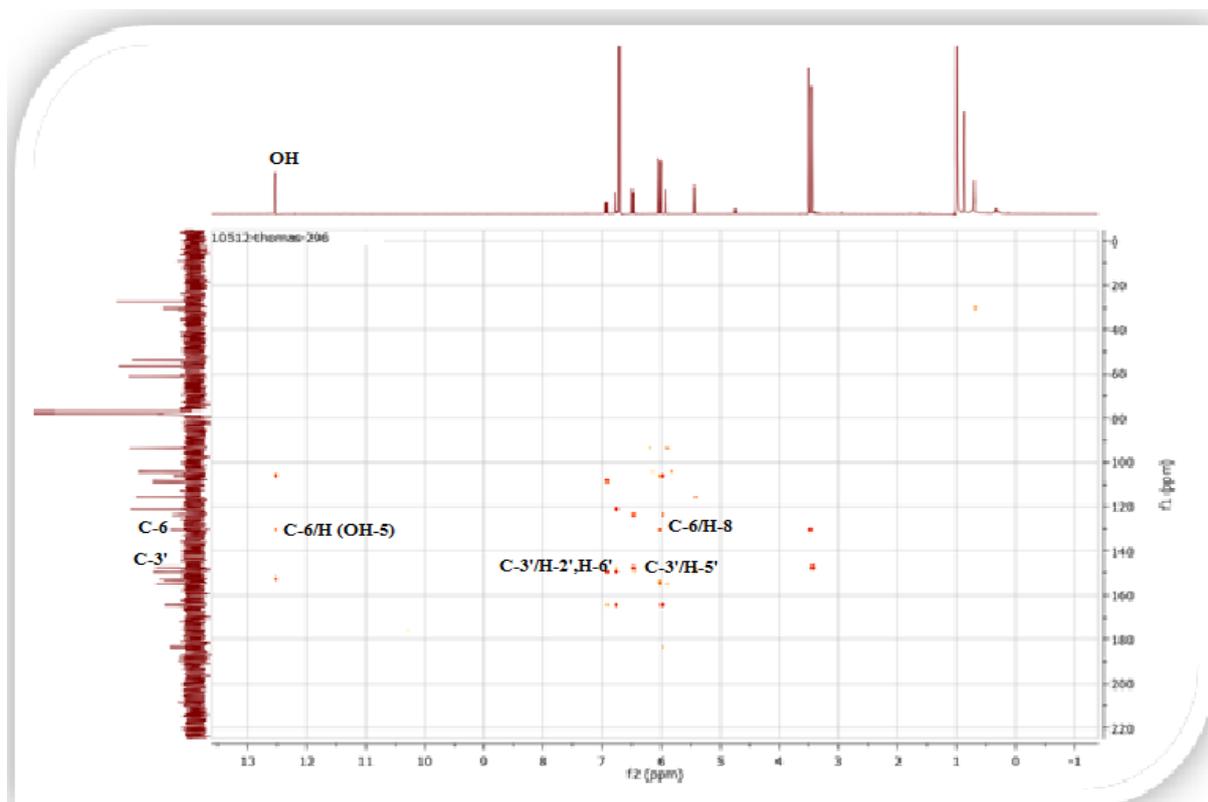


Figure V-14. Spectre HMBC du composé A_3 (100 MHz, $CDCl_3$ + 2 gouttes de CD_3OD , δ ppm)

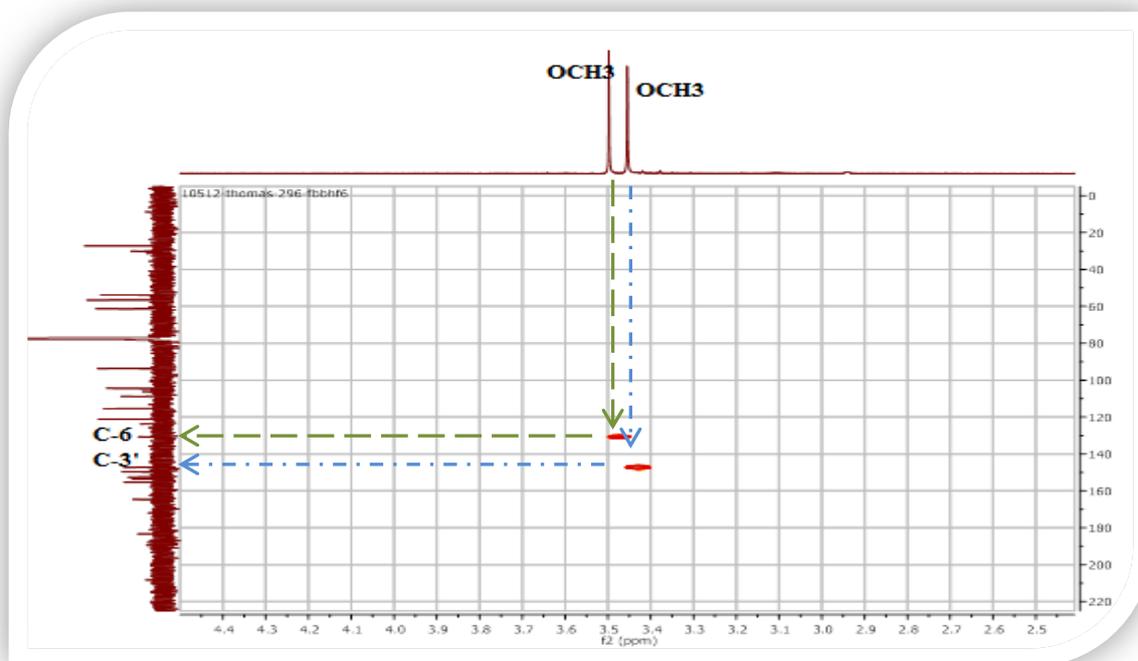


Figure V-14'. Etallement du spectre HMBC du composé A_3 (400 MHz, $CDCl_3$ + 2 gouttes de CD_3OD , δ ppm)

La combinaison de l'ensemble de ces données avec les résultats de l'analyse totale du spectre relatif à l'expérience HMBC mène à la structure reportée dans la figure V-15. C'est le jacéosidine (Zater *et al.*, 2016).

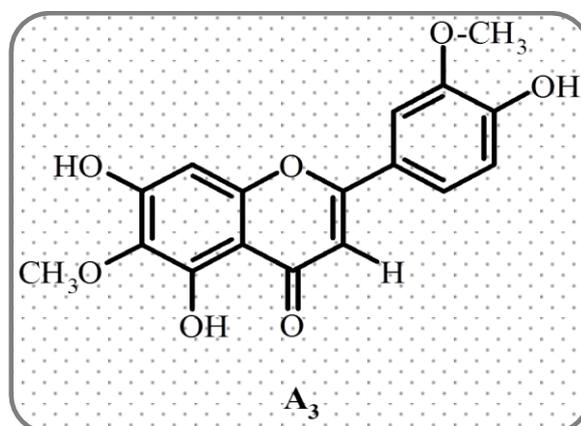


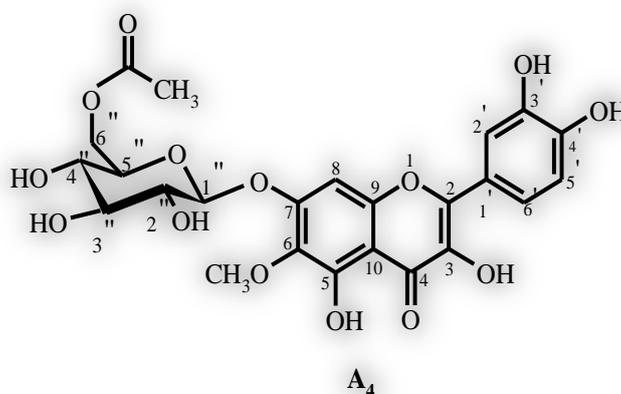
Figure V-15. Structure du composé **A₃**, jacéosidine

Le tableau 5 reporte les données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C

Tableau V-5. Attribution des signaux des spectres RMN-¹H et ¹³C du composé **A₃**

Numérotation	δ_H (ppm), Multiplicité (<i>J</i>)	δ_C (ppm)
2	/	164,60
3	5,98 (S)	104,34
4	/	183,16
5	/	152,30
6	/	130,56
7	/	155,64
8	6,03 (S)	93,71
9	/	153,71
10	/	106,21
1'	/	123,93
2'	6,75 (d ; 2,0)	108,61
3'	/	147,37
4'	/	149,74
5'	6,46 (d ; 8,4)	115,46
6'	6,91 (dd ; 8,4, 2,0)	121,16
3'-OCH ₃	3,43 (S)	56,56
6-OCH ₃	3,47 (S)	61,28

V.3.4. Identification du composé A₄



L'examen du spectre RMN-¹H (Figure V-16) indique la présence d'un ensemble de signaux dans la zone des protons aromatiques et un ensemble de signaux rappelant un glycoside facilement reconnaissable par le signal de son proton anomérique.

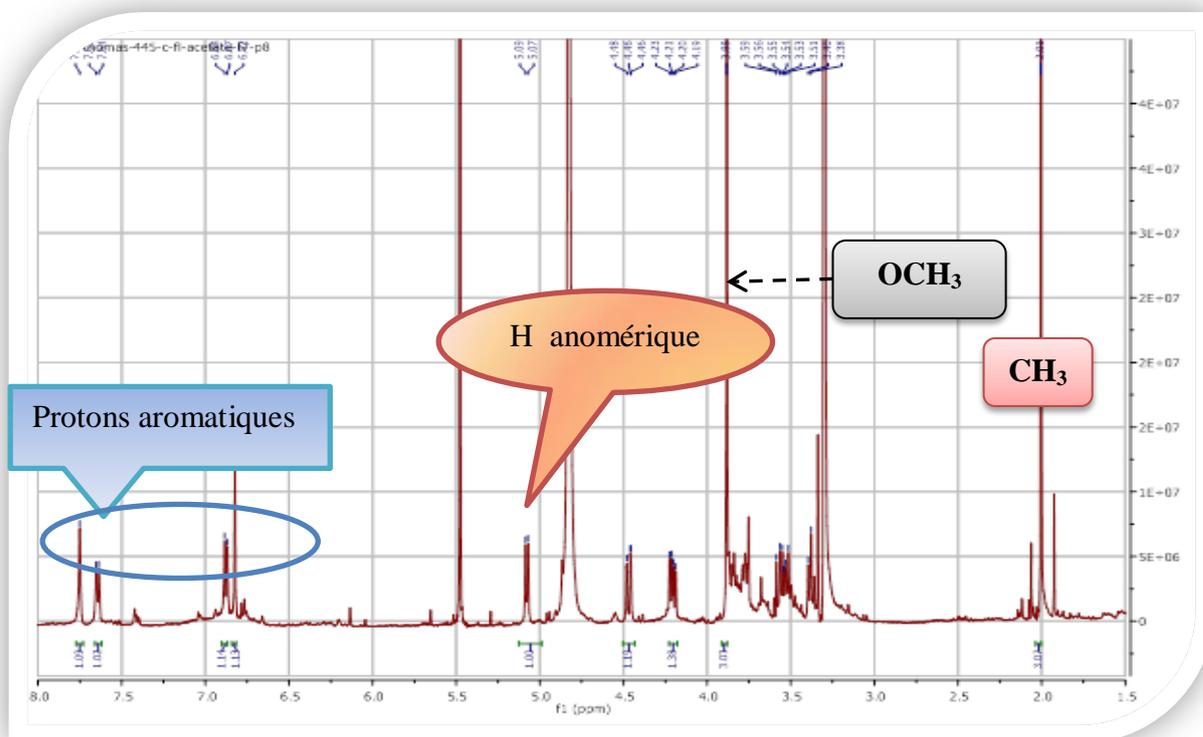


Figure V-16. Spectre RMN-¹H du composé A₄ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

Les Figures V-16' et V-16'' reportent les informations suivantes

a) Les protons aromatiques :

- Un singlet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,82$ ppm attribuable au H-8 du squelette flavonique. Cette attribution est consolidée par la corrélation observée sur le spectre HSQC (Figure V-17) entre ce proton et le carbone résonant à $\delta_C = 95,47$ ppm dont la valeur du déplacement chimique est en parfait accord avec celle généralement observée pour le C-8 des favonoïdes.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,88$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'
- Un signal sous forme de doublet large d'intégration 1H à $\delta_H = 7,64$ ppm ($J = 8,4$ Hz) appartenant à H-6'

Ces deux attributions sont appuyées par le spectre COSY (Figure V-18) qui montre des corrélations nettes entre des deux protons.

- Un singlet large d'intégration 1H à $\delta_H = 7,75$ ppm attribuable à H-2', cette attribution évidente est surtout déduite de la multiplicité du signal de ce proton et celle du signal de H-6'.

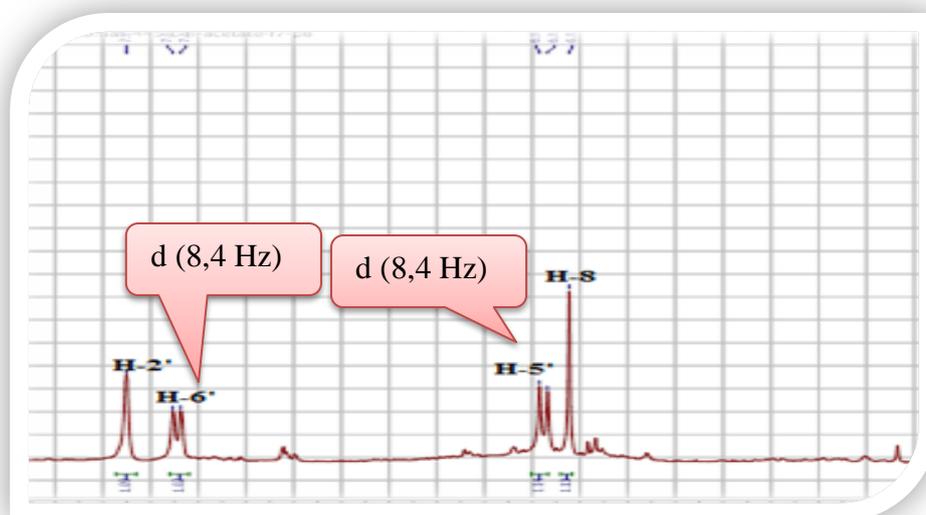


Figure V-16'. Etallement 1 du spectre RMN-¹H du composé A₄ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

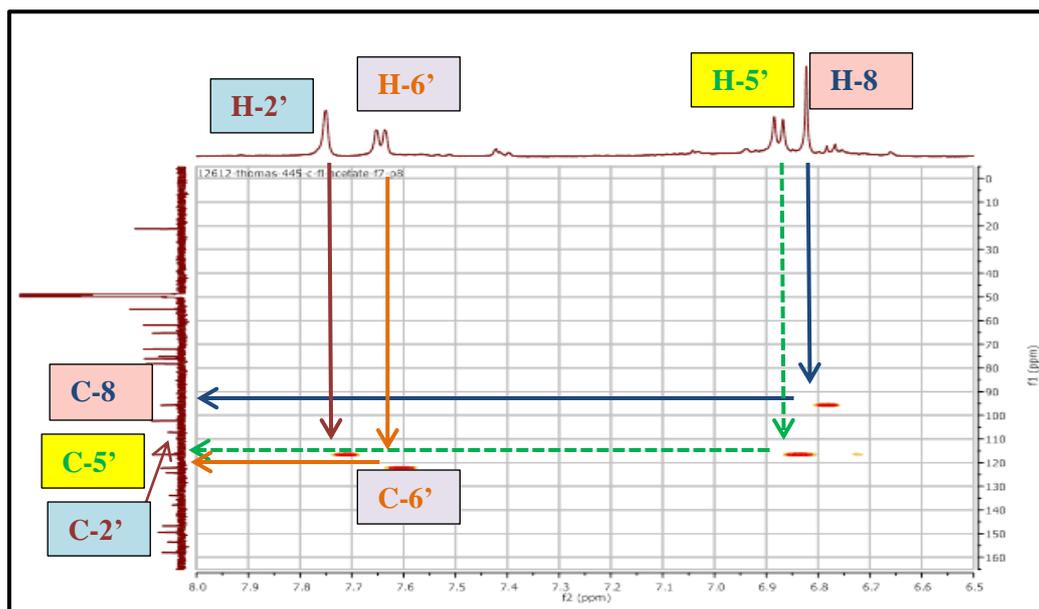


Figure V-17. Spectre HSQC du composé A_4 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

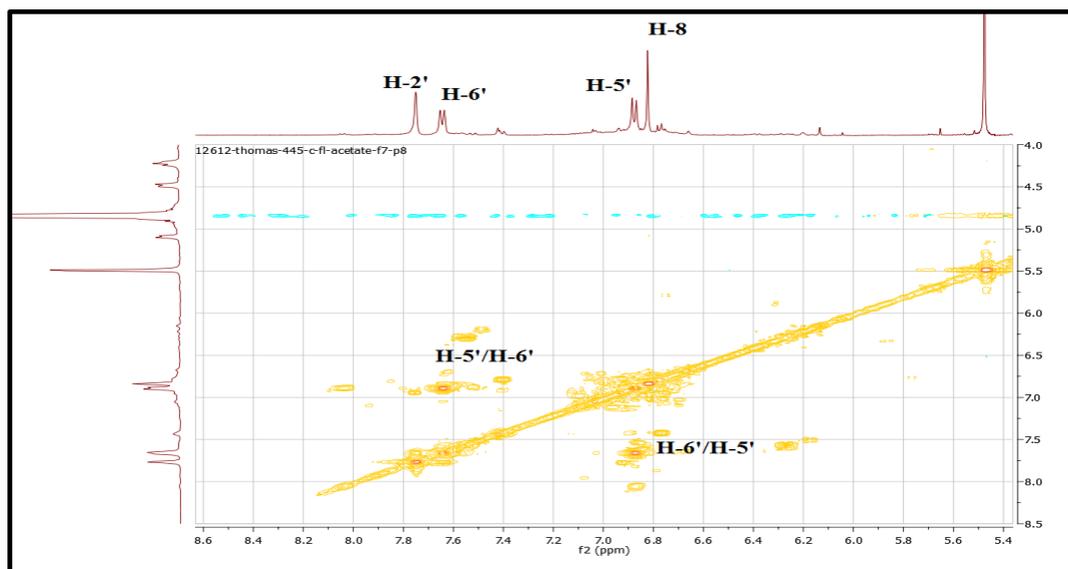


Figure V-18. Spectre COSY du composé A_4 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

b) Les protons du groupement glycoside:

- Comme signalé précédemment le doublet à $\delta_H = 5,08$ ppm, d'intégration 1H ($J = 7,5$ Hz), est attribué au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène vu la valeur de son déplacement chimique et celle de son carbone que nous numéroterons C-1'' et dont la résonance est relevée grâce à l'analyse du spectre

HSQC à $\delta_C = 102,26$ ppm. D'après la valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique (H-1'') ce sucre admet une configuration β (H-1'' axiale). On peut dès à présent annoncer que le H-2'' de ce sucre admet également une orientation β toujours grâce à cette valeur de la constante de couplage qui représente une interaction de type diaxial.

- Deux doublets de doublets, le premier à $\delta_H = 4,47$ ppm ($J = 11,8 ; 1,5$ Hz) et le second à $\delta_H = 4,21$ ppm ($J = 11,8 ; 7,5$ Hz) attribuables à H-6''a et H-6''b sur la base de leur corrélation sur le spectre HSQC, avec le même carbone résonant à $\delta_C = 65,33$ ppm et que nous numérotons C-6''.

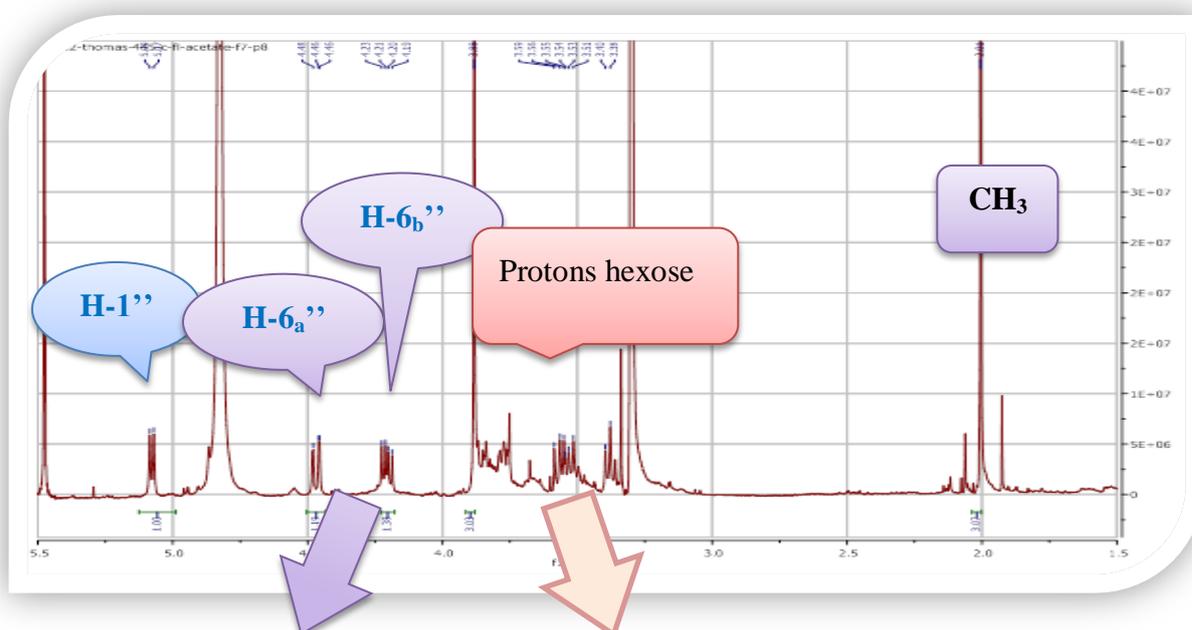
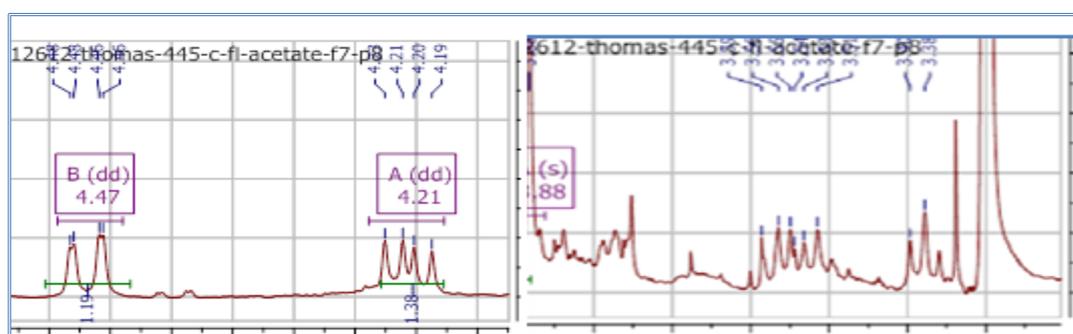


Figure V-16''. Etallement 2 du spectre RMN-1H du composé **A**₄ (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm})



Les autres signaux du sucre sont attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre COSY (Figure V-18') sur le lequel on repère en effet :

- Une corrélation entre H-1'' et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,58$ ppm attribuable à H-2''. Le multiplet de H-2'' montrant un effet de toit avec un autre multiplet centré à $\delta_H = 3,51$ ppm, permet alors l'attribution de ce signal à son voisin en position vicinale le H-3''. Sur le spectre HSQC (Figure V-17') on relève les résonances de C-2'' et C-3'' à $\delta_C = 74,84$ et $78,25$ ppm respectivement.
- Les signaux des protons H-6''a et H-6''b permettent de localiser aisément le signal de H-5'' sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,76$ ppm grâce à leurs taches de corrélation. La résonance du C-5'' est alors localisée à $\delta_C = 76,29$ ppm grâce au spectre HSQC (Figure V-17').
- L'attribution du triplet à $\delta_H = 3,35$ ppm ($J = 8,0$ Hz) au proton H-4'' est simplifiée par la tache de corrélation relevé entre ce noyau et le proton H-5''. Le signal du carbone C-4'' apparaît à $\delta_C = 71,91$ ppm.

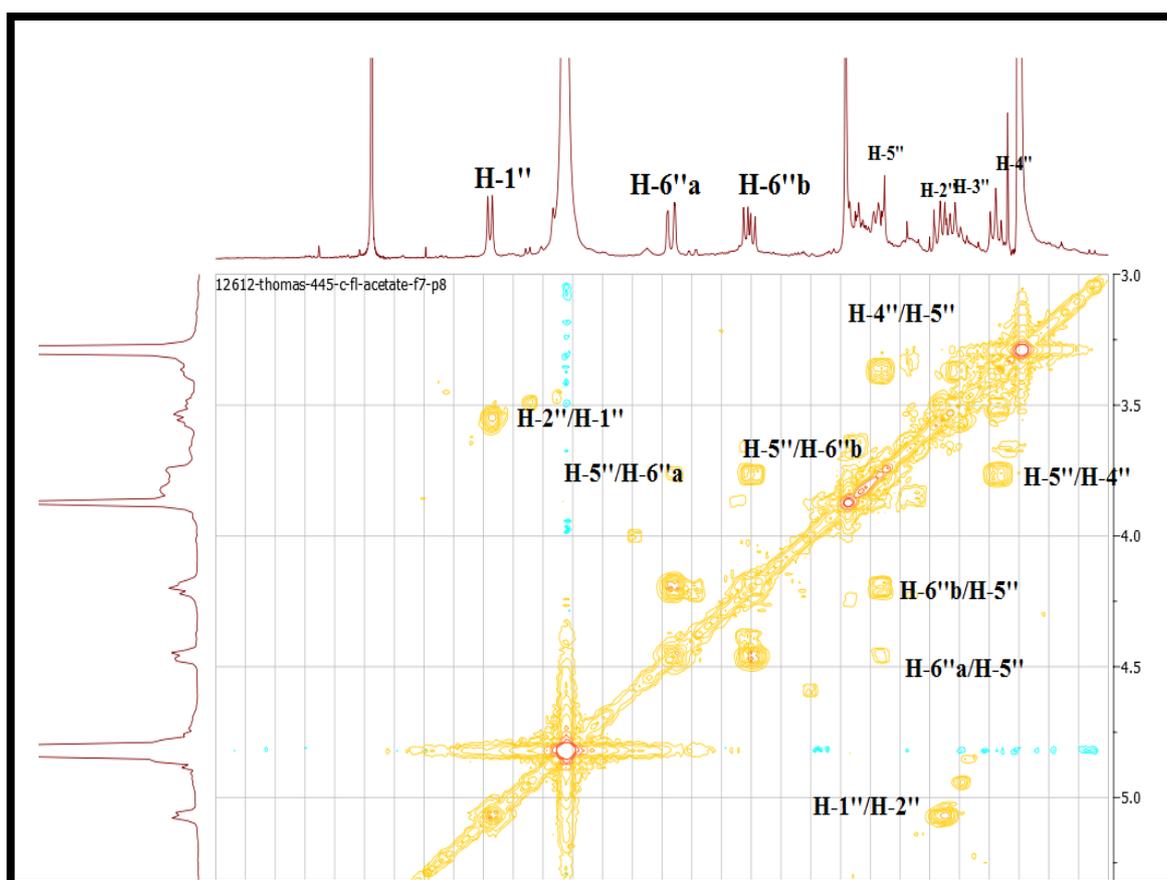


Figure V-18'. Les corrélations des signaux du sucre sur le spectre COSY du composé **A₄**
(400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

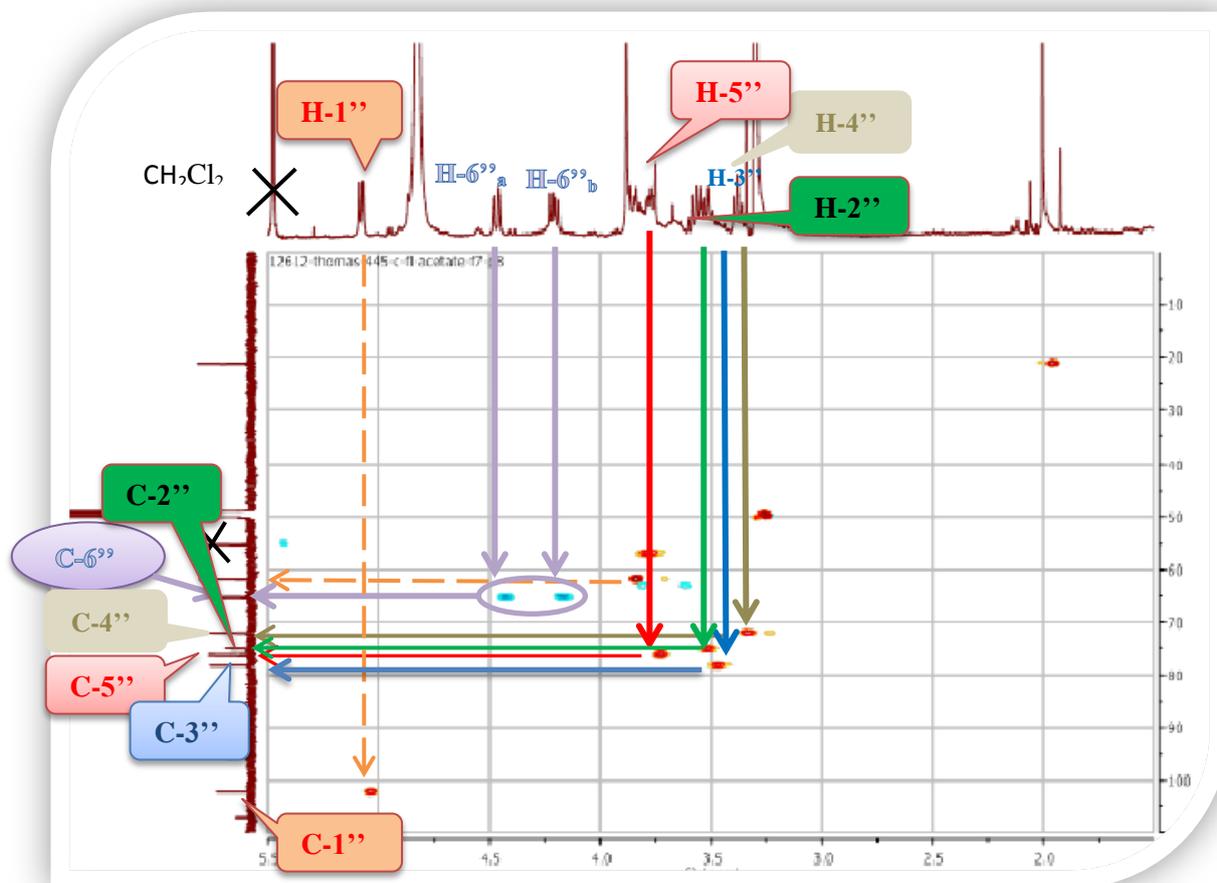


Figure V-17'. Attribution des atomes du sucre sur le spectre HSQC du composé **A₄** (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

A ce stade de notre analyse il est clair que le sucre substituant ce flavonoïde est un hexose de configuration β et dont le proton H-2'' admet une orientation axiale comme annoncé plus haut. De ce fait la nature de ce sucre peut être déduite des valeurs des constantes de couplage susceptibles d'être relevées dans les signaux des autres hydroxyméthynes de ce sucre et notamment celui du signal de H-4'' signalé plus haut comme étant un triplet où l'on relève des constantes de couplage de 9,2 Hz et donc en faveur d'une disposition trans diaxiale entre H-3''/ H-4''/H-5''. Ces observations suffisent pour conclure que ce sucre est un **glucose**. La nature glucose de ce sucre est également consolidée par les valeurs des déplacement chimiques des carbones C-2'', C-3'', C-4'' et C-5'' reportés plus haut.

a) Autres signaux :

- Un singlet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm attribuable à un groupement méthyle. Sur le spectre HMBC (Figure V-19), les protons de ce méthyle montrent une tache de corrélation avec le carbone d'un carbonyle résonnant à $\delta_{\text{C}} = 172,96$ ppm caractéristique d'une fonction ester. Sur le même spectre, le carbone de ce carbonyle montre des taches de corrélation avec les protons H-6''a et H-6''b de la position 6 du sucre orientant donc vers une acétylation à ce niveau et par conséquent vers un substituant 6''-acetylglucopyranosyle sur le squelette flavonique de cette molécule **A4**. La substitution du glucose en C-6'' par un groupement de ce type était plus qu'attendue vu la valeur du déplacement chimique ($\delta_{\text{C}} = 65,33$ ppm) de ce carbone.
- Un signal sous forme de singlet d'intégration 3H à $\delta = 3,88$ ppm appartenant à un groupement méthoxy.

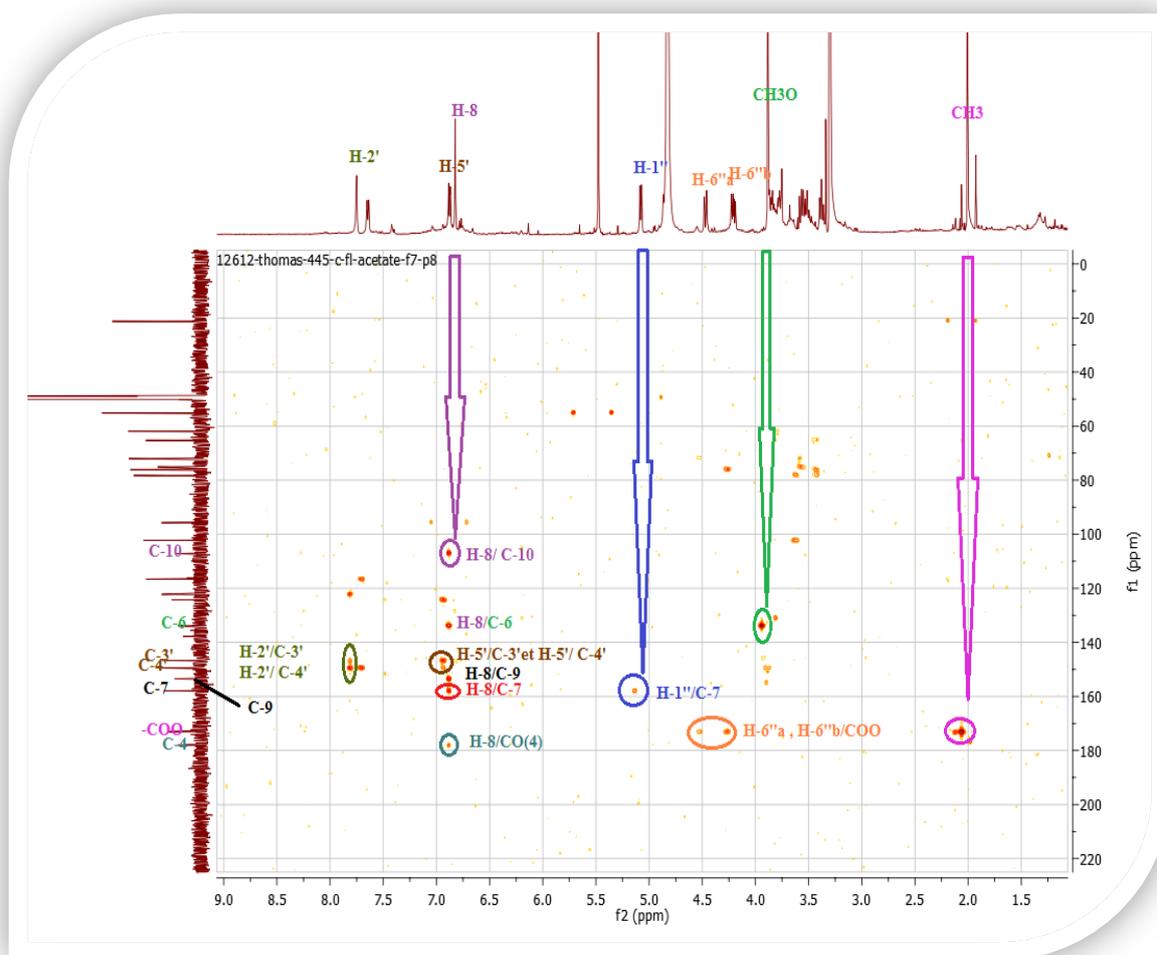


Figure V-19. Spectre HMBC du composé **A4** (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Le spectre HSQC du composé **A₄** (Figures V-17 et V-17'') permet de compléter l'attribution des atomes de carbone de la molécule, grâce aux taches de corrélations entre les protons et les carbones qui les portent.

- Une corrélation entre les protons du groupement méthyle et le carbone à $\delta_C = 21,14$ ppm
- Une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,88$ ppm et le carbone à $\delta_C = 61,71$ ppm.
- Les taches de corrélations des protons H-2', H-5' et le H-6' permettent l'attribution des carbones C-2', C-5' et C-6' aux signaux à $\delta_C = 116,34$; $116,58$ et $122,17$ ppm respectivement.

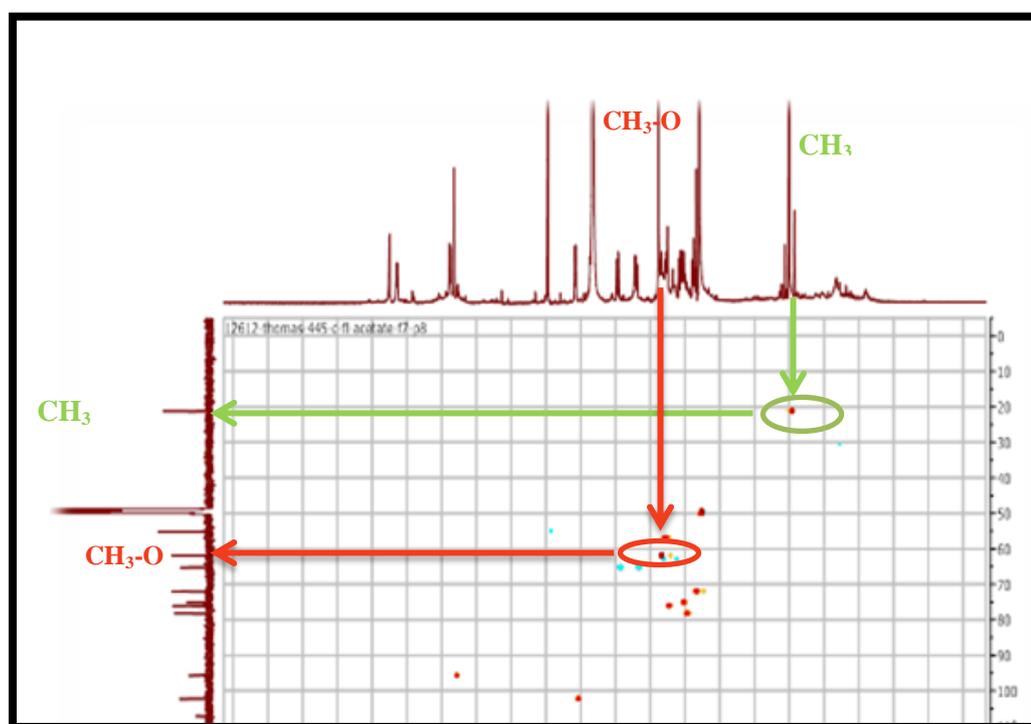


Figure V-17''. Corrélations entre les protons des groupements méthyle, méthoxyle et leurs carbones sur le spectre HSQC du composé **A₄** (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

L'examen du spectre RMN-¹³C du composé **A₄** (Figure V-20) montre un signal à $\delta_C = 178,04$ ppm attribuable sans ambiguïté au C-4 du squelette flavonique. Cette attribution est confirmée par la tache de corrélation observée entre ce carbone et le proton H-8 sur le spectre HMBC (Figure V-19)

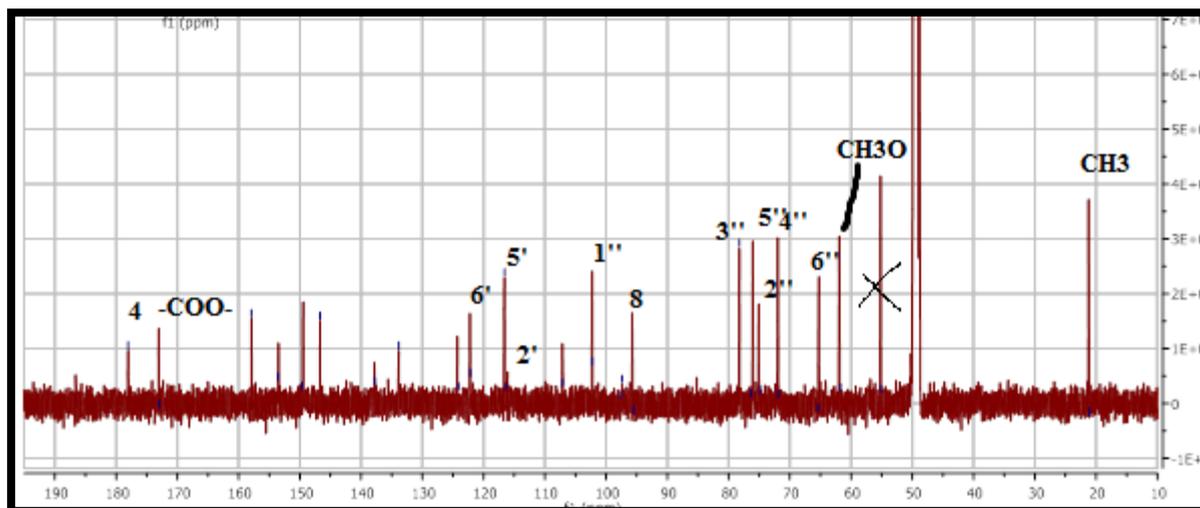


Figure V-20. Spectre RMN- ^{13}C du composé A_4 (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

L'attribution des carbones restants a été réalisée en se basant sur le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Figure V-19) qui montre :

- Une tache de corrélation entre le noyau H-8 avec un atome de carbone à $\delta_{\text{C}} = 107,12$ ppm qui ne peut être que le carbone C-10.
- Deux taches de corrélation entre le H-2' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 146,71$ attribuable au carbone C-3'.
- des taches de corrélation entre le H-2', H-5' et H-6' et les carbones résonant à $\delta_{\text{C}} = 124,10$ et $149,64$ ppm attribuable aux carbones C-1' et C-4' respectivement.
- La localisation des signaux des carbones C-6, C-9 et C-7 à $\delta_{\text{C}} = 133,84$; $153,55$ et $157,91$ ppm respectivement a été effectuée grâce à leur corrélation avec le proton H-8 et la comparaison de leur déplacement chimique. Sur le même spectre le carbone C-6 montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle précédemment signalé, cette observation indique que le squelette flavonique est méthoxylé en C-6. Par ailleurs ce spectre montre une tache de corrélation nette entre le C-7 et le proton anomérique indiquant alors que ce flavonoïde est C-7-O-(6''-acetylglucopyranoside) (Figure V-21).

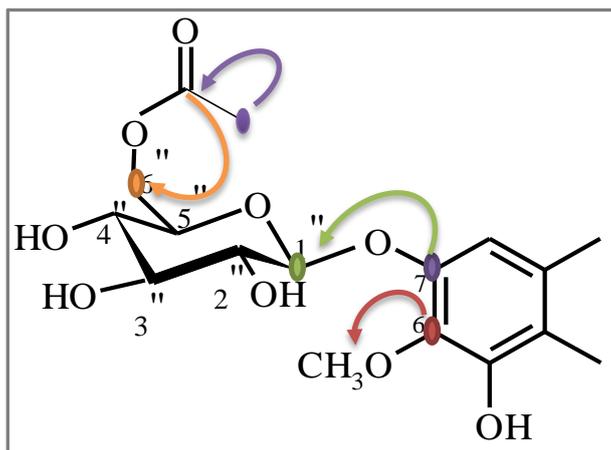


Figure V-21. Les positions du méthoxyle, ester et glucose

A l'issue de toutes ces attributions, il reste sur le spectre RMN ^{13}C , deux signaux non attribués à $\delta_{\text{C}} = 137,75$ et $153,57$ ppm qui ne peuvent être assignés qu'aux C-3 et C-5, respectivement du squelette flavonique d'après les valeurs de leur déplacement chimique. La valeur $\delta_{\text{C}} = 137,75$ du déplacement chimique du C-3 indique qu'il est oxygéné, comme nous n'avons plus de signaux correspondants à des groupements hydrocarbonés, il est évident que ce carbone est hydroxylé. Nous sommes donc en présence d'un flavonol de type patulétine.

L'intégralité des attributions des atomes de carbones sont rapportés dans la figure V-22

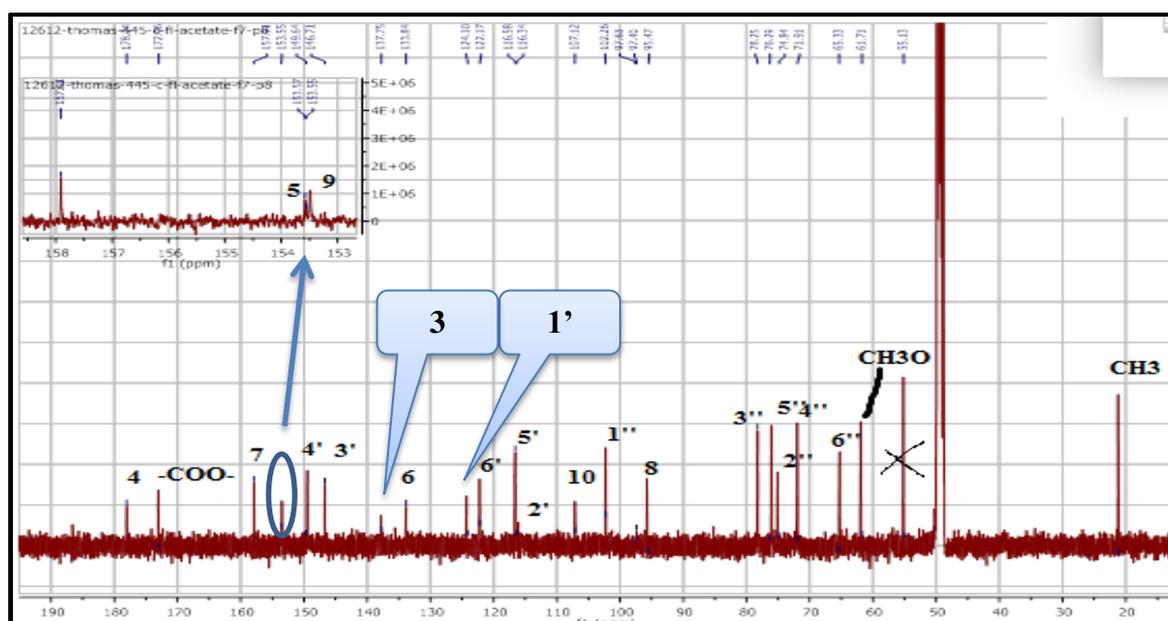


Figure V-22. L'attribution de l'intégralité des carbones de la molécule sur (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Les données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau V-6.

