

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° de série.....

N° d'ordre.....

MEMOIRE
Pour obtenir le grade de
MAGISTER
(En CHIMIE ORGANIQUE)
Option PHYTOCHIMIE

ISOLEMENT ET DETERMINATION DES METABOLITES SECONDAIRES
DE L'EXSUDAT TOLUENE- ACETATE D'ETHYLE DE *Centaurea calcitrapa*
(*ASTERACEAE*)

Sous la direction du:
Professeur SAMIR BENAYACHE

Présenté par:
KITOUNI RACHID

Devant le JURY

M ^{me} F. BENAYACHE	Pr.	Université Mentouri	présidente
M S. BENAYACHE	Pr.	Université Mentouri	rapporteur
M. A. BELLATAR	Pr.	Université Mentouri	Examineur
M. A. TENIOU	Pr.	Université Mentouri	Examineur
M. A. BENTAMENE	M.C.	Université Mentouri	Examineur

Février 2007

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mes frères et ma sœur

A tous mes amis

Merci pour tous ...

REMERCIEMENTS

CE TRAVAIL A ÉTÉ RÉALISÉ SOUS L'INTELLIGENTE DIRECTION DU PROFESSEUR : MONSIEUR S. BENAYACHE DIRECTEUR DE LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCE NATUREL ET DE LA SYNTHÈSE ORGANIQUE, ET JE TIENS A LUI EXPRIMER MA PROFONDE GRATITUDE POUR M'AVOIR AIDÉ À MENER À BON TERME MON TRAVAIL.

JE REMERCIE M^{ME} LE PROFESSEUR MADAME F. BENAYACHE POUR L'HONNEUR QU'ELLE ME FAIT EN ACCEPTANT LA PRÉSIDENTE DU JURY.

JE REMERCIE MESSIEURS : A. BELLATAR, A. TENIOU, A. BENTAMENE D'AVOIR ACCEPTÉ DE FAIRE PARTIE DU JURY.

JE REMERCIE MESSIEURS : M. BOUHROUM, Y. MECHEHOUD ET H. DENDOUGI POUR LEUR AIDE LORS DE LA PRÉPARATION DE CETTE THÈSE.

JE REMERCIE M^{ELLE} O. BENAÏSSA, S. BICHA, ET MONSIEUR A. BOUTITI, C. BENSOUÏSI, A. BENGUERBA, E. KOLLI, ET QUE TOUS MES AMIS NOMBREUX POUR LES CITER, TROUVENT ICI L'EXPRESSION DE MES REMERCIEMENTS POUR LEUR AIDE ET ENCOURAGEMENTS LORS DE LA PRÉPARATION DE CETTE THÈSE.

Avant propos

*« things should be made as simple
as possible but not simpler »
Albert Einstein*

Si l'on examine aujourd'hui les substances nouvelles introduites sur le marché pharmaceutique, on remarque que beaucoup d'entre elles sont des molécules d'origine naturelle, héritées des traditions thérapeutiques, parfois très anciennes et confirmées dans leurs indications par un long usage [1].

Une large part des médicaments fondamentaux actuels fait partie de l'héritage des traditions thérapeutiques ancestrales, car les thérapeutiques modernes s'enracinent pour une large part dans le passé.

Le développement des méthodes d'analyse et des techniques modernes a permis l'isolement et l'identification de plusieurs structures organiques complexes. Malgré cela, les secrets du monde végétal ne sont pas tous révélés, car on est loin de découvrir et d'exploiter toutes les richesses du royaume végétal [2].

Toutes ces considérations ont fait que notre laboratoire s'est attelé depuis de nombreuses années à valoriser et mettre en évidence les substances naturelles contenues dans notre patrimoine végétal largement inexploré.

SOMMAIRE

Page

Avant propos	1
Introduction	2
<u>Chapitre I : Les flavonoïdes</u>	4
I.1.Introduction	4
I.2. Flavonoïdes, Distribution, Classification	5
I.2.1. Classification des flavonoïdes selon la composition chimique	6
a-Flavones, Flavonols	6
b-Flavanones et dihydroflavonols	6
c-Biflavonoïdes	6
d-Chalcones, aurones	7
d-Les anthocyanes	7
I. 3. Origine biosynthétique	9
I.4. Les substitutions des flavonoïdes	11
I.4.1 La O- substitution	11
I.4.1.a. l'hydroxylation	11
I.4.1.b. la methoxylation	12
I.4.1.c. La O-glycosylation	12
I.4.2. La C-Substitution	13
I.4.2.a. La C-méthylation	13
I.4.2.b. La C-glycosylation	14
I.5. Analyse structurale des flavonoïdes	15
I.5.1.Méthode chromatographique	15
Relation R_f -structure	16
I.5.2. Méthodes spectroscopiques	17
A. Spectrophotométrie UV-Visible	17
B. Spectrométrie de masse	22
C. Spectroscopie RMN ^1H	23
D. Spectroscopie RMN ^{13}C	24
I.6. activités biologiques des flavonoïdes	25
I.7.Conclusion	27
<u>Chapitre II : les sesquiterpène lactones</u>	28
II.1.Introduction	28
II.2.Les différentes classes des sesquiterpène lactones	28
II.3. la biogenèse des lactones sesquiterpéniques	30
II.4.Classification selon les squelettes de carbone	34
II.4.1.Les lactones sesquiterpéniques acycliques:	34
II.4.2.Les lactones sesquiterpéniques monocycliques	34
II.4.2.1.Les germacranolides:	34
II.4.2.1.1Les <i>héliangolides</i>	34
II.4.2.1.2.Les <i>mélampolides</i>	34

II.4.2.2. Les <i>seco</i> -eudesmanolides-1,10	34
II.4.2.3. Les élémanolides	35
II.4.2.4. Les xanthanolides	35
II.4.3. Les Lactones sesquiterpéniques bicycliques	35
II.4.3.1. Les eudesmanolides	36
II.4.3.2. Les Guaianolides	36
II.4.3.3. Les pseudo-guaianolides	37
II.4.3.4. Les eremofilanolides	37
II.4.3.5. les bakkenolides	37
II.4.4. sesquiterpène lactones polycycliques :	38
II.5. l'activité biologique des sesquiterpène lactones	38
II.6. Conclusion	39
<u>Chapitre III : étude phytochimique</u>	40
III.1. Étude Botanique	40
III.1.1. Le genre <i>Centaurea</i>	40
III.1.1.1. Introduction :	40
III.1.1.2. Propriété biologiques des Centaurées :	41
III.1.2. l'espèce <i>Centaurea Calcitrapa</i>	41
III.1.2.1. Place dans la systématique	41
III.1.2.2. description Botanique	42
III.2. Etude Chimique	43
III.2.1. Les Travaux Antérieurs	43
III.2.2. Les travaux personnels	47
III.2.2.1. Matière végétale	47
III.2.2.2. Méthode d'extraction	47
III.2.2.3. Séparation chromatographique	47
<u>Chapitre IV : Résultats et Discussions</u>	57
IV.1. Introduction	57
IV.1. l'analyse structurale du produit CD4R	57
IV.1.1. Comportement chromatographique	57
IV.1.2. Les données spectrales	58
IV.1.2.1. Spectroscopie UV- Visible	58
IV.1.2.2. Spectroscopie RMN proton	61
IV.2. l'analyse structurale du produit CB7R	65
IV.2.1. Comportement chromatographique	65
IV.2.2. Les données spectrales	65
IV.2.2.1. Spectroscopie UV- Visible	65
IV.2.2.2. Spectroscopie RMN proton	68
IV.3. l'analyse structurale du produit CF3R	72
IV.3.1. Comportement chromatographique	72
IV.3.2. Les données spectrales	72
IV.3.2.1. Spectroscopie UV- Visible	72
IV.3.2.2. Spectroscopie RMN proton	75
IV.4. l'analyse structurale du produit CD3	79
IV.4.1. Comportement chromatographique	79
IV.4.2. Les données spectrales	79

IV.4.2.1.Spectroscopie UV- Visible	79
IV.4.2.2.Spectroscopie RMN proton	82
IV.5.l'analyse structurale du produit CD1	86
IV.5.1.Comportement chromatographique	86
IV.5.2.Les données spectrales	86
IV.5.2.1.Spectroscopie UV- Visible	86
IV.5.2.2.Spectroscopie RMN proton	89
IV.6.l'analyse structurale du produit CE1	92
IV.6.1.Comportement chromatographique	92
IV.6.2.Les données spectrales	92
IV.6.2.1.Spectroscopie UV- Visible	92
IV.6.2.2.Spectroscopie RMN proton	95
IV.7. .l'analyse structurale du produit CC1	98
Conclusion	111
Références	112

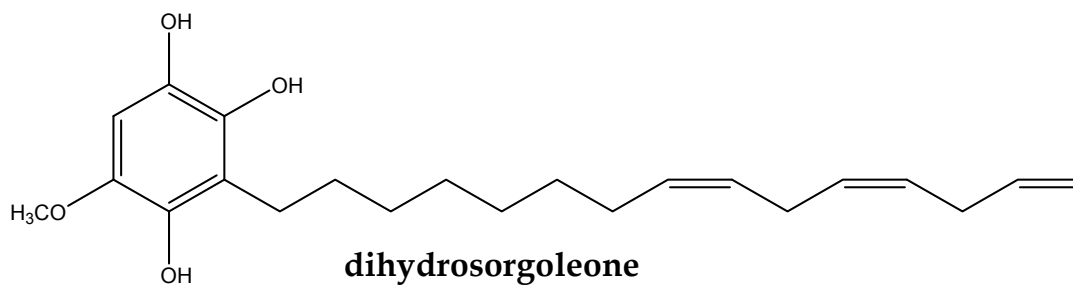
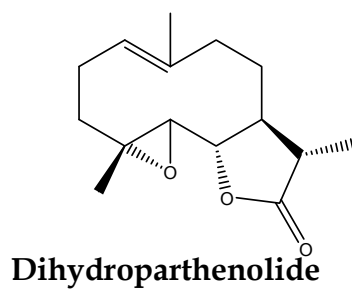
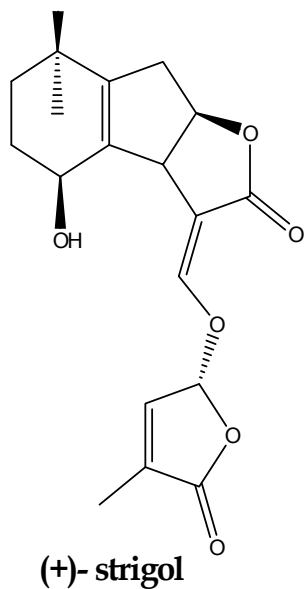
Introduction

« *Un désir réalisé est source de vie* »

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules, une source immense de molécules chimiques complexes utilisées dans les fragrances, l'agroalimentaire, et l'industrie pharmaceutique. La plupart des plantes considérées comme mauvaises herbes sont très utilisées dans la phytothérapie. Ces plantes, lorsqu'elles sont introduites dans un environnement libre et loin de leurs prédateurs naturels, investissent leur énergie dans la production chimique et dans la reproduction [3].

Trois classes de composés ont été décrites comme ayant une action stimulante sur la germination: la dihydrosorgoleone, les strigolactones et les sesquiterpènes lactones [4]. Le goût amer et la toxicité de certaines plantes seront un indice de la richesse de cette plante en certains métabolites secondaires, qui sont biologiquement actifs [5-7]. L'isolement et l'identification de ces composés révèlent les secrets de l'activité de ces plantes.

Ces dernières années, notre laboratoire s'est beaucoup intéressé à l'étude phytochimique des plantes de la famille des *Composées* pour leurs qualités et leur richesse en métabolites secondaires telles que les polyphénols [8], les lactones [9], les flavonoïdes [10-12] et les sesquiterpènes lactones [13-16], qui ont démontré une variété d'activités biologiques anti-inflammatoire, cytotoxique [17-19] et anti-tumorale [20].



L'objet de ce travail est l'extraction, la purification, et la détermination structurale des lactones sesquiterpéniques et des flavonoïdes présents dans la plante *Centaurea calcitrapa*.

LES FLAVONOÏDES

I.1. Introduction

Le mot « flavonoïde » a été introduit en 1952 par HINREIER pour désigner tous les pigments ayant un squelette $C_6-C_3-C_6$ analogue à celui des flavones (y compris les anthocyanes), lui-même dérivant du Latin *flavus* qui signifie jaune [21].

Les flavonoïdes sont presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigment : tel est le cas des flavones et des flavonols incolores co-pigmentant et protégeant les anthocyanosides [2]. Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen, condition de la survie de l'espèce végétale [2].

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet.

I.2. Flavonoïdes, Distribution, Classification

L'étude des Flavonoïdes a suscité notre intérêt, du fait de leur intérêt pharmacologique, de leurs nombreuses implications dans des domaines biologiques et de leur diversité structurale (plus de 4000 structures flavoniques identifiées à l'heure actuelle) [22].

Ils constituent l'un des grands groupes de phénols, et sont des constituants caractéristiques des plantes vertes à l'exception des algues [23].

On signale qu'environ 2% du carbone photosynthétique global sont incorporés dans la biosynthèse flavonique [22-23].

Abondants dans les plantes supérieures, on les rencontre essentiellement dans les feuilles et les fleurs. Mais ils sont également signalés dans les racines, le bois, l'écorce, le pollen, le nectar, les baies et les grains [23]. Leur concentration dans la cellule végétale excède souvent 1 μ M [25].

Très répandus dans les végétaux, les flavonoïdes existent sous forme de combinaisons, les plus fréquentes étant les hétérosides [21]. Ainsi, les flavonoïdes glycosylés se trouvent principalement dans les vacuoles et leurs aglycones sont présents dans les zones lipophiles, comme les glandes (à sécrétion) huileuses ou les couches de cire [25], telles les glandes de l'odorat du castor, la propolis (abeilles à sécrétion), et les ailes des papillons. Quant à leurs aglycones O-méthylés on les trouve dans le cytoplasme [24].

On peut les rencontrer aussi dans les chloroplastes des feuilles des plantes supérieures [26]. Comme il est possible de les localiser fixés sur les héli-cellules des parois cellulaires [27].

Les génines sont des dérivés polyhydroxylés, parfois méthoxylés ou méthylés de la chromone ou benzol γ -pyrone, Fig. 1 [28].

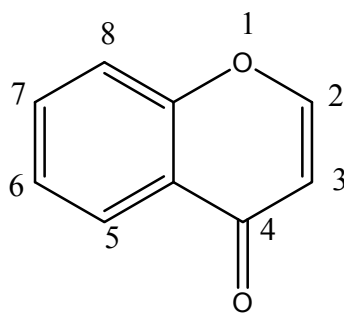


Fig.1

I.2.1. Classification des flavonoïdes selon la composition chimique

Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées ci-dessus, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C₅-C₇ et C₄.

a- Flavones, Flavonols

Ces molécules représentent la majorité des flavonoïdes connus. Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et en C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C₄ [2].

b- Flavanones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie.

Dans les Flavanones naturelles, le carbone C₂ est normalement de configuration (2S). Si, pour les dihydroflavonols, quatre isomères sont théoriquement possibles, la presque totalité des composés de la série connus à ce jour sont de configuration 2R ou 3R, le phényle et l'hydroxyle étant en *trans* [2].

c- Biflavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones, très réactifs, C₆ ou C₈. La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavanones [2].

d- Chalcones, aurones

Les chalcones, dépourvus de l'hétérocycle central, sont caractérisés par la présence d'un chaînon tri-carboné cétonique dont la liaison α - β est insaturée [2].

e- Les anthocyanes

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, et bleu en milieu basique : ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. Ils ont une structure $C_6-C_3-C_6$ dans laquelle l'élément en C_3 est sous forme d'ions pyrilium, alors que l'oxygène a une structure oxonium ionique. Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidique [2].

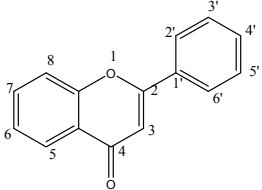
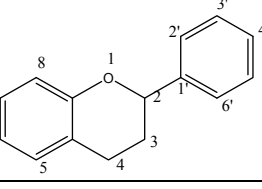
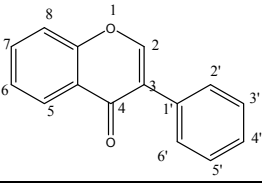
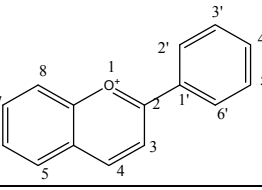
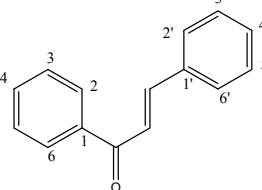
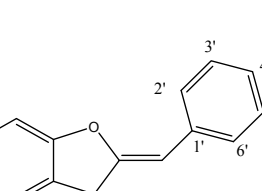
CLASSES		PRINCIPALES SUBSTANCES		
Dérivés	Structure	Nom de la famille	Nom	Hydroxylation
Phenyl-2-chromone		Flavone Flavonol Flavanone (C ₂ -C ₃ liaison simple)	apigénine myricétine butine	5, 7, 4' 3, 5, 7, 3', 4', 5' 7, 3', 4'
Phenyl-2-chromone		Catéchines (flavanols-3)	gallocatechine	5, 7, 3', 4', 5'
Phenyl-3-chromone		Isoflavone	genisteine	5, 7, 4'
Flavylium		Anthocyanidine	cyanidine	3, 5, 7, 3', 4'
Chalcone		Chalcone	Buteine	3, 4, 2', 4'
Aurone		Aurone	aureusidine	4, 6, 3', 4'

Tableau 1 : les différentes classes de flavonoïdes

I. 3. Origine biosynthétique

L'origine des flavonoïdes est inscrite en filigrane dans leur structure. Elle apparaît bien dans celle des chalcones : condensation d'un tri-acétate (cycle A) et d'un acide cinnamique (cycle B), la cyclisation engendrant le cycle pyranique central. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de précurseurs radio marqués et par des études au niveau enzymatique, aussi bien sur des cultures de tissus que sur la plante entière (les pétales en particulier).

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone-synthase, de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester de la co-enzyme A et d'un acide hydroxycinnamique. En règle générale, le 4-coumaroyl-coenzyme A (l'incorporation de caféoyl-CoA semble limitée à quelque espèce, l'hydroxylation supplémentaire du noyau B se faisant tardivement). Le produit de la réaction est une chalcone, la 4,2',4', 6'-tétrahydroxychalcone ou, si la condensation a lieu en présence d'une polyacétate-réductase à NADPH, une 6'-désoxychalcone, la 4,2',4'-trihydroxychalcone. Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone racémique. En fait, la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone isomérase, qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone, la naringénine. Cette dernière divergera vers plusieurs voies conduisant aux différentes classes flavoniques: les isoflavones, les flavones et les dihydroflavonols.

On notera en particulier le rôle important des dihydroflavonols à partir desquels deux grandes classes sont synthétisées : les anthocyanes et les flavonols. Le schéma suivant illustre la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes [2].

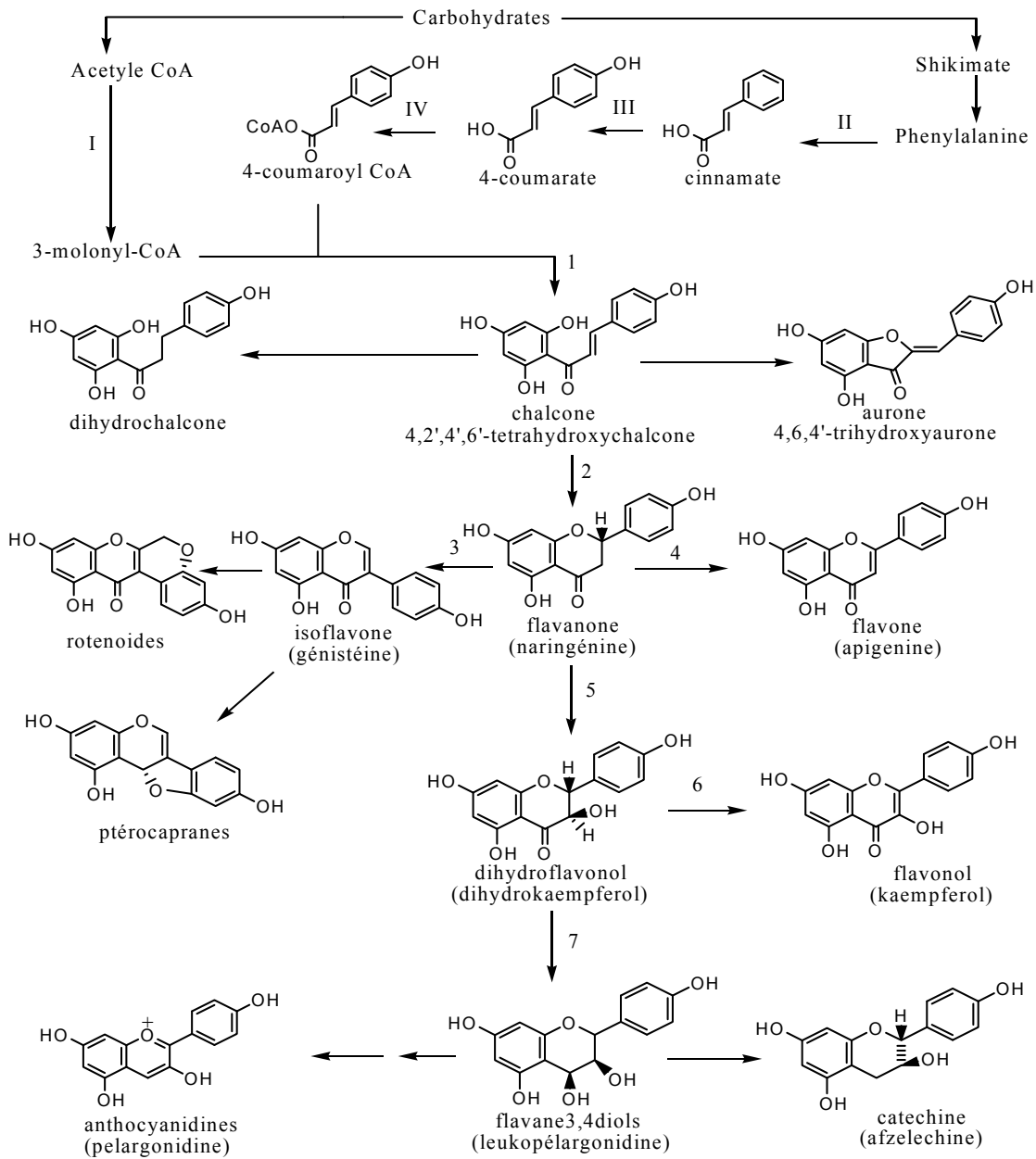


Fig. 2. Biosynthèse des flavonoïdes

I Acetyl CoA

II Phenylalanine ammonia

III Cinnamate 4-hydroxylase

IV 4-Coumrate : CoA ligase

1 Chalcone synthase

2 polyketide réductase

3 Chalcone isomérase

4 2-Hydroxyisoflavonesynthase

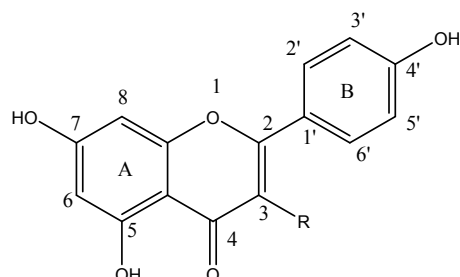
5 2-Hydroxyisoflavondehydratase

6 Flavone synthase

7 Flavanone 3-hydroxylase

I.4. Les substitutions des flavonoïdes

Il existe différents processus de substitution du squelette flavonique qui sont à l'origine de l'extraordinaire diversité des structures flavoniques. Le squelette de base de la structure flavonique est le suivant :



R=H Flavone (apigénine)

R=OH Flavonol (kaempferol)

Les composés ci-dessus sont présents dans la majorité des *Centaurees*, notamment l'espèce *Centaurea calcitrapa* [29, 30].

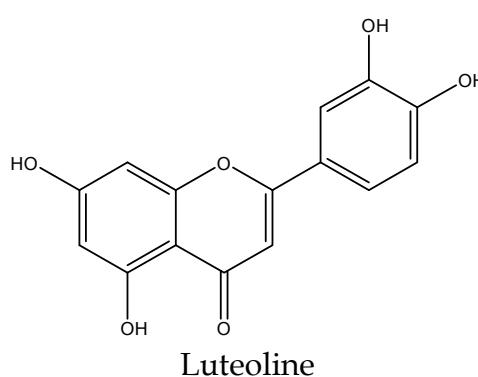
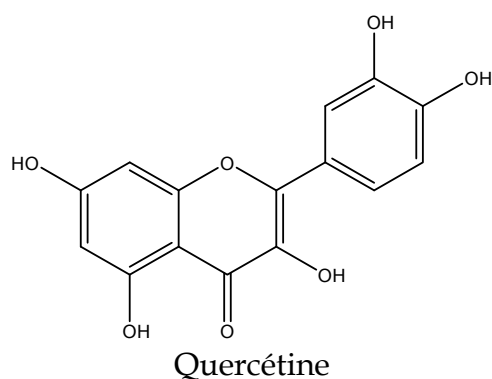
I.4.1 La O- substitution

I.4.1.a. l'hydroxylation

Les hydroxyles 5 et 7 viennent s'introduire avant la formation du noyau A. pour ce fait, ils sont considérés comme des hydroxyles originels. Il est même pour l'hydroxyle en 4' apporté par le précurseur (P- Coumaroyl) du noyau B.

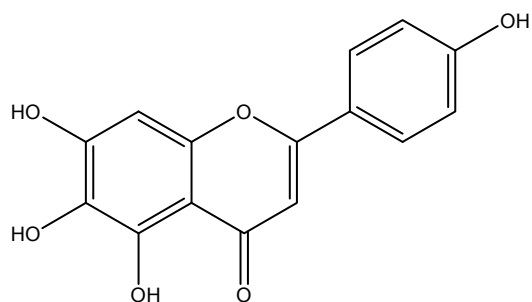
Quant aux extra hydroxyles, ils concernent toutes les autres positions d'où 6, 8 sur A et 3', 5' sur B.

EXEMPLE :

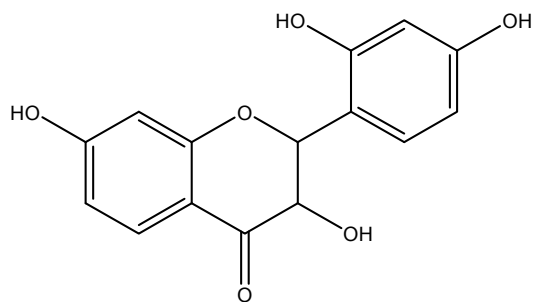


Ces deux produits ont été rencontrés dans de nombreuses espèces du genre [29-35].

Remarque : exceptionnellement des OH peuvent exister en position 2' pour les flavonone [30, 36]



Scutellareine
Extraite de *C. Apiin*, *C. Scabiosa*,
C. Deperssa.

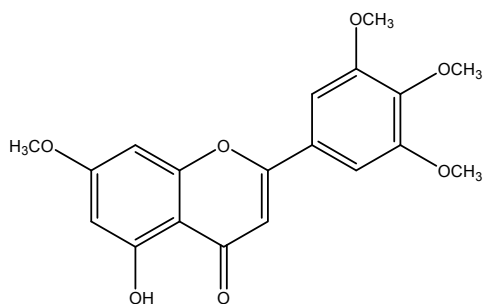


Morine
Extraite de *C. Calcitrapa*

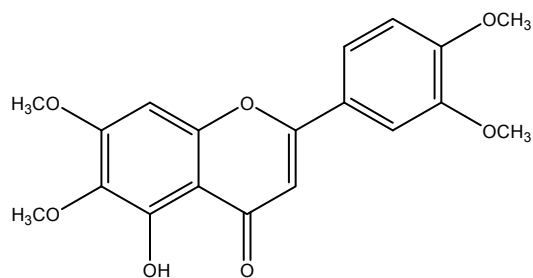
I.4.1.b. la methoxylation

C'est la méthylation des groupements OH aussi bien originels que les extra hydroxyles.

EXEMPLE :



Corymbosine extraite de
C. Incana [36]



3',4',7-triméthylethernepetin
Extraite de *C. Brugurana* [37]

I.4.1.c. La O-glycosylation

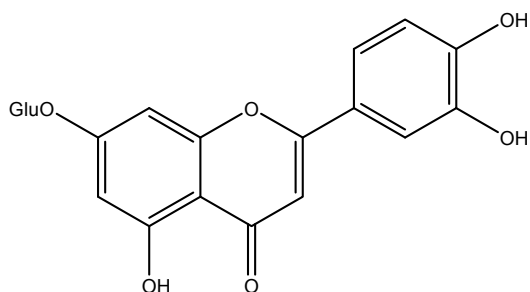
La glycosylation constitue un processus destiné à décharger les aglycones phénoliques de leur potentiel réactif vis-à-vis des autres constituants cellulaires et à faciliter leur stockage en solution dans le compartiment vacuolaire [22].

La O-glycosylation se fait préférentiellement avec l'hydroxyle en 7 chez les flavones et les flavanones et en 3 chez les flavonols.

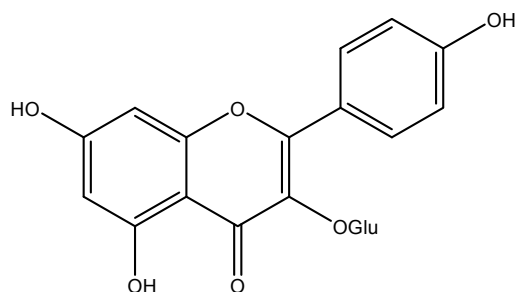
La liaison s'effectue entre un OH phénolique et un OH alcoolique d'un sucre tel : le glucose, le rhamnose, le xylose, L'arabinose, le mannose, le fructose etc....

Un deuxième sucre peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique, soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé.

EXEMPLE :



Luteoline 7-O-glucoside
Extraite de *C. Militensis* [38]



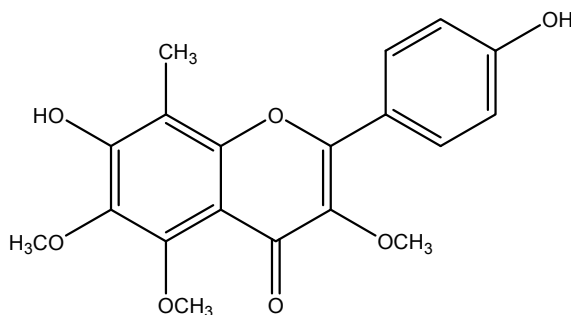
Kaempferol 3-O-glucoside
Extraite de *C. Calcitrapa* [39]

I.4.2. La C-Substitution

I.4.2.a. La C-méthylation

La C -méthylation est une des substitutions complexes des flavonoïdes. La liaison se fait entre le carbone d'un méthyle et un ou plusieurs carbones de cycle benzéniques A ou B.