Tableau V-6. L'ensemble des données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C du composé **A₄**

	Glucose	
Numérotation	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1''	5,08 (d, $J = 7,5$ Hz)	102,26
2''	3,58 (m)	74,84
3''	3,51 (m)	78,25
4''	3,35 (t, $J = 8,0$ Hz)	71,91
5''	3,76 (m)	76,29
6a''	4,21 (dd, $J = 11,8 ; 1,5$)	65,33
6b''	4,47 (dd, $J = 11,8 ; 7,5$)	65,33
	Groupement OAc	
CH₃	2,01 (s)	21,14
CO	/	172,96
	Flavonoïde	
2	/	150,85
3	/	137,75
4	/	178,04
5	/	153,57
6	/	133,84
7	/	157,91
8	6,82 (s)	95,47
9	/	153,55
10	/	107,12
1'	/	124,10
2'	7,75 (s large)	116,34
3'	/	146,71
4'	/	149,64
5'	6,88 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,58
6'	7,64 (d large, $J = 8,4$ Hz)	122,17
6-OCH₃	3,88 (s)	61,71

L'ensemble de ces données mènent à la patulétine 7-*O*-(6''-acetylglucopyranoside) connue sous le nom d'acétyle patulitrine (Figure V-23) (El-Naggar et Doskotch, 1979). Cette molécule est nouvelle pour le genre *Centaurea*.

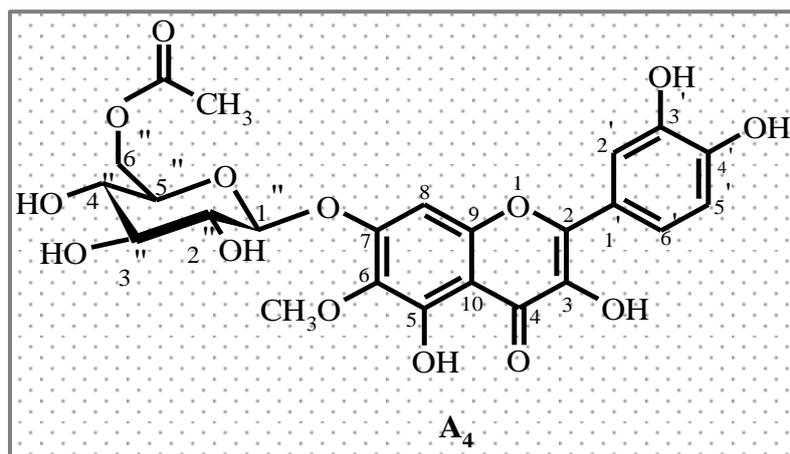
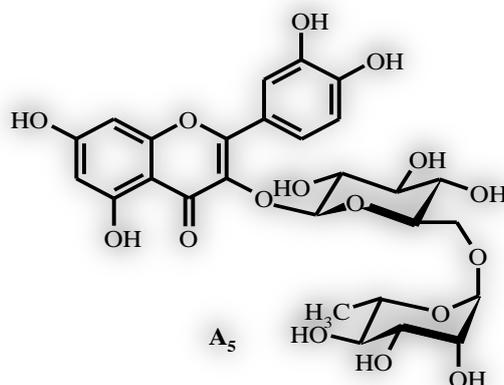


Figure V-23. Structure du composé **A₄**, acétyle patulitrine

V.3.5. Identification du composé **A₅**



L'examen du spectre RMN-¹H (Figure V-24) du composé **A₅** montre des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde notamment :

- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 7,68$ ppm ($J = 2,4$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un proton sous forme de doublet de doublets, à $\delta_H = 7,62$ ppm ($J = 8,4- 2,4$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un proton qui résonne en un doublet, à $\delta_H = 6,88$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 6,36$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-8.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 6,18$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-6.

Ces données orientent vers un dérivé de la quercétine.

Toujours sur le même spectre on remarque la présence d'un ensemble de signaux attribuables à deux groupements glycosyles de type hexose, cette observation est confirmée par le spectre RMN-¹³C (Figure V-25) où l'on remarque la présence de 9 signaux dans la zone [67- 77] ppm, deux signaux à $\delta_C = 103,48$ et $101,03$ ppm attribuables à deux carbones anomériques et un signal correspondant à un CH₃, la présence de ce groupement méthyle indique qu'un des deux hexoses attendus est en fait un 6-déoxyhexose.

Les signaux des protons de ces deux entités osidiques sont :

- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 5,11$ ppm ($J = 7,2$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1'' du premier sucre. La valeur du déplacement chimique du proton anomérique de cet hexose H-1'' et la valeur de la constante de couplage ($\delta_H = 5,11$ ppm, $J = 7,2$ Hz), orientent vers une jonction O-β- glycosidique.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 4,55$ ppm ($J = 1,2$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1''' du deuxième sucre.
- Un doublet d'intégration 3H, à $\delta_H = 1,15$ ppm ($J = 6,4$ Hz) attribuable à un groupement CH₃. La valeur de la constante de couplage du proton anomérique H-1''' et la présence de ce méthyle orientent vers un groupement O-α-rhamnopyranosyle dans cette molécule.

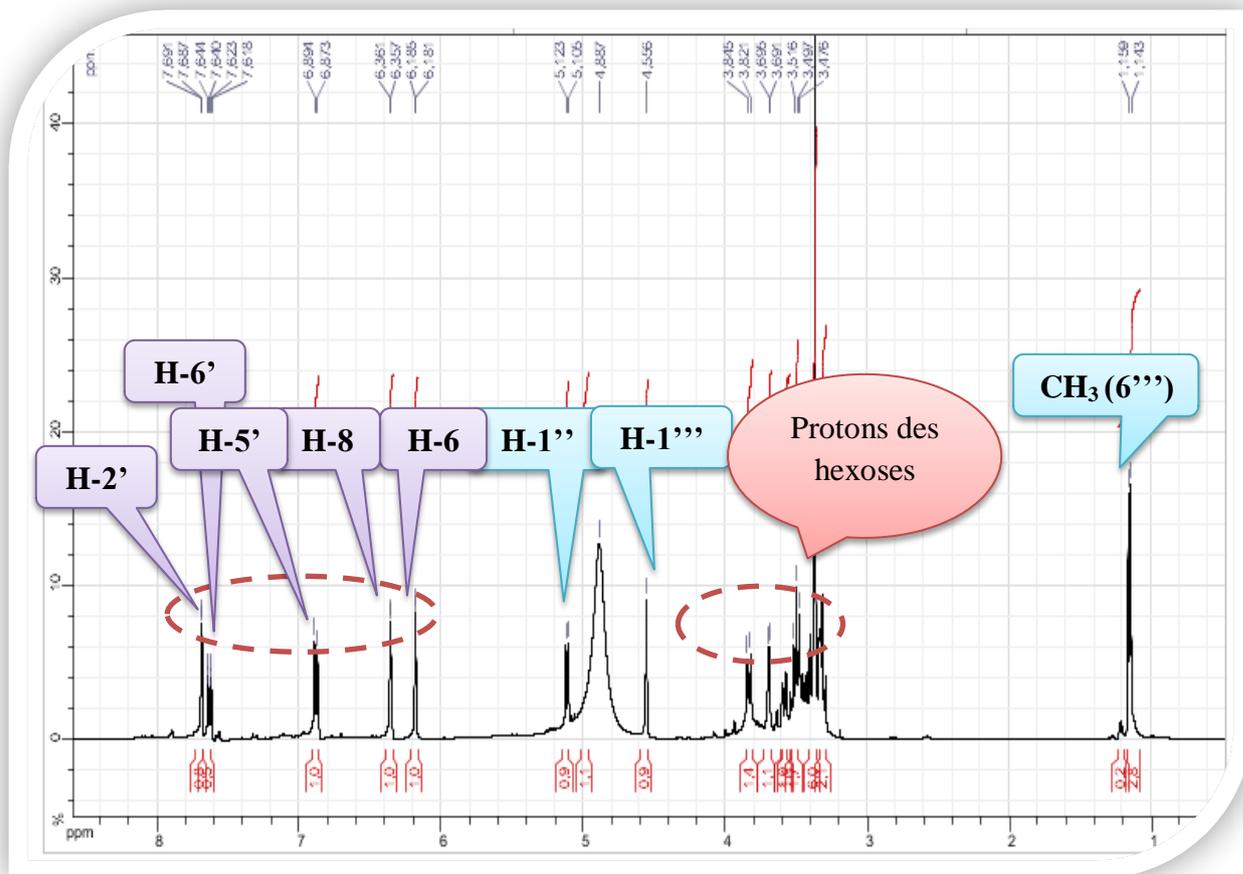


Figure V-24. Spectre RMN- ^1H du composé A_5 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

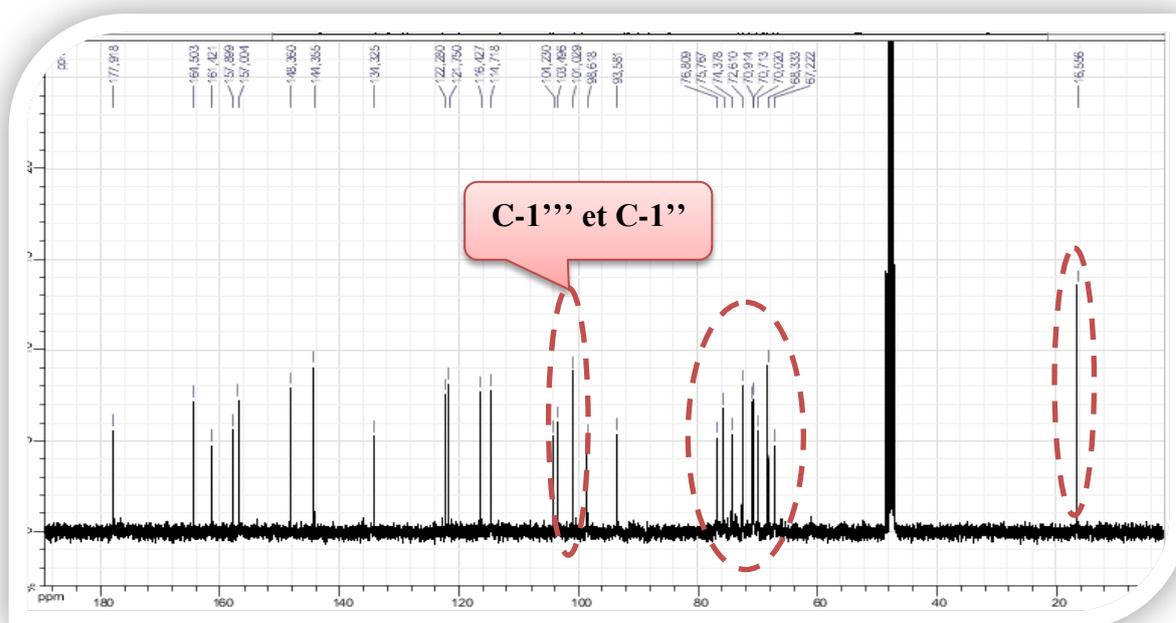


Figure V-25. Spectre RMN- ^{13}C du composé A_5 (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

- Parmi les signaux du premier hexose, ceux du groupement CH₂ sont faciles à repérer, notamment celui du H-6''a $\delta_H = 3,82$ ppm, dd, $J = 9,6 ; 3,6$ Hz (Figure V-24'), la localisation du signal de H-6''b est réalisée grâce au spectre COSY (Figure V-26) où l'on observe une tache de corrélation nette entre H-6''a et le noyau résonnant à $\delta_H = 3,39$ ppm sous forme d'un multiplet

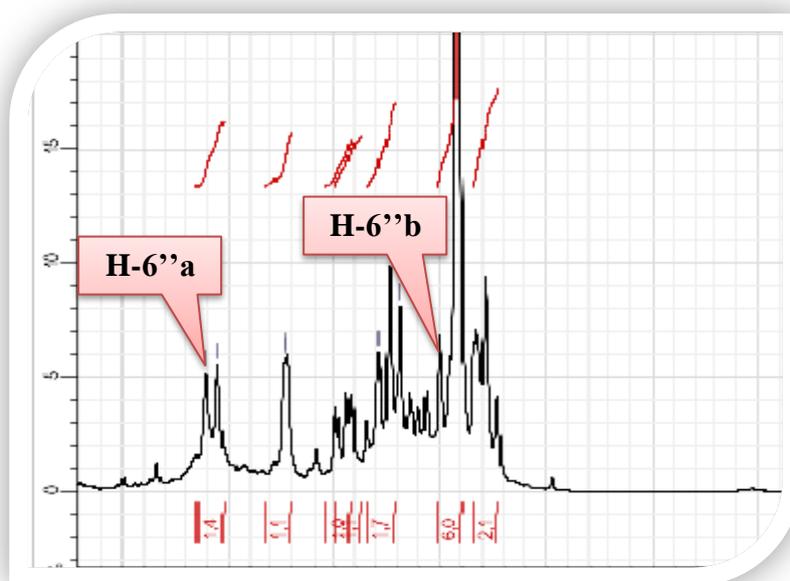


Figure V-24'. Etalement du spectre RMN-¹H du composé A₅ (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm})

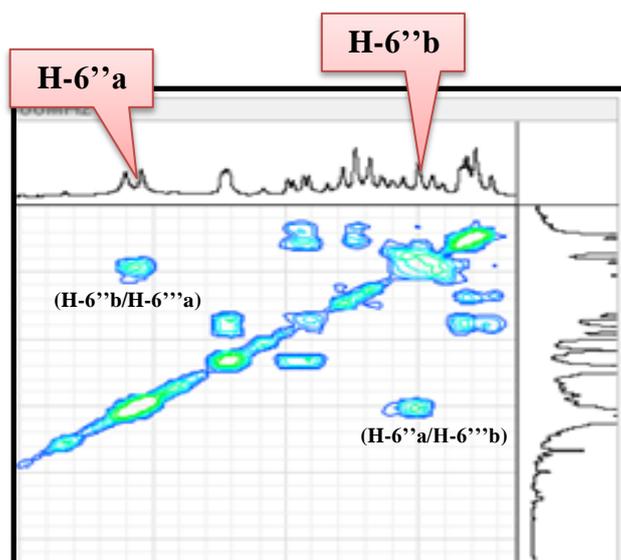


Figure V-26. Corrélation entre le H6''a et le H-6''b sur le spectre COSY du composé A₅ (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm})

Le spectre de l'expérience COSY (Figure V-26') montre la présence d'une tache de corrélation entre le H-1'' et le signal mêlé à d'autres signaux et centré à $\delta_H = 3,50$ ppm attribuable alors à H-2''.

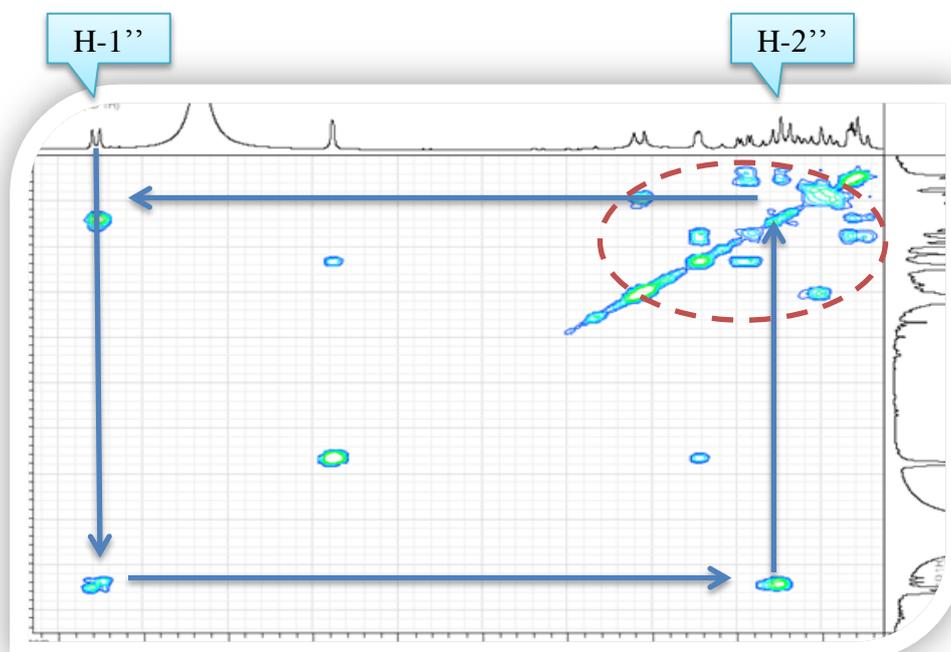


Figure V-26'. Spectre relative à l'expérience COSY du composé A_5 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Sur le même spectre, le proton H-2'' corrèle avec un proton résonant à $\delta_H = 3,35$ ppm attribuable à H-3''. D'autres taches de corrélations sont présentes dans le spectre COSY (Figure V-26'), notamment entre les protons H-6''a et H-6''b et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,43$ ppm attribuable à H-5'', ce dernier corrèle avec le proton d'un multiplet centré à $\delta_H = 3,29$ ppm et attribuable à H-4''.

Pour attribuer les carbones de ce premier hexose, nous avons fait appel au spectre HSQC (Figures V-27 et V-27') où l'on observe :

- Une tache de corrélation entre le H-1'' et le carbone à $\delta_C = 103,48$ ppm, attribuable à C-1'' comme signalé précédemment.
- Une tache de corrélation entre le H-2'' et le carbone à $\delta_C = 74,38$ ppm attribuable à C-2'.

- Deux taches de corrélation entre les protons H-6''a et H-6''b et le carbone résonnant à $\delta_C = 67,23$ ppm attribuable à C-6''. La valeur du déplacement chimique de ce carbone laisse attendre une substitution 6''-OR.
- Le carbone C-3'' est localisé à $\delta_C = 75,77$ ppm grâce à sa corrélation avec son proton H-3'' ($\delta_H = 3,35$ ppm).
- Le carbone C-4'' est localisé à $\delta_C = 70,03$ ppm vu sa corrélation avec H-4''.
- Le proton H-5'' corrèle avec son carbone C-5'' dont le signal apparaît à $\delta_C = 76,81$ ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-2'', C-3'', C-4'' et C-5'' sont en faveur d'un glucopyranosyle.

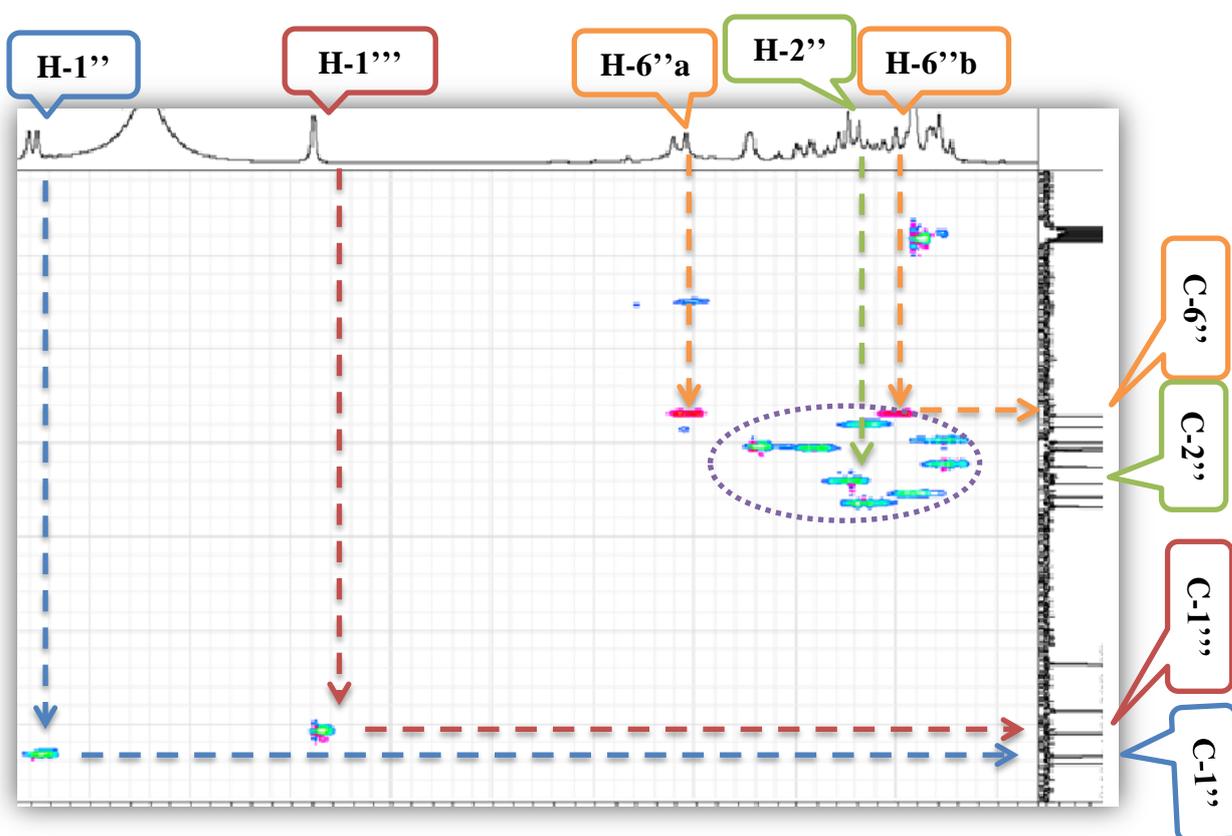


Figure V-27. Spectre HSQC du composé A₅ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

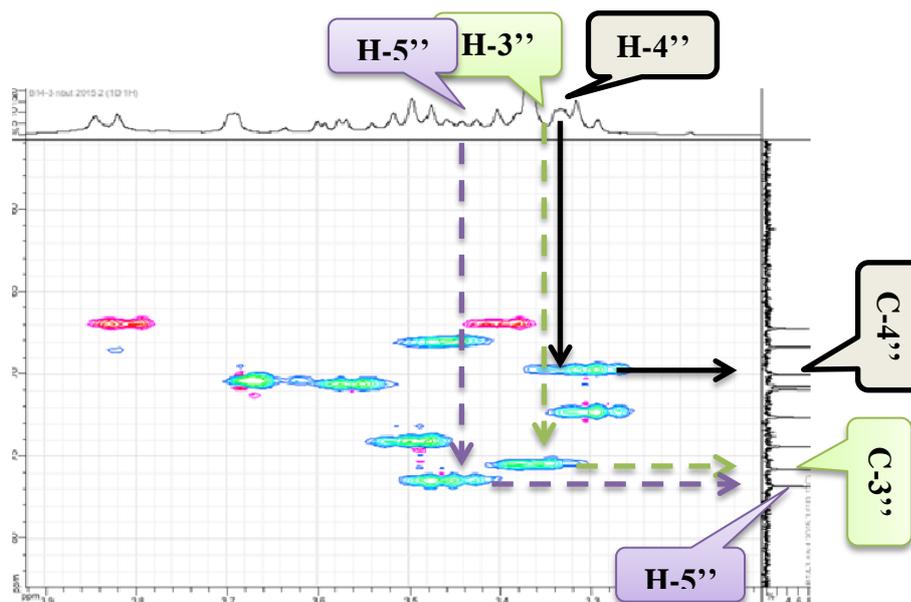


Figure V-27'. Etallement 1 du spectre HSQC du composé A_5 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

La figure V-25' rassemble les attributions précédentes des carbones.

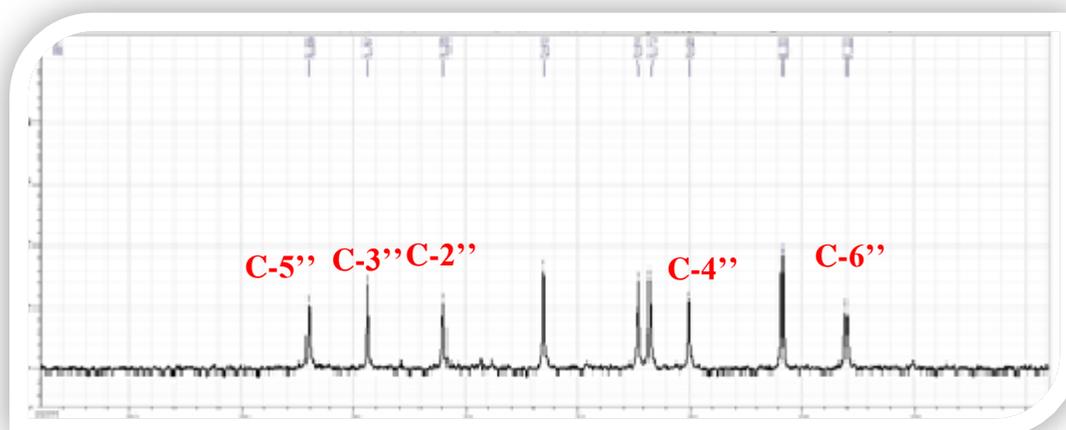


Figure V-25'. Etallement 1 du spectre RMN- ^{13}C du composé A_5 (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

- Le déplacement chimique du proton anomérique H-1'''' ($\delta_H = 4,55$ ppm, $J = 1,2$ Hz) et sa constante de couplage ainsi que la présence du groupement CH_3 orientent vers un 6-deoxyhexose avec une configuration α en faveur donc d'un groupement *O*- α -rhamnopyranosyle.

Un retour vers le spectre COSY (Figure V-26'') montre :

- Une corrélation entre le H-1''' (proton anomérique du rhamnose) et un proton résonant à $\delta_H = 3,68$ ppm sous forme d'un singulet large attribuable à H-2'''.
- Une tache de corrélation entre les protons du groupement $\text{CH}_3\text{-6}'''$ et le proton résonant à $\delta_H = 3,45$ ppm sous forme d'un multiplet qui ne peut être que H-5'''.

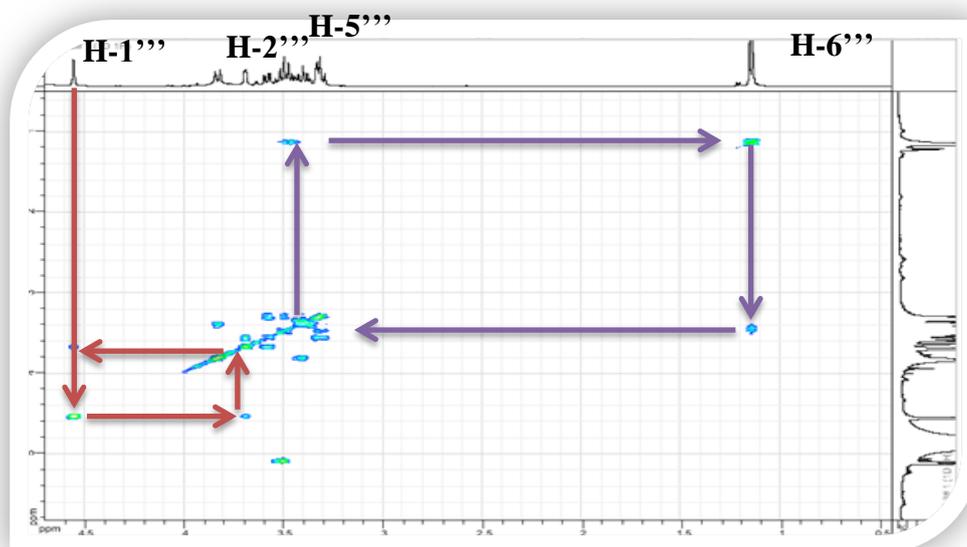


Figure V-26''. Etallement du spectre COSY du composé A₅ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

- Le proton H-2''' corrèle avec le proton dont le signal apparaît à $\delta_H = 3,57$ ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J = 8,1 ; 3,5$ Hz) attribuable à H-3'''. Ce dernier montre une corrélation avec un autre proton résonant sous forme d'un mutiplet à $\delta_H = 3,33$ ppm, qui ne peut être que H-4'''.

Comme pour le glucose l'attribution des carbones du rhamnose a été effectuée on utilisant le spectre HSQC (Figure V-27'').

On relève en effet, grâce à leur corrélation avec les carbones correspondants, le C-2''' à $\delta_C = 70,71$ ppm, le C-3''' à $\delta_C = 70,92$ ppm, le C-4''' à $\delta_C = 70,03$ ppm, le C-5''' à $\delta_C = 68,34$ ppm et le C-6''' à $\delta_C = 16,35$ ppm.

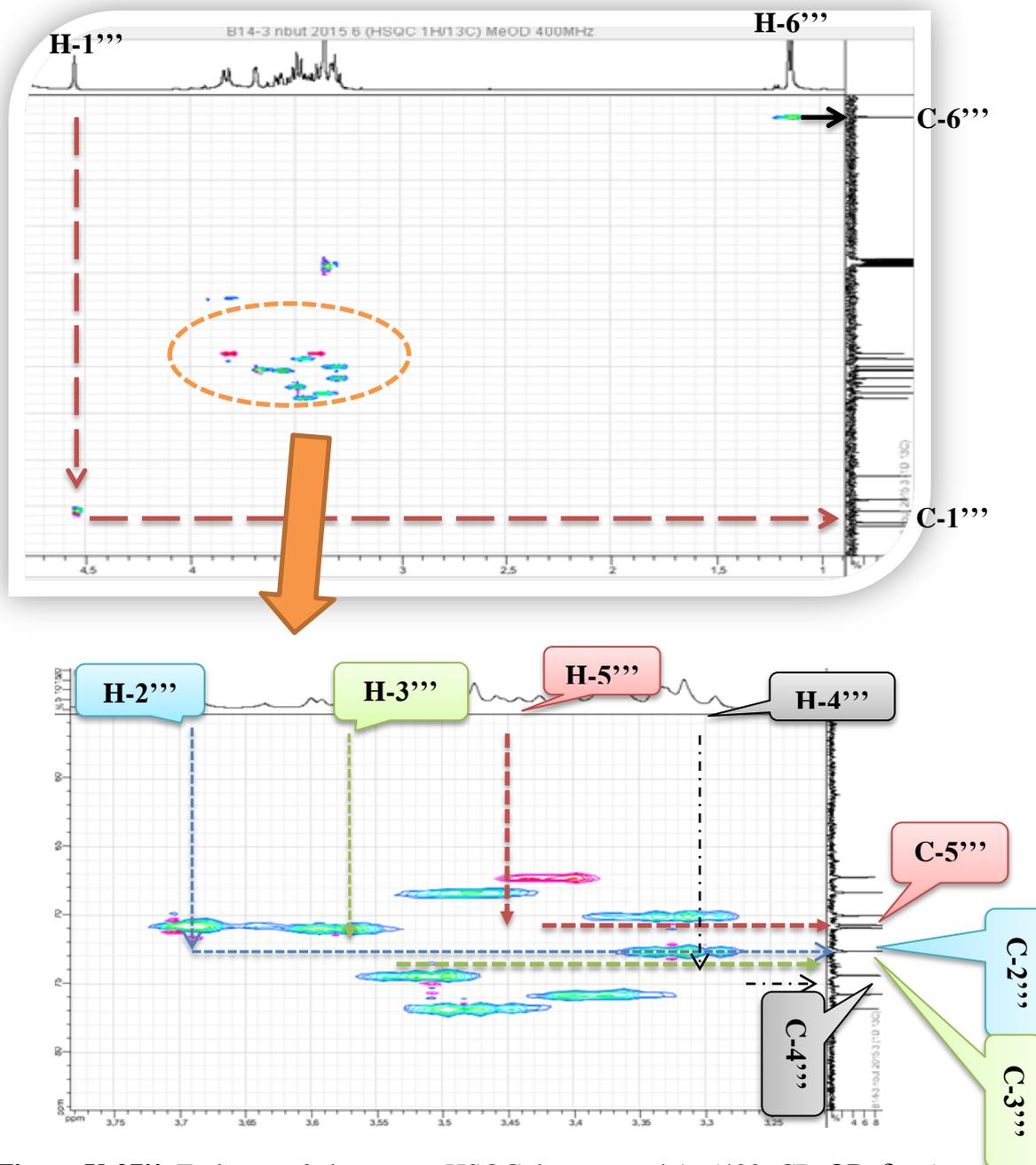


Figure V-27''. Etagement 2 du spectre HSQC du composé A₅ (400, CD₃OD, δ ppm)

La figure V-25'' reporte l'attribution des carbones du rhamnose

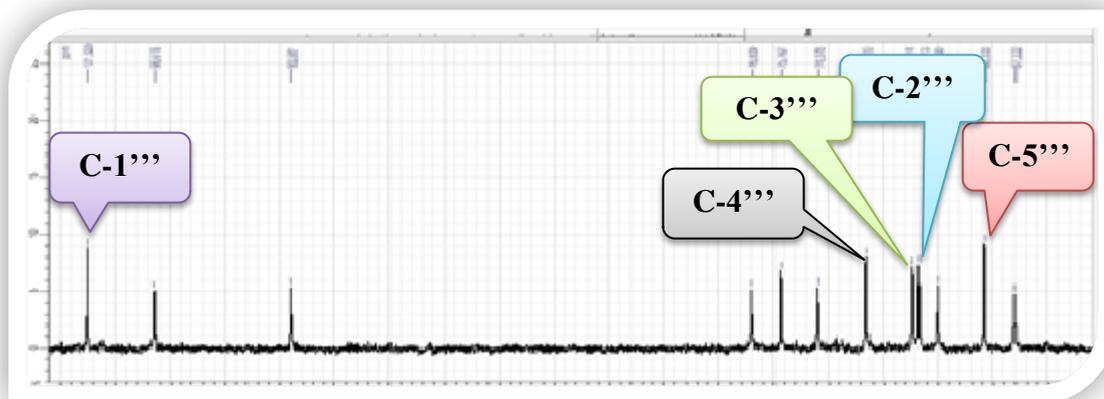


Figure V-25''. Etallement 2 du spectre RMN- ^{13}C du composé **A₅** (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

A ce stade de notre analyse il faut noter que les valeurs des déplacements chimiques des carbones des groupements glucopyranoside et rhamnopyranoside sont en accord avec celles connues dans la littérature (Agrawal, 1992).

L'analyse du spectre HSQC (Figure V-27''') de ce composé nous a également permis d'attribuer les carbones des groupements méthynes du squelette flavonique notamment :

- Le signal à $\delta_{\text{C}} = 116,44$ ppm au carbone C-2' grâce à sa corrélation avec le proton H-2'.
- Le signal à $\delta_{\text{C}} = 121,77$ ppm au carbone C-6' suite à la présence dans ce spectre d'une tache de corrélation avec le proton H-6'.
- Le signal à $\delta_{\text{C}} = 114,74$ ppm au C-5'.
- Le carbone C-8 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 93,60$ ppm suite à sa corrélation avec le proton H-8.
- Le carbone C-6 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 98,64$ vu sa corrélation avec le proton H-6.

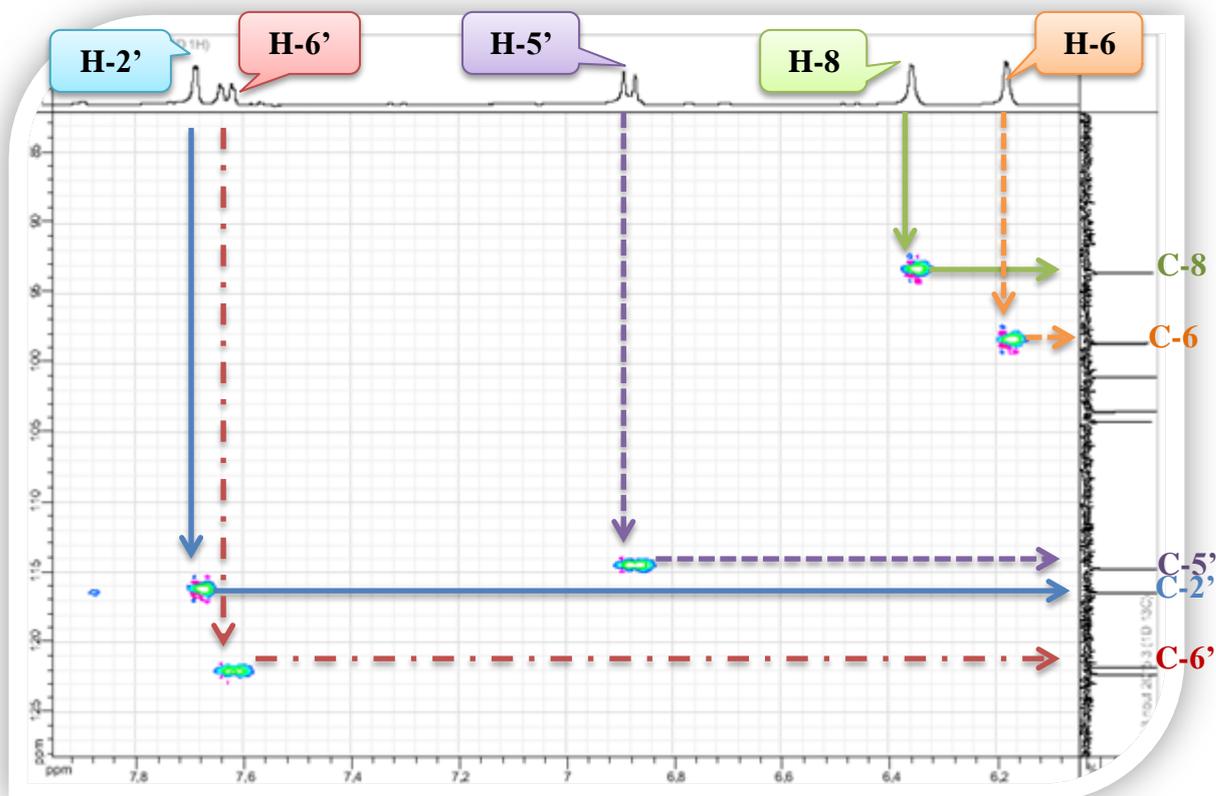


Figure V-27 : Etape 3 du spectre HSQC du composé **A₅** (400, CD₃OD, δ_{ppm})

Pour terminer l'attribution des carbones restants du squelette de l'aglycone, nous avons eu recours à l'analyse du spectre de l'expérience HMBC (Figure V-28) Sur ce spectre on note en effet :

- La corrélation observée entre H-6, H-8 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 104,25$ ppm permet son attribution à C-10.
- Les corrélations entre H-2', H-6', H-5' et le carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 122,29$ ppm permettent l'attribution de ce carbone au C-1'.
- Les corrélations observées entre H-6, H-8 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 164,50$ ppm permettent son attribution au carbone C-7.
- La corrélation relevée entre H-6 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 161,42$ ppm permet son attribution au C-5.
- La corrélation relevée entre H-8 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 157,92$ ppm permet son attribution au C-9.

- Les protons H-5', H-2' montrant des corrélations avec le carbone résonant à $\delta_C = 144,36$ ppm permettent son attribution au C-3'.
- Les protons H-5', H-2', H-6' montrant des corrélations avec le carbone résonant à $\delta_C = 148,36$ ppm permettent son attribution au C-4'.
- Les protons H-2', H-6' montrant des corrélations avec le carbone résonant à $\delta_C = 157,92$ ppm permettent son attribution au C-2.
- On note enfin la corrélation entre le proton H-8 le carbone du carbonyle C-4 résonant à $\delta_C = 177,93$ ppm.

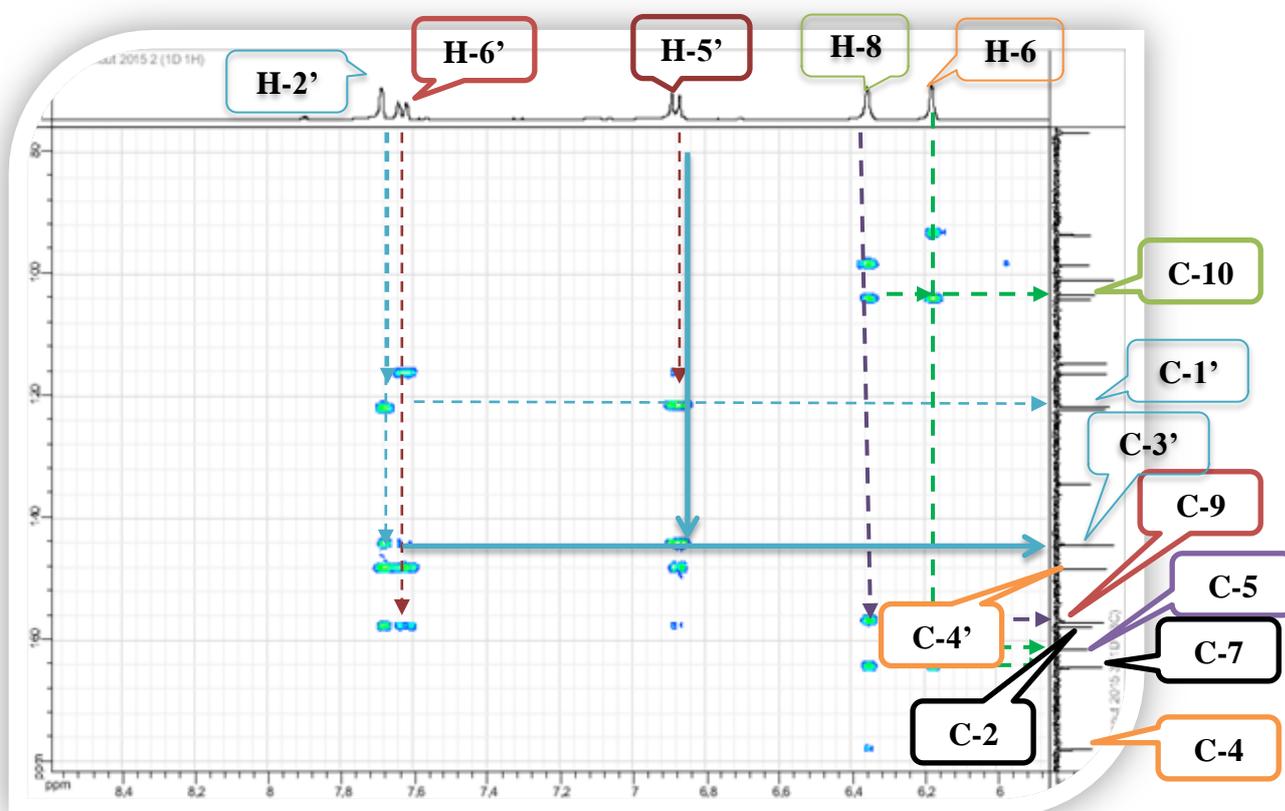


Figure V-28. Spectre HMBC du composé A_5 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Suite à toutes ces attributions, le signal à $\delta_C = 134,32$ ppm et restant non attribué sur le spectre RMN ^{13}C a été assigné au C-3 du noyau C du squelette flavonique. Cette valeur de son déplacement chimique est en faveur de son oxygénation. Un retour vers le spectre HMBC (Figure V-28') permet en effet, de relever une corrélation entre le proton anomérique H-1'' du groupement glucopyranosyle et ce carbone. Ce qui indique que le groupement *O*- β -

glucopyranosyle est attaché à l'aglycone en position C-3. Par ailleurs et toujours sur le même spectre, le proton anomérique H-1''' du groupement *O*- α -rhamnopyranosyle montre une tache de corrélation avec le carbone C-6'' indiquant une jonction 1 \rightarrow 6 des deux entités sucre soit la présence d'un groupement *O*-rutinosyle (Figure 28'') dans cette molécule.

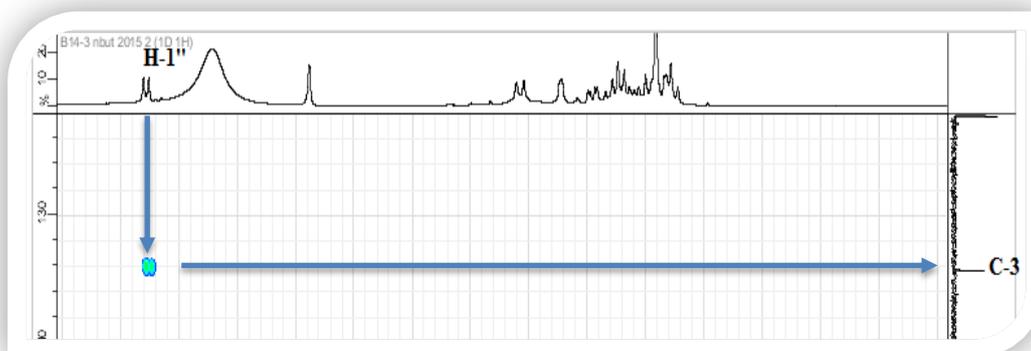


Figure V-28'. Etallement 1 du spectre HMBC du composé **A₅** (400, CD₃OD, δ_{ppm})

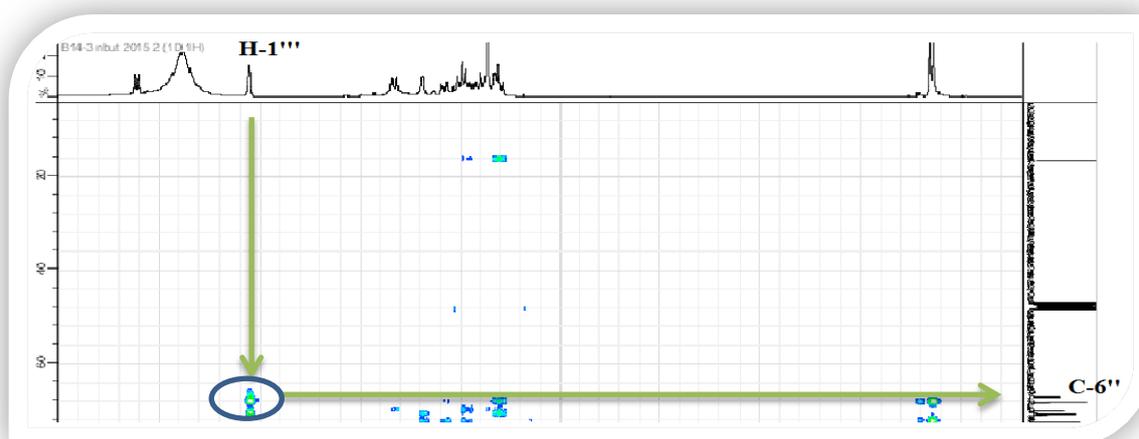


Figure V-28''. Etallement 2 du spectre HMBC du composé **A₅** (400, CD₃OD, δ_{ppm})

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure V-29. Il s'agit de la rutine (Chemam *et al.*, 2017).

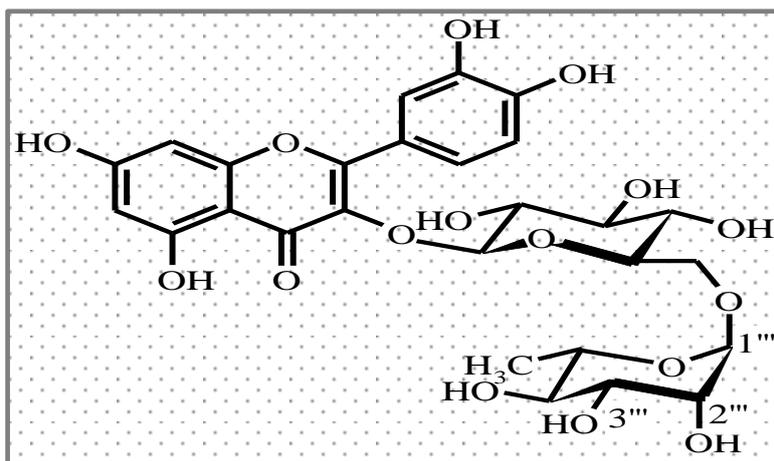


Figure V-29. Structure du composé **A₅**, rutine

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de la rutine sont reportées dans le tableau V-7.

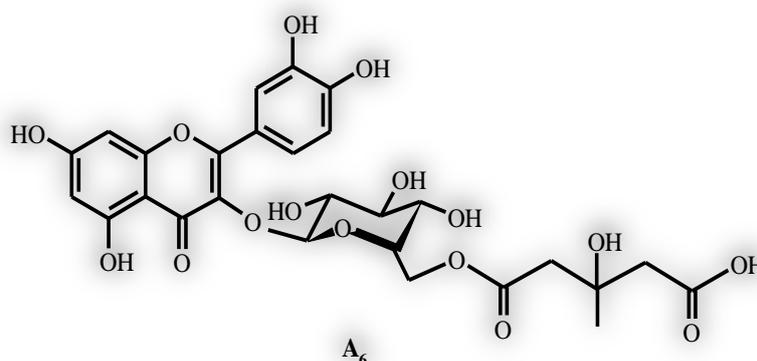
Tableau V-7. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **A₅**

Glucose		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,11(d ; 7,2 Hz)	103,48
2''	3,50 (m)	74,38
3''	3,35 (m)	75,77
4''	3,29 (m)	70,03
5''	3,43(m)	76,81
6''	3,82 (dd ; 9,6 ; 3,6 Hz) 3,39 (m)	67,23
Rhamnose		
1'''	4,55 (d ; 1,2 Hz)	101,03
2'''	3,68 (m)	70,71
3'''	3,57 (m)	70,92
4'''	3,33(m)	70,03
5'''	3,45 (m)	68,34
6'''	1,15 (d ; 6,4 Hz)	16,55
Flavonoïde		
2	/	157,01
3	/	134,32
4	/	177,93
5	/	161,42
6	6,18 (d ; 2,0 Hz)	98,64

Tableau V-7. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **A₅** (suite)

7	/	164,50
8	6,36 (d ; 2,0 Hz)	93,60
9	/	157,92
10	/	104,25
1'	/	122,29
2'	7,68 (d ; 2,4 Hz)	116,44
3'	/	144,36
4'	/	148,36
5'	6,88 (d ; 8,4 Hz)	114,74
6'	7,62 (dd ; 8,4 ; 2,4 Hz)	121,77

V.3.6. Identification du composé **A₆**



L'examen du spectre RMN- ^1H (Figures V-30 et V-30') du composé **A₆**, montre des signaux caractéristiques d'un squelette de type quercétine notamment :

- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,21$ ppm, ($J = 1,9$ Hz) attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,40$ ppm, ($J = 1,9$ Hz) attribuable à H-8.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,84$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un signal sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,59$ ppm ($J = 8,5 ; 2,0$ Hz) appartenant à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,62$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-2'

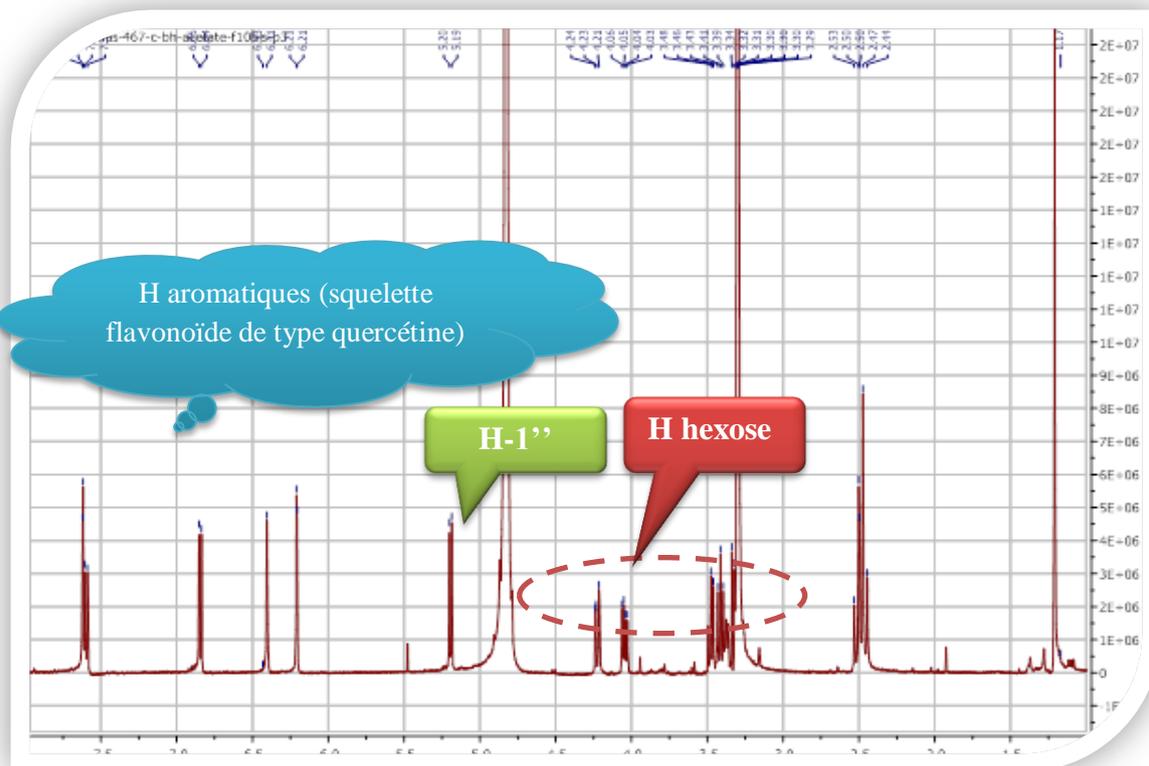


Figure V-30. Spectre RMN- ^1H du composé A_6 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

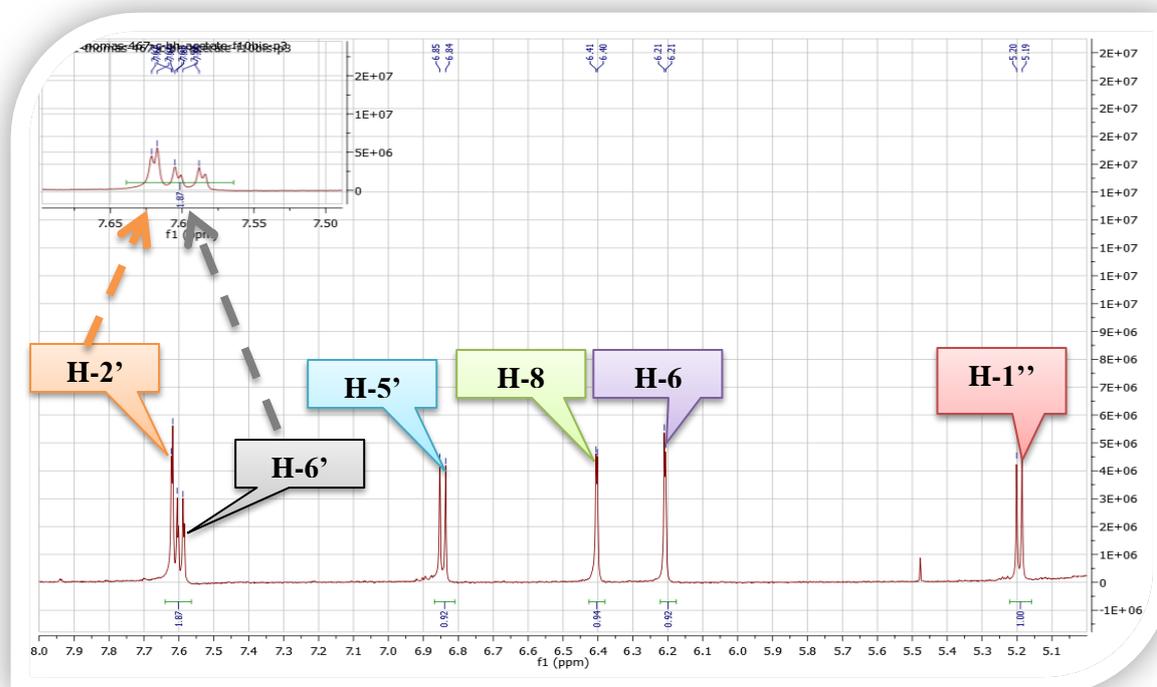


Figure V-30'. Etalement 1 du spectre RMN- ^1H du composé A_6 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

L'analyse du spectre HSQC (Figure V-31) permet d'attribuer tous les carbones porteurs de ces protons grâce à leurs corrélations hétéronucléaires respectives. Ainsi les déplacements chimiques des carbones C-8, C-6, C-2', C-5' et C-6' sont $\delta_C = 95,60$; $99,90$; $115,90$; $118,05$ et $123,93$ ppm respectivement. La détermination des carbones quaternaires de cette entité quercétine est réalisée par une analyse minutieuse du spectre de l'expérience HMBC (Figure V-32) ainsi en suivant les mêmes démarches que pour le composé A_5 , les carbones C-10, C-9, C-2, C-5, C-7, C-1', C-3', C-4' et C-4 sont attribués aux résonances à $\delta_C = 106,01$; $158,79$; $159,42$; $163,44$; $166,69$; $123,0$; $146,39$; $149,93$; $180,39$. Le carbone C-3 a été attribué à la résonance restée non attribuée sur le spectre soit le signal à $\delta_C = 135,78$ ppm. Cette valeur correspond bien à la valeur attendue celle d'un flavonol 3-OR.

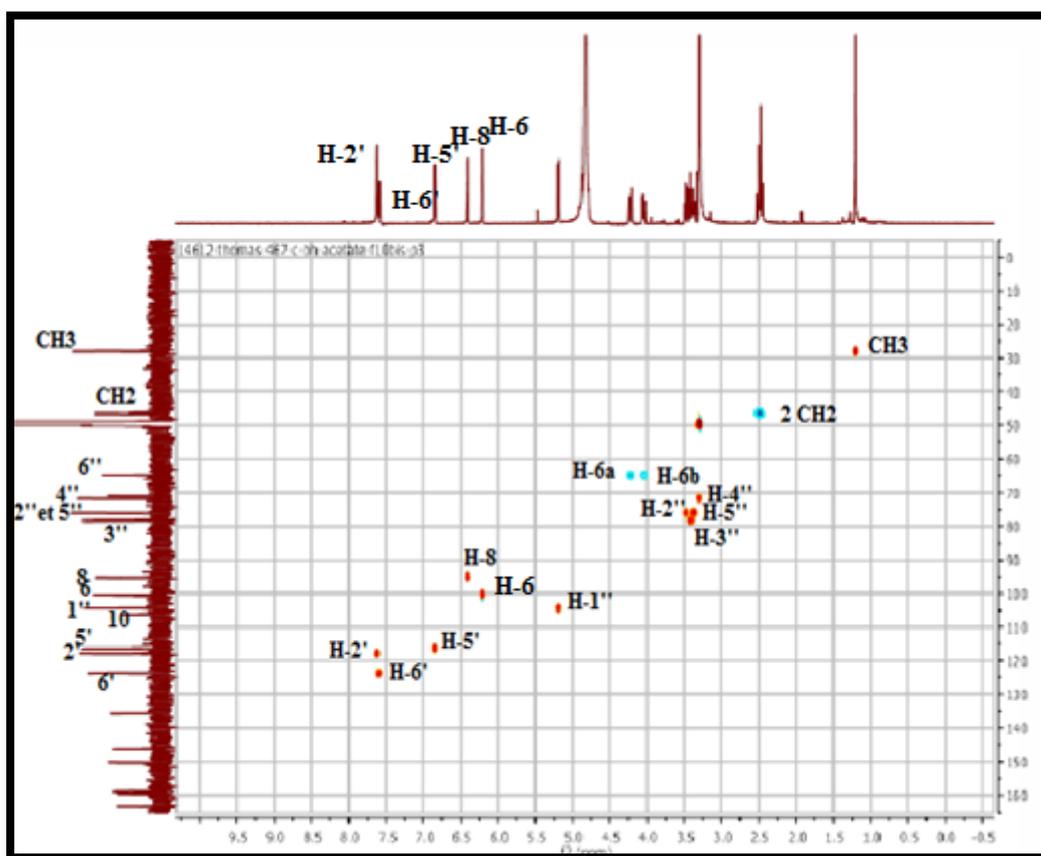


Figure V-31. Spectre HSQC du composé A_6 (400 MHz, CD_3OD , δ ppm)

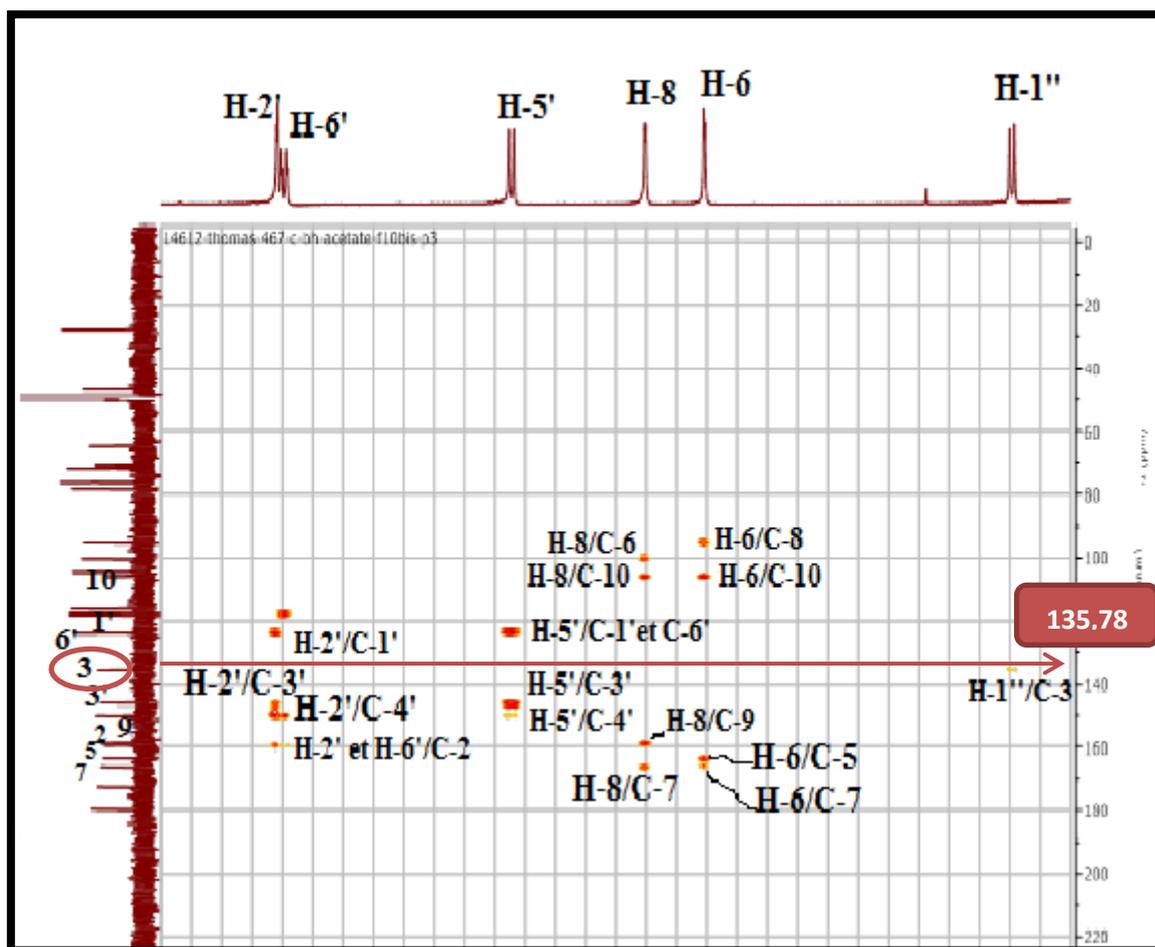


Figure V-32. Spectre HMBC du composé **A₆** (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

Le spectre proton de ce composé montre par ailleurs, un ensemble de signaux attribuables à un groupement hexose, cette observation est confirmée par le spectre RMN-¹³C (Figure V-33) où l'on remarque la présence de signaux dans la zone [60-80] ppm caractéristiques de ce type d'entité et le signal à $\delta_C = 104,33$ ppm reflétant son carbone anomérique (C-1''). Sur le spectre HSQC (Figure V-31) le proton anomérique (H-1'') est localisé à $\delta_H = 5,19$ ppm (d, $J = 7,7$ Hz), ces valeurs indiquent d'une part que le sucre est relié à l'aglycone par une jonction oxygène et d'une autre part que ce sucre admet une configuration β (H-1'' axial).

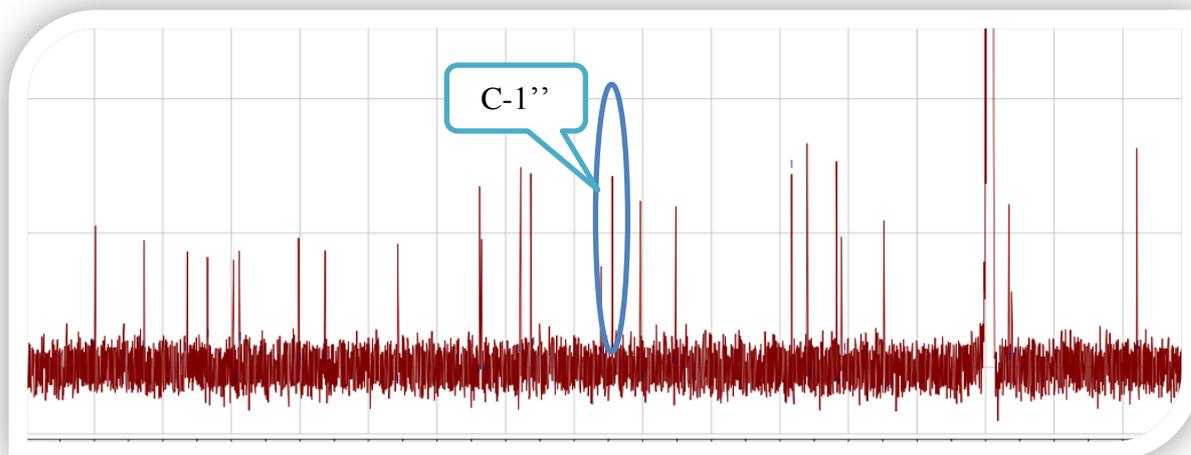


Figure V-33. Spectre RMN- ^{13}C du composé A_6 (100 MHz, CD_3OD , δ ppm)

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Figure V-34) le proton $\text{H-1}''$ permet la localisation du signal de $\text{H-2}''$ à $\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm (t, $J = 8,0$ Hz) grâce à leur corrélation. La multiplicité de ce signal confirme l'interaction *trans* diaxiale de $\text{H-1}''/\text{H-2}''$ et indique une interaction également *trans* diaxiale de $\text{H-2}''/\text{H-3}''$, ceci mène au fait que tout comme $\text{H-1}''$, $\text{H-2}''$ et $\text{H-3}''$ admettent des orientations axiales. Toujours sur le même spectre et pour les mêmes raisons, le proton $\text{H-2}''$ permet l'attribution de $\text{H-3}''$ au signal à $\delta_{\text{H}} = 3,40$ ppm (t, $J = 8,0$ Hz). La multiplicité de ce signal confirme l'orientation axiale de $\text{H-3}''$ et suggère une orientation également axiale de $\text{H-4}''$. Toujours concernant les signaux de cette entité sucre, le signal du proton $\text{H-4}''$ est localisé à $\delta_{\text{H}} = 3,30$ ppm grâce à la tache de corrélation relevée sur ce spectre entre ce proton et le proton $\text{H-3}''$. Le signal de $\text{H-4}''$ étant partiellement recouvert par les signaux du méthanol résiduel et du méthanol partiellement deutéré, sa présence en cette emplacement du spectre est appuyée par le spectre HSQC (Figure V-31) qui montre en effet, une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 71,47$ ppm que nous pouvons alors attribuer au carbone $\text{C-4}''$. Par ailleurs, on relève sur le spectre proton (Figure V-30'') deux signaux sous forme de doublet de doublets, le premier à $\delta_{\text{H}} = 4,22$ ppm ($J = 11,8 ; 1,8$ Hz) et le second à $\delta_{\text{H}} = 4,04$ ppm ($J = 11,8 ; 6,0$ Hz), ces deux protons corrélant sur le spectre HSQC (Figure V-33) au même carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 64,63$ ppm sont attribuables aux protons H-6a et H-6b , quant à ce carbone il est attribué au $\text{C-6}''$ de ce groupement glycosyle. On remarque au passage que le déplacement chimique de ce carbone est assez élevé, ceci indique que l'hydroxyle de la position C-6 de cet hexose n'est pas libre. Concernant les protons de cet hexose, il ne reste plus qu'à déterminer $\text{H-5}''$; ceci est facilité

par le spectre COSY (Figure V-34) où les corrélations observées entre les H₂-6'' et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 3,35$ ppm mènent sans aucune ambiguïté à l'assignement de ce proton (H-5'').

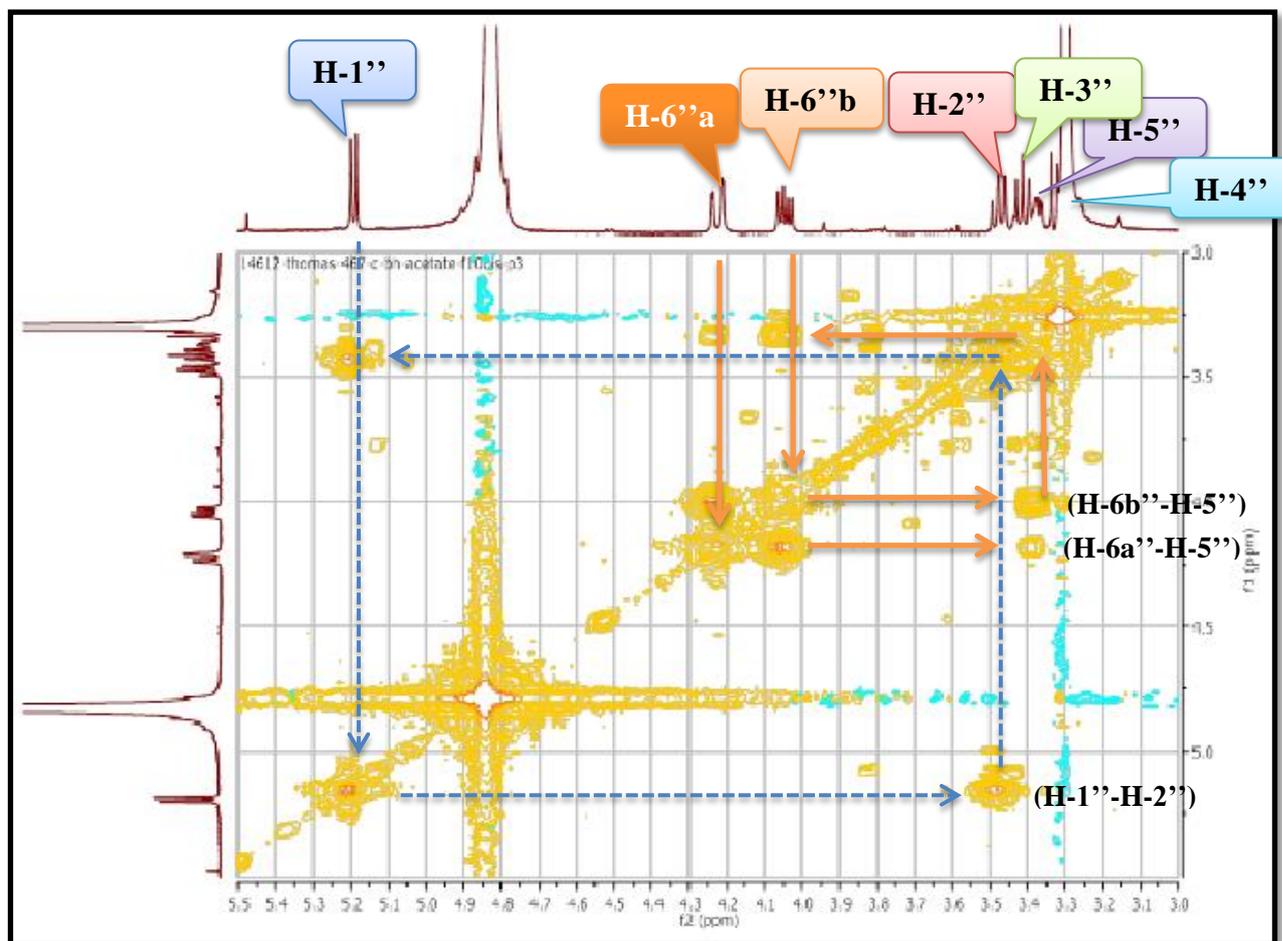


Figure V-34. Spectre COSY du composé A₆ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

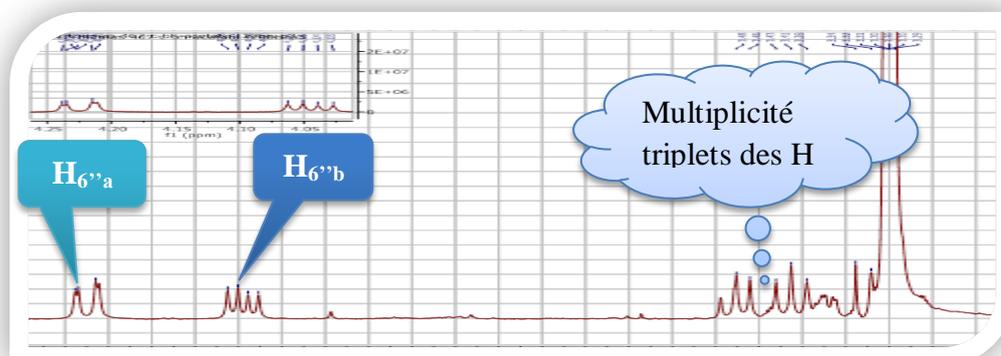


Figure V-30''. Etallement 2 du spectre RMN-¹H du composé A₆ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)

Par ailleurs, vu les orientations axiales des protons des groupements méthynes de cet hexose nous pouvons affirmer qu'il s'agit d'un groupement *O*- β -glucopyranosyle. Un retour vers le spectre HMBC (Figure V-32) permet de positionner ce groupement *O*- β -glucopyranosyle en C-3 de la quercétine grâce à la tache de corrélation nette entre le proton anomérique et ce carbone.

Le spectre proton de ce composé montre également.

- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 1,21$ ppm attribuable à un groupement CH_3
- Des signaux appartenant à deux groupements CH_2 , résonant sous forme d'un système AB chacun, le premier à $\delta_{\text{H}} = 2,51$ et $2,46$ ppm ($J = 14,6$ Hz) et le second à $\delta_{\text{H}} = 2,50$ et $2,46$ ppm ($J = 14,6$ Hz) (Figure V-30''').

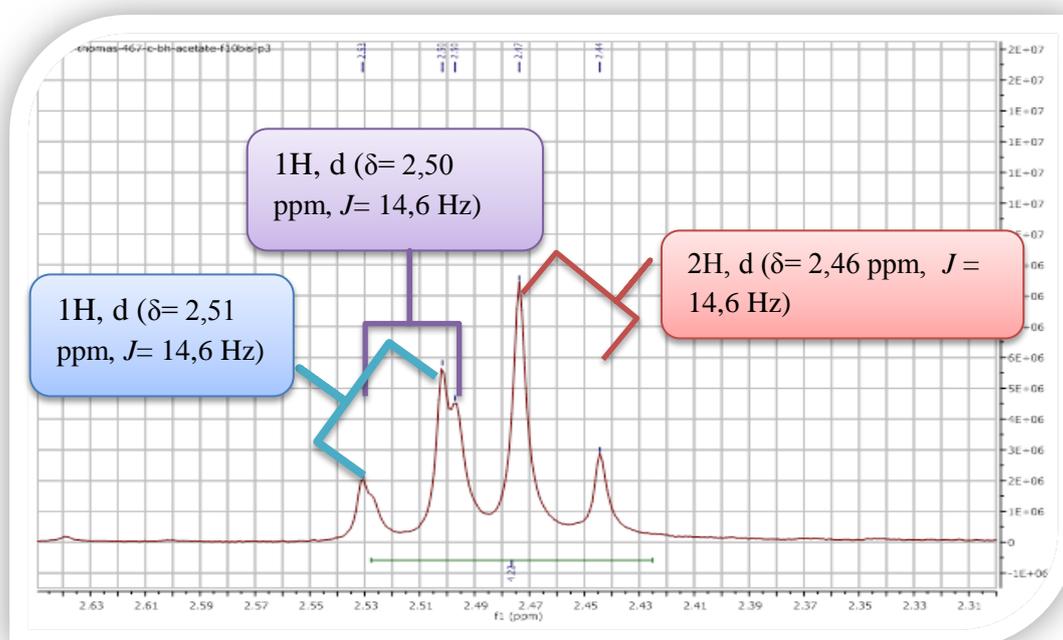


Figure V-30'''. Etallement 3 du spectre RMN- ^1H du composé A_6 (400 MHz, CD_3OD , δ_{ppm})

Le spectre HSQC permet d'attribuer le carbone du groupement méthyle et les carbones des deux groupements méthylènes aux signaux à $\delta_{\text{C}} = 27,83$; $45,78$ et $46,47$ ppm respectivement. En plus de ces signaux, le spectre RMN ^{13}C (Figure V-33') de ce composé montre un signal à $\delta_{\text{C}} = 172,85$ ppm caractéristique d'une fonction ester, un signal à $\delta_{\text{C}} = 176,00$ ppm caractéristique d'une fonction acide et un signal à $\delta_{\text{C}} = 70,55$ ppm correspondant à un carbone quaternaire aliphatique oxygéné d'après la valeur de son déplacement chimique.

À ce stade la figure V-35 reporte les entités présentes dans cette molécule:

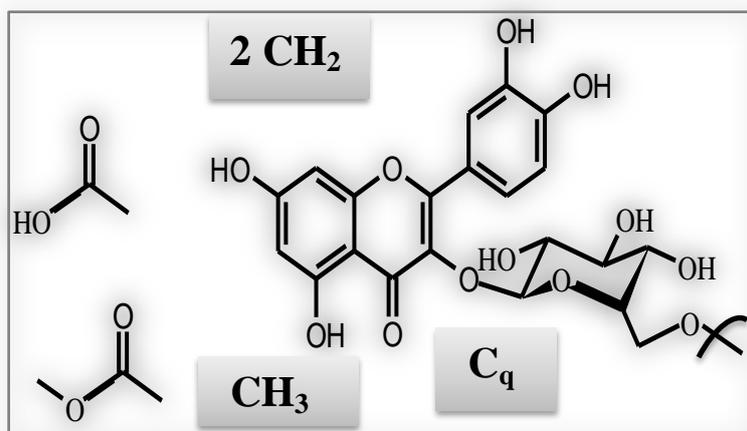


Figure V-35. Entités présentes dans la molécule du composé A₆

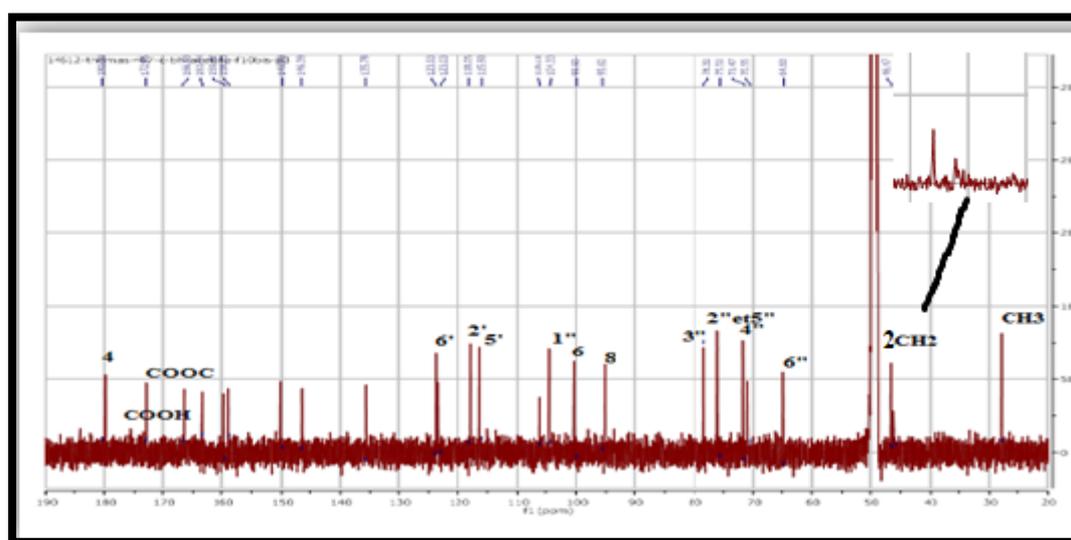


Figure V-33'. La présence d'un ester, d'un acide et un carbone quaternaire sur le spectre RMN-¹³C

Par ailleurs comme attendu, on peut déduire l'acylation de l'hydroxyle en C-6'' du glucose suite à la corrélation des protons H-6a'' et H-6b'' avec le carbonyle d'ester à $\delta_C = 172,85$ ppm. Ce carbonyle montre une autre tache de corrélation avec les protons d'un seul des deux groupements CH₂ vu la multiplicité des signaux de ces deux groupements sur le spectre proton. On remarque par ailleurs la présence de taches de corrélation entre les protons du groupement méthyle d'une part et les carbones des deux groupements méthylènes et d'autre

part avec le carbone quaternaire oxygéné. Cette situation n'est possible que si le carbone quaternaire porte le groupement méthyle et il est placé entre les deux méthylènes ce qui est d'ailleurs en accord avec la multiplicité des signaux de leurs protons. Toujours sur le spectre HMBC (Figure V-32'), on relève une corrélation entre les protons d'un des groupements méthylènes et le carbonyle de la fonction acide, cette situation oriente vers la présence du groupement carboxyle sur le carbone du méthylène. Comme il ne reste plus de groupements hydrocarbonés sur les spectres proton et carbone treize il est évident que le carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 70,55$ ppm est hydroxylé.

La figure V-36 reporte les différentes corrélations déjà citées plus haut :

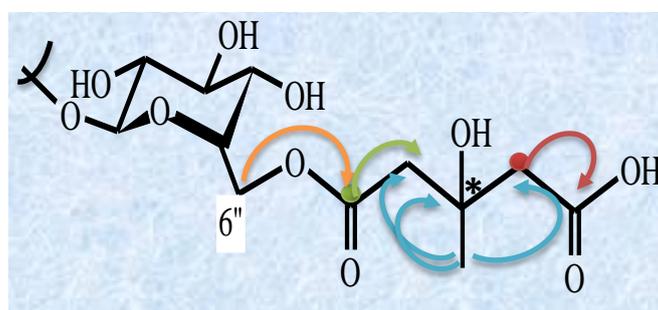


Figure V-36. Les différentes corrélations du substituant en C-6'' du composé **A₆**

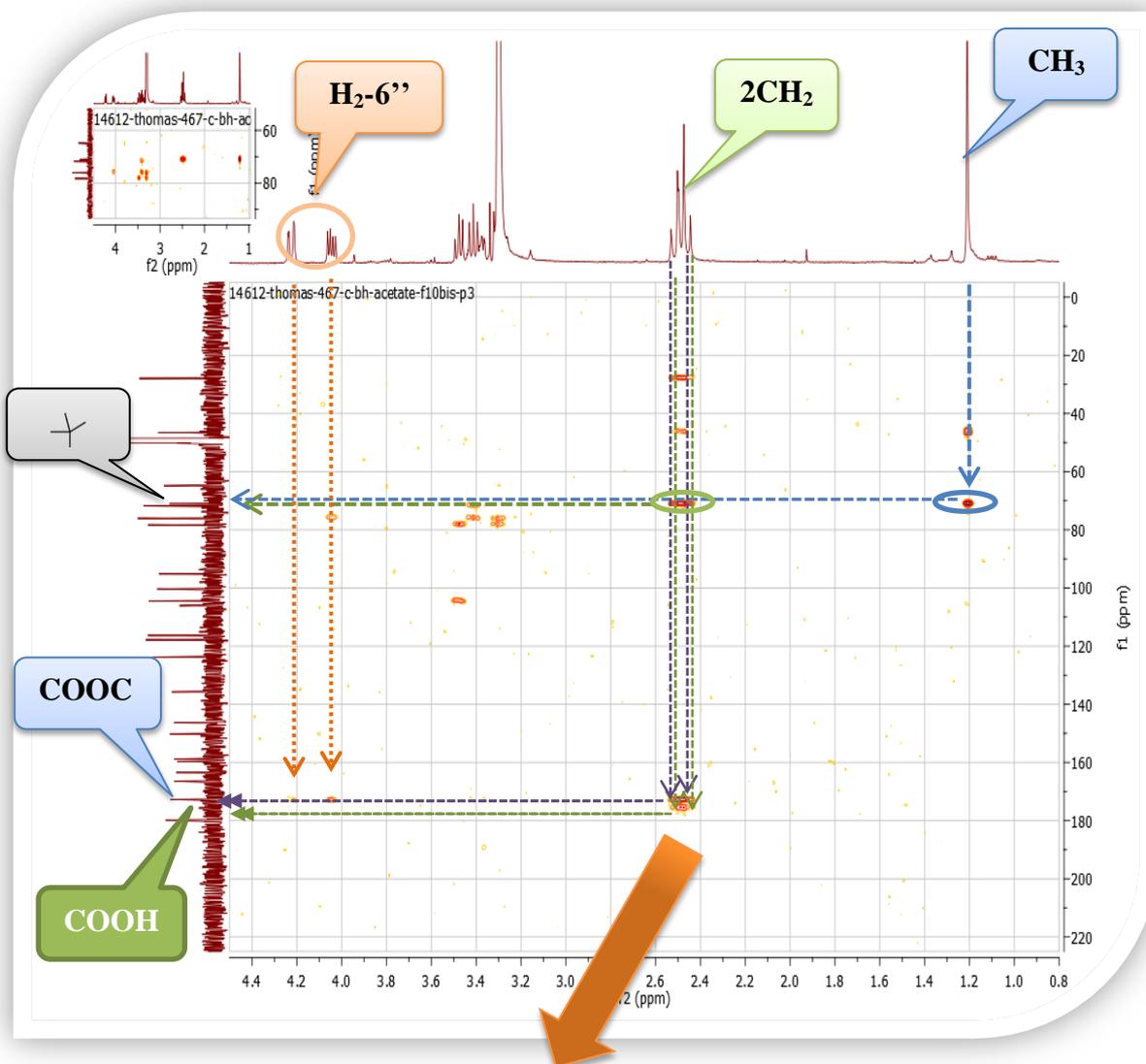
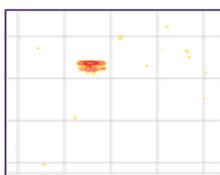


Figure V-32'. Etallement de l'expérience HMBC du composé A₆ (400 MHz, CD₃OD, δ ppm)



Cette analyse mène à la présence du groupement reporté dans la figure V-37 en position C-3 de la quercétine.

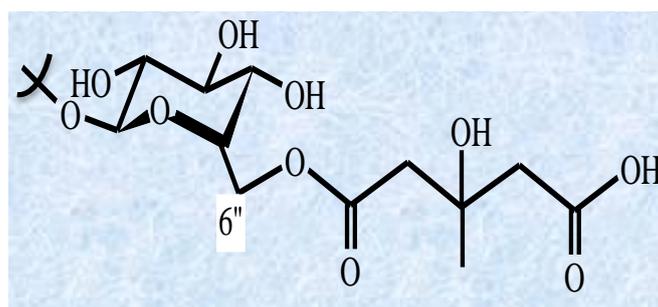


Figure V-37. La forme du groupement présent en position C-3 de la quercétine

L'intégralité des attributions d'atomes de carbones de la molécule sont rapportés dans la figure V-33''. Cela a été réalisé suite à la combinaison des données rapportées par le spectre RMN-¹³C et les expériences HSQC , HMBC.

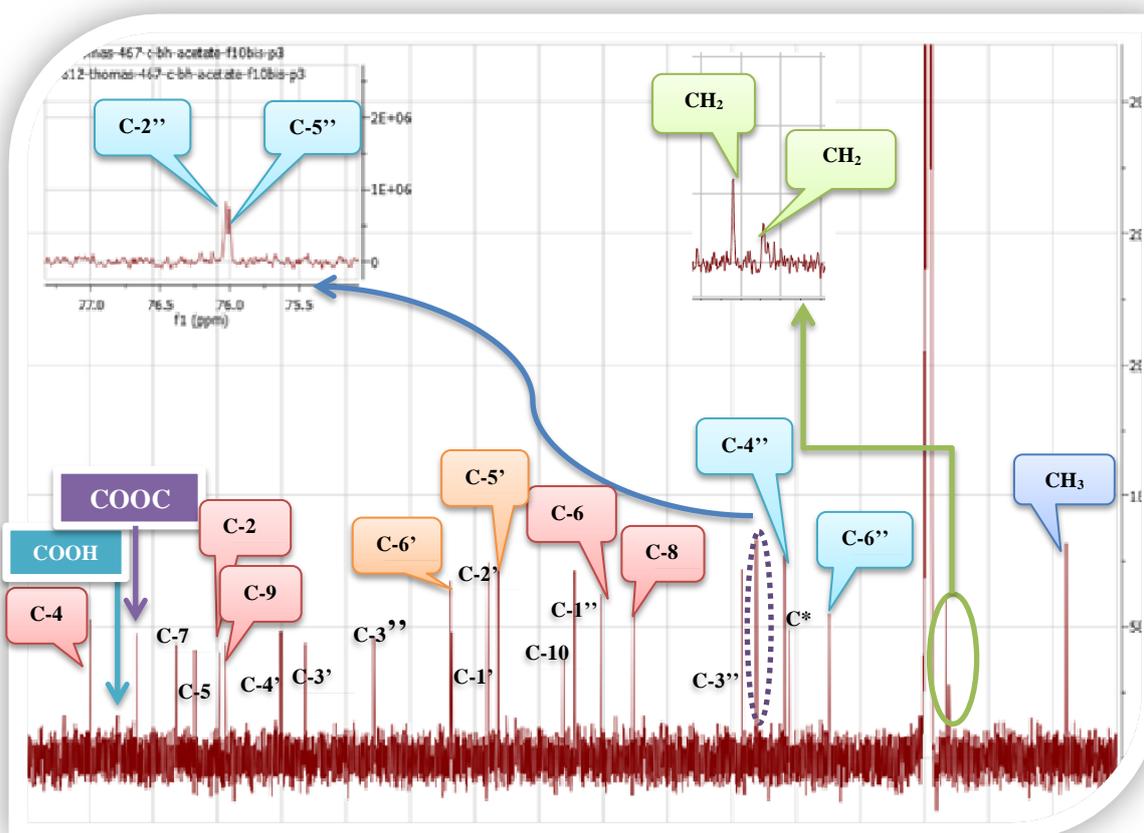


Figure V-33''. L'intégralité des carbones de la molécule du composé A₆ (100 MHz, CD₃OD, δ_{ppm})

Les données relatives aux spectres RMN- ^1H et ^{13}C du composé **A₆** sont reportées dans le tableau V-8.

Tableau V-8. Les données relatives aux spectres de RMN- ^1H et ^{13}C du composé **A₆**.