EXEMPLE :

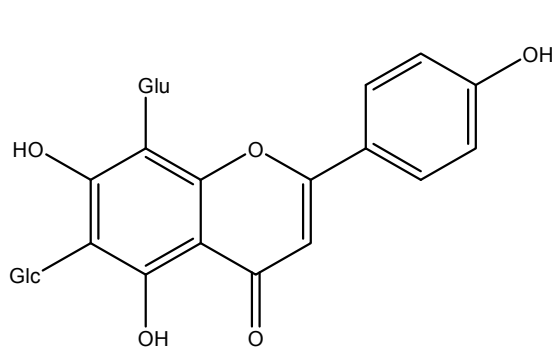


Centaflavone B

Extraite de *C. Senegalensis* [40]

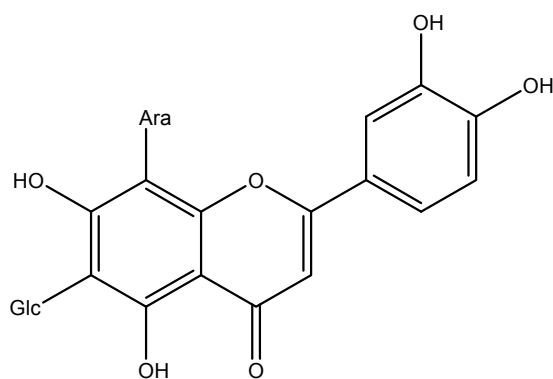
I.4.2.b. La C-glycosylation

La liaison entre l'aglycone flavonique et la fraction glucidique est du type carbone - carbone très résistante aux acides contrairement à la O-glycosylation. Les sucre dans la liste restreinte : glucose, galactose, rhamnose, xylose et arabinose se rattache à l'aglycone en position 6 et 8 qui est généralement une flavone.



Vicenine2

Extraite de *C. Melitensis* [38]



Schaftosid

Extraite de *C. Metensis* [41]

I.5. Analyse structurale des flavonoïdes

I.5.1. Méthode chromatographique

L'examen des flavonoïdes en lumière ultraviolette est le plus utilisé pour l'identification et la détermination des différents types des flavonoïdes.

Tous les flavonoïdes apparaissent en UV sous forme de spots colorés, permettant de donner des renseignements pour déterminer la structure du produit [42].

La Coloration	Type de flavonoïdes
Jaune Pâle	Dihydroxyflavone
Jaune Fluorescent	Flavonol avec 3-OH libre, Aurone, Chalcones, Flavanones
Jaune Vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune Orange (fluorescent)	Flavonol avec OH ou OR en 3
Bleu Claire (fluorescent)	Flavone 5-O- substitué Flavonols avec OR en 3 sans OH en 5
Violet	5,4'-dihydroxyflavone Flavone 3-O substituée et 5-OH, 4'-OH 6-hydroxy ou 8-hydroxyflavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavonols, flavanones
Noir	5, 6, 7- trihydroxyflavonol 5, 7, 8- trihydroxyflavonol

Tableau 2 : Préviation de la structure à partir de la fluorescence sous lumière de wood

Relation R_f structure

La relation R_f - structure a été établie par BATE-SMITH et WESTALL [42].

R_f est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme le rapport entre la distance d parcourue par l'origine de la substance ayant migré et la distance D parcourue par l'origine et le front du solvant :

$$R_f = d/D$$

R_f est une valeur caractéristique d'un composé pour des conditions de chromatographie donnée (éluant, température). R_f est égale à 1, dans le cas de produit très solubles dans la phase mobile et insolubles dans la phase stationnaire. Inversement R_f est nul lorsque le produit est trop peu soluble dans la phase mobile.

Structure flavoniques	R_f
Augmentation des groupes hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux [43]
Glucosylation	R_f augmente dans les solvants aqueux R_f diminue dans les solvants organiques [43]
Méthylation des hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants aqueux et augmente dans les systèmes de solvants organiques [43]

Tableau 3 : Relation R_f et structure flavonique

I.5.2. Méthodes spectroscopique

A. Spectrophotométrie UV -Visible

Les flavonoïdes sont capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fractions chimiques responsables de cette absorption sont dites

Chromophores. Les groupements chimiques comme l'hydroxyle et le méthoxyle sont susceptibles de modifier la couleur de base offerte par le chromophore. Ainsi l'effet bathochrome correspond à une modification de la structure moléculaire par addition de groupements chimiques auxochromes. L'étude de ces propriétés se fait par la spectrophotométrie UV -Visible qui est une méthode très importante pour la détermination des composés flavoniques. Son importance réside dans :

- l'utilisation des faibles quantités de produit.
- La facilité d'analyse
- L'obtention d'informations très importantes sur la position des hydroxyles sur le squelette flavonique.

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que chaque produit à un spectre d'absorption dans le méthanol et l'addition des réactifs provoque un changement dans ce spectre donne des indications précises sur le squelette flavonique [44].

a- Absorption dans le méthanol

L'absorption ultraviolette des flavonols dans le méthanol neutre donne deux bandes :

- la bande I : apparaissant entre 320 et 380 nm correspondant à l'absorption du système cinnamoylé et faisant intervenir la conjugaison de groupement carbonyle C₄ avec le noyau B.
- la bande II : apparaissant entre 240-280 nm correspondant à l'absorption du système benzoylé.

b- Absorption en présence des réactifs

L'utilisation des réactifs spécifiques permet d'indiquer la nature des substituent sur le squelette flavonique.

Présence de NaOH

NaOH est une base forte, elle ionise tous les hydroxyles phénoliques de la molécule, ce qui indique un déplacement bathochrome de la bande I.

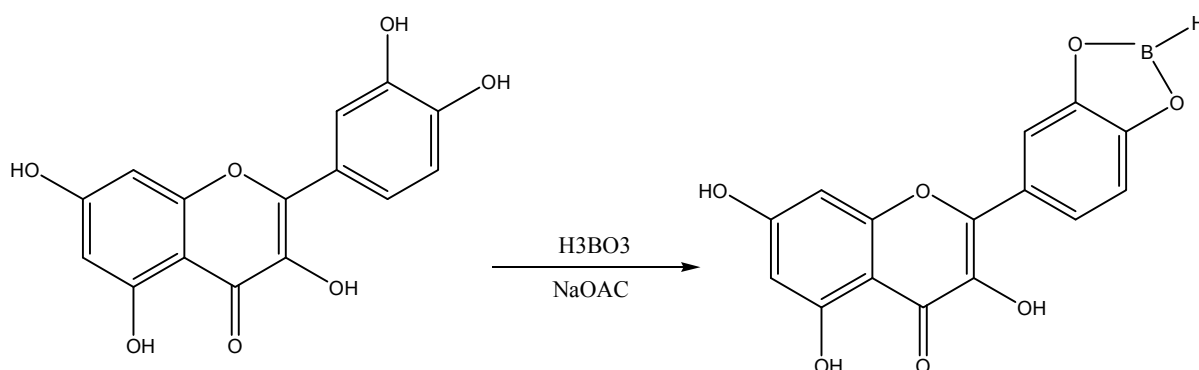
L'enregistrement du spectre en présence du NaOH ce fait en deux temps : instantanément, et après cinq minutes :

- un déplacement bathochrome de 45-65 nm de la bande I accompagné d'une stabilité de la densité optique qui confirme la présence d'un OH libre en 4'.
- Un déplacement bathochrome de 50-60 nm de la bande I accompagné d'une diminution d'intensité, indique la présence d'un OH en 3.
- La présence d'un hydroxyle libre en position 7 peut être confirmée par l'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm.

En présence de NaOAc et NaOAc+H₃BO₃

L'acétate de sodium NaOAc est une base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule 3, 7 et 4'. [45] Elle provoque un effet bathochrome de 5 à 20 nm, sur la bande II qui signal la présence d'un hydroxyle libre en 7.

L'addition d'acide borique en présence de l'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande I avec 12 à 13 n.m indique un système orthodihydroxyle.



En présence de AlCl₃ et AlCl₃ + HCl

La présence (ou absence) de système ortho dihydroxyle dans les flavonoïdes peut être déduit à partir de l'analyse de leur spectre dans le

méthanol avant et après l'addition de chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique.

Dans ces cas la formation d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en 5 (ou en 3) et d'un complexe labile avec le système Ortho dihydroxyle sur les cycles A ou B [42].

L'utilisation de AlCl_3 pour la détection de groupement ortho dihydroxylé, se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique neutre.

L'addition de HCl permet de s'assurer de la stabilité du complexe formé.

La présence d'un système orthodihydroxyle est observée, sur le spectre obtenu avec le AlCl_3 acidifié par un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm par rapport au spectre de AlCl_3 . Un déplacement hypsochrome de la bande I de 20 nm est significatif d'une Flavone tri - substitué sur le noyau B.

D'autre part, le spectre obtenue avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ donne un déplacement bathochrome de la bande I de 60 nm, ce qui indique la présence de OH libre en 3, et éventuellement en 5, un déplacement de cette bande de 35 à 55 nm signifié que l'hydroxyle en position 5 est libre.

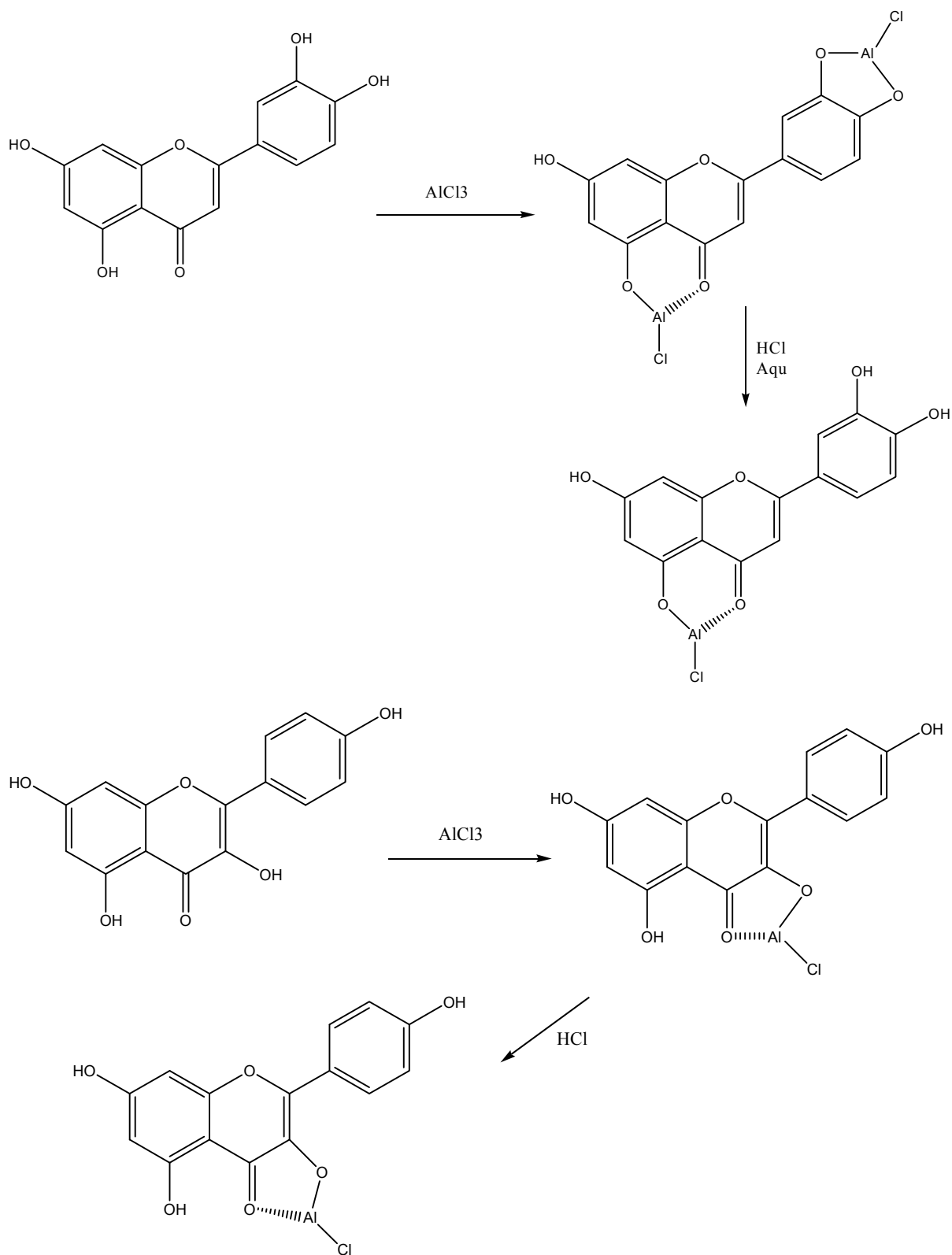


Fig. 3 : les complexes stables entre flavonoïdes et AlCl_3

Réactif	Déplacement (n.m)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350 352-385 328-357	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol OR en 3
NaOMe (NaOH)	+45 à +65 1. stabilité d'intensité/MeOH 2. diminution d'intensité		OH en 4'
	L'intensité diminue avec le temps (décomposition)		OR en 4' et OH en 3 3',4' OH ou ortho di - OH sur A ou ortho di OH sur B
	Nouvelle bande/MeOH entre 320 à 335		OH en 7
NaOAc		+5 à +20 Déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8	OH en 7
		Pas de déplacement ou très faible	OR en 7
		Spectre qui se décompose avec le temps	5, 6, 7-tri OH ou 5, 7, 8- tri OH
NaOAc+ H ₃ BO ₃	+12 à +36		Ortho di OH sur B
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430		Ortho di OH sur B avec 5-OH
MeOH/ AlCl ₃ + HCl	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6
	+35 à +55		5-OH et 3-OMe
	+50 à +60		OH en 3 avec ou sans OH en 5
AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)	-20 à -40 avec sommet où épaulement entre (350- 360)		Ortho di OH sur B
	-20 à -25		Ortho di OH sur A et Ortho di OH sur B ou tri-OH sur B.

Tableau 4 : les déplacements observés dans la présence des réactifs

/ : Par rapport + : déplacement bathochrome - : déplacement hypsochrome

B. Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse avec ses différents type (impact électronique, à bombardement atomique rapide ; et ionisation chimique) permet la détermination du pic moléculaire et valorisation du nombre et de la nature des substituents.

- Cas d'un Flavonol :

Pour les flavonols, une transformation rétro de Diels-Alder, suivie d'une rupture donne naissance à deux ions fragments principaux.

Exemple : Kaempferol

$[B - CO]^+ \quad m/z = 93$

$[B]^+ \quad m/z = 121$

$[A]^+ \quad m/z = 153$

- Cas d'une Flavone :

La transformation rétro de Diels-Alder conduit pour les flavones à une répture au niveau de l'hétérocycle produisant ainsi trois fragments caractéristiques :

Exemple : apigénine

$[M - CO]^+ \quad m/z = 242$

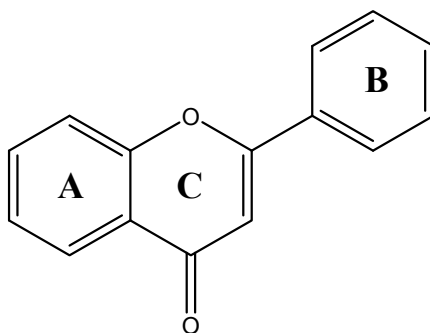
$[B]^+ \quad m/z = 121$

$[A - CO]^+ \quad m/z = 124$

$[A]^+ \quad m/z = 152$

$[A + 1]^+ \quad m/z = 153$

La spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB) est intéressante pour les glycosides par ce que elle permis la détection du pic quasi moléculaire (méthode douce).



Les trois cycles des flavonoïdes

Spectroscopie RMN ^1H :

On utilise cette méthode dans l'analyse qualitative des flavonoïdes pour déterminé :

- Le nombre total de proton à partir de la courbe d'intégration.
- Le degré d'oxydation des noyaux A, B et C
- Le nombre des molécules de sucre et le type de liaison anomérique α et β entre le sucre et l'aglycone.
- Le nombre et la position de groupements méthoxyle dans le produit.

a. Proton aromatique

- Proton du noyau A

Selon les substitutions possible. Les résonances et les multiplicités des protons H_5 , H_6 et H_8 sont résumées dans le tableau suivant :

Flavonoïdes	H_5 (δ =ppm) (J =Hz)	H_6 (δ =ppm) (J =Hz)	H_8 (δ =ppm)(J =Hz)
5-7 di -hydroxy	-	6.00-6.20 $J=2.5\text{Hz}$	6.30-6.50 $J=2.5\text{Hz}$
5-OH 7-hydroxy, glucoside	-	6.20-6.40 $J=2.5\text{Hz}$	6.50-7.00 $J=2.5\text{Hz}$
5, 6, 7-OR R=H, sucre	-	-	6.3 (s)
5, 7, 8-OR	-	6.3 (s)	-
7-OR R=H, sucre	8.00 $d J=9.0\text{Hz}$	6.70-7.10 $dd J=9\text{Hz}$ et $J=2.5\text{Hz}$	6.70-7.10 $d J=2.5\text{Hz}$

Tableau 5 : déplacement et multiplicité des protons du noyau A

-Proton du noyau B

Le déplacement chimique est basé sur les substituent dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C

Flavonoïdes	Déplacement chimique (ppm) H ₂ , H ₆ (J=8.5Hz)	Déplacement chimique (ppm) H ₃ , H ₅
4'-hydroxy Flavone	7.70-7.90 (<i>d</i>)	6.50-7.10 (<i>d</i>) J=8.5Hz
4'-hydroxy Flavonol	7.90-8.10 (<i>d</i>)	6.50-7.10 (<i>d</i>) J=8.5Hz
3',4' dihydroxy	7.20-7.90	-
3',4',5' tri hydroxy	6.50-7.50 (<i>s</i>)	-

Tableau 6 : *déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B*

- *Proton du noyau C*

Le proton H₃ dans la Flavone, résonne sous forme d'un singulet dans l'intervalle (6.20-6.40ppm).

b. protons aliphatiques :

- *Protons méthoxyle :*

Il se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.5 et 4.5 ppm.

- *Protons du sucre :*

Les déplacements chimiques des protons anomériques dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone. La constante de couplage entre le proton anomérique du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone si il s'agit d'une position α ou β .

Pour le sucre glucose, le proton anomérique donne en générale un doublet et sa constante de couplage est de J=7Hz car il est toujours on position β d'après la biogénèse. Pour le rhamnose son proton anomérique donne un doublet aussi mais sa constante de couplage est de J=2.5Hz (position α). On peut aussi reconnaître le sucre rhamnose par le signal du groupement méthyle entre 0.8-1.2 ppm et avec une constante de couplage de J=6Hz.

D. Spectroscopie RMN ¹³C

Cette technique permet l'obtention des informations sur la structure : le nombre, la nature et l'environnement des carbones présents dans la molécule.

I.6. Activites Biologiques des Flavonoides

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-oxydants.

I.6.1. Effets Antiallergiques

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules.

En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d' action supérieur à celui du chromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l' histamine et d' autres substances endogènes qui causent l' asthme [46].

I.6.2. Effets Anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se Métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [47]. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l' apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

I.6.3. Effets Anti-ulcereux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la

naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes [46].

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel [48]. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

I.6.4. Effets Anticancereux

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la Catéchine a montré une activité anti-tumorale [49]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [50].

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres [46]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [51] et inhibe l'activité de la collagénase [52].

I.6.5. D'autres effets Biologiques

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [53]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [56, 57].

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [54].

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés [55].

I.7. Conclusion

Les différentes activités biologiques des flavonoïdes et leur intérêt thérapeutique, ils sont devenus un axe de recherche dans notre laboratoire, mais ils ne sont pas les seules substances dominantes dans l'usage pharmaceutique. Il y a d'autres métabolites secondaires qui présentent également un intérêt biologique, c'est le cas des sesquiterpènes lactones.

LES SESQUITERPENE LACTONES

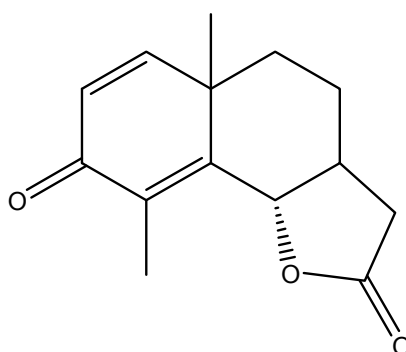
II.1. Introduction

Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe numériquement important des substances (environ 5000 structures enregistrées) [58].

Les lactones sesquiterpéniques ont une distribution botanique assez sporadique, présentes chez les angiospermes (Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae) et très majoritairement chez les compositae. Chez ces dernières, les lactones sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Elles sont également assez souvent présentes dans les racines [59].

II.2. Les différentes classes des sesquiterpène lactones

Les sesquiterpène lactones sont connus depuis 1830, date à laquelle la première d'entre elles, L' α -Santonine « Fig.1 » a été isolée sous forme cristalline [60].



(9bS)-5a,9-dimethyl-3a,4,5,5a-tetrahydronaphtho[1,2-b]furan-2,8(3H,9bH)-dione

Fig.1 : α -Santonine

Les lactones sesquiterpéniques ont comme base le squelette de 15 carbones qui contient généralement au moins le groupe γ -lactonique, leur construction s'effectue naturellement à l'intérieur des plantes. La condensation « tête - queue » de trois unités d'isoprène donne le composé « 2,6,10-

triméthylododécane » « Fig 2 », qui constituera l'ossature moléculaire principale de la plupart des familles de lactones sesquiterpéniques « Fig.3 ».

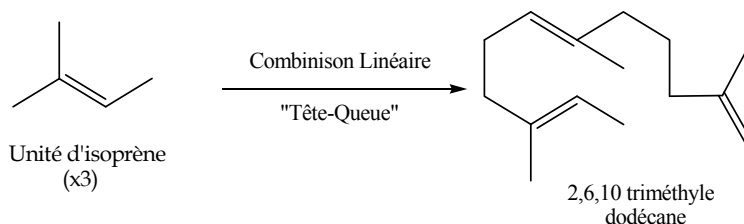


Fig2 : Squelette de base des lactones

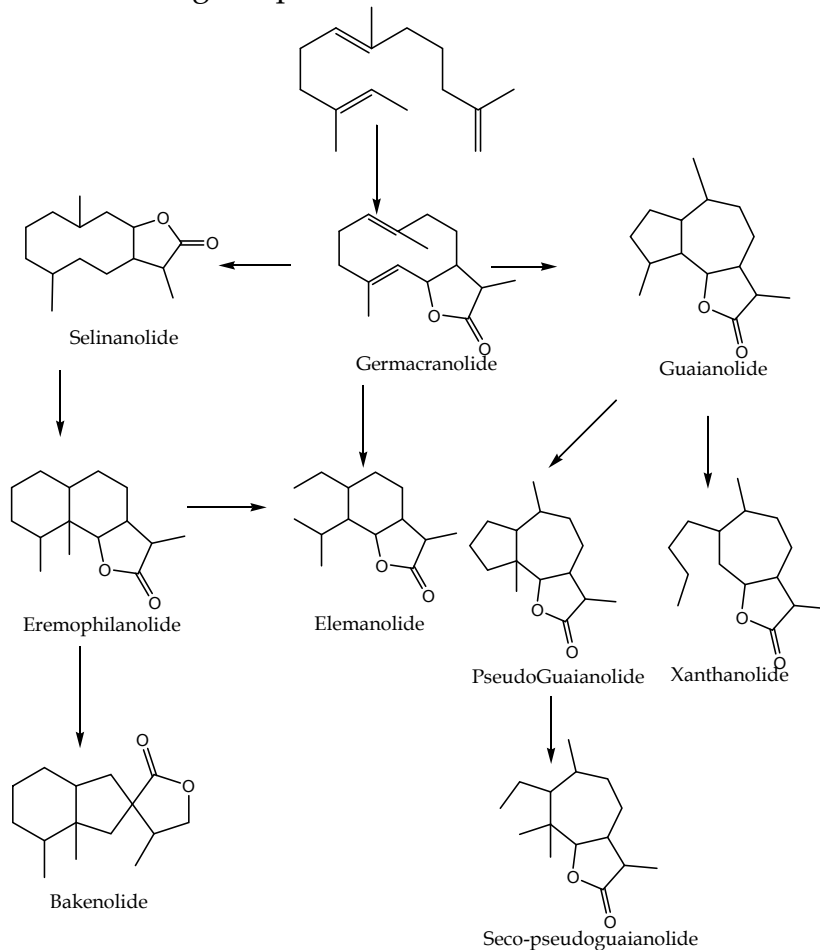
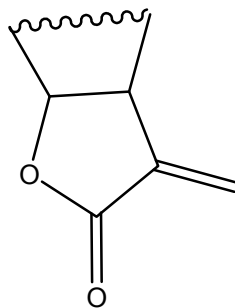


Fig.3:Les principales familles des lactones Sesquiterpiniques

Les lactones sesquiterpéniques sont classées sur la base de leur squelette carbocyclique, on distingue en effet à titre d'exemple, les germacranolides, les guaianolides, les eudesmanolides et les pseudo-guaianolides, ... etc.

Le suffixe « olide » se rapporte à la présence de la fonction lactonique, souvent sous forme de α -méthylène- γ -lactones « Fig 4 »

Fig.4 : groupe α - méthylène γ lactones

En générale la chimie des sesquiterpène lactones est formée à la base, des lactones natives, qui ont été isolées des différentes familles de plantes comme : les magnoliacées , les amarantacées, les aristolochiacées, les ombellifères et les composées.

Pour la stéréochimie, la structure des substituants surtout sur les carbones C (6), C (7), C (8), C (11), dans Ces lactones sesquiterpéniques possèdent des configurations absolues différentes.

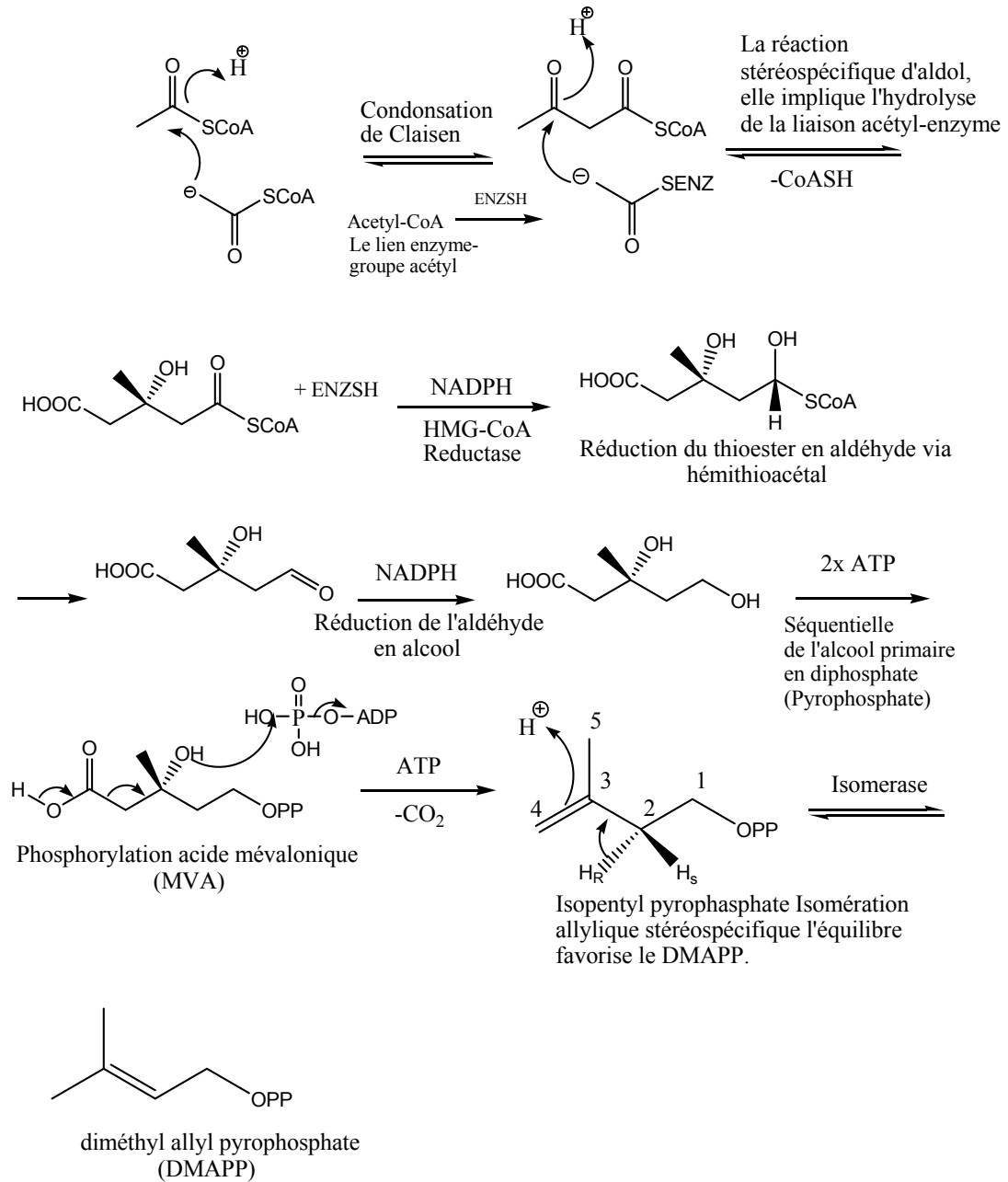
Des études effectuées sur les différentes familles des plantes montrent que près de 90% des lactones ont été isolées à partir de la famille des composées [61]. Cette caractéristique ajoutée à l'activité biologique des sesquiterpènes lactones est devenue un des critères importants dans la chimie systématique des composées [62].