	Glucose	
Numeration	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,19 (d, $J = 7,7$ Hz)	104,33
2''	3,45(t, $J = 8,0$ Hz)	76,03
3''	3,40 (t, $J = 8,0$ Hz)	78,31
4''	3,30 *	71,47
5''	3,35 (m)	75,95
6a''	4,22 (dd, $J = 11,8-1,8$)	64,63
6b''	4,04 (dd, $J = 11,8-1,8$)	64,63
	3-hydroxy-3-méthylglutaryle	
CH₃	1,25	27,83
H_{2a}	2.51 (d, $J = 14,6$ Hz)	45,78 [§]
H_{2b}	2,46 (d, $J = 14,6$ Hz)	45,78
H_{4b}	2.46 (d, $J = 14,6$ Hz)	46,47 [§]
H_{4a}	2.50 (d, $J = 14,6$ Hz)	46,47
COOC	/	172,85
COOH	/	176,00
	Flavonoïde	
2	/	159,42
3	/	135,78
4	/	180,39
5	/	163,44
6	6,21 (d, $J = 1,9$ Hz)	99,90
7	/	166,69
8	6,40 (d, $J = 1,9$ Hz)	95,60
9	/	158,79
10	/	106,01
1'	/	123,00
2'	7,62 (d, $J = 2,0$ Hz)	118,05
3'	/	146,39
4'	/	149,93
5'	6,84 (d, $J = 8,4$ Hz)	115,90
6'	7,59 (dd, $J = 8,4-2,0$ Hz)	123,93

*Signal partiellement recouvert par les signaux du méthanol résiduel et du méthanol partiellement deutéré.

[§]Ces valeurs peuvent être interchangeables.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la figure V-38. Il s'agit de la quercétine 3-*O*-[6''-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -glucopyranoside] (Zhang *et al.*, 2015). Cette molécule est nouvelle pour la famille des Astéracées.

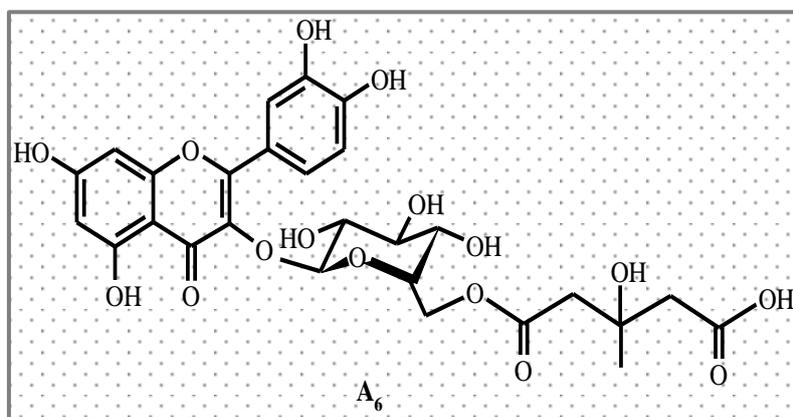
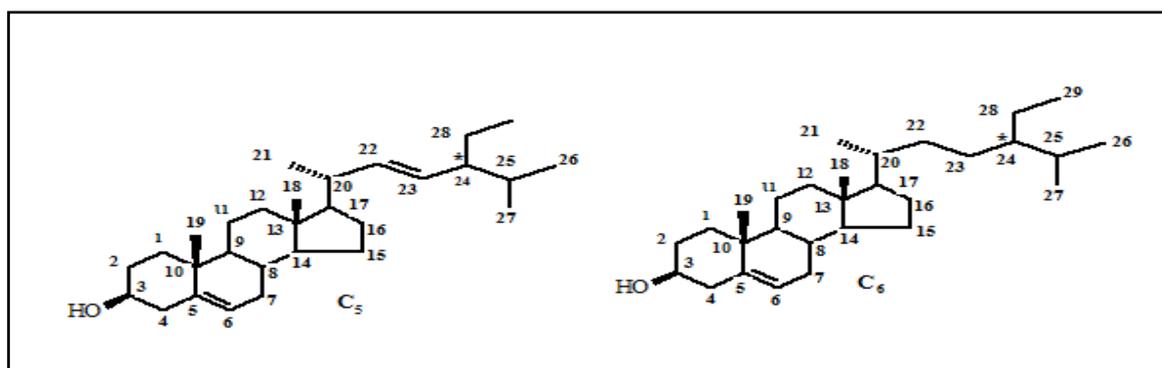


Figure V-38. Structure du composé **A₆**, quercétine 3-*O*-[6''-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -glucopyranoside]

V.4. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait chloroforme

V.4.1. Identification des composés **C₅** et **C₆**



L'analyse du spectre RMN-¹H (Figures V-39, V-39' et V-39'') montre la présence de signaux caractéristiques d'un mélange de deux stérols notamment le β -sitostérol et le stigmastérol. Ces signaux sont :

- ❖ Un doublet large à $\delta_H = 5,32$ ppm ($J = 5,2$ Hz) caractéristique du proton oléfinique H-6 des deux molécules.
- ❖ Un multiplet à $\delta_H = 3,44$ ppm attribuable aux H-3 des deux molécules.
- ❖ Deux doublets de doublets à $\delta_H = 5,05$ ppm ($J = 15,20 ; 8,4$ Hz) et $\delta_H = 5,16$ ppm ($J = 15,2 ; 8,4$ Hz), correspondant aux protons oléfiniques H-23 et H-22 respectivement du stigmastérol.
- ❖ Un doublet à $\delta_H = 0,92$ ppm pour le méthyle 21 ($J = 6,4$ Hz), ces signaux appartiennent aux deux molécules.
- ❖ Deux singulets, le premier à $\delta_H = 0,69$ ppm et le deuxième à $\delta_H = 1,00$ ppm attribuables aux méthyles 18 et 19, respectivement des deux molécules.

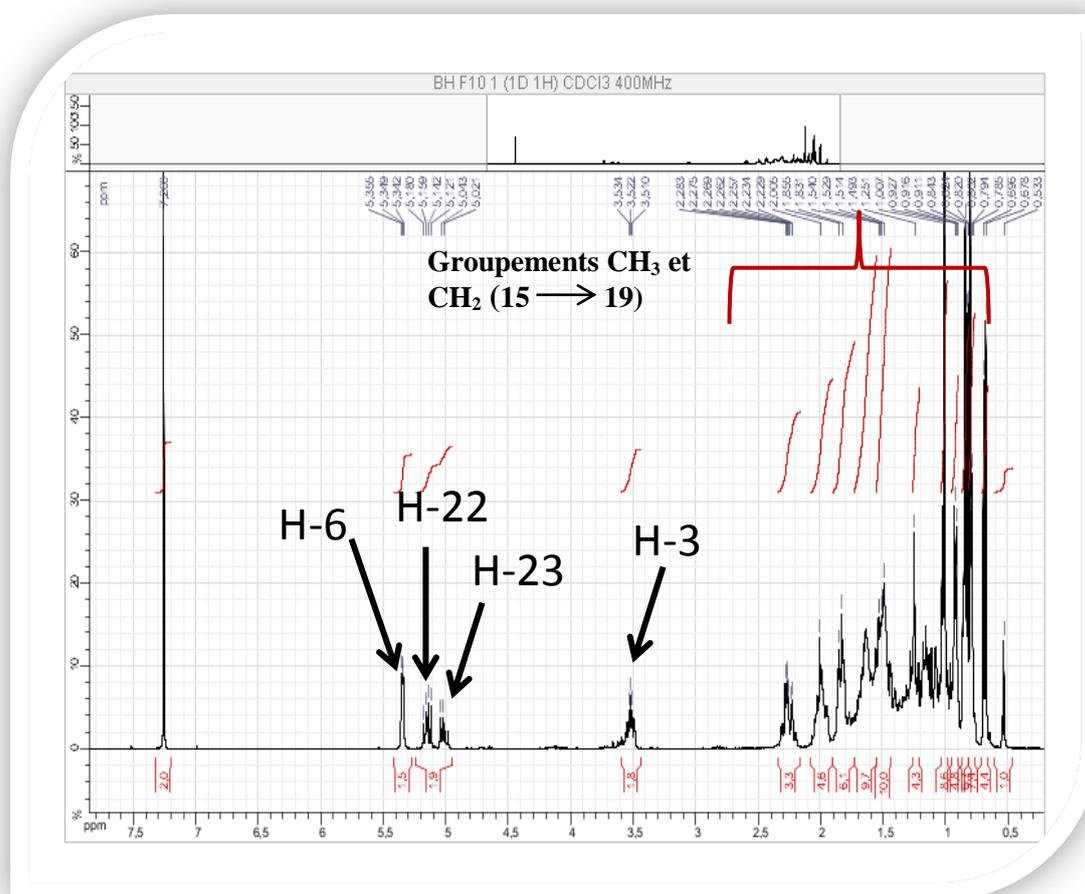


Figure V-39. Spectre RMN-¹H des composés C₅ et C₆ en mélange (400 MHz, CDCl₃, δ ppm).

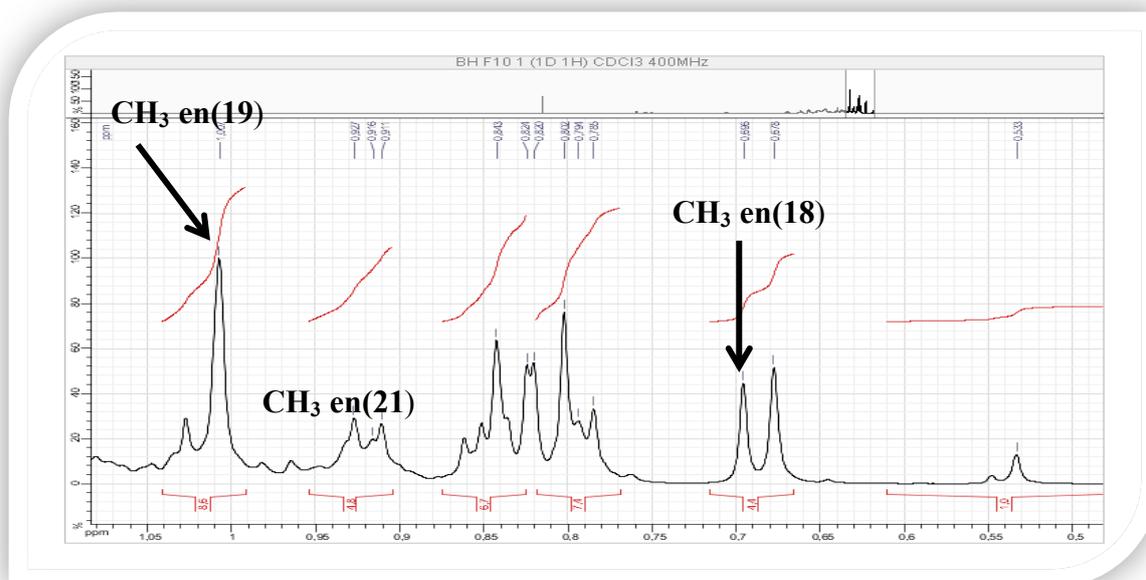


Figure V-39'. Etagement 1 du spectre RMN-¹H des composés **C**₅ et **C**₆ en mélange (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

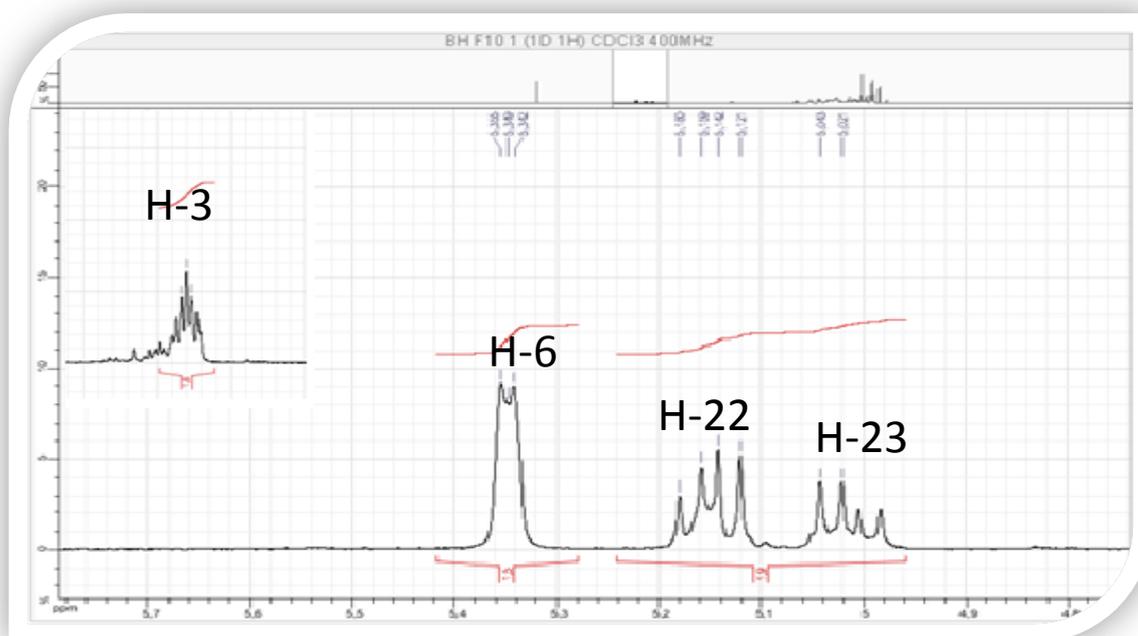


Figure V-39''. Etagement 2 du spectre RMN-¹H des composés **C**₅ et **C**₆ en mélange (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

Le spectre RMN ¹³C (Figure V-40) confirme la présence des deux doubles liaisons par les signaux à $\delta_C = 140,79$ ppm et $\delta_C = 121,71$ ppm pour celle entre C-5, C-6 des deux molécules et à $\delta_C = 129,32$ ppm et $\delta_C = 138,31$ ppm pour celle entre C-23 et C-22 du stigmasterol. On

relève également une résonance à $\delta_C = 77,61$ ppm attribuable au carbone hydroxylé C-3 des deux molécules.

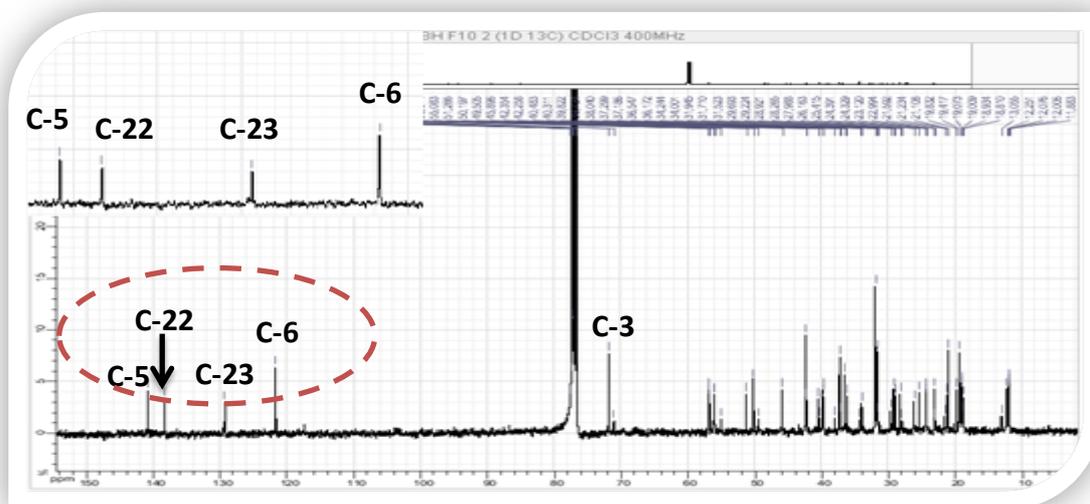


Figure V-40. Spectre RMN- ^{13}C des composés C_5 et C_6 en mélange (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm).

Pour trouver le pourcentage de chaque composé dans le mélange nous avons procédé à la comparaison de l'intégrale du signal des H-6 (superposés) des deux molécules et l'intégrale des signaux relatifs aux protons H-22 et H-23 qui n'appartiennent qu'au stigmasterol (Figure V-39'''). On relève en effet, des intégrales de 1,5 et 1,9 respectivement. Un calcul simple utilisant ces données mène à 63% de stigmasterol et 37% de β -sitostérol dans ce mélange.

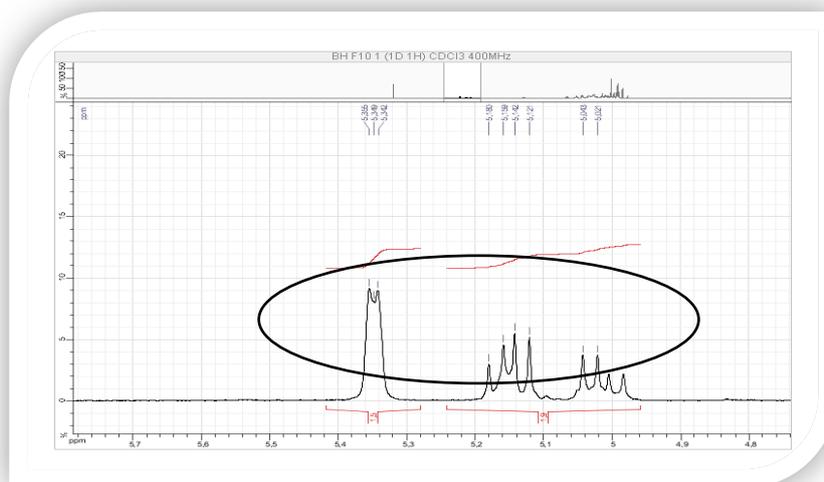


Figure V-39'''. Etalement 3 du spectre RMN- ^1H des composés C_5 et C_6 en mélange (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'enregistrement du spectre HSQC (Figure V-41) a permis de confirmer l'attribution des carbones C-3, C-22, C-23, C-6, grâce aux taches de corrélations de ces carbones avec leurs protons.

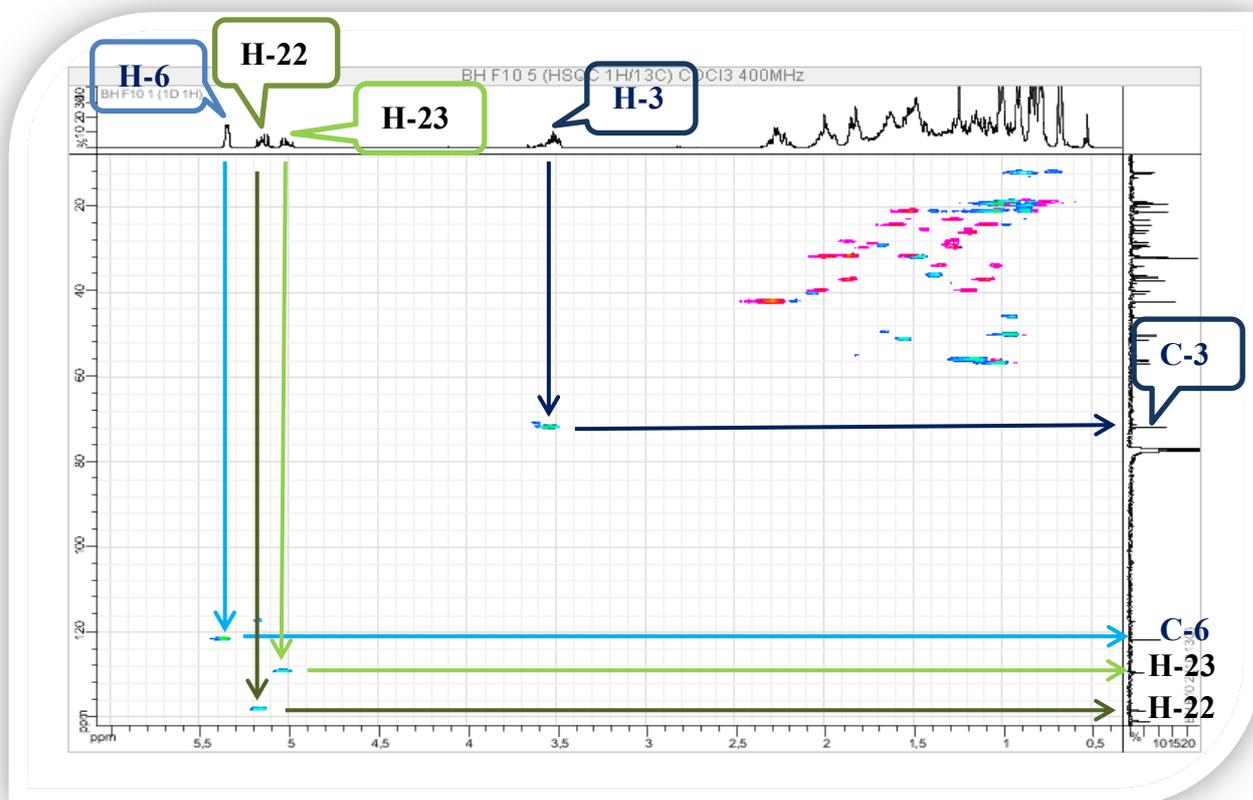


Figure V-41. Spectre HSQC des composés C_5 et C_6 en mélange (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm)

L'ensemble des données est en accord avec les structures reportées sur les figures V-42 et V-43. Il s'agit du stigmastérol et du β -sitostérol (Khatun *et al.*, 2012).

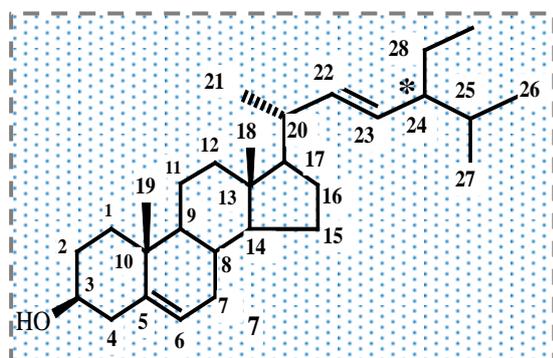


Figure V-42. Structure du stigmastérol.

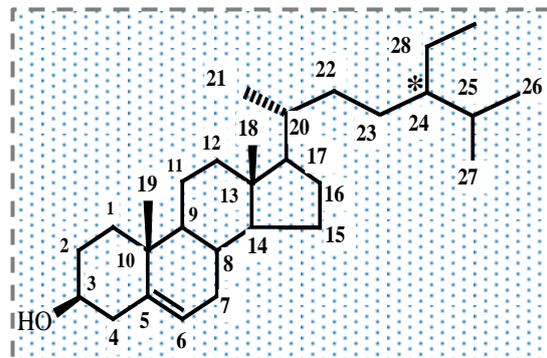


Figure V-43. Structure du β -sitostérol

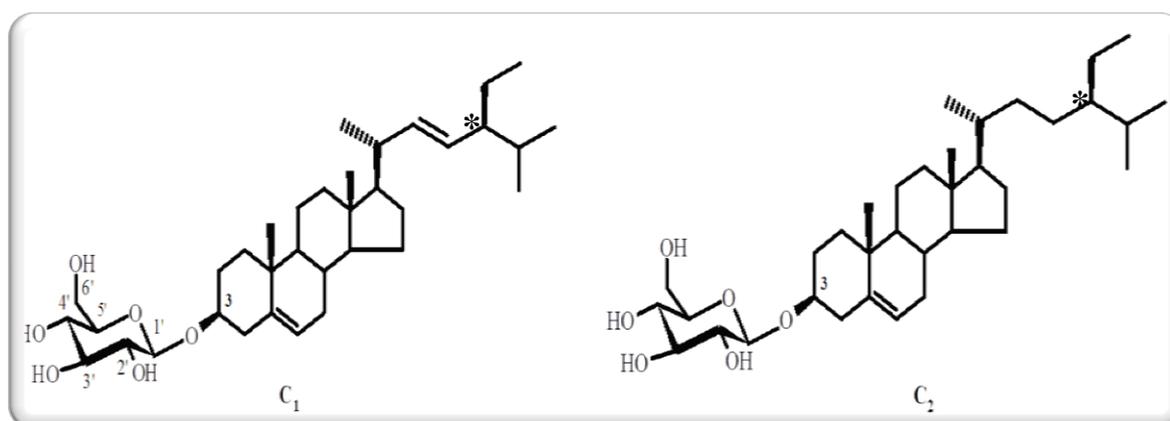
Le tableau V-9 reporte les données relatives aux spectres RMN- ^1H et ^{13}C des composés C_5 et C_6 en mélange.

Tableau V-9. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C des composés C_5 et C_6 en mélange

Numération	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
3	3,44 (m)	77,61
6	5,32 (d, 5,2 Hz)	121,71
18	0,69 (s)	12,25
19	1,00 (s)	18,93
21	0,92 (d, 6,4)	21,59
22	5,2 (15,2 Hz ; 8,5 Hz) ^a	138,31 ^a
23	5,0 (15,2 Hz ; 8,5 Hz) ^a	129,32 ^a

^a Atomes relatifs au stigmastérol uniquement.

V.4.2. Identification des composés C_1 et C_2



L'examen du spectre RMN- ^1H (Figure V-44) indique que ce composé est constitué d'un mélange de deux stérols, suite à une comparaison entre les spectres de ce composé et les spectres du mélange précédent C_5 et C_6 qui lui-même représente un mélange des deux stérols le β -sitostérol et le stigmastérol. Cette observation oriente donc vers des dérivés du stigmastérol et du β -sitostérol. Ainsi, en plus des signaux attribuables aux deux stérols précédents on relève des signaux caractéristiques d'un groupement glycoside de type hexose, notamment :

- Un signal sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,24$ ppm ($J = 7,6$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1'. Sur le spectre HSQC (Figure V-45), ce proton corrèle avec le

carbone résonant à $\delta_C = 101,28$ ppm correspondant par conséquent au C-1'. Vu la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-1' et le déplacement chimique de C-1', nous pouvons conclure la présence d'un sucre de configuration β relié à l'aglycone par une jonction oxygène. Sur le spectre COSY (Figure V-46), le proton H-1' montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 2,90$ ppm permettant alors, son attribution à H-2'. Le signal du carbone C-2' est alors relevé à $\delta_C = 73,97$ ppm grâce au spectre HSQC. Le spectre COSY permet également de relever la résonance du OH-2' à $\delta_H = 4,87$ ppm (signal partiellement recouvert par celui d'un autre hydroxyle de cette partie osidique de la molécule).

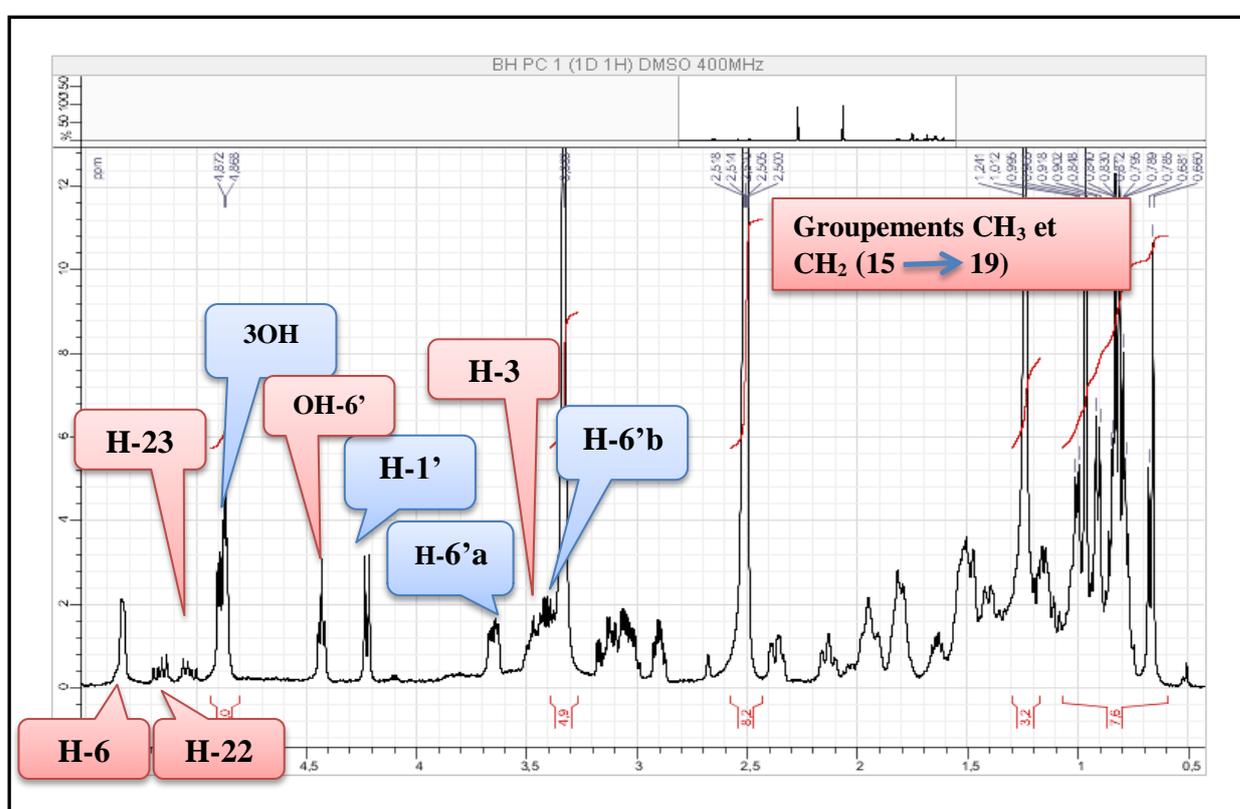


Figure V-44. Spectre RMN-¹H des composés C₁ et C₂ en mélange (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

- Deux signaux sous forme de multiplets à $\delta_H = 3,69$ et $3,40$ ppm corrélant sur le spectre HSQC (Figure V-45) au carbone du méthylène résonant à $\delta_C = 61,61$ ppm, que nous pouvons alors attribuer à H-6'a et H-6'b respectivement. Le carbone de ce méthylène est par conséquent attribué au C-6' de l'hexose. Le signal du groupement OH de la

position C-6' est aisément localisé à $\delta_H = 4,43$ ppm (triplet, $J = 4,4$ Hz) grâce à l'analyse du spectre COSY (Figure V- 46).

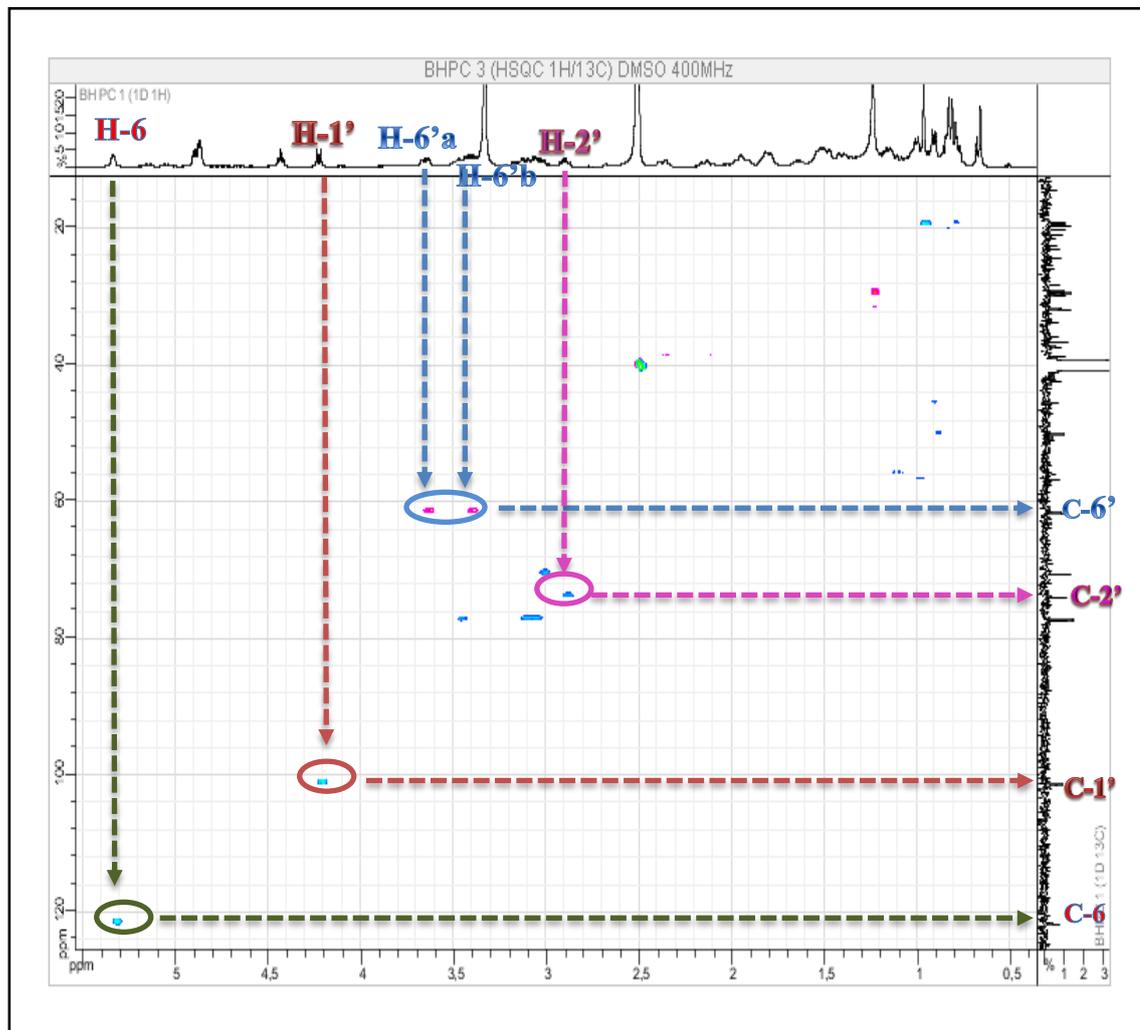


Figure V-45. Spectre HSQC des composés C_1 et C_2 en mélange (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm)

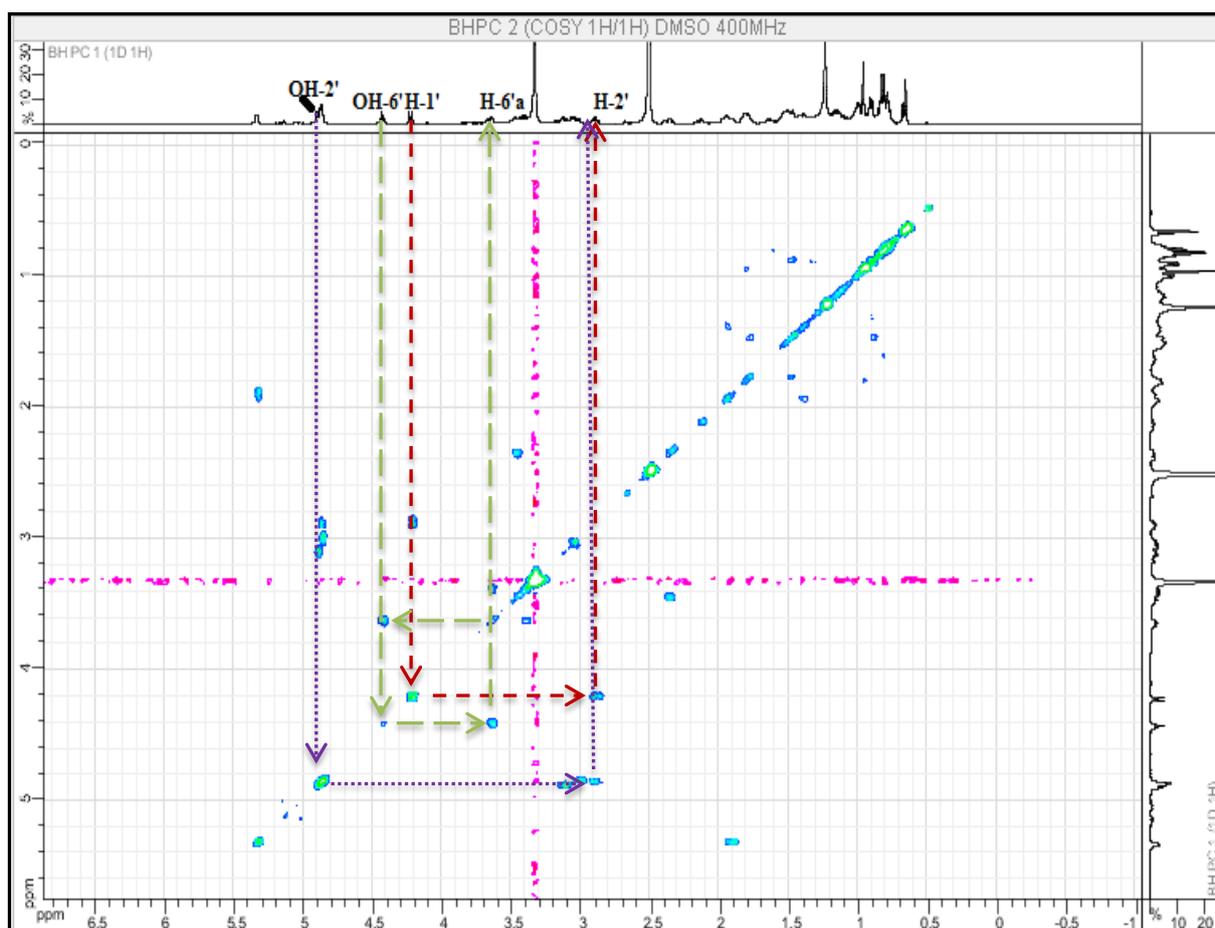


Figure V-46. Spectre COSY des composés C_1 et C_2 en mélange (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

- Un ensemble de signaux se chevauchant partiellement d'intégration 3H et situés dans l'intervalle [3,00-3,20] ppm que nous pouvons attribuer aux protons H-3', H-5' et H-4'. Ces attributions sont confortées par l'examen du spectre HSQC (Figure V-45') qui montre des corrélations entre ces protons et les carbones résonant à $\delta_C = 77,28$, $77,25$ et $70,63$ ppm, attribuables aux carbones C-3', C-5' et C-4', respectivement. Le spectre relatif à l'expérience COSY (Figure V-46') permet alors de localiser les signaux des hydroxyles OH-3' et OH-4' à $\delta_H = 4,90$ ppm (d, $J = 4,4$ Hz) et $\delta_H = 4,86$ ppm (chevauchant le signal du OH-2').

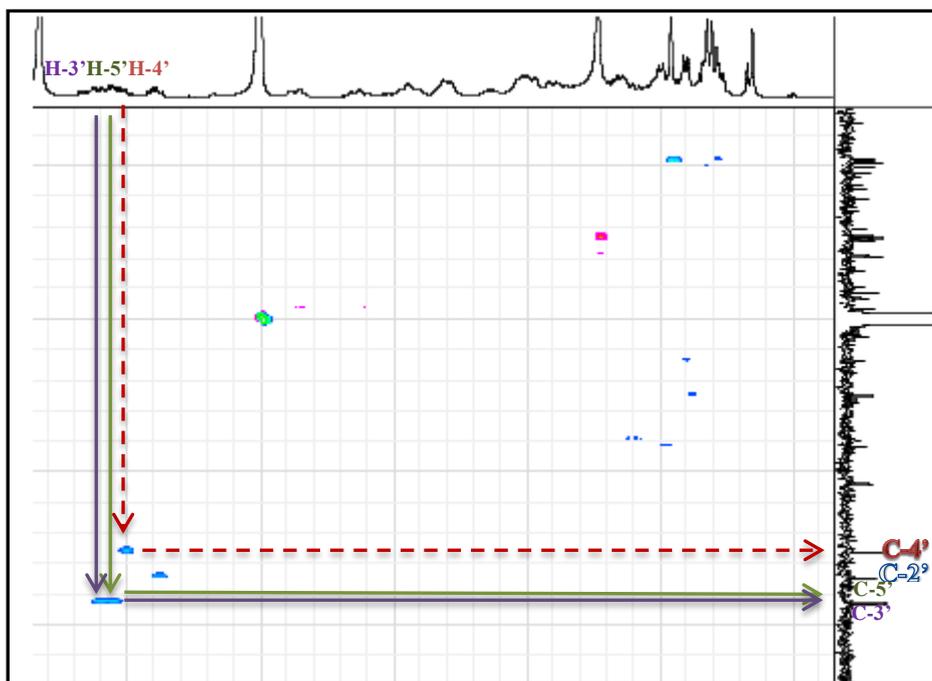


Figure V-45'. Etallement du spectre HSQC des composés C_1 et C_2 en mélange (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Un récapitulatif de l'ensemble des données des spectres de RMN de cet hexose et notamment les valeurs des déplacements chimiques des carbones indiquent qu'il s'agit d'un groupement glucopyranosyle (Agrawal, 1992).

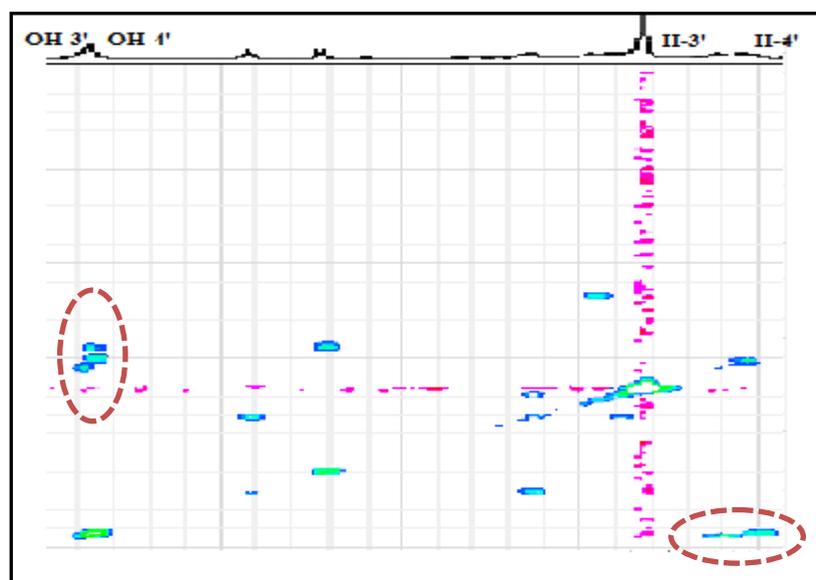


Figure V-46'. Etallement du spectre COSY des composés C_1 et C_2 en mélange (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

En faisant abstraction des signaux de l'entité sucre, on peut aisément attribuer le multiplet à $\delta_H = 3,45$ ppm et le doublet large à $\delta_H = 5,33$ ppm ($J = 5,2$ Hz) aux protons H-3 et H-6, respectivement des deux stérols. Les résonances des carbones porteurs de ces deux protons sont relevées à $\delta_C = 77,42$ ppm (C-3) et à $\delta_C = 121,70$ ppm (C-6). On peut également attribuer les deux doublets de doublets à $\delta_H = 5,16$ ppm ($J = 15,6 ; 8,8$ Hz) et à $\delta_H = 5,03$ ppm ($J = 15,6 ; 8,4$ Hz) aux protons H-22 et H-23, respectivement de la chaîne en C-17 du stigmastérol (Figure V-44').

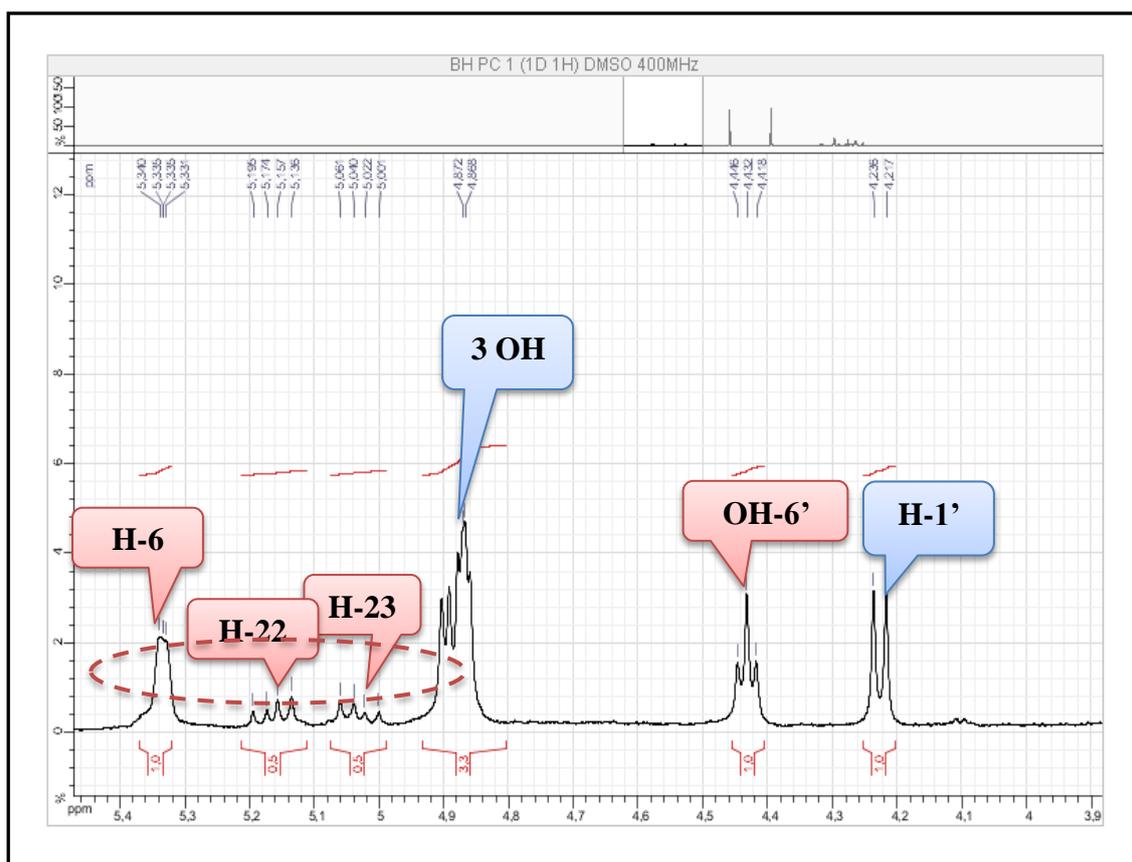


Figure V-44'. Etallement du spectre RMN-¹H des composés **C₁** et **C₂** en mélange (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

D'autres données relevées les spectres de RMN et concernant ce mélange stigmastérol- β -sitostérol sont reportées dans le tableau V-10.