II.3. la biogenèse des lactones sesquiterpénique

La première hypothèse sur la biogenèse des composés terpéniques à été formulée par RUZIKA [63,64], puis plus tard par HENDRICKSON 1959, qui avait envisagé toutes les étapes de la biosynthèse possibles à partir des unités acétate, desquelles se forme le mévalonate par condensation des trois unités qui donnent l'isopentényl pyrophosphate par décarboxylation. [65]

Les combinaisons des trois unités de dimethylallylpyrophosphate dans l'ordre « tête- queue » forme le farnesylpyrophosphate d'après la stéréochimie des

trois doubles liaisons, le farnésol peut exister sous forme de quatre isomères géométriques dans les lactones monocycliques sesquiterpéniques. « Fig.5 »



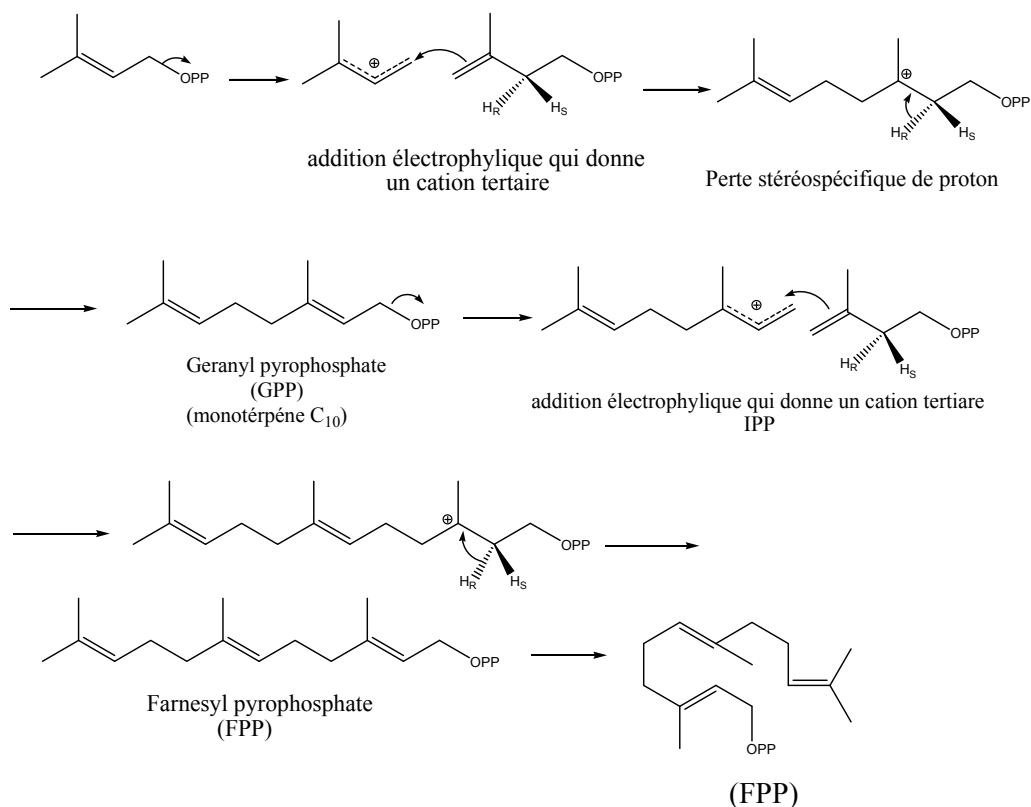


Fig.5 : Représentation des différentes étapes de la biosynthèse de Farnesyl pyrophosphate

Ces isomères, farnesylpyrophosphate, forment à la base le germacra-1(10), 4-diène-6, 12-olide dont la structure peut être déduite de l'isomère géométrique du farnesylpyrophosphate correspondant après cyclisation, oxydation d'un groupe méthyle de l'isopropyle, oxydation de l'atome de carbone 6 et fermeture sur l'oxygène de la fonction hydroxyle.

C'est de l'ensemble de ces réactions, impliquant des cyclisations du farnesyl pyrophosphate que proviennent un grand nombre de lactones sesquiterpéniques caractérisées par le groupe lactonique en C (6) et C (8).
« Fig.6 »

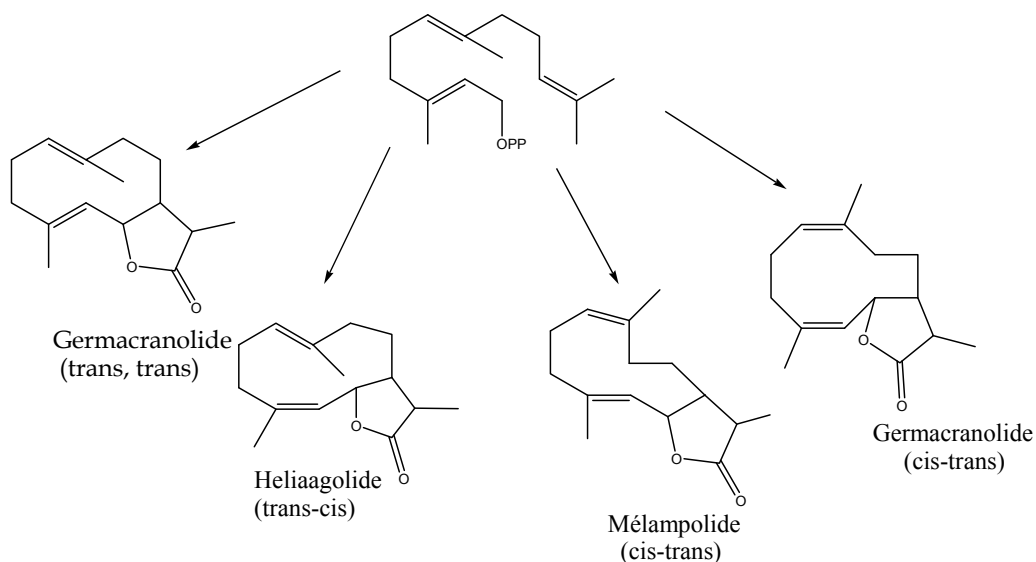


Fig.6 : Les différentes étapes de la biogénèse
Des lactones sesquiterpéniques

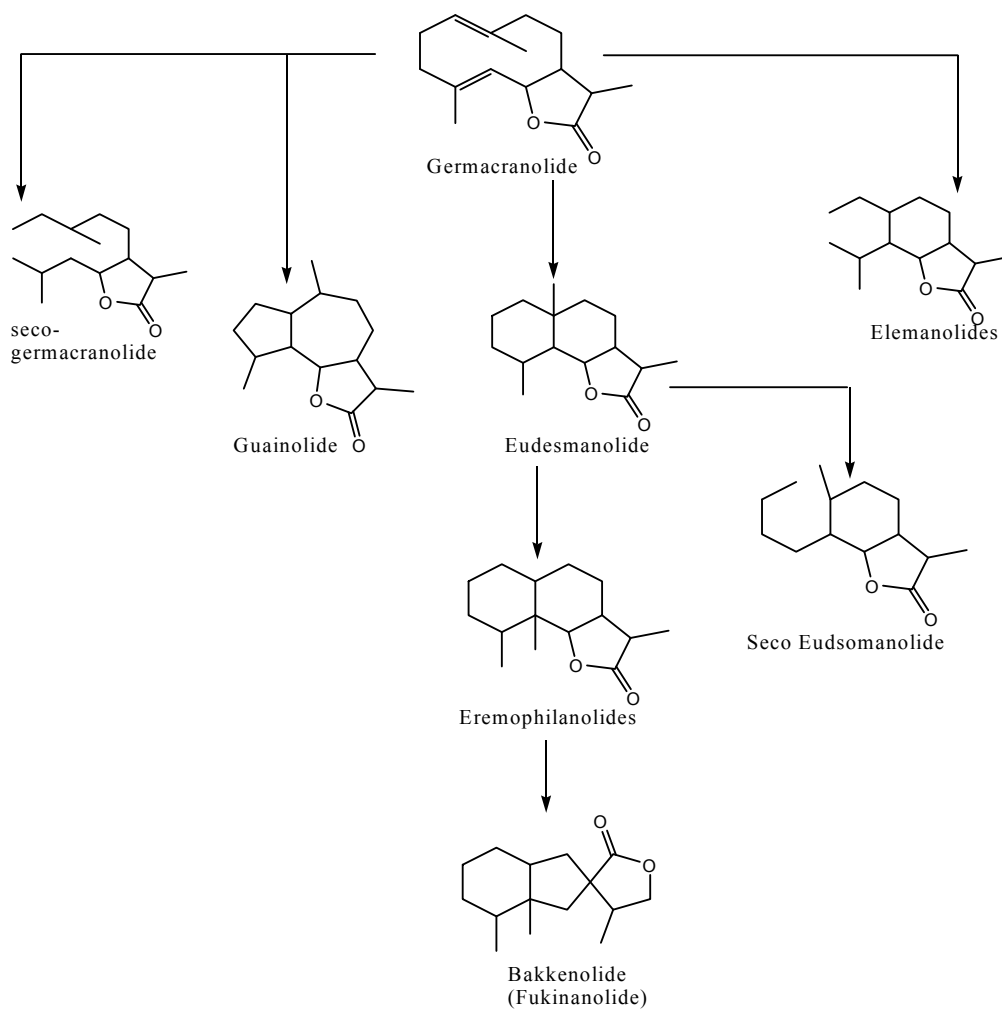


Fig.7 : les différents dérivés des germacranolide

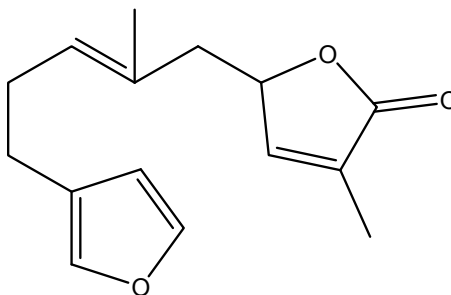
II.4.Classification selon les squelettes de carbone

Les lactones sesquiterpéniques qui ont pour précurseurs le farnesyl pyrophosphate se classent selon le nombre de cycles du squelette carboné.

II.4.1.Les lactones sesquiterpéniques acycliques

Le squelette carboné de ce type de lactone se forme probablement par décomposition de liaison C₍₂₎ C₍₃₎ du squelette germacrane monocyclique à savoir le secogermecranolide-2,3. On peut citer en exemple la freelingnite [66].

Exemple :



Freelingnite

II.4.2.Les lactones sesquiterpéniques monocycliques

II.4.2.1.Les germacranolides

Les germacranolides ont comme squelette de base un cycle à dix atomes de carbone. La plupart d'entre eux contient deux doubles liaisons entre C₍₁₎ et C₍₁₀₎ [66], et se distinguent les uns des autres par la stéréochimie de ces doubles liaisons.

II.4.2.1.1.Les héliangolides

Ce sont les germacranolides avec une double liaison trans (E) (C₍₁₎ et C₍₁₀₎) et autre (Z) (C₍₄₎ et C₍₅₎).

II.4.2.1.2.Les mélampolides

Ce sont les germacranolides avec une géométrie des doubles liaisons opposées à celles des héliangolides. A côté de ces types de germacranolides sont décrit d'autres groupes avec d'autres positions des doubles liaisons [66].

II.4.2.2.Les seco-eudesmanolides-1,10

Ils sont obtenus par la décomposition de sesquiterpènes à squelette carboné bicyclique et en sont considérés comme dérivés secondaires.

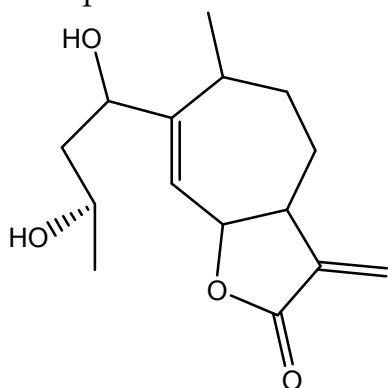
II.4.2.3.Les élémanolides

Ce sont des seco-eudesmanolides-2,3, ils se forment par un réarrangement de COPE des germacrane-1(10), 4-diénoles. Plus de 30 lactones natives de ce type sont décrites.

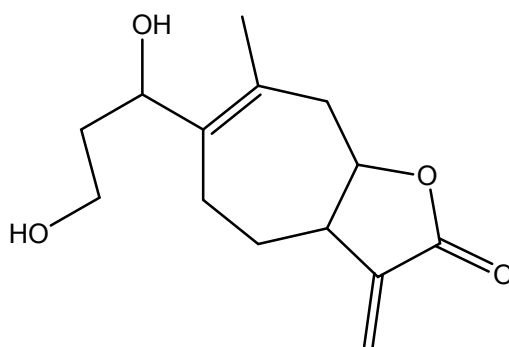
II.4.2.4.Les xanthanolides

Ils sont considérés comme des seco-guaianolides-4,5 , plus de 20 produits natifs de ce type sont décrits dans la littérature. On peut encore citer les seco-guaianolides-4,5 et les seco pseudoguaianolides -4,5 dont plus de 10 produits natifs ont été isolés. L'ivambrine et l'inulicine illustrent cette famille de composés.

Exemple :



Ivambrine



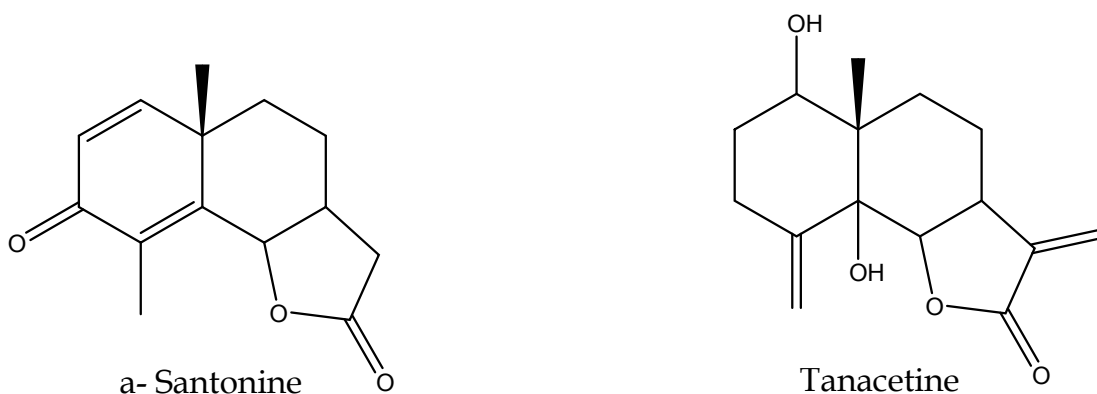
Inulicine

II.4.3.Les Lactones sesquiterpéniques bicycliques

Presque toutes les lactones sesquiterpéniques sont réparties dans les groupes des eudesmanolides, guaianolides, pseudo-guaianolides, eremofilanolides et bakkenolides.

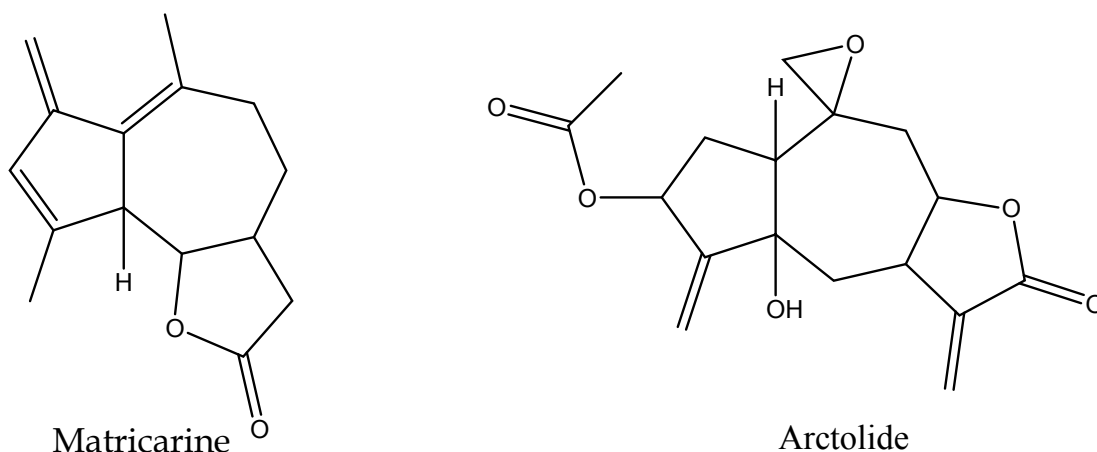
II.4.3.1. Les eudesmanolides

Appelés aussi selinanolides, ce groupe contient plus de 150 lactones natives et est formé à la base du squelette diméthyl-1,7-isopropyl-4 bicyclo [0, 4, 4] décane qui se produit du squelette germacrane par cyclisation trans-annulaire entre C₍₅₎ et C₍₁₀₎ en formant deux cycles hexagonaux. Deux des lactones sesquiterpéniques les plus connues de ce type sont présentées dans le schéma ci après .



II.4.3.2. Les Guaianolides

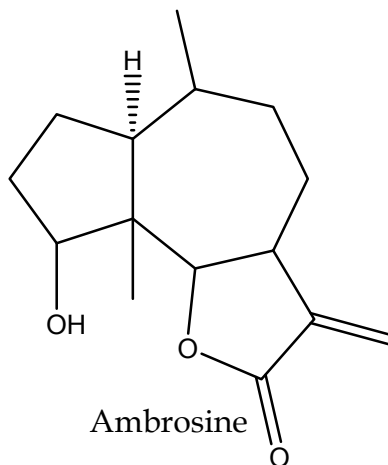
Leur squelette de base est formé du diméthyl 2-8 isopropyl-5 bicyclo[0,3,5] décane qui se déduit du squelette germacrane par cyclisation trans-annulaire entre C₍₅₎ et C₍₁₎ en formant un cycle pentagonal et un autre heptagonal. La plupart des produits de ce type donnent par déshydrogénation des dérivés de l'azulène. Cent cinquante lactones natives de ce type ont été isolées. Deux d'entre elles sont représentées ci-après :



II.4.3.3. Les pseudo-guaianolides

Ils se forment à partir du squelette guaiane après migration du groupe méthyle de la position C₍₄₎ à la position C₍₅₎.

Exemple :

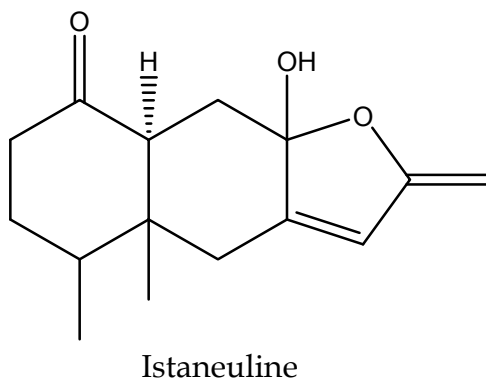


II.4.3.4. Les eremofilanolides

Le squelette d'eremofilane se forme à partir du squelette eudesmane par migration du groupe méthyle de C₍₁₀₎, C₍₅₎.

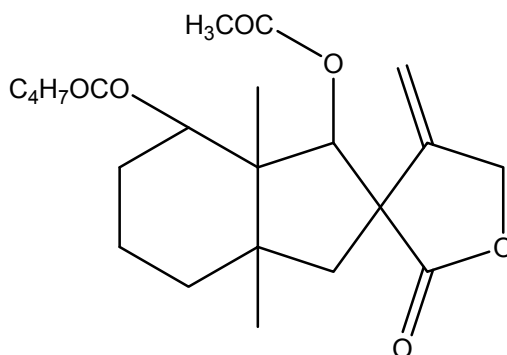
Plus de 25 lactones de ce type sont décrites. Tous les eremofilanolides décrits jusqu'à présent ont leur groupe lactonique fermé en C₍₈₎.

Exemple :



II.4.3.5. les bakkenolides

Appelés aussi fukinanolides, ce groupe se début par le réarrangement de la liaison C₍₉₎, C₍₈₎ du squelette d'eremofilanolides. Plus de 10 produits natifs de ce type été isolés. Le fukinolide en est l'un deux.



Fukinolide

II.4.4. sesquiterpène lactones polycycliques

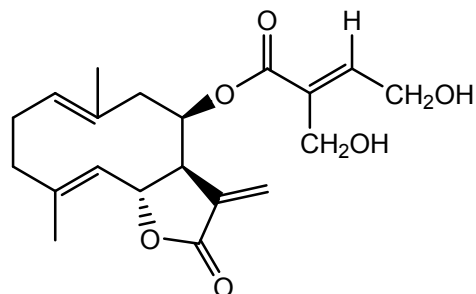
Les sesquiterpène lactones tricycliques sont connues, il existe de même celles avec un plus grand nombre de cycles carbonés.

II.5. l'activité biologique des sesquiterpène lactones

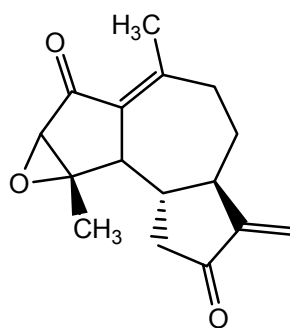
L'investigation chimique qui fait l'objet de nombreux travaux est justifiée par l'importance de ces produits dans la chimie des essences, des arômes et des parfums, par l'activité antibiotique de certains d'autres eux [67], par leur rôle éventuel de stimulant ou régulateur de la croissance des plantes [68].

Une grande attention a été donnée à l'activité cytotoxique [69] et anticancéreuse des lactones sesquiterpéniques, cette activité a été mise en évidence par Kupchan et Coll qui ont montré qu'elle est liée au groupe γ -lactonique, plus exactement à la double liaison exocyclique α,β insaturée [70]. Les propriétés inhibitrices sur la croissance des tissus animaux des germacranolide ont fait dès 1948 l'objet de revues [71], dans ce domaine la recherche a été axée principalement sur la chimiothérapie du cancer.

Des recherches portant sur deux sesquiterpène lactones différentes ont prouvé une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses avec un pourcentage d'inhibition de 50% [72]:



Eupantariopierin



2-oxoudartin

Le 2-oxoludartin possède un méthylène butyrolactone, et aussi epoxy ces deux groupements aident la molécule pour fonctionner selon un mécanisme complexe sur les tumeurs solides comme HL-60(TB), NCI-522(leucémie), RXF-393(rein), HCT-116(colon)[73- 75].

Conclusion

L'espèce *Centaurea calcitrapa* à subit une investigation phytochimique dans notre laboratoire, et les résultats ont montré la richesse de cette plante en métabolites secondaires [39,66]. Ce travail est une continuation de cette investigation phytochimique.

Etude Phytochimique de l'espèce *Centaurea calcitrapa*

III.1. Étude Botanique

III.1.1. Le genre *Centaurea*

III.1.1.1. Introduction

Il y a environ 500.000 Plantes sur la terre : les études menées à ce jour on montré que 10.000 d'entre elles environ possèdent des propriété médicinales [76].

C'est plantes ont été divisées en plusieurs familles, la famille des Composées, comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [77, 78].

En Algérie la famille des Composées compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [4], l'un de ces genres, celui des Centaurées compte environ 45 espèces [79].

Le genre *Centaurea* objet de notre étude comprend plus de 500 espèces dans le monde la plus part des *Centaureés* croissent autour du bassin méditerranée [80].

Ce genre est répandu aussi bien sur le territoire national qu'en Europe méridional, l'ouest de l'Asie et le continent Américain [80, 81].

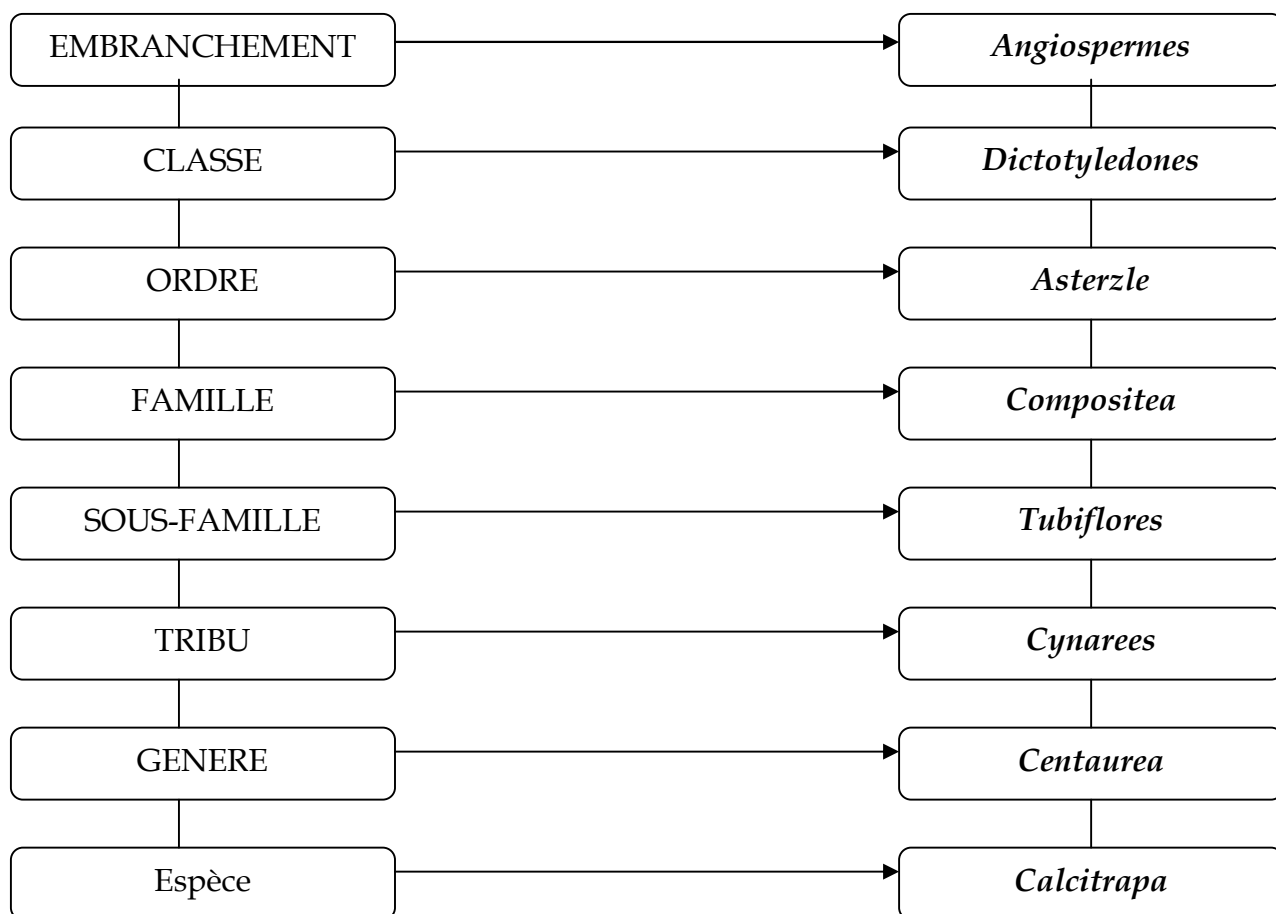
L'étymologie de l'appellation du genre « *Centaurea* » dérive du nom grec « *Centaureios* » herbe du *Centaure Chiron*, auquel on attribuait la découverte des propriétés de ces plantes [82].

III.1.1.2. Propriétés biologiques des *Centaurées*

Plusieurs propriétés biologiques sont décrites pour les *Centaurées*. Le genre *Centaurea* est utilisé pour leur activités stimulantes, toniques [81, 83], astringentes [84], anti-diabétiques [85, 86], diurétiques [87], anti-rhumatismales [88, 89], et anti-fongique. Les *Centaurées* sont réputées pour leur goût amer qui est indicatif de la présence des groupements sesquiterpène lactones [90].

III.1.2. l'espèce *Centaurea calcitrapa*

III.1.2.1. Place dans la systématique



III.1.2.2.description Botanique

Plante herbacée bisannuelle (20-50 cm). Tige dressée, plus ou moins velue, très ramifiée à rameaux étalés. Feuilles alternes, plus ou moins pubescentes laineuses et glanduleuses, Les inférieures en rosette, pennatipartites à pennatifides (rapidement caduques), les caulinaires pennatiséquées, non décurrentes. Fleurs en capitules terminaux et latéraux, larges de 8-10 mm, sessiles ; bractées de l'involucre épineuses, l'appendice étant terminé par 1 épine très acérée longue de 10-18 mm, étalée, à base très épaissie et canaliculée en dessus, accompagnée de 4-6 épines plus faibles (3-5 mm de long) ; fleurs toutes tubulées et égales, glanduleuses, à corolle rose (rarement blanche). Fruit : akène blanchâtre, glabre. [79]



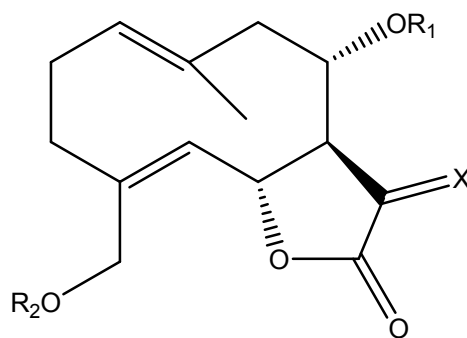
III.2. Etude Chimique

III.2.1. Les Travaux Antérieurs

L'espèce *C. calcitrapa* a fait l'objet de plusieurs travaux, qui ont montré la présence des six lactones sesquiterpénique (Tableau 1) deux d'entre elles sont dominantes et de type germacranolide, il s'agit de la Cnicine et la Salotenolide. Ces travaux ont également révélé la présence de 19 flavonoïdes dans cette espèce. (Tableau 2)

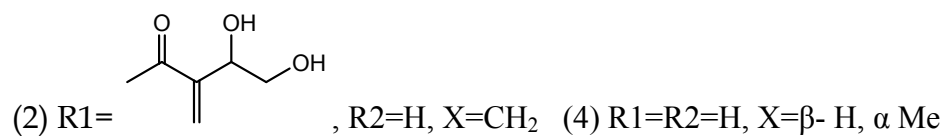
Produits isolée	Structures	Références
Salotenolide	(1)	[91,92]
Cnicine	(2)	[91-93], [66]
L'acétoxycnicine	(3)	[91]
11 β ,13dihydro salonitenolide	(4)	[91]
11 α ,13dihydro salonitenolide	(5)	[91]
15-hydroxy-8 α -(1',2'-dihydroxyethyl)acryloxy elema1,3,11(13)-trien,12olide	(6)	[91]

Tableau 1 : les sesquiterpène lactones de *C. calcitrapa*



(1) R1=R2=H, X=CH₂

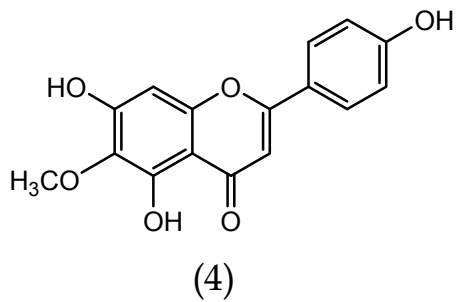
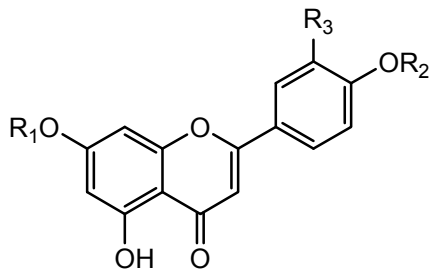
(3) R1= , R2=H, X=CH₂



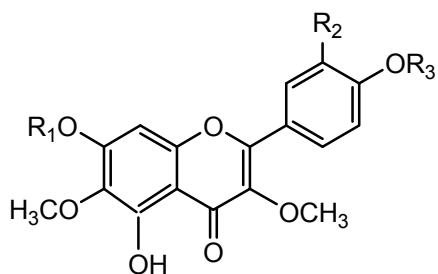
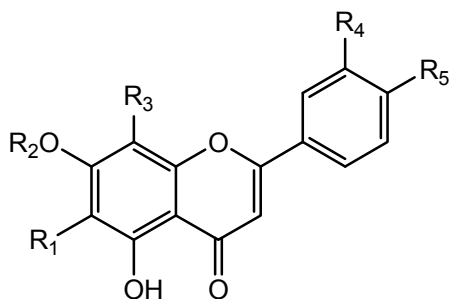
(5) R1=R2=H, X= α- H, β Me

Produit	Structure	références
Apigénine	(1)	[29]
Apigénine7-O-methylglucuronide	(2)	[30]
Luteoline	(3)	[29,30]
Hispiduline	(4)	[29,94]
Hesperidine	(5)	[29]
Jaceosidine	(6)	[39]
Pictolarigenine	(7)	[39]
Vitexine	(8)	[29]
Jaceine	(9)	[29]
Centaureine	(10)	[29]
Kaempferol	(11)	[29,30]
Quercétine	(12)	[29]
Rutine	(13)	[29,30]
Morine	(14)	[29]
Naringénine	(15)	[29,30]
Fisétine	(16)	[29]
Dihydroquercétine	(17)	[29]
Astragaline	(18)	[30]
Helichrysine		[29]

Tableau 2 : les flavonoides de *C.calcitrapa*

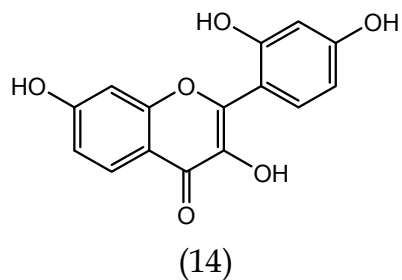
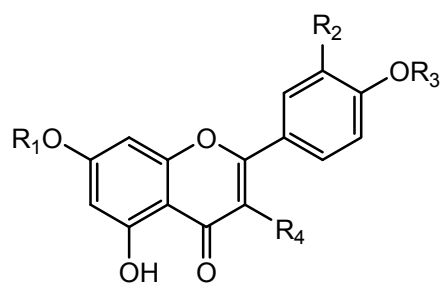


	R1	R2	R3
(1)	H	H	H
(2)	Méthylglucuronide	H	H
(3)	H	H	OH

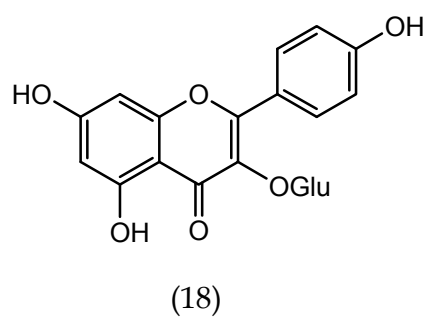
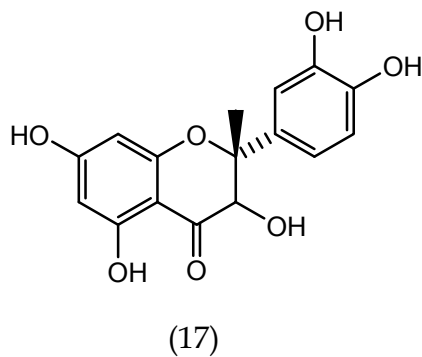
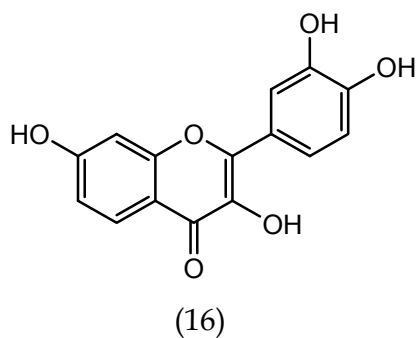
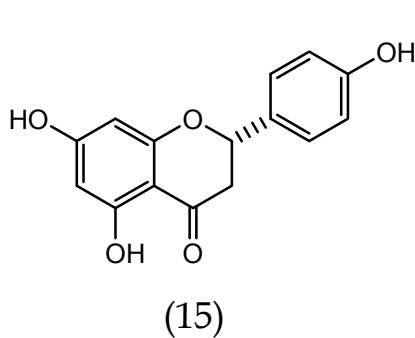


	R1	R2	R3	R4	R5
(5)	H	Rh-Glc	H	OH	OCH ₃
(6)	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
(7)	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
(8)	H	H	Glc	H	OH

	R1	R2	R3
(9)	Glc	OCH ₃	H
(10)	Glc	OH	CH ₃



	R1	R2	R3	R4
(11)	H	H	H	OH
(12)	H	OH	H	OH
(13)	H	OH	H	O-Rut



III.2.2.Les travaux personnels

III.2.2.1.Matière végétale

La matière végétale a été prélevée dans l'entourage de l'université Mentouri, à Constantine, le 07 juin 2004, nous n'avons pris en considération que les parties aériennes de la plante.