Pour positionner le groupement glucopyranosyle sur le ou les deux stérols, nous avons examiné le spectre HMBC (Figure V-47), lequel montre une corrélation nette entre H-1' et le

C-3. Cette position pour porter ce groupement est d'ailleurs toute indiquée vu qu'aussi bien le stigmastérol que le β -sitostérol ne renferment que ce carbone oxygéné.

Le pourcentage de chaque composé dans ce mélange a été évalué en comparant l'intégrale du signal des H-6 des deux stérols (qui sont superposés à $\delta_H = 5,33$ ppm), l'intégrale du signal de H-22, proton appartenant au stigmastérol seulement (Figure V-44') et l'intégrale du signal du proton anomérique. Ces intégrales sont de 1,0 ; 0,5 et 1,0 respectivement. Ces valeurs indiquent d'une part, que les deux stérols en mélange sont tous les deux glucosylés et d'autre part, que le stigmastérol 3-O- β -glucopyranosyle et le daucostérol (β -sitostérol 3-O- β -glucopyranosyle) sont en quantité équimoléculaire dans ce mélange. Les structures de ces composés sont représentées dans les figures V-49 et V-50. (Khatun *et al.*, 2012).

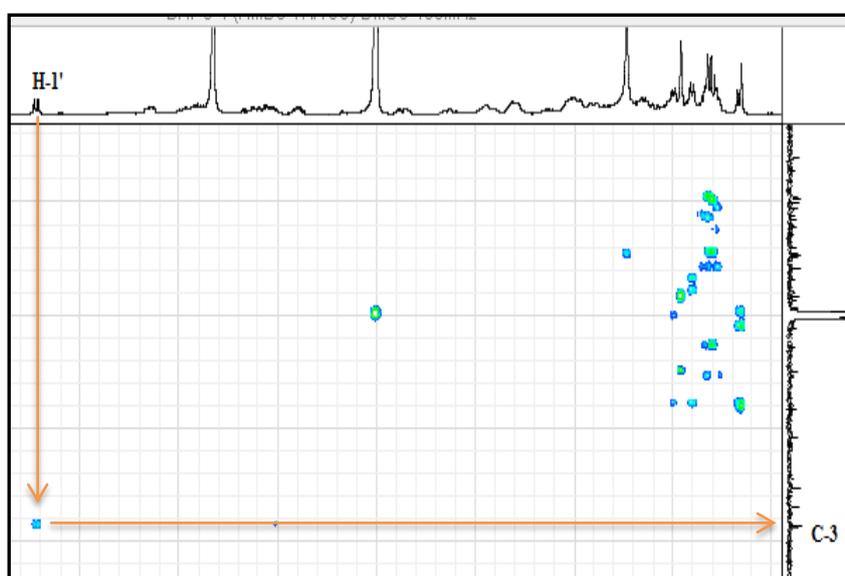


Figure V-47. Spectre HMBC des composés C_1 et C_2 en mélange (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les figures V-48 et V-48' reportent les attributions des atomes de carbones du glucose

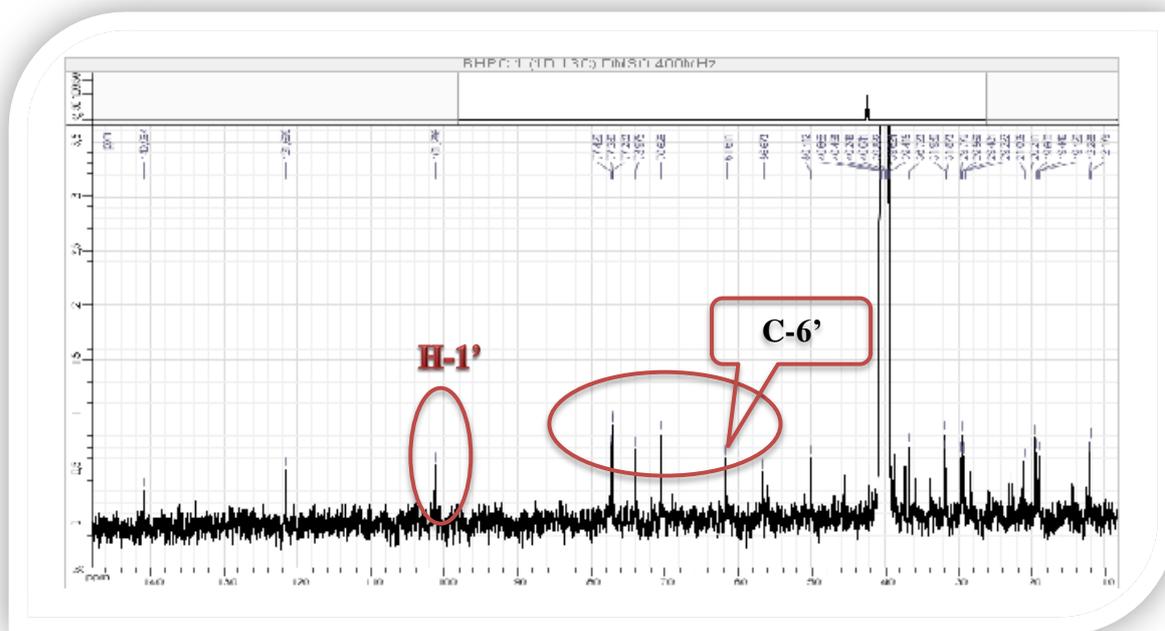


Figure V-48. Spectre RMN- ^{13}C des composés C_1 et C_2 en mélange (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

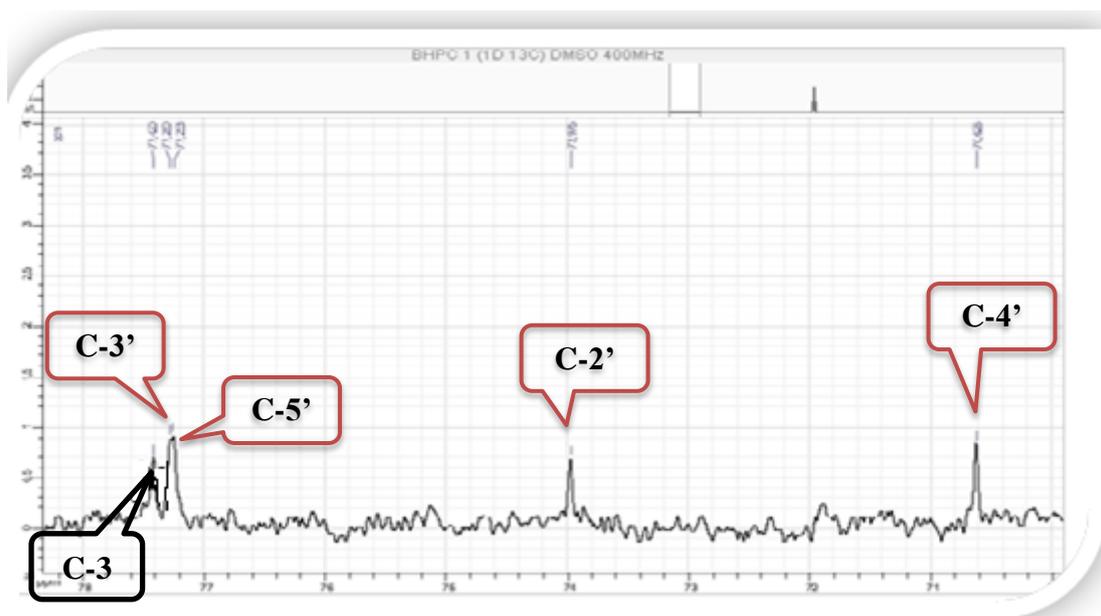


Figure V-48'. Etallement du spectre RMN- ^{13}C des composés C_1 et C_2 en mélange (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

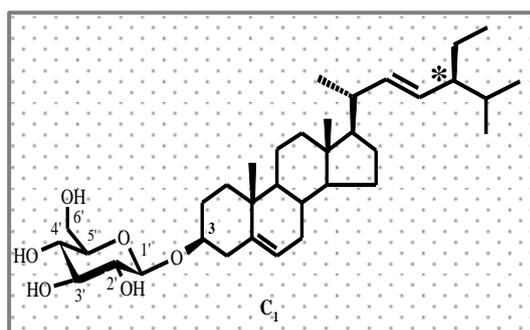


Figure V-49. Stigmastérol3-O-β-glucopyranosyle

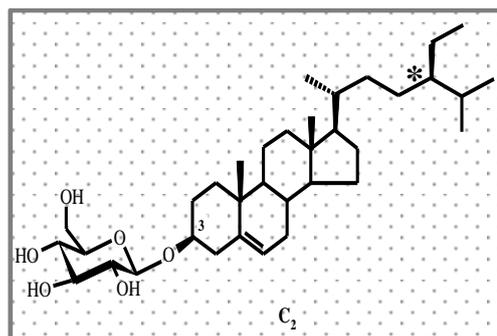


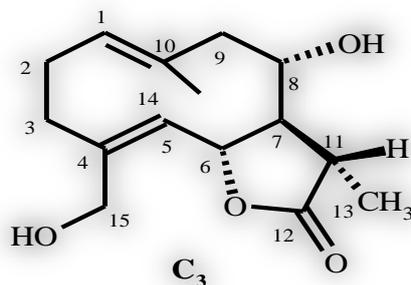
Figure V-50. Daucosterol

Tableau V-10. Les données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C des composés C₁ et C₂ en mélange

Numération	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)
Stérols		
3	4,45 (m)	77,42
6	5,33 (d, 5,2 Hz)	121,70
18	0,68 (s)	12,28
19	0,98 (s)	12,17
21	0,92 (d, 6,4)	20,21
22	5,03 (15,6 Hz, 8,4Hz)	ND
23	5,16 (15,6 Hz, 8,4 Hz)	ND
Glucose		
1'	4,24 (d, 7,6)	101,28
2'	2,90 (m)	73,97
3'	3,20 (m)	77,28
4'	3,00 (m)	70,63
5'	3,10 (m)	77,25
6'	3,69, 3,40 (m, m)	61,61

ND : non déterminée.

V.4.3. Identification du composé C₃



L'analyse des spectres RMN-¹H (Figure V-51) et HSQC (Figure V-52) de ce composé permet de relever la présence dans ce composé, des groupements suivants :

- Deux CH₃ résonant à $\delta_H = 1,79$ ppm (d, $J = 6,5$ Hz) et $\delta_H = 1,86$ ppm (sl), ces deux méthyles corrélient sur le spectre HSQC aux carbones résonant à $\delta_C = 18,8$ et $16,8$ ppm respectivement.
- Quatre groupements CH₂ tous aliphatiques dont un oxygéné.
- Six groupements CH dont deux aliphatiques oxygénés, deux aliphatiques non oxygénés et deux éthyléniques.

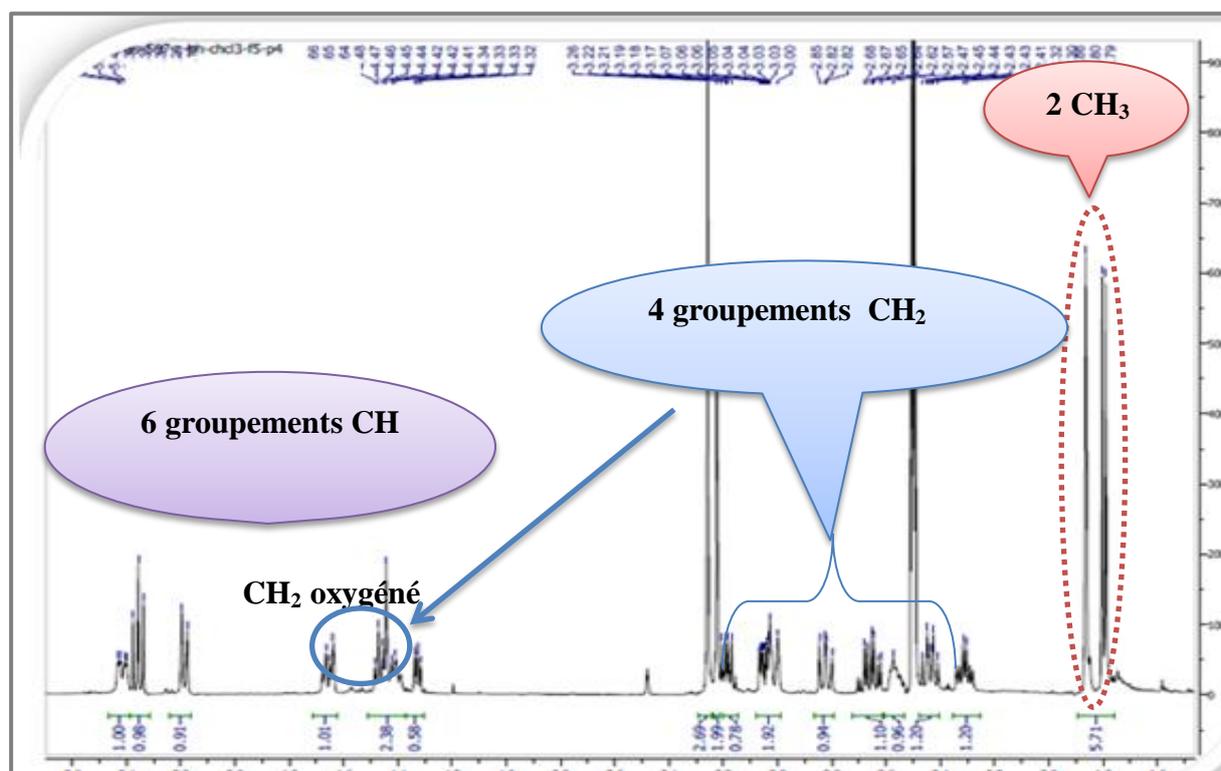


Figure V-51. Spectre RMN-¹H du composé C₃ (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ ppm)

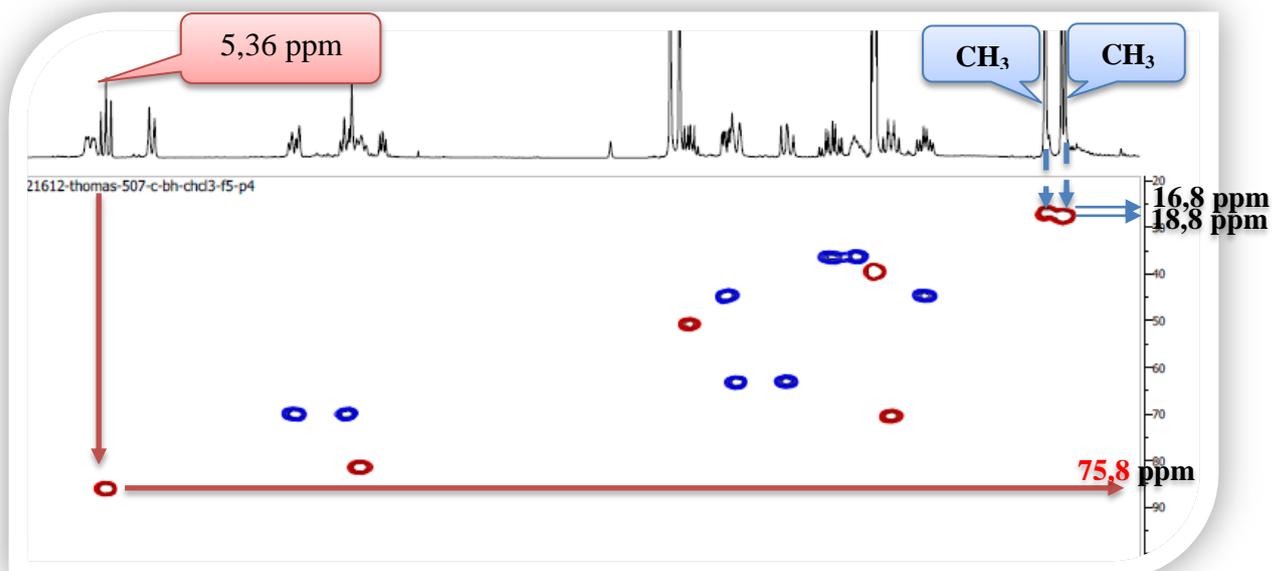


Figure V-52. Spectre HSQC* du composé C_3 (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ ppm)

*Ce spectre montre un décalage dans la dimension F1 (^{13}C), ainsi nous avons procédé à une calibration dans le calcul des déplacements chimiques des atomes de carbone de notre molécule. Sachant que le déplacement chimique du carbone du groupement CD_3 de l'acétone- d_6 utilisée comme solvant est de 29,8 ppm, le décalage trouvé est d'environ 10,2 ppm.

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Figure V-53), les protons des 2 CH éthyléniques ne montrent aucune corrélation entre eux, ce qui permet de déduire qu'ils appartiennent à deux doubles liaisons et que ces deux doubles liaisons sont délimitées par des carbones quaternaires en plus de ces deux CH éthyléniques. Nous pouvons donc déduire la présence de deux carbones quaternaires éthyléniques dans cette molécule.

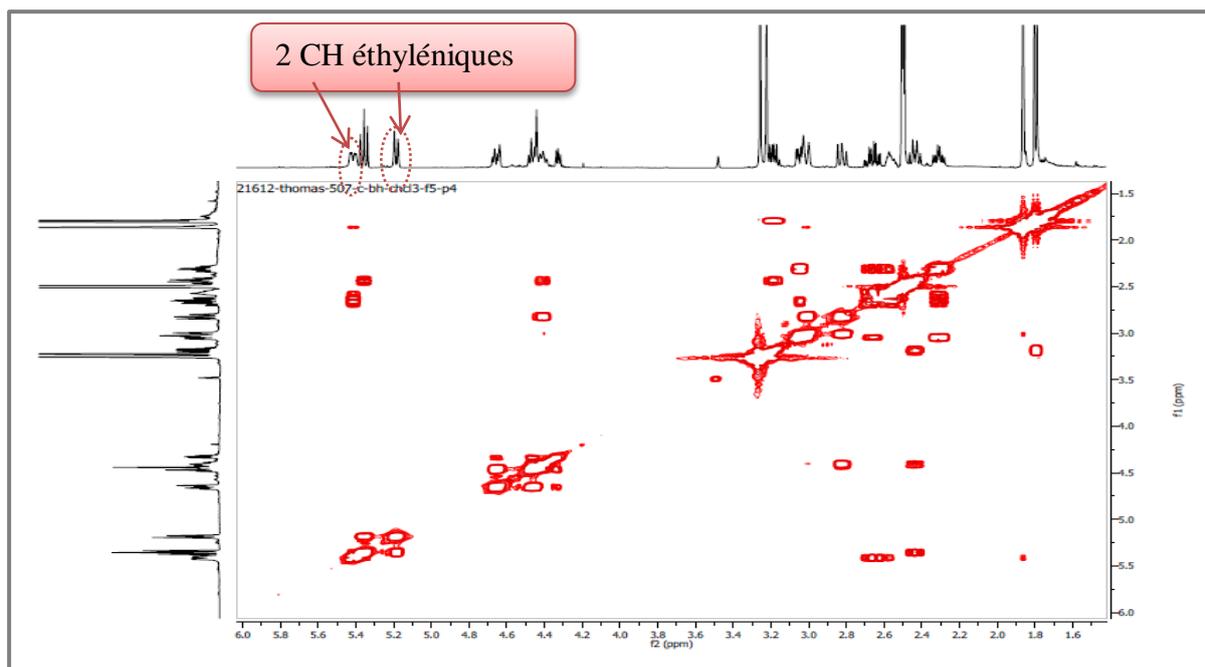


Figure V-53. Spectre COSY du composé C_3 (400 MHz, $(CD_3)_2CO$, δ ppm)

Parmi les groupements méthynes, celui dont le proton résonne à $\delta_H = 5,36$ ppm (t, $J = 8,0$ Hz) et montrant une corrélation sur le spectre HSQC (Figure V-52) avec le carbone résonant à $\delta_C = 75,8$ ppm est caractéristique d'un CH de fermeture d'une γ -lactone. Cette hypothèse est consolidée par la famille et le genre de l'espèce étudiée. En effet, le genre *Centaurea* est connu pour être un excellent accumulateur de lactones sesquiterpéniques (Bentamene *et al.*, 2005). Sachant que les acides sesquiterpéniques se ferment en C-6 ou en C-8 pour donner les lactones sesquiterpéniques correspondantes, on en déduit alors que ce carbone et son proton sont attribuables soit à C-6 et H-6 soit à C-8 et H-8.

A ce stade de notre analyse, et tenant compte de la présence de la fonction γ -lactone, nous pouvons déduire une formule brute partielle $C_{15}H_{20}O_4$. Comme nous n'avons que 15 atomes de carbone dans cette molécule, il est donc clair que ces carbones font partie du squelette sesquiterpénique. Ainsi, le groupement CH_2 oxygéné signalé plus haut ne peut être qu'hydroxylé, il en est de même pour le CH oxygéné restant. Cette observation en faveur de la présence de deux hydroxyles dans cette molécule, permet donc d'arriver à la formule brute $C_{15}H_{22}O_4$ pour ce composé. Cette formule brute indique alors la présence de 5 degrés d'insaturations dans cette molécule; à ce stade, nous avons utilisé quatre d'entre eux (2 doubles liaisons éthyléniques, la double liaison du carbonyle et le cycle de la γ -lactone). Nous pouvons alors déduire que cette lactone sesquiterpénique admet un squelette monocyclique,

comportant deux doubles liaisons. Ces deux doubles liaisons sont obligatoirement endocycliques vu l'absence d'autres substituants que les deux hydroxyles que nous avons déjà localisés sur un méthine et un méthylène aliphatiques. Ces conditions excluent alors parmi les lactones sesquiterpéniques les plus métabolisées par les Centaurées : les guaianolides et les eudesmanolides et les élémanolides et orientent vers une lactone sesquiterpénique de type germacranolide. Pour essayer de trancher en matière de type de squelette sesquiterpénique et de point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique (en C-6 ou en C-8), nous avons examiné le spectre relatif à l'expérience COSY (Figure V-53'), ce spectre montre en effet, des taches de corrélation nettes entre le proton de fermeture de la lactone et le proton de l'hydroxyméthine avec le même proton dont le signal est situé à $\delta_H = 2,45$ ppm (q, $J = 8,0$ Hz ; $\delta_C = 60,8$ ppm). De cette observation on conclut que, quel que soit le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique, ce dernier proton est attribuable au H-7, ceci d'une part ; d'autre part on peut affirmer que cette lactone est soit fermée en C-6 et hydroxylée en C-8 ou fermée en C-8 et hydroxylée en C-6. Pour trancher définitivement, nous sommes revenus au signal du proton de fermeture de cette lactone où l'on relève un triplet avec une constante de couplage de 8,0 Hz ; sur le spectre COSY (Figure V-53'), ce proton montre une tache de corrélation avec le proton éthylénique résonant à $\delta_H = 5,20$ ppm (d, $J = 8,0$ Hz ; $\delta_C = 130,8$ ppm) orientant vers la présence d'une double liaison en α de ce CH. Cette situation n'est possible que pour le CH-6 d'un germacranolide ce qui confirme donc l'idée d'un squelette de type germacranolide par la présence de cette double liaison entre C-4 et C-5. De ce fait, cette molécule est donc un germacranolide lactonisé en C-6. Ainsi, le CH éthylénique est attribué à la position C-5 (H-5 et C-5) et l'hydroxyméthine résonant à $\delta_H = 4,42$ ppm (m ; $\delta_C = 73,3$ ppm) est attribué à la position C-8.

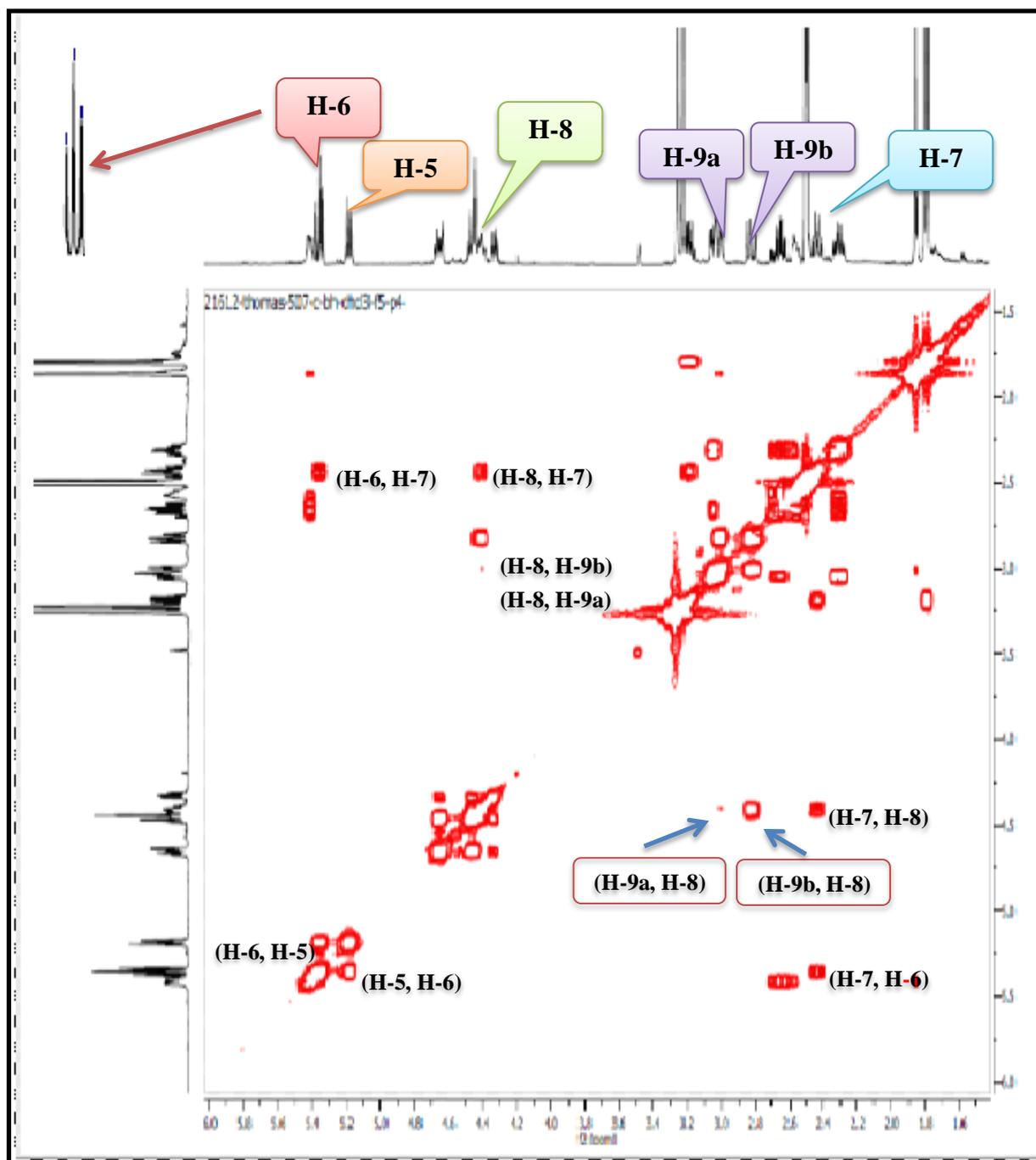


Figure V-53'. Attributions des protons (H-6, H-5, H-7, H-8, H-9a et H-9b) sur le spectre COSY du composé C_3 (400 MHz, $(CD_3)_2CO$, δ ppm)

Par ailleurs et toujours grâce au spectre COSY (Figure V-53''), l'attribution de H-7 mène à celle de H-11 du cycle γ -lactonique à $\delta_H = 3,18$ ppm (m ; $\delta_C = 42,3$ ppm). Ce proton (H-11) corrèle avec les protons du CH_3 résonant à $\delta_H = 1,79$ (d, $J = 6,5$ Hz ; $\delta_C = 18,8$) ppm, permettant alors l'attribution de ce méthyle au carbone et protons de la position 13.

De même, l'attribution de H-8 permet grâce toujours à l'analyse du spectre COSY (Figure V-53') de localiser les signaux des protons H-9a (H-9 β) à $\delta_H = 3,0$ ppm (dl, $J = 12,0$ Hz ; $\delta_C = 54,8$ ppm) et H-9b (H-9 α) à $\delta_H = 2,83$ ppm (t, $J = 12,0$ Hz ; $\delta_C = 54,8$ ppm). Dans le même spectre COSY (Figure V-53'') on remarque une corrélation entre le groupement méthyle (CH₃) résonant sous forme d'un singulet large à $\delta_H = 1,86$ ppm et le proton H-9a, cela indique que ce méthyle est porté par le carbone voisin, en l'occurrence le C-10 qui, de plus doit être quaternaire et éthylénique vu la multiplicité du signal des protons de ce méthyle, la valeur de leur déplacement chimique et les résultats de notre analyse précédente. D'après la numérotation adoptée pour les squelettes sesquiterpéniques le carbone de ce groupement méthyle est numéroté C-14 et ses protons H₃-14. Toujours sur le même spectre, les protons H₃-14 corrélient avec le proton du groupement CH éthylénique résonant à $\delta_H = 5,42$ ppm attribuable de ce fait à H-1 (ddl, $J = 12,0 ; 4,0$ Hz ; $\delta_C = 126,3$ ppm). La présence de cette double liaison entre C-1 et C-10 en plus de celle entre C-4 et C-5 signalée précédemment conforte et confirme bien la nature germacranolide de cette lactone sesquiterpénique.

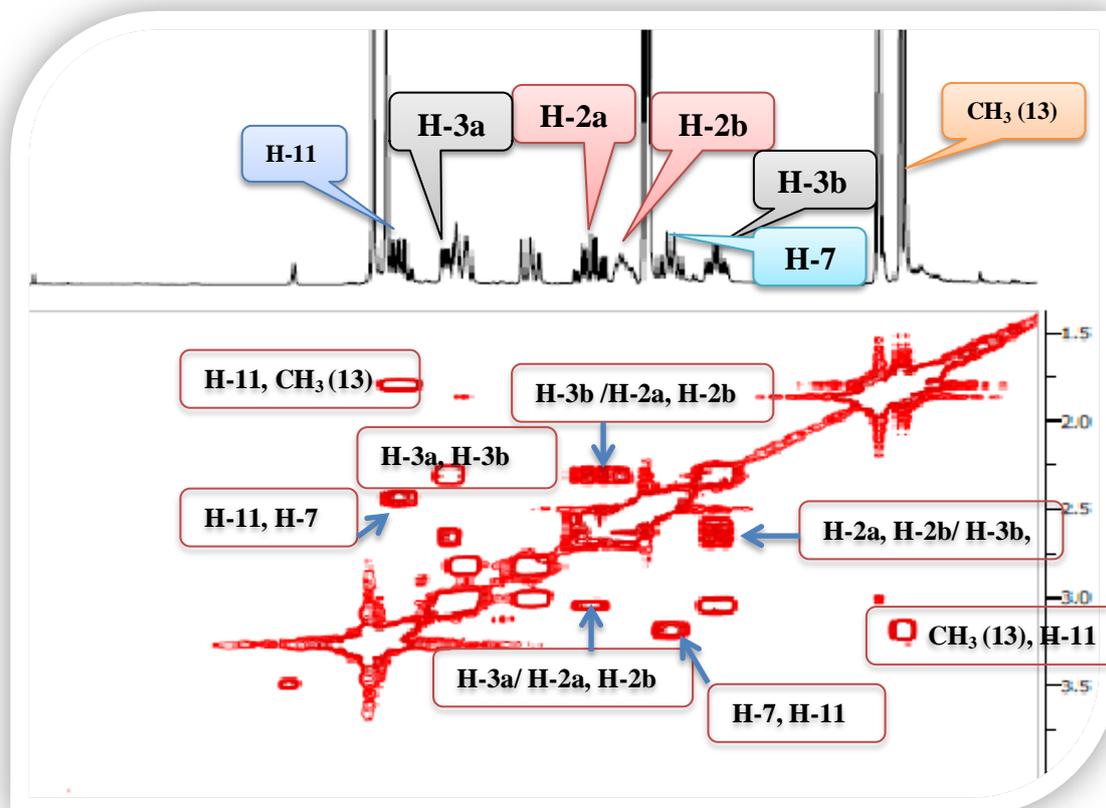


Figure V-53''. Etagement 1 du spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ ppm)

La localisation de H-1 permet d'attribuer les deux protons H-2a et H-2b aux signaux à $\delta_H = 2,68$ (tdd, $J = 12,0 ; 8,0 ; 4,0$ Hz ; $\delta_C = 26,8$ ppm) et à $\delta_H = 2,57$ ppm (m ; $\delta_C = 26,8$ ppm), respectivement, suite à leurs corrélations avec H-1 (Figure V-53'''). Toujours sur le spectre COSY (Figure V-53'') les deux protons H-2a et H-2b corrélient avec les protons du groupement méthylène résonant à $\delta_H = 3,04$ ppm (m ; $\delta_C = 34,8$ ppm) et $\delta_C = 34,8$ ppm) qui ne peuvent être que le proton H-3a et le proton H-3b respectivement.

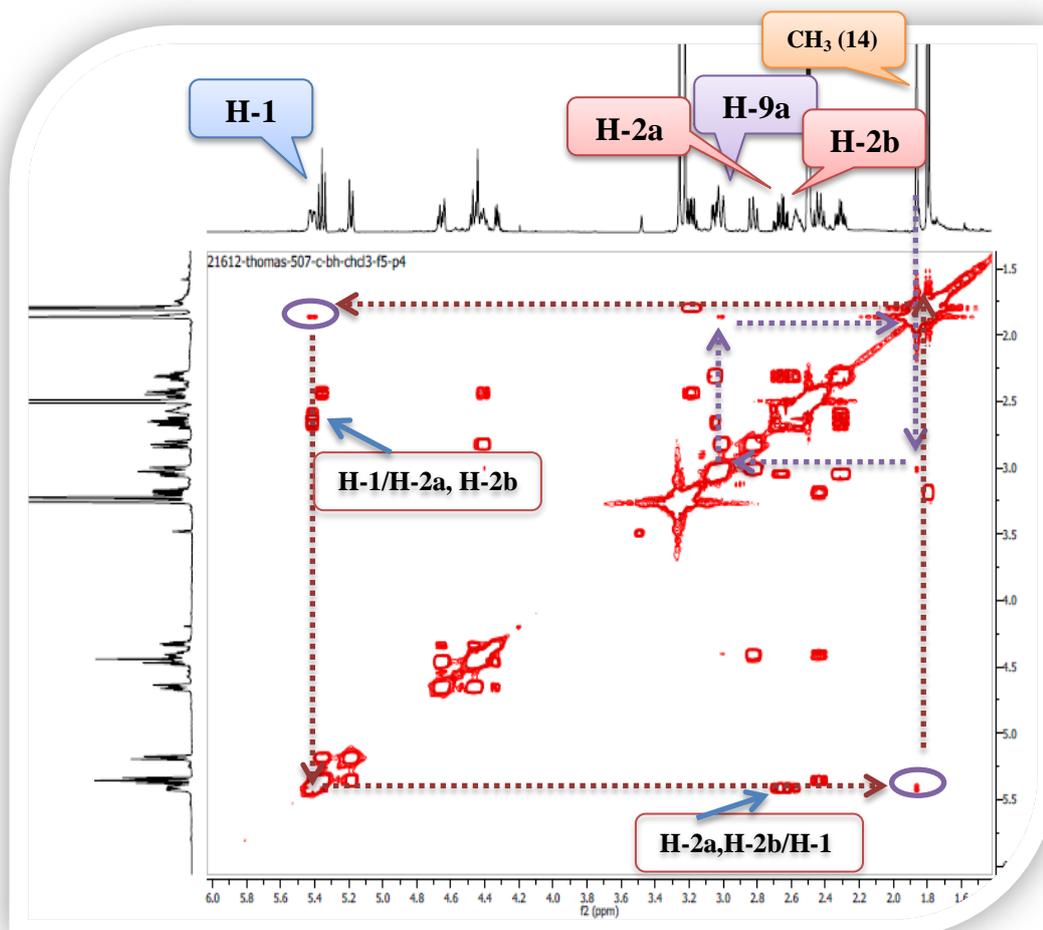


Figure V-53'''. Retour vers le spectre COSY du composé C_3 (400 MHz, $(CD_3)_2CO$, δ ppm)

La multiplicité du signal de H-3b et celle de celui de H-5 confirment que le carbone C-4 est bien quaternaire. Ceci est appuyé par le fait que le groupement hydroxyméthylène précédemment évoqué ne peut être placé qu'en C-4, il est donc attribué à la position C-15. On relève en effet, sur le spectre proton des signaux à $\delta_H = 4,70$ ppm (dd, $J = 12,0 ; 4,5$ Hz ; $\delta_C = 60,3$ ppm) et à $\delta_H = 4,56$ ppm (m ; $\delta_C = 60,3$ ppm) attribuables à H-15a et H-15b. La

multiplicité des signaux de ces derniers protons et plus précisément celle de H-15a (dd) laissent attendre un couplage vicinal de ces deux noyaux avec un autre proton. En effet, et toujours avec l'aide du spectre COSY (Figure V-53'''), on relève des corrélations nettes entre les protons H₂-15 et un proton résonnant sous forme d'un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 4,30$ ppm ($J = 4,5 ; 4,0$ Hz) et qui ne peut par conséquent, être attribué qu'au groupement 15-OH. Ceci est d'ailleurs clair sur le spectre HSQC (Figure V-53''') où l'on ne relève aucune corrélation entre ce dernier proton et les carbones de la molécule.

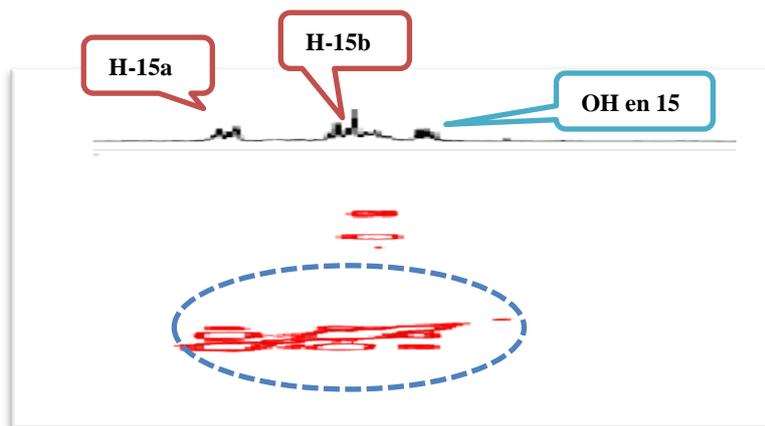


Figure V-53'''. Etallement 2 du spectre COSY du composé C₃ (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ_{ppm}).

La figure V-52' reporte les attributions des carbones à l'aide de l'expérience HSQC

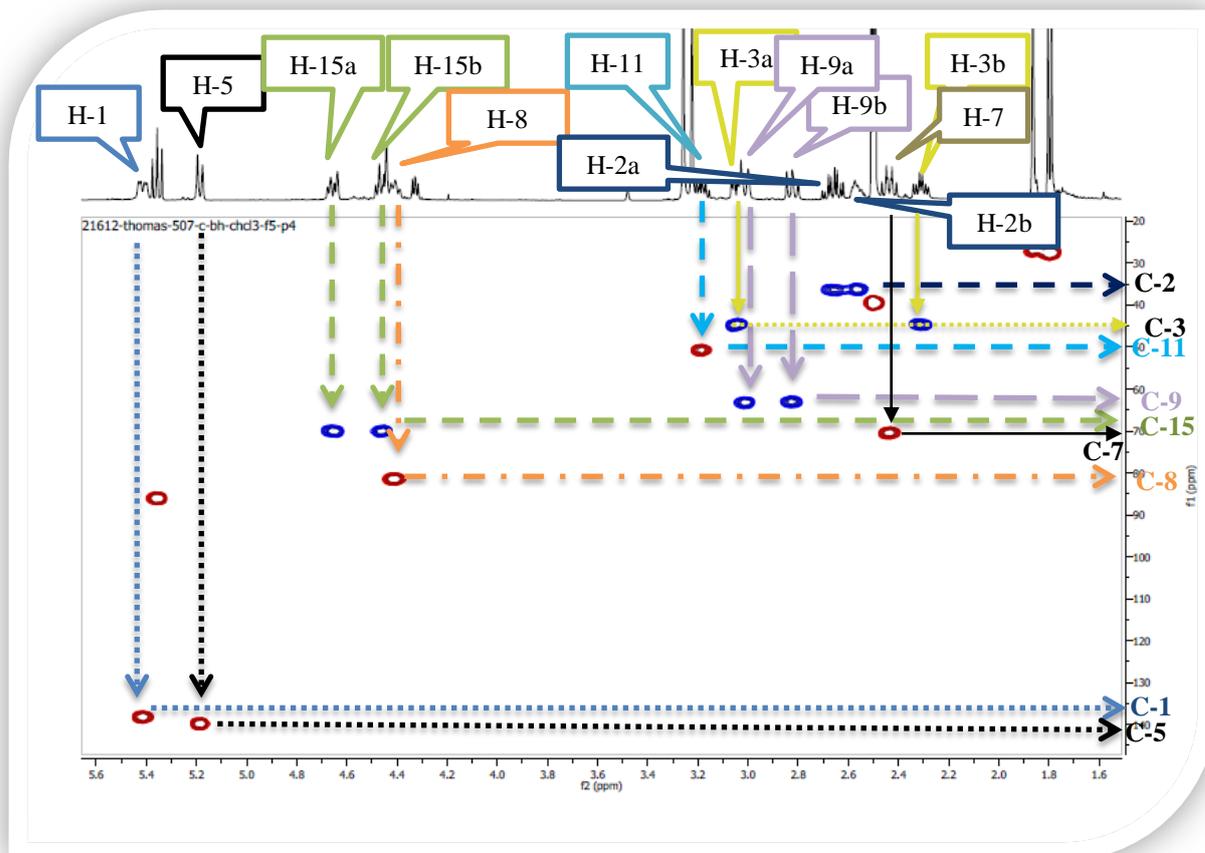


Figure V-52'. Attribution des carbones sur le spectre HSQC du composé C_3 (400 MHz, $(CD_3)_2CO$, δ ppm)

A l'issue de cette analyse, nous sommes donc en présence d'une lactone sesquiterpénique ayant un squelette de type germacranolide. Il reste à préciser les configurations des deux doubles liaisons du macrocycle pour trancher entre un mélampolide, un héliangolide, un *cis,cis*-germacranolide ou un *trans,trans*-germacranolide.

Pour établir la configuration de la double liaison entre C-4 et C-5, nous nous sommes basés sur la valeur du déplacement chimique de H-6 qui est de 5,36 ppm (t, $J = 8,0$ Hz). Cette valeur montrant un bon déblindage de ce proton indique que le groupement hydroxyméthylène en C-4 et ce proton H-6 sont en positions 1,3-diaxiales (Figure V-54), ce qui impose une configuration *trans* à cette double liaison (Olivier, 1980). Cette hypothèse est confortée par les valeurs des constantes de couplage relevées entre H-6/H-5 (8,0 Hz) et H-6/H-7 (8,0 Hz) qui indiquent des dispositions anti pour ces paires de protons permettant de déduire des orientations β (axiale) pour H-6 et α (axiales) pour H-5 et H-7.

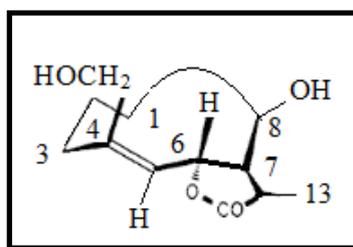


Figure V-54. Configuration de la double liaison C(4)-C(5) du composé C_3

En ce qui concerne la configuration de la double liaison entre C-1 et C-10, elle est déduite *trans*, vu la valeur inférieure à 20 ppm du déplacement chimique du carbone du CH_3 -14 (Figure V-55) (Buděšínský et Šaman, 1995).

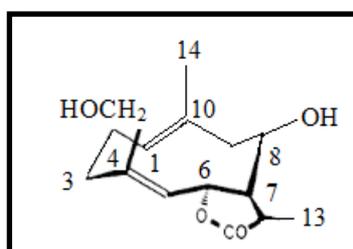


Figure V-55. Configurations des doubles liaisons C(4)-C(5) et C(1)-C(10) du composé C_3

A ce stade de notre discussion, le composé C_3 est donc un *trans,trans*-germacranolide dit également germacranolide.

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la figure V-56

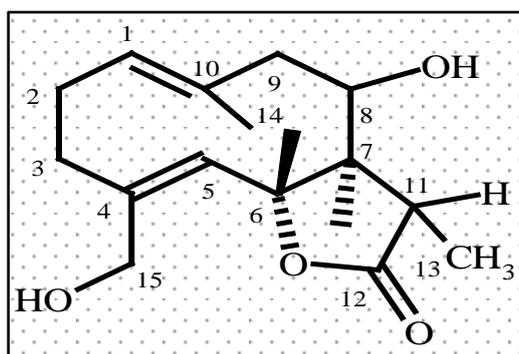


Figure V-56. Structure plane du composé C_3

En matière de stéréochimie des centres chiraux restants notamment C-8 et C-11, l'orientation β de H-8 est déduite de ses constantes de couplage avec H-9 α et H-7 où l'on relève une valeur de 8,0 Hz chacune, signifiant des interactions *trans* diaxiales entre H-8/H-9 α et H-8/H-7. On relève également une constante de couplage de 8,0 Hz entre H-7 et H-11, cette valeur signifiant une disposition anti de ces deux noyaux indique donc une orientation β de H-11.

Toutes ces données convergent vers la structure reportée dans la figure V-57. Il s'agit du 11 β , 13-dihydrosaloniténolide Comme produit naturel, il a été isolé pour la première fois de *C. calcitrapa* (Marco et al., 1992), par la suite il a été isolé des espèces suivantes du genre *Centaurea*: *C. achaia* (Skaltsa et al., 2000), *C. maroccana* (Barrero et al., 2000).