Le choix du matériel végétal s'est fait selon des critères chimiques et biologiques. Sur le plan chimique, ce modèle végétal présente une grande diversité de lactones sesquiterpéniques et de flavonoides [66]. Sur le plan biologique, on s'intéresse à l'activité connue des γ -lactones, et plus particulièrement celles des γ -lactones α,β insaturées [66].

III.2.2.2.Méthode d'extraction

La littérature offre une grande variété de méthode d'extraction généralement orientée vers l'obtention d'une substance ou d'un groupe de substances selon la polarité, volume de la molécule, etc. Dans ce travail, nous avons choisi l'exsudat toluène/acétate d'éthyle avec les proportions 6:4 en ciblant les substances moyennement polaires.

Nous avons utilisé 1.8 kg de la matière végétale (les parties aériennes) fraîche, trempée, le jour même de la récolte, pendant 10 minutes, dans un solvant toluène/acétate d'éthyle (6 :4). On remarque un précipité blanc sous forme cristalline (2,655g). Ce précipité a été filtré le résidu et bien lavé dans de l'éther de pétrole. Le filtrat résiduel est évaporé conduisant à 11.52 g d'extrait brut.

III.2.2.3.Séparation chromatographique

La totalité de l'extrait brut est chromatographié sur une colonne de hauteur $h=80\text{cm}$, et de diamètre $d=4\text{cm}$. La phase stationnaire utilisée est le gel de silice. Le système chloroforme/cyclohexane/acétate d'éthyle, avec les proportions 1:1:1, est utilisé comme phase mobile. Le poids le gel de silice utilisé 345g.

Le tableau 3 montre l'ensemble des fractions obtenues.

Fraction	Volume (ml)	Poids (mg)	Fraction	Volume (ml)	Poids (mg)
1	161	4	15	138	21
2	207	21	16	69	28
3	46	28	17	345	86
4	46	73	18	115	36
5	69	272	19	874	344
6	115	160	20	1058	40
7	92	40	21	184	79
8	161	105	22	759	210
9	46	10	23	1288	60.4
10	69	16	24	322	14
11	92	36	25	851	45
12	69	35	26	1035	132.4
13	69	17	27	529	175.3
14	230	50	28	-	4000

Tableau3: l'ensemble des fractions

Les fractions obtenues sont contrôlées sur plaque analytique CCM dans les systèmes $\text{CHCl}_3/\text{Acétone}$ (9:1) et cyclohexane/ $\text{CHCl}_3/\text{AcOET}$ (1:1:1). Elles sont regroupées selon leur ressemblance (fig. 1).

Le tableau 4 résume les fractions regroupées après le contrôle chromatographique. Pour la fraction F₉, 1g a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice, de hauteur $h=40\text{cm}$ et de diamètre $d=1.25\text{cm}$, en utilisant un éluant chloroforme/acétone. (32 g de gel de silice 60 (0.063-0.200 mm utilisé)

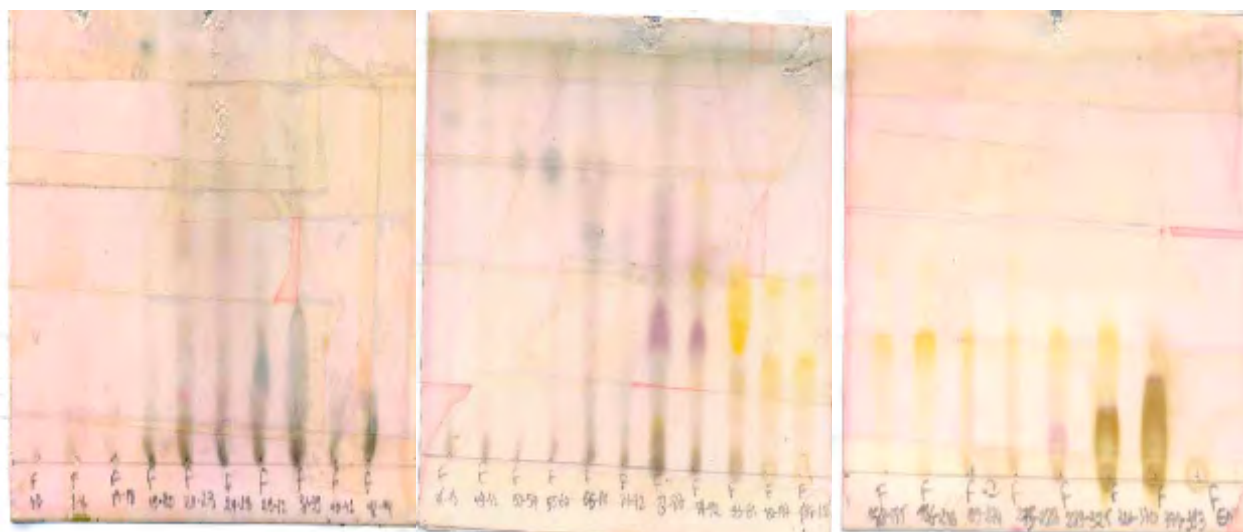


Figure 1 : Ensemble des fractions obtenues

Fraction	Fractions étudiées	Poids
F ₁ (1-12)	-	800mg
F ₂ (13-14)	CCM	67mg
F ₃ (15-16)	-	49mg
F ₄ (17-18)	CCM	122mg
F ₅ (19)	CCM	344mg
F ₆ (20-21)	CCM	119mg
F ₇ (22-23)	CCM	270.4mg
F ₈ (24-25)	CCM	59mg
F ₉ (26-28)	Mélange complexe re-chromatographié sur colonne de gel de silice	4307.7mg

Tableau 4: *les fractions étudiées*

Le précipité blanc que nous avons obtenu au cours de l'évaporation s'est avéré pur. Dans ce qui suit, il est noté CC1 (2.65g). Pour les fractions F₅, F₆, F₇, F₈ nous avons remarqué la présence de flavonoides, connu d'après leur couleur sous la lampe UV (taches de couleur noir violet sous la lumière UV).

On cite dans le tableau 5 ci-dessous les systèmes d'élution généralement utilisés dans la séparation des flavonoides sur couche mince. Après avoir étudié la plupart des systèmes de séparation des flavonoïdes sur les fractions F₅, F₆, F₇, F₈ nous avons choisi l'éluant CHCl₃/MeOH/H₂O avec les proportions 80:9:1 sur gel de silice (utilisé généralement dans la séparation des aglycones) qui a montré son efficacité pour toutes ces fractions.

Sur gel de silice :

Eluant	Proportion
Hexane ou EP/ AcOET	1 :1
Toluène/ AcOET/ AcOH	5 :3 :1 ou 4 :2 :1
Hexane/ AcOET/ MeOH	15 :70 :15
AcOET/ MeOH/ H ₂ O	100 :17 :3
CHCl ₃ / MeOH/ H ₂ O	8 :4 :1 ou 40 :9 :1 ou 80 :9 :1
AcOET/ MeOH	15 :3
AcOET/ H ₂ O/ MeOH/ AcOH	13 :3 :3 :4
AcOET/ MeOH	4 :1 ou 2 :1 très polaire
AcOET/ H ₂ O/ MeOH/ ACOH	13 :2 :2 :3

Sur polyamide :

Toluène/ MEC/ MeOH	4:3:3
H ₂ O/ MeOH/ MEC/ Acétylène	13:3:3:1
H ₂ O/ ETOH/ ButOH/ ACOH	60:20:25:2
Toluène/ ETOH/ MEC/ E P	60:10:10:10 ou 50:10:10:10
MeOH/ H ₂ O/ ACOH	18:1:1

Tableau 5: les systèmes les plus utilisés dans la séparation des flavonoïdes sur CCM

Pour la fraction F₅, nous avons obtenu 7 sous-fractions, notées CB1, CB2, CB3, CB4, CB5, CB6 et CB7. Trois d'entre elles sont des flavonoïdes (CB1, CB2, CB7). Pour la fraction F₆, on obtient 4 sous-fractions, notées CD1, CD2, CD3 et CD4 (flavonoïdes). Pour la fraction F₇, on obtient 4 sous-fractions, notées CF1, CF2, CF3 et CF4 (flavonoïdes). Pour la fraction F₈, on obtient 2 sous-fractions, notées CE1 et CE2 (flavonoïdes).

Les sous-fractions qui ont montré la présence des flavonoïdes sont contrôlées sur des plaques analytiques de polyamide et de gel de silice pour confirmer leur pureté, dans les systèmes suivants :

	Eluant	proportion	système
Polyamide	Toluène/MEC/MeOH	4:3:3	SI
	H ₂ O/MeOH/MEC/Acétyle cétone	13:3:3:1	SII
	Toluène/ETOH/MEC/EP	60:10:10:10	SIII
Gel de silice	Cyclohexane/AcOET	2:1	SIV
	Toluène/AcOET/ACOH	90:9:1	SV
	CHCl ₃ /Acétone	9:1	SVI

Tableau 6: systèmes utiliser pour contrôler la pureté

Seuls les composés CB7 (83mg), CD1 (22mg), CD3 (60mg), CD4 (36mg), CE1 (36mg), CF3 (70mg) et ont pu être exploités. Ils ont subi une ultime purification sur une petite colonne de SEPHADEX LH20, en utilisant le méthanol comme éluant.

La fraction F₄ a été éluée avec le système CHCl₃/Cyclohexane/AcOET (1:1:2). Elle a donné 8 sous-fractions, notées CJ1, CJ2, CJ3, CJ4, CJ5, CJ6, CJ7 et CJ8. La sous-fraction CJ7 était majoritaire.

La fraction F₂ a été traitée avec le système CHCl₃/cyclohexane/AcOET (4:4:1). Elle donne trois sous-fractions, notées CA1, CA2 et CA3. Et le tableau 7 résume l'ensemble des sous fractions obtenues :

Fraction	Sous fraction obtenu	Remarque
F1	-	-
F2	CA1, CA2, CA3	Non exploitée
F3	-	-
F4	CJ1, CJ2, CJ3, CJ4, CJ5, CJ6, CJ7, CJ8	Non exploitée
F5	CB1, CB2, CB3, CB4, CB5, CB6, CB7	CB7 (83mg) Pure
F6	CD1, CD2, CD3, CD4	CD1 (22mg), CD3 (60mg), CD4(36mg) pure
F7	CF1, CF2, CF3, CF4	CF3 (70mg) Pure
F8	CE1, CE2	CE1 (36mg), CE2 (21mg) Pure CE2=CF3

Tableau 7 : Ensemble des sous fractions obtenu

1g de la fraction F₉ a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice, en utilisant le CHCl₃/Acétone comme phase mobile. Les résultats sont rapportés dans le tableau 8.

Fraction	Poids (mg)	Volume (ml)	Pourcentage de l'acétone
FE1 (1-4)	90	600	0%-15%
FE2 (5-7)	206	600	15%-30%
FE3 (8-10)	35	400	30%
FE4 (11-14)	100	400	30%-50%
FE5 (15-16)	38	800	50%-75%
FE6 (17-18)	153	800	75%-100%

Tableau 8: les sous fraction de F₉

Pour la fraction FE2, qui a été chromatographiée sur plaque de gel de silice (CCM) et éluée avec un mélange CHCl₃/Cyclohexane/AcOET (1:1:2), qui est utilisé généralement dans la séparation des lactones sesquiterpéniques, on obtient 6 composés, notés CH1, CH2, CH3, CH4, CH5 et CH6.

La fraction FE3 montre, après contrôle chromatographique, la présence d'une lactone sesquiterpénique à l'état pur, mais malheureusement la faible quantité de ce composé ne nous a pas permis de l'identifier.

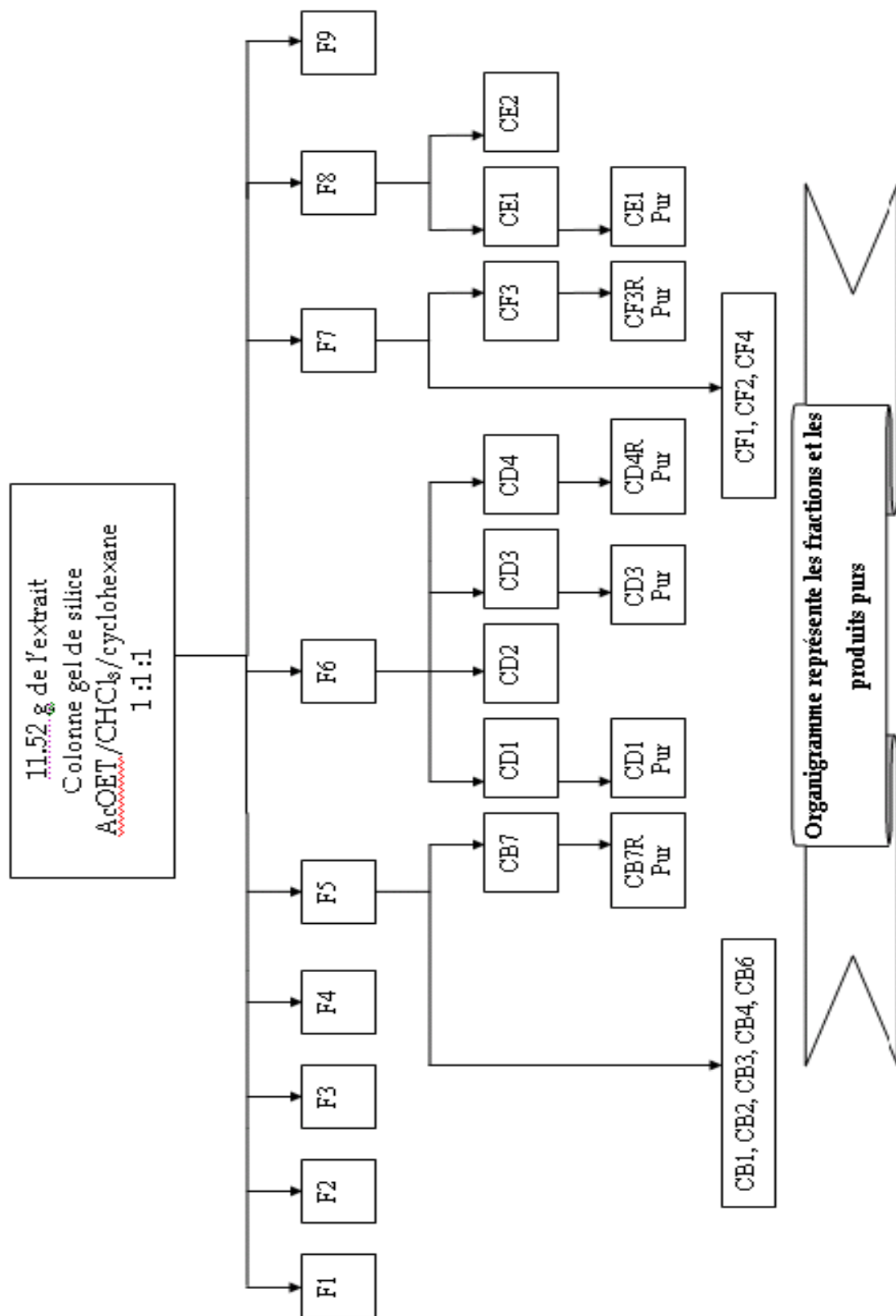
On a partagé le reste de la fraction F₉ (3g) en deux parties, l'une est très soluble dans le chloroforme est l'autre insoluble.

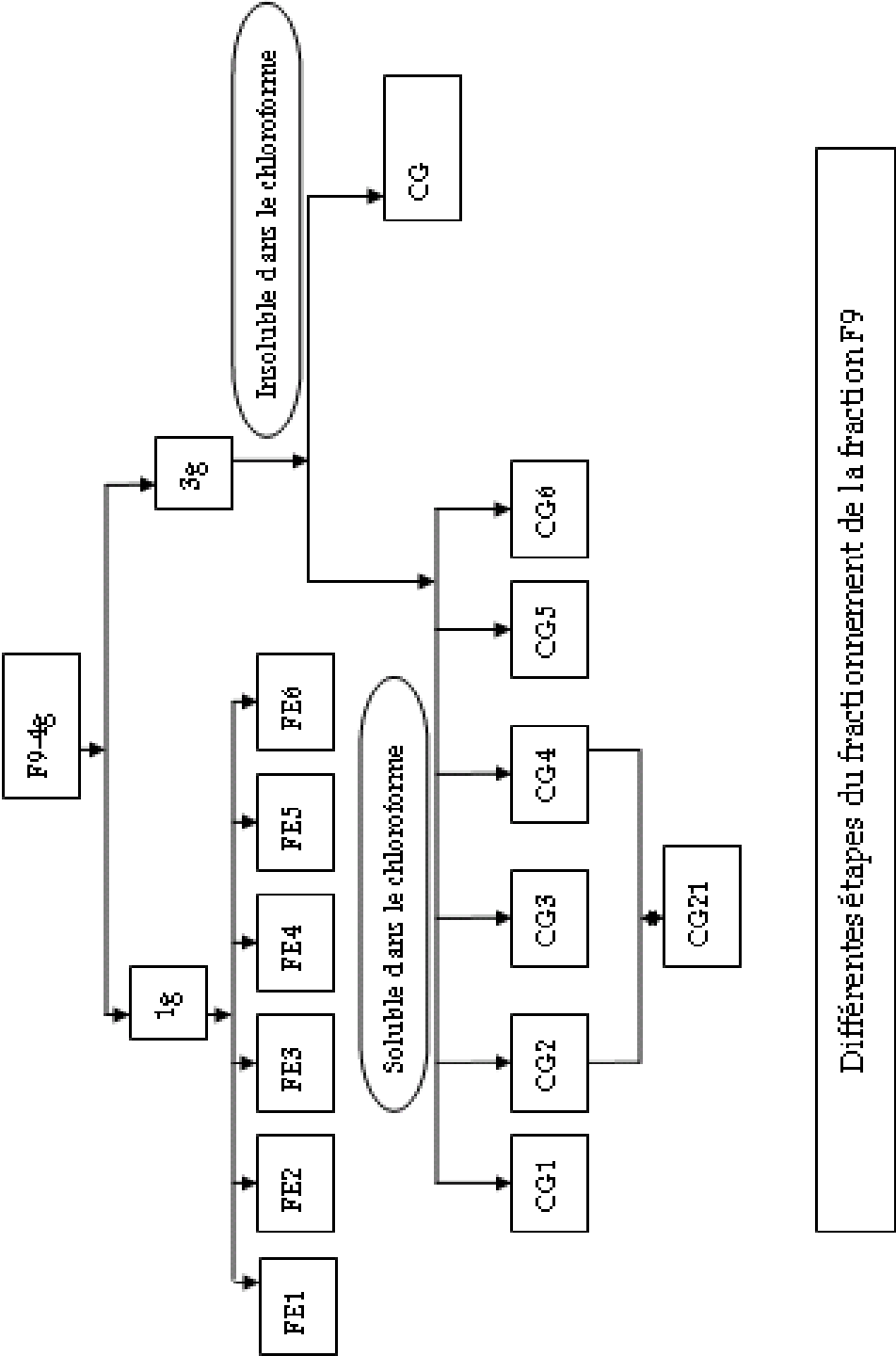
Pour la première partie très soluble dans le CHCl₃ le poids est de 1.5g, a été rechromatographié sur plaque de gel de silice, en utilisant l'AcOEt/Hexane comme éluant (6 :4), on obtient 6 sous fractions qui sont : CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 et CG6. Après un contrôle chromatographique on a remarqué que les deux sous fractions CG2 et CG4 nous donne deux produits semblables.

Les autres sous fractions obtenus de F₉ ne sont pas exploitées ils feront l'objet d'investigations ultérieures.

Fraction F9 4g	Les partie fractionnées de F9		sous fraction obtenu	Remarque
	La partie de 1g		FE1, FE2, FE3, FE4, FE5, FE6	FE3 Pure, et FE2 donne CH1....CH6 non exploitées
	La partie de 3g	La partie soluble dans le CHCl ₃	CG1, CG2, CG3, CG4, CG5, CG6	non exploitées
		La partie insoluble dans le CHCl ₃	CG	non exploitées

Tableau 9: l'ensembles des sous fractions obtenu de F9





Chapitre IV

Résultats et Discussions

Introduction :

L'étude phytochimique d'exsudat de l'espèce *Centaurea calcitrapa* a montré la présence de sept produits purs qui ont été identifiés par des méthodes analytiques telles que RMN 1 H et l'UV visible.

Fraction	Produit
F5	CB7R
F6	CD1, CD3, CD4R
F7	CF3R
F8	CE1
Précipité blanc	CC1

Tableau récapitulatif des produits purs obtenus

IV.1.l'analyse structurale du produit CD4R (F6)

IV.1.1.Comportement chromatographique

Système	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/ Acétylène cétone
R _f	0.92	0.06
fluorescence	Violette	

Tableau1 : *Comportement chromatographique de CD4R*

IV.1.2. Données spectrales

IV.1.2.1. Spectroscopie UV- Visible

Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	340	271
NaOH	370	314, 275
AlCl ₃	365	269, 286
AlCl ₃ +HCl	358	274, 286
NaOAC	374, 320	281
NaOAC+H ₃ BO ₃	350	270

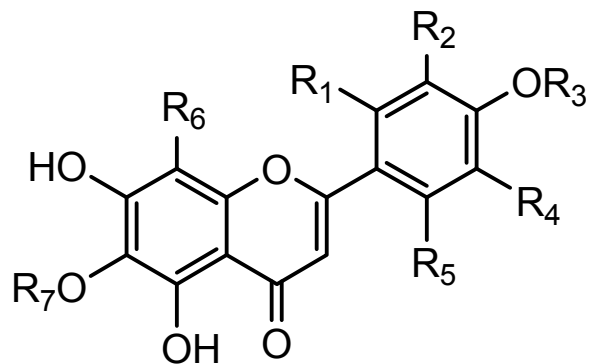
Tableau2 : résultat de la série spectrale pour CD4R

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CD4R sous la lumière UV- Visible (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol ($\lambda_{\max}=340\text{nm}$), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +30nm de la bande I, avec diminution de l'intensité, ce qui indique que la position 4' est occupée, l'apparition d'une nouvelle bande ($\lambda_{\max}=314\text{nm}$) montre la présence d'un OH libre en 7, ce qui est confirmé par le spectre en présence de NaOAC, ou la bande II subit un déplacement bathochrome (+10nm) par rapport au spectre du méthanol.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré en présence de AlCl₃ par rapport à celui enregistré en présence de AlCl₃+HCl, on conclut qu'il y n' a pas de système ortho dihydroxyle sur le noyau B (faible déplacement de la bande I). L'addition du réactif AlCl₃+HCl conduit à un déplacement bathochrome (+18nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui indique l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6.

L'addition du réactif NaOAc+H₃BO₃ donne un faible déplacement (+10nm) par rapport au spectre du MeOH, ce qui confirme l'absence du système ortho di OH. Ces éléments permettent de déduire la structure partielle suivante .



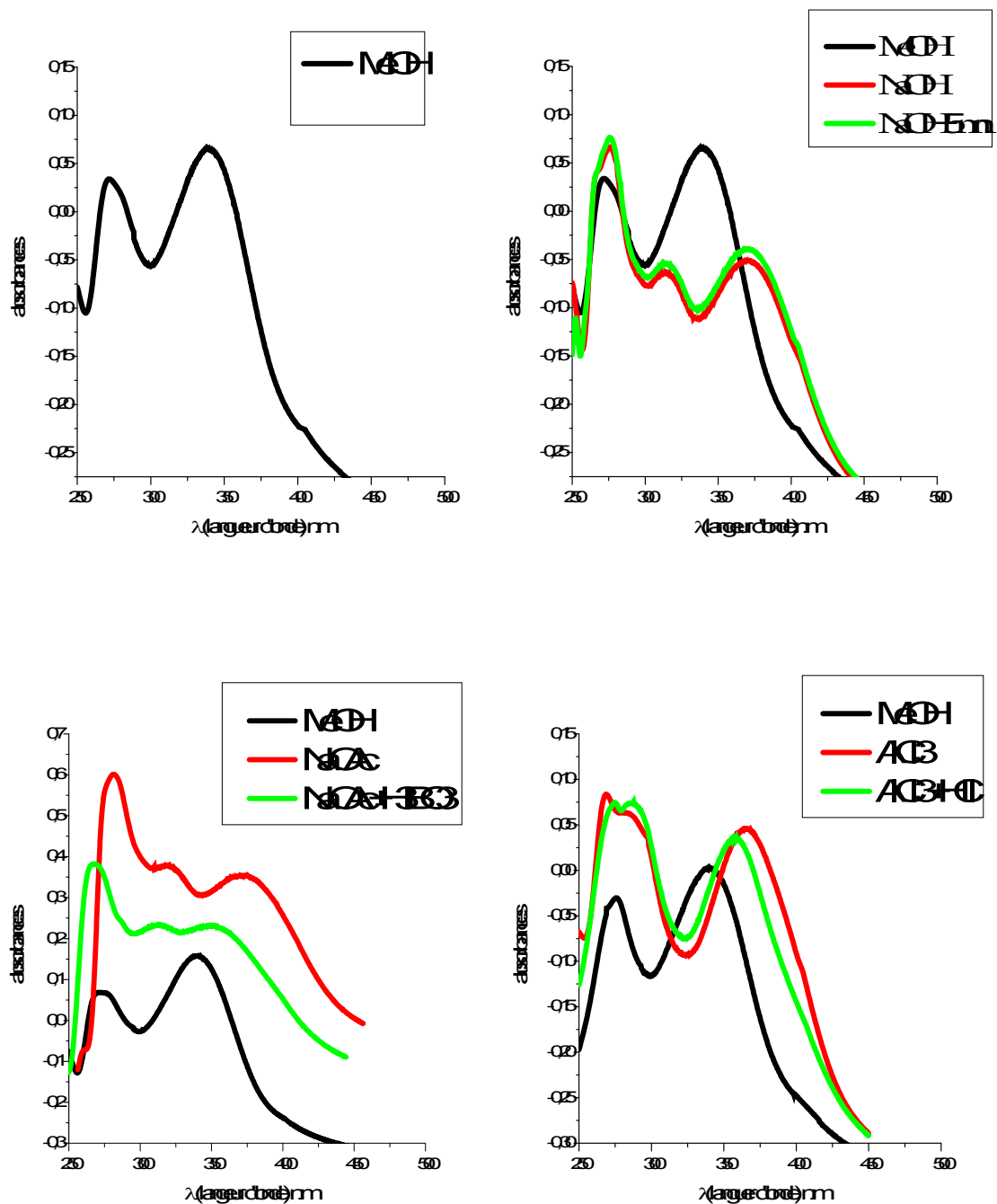


Fig.1 : la série spectrale UV- Visible CD4R

IV.1.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.55	1H	S	-	H8
6.65	1H	S	-	H3
7.2	1H	d	8.5	H5'
7.6	1H	d	2.1	H2'
7.7	1H	dd	8.5, 2.1	H6'
4.1	3H	S	-	O-CH ₃
4.0	3H	S	-	O-CH ₃
3.9	3H	S	-	O-CH ₃

Tableau3 : RMN proton CD4R

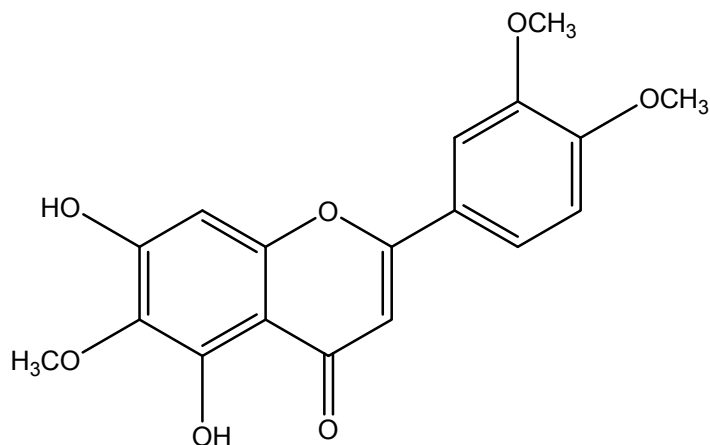
Interprétation :

Les signaux relatif au spectre RMN proton peuvent interprétés comme suit :

- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.55$ ppm est attribuable à H8 (la position H-6 étant oxygénée d'après les données de la spectroscopie UV).
- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.65$ ppm est attribuable à H3
- Le doublet de doublet qui apparaît a $\delta=7.7$ ppm avec les constantes de couplage $J=8.5$ Hz et $J=2.1$ Hz est attribuable à H6' et indique l'existence des protons H2' et H5' ($J_{H5'-H6'} = 8,5$ Hz ; $J_{H2'-H6'} = 2,1$ Hz).
- La constante de couplage $J=8.5$ Hz du doublet qui apparaît a $\delta=7.2$ ppm, permet l'attribution du H5'.