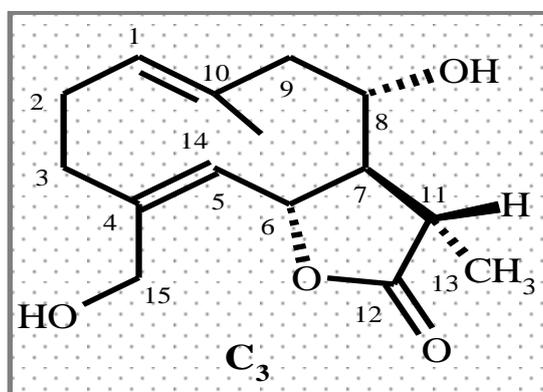


Figure V-57. Structure du composé C₃, 11 β , 13-dihydrosaloniténolide

Les données relatives à l'analyse de différentes séquences de RMN sont reportées dans le tableau V-11.

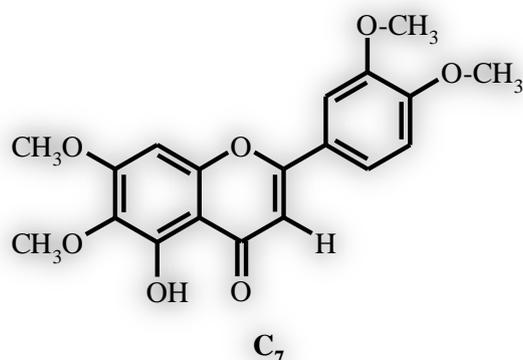
Tableau V-11. Les données relatives aux différentes expériences RMN du composé C₃

Numération	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	5,42 (ddl, $J = 12,0 ; 4,0$ Hz)	126,3
2a	2,68 (tdd, $J = 12,0 ; 8,0 ; 4,0$ Hz)	26,8
2b	2,57 (m)	26,8
3a	3,04 (m)	34,8
3b	2,30 (ddd, $J = 12,0 ; 8,0 ; 4,0$ Hz)	34,8
5	5,20 (d, $J = 8,0$ Hz)	130,8
6	5,36 (t, $J = 8,0$ Hz)	75,8
7	2,45 (q, $J = 8,0$ Hz)	60,8
8	4,42 (m)	73,3
9a (9 β)	3,0 (dl, $J = 12,0$ Hz)	54,8
9b (9 α)	2,83 (dd, $J = 12,0 ; 8,0$ Hz)	54,8
11	3,18 (m)	42,3

Tableau V-11. Les données relatives aux différentes expériences RMN du composé **C₃**
(suite)

13	1,79 (d, $J = 6,5$ Hz)	18,8
14	1,86 (sl)	16,8
15a	4,70 (dd, $J = 12,0 ; 4,5$ Hz)	61,8
15b	4,56 (m)	61,8
15-OH	4,30 (dd, $J = 4,5 ; 4,0$ Hz)	-

V.4.4. Identification du composé **C₇**



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, sa fluorescence mauve foncé sous la lumière UV ($\lambda = 365$ nm) oriente vers un squelette flavonoïde de type flavone ou flavonol-3-OR.

L'examen du spectre RMN-¹H (Figure V-58) de ce composé **C₇** enregistré dans le (CDCl₃, 400 MHz) indique la présence de :

- Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,53$ ppm, ($J = 8,5 ; 1,5$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,35$ ppm, ($J = 1,5$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ ppm, ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5'.

Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,60$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,56$ ppm, attribuables aux protons H-8 et H-3 ou H-3 et H-6. Sur le spectre HSQC (Figure V-59), le proton résonant à $\delta_{\text{H}} = 6,56$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 90,70$ ppm ; la valeur du déplacement chimique de ce carbone

est caractéristique du C-8 d'une flavone. Donc le proton résonant à $\delta_H = 6,56$ ppm sera attribué au H-8 et le proton à $\delta_H = 6,60$ ppm sera attribué au H-3. Cette donnée est en parfait accord avec la valeur du déplacement chimique de C-3 que l'on relève à $\delta_C = 104,50$ ppm sur le spectre HSQC. A ce stade, nous pouvons attendre une flavone substituée entre autre en C-6.

- Quatre singulets, correspondant à des groupements méthoxyles (OCH_3) à $\delta_H = 3,93$; $3,97$; $3,98$ et $3,99$ ppm.
- Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 12,75$ ppm caractéristique du proton d'un groupement OH en C-5 d'un flavonoïde.

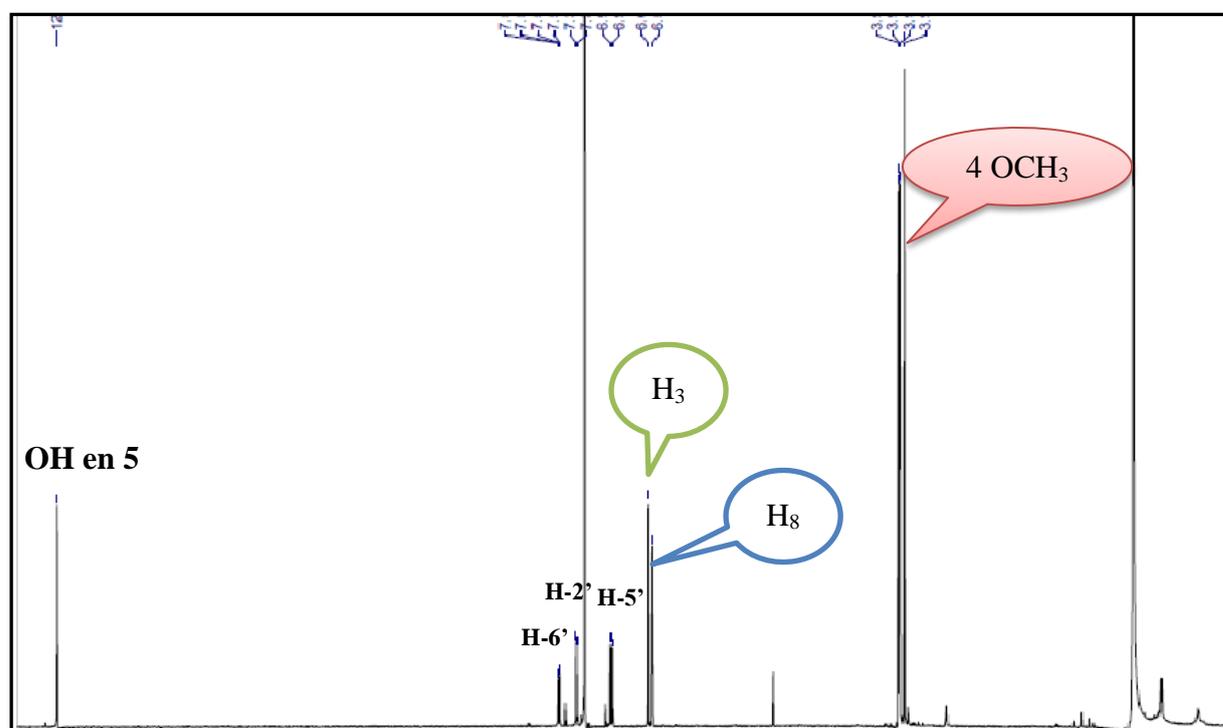


Figure V-58. Spectre RMN- ^1H du composé C_7 (400 MHz, CD_3Cl , δ_{ppm})

Le spectre HSQC de ce composé C_7 (Figure V-59) reporte les données suivantes :

- ✓ Le proton H-2' ($\delta_H = 7,35$ ppm) permet la localisation de la résonance du C-2' à $\delta_C = 108,79$ ppm.
- ✓ Le proton H-5' ($\delta_H = 6,98$ ppm) permet la localisation du signal du C-5' à $\delta_C = 111,23$ ppm.
- ✓ Une corrélation entre le H-6' et le carbone à $\delta_C = 120,18$ ppm attribuable donc à C-6'.

- ✓ Les protons du groupement méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,93$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 60,97$ ppm, les protons du méthoxyle à $\delta_H = 3,98$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 56,45$ ppm et les protons des méthoxyles résonant à $\delta_H = 3,97$ et $3,99$ ppm corrélient avec les carbones dont les résonances sont superposées à $\delta_C = 56,22$ ppm (Tableau V-12).

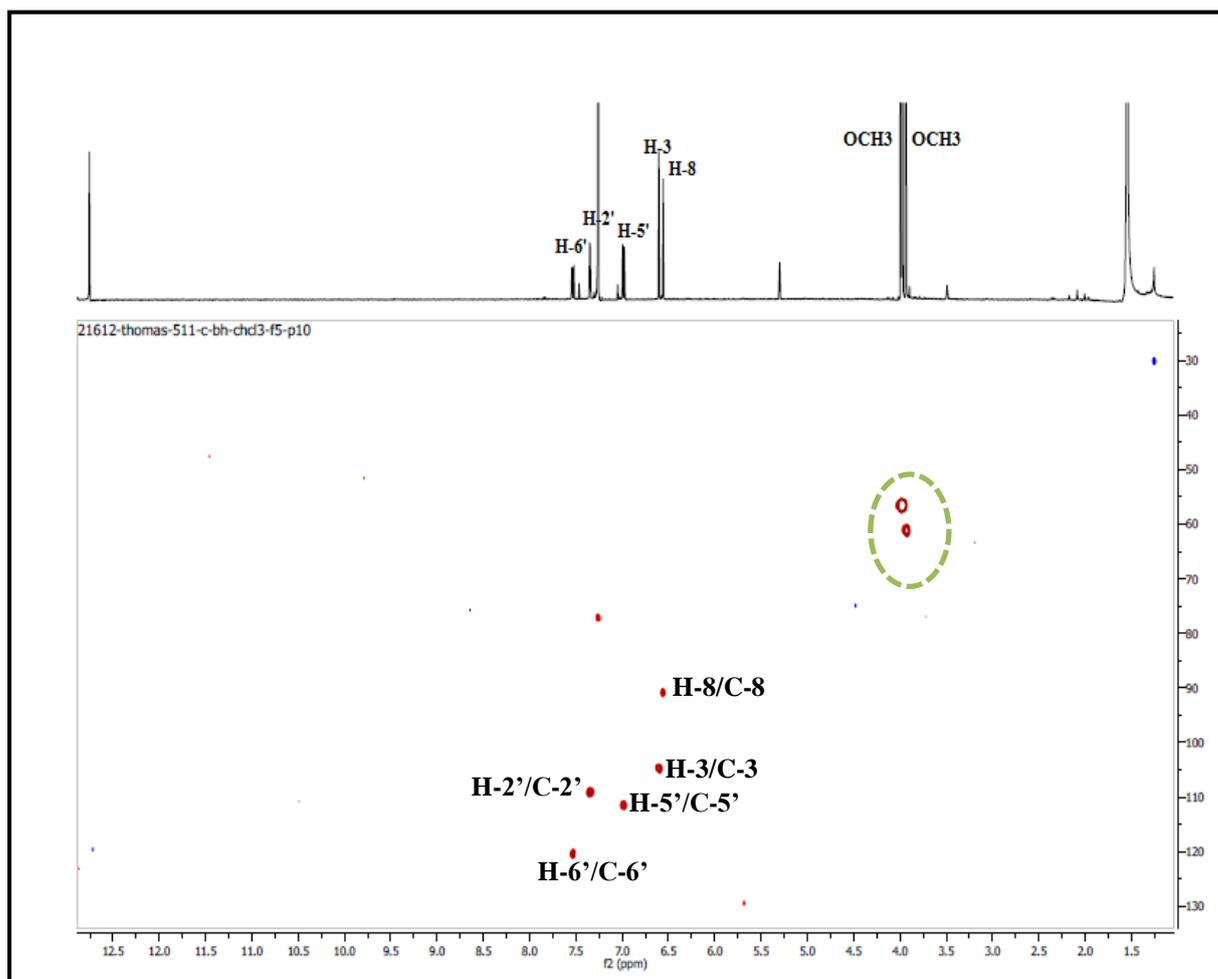


Figure V-59. Spectre HSQC du composé **C₇** (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

La figure V-60 représente le spectre RMN-¹³C du composé **C₇** enregistré dans le (CDCl₃, 62,9 MHz). Ce spectre montre la présence des 15 atomes de carbone caractéristiques du squelette flavonique et montre également 4 signaux dont deux superposés à δ_C 60,97 ; 56,45 et 56,22 ppm indiquant 4 groupements méthoxyles dans cette molécule. Confirmant ainsi les données énoncées précédemment avec le spectre RMN-¹H. L'attribution de tous les atomes de carbone aux noyaux respectifs a été réalisée en se basant sur l'expérience HSQC et les résultats de la littérature (Agrawal, 1989).

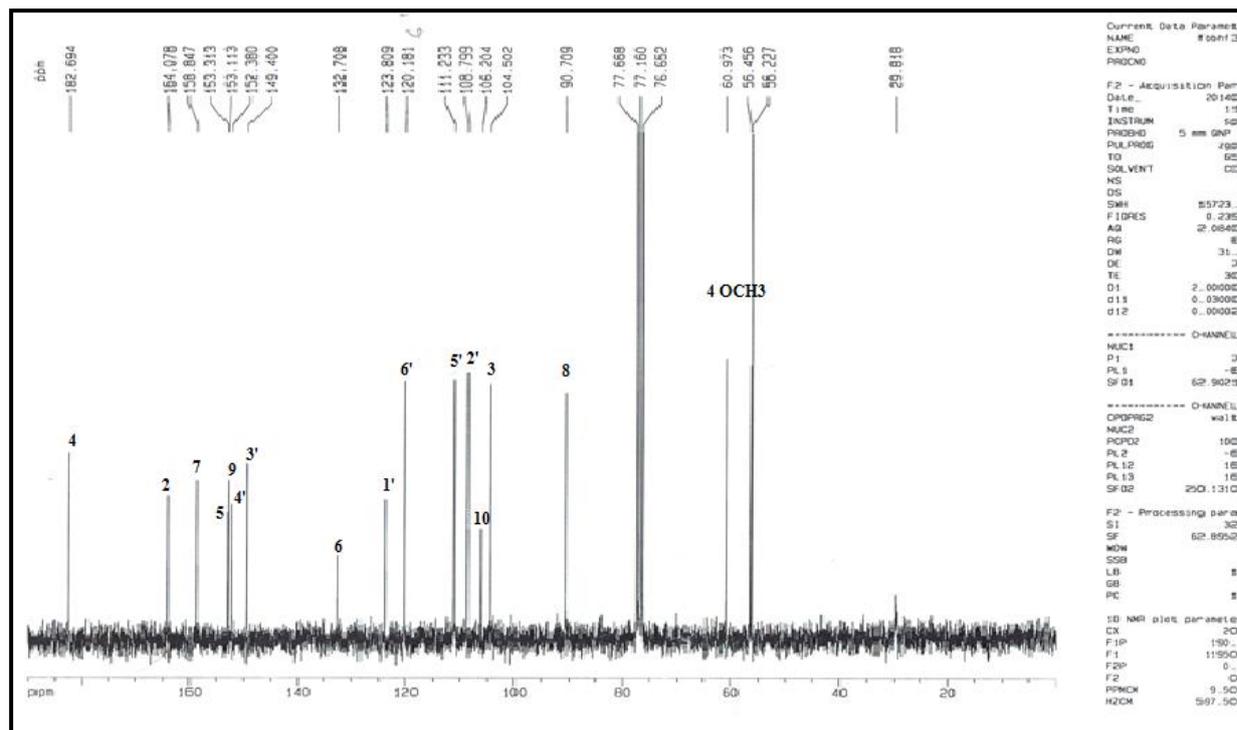


Figure V-60. Spectre RMN- ^{13}C du composé C_7 (62,9 MHz, CD_3Cl , δ ppm)

Les données précédentes mènent à la structure représentée sur la figure V-61. Il s'agit du 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone ou 6-hydroxyluteoline 6,7,3',4'-tetraméthyl ether (Tomas-Lorent *et al.*, 1989).

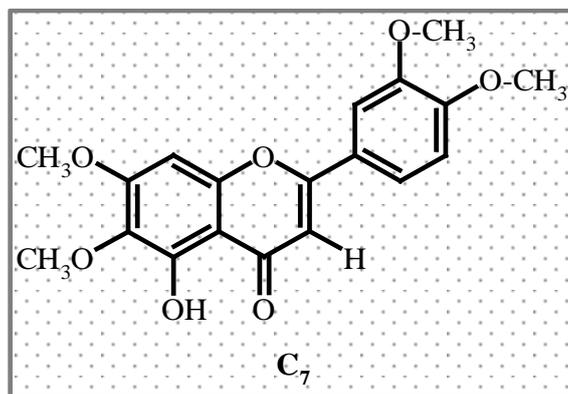


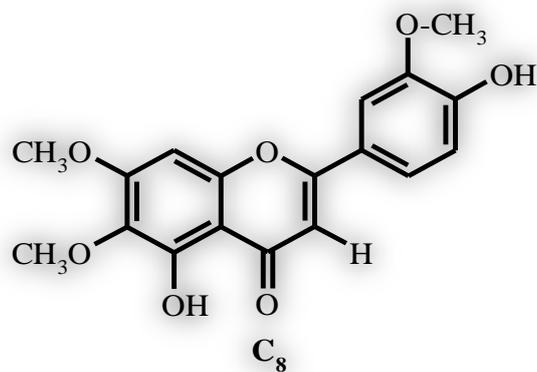
Figure V-61. Structure du composé C_7 . 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau V-12.

Tableau V-12. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé C_7 .

Numération	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	/	164,07
3	6,60 (s)	104,50
4	/	182,69
5	/	153,31
6	/	132,70
7	/	158,84
8	6,56 (s)	90,70
9	/	153,11
10	/	106,20
1'	/	123,80
2'	7,35 (d, $J = 1,5$ Hz)	108,79
3'	/	149,40
4'	/	152,38
5'	6,98 (d, $J = 8,5$ Hz)	111,23
6'	7,53 (dd, $J = 8,5 ; 1,5$ Hz)	120,18
OCH_3	3,93 (s)	60,97
OCH_3	3,97 (s)	56,22
OCH_3	3,98 (s)	56,45
OCH_3	3,99 (s)	56,22

V.4.5. Identification du composé C_8



L'élucidation structurale de ce composé a débuté par l'enregistrement du spectre UV-Visible (Figure V-62) qui montre la présence de deux bandes la première à $\lambda = 275$ nm attribuable à la bande II et une deuxième à $\lambda = 330$ nm attribuable à la bande I caractéristique d'une structure de type flavone.

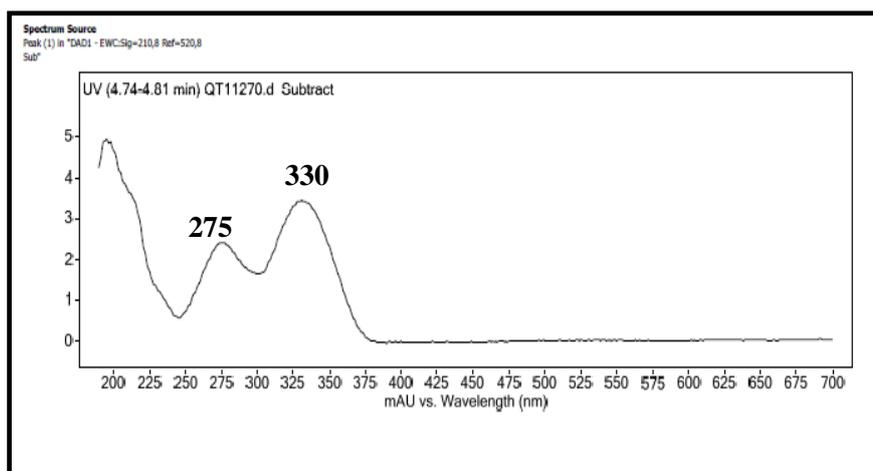


Figure V-62. Spectre d'absorption ultraviolette du composé C_8

Le spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Figure V-63) montre la présence de deux ions adduits à $m/z = 345,09741$; $711,16871$ correspondant à $[M+H]^+$ et $[2M+Na]^+$, respectivement. Ces données orientant vers la formule brute $C_{18}H_{16}O_7$ sont en accord avec l'évaluation de la masse exacte (Tableau V-13), $m/z = 344,09013$ (calculée pour $C_{18}H_{16}O_7$ $m/z = 344,08960$). Le composé C_8 doit donc contenir 11 degrés d'insaturations. Le spectre HR-ESIMS montre également un ion à $m/z = 315,08621$ correspondant à $[(M+H)-CH_2O]^+$. Cet ion indique la présence d'au moins un méthoxyle dans cette molécule.

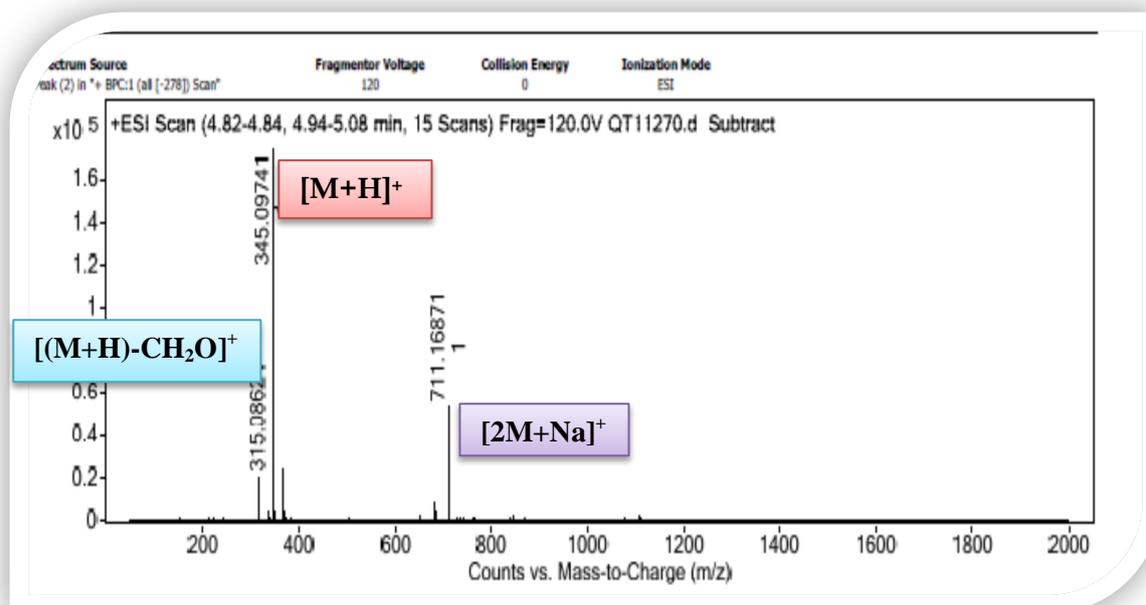


Figure V-63. Spectre HR-ESI-MS (+) du composé C_8

Tableau V-13. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C18 H16 O7		344.09013	344.0896	-1.54	345.09741	C18 H17 O7	98.40

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figures V-64 et V-64') et le spectre HSQC (Figures V-65 et V-65') de ce composé confirme la nature flavone de ce composé en montrant les signaux caractéristiques suivants:

- Un signal sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,62$ ppm ($J = 8,0 ; 2,4$ Hz) chevauché par un autre doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,60$ ppm ($J = 2,4$ Hz). Ces deux signaux sont attribuables à H-6' et H-2', respectivement. ces deux protons montrent des corrélations respectives avec les carbones résonant à $\delta_{\text{C}} = 121,00$ et $110,76$ ppm, permettant alors les attributions de C-6' et C-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,94$ ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-5', ce proton corrèle avec le carbone qui le porte, le C-5' résonant à $\delta_{\text{C}} = 116,31$ ppm.
- Deux singulets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ ppm et $\delta_{\text{H}} 6,97$ ppm. Sur le spectre HSQC, les protons relatifs à ces signaux montrent des corrélations avec les carbones résonant à $\delta_{\text{C}} = 103,45$ et $\delta_{\text{C}} = 92,13$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones sont caractéristiques des positions C-3 et C-8, respectivement d'une flavone. En conséquence les deux singulets à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ et $6,97$ ppm sont attribués à H-3 et H-8, respectivement.

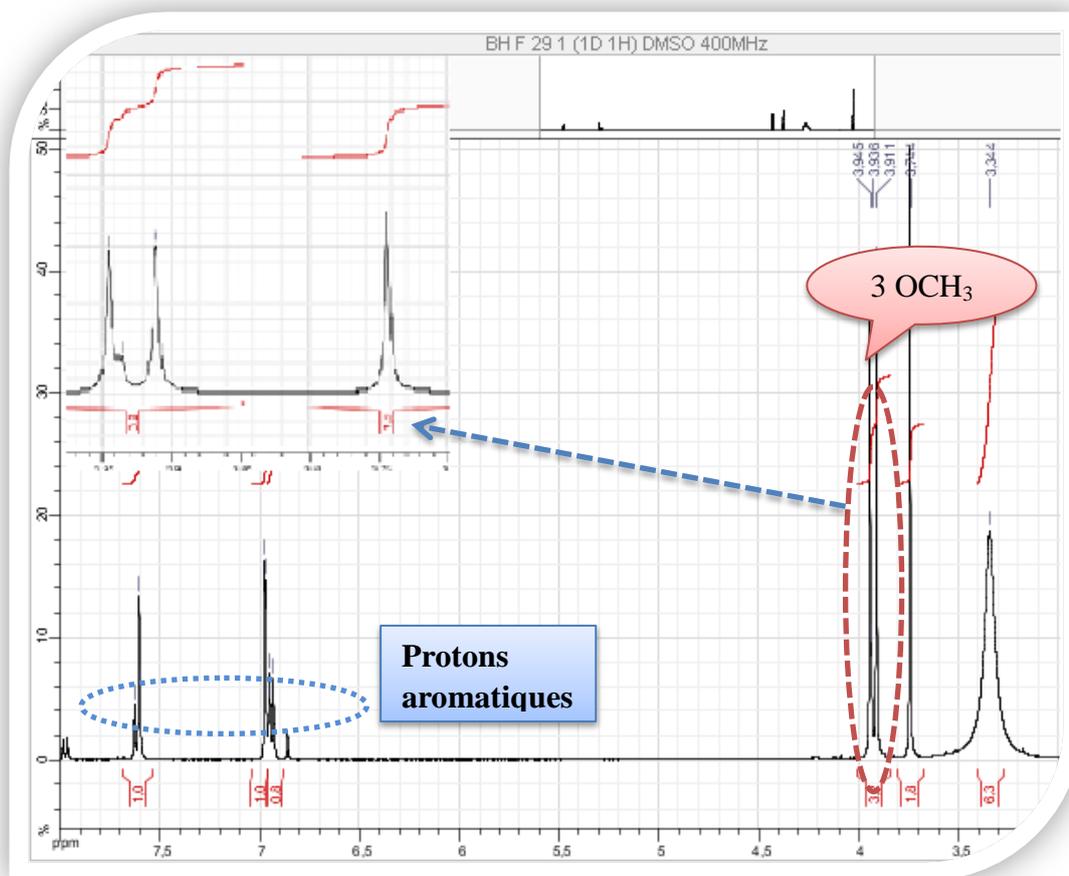


Figure V-64. Spectre RMN-¹H du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

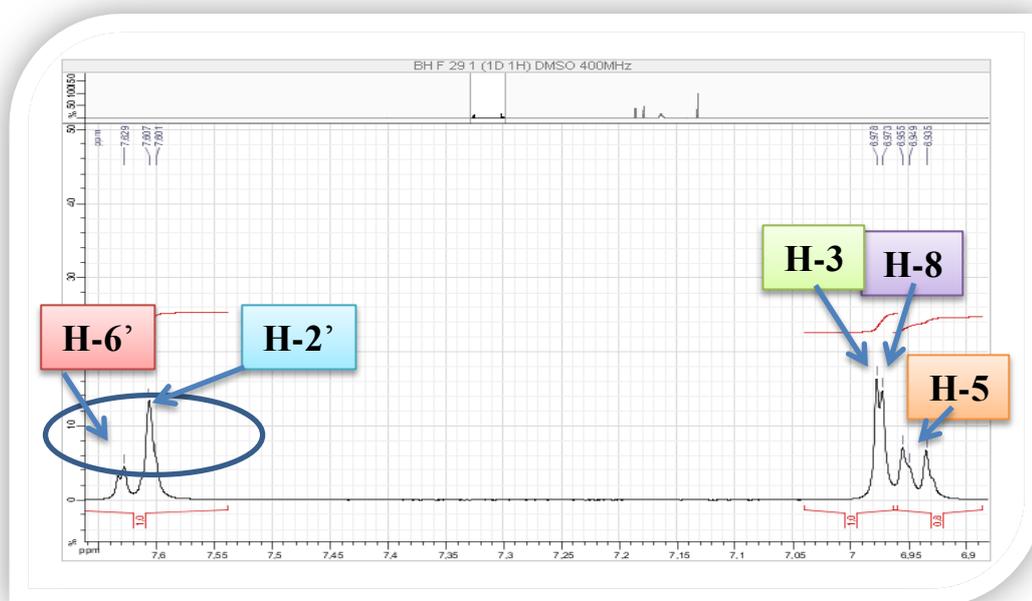


Figure V-64'. Etalement du spectre RMN-¹H du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

- Trois singulets correspondant à des groupements méthoxyles (OCH_3) à $\delta_{\text{H}} = 3,74$; $3,91$ et $3,94$ ppm, ces groupements montrent des corrélations respectives avec les carbones à $\delta_{\text{C}} = 60,52$; $56,96$ et $56,52$ ppm.

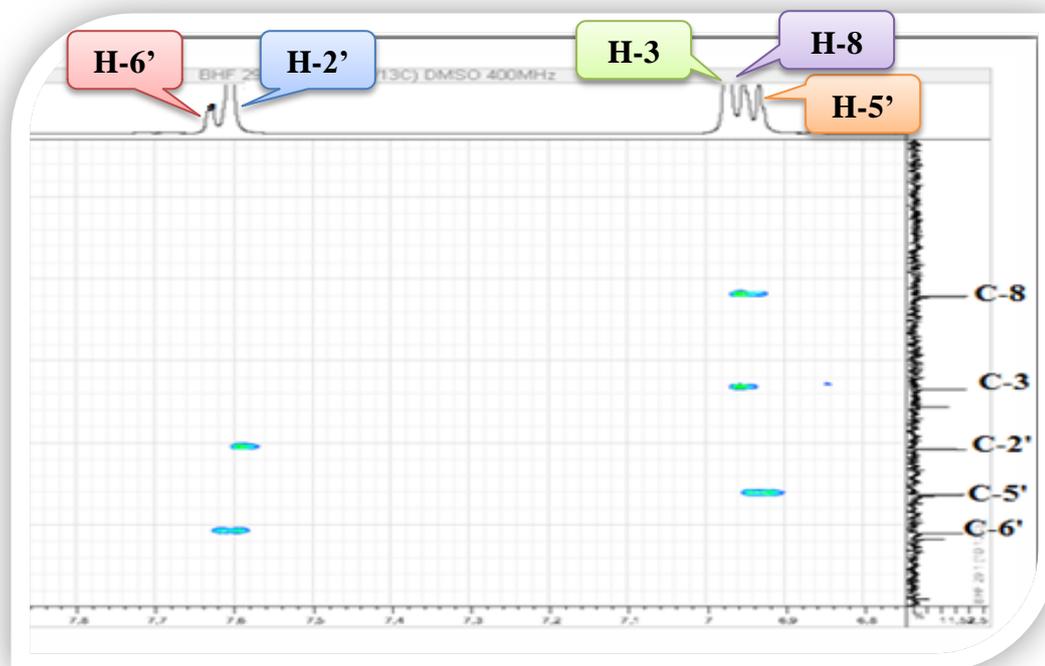


Figure V-65. Spectre HSQC du composé C_8 (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm)

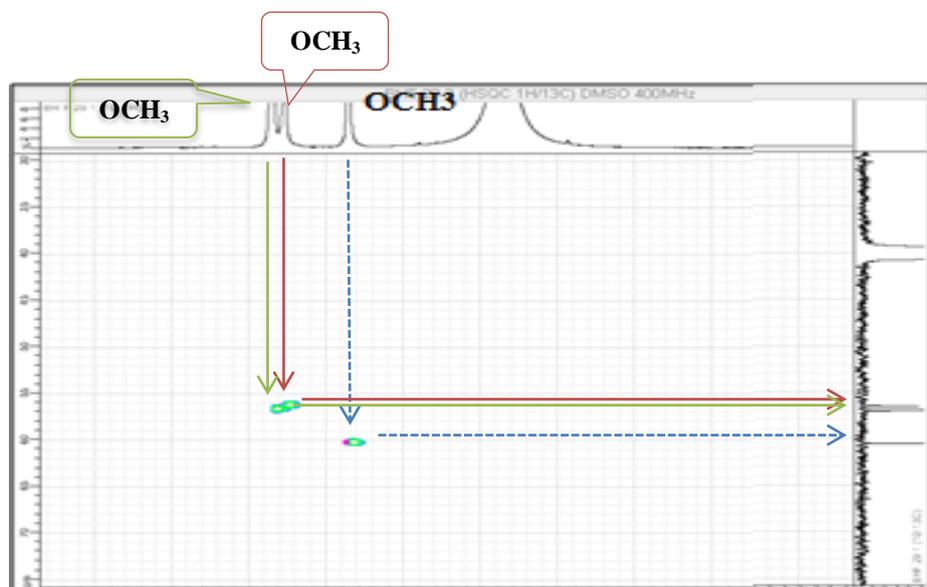


Figure V-65'. Etalement du spectre HSQC du composé C_8 (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm)

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figures V-66 et V-66') permettent d'une part de localiser les carbones quaternaires de la molécule et d'autre part de positionner les groupements méthoxyles sur leurs carbones porteurs.

En effet, le proton H-3 permet aisément de confirmer l'attribution du C-4 à la résonance à $\delta_C = 182,73$ ppm. Les protons H-3, H-2' et H-6' permettent la localisation du signal du C-2 à $\delta_C = 164,51$ ppm. Les protons H-2' et H-5' permettent la localisation du signal du C-3' à $\delta_C = 148,60$ ppm. Les protons H-6', H-2' et H-5' permettent la localisation du signal du C-4' à $\delta_C = 151,60$ ppm. Les protons H-3, H-2' et H-5' permettent la localisation du signal du C-1' à $\delta_C = 121,00$ ppm. Les protons H-3 et H-8, permettent la localisation du signal du C-10 à $\delta_C = 106,00$ ppm. Sur la base des valeurs des déplacements, le proton H-8 permet l'attribution des carbones C-6, C-9 et C-7 aux résonances à $\delta_C = 132,37$; $153,12$ et $159,09$ ppm. Le signal à $\delta_C = 152,55$ ppm restant est attribué au carbone C-5. Sur ce spectre, les protons du méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,74$ ppm montrent une tache de corrélation avec le carbone C-6, les protons du méthoxyle résonant à $\delta_H = 3,91$ ppm montrent une tache de corrélation avec la carbone C-3'. Le dernier groupement, méthoxyle ($\delta_H = 3,94$ ppm) et le proton H-8 montre des taches de corrélation avec le même atome de carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 159,09$ ppm. Cette observation permet et confirme l'attribution de ce carbone au C-7.

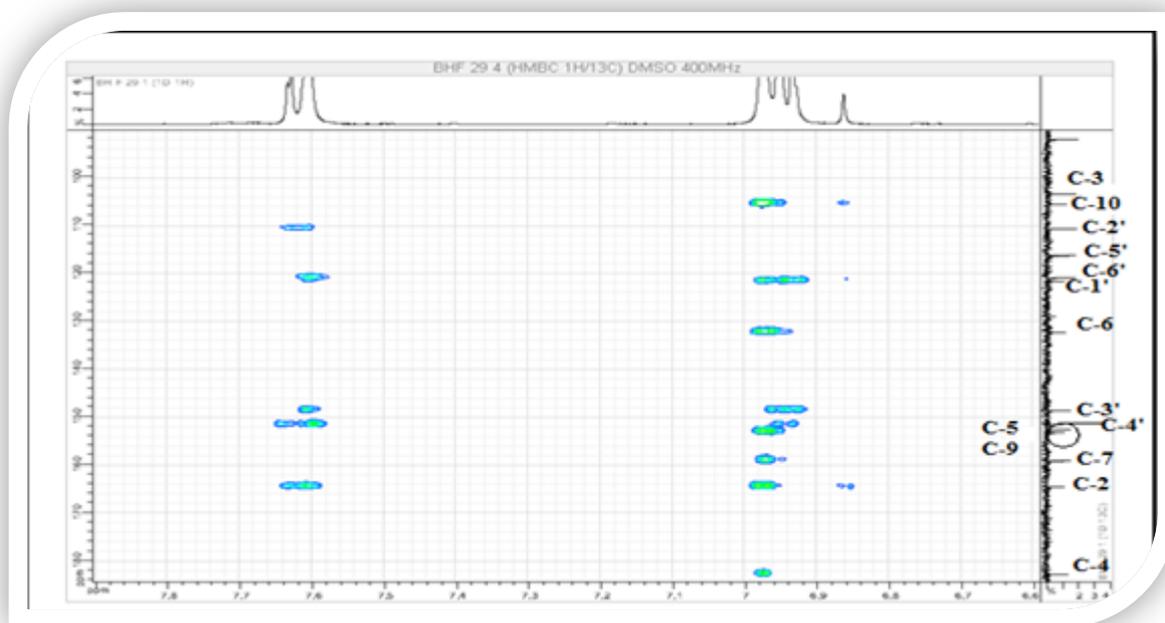


Figure V-66. Spectre HMBC du composé C₈ (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

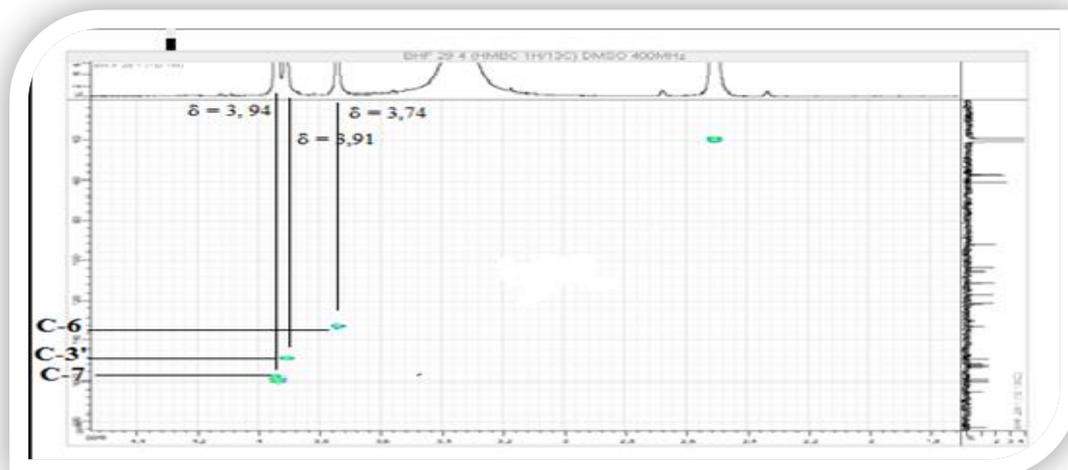


Figure V-66'. Etalement du spectre HMBC du composé C_8 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

La figure V-67 reporte toutes les attributions des carbones de la molécule.

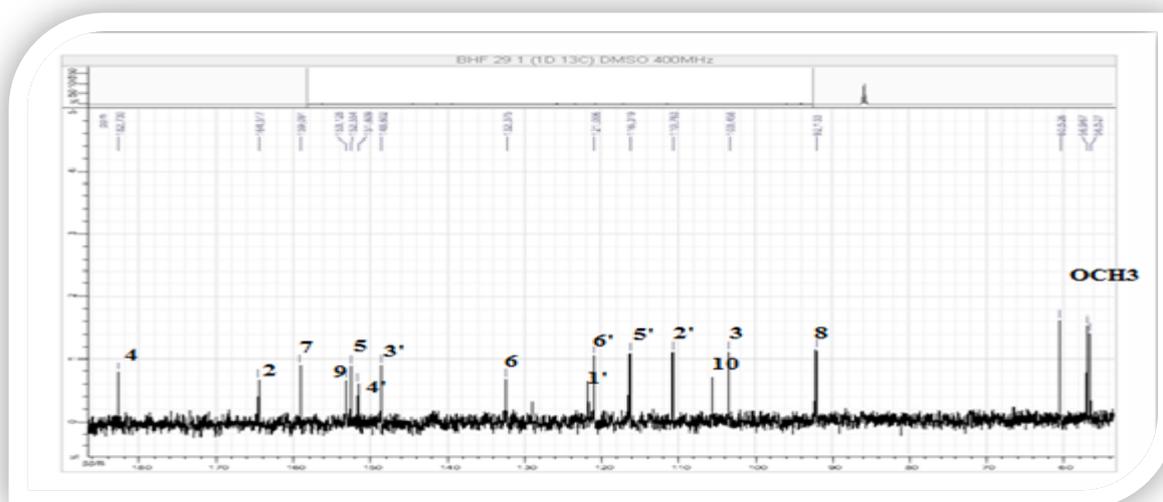


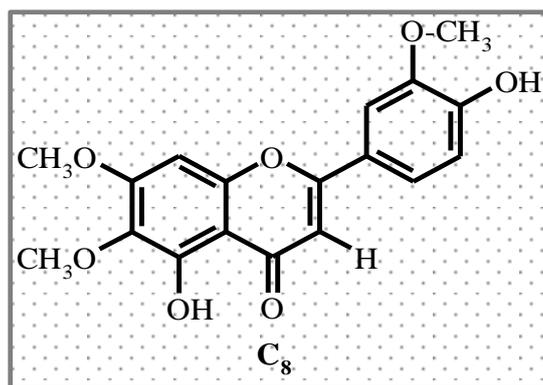
Figure V-67. Spectre RMN- ^{13}C du composé C_8 (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les données relatives aux spectres de RMN 1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau V-14.

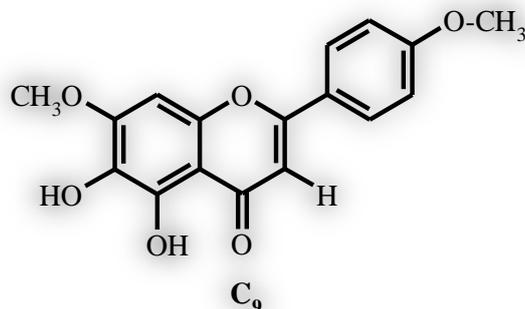
Tableau V-14. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé C_8 .

Numération	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	/	164,51
3	6,98 (s)	103,45
4	/	182,73
5	/	152,55
6	/	132,37
7	/	159,09
8	6,97 (s)	92,12
9	/	153,12
10	/	106,00
1'	/	122,00
2'	7,60 (d, $J = 2,4$ Hz)	110,76
3'	/	148,60
4'	/	151,6
5'	6,94 (d, $J = 8,0$ Hz)	116,31
6'	7,62 ($J = 8,0 ; 2,4$ Hz)	121,00
6-OCH ₃	3,74 (s)	60,50
3'-OCH ₃	3,91 (s)	56,52
7-OCH ₃	3,94 (s)	56,96

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure V-68, il s'agit de la 5, 4'-dihydroxy-6, 7, 3'- triméthoxyflavone connue sous le nom de cirsilinéol et également sous les noms de fastigénine, anisomelin et eupatrine (Belkacem *et al.*, 2014)

**Figure V-68.** Structure du composé C_8 , cirsilinéol

V.4.6. Identification du composé C₉



➤ La fluorescence

Déposée sur papier Wattman en solution dans le méthanol cette molécule montre une fluorescence mauve sombre sous irradiation UV à 365 nm caractéristique de composés de type flavone ou flavonol 3-OR.

➤ Spectroscopie RMN-¹H

L'examen du spectre RMN-¹H (Figures V-69 et V-69') montre la présence de deux groupements méthoxyles résonants à $\delta_{\text{H}} = 4,01$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3,86$ ppm. Ce spectre montre également des signaux confirmant la nature flavonoïde de ce composé en particulier :

- Un doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,93$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-2' et H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 6,69$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-3' et H-5'.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,86$ ppm, attribuable à H-3.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,69$ ppm, attribuable à H-8, vu la valeur de son déplacement chimique.