- H₂' apparaît à $\delta=7.6$ sous forme de doublet avec une petite constante de couplage $J=2.1\text{Hz}$.
- On remarque aussi la présence de trois méthoxyles sur le spectre proton.

De toutes ces données on déduit la structure du composé CD4R :



5,7-dihydroxy, 6, 3', 4'-trimethoxyflavone (Eupatiline)

Extrait de nombreuse centaurée (*C. alexeundrina*[95], *C. arguta*[96], *C. cineraria*[97], *C. cunifolia*[98], *C. rothmalerana*[99], *C. senegalensis*[40], *C. virgata*[100]).

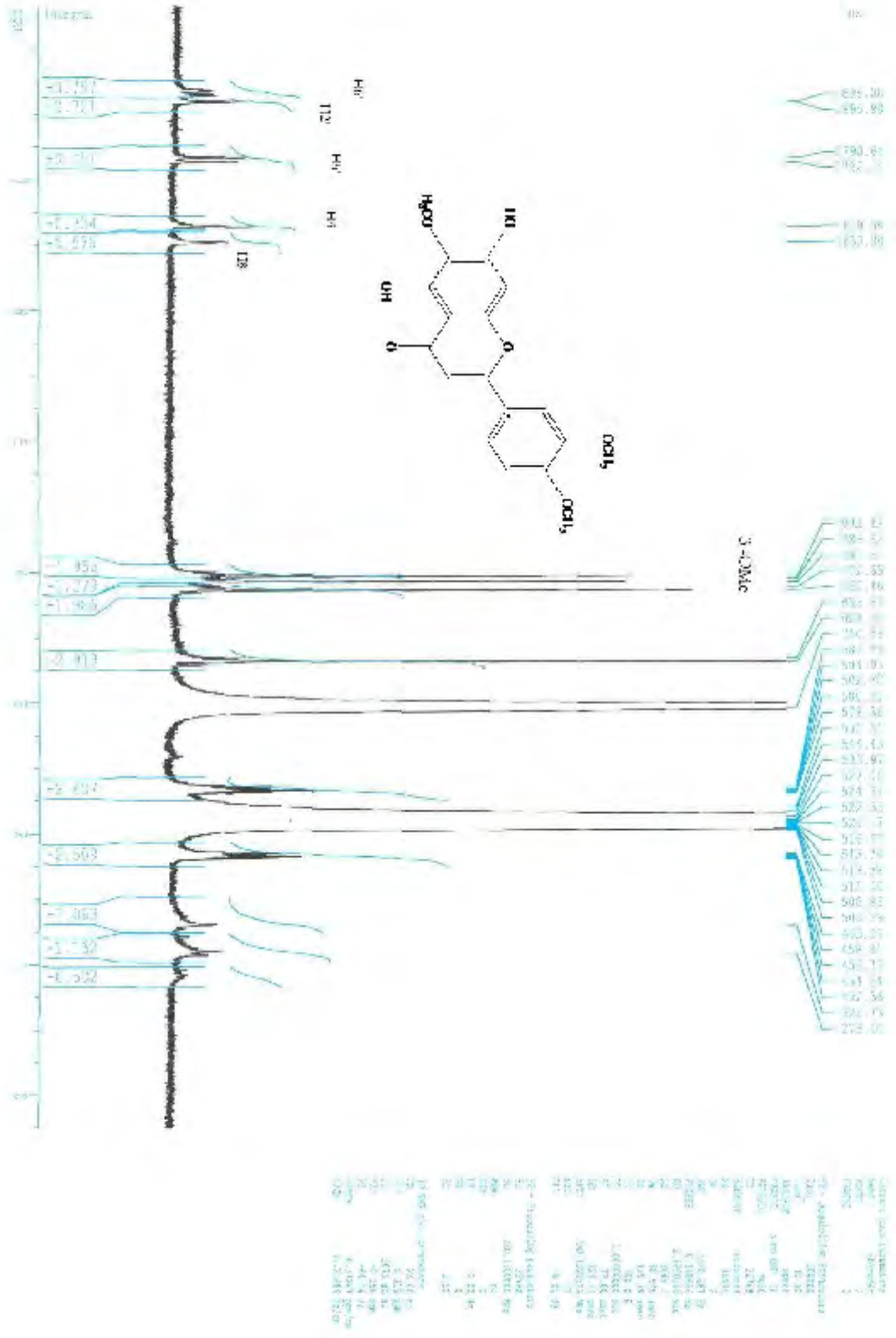


Fig.2 : spectre RMN proton CD4R dans $(CD_3)_2CO$

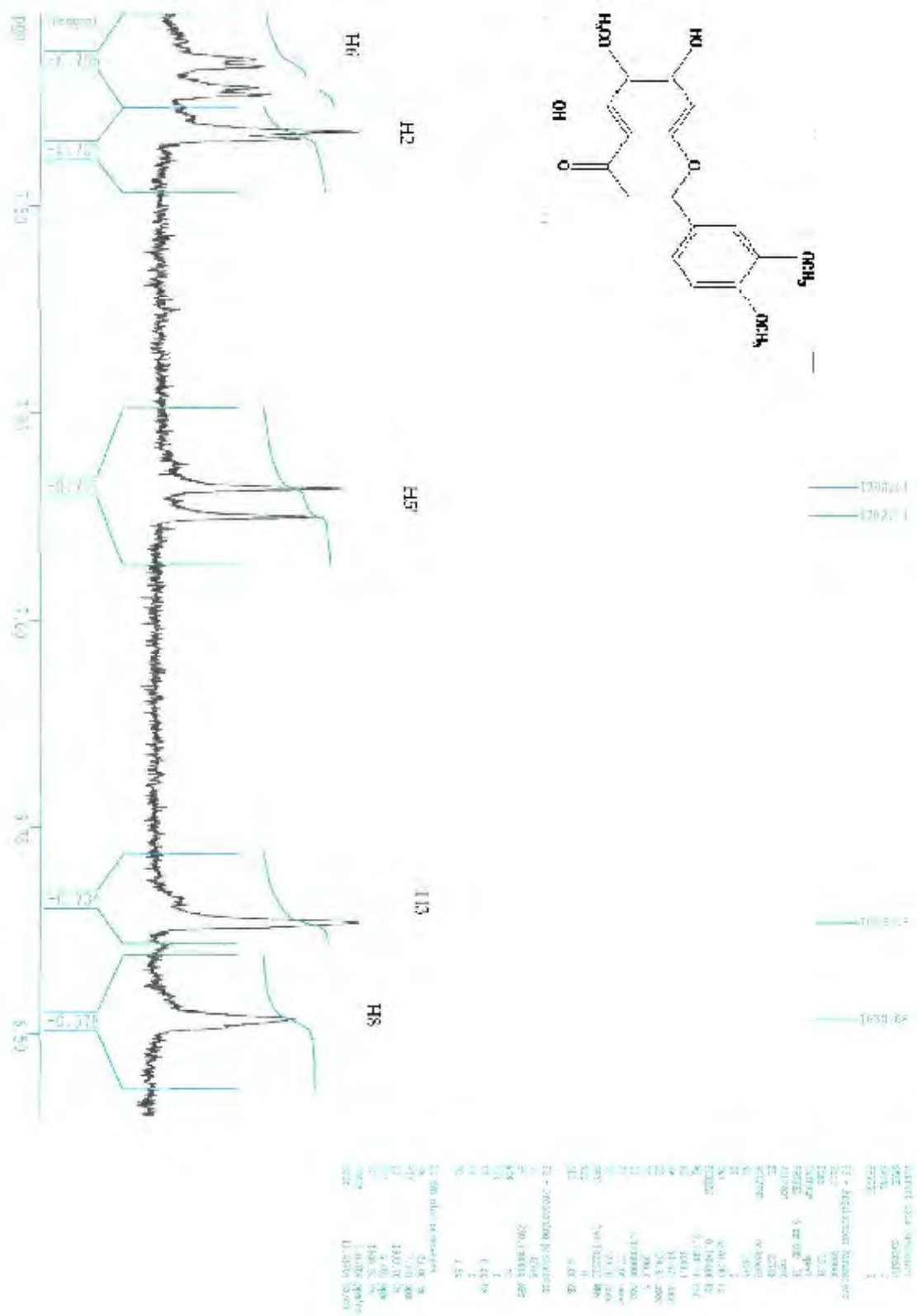


Fig.3 : étalement spectre proton CD4R dans (CD₃)₂CO

IV.2.1'analyse structurale du produit CB7R (F 5)

IV.2.1.Comportement chromatographique

Systeme	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/Acétyle cétone
R _f	0.94	0.08
Couleur	Violet	

Tableau4 : Comportement chromatographique de CB7R

IV.2.2. Données spectrales

IV.2.2.1.Spectroscopie UV- Visible

Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	340	275
NaOH	354	275
AlCl ₃	366	270, 286
AlCl ₃ +HCl	359	267, 289
NaOAC	370	275
NaOAC+H ₃ BO ₃	350	275

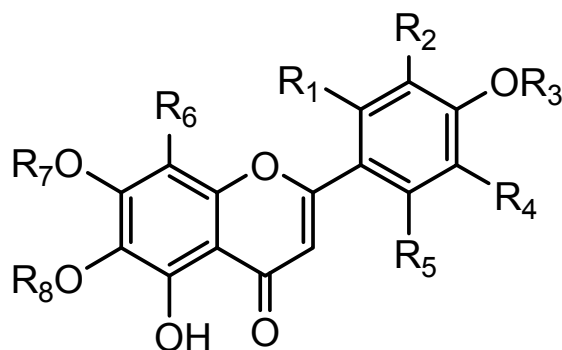
Tableau5 : résultat de la série spectrale pour CB7R

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CB7R sous la lumière UV- Visible (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence de méthanol ($\lambda_{\max}=340$ nm), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +14 nm de la bande I, avec diminution de l'intensité, ce qui prouve que l'hydroxyl en position 4' est substitué et l'absence d'une nouvelle bande entre 320-350 nm est significative d'une substitution en position 7, ce qui est confirmé par le spectre en présence de NaOAc, où la bande II ne subit pas un déplacement bathochrome par rapport au spectre du méthanol.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré en présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré en présence de AlCl_3+HCl , on conclut qu'il y a pas de système ortho di hydroxyle sur le noyau B (faible déplacement de la bande I), ceci confirmé Par l'addition du réactif $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ qui donne un faible déplacement (+10 nm) par rapport au spectre du MeOH. L'addition du réactif AlCl_3+HCl conduit à un déplacement bathochrome (+19 nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6.

En peut déduire la structure suivante :



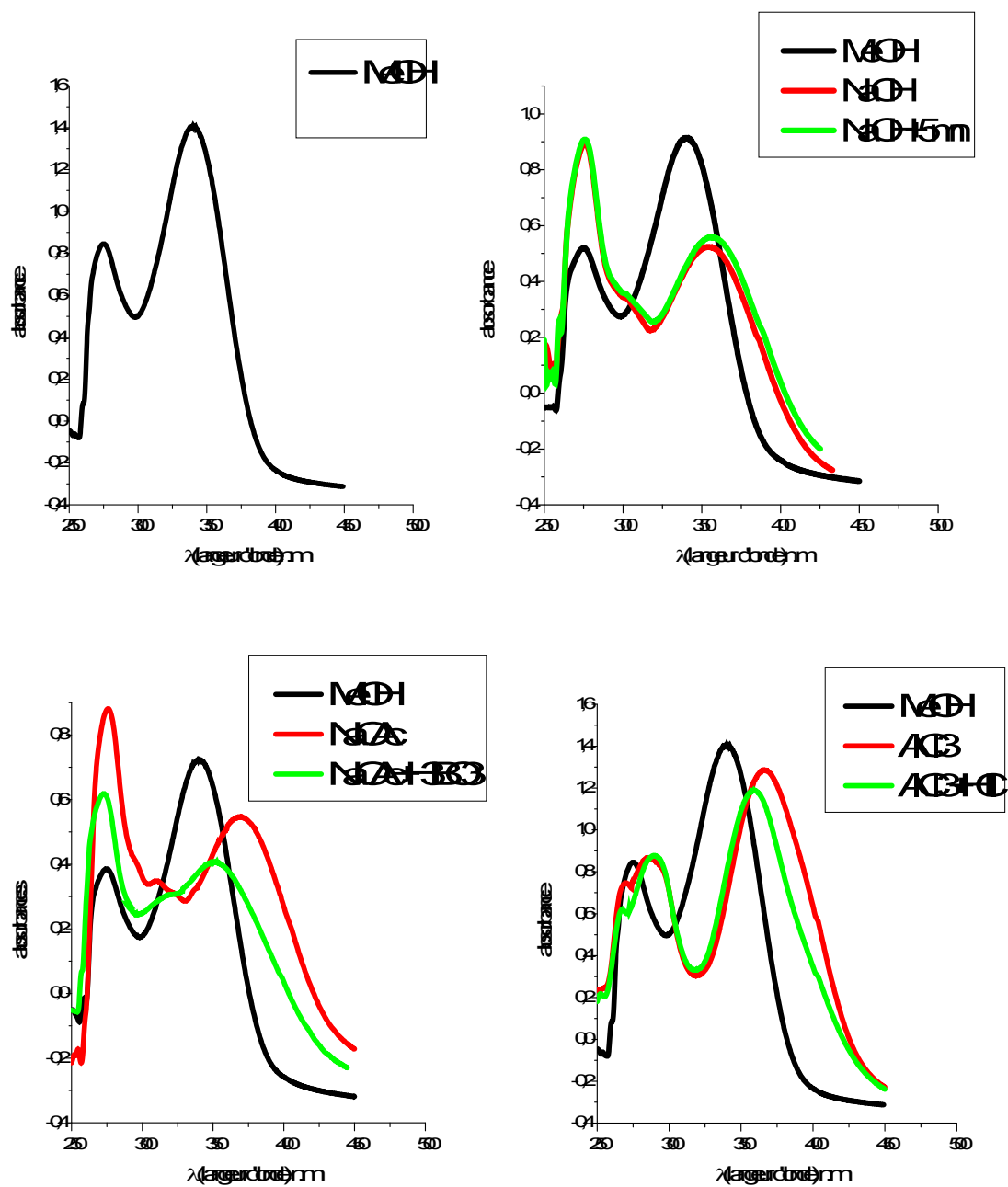
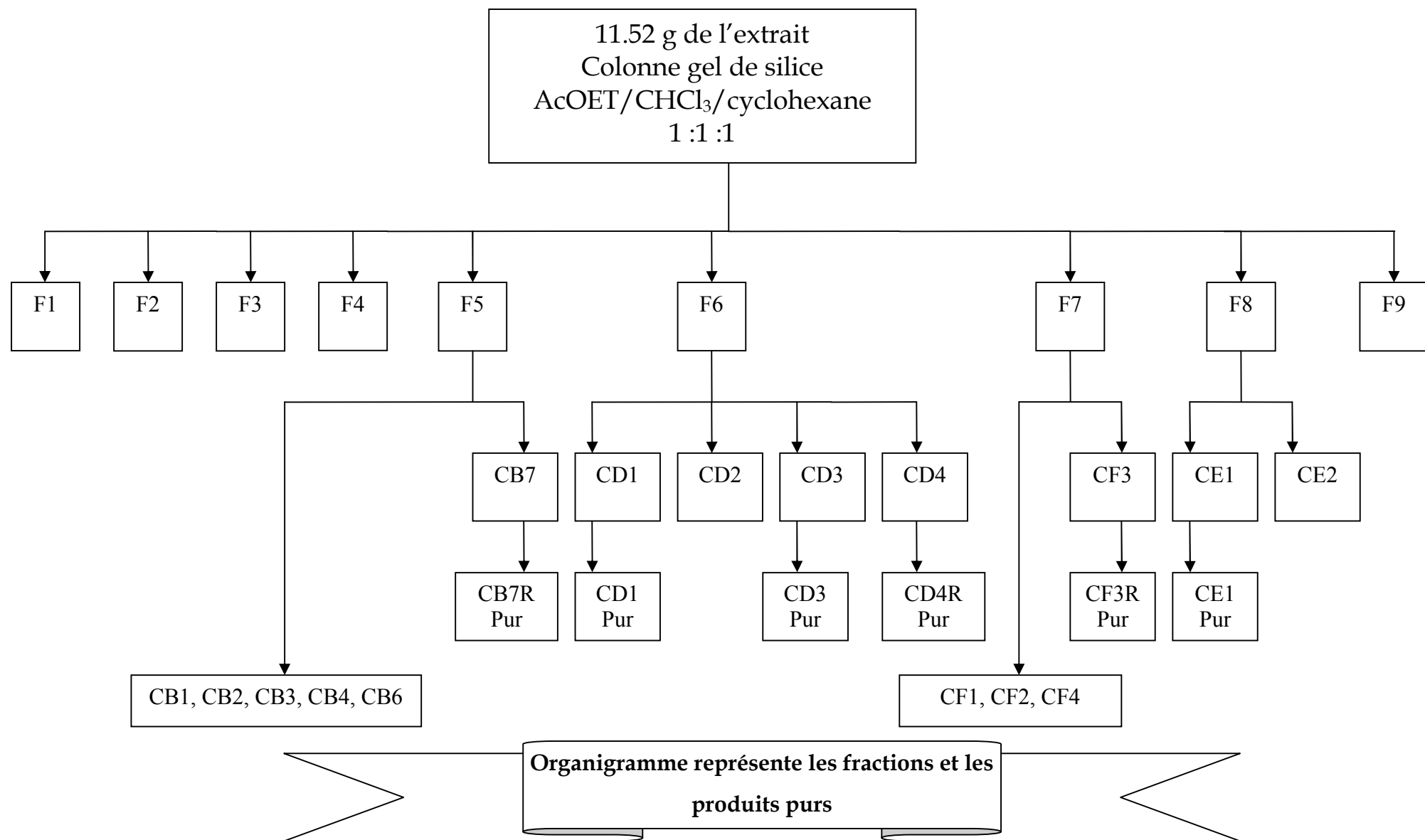
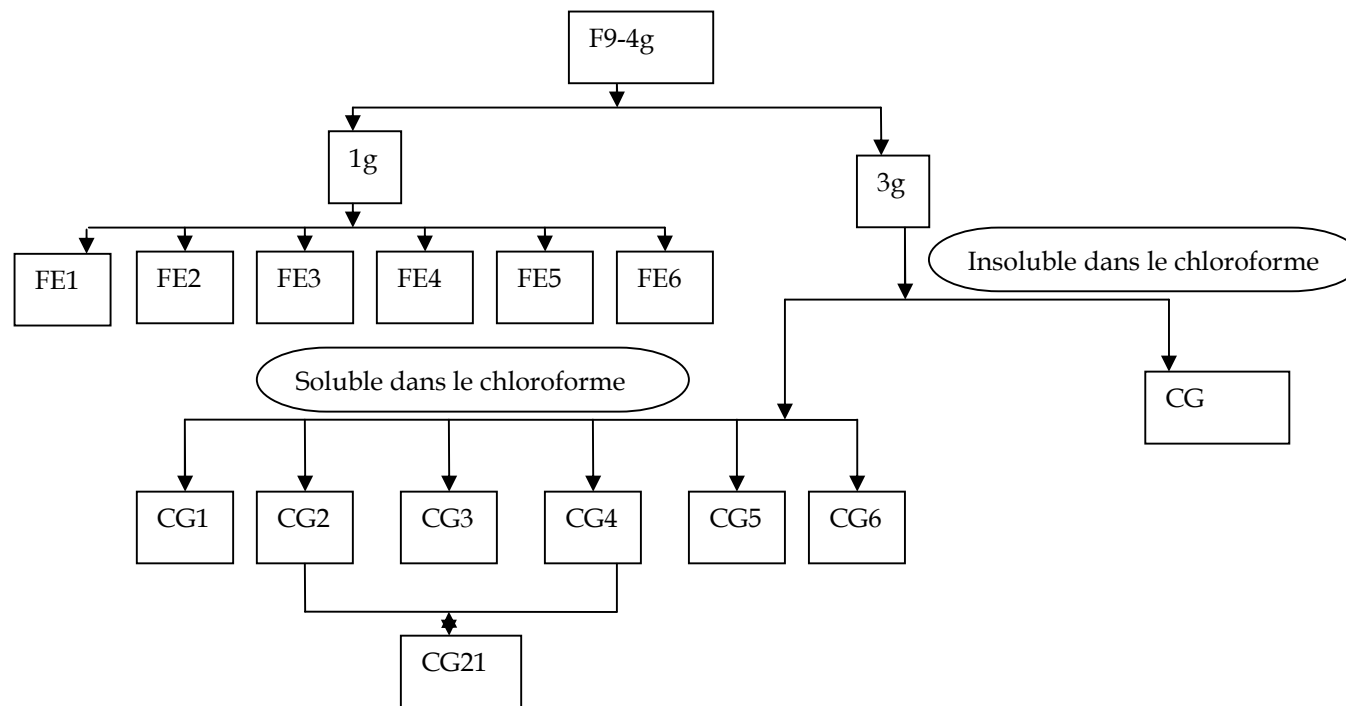


Fig.4 : la série spectrale UV- Visible CB7R





Différentes étapes du fractionnement de la fraction F9

IV.2.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.25	1H	S	-	H8
6.3	1H	S	-	H3
6.8	1H	d	8,7	H5'
7.2	1H	d	2	H2'
7.3	1H	dd	8,7 ; 2	H6'
3.66	3H	S	-	O-CH ₃
3.75	3H	S	-	O-CH ₃
3.8	3H	S	-	O-CH ₃

Tableau6 : RMN proton CB7R

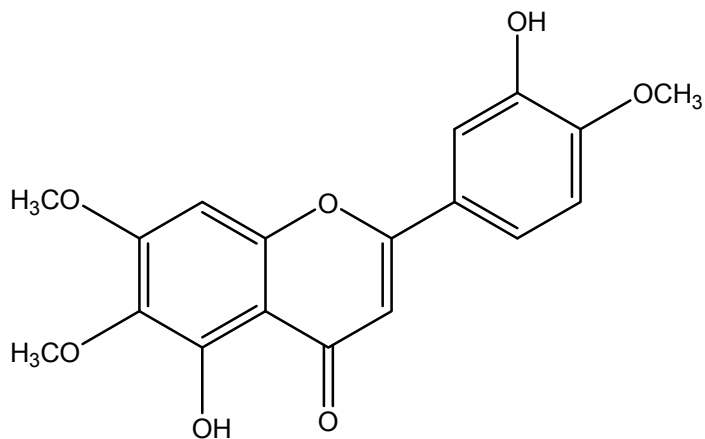
Interprétation :

Les signaux relatif au spectre RMN proton peuvent être interprété comme suit :

- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.25$ ppm est attribuable a H8 (la position H-6 étant oxygéné d'après les données de la spectroscopie UV).
- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.3$ ppm est attribuable a H3
- Le doublet de doublet qui apparaît à $\delta=7.3$ ppm avec les constantes de couplage $J=8.7$ Hz et $J=2$ Hz est attribuable à H6' et indique également l'existence des protons H2' et H5'.
- La constante de couplage $J=8.7$ Hz du doublet qui apparaît a $\delta=6.8$ ppm, permet l'attribution de H5'.

- H₂' apparaît à $\delta=7.2$ sous forme de doublet avec une petite constante de couplage $J=2\text{Hz}$.
- On remarque aussi la présence de trois méthoxyles sur le spectre proton.

D'après ces données, on déduit la structure du composé CB7R :



5,3' dihydroxy, 6, 7, 4' -trimethoxyflavone (Eupatorine)

Extrait de nombreuse centaurees (*C.aggregata*[101], *C.ariensis*, *C.cuneifolia*[98],
C.inermis[100], *C.pseudomaculosa*[29,102], *C.virgata*[100])

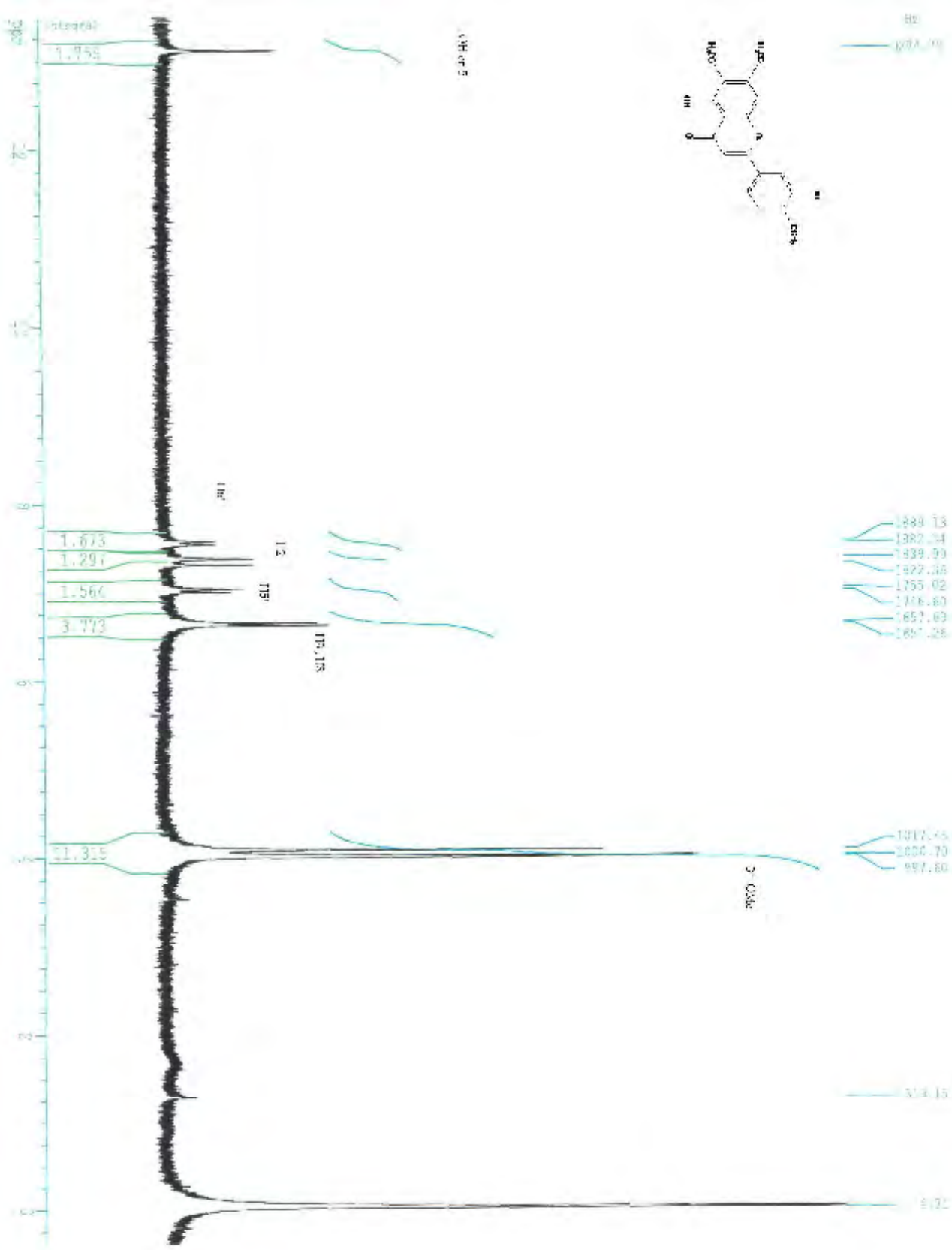


Fig.5 : spectre RMN proton CB7R dans CDCl₃

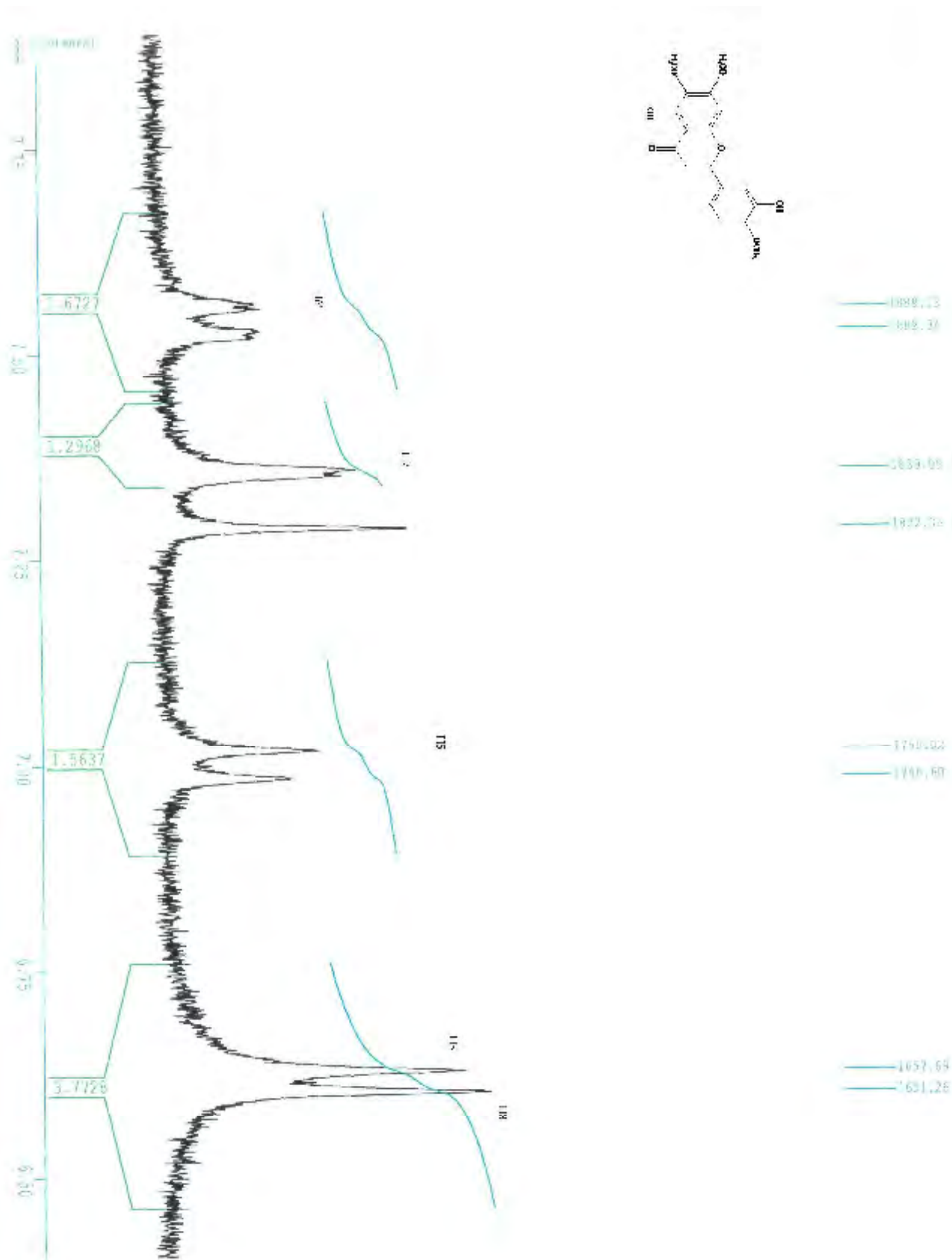


Fig.6 : étalement spectre RMN proton CB7R dans CDCl₃

IV.3.1'analyse structurale du produit CF3R (F 7)

IV.3.1.Comportement chromatographique

Systeme	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/ Acétyl cétone
R _f	0.79	0.05
Couleur	Violet	

Tableau7 : Comportement chromatographique de CF3R

IV.3.2.Les données spectrales

IV.3.2.1.Spectroscopie UV- Visible

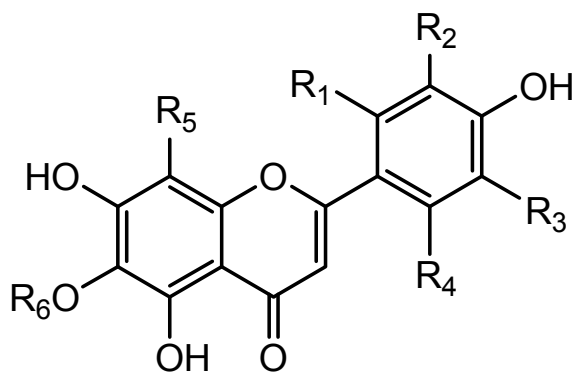
Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	345	271
NaOH	408, 334	267
AlCl ₃	373	263, 283
AlCl ₃ +HCl	362	288
NaOAC	392, 320	263, 283
NaOAC+H ₃ BO ₃	354, 315	271

Tableau8 : résultat de la série spectrale pour CF3R

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CF3R sous la lumière UV- Visible (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol ($\lambda_{\max}=345\text{nm}$), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +63nm de la bande I, avec augmentation de l'intensité, ce qui prouve qu'il y a un OH libre en 4', et l'apparition d'une nouvelle bande à 334 nm indique la présence d'un OH libre en position 7.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré en présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré en présence de AlCl_3+HCl , on conclut qu'il y a pas de système ortho dihydroxyle sur le noyau B (faible déplacement de la bande I), ceci est confirmé par l'addition du réactif $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ qui donne un faible déplacement (+9 nm) par rapport au spectre du MeOH. L'addition du réactif AlCl_3+HCl conduit à un déplacement bathochrome (+17 nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6. De toutes ces données, on peut déduire la structure suivante :



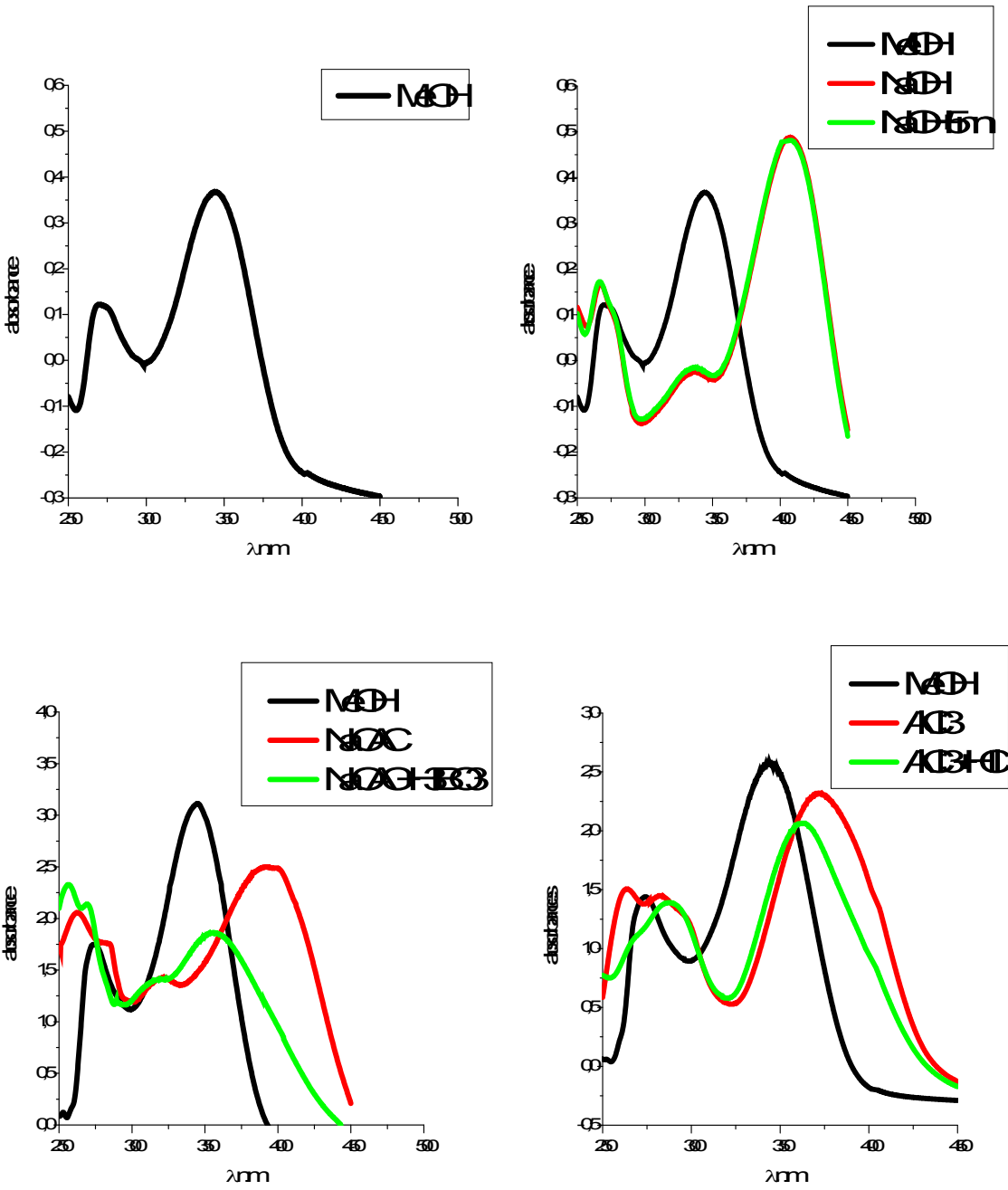


Fig.7 : la série spectrale UV- Visible CF3R

IV.3.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.54	1H	S	-	H8
6.62	1H	S	-	H3
6.95	1H	d	8.33	H5'
7.52	1H	d	2	H2'
7.53	1H	dd	8.33, 2	H6'
4	3H	S	-	O-CH ₃
3.9	3H	S	-	O-CH ₃

Tableau9 : RMN proton CF3R

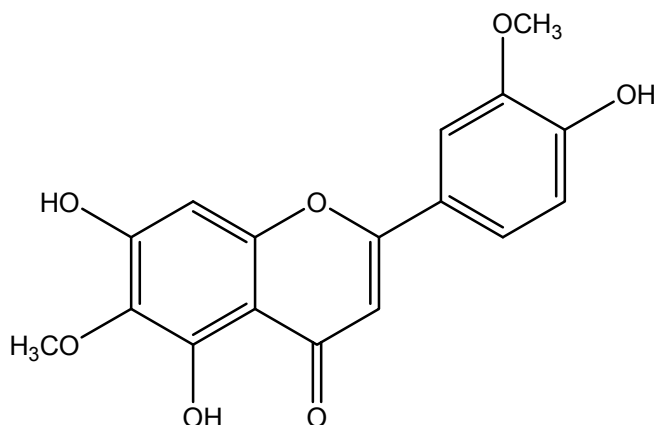
Interprétation :

Les signaux relatif au spectre RMN proton peuvent être interprétés comme suit :

- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.54$ ppm est attribuable a H8 (la position H-6 étant oxygéné d'après les données de la spectroscopie UV).
- Le signal singulet qui apparaît a $\delta=6.62$ ppm est attribuable a H3
- Le doublet de doublet qui apparaît a $\delta=7.53$ ppm avec les constantes de couplage $J=8.33$ Hz et $J=2$ Hz est attribuable à H6' et indique l'existences des protons H2' et H5'.
- La constante de couplage $J=8.33$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta=6.95$ ppm, permet l'attribution du H5'.
- H2' apparaît à $\delta=7.52$ sous forme de doublet avec une petite constante de couplage $J=2$ Hz.

- On remarque aussi la présence de deux méthoxyls sur le spectre proton.

D'après ces données on déduit la structure du composé CF3R :



5, 7, 4', trihydroxy 6, 3', dimethoxyflavone (Jaceosidine)

Extrait de nombreuse Centaurée (*C.alexandrina*[95], *C.arguta*[96], *C.aspera*[23,103], *C.behen*[100], *C.calcitrapa*[39], *C.cineraria*[97], *C.cuneifolia*[98], *C.inermis*[100], *C.jacea*[100], *C.kilea*[100], *C.malcitana*[104], *C.pallescens*[105])

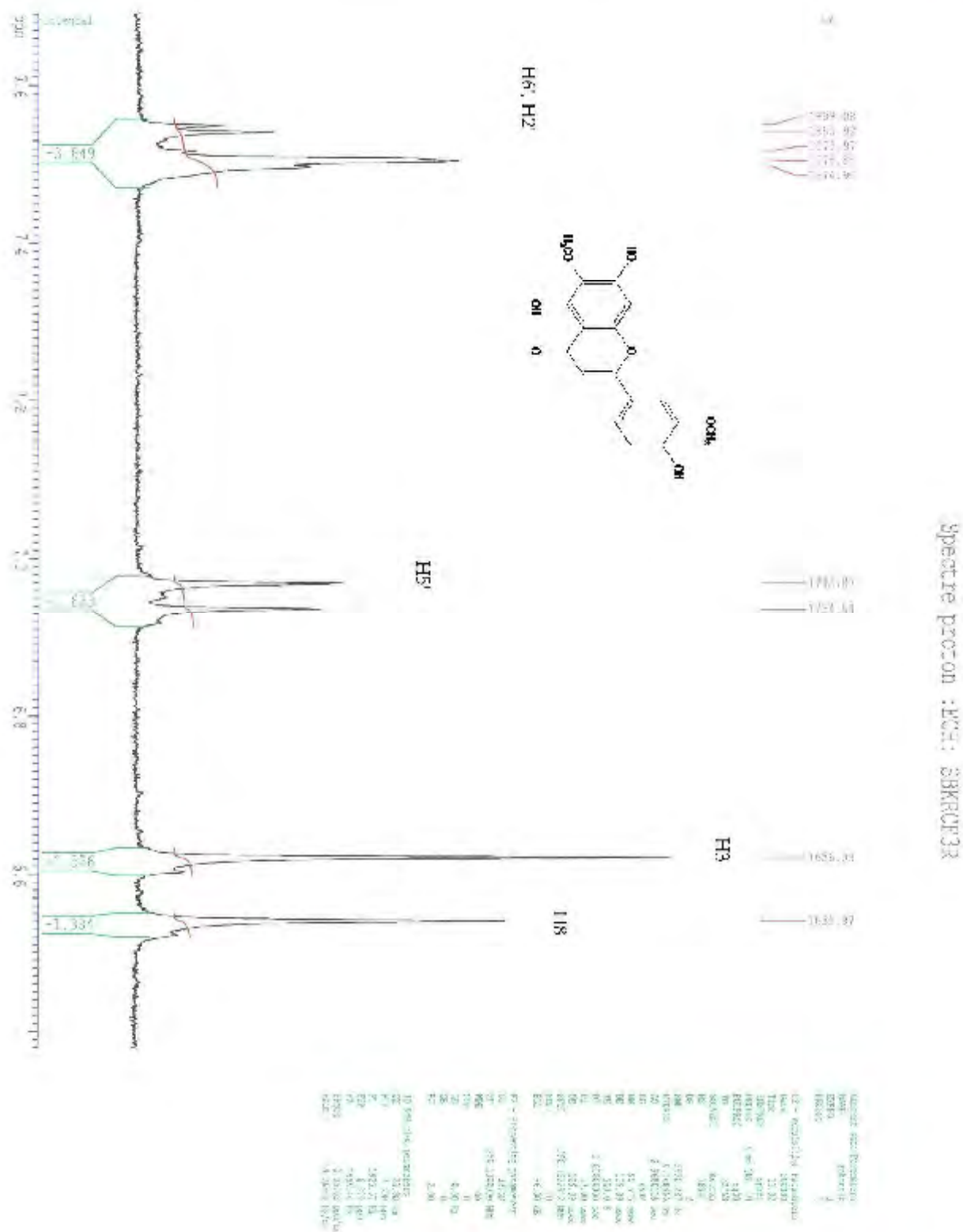


Fig.9 : étalement du spectre RMN proton CF3R dans CD₃OD

IV.4.1'analyse structurale du produit CD3 (F6)

IV.4.1.Comportement chromatographique

Systeme	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/Acétyle cétone
R _f	0.73	0.04
Couleur	Violet	

Tableau10 : Comportement chromatographique de CD3

IV.4.2. Données spectrales

IV.4.2.1.Spectroscopie UV- Visible

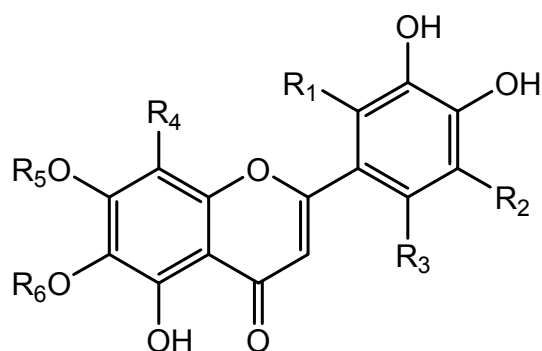
Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	343	273
NaOH	405	260
AlCl ₃	383	288
AlCl ₃ +HCl	360	288
NaOAC	393	273, 303
NaOAC+H ₃ BO ₃	355	277, 307

Tableau11 : résultat de la série spectrale pour CD3

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CD3 sous la lumière UV- Visible (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol ($\lambda_{\max}=343\text{nm}$), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +62nm de la bande I, avec augmentation de l'intensité, ce qui prouve qu'il y a un OH libre en 4', et l'absence d'une nouvelle bande entre 320-350nm est significative d'une substitution en position 7, ce qui est confirmé par le spectre en présence de NaOAc, ou la bande II ne subit pas un déplacement bathochrome par rapport au spectre du méthanol.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré en présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré en à la présence de AlCl_3+HCl , on conclut qu'il existe un système ortho dihydroxyle sur le noyau B (déplacement hypsochrome , $\Delta\lambda=-23\text{nm}$), ceci est confirmé par l'addition du réactif $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ qui conduit à un déplacement bathochromique de $\Delta\lambda=+12\text{nm}$ de la bande II, par rapport au spectre du MeOH. L'addition du réactif AlCl_3+HCl conduit à un déplacement bathochrome (+17nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6 . De toutes ces données, on peut déduire la structure suivante :



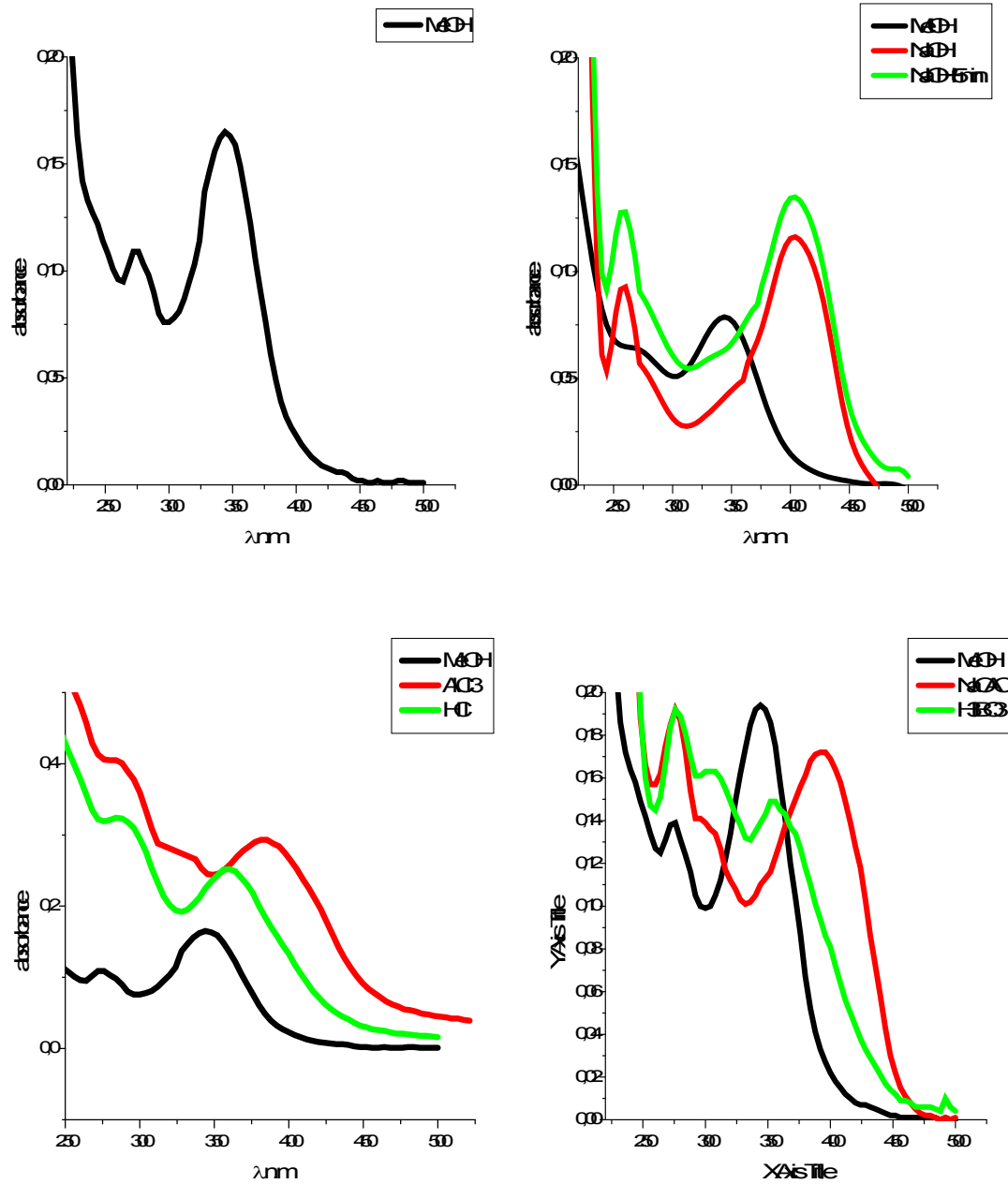


Fig.10 : la série spectrale UV- Visible CD3

IV.4.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.7	1H	S	-	H8
6.72	1H	S	-	H3
7.02	1H	d	8.55	H5'
7.7	1H	d	2	H2'
7.68	1H	dd	8.55, 2	H6'
4	3H	S	-	O-CH ₃
3.9	3H	S	-	O-CH ₃

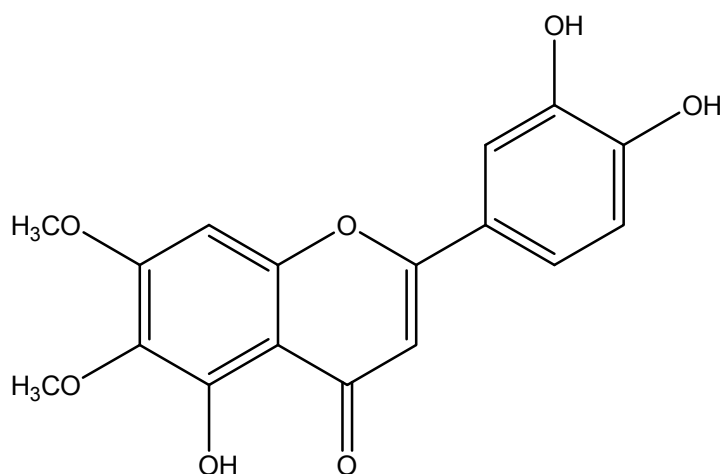
Tableau12 : RMN proton CD₃**Interprétation :**

Les signaux relatif au spectre RMN proton peuvent interprété comme suit :

- Le singulet qui apparaît a $\delta=6.7$ ppm est attribuable a H8 (la position H-6 étant oxygéné d'après les données de la spectroscopie UV).
- Le singlets qui apparaît a $\delta=6.72$ ppm est attribuable a H3
- Le doublet de doublé qui apparaît a $\delta=7.68$ ppm avec les constantes de couplage $J=8.55$ Hz et $J=2$ Hz est attribuable à H6' est indique l'existences des H2' et H5'.
- La constante de couplage $J=8.55$ Hz du doublet qui apparaît a $\delta=7.02$ ppm, permet l'attribution du H5'.
- H2' apparaît à $\delta=7.7$ ppm sous forme de doublet avec une petite constante de couplage $J=2$ Hz.

- On remarque aussi la présence de deux méthoxyles sur le spectre proton.

D'après ces données on déduit la structure du composé CD3 :



3',4',5-trihydroxy 6,7 dimethoxyflavone (Cirsiliol)

Extrait de 3 Centaurée (*C.phyllocephala*[106,107], *C.sinaica*[108], *C.urivillei*[109])

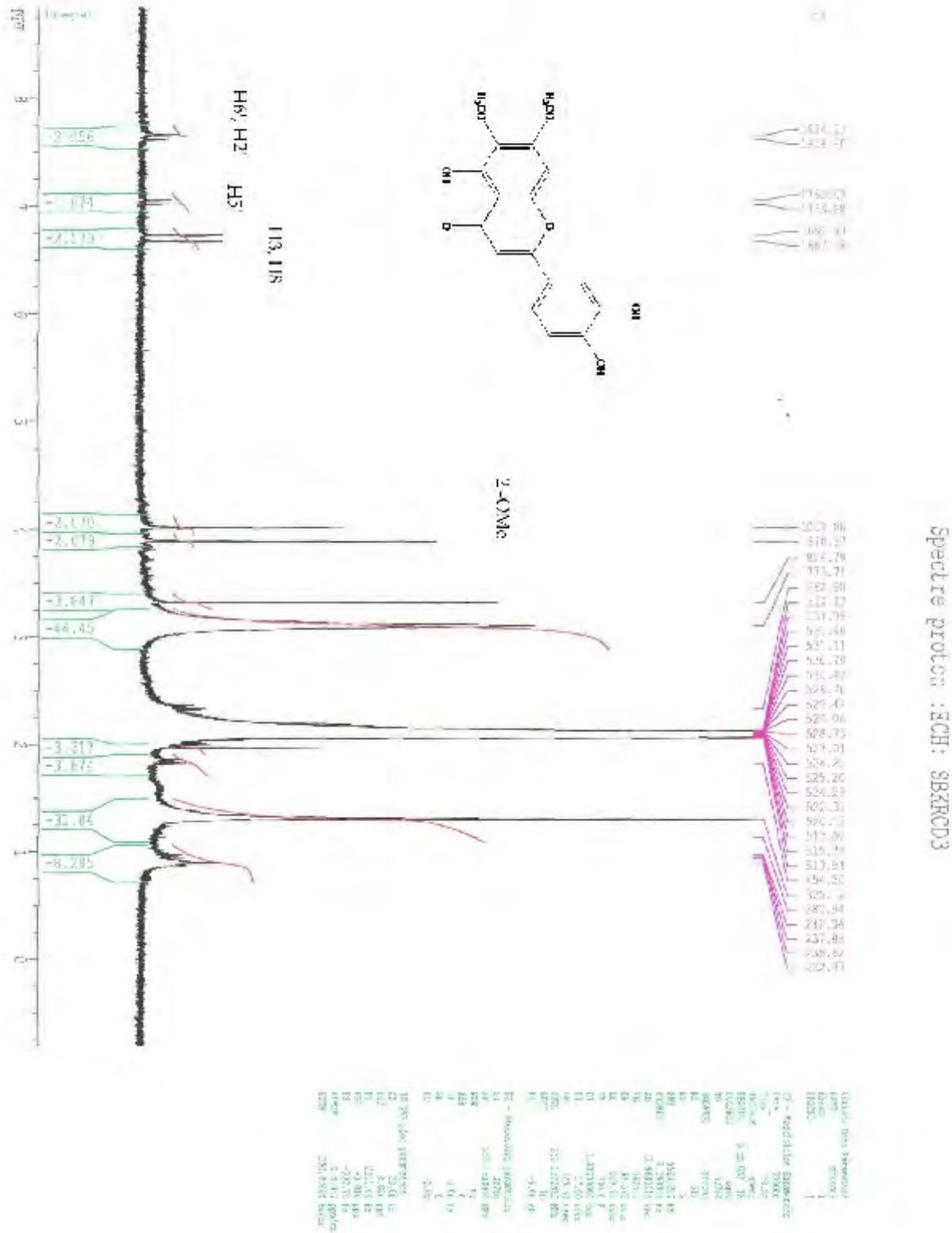


Fig.11 : spectre RMN proton CD3 dans (CD₃)₂CO

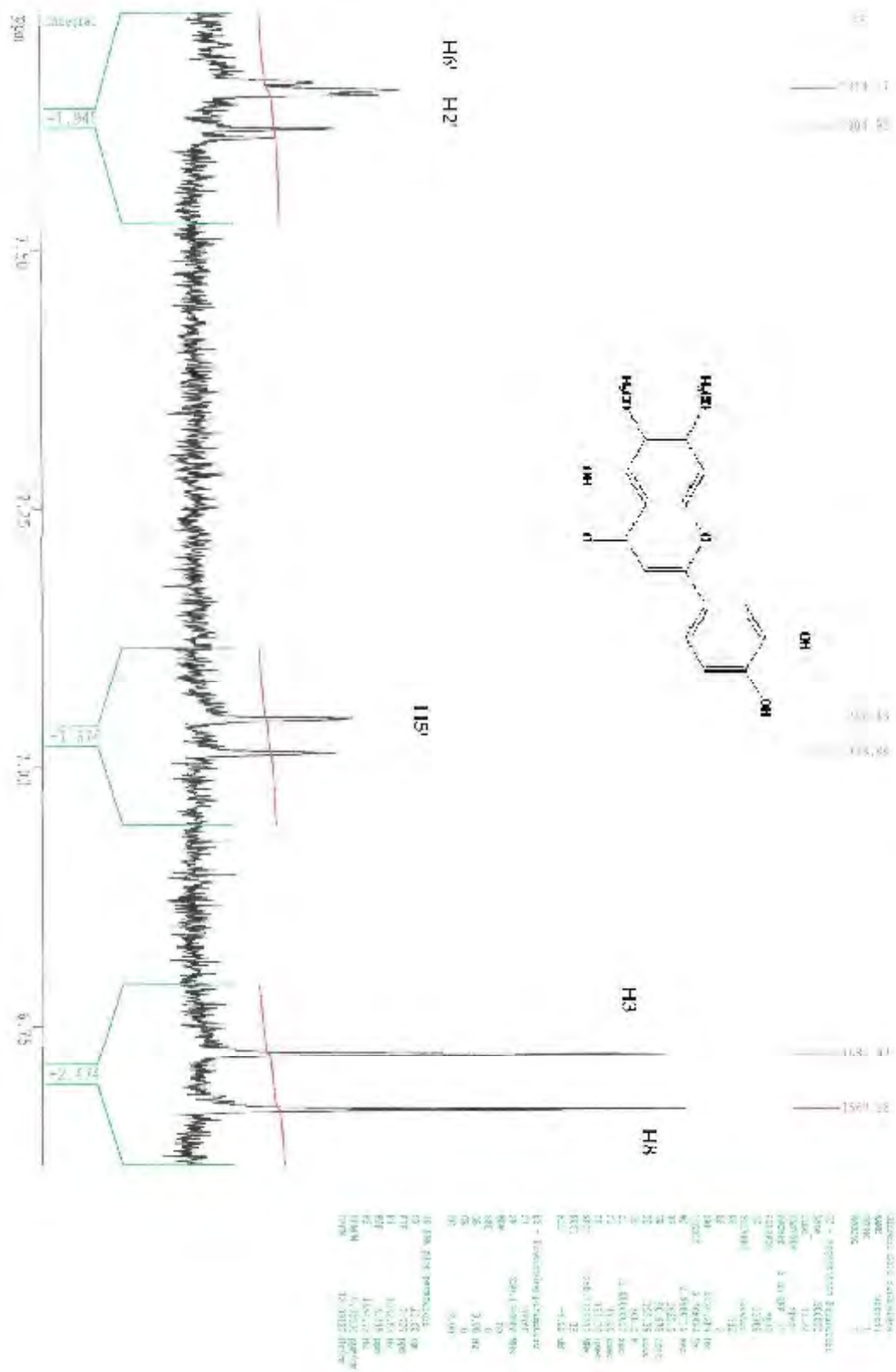


Fig.12 : étalement du spectre RMN proton CD3 dans (CD₃)₂CO

IV.5.1'analyse structurale du produit CD1 (F6)

IV.5.1.Comportement chromatographique

Système	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/Acétyle cétone
R _f	0.65	0.05
Couleur	Violet	