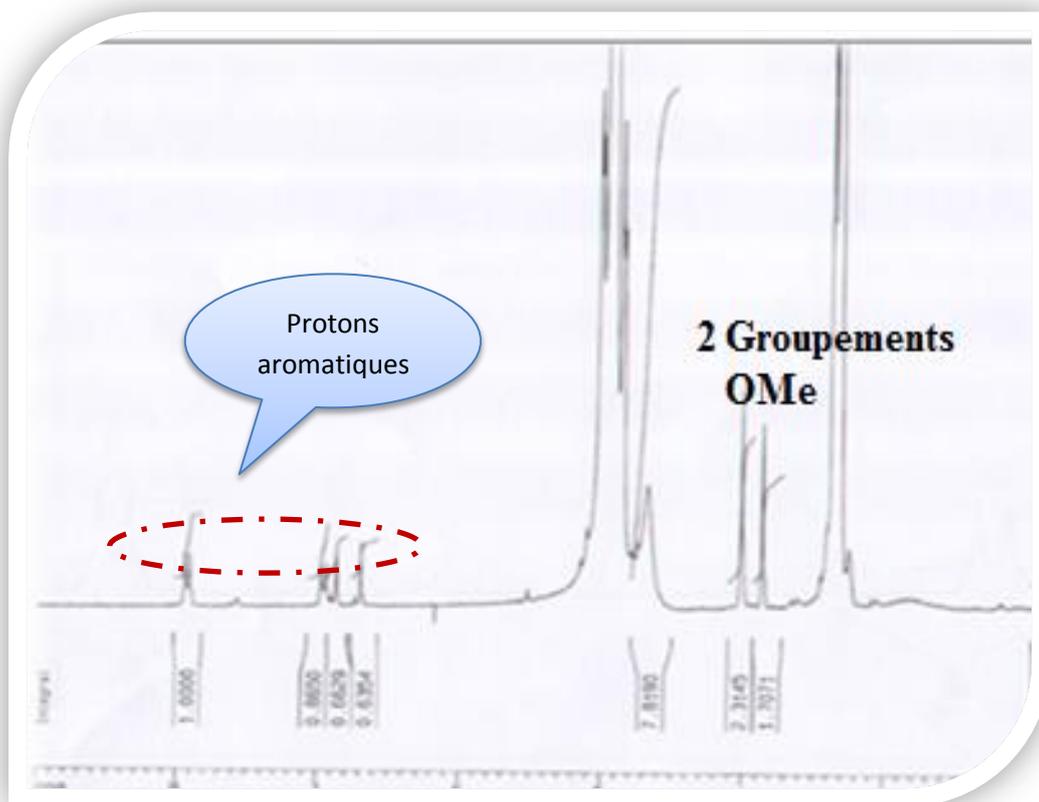


Figure V-69. Spectre RMN-¹H du composé C₉ (250 MHz, CD₃OD, δ ppm)

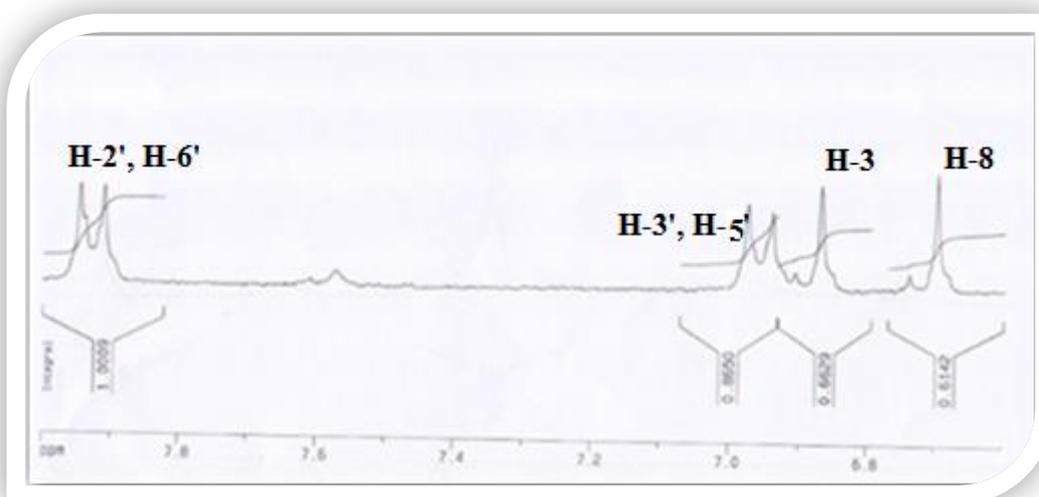


Figure V-69'. Etallement du spectre RMN-¹H du composé C₉ (250 MHz, CD₃OD, δ ppm)

➤ La série spectrale UV-Visible

Le spectre UV- visible de cette molécule enregistré dans le méthanol, montre une bande à $\lambda_{\max} = 335$ nm caractéristique de la bande I des flavones confortant ainsi les données précédentes. L'addition de NaOH dans l'échantillon méthanolique provoque sur le spectre UV-Vis un déplacement bathochromique avec diminution de l'intensité optique de la bande I indiquant un flavonoïde 4'-OR. Sur le même spectre on remarque l'absence d'une nouvelle bande vers 320 nm, ceci est en faveur d'un flavonoïde 7-OR. Cette hypothèse est confirmée par le spectre en présence de NaOAc qui ne montre aucun déplacement bathochromique de la bande II. L'addition de H_3BO_3 ne provoquant aucun déplacement bathochromique de la bande I, indique l'absence de système ortho di-OH dans cette molécule (Figure V-70).

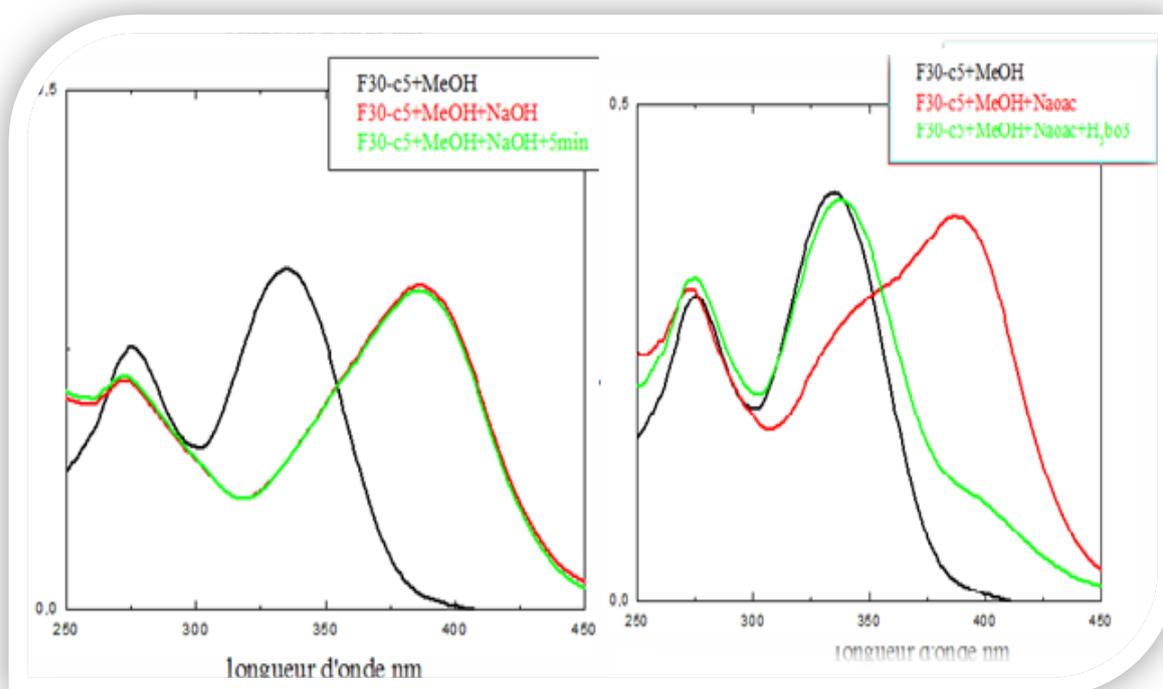


Figure V-70. La série spectrale UV-Visible du composé C_9 .

Les données relatives à la spectrophotométrie UV-Vis sont reportées dans le tableau V-15

Tableau V-15. Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé C₉.

Les réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Observation
MeOH	335	276	Flavone
NaOH	387 avec diminution de l'intensité	272	4'-OR
NaOH+5min	387	272	Confirme la nature flavone
NaOAc	387	272	7-OR
NaOAc+H ₃ BO ₃	338	274	Absence de systèmes ortho di-OH

Les données relatives au spectre RMN-¹H sont rassemblées dans le tableau V-16.

Tableau V-16. Données relatives au spectre RMN-¹H du composé C₉

Les protons	δ _H (ppm)	Multiplicité
OCH ₃	3.86	s
OCH ₃	4.04	s
H-8	6.69	s
H-3	6.86	s
H-3', H-5'	6.69	d (J = 8,8 Hz)
H-2', H-6'	7.93	d (J = 8,8 Hz)

L'ensemble des données de la spectroscopie RMN-¹H additionné à ceux de la spectrophotométrie UV-Vis mène à la structure reportée dans la figure V-71. Il s'agit de la 7,4'- dimethoxy-5, 6-dihydroxyflavone ou scutellareïne 7,4'-dimethyl éther connue sous le nom de ladaneïne, elle a été isolée auparavant de *Thymus piperella*, de *Ballota hirsuta* de la famille Labiatae et d'autres espèces de la famille Compositae (Harborne et Baxter, 1999).

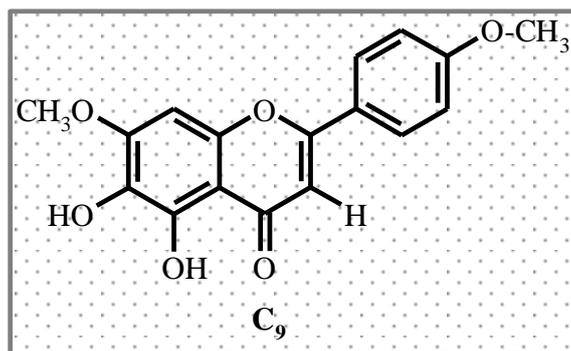
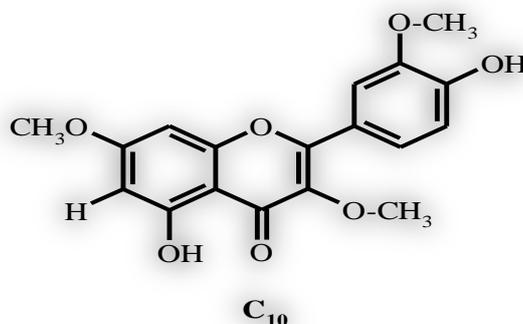


Figure V-71. Structure du composé C_9 , ladaneïne

V.4.7. Identification du composé C_{10}



Déposée sur papier Wattman en solution dans Méthanol cette molécule montre une fluorescence mauve sombre sous irradiation UV 365 nm. La couleur de cette fluorescence indique un composé de type flavone ou flavonol 3-OR.

L'analyse du spectre RMN- 1H (Figures V-72 et V-72') montre une grande ressemblance avec celui du composé C_8 , où l'on note la présence de trois groupements méthoxyles et des signaux caractéristiques de flavonoïdes. Les données reportées par les spectres nous orientent vers une substitution similaire sur le squelette flavonique du composé C_8 , du fait que l'on a :

- ✓ Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_H = 7,60$ ppm, ($J = 8,3 ; 2,2$ Hz) attribuable à H-6', partiellement recouvert par un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,54$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-2'.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,94$ ppm, ($J = 8,3$ Hz) attribuable H-5'.
- ✓ Un singlet large à $\delta_H = 6,89$ ppm, attribuable à H-8.

- ✓ Un singulet large a $\delta_H = 6,71$ ppm, attribuable à H-6.
- ✓ Trois signaux correspondant à trois méthoxyles à $\delta_H = 4,02$; $\delta_H = 3,99$ et $\delta_H = 3,86$ ppm.

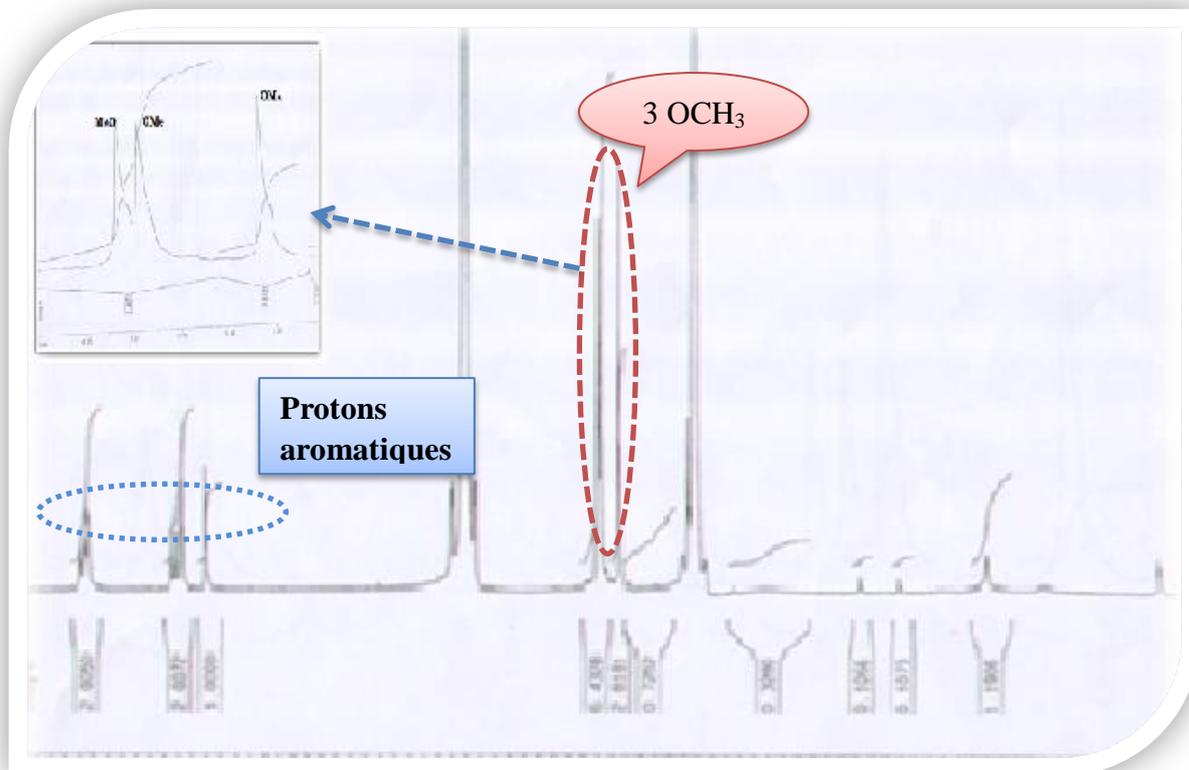


Figure V-72. Spectre RMN- ^1H du composé C_{10} (250 MHz, CD_3OD , δ ppm)

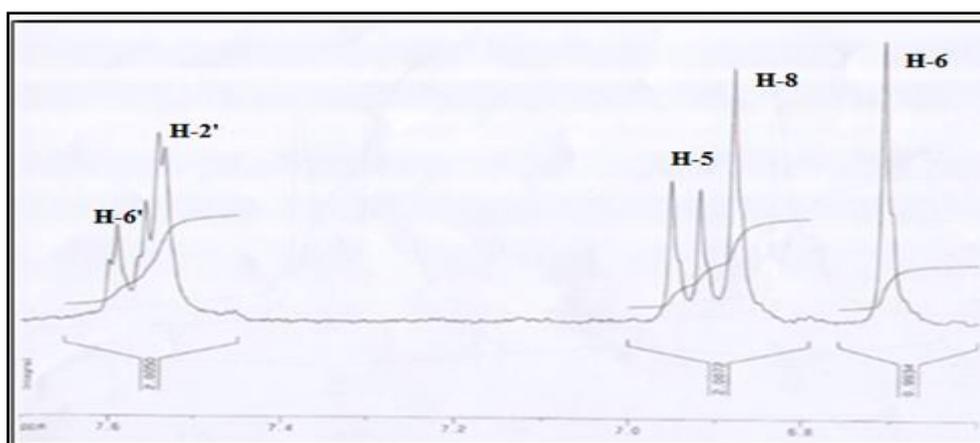


Figure V-72'. Etallement du spectre RMN- ^1H du composé C_{10} (250 MHz, CD_3OD , δ ppm)

L'enregistrement d'une série spectrale UV-visible (Figure V-73) apporte les informations résumées dans le tableau V-17.

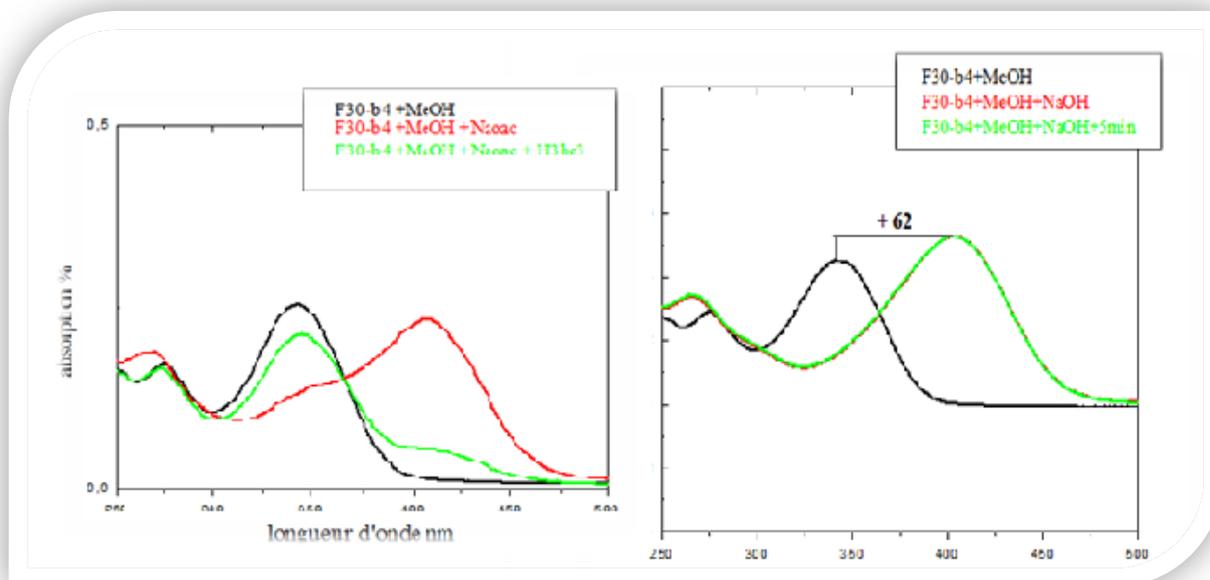


Figure V-73. La série spectrale UV-Visible du composé C_{10} .

Tableau V-17. Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé C_{10}

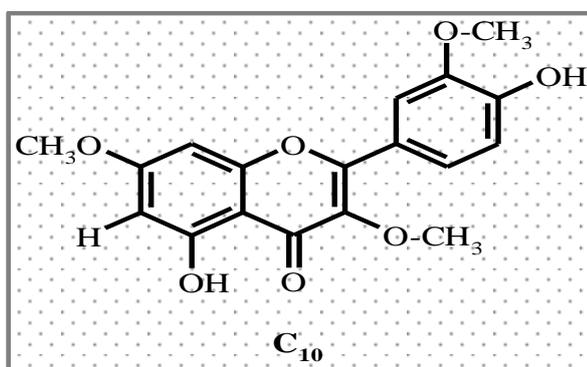
Les réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Observation
MeOH	342	274	Flavone ou flavonol 3-OR.
NaOH	404	265	4'-OH, pas de nouvelle bande (7-OR)
NaOH+5min	404	265	Spectre stable, pas de OH libre en C-3
NaOAc	407	269	7-OR
NaOAc+H ₃ BO ₃	345	273	Absence de systèmes ortho di-OH

Les données relatives au spectre RMN-¹H du composé C_{10} sont reportées dans le tableau V-18.

Tableau V-18. Données relatives au spectre RMN-1H du composé C₁₀.

Les protons	$\delta_H(\text{ppm})$	Multiplicité
OCH ₃	3,86	s
OCH ₃	3,99	s
OCH ₃	4,02	s
H-6	6,71	sl
H-8	6,89	sl
H-2'	7,54	d, ($J = 2,2 \text{ Hz}$)
H-6'	7,60	dd, ($J = 8,3 ; 2,4 \text{ Hz}$)
H-5'	6,94	d, ($J = 8,3 \text{ Hz}$)

En combinant les données de la RMN ¹H avec les résultats de la spectrophotométrie UV-Vis, notre analyse mène à la structure reportée sur la figure V-74. Il s'agit de la 5,4'-dihydroxy-3,7,3'-triméthoxyflavone. Cette molécule est connue sous le nom de pachypodol, elle a été isolée et décrite de *Grindelia robusta* (Compositae) et de plusieurs espèces d'autres familles (Harborne et Baxter, 1999)

**Figure V-74.** Structure du composé C₁₀, pachypodol

V.5. Interprétation des résultats de l'étude de l'huile essentielle de *Centaurea sempervirens*.

D'après l'étude bibliographique menée sur cette espèce, aucune étude comportant la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante n'a été réalisée.

L'huile obtenue par entraînement à la vapeur à partir des parties aériennes est de couleur verte et dégage une odeur forte, le rendement obtenu de l'huile a été de 0,2 % par rapport à la matière végétale.

L'analyse et l'identification des composés de l'huile essentielle ont été réalisées en utilisant la CG-DIF et la CG-SM (Figure V-75). Le profil chimique général de l'huile essentielle, la teneur en pourcentage et les indices de rétention des constituants sont résumés dans le tableau V-19.

Cette étude a permis l'identification de 30 constituants correspondant à 78,5% de l'huile totale. Parmi les constituants identifiés, les composés oxygénés représentent 31,9%, dont 21,2% d'hydrocarbures, 10,7% de sesquiterpènes. Les composés non oxygénés étaient des dérivés d'hydrocarbures avec 9,8%. Les phtalates représentaient 35,3% de l'huile totale.

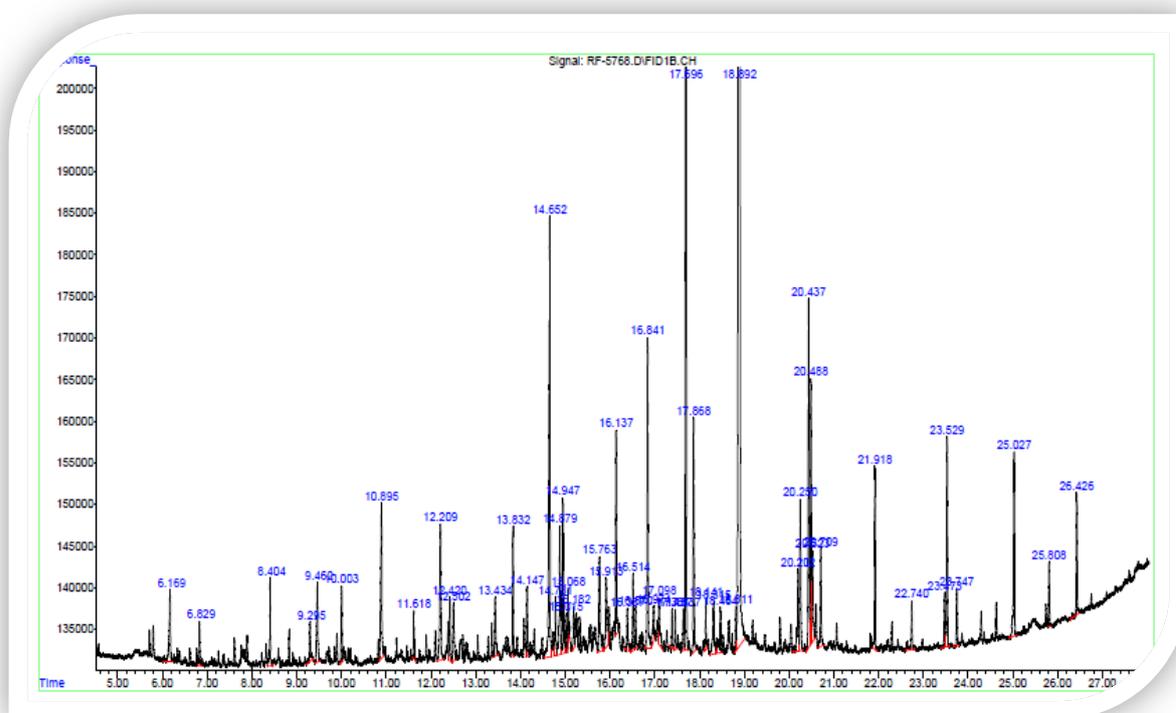


Figure V-75. Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. sempervirens* L.

Tableau V-19. Composition chimique de l'huile essentielle de *C. sempervirens* L.

N°	T _R	I _R	%	Composés
1	6.169	983	0,9	Oct-1-èn-3-ol
2	6.829	1005	0,4	Hepta-2,4-diènal
3	8.404	1100	0,8	Nonanal
4	9.462	1165	1,0	Nonanol
5	10,003	1201	0,6	Décanal
6	10,895	1267	1,9	Acide nonanoïque
7	11,618	1315	0,4	Déca-2,4-diènal
8	12,209	1367	1,7	Undécanol
9	12,420	1383	0,5	β -Damacénone
10	12,502	1388	0,7	Dodécan-2-one
11	13,832	1494	1,0	Pentadécan-1-ène
12	14,652	1563	5,1	<i>épi</i> -toriléanol
13	14,781	1574	0,5	1,5-époxyalsvial-4(14)-ène
14	14,879	1577	1,4	Spathuléanol
15	14,947	1582	1,5	Oxyde de caryophyllène
16	15,015	1594	0,3	Hexadécan-1-ène
17	15,068	1597	0,4	Salvia-4(14)-èn-1-one
18	15,182	1609	0,4	β -oplopénone
19	15,763	1661	1,4	β -eudesmol
20	16,137	1694	1,5	Hepdécan-1-ène
21	16,387	1717	0,4	Pentadécanal
22	17,696	1843	12,4	6,10,14-triméthylpentadéca-2-one
23	17,868	1860	2,3	Phtalate
24	18,892	1963	33,0	Diisopentylphtalate
25	20,202	2093	1,0	Phytol
26	21,918	2299	1,6	Tricosane
27	22,740	2399	0,5	Tetracosane
28	23,529	2499	1,8	Pentacosane
29	25,027	2700	2,0	Heptacosane
30	26,426	2900	1,1	Nonacosane

Les principaux composants de cette huile sont les diisopentylphtalate (33,0%); 6, 10, 14-triméthylpentadécane-2-one (12,4%) et *epi*-torilenol (5,1%). La présence de 6, 10, 14-triméthylpentadécane-2-one comme composant principal de *C. sempervirens* est en accord avec les résultats rapportés sur *C. grisebachii* subsp. *grisebachii* (Djeddi *et al.*, 2011) alors que la présence des esters phtaliques pourrait s'expliquer dans la plupart des cas par une pollution probable des lieux de récolte des plantes étudiées (Manayi *et al.*, 2014).

La figure V-76 reporte les pourcentages des différents groupes chimiques présents dans l'huile essentielle des parties aériennes de *C. sempervirens*.

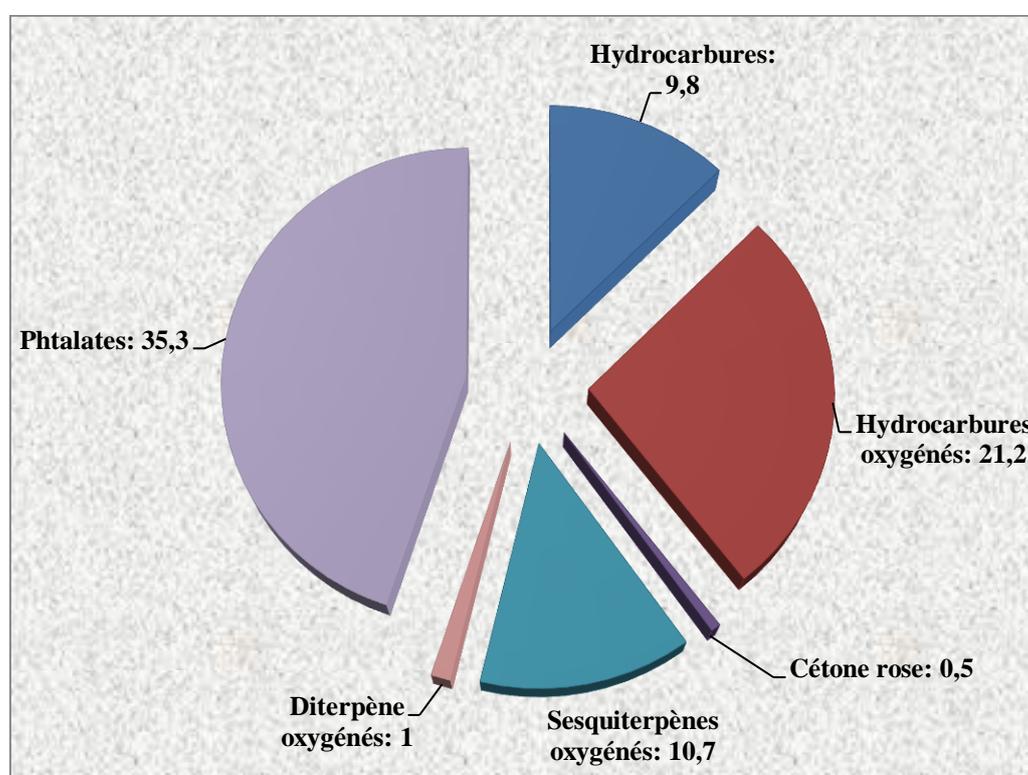


Figure V-76. Diagramme des pourcentages de différents groupes chimiques d'huile essentielle de *C. sempervirens*

V.6. Résultats de l'étude biologique des extraits de *Centaurea sempervirens*

V.6.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits : chloroforme (EC), acétate d'éthyle (EAE) et *n*-butanol (EB) de cette plante (Tableau V-20) ont été exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/ g d'extrait) pour les flavonoïdes.

Tableau V-20. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *C. sempervirens*

Extrait	Phénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait)
Extrait chloroforme (EC)	11,43 ± 5,29	41,55 ± 2,73
Extrait acétate d'éthyle (EAE)	61,68 ± 3,99	78,94 ± 3,81
Extrait <i>n</i> -butanol (EB)	48,10 ± 2,03	38,73 ± 2,52

D'après les résultats reportés dans le tableau V-20 et représentés dans la figure V-77, on constate que :

- La teneur en polyphénols de EAE a été plus importante (61,68 mg EAG/g) que celle des deux autres extraits, EB avec (48,10 mg EAG/g) et EC avec (11,43 mg EAG/g).
- La teneur en flavonoïdes enregistrée a été plus élevée dans EAE (78,94 mg EQ/g) comparant à EB (38,73 mg EQ/g) et EC (41,55 mg EQ/g).
- L'EAE présente les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes.

Ces résultats sont largement inférieurs à ceux trouvés par Azzouzi *et al.*, 2016 pour deux espèces appartenant au genre *Centaurea* (*Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur.). Cependant, il faut noter que la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et

extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Podsdek, 2007).

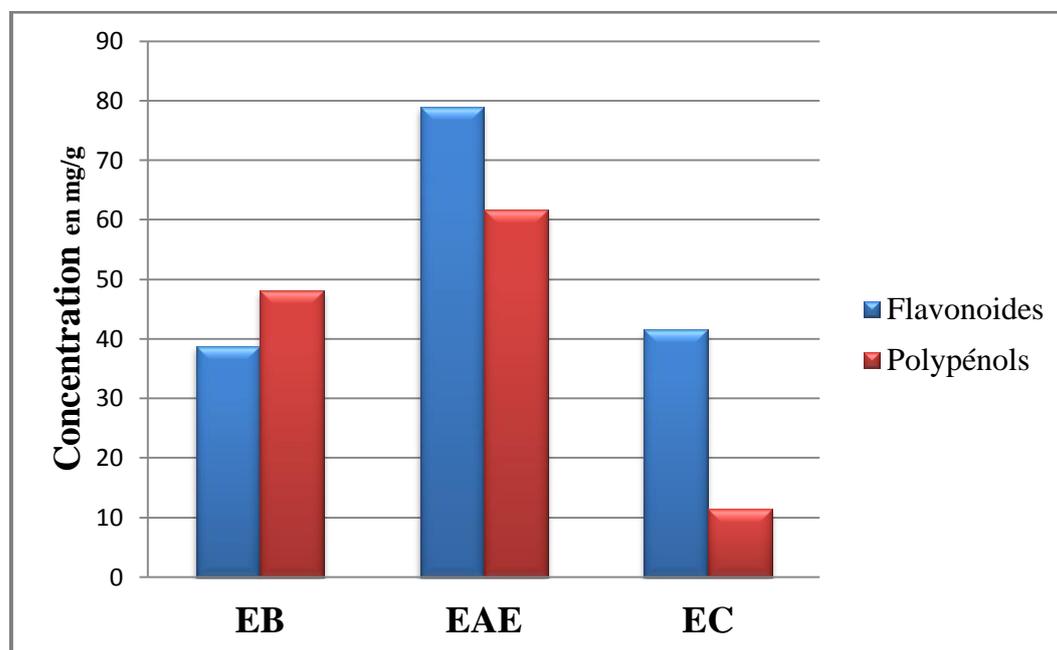


Figure V-77. Les teneurs des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les trois extraits

V.6.2. Activité antioxydante

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits chloroforme (EC), acétate d'éthyle (EAE) et *n*-butanol (EB) de *Centaurea sempervirens* L.

V.6.2.1. Activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical DPPH

Les résultats de l'activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical DPPH des trois extraits, sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration (Figure V-78), ainsi que les valeurs de la concentration inhibant 50% de la réaction (Tableau V-21).

À des fins comparatives trois antioxydants standards sont utilisés, le BHA, BHT et le α -tocophérol

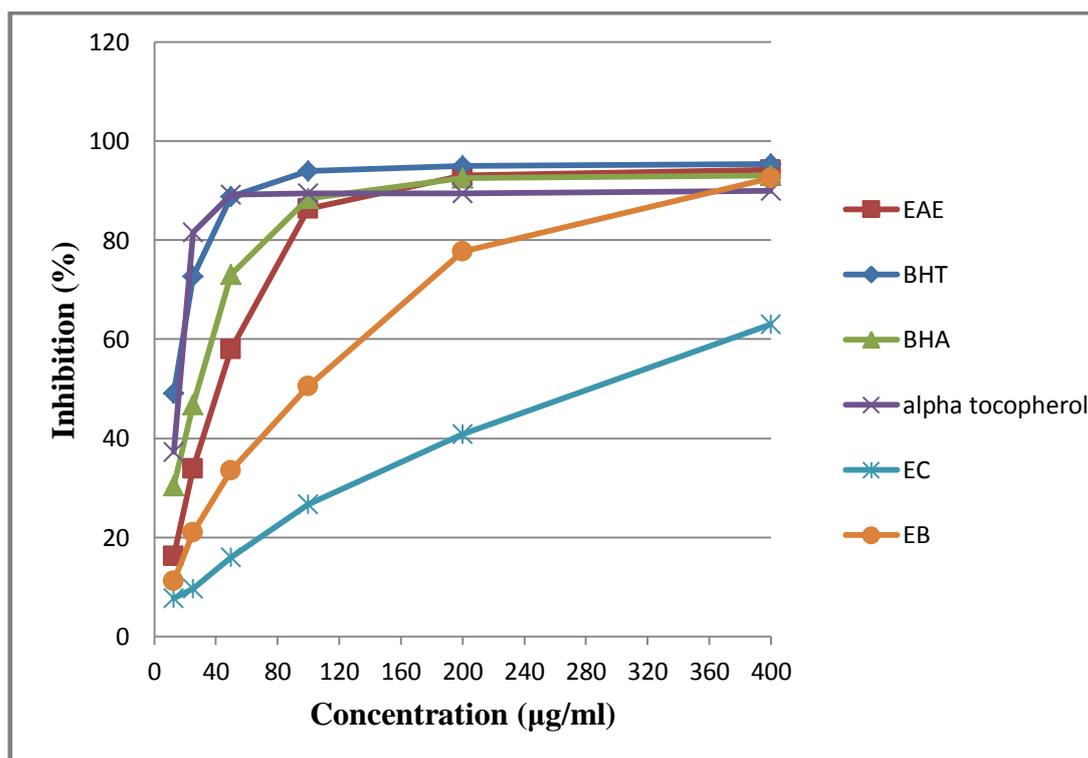


Figure V-78. Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de *C. sempervirens* et les trois standards en fonction de la concentration.

Les valeurs de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ont été calculées à partir des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

Tableau V-21. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des trois extraits de *C. sempervirens* et des standards.

Extraits et standards	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Chloroforme (EC)	$253,21 \pm 3,06$
Acétate d'éthyle (EAE)	$41,96 \pm 0,81$
<i>n</i> -butanol (EB)	$97,83 \pm 1,56$
BHA	$29,09 \pm 2,10$
BHT	$12,99 \pm 0,41$
α -tocophérol	$13,02 \pm 5,17$

L'extrait EAE a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé, suivi par l'extrait EB, et en dernier l'extrait EC qui a présenté le pourcentage le plus bas. Les résultats ont révélé que

l'extrait EAE a présenté un effet piègeur maximal du radical DPPH (86,35- 94,22%) à des concentrations comprises entre (100 et 400 $\mu\text{g/ml}$) en comparant avec les antioxydants standards, le BHA, le BHT et l' α -tocophérol qui ne nécessitaient que 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ et 25 $\mu\text{g/ml}$ pour 73,62%, 72,09% et 81,53% de l'effet piègeur du radical DPPH, respectivement.

L'activité antiradicalaire manifestée par l'extrait EAE, avec une valeur de CI_{50} 41,96 $\mu\text{g/ml}$, est une fois et demie moins grande que celle du BHA et trois fois moins grande que celles du BHT et de l' α -tocophérol.

Ce résultat peut être expliqué par la richesse de l'extrait EAE en composés de types flavonoïdes et polyphénols. Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui ont pu établir une relation étroite entre la structure chimique des composés phénoliques et leur capacité à piéger les radicaux libres (Marfak, 2003).

V.6.2.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau V-22 et la figure V-79. L'extrait EAE a montré une meilleure activité inhibitrice dans le test CUPRAC ($A_{0,50} = 8,83 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$), par rapport à l'extrait EB avec ($A_{0,50} = 9,71 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait EC avec ($A_{0,50} = 11,29 \pm 1,78 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait EAE a manifesté une activité semblable à celle de la quercétine ($A_{0,50} = 8,82 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$) donc une activité antioxydante importante, par contre elle était inférieure à celles des autres standards, BHA ($A_{0,50} = 2,59 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$), BHT ($A_{0,50} = 4,50 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$) et α -tocopherol ($A_{0,50} = 5,66 \pm 0,76 \mu\text{g/ml}$).

Tableau 22. Inhibition du CUPRAC par les extraits de *Centaurea sempervirens* L.

Extrait	Absorbance							
	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	A _{0,50} µg/ml
EC	0,52 ± 0,01	0,61 ± 0,00	0,79 ± 0,02	1,11 ± 0,02	1,67 ± 0,00	2,30 ± 0,01	2,68 ± 0,06	9,71 ± 0,37
EAE	0,82 ± 0,00	1,15 ± 0,05	1,73 ± 0,01	2,36 ± 0,14	2,52 ± 0,00	2,88 ± 0,09	3,00 ± 0,08	8,83 ± 0,35
EB	0,53 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,86 ± 0,01	1,34 ± 0,03	1,92 ± 0,07	2,38 ± 0,01	2,52 ± 0,01	11,29 ± 1,78
BHA	1,70 ± 1,11	2,38 ± 0,01	2,10 ± 0,59	2,27 ± 0,19	2,87 ± 0,30	2,49 ± 0,01	2,47 ± 0,00	2,59 ± 0,32
BHT	1,41 ± 0,03	2,22 ± 0,05	2,42 ± 0,02	2,50 ± 0,01	2,56 ± 0,05	2,86 ± 0,07	3,38 ± 0,13	4,50 ± 0,11
α-tocopherol	0,65 ± 0,24	0,84 ± 0,16	1,40 ± 0,03	2,20 ± 0,06	2,98 ± 0,12	3,35 ± 0,01	3,84 ± 0,03	5,66 ± 0,76
Quercétine	0,91 ± 0,04	1,06 ± 0,04	1,55 ± 0,05	2,24 ± 0,12	3,45 ± 0,09	-	-	8,82 ± 0,51

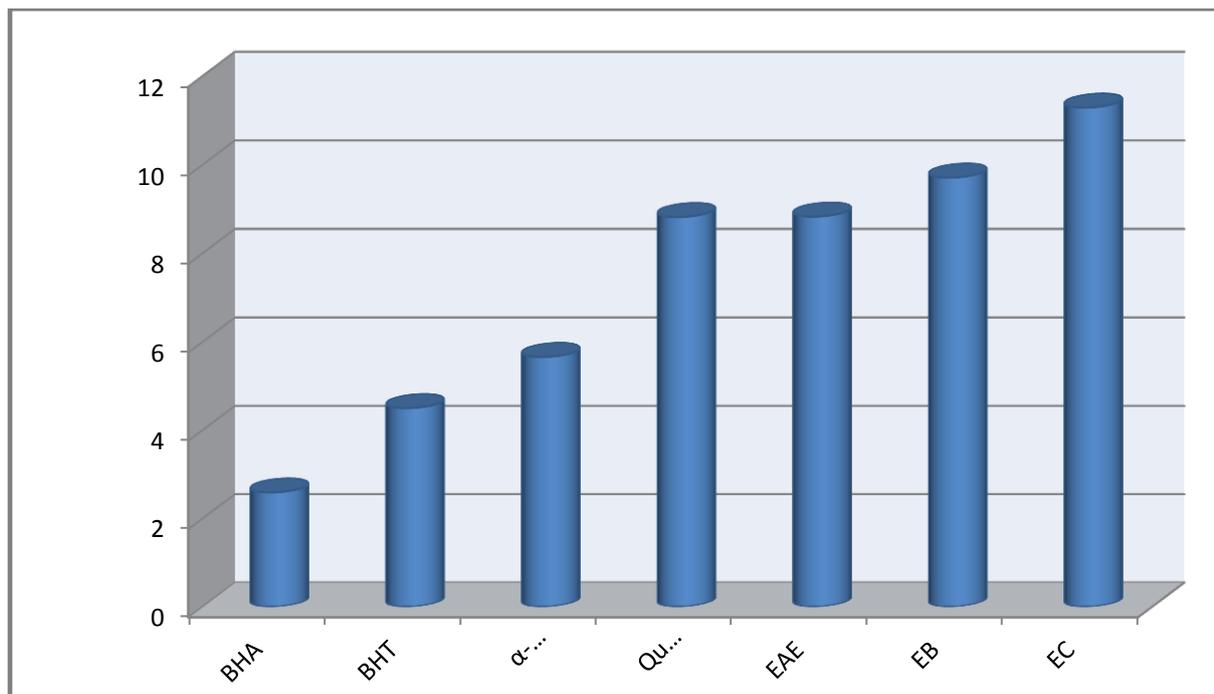


Figure V-79. L'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) des extraits de *Centaurea sempervirens* et des standards.

Les résultats des deux méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, montrent que l'extrait acétate d'éthyle (EAE) possède une activité importante en comparant avec les contrôles positifs utilisés. (Tableau V-23).

Tableau V-23. Résultats de l'activité antioxydante de L'EAE et des contrôles positifs utilisés

Extrait /standards	DPPH CI ₅₀ (μg /ml)	CUPRAC A _{0,50} (μg/ml)
EAE	41,96 ± 0,81	8,83 ± 0,35
BHA	29,09 ± 2,10	2,59 ± 0,32
BHT	12,99 ± 0,41	4,50 ± 0,11
α-Tocopherol	13,02 ± 5,17	5,66 ± 0,76
Quercétine	NT	8,82 ± 0,51

NT : non testé

V.6.3. Activité antibactérienne

Le tableau V-24, reporte les résultats de l'activité antibactérienne (zones d'inhibition en mm) des extraits EC, EAE et EB à différentes concentrations (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml et 0,25 mg/ml) contre deux bactéries pathogènes gram (-) : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et deux bactéries pathogènes gram (+) : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus groupe d*.

Les résultats montrent que les trois extraits de la plante ne sont pas sensibles vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées. On relève en effet, des zones d'inhibition faibles.

Tableau 24. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits EC, EAE et EB de *C. sempervirens*

Zone d'inhibition (mm)												
Extrait	Extrait Chloroforme (EC)				Extrait acétate Ethyle (EAE)				Extrait <i>n</i> -butanol (EB)			
	0,25	0,50	1	2	0,25	0,50	1	2	0,25	0,50	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,33±0,57	7,66±0,57	9,66±0,57	9,66±0,57	6,33±0,57	6,33±0,57	7,66±0,57	8,00±1,73	6,00±0,00	6,33±0,57	8,00±1,00	9,33±1,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,66±0,57	7,33±0,57	7,66±0,57	10,00±0,00	6,33±0,57	7,66±1,15	8,66±1,15	8,66±0,57	6,00±0,00	7,33±0,57	9,00±0,00	10,66±1,15
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6,00±0,00	7,00±1,00	7,33±1,15	9,66±0,57	6,00±0,00	6,66±0,57	9,00±1,00	10,33±1,52	6,00±0,00	6,33±0,57	7,66±0,57	10,66±1,52
<i>Streptococcus groupe d</i>	6,00±0,00	6,33±0,57	9,00±0,00	8,33±0,57	7,66±0,57	7,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00

V.7. Conclusion

L'identification structurale des composés isolés de *Centaurea sempervirens* a été réalisée par la combinaison des données de différentes méthodes d'analyses spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse à haute résolution par ionisation douce (electrospray) et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'étude de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et CUPRAC des trois extraits dérivés de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *Centaurea sempervirens* L. a montré que l'extrait acétate d'éthyle (EAE) possède une activité plus élevée que celle des deux autres extraits, en comparaison avec les antioxydants standards utilisés comme références. Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des trois extraits ont également été évaluées. L'extrait acétate d'éthyle a montré une composante plus riche en ce type de composés, que les deux autres. Par ailleurs, les études menées sur la recherche de l'activité antibactérienne ont révélé que les trois extraits ne sont pas sensibles par rapport aux souches bactériennes testées.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail ayant pour objectif la recherche et la détermination de métabolites secondaires à activité biologique potentielle, est consacré à l'étude phytochimique et biologique de *Centaurea sempervirens*, synonyme: *Cheirolophus sempervirens* L. Pomel. Cette étude a débuté par la macération dans l'éthanol à 70% des feuilles et des fleurs prises séparément. Après filtration, concentration et dilution dans de l'eau distillée, les solutions obtenues ont subi des affrontements à l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol donnant les extraits correspondants.

Les expérimentations réalisées ont concerné le fractionnement sur colonne de gel de silice des extraits CHCl₃ et EtOAc des fleurs, en vue de déterminer leur composante chimique, l'extraction et l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et enfin l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des trois extraits (Chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

Le fractionnement chromatographique des deux extraits a été réalisé sur colonne de gel de silice greffé (diol) et gel de silice 60, suivi par une séparation et purification par HPLC semi-préparative en phase inverse, sur chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 et sur colonne de Sephadex LH20. Les structures des composés isolés ont été établies par la combinaison des données des expériences de RMN (¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC), de spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par electrospray (HR-ESI-MS), UV-Vis et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles reportées dans la littérature.