Tableau13 : Comportement chromatographique de CD1

IV.5.2.Les donnés spectrales

IV.5.2.1.Spectroscopie UV- Visible

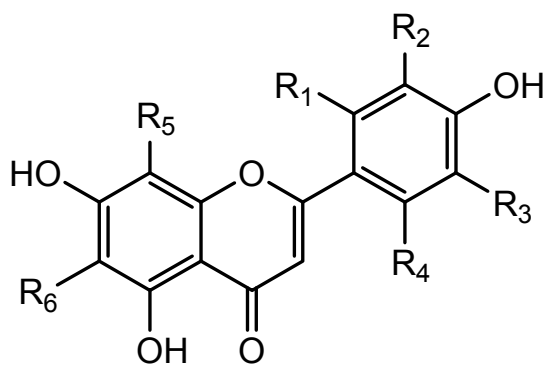
Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	334	268
NaOH	325, 392	275
AlCl ₃	348, 382	275, 302
AlCl ₃ +HCl	343, 379	277, 300
NaOAC	393	275, 305
NaOAC+H ₃ BO ₃	340	269

Tableau14 : résultat de la série spectrale pour CD1

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CD1 sous la lumière UV- Visible (365 nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol ($\lambda_{\max}=334\text{nm}$), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +58 nm de la bande I, avec augmentation de l'intensité, ce qui prouve qu'il y a un OH libre en 4', et la présence d'une nouvelle bande à 325 nm est significative d'un OH libre en position 7, ce qui est confirmé par le spectre en présence de NaOAc ($\Delta\lambda=+7\text{ nm}$), où la bande II subit un déplacement bathochrome par rapport au spectre du méthanol.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré à la présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré à la présence de AlCl_3+HCl , on conclut qu'il y a pas de système ortho dihydroxyle sur le noyau B (faible déplacement de la bande I -3 nm), ceci est confirmé. Par l'addition du réactif $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ donne un faible déplacement (+6nm) par rapport au spectre du MeOH. L'addition du réactif AlCl_3+HCl conduit à un déplacement bathochrome (+45 nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en 5. De toutes ces données, on peut déduire la structure suivante :



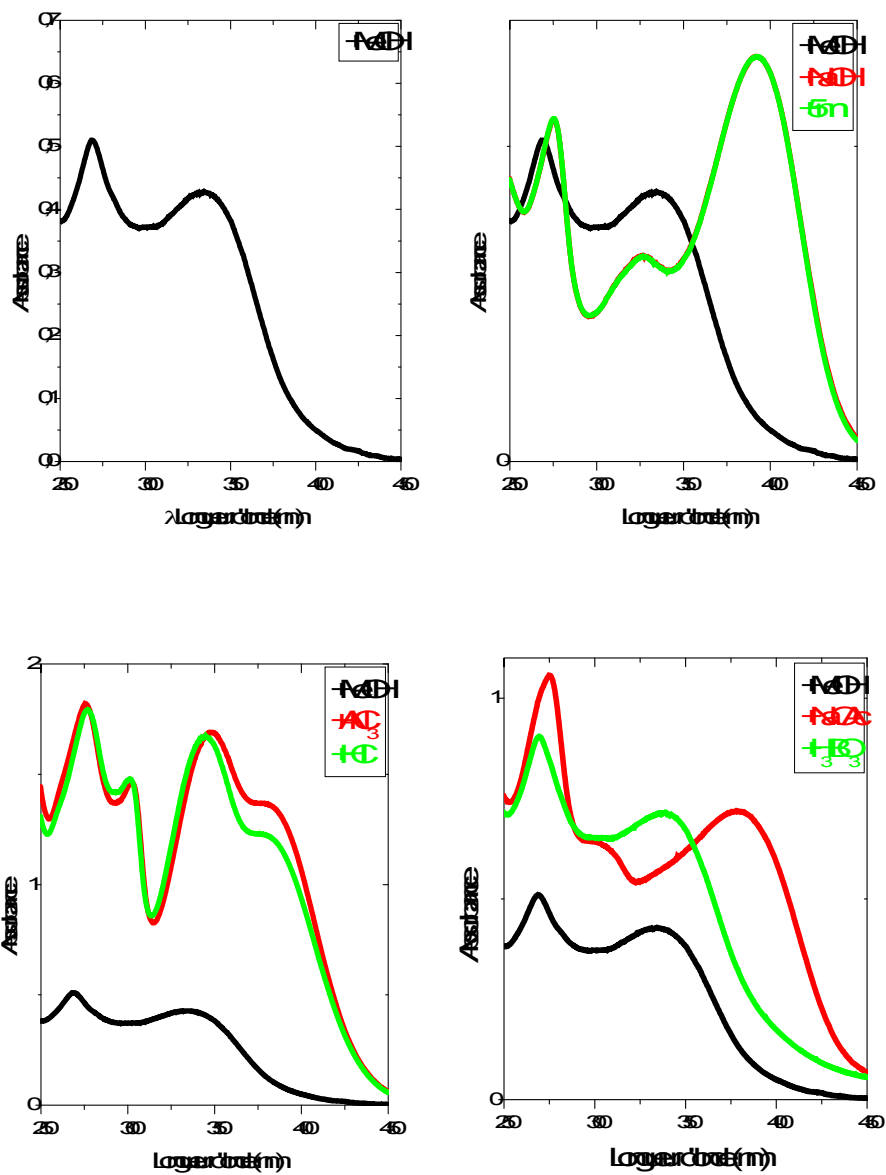


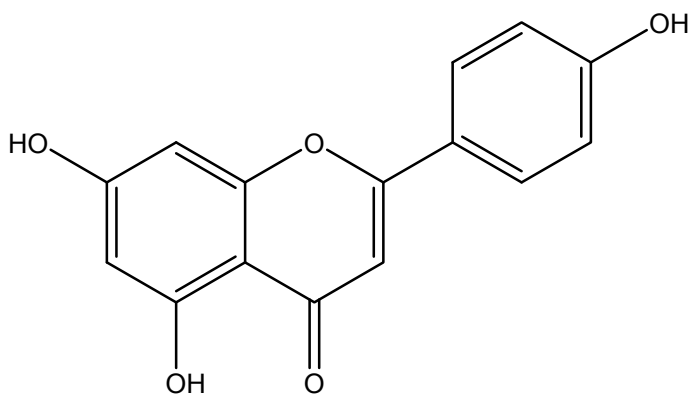
Fig.13 : La série spectrale UV -Visible CD1

IV.5.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.24	1H	d	2	H6
6.48	1H	d	2	H8
6.6	1H	s	-	H3
7	2H	d	8.9	H3', H5'
7.8	2H	d	8.9	H6', H2'

Tableau15 : RMN proton CD1

D'après ces données on déduit la structure du composé CD1 :



4', 5, 7-trihydroxyflavone (apigénine)

Extrait de nombreuse centaurée (*C.alexendrina*[29], *C.aspera*[102], *C.calcitrapa*[29], *C.depressa*[35], *C.furfuracea*[110], *C.glomerata*[29], *C.inermis*[100], *C.kilea*[100], *C.kotschy*[100], *C.pallescens*[105], *C.urivillei*[111], *C.virgata*[100]).

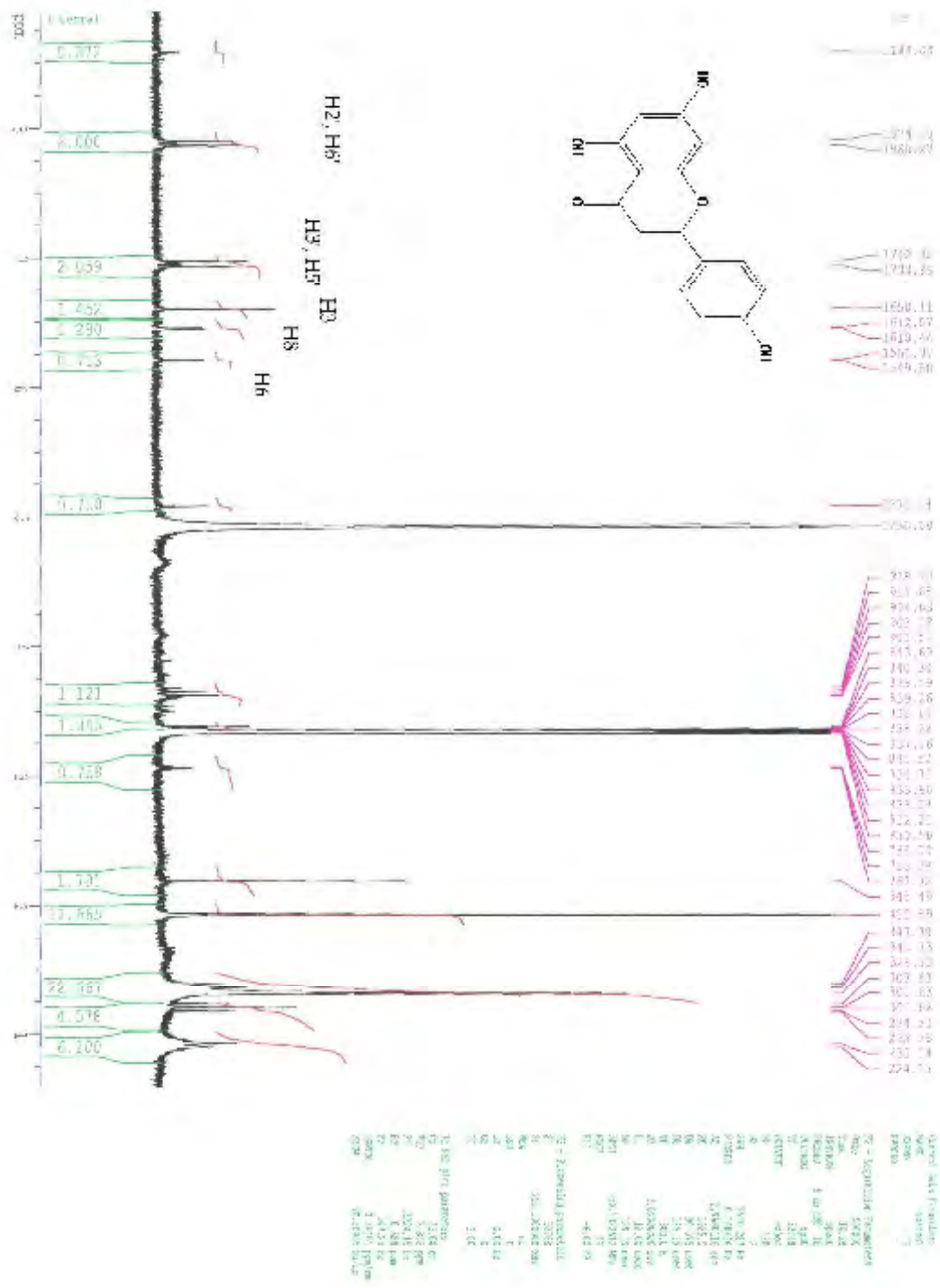


Fig.14 : Spectre RMN proton CD1 dans le CD3OD

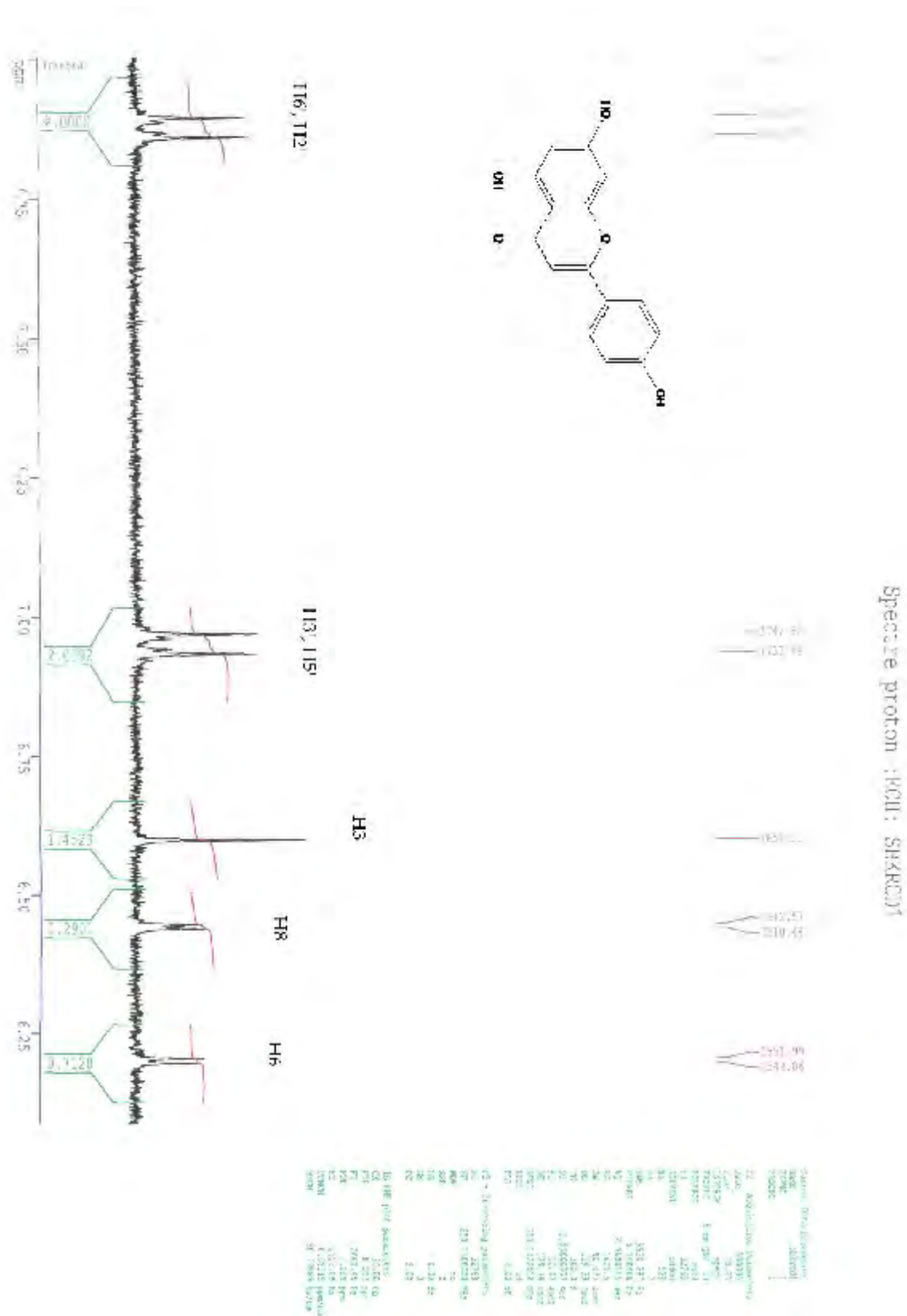


Fig.15 : étalement spectre RMN proton CD1 dans le CD₃OD

IV.6.1'analyse structurale du produit CE1 (F 8)

IV.6.1.Comportement chromatographique

Système	SI Toluène/MEC/MeOH	SII H ₂ O/MeOH/MEC/ Acétyl cétone
R _f	0.80	0.10
Couleur	Violet	

Tableau16 : Comportement chromatographique de CE1

IV.6.2. Données spectrales

IV.6.2.1.Spectroscopie UV- Visible

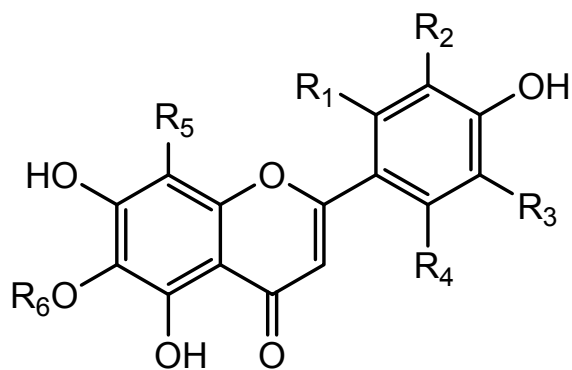
Réactif	Bande I	Bande II
MeOH	335	273
NaOH	328, 393	275
AlCl ₃	356	291
AlCl ₃ +HCl	352	295
NaOAC	381	276, 298
NaOAC+H ₃ BO ₃	354	276, 298

Tableau17 : résultat de la série spectrale pour CE1

Interprétation :

La fluorescence noire violette du produit CE1 sous la lumière UV- Visible (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol ($\lambda_{\max}=335$ nm), indique que ce composé est une flavone. L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +58 nm de la bande I, avec augmentation de l'intensité, ce qui prouve qu'il y a un OH libre en 4', et la présence d'une nouvelle bande 328 nm est significative qu'il y a un OH libre en position 7.

En comparant le spectre UV- Visible enregistré à la présence de $AlCl_3$ par rapport à celui enregistré à la présence de $AlCl_3+HCl$, on conclut qu'il y a pas le système ortho dihydroxyle sur le noyau B un faible déplacement hypsochrome ($\Delta\lambda=-4$ nm), L'addition du réactif $AlCl_3+HCl$ conduit à un déplacement bathochrome (+17 nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6. De toutes ces données, on peut déduire la structure suivante :



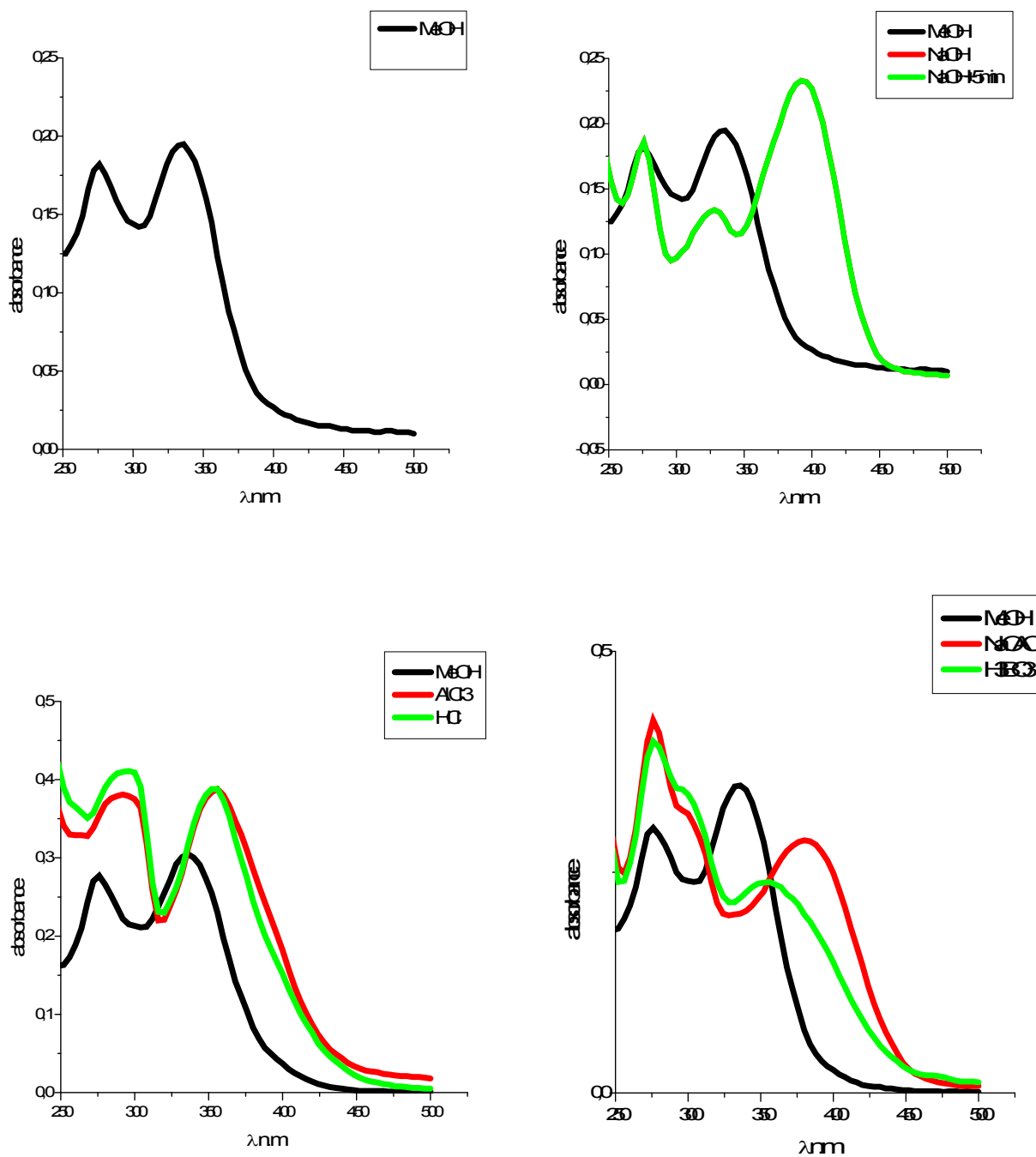


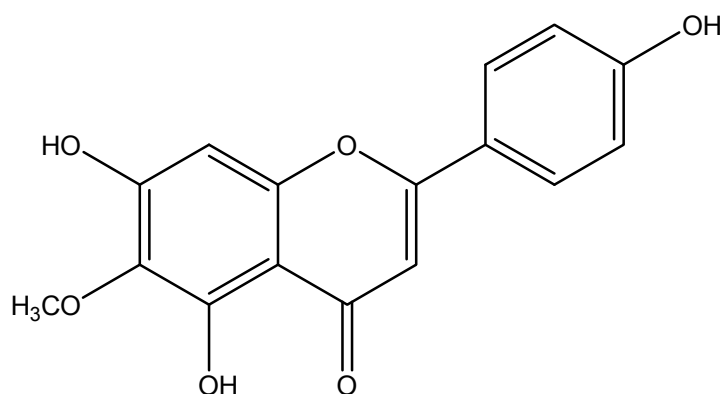
Fig.16 : La série spectrale UV -Visible CE1

IV.6.2.2.Spectroscopie RMN proton

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Proton
6.55	1H	s	-	H8
6.60	1H	s	-	H3
6.95	2H	d	8.5	H3', H5'
7.85	2H	d	8.5	H6', H2'
3.95	3H	s	-	O-CH ₃

Tableau18 : RMN proton CE1

D'après ces données on déduit la structure du composé CE1 :



4', 5, 7-trihydroxy 6methoxyflavone (Hispiduline)

Extrait de nombreuse centaurée (*C.arguta*[29], *C.aspera*[111], *C.calcitrapa*[39], *C.chilensis*[32], *C.clementie*[39], *C.floccosa*[112], *C.furfuracea*[110], *C.glomerata*[112], *C.inermis*[100], *C.incana*[113], *C.napifolia*[114], *C.pullata*[114], *C.phyllocephala*[107], *C.scoparia*, *C.urivillei*[109], *C.virgata*[100]).

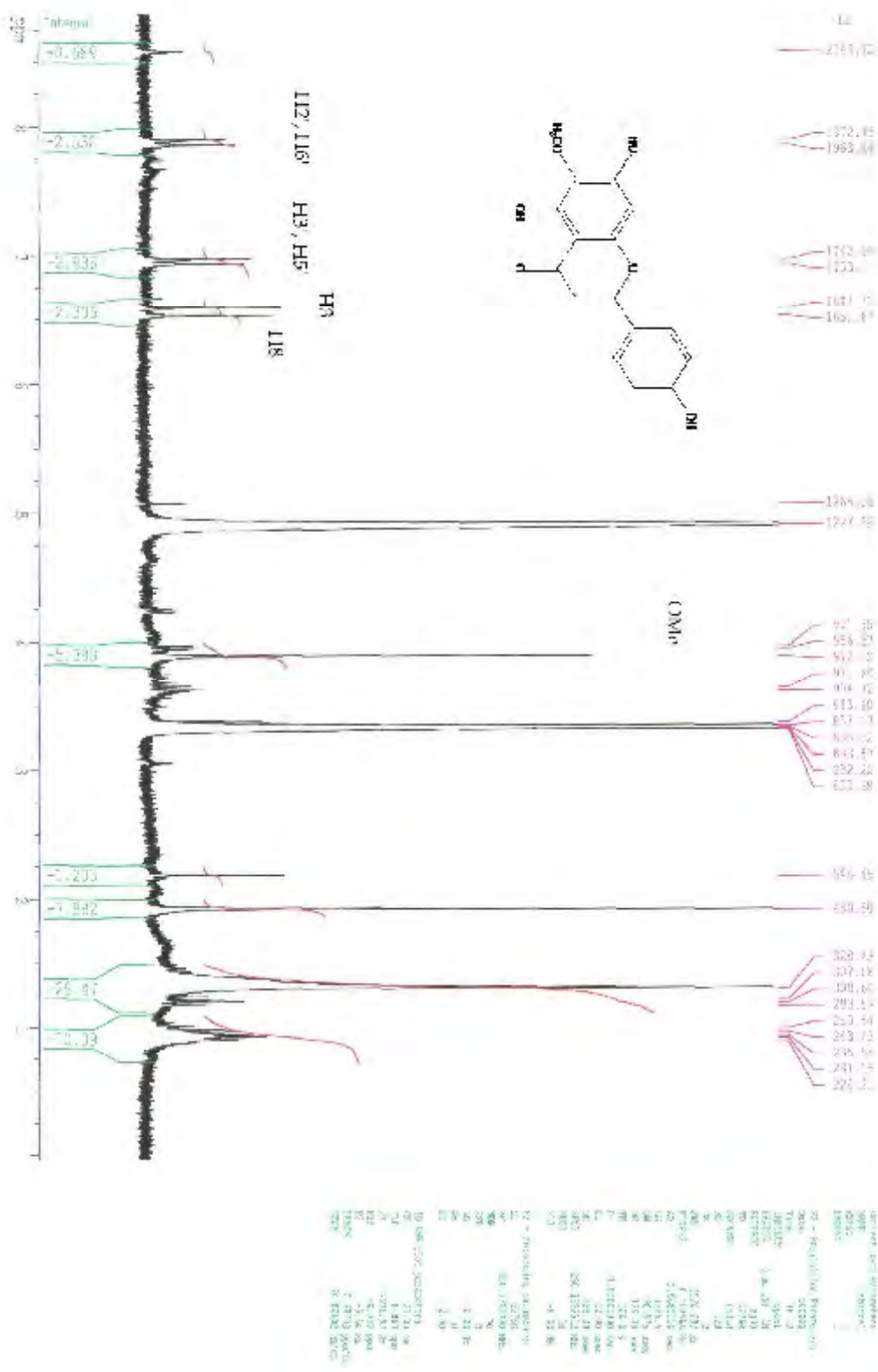


Fig.17 : Spectre RMN proton CE1 dans le CD₃OD

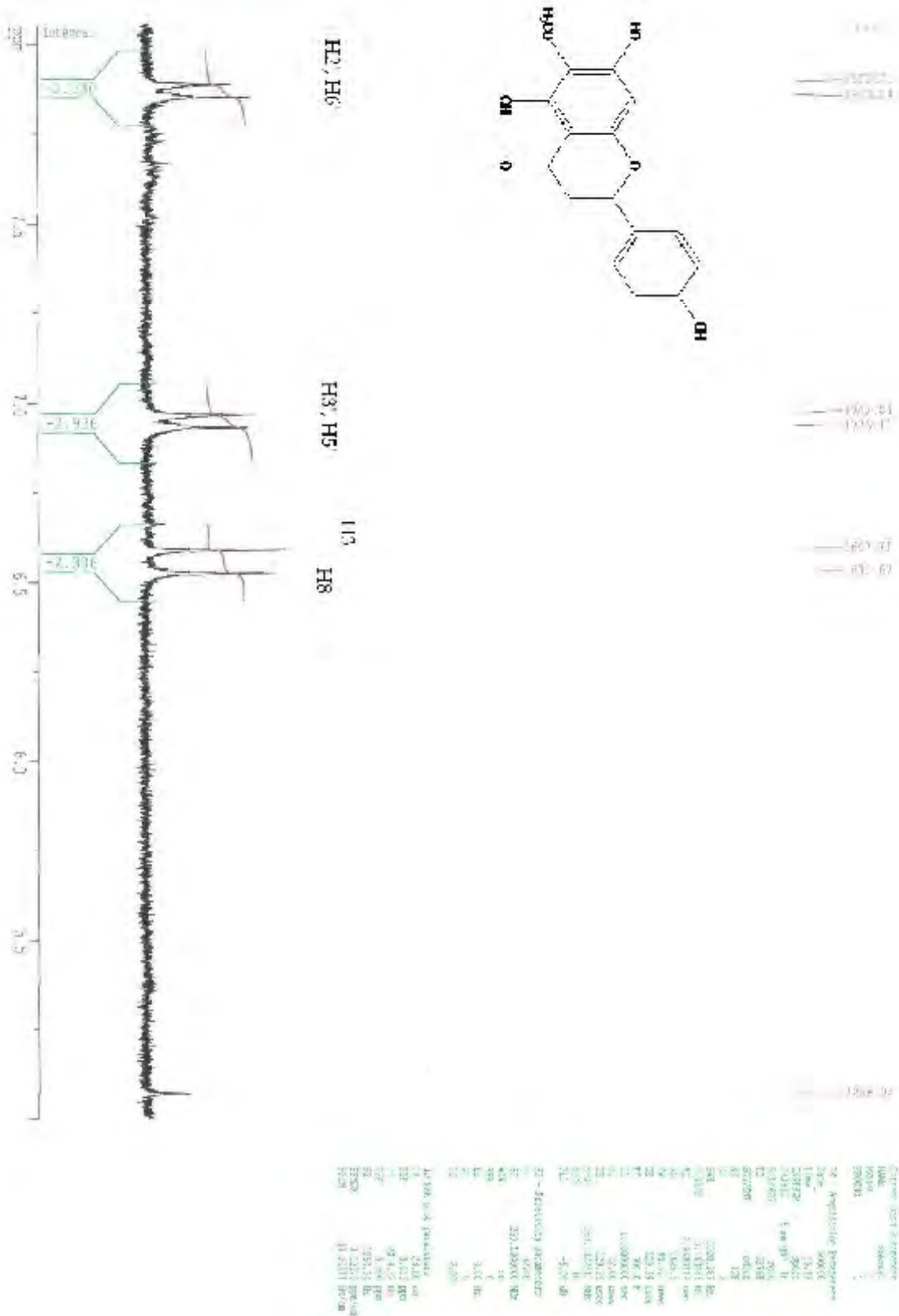


Fig.18 : étalement spectre proton CE1 dans le CD₃OD

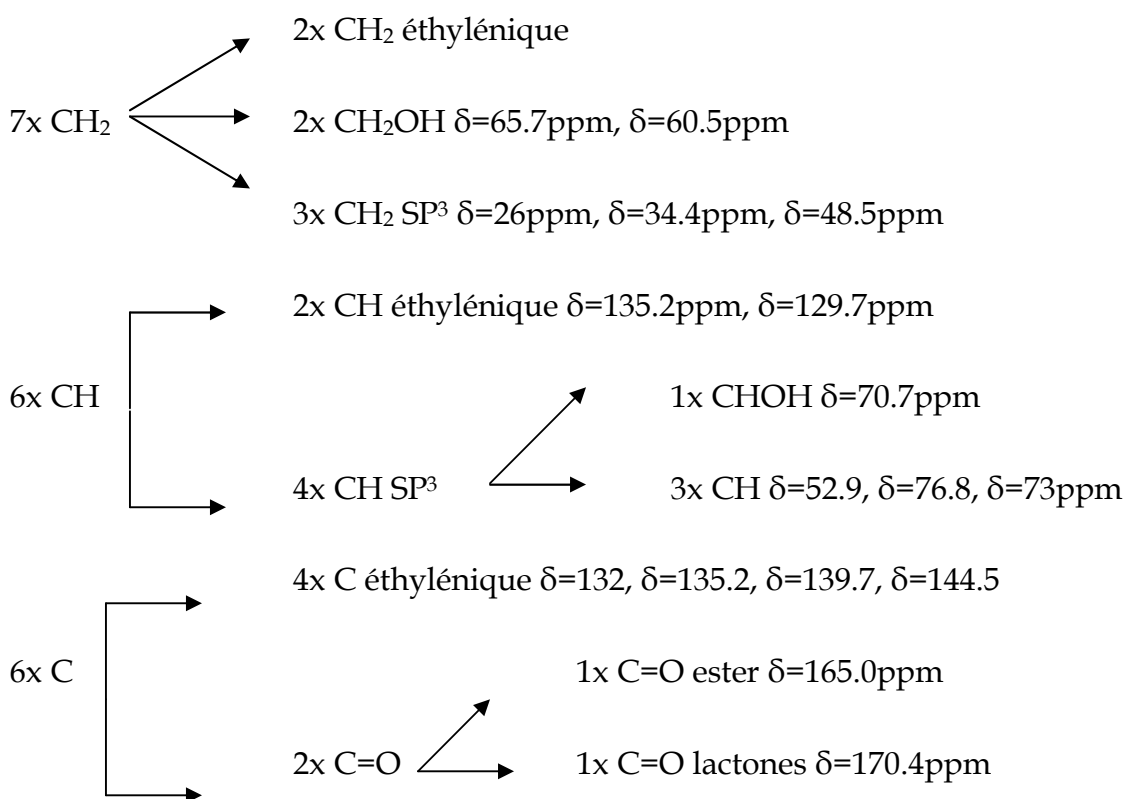
IV.7.1'analyse structurale du produit CC1

La spectroscopie IR (Fig.19) présente une bande à 1756cm^{-1} caractéristique au groupement lactone et une bande a 1707cm^{-1} indiquant la présence d'un ester insaturé
La bande à 3385cm^{-1} correspond à la liaison O-H d'un alcool.