Sept composés purs ont été isolés de la phase acétate d'éthyle, dont six ont été identifiés. Il s'agit de :

- ❖ Cirsiliol (1)
- ❖ Jacéosidine (2)
- ❖ Apigénine (3)
- ❖ L'acétyl patulitrine (4)
- ❖ Quercetin-3-*O*-[6''-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-glucopyranoside] (5)

❖ Rutine (6)

Neuf composés purs ont été isolés de la phase chloroforme. Il s'agit de :

- ❖ β -Sitostérol (7)
 - ❖ Stigmastérol (8)
 - ❖ Stigmastérol 3-O- β -glucopyranoside (9)
 - ❖ β -sitostérol 3-O- β (Daucostérol) (10)
 - ❖ 11 β , 13-dihydrosalonniténolide (11)
 - ❖ Ladaneïne (12)
 - ❖ Cirsilinéol (13)
 - ❖ Pachypodol (14)
 - ❖ 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone ou 6-hydroxyluteoline 6,7,3',4'-tetraméthyl ether (15)
- Mélange 63- 37%
- Mélange 50- 50%

Il est à noter que le composé 4 est nouveau pour le genre *Centaurea* et que le composé 5 est nouveau pour la famille Asteraceae.

La composition de l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce *C. sempervirens* obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, a été analysée par GC-FID et CG-SM. Les composés majoritaires identifiés sont : le 6,10,14-triméthylpentadéca-2-one avec (12,4%) et le *épi*-toriléol (5,1%). On note que les différents groupes chimiques présents dans l'huile sont : hydrocarbures 9,8%, les hydrocarbures oxygénés 21,2%, rose cétone 0,5%, les sesquiterpènes oxygénés 10,7%, 1,0% de diterpènes oxygénés et les phtalates qui représentaient 35,3% de l'huile totale.

La quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes a été effectuée sur les trois extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol, par les méthodes colorimétriques. Les résultats montrent que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait acétate d'éthyle était plus importante que celle des deux autres extraits.

L'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes (DPPH et CUPRAC) a montré que l'extrait AcOEt possède un pouvoir antioxydant important par rapport aux autres extraits ; le BHA, le BHT, l' α -tocophérol et la quercétine ont été utilisés comme antioxydants standards. Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques, ont montré que les trois extraits n'ont pas montré d'effets significatifs vis-à-vis de quatre souches bactériennes testées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.

Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992; 31, 3307-3330.

Agrawal PK. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam, Oxford, New-York, Tokyo. 1989.

Ahmed SA, Kamel EM. Cytotoxic activities of flavonoïds from *Centaurea scoparia*. *The Scientific World Journal*. 2014; 1-7.

Ahmed ZF, Rimpler H, Hamouda FM, Rizk AM, Ismail SI. The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry*. 1970; 9(7), 1595-1601.

Akkal S, Benayache F, Benayache S, Jay M. Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 1997; 25, 361-362.

Akkal S, Benayache F, Medjroubi K, Tillequin F, Seguin E. Flavonoids from *Centaurea furfuracea*. *Biochem.Syst. Ecol.* 2003; 31, 641-643.

Almasiova V, Holovska K, Tarabova L, Cigankova V, Lukacinova A, Nistiar F. Structural and ultra-structural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. *Journal of Environment Science and Health*. 2012; 47, 1319-1328.

Altintas A, Kose YB, Yucel E, Demirci B, Baser KHC. Composition of the essential oil of *Centaurea dichroa*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2004; 40, 604-605.

Altintas A, Kose YB, Kandemir A, Demirci B, Baser KH. Composition of the essential oil of *Centaurea saligna*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009; 45, 276-277.

Amatri F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010; 14, 141-148.

Annaházi A, Mracsó E, Süle Z, Karag E, Penke B, Bari F, Farkas E. Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage experimental cerebral hypoperfusion. *European Journal of Pharmacologie*. 2007; 571, 20-128.

Apak R, Guclu K, Ozyurek K, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food. Chem*. 2004; 52, 7970–7981.

Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). *Gazi Univ. J. Sci*. 2004; 17(4), 149-164.

Audigie CL, Dupon G, Zonsgain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris. 1995. p. 44.

Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P, Jean-Claude Chalchat JC, Boumaza O, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. Essential Oil Composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2016; 8(9), 1545-1548.

B

Bandyukova VA, Khalmatov KhKh, Alimov KhI. Flavonoids of *Centaurea depressa*. *Chem. Nat. Cmpds*. 1969; 5(4), 324-325.

Barel S, Segal R, Yashphe J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol*. 1991; 33, 187-191.

Barkely TM, Brouillet L, Strother JL. *Flora of North America-Asteraceae*. 2006 ; 19, 3-69.

Barnoud D, Cano N, Schneider SM, Vasson MP, Hasselmann M, Leverve X. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer, troisième édition. Paris. 2007; 241-242.

Barrero AF, Oltra JE, Alvarez M, Raslan DS, Saude DA, Akssira M. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*. 2000; 71(1), 60-4.

Baytop T. *Therapy with medicinal plants in Turkey, Past and Present*, second ed, Nobel Tıp Basımevi. Istanbul. Turkey. 1999.

Bellakhdar J. *La pharmacopée marocaine traditionnelle*, Ibis press. 1997.

- Belkacem S, Belbache H, Boubekri C, Mosset P, Rached-Mosbah O, Marchioni E, Benayache S, Benayache F.** Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf. Res. Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014 ; 5(3), 1275-1279.
- Benayache F, Benayache S, Medjroubi K, Massiott G, Aclinou P, Drodz B, Nowaks G.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata*. Phytochemistry. 1992; 31(12), 4359-4360.
- Benayache S, Benayache F, Benyahia S, Chalchat JC, Garry RP.** Leaf Oils of some *Eucalyptus* Species Growing in Algeria. J. Essent. Oil Res. 2001; 13, 210-213.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM,** The antioxidant role of vitamin C. Free Radical Bio Med. 1986; 2, 419-444.
- 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(4), 580-585.
- Benjilali B.** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 2004; 7-59.
- Bentamene A, Benayache S, Crèche J, Petit G, Bermejo J, Leon F, Benayache, F.** A new guaianolides and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology. 2005 ; 33, 1061-1065.
- Bicha S, Amrani A, Benaissa O, León F, Zama D, Brouard I, Benayache S, Bentamene A, Benayache F.** A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L. Der Pharmacia Lettre, 2013; 5(6): 24-30.
- Blois MS.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1985; 81, 1199-1200.
- Bohlmann F, Postulka S, Ruhnke J.** Polyacetylene compounds. XXIV. Polyynes of the species *Centaurea*. Chem. Ber, 1958; 91, 642-656.
- Bohlmann F, Burkhardt T, Zdero C.** Naturally occurring acetylenes. Academic Press, London. 1973.
- Bouchama KE.** Etude des composés flavoniques de la plante *Centaurea sempervirens* L., Thèse de magister, Université Mentouri – Constantine, 2003.

Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Ga Sastri L, Marceca MX, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*. 2006; 76, 61-68.

Bremer K. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics*. 1987 ; 3, 210–253.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier. 1993. p. 385 – 623.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. 1999. p. 461 – 769.

Bubenchikov VN, Kitvinenko VI, Popova TP. Phenolic compound of *Centaurea pseudomaculosa*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1992; 28(5), 507.

Buděšínský M, Šaman D. Annual reports on NMR spectroscopy. Academic press limited, Oval Road, London NW1 7DX. 1995; 30; 231-475.

Buronzo A. Grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires. 2008.

Burt S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 94, 223-253.

C

Chaverri C, Ciccio JF. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica, I. *Ocotea brenesii*. *Int. J. Trop. Biol*. 2005; 53, 431-436.

Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, Zhao M, Mosset P, Benayache F. On Line Screening, Isolation and Identification of Antioxidant Compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules*, 2017; 22, 239.

Couic-Marinier F, Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*. 2013; 52(525), 18-21.

Crète P. Précis de botanique. Masson, Paris, édition 2. 1965 ; 429.

Curtay JP, Robin J-M. Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*. 2000. p. 4.

D

- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc. Symp.* 1995; 61,1-31.
- Delaquais JP, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill *Cilantro*, *Coriander* and *Eucalyptus* essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 74, 101-109.
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Edition Lavoisier TEC & DOC édition Médicales Internationales. Pris. 2005. p. 14, 93, 94.
- De Maack F, Sablier M. Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. 1994. p. 2614.
- Desjobert JM., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis.* 1997; 25 (6), 13-16.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR. *Melisa officinalis* L essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; 56, 677-681.
- Djarri L, Medjroubi K, Akkal S, Elomri A, Seguin E, Vérité P. Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21, 647-649.
- 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, 1796-1799.
- Djeddi S, Sokovic M, Skaltsa H. Analysis of the essential oils of some *Centaurea* species (Asteraceae) growing wild in Algeria and Greece and investigation of their antimicrobial activities. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 2011; 14(6), 658-666.
- 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.

Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S, Kukic J. Antimicrobial anti-inflammatory anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 109, 458–463.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88, 308-316.

Dumlu MU, Gürkan E. A new active compound from *Centaurea* species. *Z. naturforsch.* 2006; 61c, 44-46.

Duong TTH, Antao S, Ellis NA, Myers SJ, Witting PK. Supplementation with a synthetic polyphenol limits oxidative stress and enhances neuronal cell viability in response to hypoxia-re-oxygenation injury. *Brain Research.* 2008; 1219, 8-18.

Duraffourd C, D'Hervicourt L, Lapraz JC. Cahiers de phytothérapie clinique.1. Examens de laboratoire galénique. *Eléments thérapeutiques synergiques*, 2^{ème} éd. Masson, Paris. 1990.

Dural H, Bagci Y, Ertugrul K, Demirelma H, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2003; 3, 11417–11425.

E

Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 2007; 21, 308-323.

Elghozi JL, Duval D. *Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion.* Paris. 1992; p. 289.

El-Naggar SF, Doskotch RW. Patulitrin and Acetyl Patulitrin, Flavonol Glycosides From *Lagascea mollis*. *J Nat Prod.* 1979; 42(1), 126-128.

Ergene A, Guler P, Tan S, Mirici S, Hamzaoglu E, Duran A. Antimicrobial and antifungal activity of *Heracleum sphondylium subsp. artvinense*. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5(11), 1087-1089.

Esmaeili A, Rustaiyan A, Nadimi M, Masoudi S, Tadayon F, Sedaghat S, Ebrahimpur N, Hajyzadeh E. Volatile Constituents of *Centaurea depressa* M.B. and *Carduus pycnocephalus* L. Two Compositae Herbs Growing Wild in Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2005; 17, 541-539.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 1992; 13, 341.

Evenari M, Schulze ED, Lange OL, Kappen L, Buschbom U. Long-term effects of drought on wild land cultivated plants in the Negev desert I Maximal rates of net photosynthesis. *Oecologia (Berl.)*. 1980 ; 45(1), 11-18.

F

Fabre AJ. Société internationale d'histoire. 1956.

Fain O. Mise au point : Carence en vitamine C. *La revue de médecine interne*. 2004; 25, 872-880.

Falleh H, Ksouri, R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. 2008 ; 331, 372-379.

Fernandez X, Cabrol-Bass N. Analyse des arômes, *Techniques de l'ingénieurs*. 2007; 1, 3233.

Flamini G, Antognoli E, Morelli I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*. 2001; 57, 559–564.

Flamini G, Ertugrul K, Cioni PL, Morelli I, Dural H, Bagci Y. Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *Pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*, *Biochemical Systematics and Ecology*. 2002; 30, 953-959.

Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. 2012; 83(5), 912-916.

Fortuna AM, De-Riscala EC, Catalan CAN, Gedrist E, Herz W. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochem.Syst. Ecol.* 2001; 29, 967-971.

France-Ida J. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info essence*. 1996; 3, 5-6.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*. 1995; 64, 97-112.

G

Garnero J. Phytothérapie-aromathérapie. *Encycl. Méd. Nat.* 1991.

- Gaussen H, Leroy F. Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2^{ème} édition. 1982 ; 424- 426.
- Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal Activity of the Essential Oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) Growing in Brazil. Braz. J. Microbiol. 2008; 39, 61-63.
- Georges SO. Les huiles essentielles - généralités et définitions, dans Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, éd. Maloine. 1979.
- Giseke PD. Praelectiones in Ordines Naturales Plantarum. Hoffmann, Hamburg. 1792.
- Grosjean N. L'aromathérapie, santé et bien-être par les huiles essentielles (Albin Michel, Paris ed.). 1993.
- Guenther E. «The Essential Oils». Vol. I, Krieger Publishing Co, Malabar. Florida. 1972.
- Guerin-Fauble V, Carret G. l'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV-INRA. 1999; 5-19.
- Guignard JL. Abrégé botanique, 9^{ème} édition. 1994; 203-204.

H

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2nded. Clarendon Press, Oxford. 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. Meth. Enzymol. 1990; 186, 1-85.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology. 2004; 142, 31-2.
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun. 1999; 9, 1-32.
- 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. Nat. prod. Res. 2012; 26(3), 203-208.
- Handique JG, Baruah JB. Polyphenolic compound: an overview. Reactive & Functional Polymers. 2002; 52, 163-188.

Harborne JB. Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis, 3rd Edn. *Chapman and Hall*, London, 1998. p. 235.

Harborne JB, Baxter H. the handbook of natural flavonoids, John Wiley and Sons. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore. 1999; (1).p. 61 (37).p. 205 (36).

Hudson JF. Food antioxidants. Elsevier Applied Science. London. 1990.

I

Ichai C, Quintard H, Orban JC. Désordres métaboliques et reanimation. Springer. 2011; 427-439.

Inouyea S, Takizawab T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact .J. Antimicrob. Chemother, 2001; 47, 565-573.

J

Janačković P, Tešević V, Milosavljević S, Vajs V, Marin PD. Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. Biochem. Syst. Ecol. 2004; 32, 355–357.

Joulain D. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, Perfumer & Flavorist. 1994; 19, 5-17.

K

Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 2003; 10, 813-829.

Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S, Khan IA. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycoside from *Centaurea hierapolitana*. Phytochemistry. 2007a; 68, 609-615.

Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan IA. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea L.* species. Phytother Res. 2007b; 21, 488-491.

Kargıoglu M, Cenkeci S, Evliyaoglu N, Konuk M, Kok MS, Bağcı y. An ethnobotanical survey of inner- West Anatolia. Turkey. Hum Ecol. 2008; 36, 763-777.

Kargıoglu M, Cenkci S, Serteser A, Konuk M, vural G. Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Hum Ecol.* 2010; 38, 429-450.

Karioti A, Skaltsa H, Lazari D, Sokovic M, Garcia B, Harvala C. Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* 2002; 57, 75-80.

Katsiotis ST, Chatzopoulou P, Svendsen AB. The Essential Oil of *Thymus sibthorpii* Benth. Growing Wild in Greece. *Sci. Pharm.* 1990; 58, 303-306.

Kerkatou M, Redouane-Salah A, León F, Brouard I, Mosset P, Menad A, Ameddah S, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze Extracts. *Asian J. Chem.* 2016; 28(12), 2695-2700.

Khatun M, Billah M, Quade MA. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka Univ. J. Sci.* 2012 ; 60(1), 5-10.

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.

Kose YB, Altintas A, Demirci B, Celik S, Baser KHC. Composition of the Essential Oil of Endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz From Turkey. *Asian Journal of Chemistry.* 2009; 21(3), 1719-1724.

Koukoulitsa E, Skaltsa H, Karioti A, Demetzos C, Dimas K. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. *Planta Med.* 2005; 68(7), 649-52.

Kováts E. Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System *Adv. Chromatogr.* 1965; (7), 229-247.

L

Lacolley P, Babuty D, Boulanger C, Ghaleh B, Loirand G, Pinet F, Samuel JL. Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, Paris. 2007. p. 312, 316, 317.

Lamendin H. Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. *Chir. Dent, Fr.* 2004; 1185, 78-80.

Lee CY, Sharma A, Cheong JE, Nelson JL. Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009; 19, 6326-6330.

Levrant J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284, 549-58.

Lograda T, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G, Khalfoune K, Silini H. Phyto-chemistry, antibacterial activity and chromosome number of *Centaurea solstitialis* L. Grown in Algeria. *Global. J. Res. Med. Plants & Indigen. Med*. 2013; 2(10), 675–684

Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Canigueral S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol Techn*. 2002; 45, 519-524.

M

Maataoui BS, Hmyene A, Hilali S. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 2006; 7(1), 3-8.

Mabberly DJ. *Plant book*, 2nd edition. 1997.

Magalhaes LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*. 2009; 77, 1559-1566.

Manayi A, Kurepaz-Mahmoodabadi M, Gohari AR, Ajani Y, Saeidnia S. Presence of phthalate derivatives in the essential oils of a medicinal plant *Achillea tenuifolia*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014; 22, 78.

Mann J. *Secondary metabolis*. Second edition. Clarendon press, Oxford. 1987. p. 374.

Marco JA, Sanz-Cervera F, Carda M. Sesquiterpene lactones from *Picris echioides*. *Phytochemistry*. 1992; 31, 2163-2164.

Marco JA, Sanz-Cervera JF, Garcia-Lliso V, Susanna A, Garcia-Jacas N. Sesquiterpene lactones, lignans and aromatic esters from *Cheirolophus* species. *Phytochemistry*. 1994; 37(4), 1101-1107.

Marco JA, Sanz-Cervera F, Yuste A, Sancenón F, Carda M. Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*. 2005; 66(14), 1644-1650.

Martynov II. *Tekhno-Botanicheskii Slovar*. Rossilska Akademia, St. Petersburg. 1820.

Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York. 1991.

Middleton M, Cox PJ, Jaspars M, Kumarasamy Y, Nahar L, Reid R, Sarker SD. Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 2003; 31(6), 653-656.

Mishio T, Houma T, Iwashina T. Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. *Biochem. Syst. Ecol.* 2006; 34, 180-184.

Modzelewska A, Sur S, Kumar KS, Khan SR. *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents.* 2005; 5, 477-499.

Molyneux P. The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004; 26, 211-219.

Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, Cnoud B. Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie.* 2002; 3(5), 201-208.

Mouffok S, Haba H, Lavaud C, Long C, Benkhaled M. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Rec. Nat. Prod.* 2012; 6(3), 292-295.

Mukherjee PK, Wahil A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian système of medicine. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 103, 25-35.

N

Nauciel C, Vildé JL. *Bactériologie médicale*, 2ème Ed. Masson. Paris. 2005. p. 5-10.

N'guessan K, Kadja B, Zirihi GN, Traoré D, Aké-Assi L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature.* 2009; 6(1), 1 -15.

O

Öksüz S, Serin S. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry.* 1997; 46(3), 545-548.

Olivier EJ. The Structure Elucidation of Germacranolide Sesquiterpene Lactones of the Genus *Melampodium* by Chemical and Spectral Methods." *LSU Historical Dissertations and Theses.* 1980; 3568.

https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/3568

Olson BE, Kelsey RG. Effect of *Centaurea maculosa* on sheep rumen microbial activity and mass in vitro. *J Chem Ecol.* 1997; 23 (4), 1131–1144.

Oroojaliana F, Kasara-Kermanshahia R, Azizic M, Bassamid MR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry.* 2010; 120,765-770.

Ozenda P. Flore du Sahara, Ed CNRS, Paris. France, 1977; 250-259.

P

Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Slater TF, Willson RL, Wolfenden BS. Free radicals and singlet oxygen scavengers : reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenylfuran and 1, 4-diazobicyclo (2, 2, 2)-octane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 98, 901-906.

Paris M, Hurabielle M. Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie, Tome I, édition Masson. 1981.

Peron L, Richard H. Epices et aromates, techniques et documentations Lavoisier. 1992; 73.

Peyron L. Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. 1992. p. 217 – 238.

Pibiri MC. Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat .polytechnique fédérale de Lausanne. 2005.

Picher MT, Seoane E, Tortajada A. Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *Stenophylla*. *Phytochemistry.* 1984 ; 23(9), 1995-1998.

Pistelli L. Comparaison des systèmes d'extraction des huiles essentielles avec une référence particulière aux liquides ioniques (IL). Université de Piz, Italy. 2015.

Plouvier V. Structure of flavone glycosides by nuclear magnetic resonance. Compounds of the genera, *Centaurea*, *Kerria*, *Rhus*, and *Scabiosa*. *Comptes Rendus des Séances de l'académie des sciences, Serie D: Sciences naturelles.* 1970; 270(22), 2710-2713.

Podsdek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables. *LWT-Food Science and Technology.* 2007 ; 40, 1-11.

Polatoglu K, Sen A, Bulut G, Bitis L, Gören N. Essential oil composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2014a; 17, 1268-1278.

Polatoglu K, Sen A, Bulut G, Bitis L, Gören N. Essential oil composition of *Centaurea kilaea* Boiss. and *C. cuneifolia* Sm. from Turkey. Natural Volatiles & Essential Oils. 2014b; 1, 55-59.

Q

Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2, C.N.R.S. Paris. 1963.

R

Rafi A, Tasneem US, Ashfaq A. The essential oils. Hamdard Medicus, XXXV. 1995; 1, 108.

Ribeiro NL, Nahar L, Kumarasamy Y, Mir-Babayev N, Sarker SD. Flavonoid C-glucosides and a lignans from *Centaurea macrocephala* (Compositae). Biochem. Syst. Ecol. 2002; 30, 1097-1100.

Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. Harvestplus handbook for carotenoid analysis. Technical Monograph Series. 2004. p. 3.

Rolo-Naranjo A, Rebolledo-Rios R, Melchor-Rodriguez K, Codorniu-Hernández E. Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid-protein interactions. Applied Mathematics and Computation. 2009; 215, 156-167.

Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Raccuglia RA, Bancheva S, Senatore F, Formisano C. Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. Biochemical Systematics and Ecology. 2009; 37, 426-431.

S

Sarker SD, Dinan L, Sik V, Rees HH. Moschatine: an unusual steroidal glycoside from *Centaurea moschata*. Phytochemistry. 1998; 48(06), 1039-1043.

Scheffer JJC. Various methods for the isolation of essential oils. Phytother. Res. 1996; 10, S6-S7.

- Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry*. 2009; 2, 114-118.
- Senatore F, Rigano D, De Fusco R, Bruno M. Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (Asteraceae), two species growing wild in Sicily. *Flav. Frag. J.* 2003; 18, 248-251.
- Senatore F, Formisano C, Raio A, Bellone G, Bruno M. Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp. *schowii* (DC.) Dostál growing wild in southern Italy and their biological activity. *Nat. Prod. Res.* 2008; 22(10), 825–832
- Sévent T, Tortra C. Plante, molécules et médicaments. Nathan, CNRS Editions. Paris.1994.
- Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey X, Folk medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 75, 95–115.
- Shoeb M, Mac-Manus SM, Jaspars M, Trevidu J, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo₂ colon cancer cells. 2006a; 62, 11172-11177.
- Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Nazemiyeh H, Sarker SD. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*. 2006b; 67, 2370-2375.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Met. Enzym.* 1999; 99, 152-178.
- Skaltsa SH, Mavrommati A, Constantinidis T. A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. *Swainsonianae* (Labiatae). *Phytochemistry*. 2000 ; 57, 235–244.
- Sofowora A. Screening Plants for Bioactive Agents. In: Medicinal plants and Traditional Medicinal in Africa, 2nd Ed. Spectrum Books Ltd, *Sunshine House*, Ibadan, Nigeria, 1993; p. 134 - 156.

Stagliano M. Actifs et additifs en cosmétologie, techniques et documentations, Lavoisier. 1992.

Susanna A, Garcia-Jacas N. Cardueae (Carduoideae). In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) Systematics evolution and biogeography of the compositae. IAPT, Vienna. 2009; 293–313.

T

Takeda K, Osakabe A, Saito S, Furuyama D, Tomita A, Kojima Y, Yamadera M, Sakuta M. Components of protocyanin, a blue pigment from the flowers of *Centaurea cyanus*. Phytochemistry. 2005; 66, 1607-1613.

Tarasov VA, Kasymov ShZ, Sidyakin GP. The isolation of Cnicin from *Centaurea squarrosa*. Chemistry of natural Compounds. 1975; 9, 414.

Tomás-Lorente F, Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Rivera D, Obón C. Phytochemistry. 1989; 28, 2141-2143.

Trease, GE., Evans WC., Pharmacognosy. 15th ed. London, Saunders Publishers. 2002.

Trendafilova A, Todorova M, Bancheva S. Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*. Biochem. Syst. Ecol. 2007; 35, 544-548.

Turgeon M. Profil des produits forestiers premiers transformation huile essentielle. Ministère des Ressources Naturelles secteur des forets direction du développement de l'industrie des produits forestiers. 2001.

Turkoglu A, Duru M E, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chem. 2007; 101, 267-273.

U

Ugur A, Duru ME, Ceylan O, Sarac N, varol O, Kivrak I. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). Nat Prod Res. 2009; 23(2), 149-167.

Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Archives Microbiol. 2000; 174, 233-238.

Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 2002; 83, 117-121.

V

Valenzuela AB, Nieto SK. Synthetic and natural antioxidants : food quality protecters. *Grasas y Aceites.* 1996; 47, 186-196.

Van Den Dool H, Kratz D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatog.* 1963; (11), 463-471.

W

Wang X, Quinn PJ. The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie.* 2006; 88, 1883-1888.

Wichtel M, Anton R. *Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques*, Ed. Tec et Doc. 1999.

Y

Yayli N, Yaşar A, Gülec C, Usta A, Kolayli S, Coşkunçelebi K, Karaoğlu Ş. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry.* 2005; 66, 1741–1745.

Yayli N, Yaşar A, Yayli N, Albay C, Aşamaz Y, Coşkunçelebi K, Karaoğlu S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*. *Pharmaceutical Biology.* 2009; 47(1), 7–12.

Z

Zahiri A. *Aromathérapie : un peu d'histoire...* Natura News : Science, Nutrition, Prévention et Santé. 2006.

Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, Stévigny C, Duez P, Benayache F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2016; 9(6), 554–561.

Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Aktumsek A. Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschy* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *persica* (Boiss.) Wagenitz from Turkey. *grasas y aceites*. 2011; 62(1), 90-95.

Zengin G, Aktumsek A, Boga M, Ceylan R, Uysal S. Essential oil composition of an uninvestigated *Centaurea* Species from Turkey: *Centaurea patula* DC. *TEOP*. 2016; 19(2), 2016. p. 485 – 491.

Zhang J, Pang DR, Huang Z, Huo HX, Li YT, Zheng J, Zhang Q, Zhaon YF, Tu PF, Li J. Flavonoids from whole plants of *Lagopsis supina*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2015; 40(16): 3224-3228 (Article in Chinese).

*Résumés en français, anglais et
en arabe*

Résumé

Ce travail porte sur l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea sempervirens*, synonyme: *Cheirolophus sempervirens* L. de la famille Asteraceae. Cette espèce a été récoltée de la région Constantinoise. Après extraction par macération suivie de séparations et purifications chromatographiques sur colonne de gel de silice greffée (diol), sur CCM et par HPLC semi-préparative phase inverse, 16 composés ont été obtenus des parties solubles dans le chloroforme et l'acétate d'éthyle de l'extrait EtOH-H₂O des parties aériennes. Les structures de 15 de ces composés ont été élucidées grâce à la combinaison des résultats des analyses des spectres de masse haute résolution en mode ESI positif, de RMN 1D (¹H, ¹³C) et de RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de cette espèce par GC-FID et GC-MS, a montré que les constituants majoritaires sont : le 6,10,14-triméthylpentadéca-2-one avec (12,4%) et le *épi*-toriléanol (5,1%). Cette analyse est effectuée pour la première fois sur cette espèce.

En matière d'évaluation d'activités biologiques nous avons soumis en premier lieu les trois extraits au dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux. Les résultats obtenus ont montré des teneurs plus importantes dans l'extrait acétate d'éthyle et à degré moindre l'extrait *n*-butanol. Ces travaux ont été suivis par l'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes, l'effet de piégeage du radical DPPH et le CUPRAC. Le meilleur résultat a été obtenu pour l'extrait acétate d'éthyle notamment dans la méthode CUPRAC où son effet est très proche de celui de la quercétine utilisée comme standard.

Le résultat de l'activité antibactérienne des trois extraits de la plante par la méthode de diffusion des disques dans un milieu de gélose n'a pas montré d'activité significative vis-à-vis des micro-organismes testés.

Mots clés : Asteraceae, *Centaurea sempervirens*, HPLC, GC-MS, Huiles essentielles, Activités antioxydante et antibactérienne.

Abstract

This work concerns the phytochemical study of *Centaurea sempervirens* synonym: *Cheirolophus sempervirens* L. from Asteraceae family. This species was collected from Constantine area. After extraction by maceration followed by chromatographic separations and purifications on columns of grafted silica gel (diol), TLC and semi-preparative reverse phase HPLC, 16 compounds were isolated from the chloroform and ethyl acetate extracts. Among these compounds, 15 were identified. The structure elucidations of these compounds were carried out by the combination of the results obtained from the analyses the high resolution positive electrospray ionization mass spectra, 1D NMR (^1H , ^{13}C) and 2D NMR (COSY, HSQC et HMBC) spectra as well as by comparing the results with the data of the literature.

The chemical composition of the essential oil of aerial parts of *C. sempervirens* studied by GC-FID and GC-MS, showed the presence of several chemical groups from which 6,10,14-trimethylpentadeca-2-one (12,4%) and *epi*-torilenol (5,1%) were the major components. This study was carried out for the first time.

The total phenolic and total flavonoid contents of the three extracts were determined, EtOAc extract had the highest phenolic and flavonoid contents followed by *n*-butanol extract.

This step was followed by the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity using two methods: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) and cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The best result was obtained for the AcOEt with CUPRAC method, where its effect is very closer to quercetin used as standard.

The result of the *in vitro* antibacterial activity of the three extracts by the disk-diffusion method in an agar medium showed no significant activity

Key words: Asteraceae, *Centaurea sempervirens*, HPLC, GC-MS, Essential oil, Antioxidant and antibacterial activities.

ملخص

هذا العمل يتعلق بالدراسة الفيتوكيميائية لنبته من العائلة المركبة وهي *Cenaturea Sempervirens* مرادف *Cheirolophus Sempervirens* L. قطفت هذه النبتة من ضواحي قسنطينة ، بعد عملية الإستخلاص المتبوعة بعملية فصل وتنقية كروماتوغرافية بواسطة (كروما ثوغرافيا العمود ، الطبقة الرقيقة و HPLC) تحصلنا على 16 مركب من مستخلص الكلور وفورم وأسيتات الإيثيل للأجزاء الهوائية . لقد تم تحديد البنى النهائية لـ 15 مركب بالإعتماد على تجميع المعطيات المقدمة من مطيافية الكتلة ، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ذات بعد واحد (H^1 , C^{13}) RMN1D وذات بعدين (COSY,HSQC et HMBC) إلى جانب مقارنة النتائج مع مختلف المراجع .

تحليل الزيت الأساسي للأجزاء الهوائية لهذه النبتة بواسطة GC-FID و GC-MS أظهر وجود مركبين أساسيين هما : $6,10,14 - triméthylpentadéca - 2-one$ (12,4%) و $épi - toriléno$ (5,1%) . هذه العملية أنجزت لأول مرة بالنسبة لهذه النبتة .

لتقويم الفعالية البيولوجية قمنا في البداية بتحديد إجمالي البوليفنولات والفلافونويدات للمستخلصات الثلاثة (الكلوروفورمي, أسيتات الإيثيل والبتانول) حيث أظهرت النتائج محتوى معتبر لهذه المركبات في مستخلص أسيتات الإيثيل متبوع بمستخلص البوتانول ، ثم قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة بواسطة طريقتين (طريقة إرجاع الجذع الحر DPPH و طريقة إرجاع معقد النحاس CUPRAC) حيث أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل نتائج جيدة بالنسبة (CUPRAC) أين كانت فعاليته مقاربة للمرجع quercétine .

بالنسبة للفعالية المضادة للبكتيريا لم تظهر المستخلصات الثلاثة فعالية جيدة

كلمات مفتاحية :

الفعالية ضد الأكسدة ,الزيت الأساسي , الفعالية ضد البكتيريا *Centaurea Sempervirens* , Asteraceae

HPLC ,GC –MS,

Essential Oil Composition of *Centaurea sempervirens* L. (Asteraceae)

Belbache Hanene¹, Mechehoud Youcef¹, Chalchat Jean-Claude², Figueredo Gilles³, Chalard Pierre², Benayache Samir¹, Benayache Fadila^{1*}

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174, Clermont-Ferrand, France.

³Laboratoire d'Analyses des Extraits Végétaux et des Arômes (LEXVA Analytique), 460 Rue du Montant, Beaumont, France.

Received: 20th Nov, 16; Revised: 5th Dec, 16; Accepted: 24th Dec, 16; Available Online: 15th January, 2017

ABSTRACT

The essential oil of the aerial parts of *Centaurea sempervirens* L. (Asteraceae), synonym : *Cheirolophus sempervirens* (L.) Pomel, was obtained by steam distillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. 30 components were identified corresponding to 78.5% of the total oil. Among the identified constituents, oxygenated compounds represented 33.4%, from which 21.2% were hydrocarbons, 10.7% were sesquiterpenes. The non oxygenated compounds were hydrocarbons (9.8%). Phthalates represented 35.3% of the total oil. The major components were 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one (12.4%) and *epi*-torilenol (5.1%). This is the first report on the chemical composition of the essential oil of this species.

Keywords: *Centaurea sempervirens* L., *Cheirolophus sempervirens* (L.) Pomel, Asteraceae, Essential oil composition.

INTRODUCTION

The genus *Centaurea* from the Asteraceae family is one of the most widely distributed plant genera in the world. This genus includes more than 500 species, 45 of which grow spontaneously in Algeria, with 7 species localized in the Sahara^{1,2}. Many *Centaurea* species are used in the popular medicine of many countries³⁻⁸. In addition, various studies have shown medicinal properties of *Centaurea* species such as antimicrobial⁹, antibacterial^{10,11}, hypoglycemic¹², antifungal¹³⁻¹⁶, cytotoxic and phytotoxic¹⁷⁻¹⁹, analgesic²⁰, anti-inflammatory and immunological²¹. *Centaurea* species are well known for their high structural diversity in major bioactive compounds, including triterpenes, flavonoids, lignans, fatty acids and sesquiterpene lactones²²⁻²⁹.

Studies conducted on the chemical composition of their essential oils showed the presence of fatty acids, hydrocarbon derivatives, phytol, β -eudesmol and caryophyllene oxide in the majority of them³⁰⁻³². Within the context of the study of *Centaurea* species growing in Algeria³³⁻³⁶, we have taken interest in the study of *Centaurea sempervirens* and more precisely the chemical composition of its essential oil. Previous studies on this plant led to the isolation of sesquiterpene acids and sesquiterpene lactones³⁷, flavonoids³⁸ and polyacetylenes^{39,40}. To the best of our knowledge there is no previous report on the essential oil composition of this species.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *Centaurea sempervirens*, synonym : *Cheirolophus sempervirens* (L.) Pomel⁴¹ were collected on June 2011 from Djebel El Wahch in the area of Constantine Northeast Algeria, and authenticated by professor Mohamed Kaabeche, Setif 1 university Algeria, according to Quezel and Santa (1963)¹. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University Frères Mentouri Constantine 1.

Extraction of the essential oil

The aerial parts (400 g) of *Centaurea sempervirens* were subjected to steam distillation in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oil was collected and dried over anhydrous sodium sulphate and kept at 4°C until analysis. The yield of the oil was calculated in relation of the dry weight of the plant.

GC-FID Analysis

The essential oil was analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5MS fused silica capillary column (5% -diphenyl-95% -dimethylpolysiloxane (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m), programmed from 50 °C (5 min) to 250 °C at 3 °/min and held for 10 min. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300 °C, respectively. The essential oil was diluted in acetone (3.5%, v/v) and injected in split mode (1/60), helium was used as a carrier gas (1.0 mL/min). Solutions of standard alkanes (C₈-C₂₀) were analyzed under the same conditions to calculate

Table 1: Composition of the essential oil of *Centaurea sempervirens* L. with retention times, retention indices and percentages.

Peak N°	RT	^b RI	^a Components	%
1.	6.169	983	Oct-1-en-3-ol	0.9
2.	6.829	1005	Hepta-2,4-dienal	0.4
3.	8.404	1100	Nonanal	0.8
4.	9.462	1165	Nonanol	1.0
5.	10.003	1201	Decanal	0.6
6.	10.895	1267	Nonanoic acid	1.9
7.	11.618	1315	Deca-2,4-dienal	0.4
8.	12.209	1367	Undecanol	1.7
9.	12.420	1383	β -Damascenone	0.5
10.	12.502	1388	Dodecan-2-one	0.7
11.	13.832	1494	1-Pentadecene	1.0
12.	14.652	1563	<i>epi</i> -Torilenol	5.1
13.	14.781	1574	1,5-Epoxyalvial-4(14)-ene	0.5
14.	14.879	1577	Spathulenol	1.4
15.	14.947	1582	Caryophyllene oxide	1.5
16.	15.015	1594	1-Hexadecene	0.3
17.	15.068	1597	Salvia-4(14)-en-1-one	0.4
18.	15.182	1609	β -Oplophenone	0.4
19.	15.763	1661	β -Eudesmol	1.4
20.	16.137	1694	1-Heptadecene	1.5
21.	16.387	1717	Pentadecanal	0.4
22.	17.696	1843	6,10,14-Trimethylpentadeca-2-one	12.4
23.	17.868	1860	Phthalate	2.3
24.	18.892	1963	Diisopentylphthalate	33.0
25.	20.202	2093	Phytol	1.0
26.	21.918	2299	Tricosane	1.6
27.	22.740	2399	Tetracosane	0.5
28.	23.529	2499	Pentacosane	1.8
29.	25.027	2700	Heptacosane	2.0
30.	26.426	2900	Nonacosane	1.1
Total identified				78.5
Grouped compounds				
hydrocarbons				9.8
Oxygenated hydrocarbons				21.2
Rose ketone				0.5
Oxygenated sesquiterpenes				10.7
Oxygenated diterpene				1.0
Phthalates				35.3

^aCompounds are listed in order of their RI

^bRI (retention index) measured relative to *n*-alkanes (C₈-C₂₀) using HP-5MS

retention indices (RI) with Van del Dool and Kratz equation.

GC-MS Analysis

Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) Model 7890/5975, equipped with HP-5MS capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) programmed with the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) ionization was set in positive electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was set at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230 °C and 180 °C, respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the *m/z* range 33-450. The essential oil constituents were identified by matching their mass spectra

and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries such as Adams⁴² and Mc Lafferty & Stauffer⁴³. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

RESULTS AND DISCUSSION

The steam distillation of the essential oil of *Centaurea sempervirens* gave a viscous liquid with a green color and a strong odor. The yield of essential oil was 0.2% (w/w) in relation to the dry weight of the plant. The analysis and identification of the compounds of the essential oil was performed using the GC-MS. The general chemical profile of the essential oil, the percentage content and retention indices of the constituents are summarized in Table 1. This investigation allowed the identification of 30 constituents

corresponding to 78.5% of the total oil. Among the identified constituents, oxygenated compounds represented 33.4%, from which 21.2% were hydrocarbons, 10.7% were sesquiterpenes. The non oxygenated compounds were hydrocarbon derivatives (9.8%). Phthalates represented 35.3% of the total oil. The major components were diisopentylphthalate (33.0%); 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one (12.4%) and *epi*-torilenol (5.1%). The presence of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one as main component of *C. sempervirens* agreed with the reported results on *C. grisebachii* subsp. *grisebachii*⁴⁴ while the presence of the phthalate esters could be explained in most cases by a probable pollution of the harvest area of studied plants⁴⁵.

To the best of our knowledge this is the first report on essential oil composition of *Centaurea sempervirens* L.

CONCLUSION

We report for the first time the essential oil composition of *Centaurea sempervirens* collected from the area of Constantine in the Northeast of Algeria. Analysis by GC-FID and GC-MS allowed the identification of 6,10,14-trimethyl-pentadeca-2-one (12.4%) and *epi*-torilenol (5.1%) as major components. In addition, the presence in significant amount of hydrocarbons (9.8%), oxygenated hydrocarbons (21.2%) and oxygenated sesquiterpenes (10.7%) was in accordance with the chemical composition of other *Centaurea* species.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to professor Mohamed Kaabeche (Setif 1 university, Algeria) for the identification of the plant material and MESRS (DGRSDT) for financial support.

REFERENCES

1. Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. CNRS Paris, edn. Vol. II, 1963. p. 1016-1032.
2. Ozenda P. Flore du Sahara Septentrional et Central. CNRS. 1958. p. 450.
3. Vázquez FM, Suarez MA, Pérez, A. Medicinal plants used in the Barros Area, Badajoz Province (Spain). J. Ethnopharmacol. 1997; 55(2), 81–85.
4. Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species. GU J. Sci. 2004; 17(4),149-164.
5. Baytop T. Türkiye'de bitkiler ile tedavi (Geçmişte ve bugün). Istanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999; p.316.
6. Alapetite GP. Flore de la Tunisie. Imprimerie Officielle de la RépubliqueTunisienne: Tunis 1981, p. 1060.
7. Fakhfakh JA, Damak M. Sesquioneolignans from the flowers of *Centaurea furfuracea* Coss. et Dur. (Asteraceae). Nat. Prod.Res. 2007; 21(12),1037–1041.
8. 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.
9. Karioti A, Skaltsa H, Lazari D, Sokovic M, Garcia B, Harvala C. Secondary Metabolites from *Centaurea deusta* with Antimicrobial Activity. Z. Naturforsch., C. 2002; 57c, 75-80.
10. Yesilada E, Gürbüz I, Shibata H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. J. Ethnopharmacol. 1999; 66(3), 289-293.
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. Chucla MT, Lamela M, Gato A, Cadavid I. *Centaurea corcubionensis*: a study of its hypoglycemic activity in rats. Planta Med. 1988; 54, 107–109.
13. Skaltsa H, Lazari D, Garcia B, Pedro JR, Sokovic M, Constantinidis T. Sesquiterpene lactones from *Centaurea achaia*, a greek endemic species. Antifungal activity. Z. Naturforsch. 2000; 55c, 534-539.
14. Vajs V, Todorović N, Ristić M, Tešević V, Todorović B, Janačković P, Marin P, Milosavljević S. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. Phytochemistry. 1999; 52, 383-386.
15. Barrero AF, Oltra JE, Alvarez M, Raslan DS, Saúde DA, Akssira M. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. Fitoterapia. 2000; 71, 60.
16. Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H. VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. J. Comput. Aided Mol. Des. 2005; 19(8), 617–623.
17. Koukoulitsa E, Skaltsa H, Karioti A, Demetzos C, Dimas K. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines *in vitro*. Planta Med. 2002; 68(7), 649-652.
18. Tukov FF, Anand S, Gadepalli RSVS, Gunatilaka AAL, Mathews JC, Rimoldi JM. Inactivation of the Cytotoxic Activity of Repin, a Sesquiterpene Lactone from *Centaurea repens*. Chem. Res. Toxicol. 2004; 17(9), 1170-1176.
19. Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia 2005; 76(7-8),744-746.
20. 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.
21. Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Bodart P, Tits M, Angenot, L. Antiinflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. J. Ethnopharmacol. 1999; 68(1-3), 235–241.
22. Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. Phytochem. Lett. 2009; 2(3), 114-118.
23. 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.
24. 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.
25. Shoeb M, MacManus SM, Jaspars M, Kong-Thoo-Lin P, Nahar L, Celik S, Sarker SD. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. Braz. J. Pharmacog. 2007; 17(2), 155-159.
26. Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin PK, Nazemiyeh H, Sarker SD. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. Phytochemistry 2006; 67(21), 2370-2375.
27. Demir S, Karaalp C, Bedir E. Unusual sesquiterpenes from *Centaurea athoa* DC. Phytochem. Lett. 2016; 15, 245-250.
28. 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.
29. 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.
30. Senatore F, Formisano C, Raio A, Bellone G, Bruno M. Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp. *schowii* (DC.) Dostál growing wild in southern Italy and their biological activity. Nat. Prod. Res. 2008; 22(10), 825-832.
31. Polatoglu K, Sen A, Bulut G, Bitis L, Gören N. Essential Oil Composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. J. Essent. oil bear. Pl. 2014; 17(6), 1268-1278.
32. 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(4), 580-585.
33. Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P, Chalchat JC, Boumaza O, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. Essential Oil Composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(9), 1545-1548.
34. Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, Stévigny C, Duez P, Benayache F. Chemical constituents, Cytotoxic, antifungal and Antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.). Maire. Asian Pac. J. Trop. Med. 2016, 9(6), 554-561.
35. Bicha S, Chalard P, Hammoud L, León F, Brouard I, Garcia VP, Lobstein A, Bentamene A, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. Maroccanin: a new γ -lactone and Other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). Rec. Nat. Prod. 2013; 7(2), 114-118.
36. Boudjerda A, Zater H, Benayache S, Chalchat JC, González-Platas J, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica* Biochem. Syst. Ecol. 2008; 36 (5-6), 461- 466.
37. Marco. J A, Sanz-Cervera J F, Garcia-Lliso V, Susanna A, Garcia-Jacas N. Sesquiterpene lactones, lignans and aromatic esters from *Cheirolophus* species. Phytochemistry 1994; 37(4), 1101-1107.
38. Plouvier V. Structure of flavone glycosides by nuclear magnetic resonance. Compounds of the genera, *Centaurea*, *Kerria*, *Rhus*, and *Scabiosa*. Comptes Rendus des Séances de l'académie des sciences, Serie D: Sciences naturelles 1970; 270(22), 2710-2713.
39. Bohlmann F, Postulka S, Ruhnke J. Polyacetylene compounds. XXIV. Polyynes of the species *Centaurea*. Chem. Ber. 1958; 91, 642-656.
40. Bohlmann F, Burkhardt T, Zdero C. Naturally occurring acetylenes. Academic Press, London. 1973.
41. The Plant List (2010). Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
42. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.
43. Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York. 1991.
44. Djeddi S, Sokovic M, Skaltsa H. Analysis of the essential oils of some *Centaurea* species (Asteraceae) growing wild in Algeria and Greece and investigation of their antimicrobial activities. J. Essent. Oil Bear. Pl. 2011; 14(6), 658-666.
45. Manayi A, Kurepaz-mahmoodabadi M, Gohari AR, Ajani Y, Saeidnia S. Presence of phthalate derivatives in the essential oils of a medicinal plant *Achillea tenuifolia*. DARU 2014; 22(1), 78-83.