Le spectre de masse FAB⁺ (Fig.20) donne un sommet $[M+H]^+=379$ d'ou $M^+=318$.

Spectre RMN¹³C (Fig.21), on peut déduire 20 atomes du carbone selon les expériences DEPT90 et DEPT135 (Fig.22) on a classifié ces carbones comme suit :

1x CH₃ $\delta=16.6\text{ppm}$



Tout ces donnés conduisent a la formule moléculaire générale suivante : C₂₀H₂₆O₇ avec un nombre d'instauration $\Omega=20-(26/2)+1=8$.

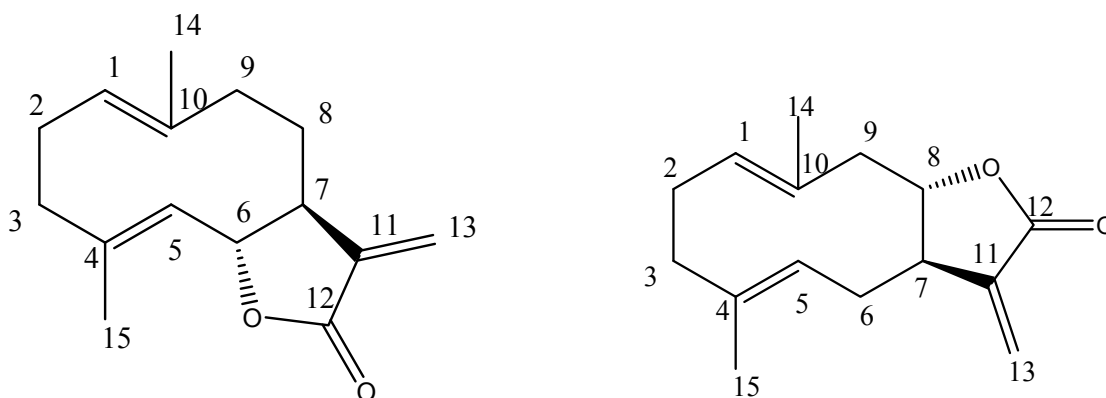
En RMN¹³C, on trouve la valeur a $\delta=170.4$ relative au groupement carbonyle du lactones (α,β insaturé).

Le pic a 165ppm caractérise le groupement C=O de l'ester α,β -insaturé.

Jusqu'à ici, on a pu déterminer 4 liaisons insaturées et le cycle lactonique (ça fait 5 insaturations).

La présence de deux CH éthylénique non couplées à $\delta=4.78\text{ppm}$ et $\delta=4.81\text{ppm}$ selon l'expérience cosy (H^1, H^1) (Fig.23) démontre que sont pas voisins et alors la présence de deux double liaisons (ça fait donc 7 insaturations).

Le squelette du sesquiterpène lactones comprend un seul cycle et probablement un germacranolides.



germacranolides

La spectroscopie RMN¹H (Fig.24) montre deux signaux sous forme de doublets à $\delta=5.75\text{ppm}$ avec $J=2.79\text{Hz}$ et $\delta=6.3$ avec $J=3.46\text{Hz}$ caractéristiques au proton H_{13} et $H_{13'}$ du lactone, ces deux proton corrélant avec le proton H_7 qui apparaît à $\delta=3.12\text{ppm}$ sous forme d'un multiplet, il se couple avec H_8 et H_6 , ceux-ci donnent un multiplet à $\delta=5.15\text{ppm}$ et un triplet à $\delta=5.20\text{ppm}$ avec $J_{6-5,6-7}=8.29\text{Hz}$ respectivement.

L'expérience cosy (H^1, H^1) (Fig.23) confirme la position du proton H_6 qui se couple avec le proton H_5 qui apparaît sous forme de doublet à $\delta=4.81$ avec la même constante de couplage $J=8.29\text{Hz}$.

Le déplacement chimique des proton H_8 et H_6 en RMN¹H (Fig.24) montre que la squelette sesquiterpène lactones est lié avec deux atomes d'oxygène à C_8 et C_6 , et comme l'hydrogène H_7 est toujours en position α (origine biosynthétique), on peut

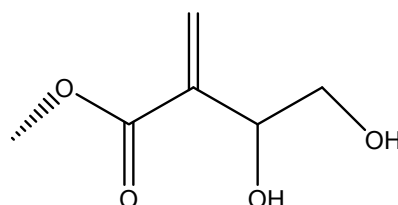
déduire que H₆ est orienté vers la position β selon la constante de couplage $J=8.29\text{Hz}$ entre H₆ et H₇, d'après la valeur du déplacement chimique on peut déterminer aisément la stéréochimie en position β du proton H₈ qui se couple à deux atomes d'hydrogène (cosy (¹H, ¹H)) sortent à $\delta=2.50\text{ppm}$ et correspondent à H₉ et H_{9'}, la RMN¹H montre également un multiplet à $\delta=5.05\text{ppm}$ un déplacement chimique qui convient tous à fait au proton éthylénique H₁, ce dernier se couple avec un groupement méthyle (cosy (¹H, ¹H)) qui sort à 1.5ppm sous forme d'un singulier, donc ce groupement est lié au carbone 10 (ou bien ce qui nous permet de mettre ce groupement en C₁₀), la détermination du H₁ nous permet de positionner deux protons en C₂, et donc deux autres C₃ (cosy (¹H, ¹H)). Les données fournies par la RMN¹³C montre que C₁₅ ne peut être que de type CH₂OH, ce qui est confirmé en RMN¹H, par présence du système AB à $\delta=4.30\text{ppm}$ avec $J=13.9\text{Hz}$ et $\delta=4.10\text{ppm}$ avec $J=13.9\text{Hz}$ qui correspond à H₁₅ et H_{15'} respectivement.

Par l'expérience cosy (¹H, ¹³C) (Fig.25), on peut confirmer la corrélation entre H₆ à $\delta=76.8\text{ppm}$ et entre H₈ et C₈ à $\delta=73\text{ppm}$, et puisque le déplacement chimique du C₆ est supérieur à celui du C₈, on peut déduire que ce lactone sesquiterpénique est fermé à C₆ et substitué en C₈.

Le substituant en C₈ comprend la fonction ester conjuguée à la double liaison restante, et comporte également deux groupements CH-OH et CH₂OH montrant ainsi un système AMX qui apparaît clairement en RMN du proton à :

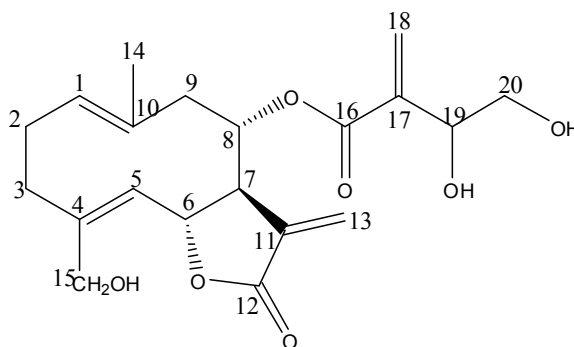
- $\delta=4.52\text{ppm}$ ($J=6.8\text{Hz}$, $J=3.3\text{Hz}$) sous forme d'un doublet de doublet.
- $\delta=3.8\text{ppm}$ ($J=11.3\text{Hz}$, $J=6.8\text{Hz}$) sous forme d'un doublet de doublet.
- $\delta=3.6\text{ppm}$ ($J=11.3\text{Hz}$, $J=3.3\text{Hz}$) sous forme de doublet de doublet.

Relative à H₁₉, H₂₀, H_{20'} respectivement, donc le substituant en C₈ est le suivant :



La spectroscopie de masse FAB⁺ (Fig.20) confirme d'avantage ces résultats car la libération de l'acide correspondant est traduit par la présence du sommet [M⁺-132] m/z=247, et le sommet m/z=229 résultant du réarrangement de l'ion R⁺ qui perte une molécule d'eau (Donc la présence d'un groupement hydroxyle en C₁₅).

Les données en RMN¹H et RMN¹³C sont récapitulées aux tableaux 19 et 20 On peut conclure finalement la structure du composé CC1 :



Cnicine

proton	Déplacement chimique δ (ppm)	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)
H ₁	5.05	m	
H ₂	2.20	m	
H _{2'}	2.25	m	
H ₃	2.99	m	
H _{3'}	2.00	m	
H ₅	4.81	d	H ₅₋₆ =8.29
H ₆	5.20	t	H ₅₋₆ =H ₆₋₇ =8.29
H ₇	3.12	m	
H ₈	5.15	m	
H ₉	2.5	m	
H _{9'}	2.5	m	
H ₁₃	5.75	d	H ₁₃₋₇ =2.79
H _{13'}	6.3	d	H _{13'-7} =3.46
H ₁₄	1.5	s	
H ₁₅	4.10	d	H _{15-15'} =13.9
H _{15'}	4.30	d	H _{15'-15} =13.9
H ₁₉	4.52	dd	H ₁₉₋₂₀ =6.8 H _{19-20'} =3.3
H ₂₀	3.8	dd	H _{20-20'} =11.3 H ₂₀₋₁₉ =6.8
H _{20'}	3.6	dd	H _{20'-20} =11.3 H _{20'-19} =3.3

 Tableau 19 : spectre proton CC1 dans CDCl₃+CD₃OD

Carbone	Déplacement chimique δ (ppm)
C ₁	129.7
C ₂	26.0
C ₃	34.4
C ₄	135.2
C ₅	127.9
C ₆	76.8
C ₇	52.9
C ₈	73.0
C ₉	48.5
C ₁₀	139.7
C ₁₁	144.5
C ₁₂	170.4
C ₁₃	125.4
C ₁₄	16.6
C ₁₅	60.5
C ₁₆	165.0
C ₁₇	132.0
C ₁₈	126.9
C ₁₉	70.7
C ₂₀	65.7

Tableau 20 : spectre Carbone CC1 dans CD₃OD

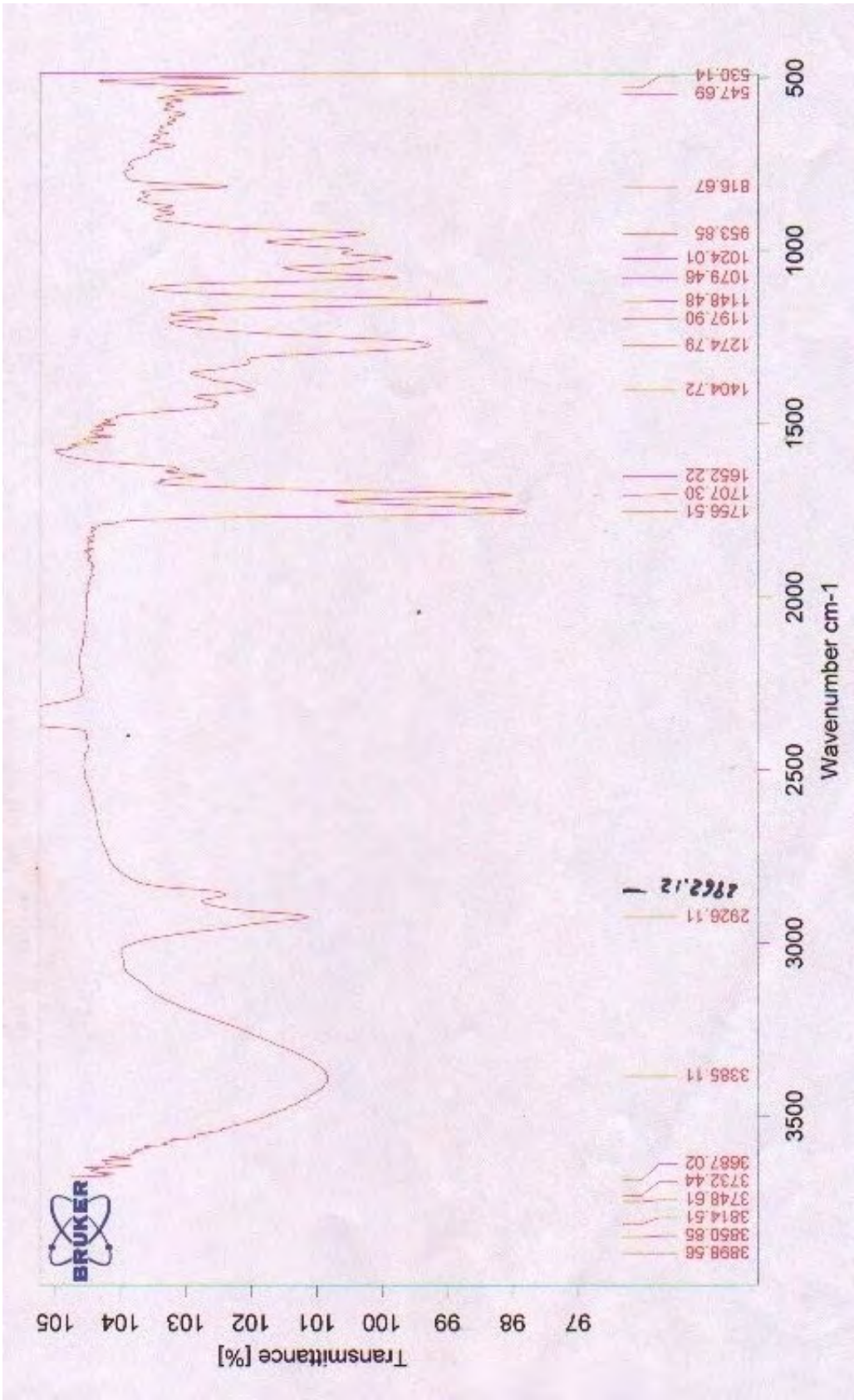


Fig.19: Spectre Infra rouge du CC1

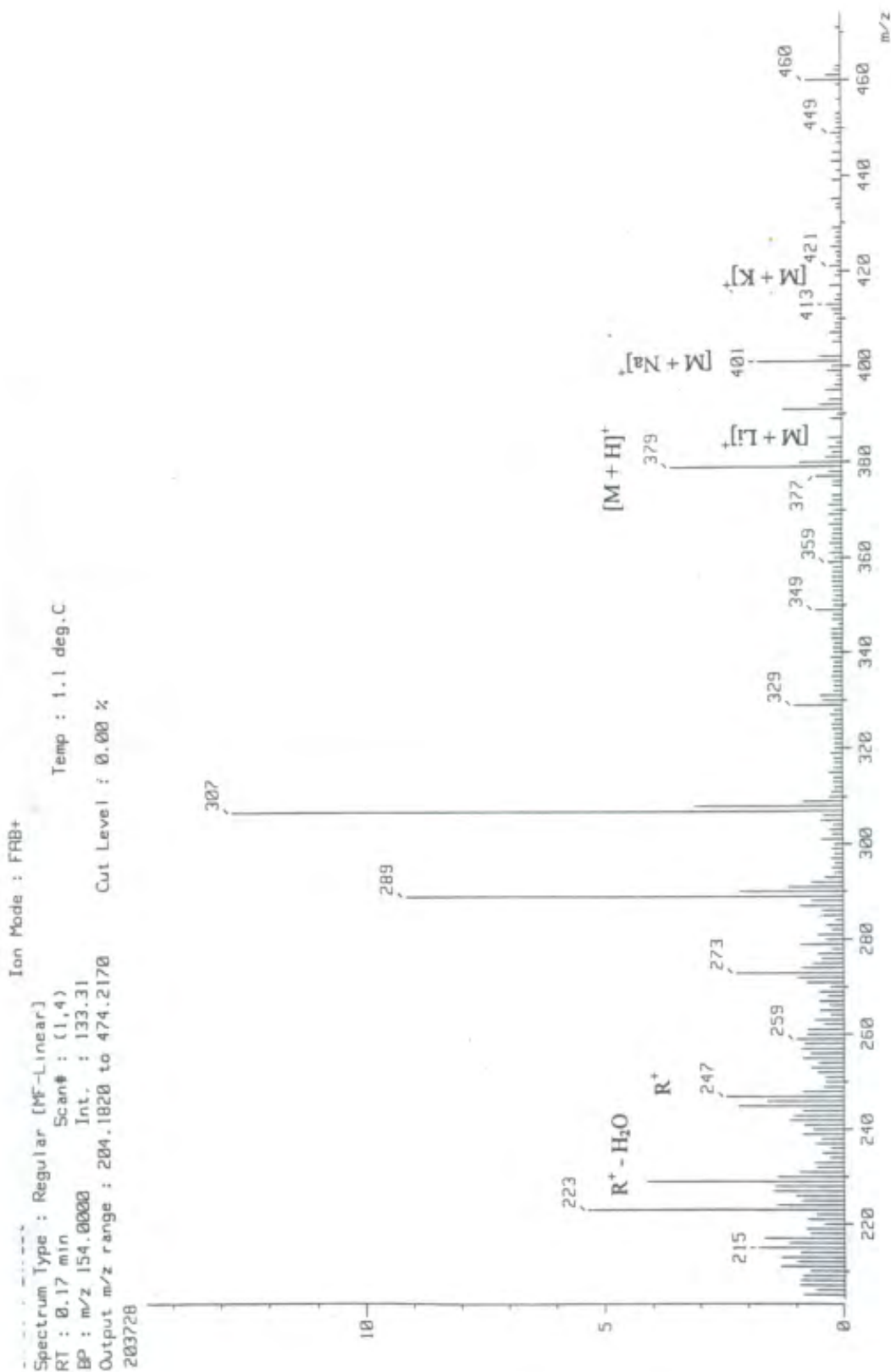


Fig.20: Spectre de masse (FAB⁺) du CC1

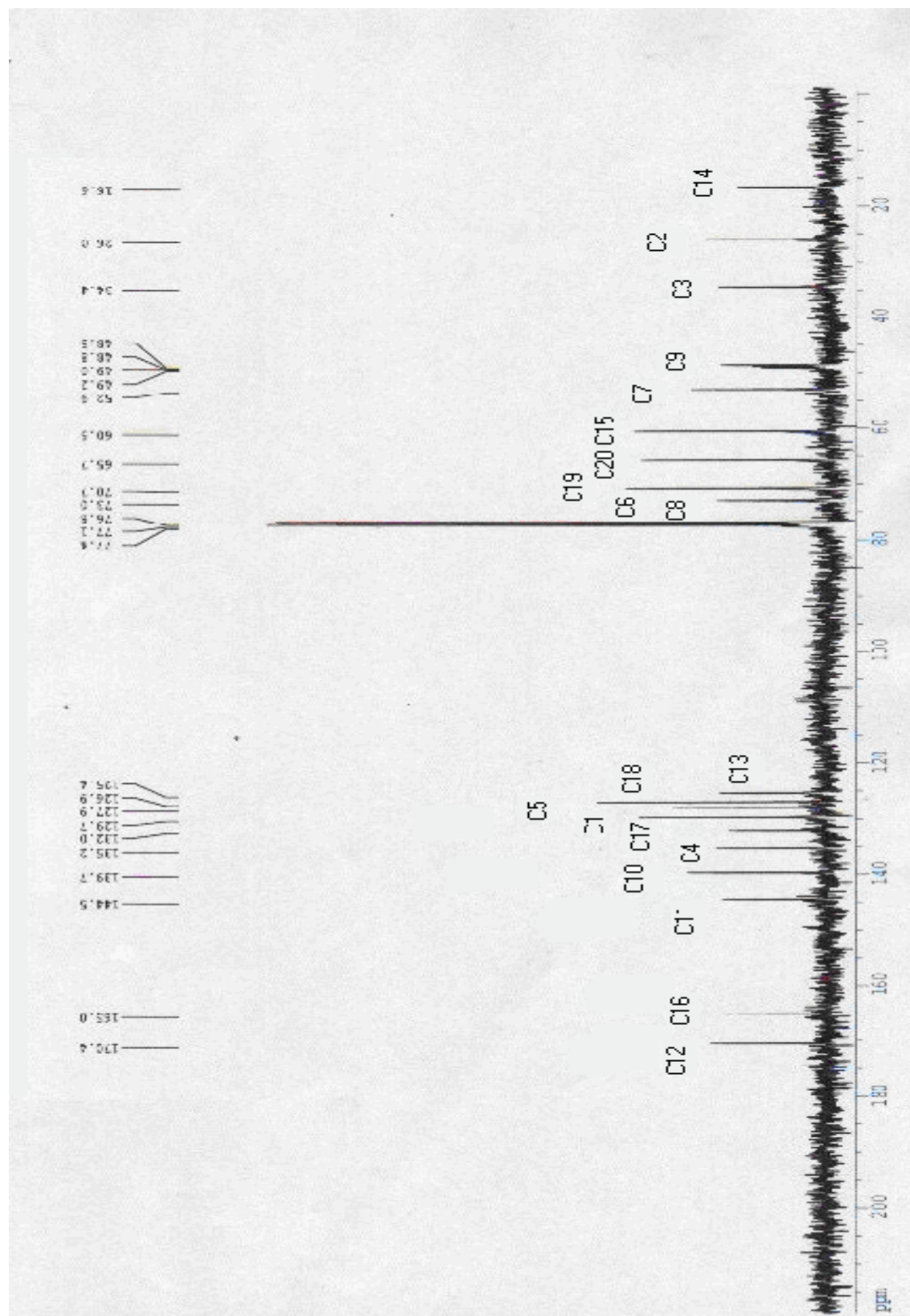


Fig.21: Spectre RMN ^{13}C du CCl_1 dans CDCl_3

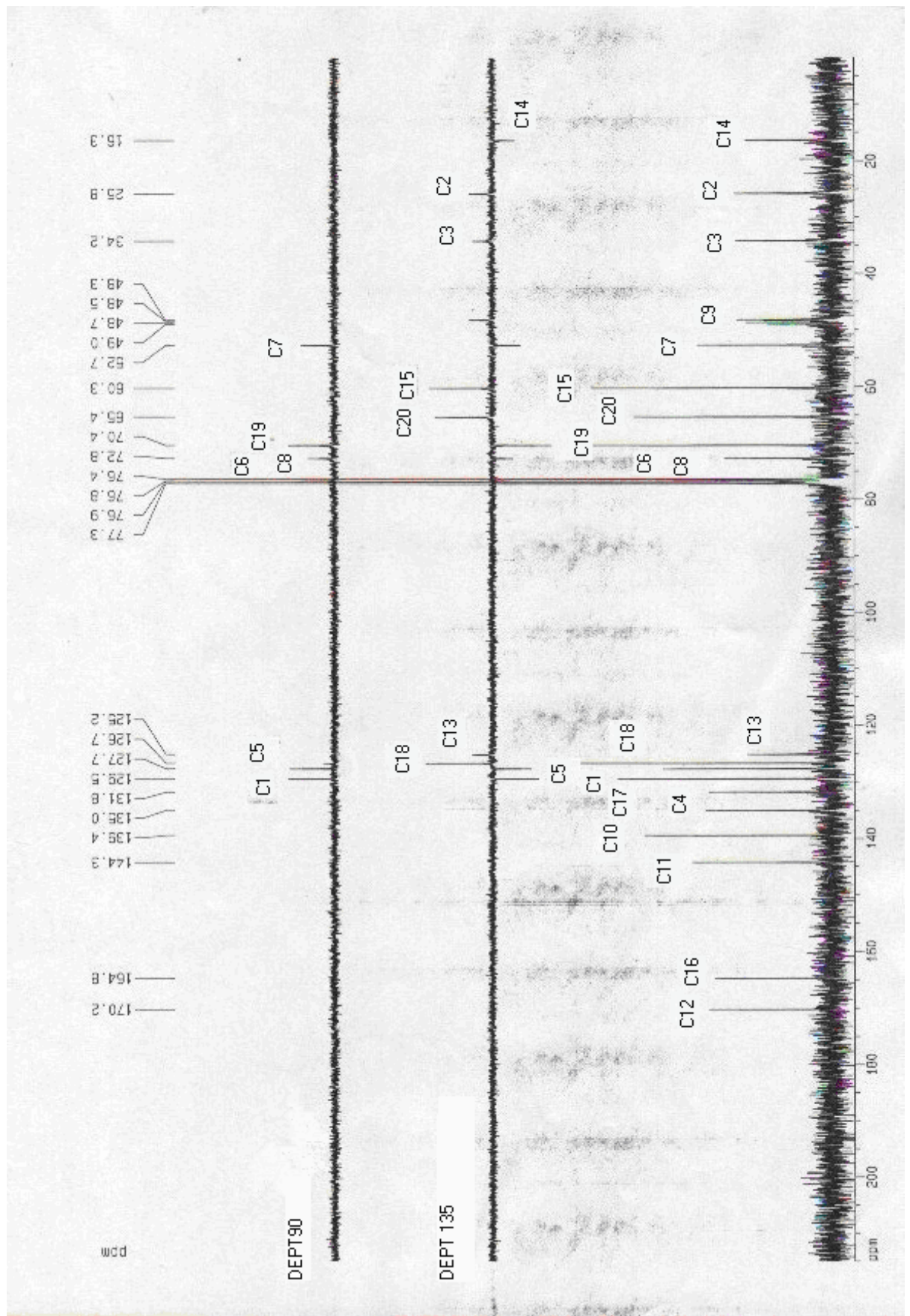


Fig.22: Spectre ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 du CC1 dans CDCl_3

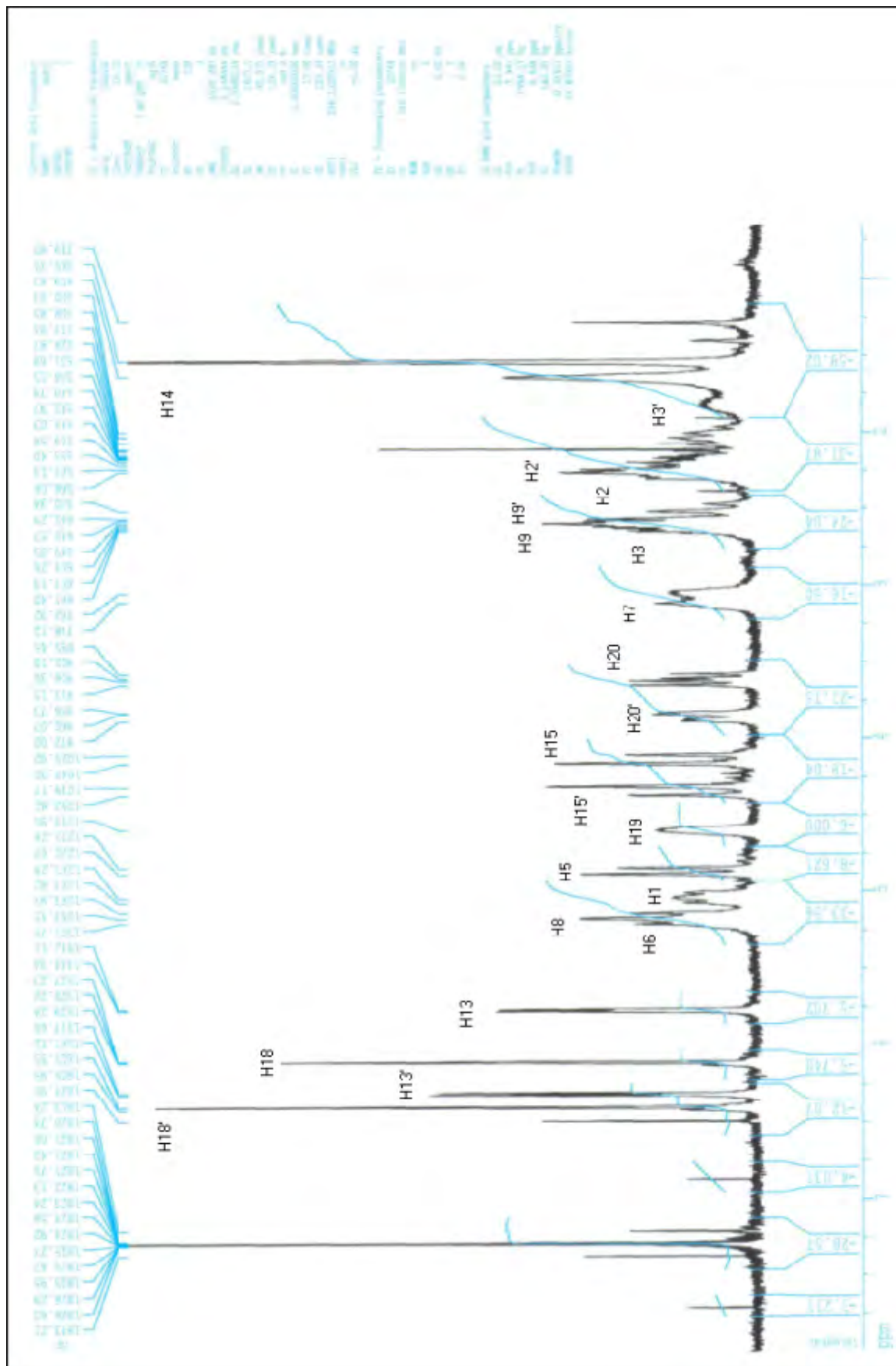


Fig.24: Spectre RMN ¹H du CC1 dans CDCl₃+CD₃OD

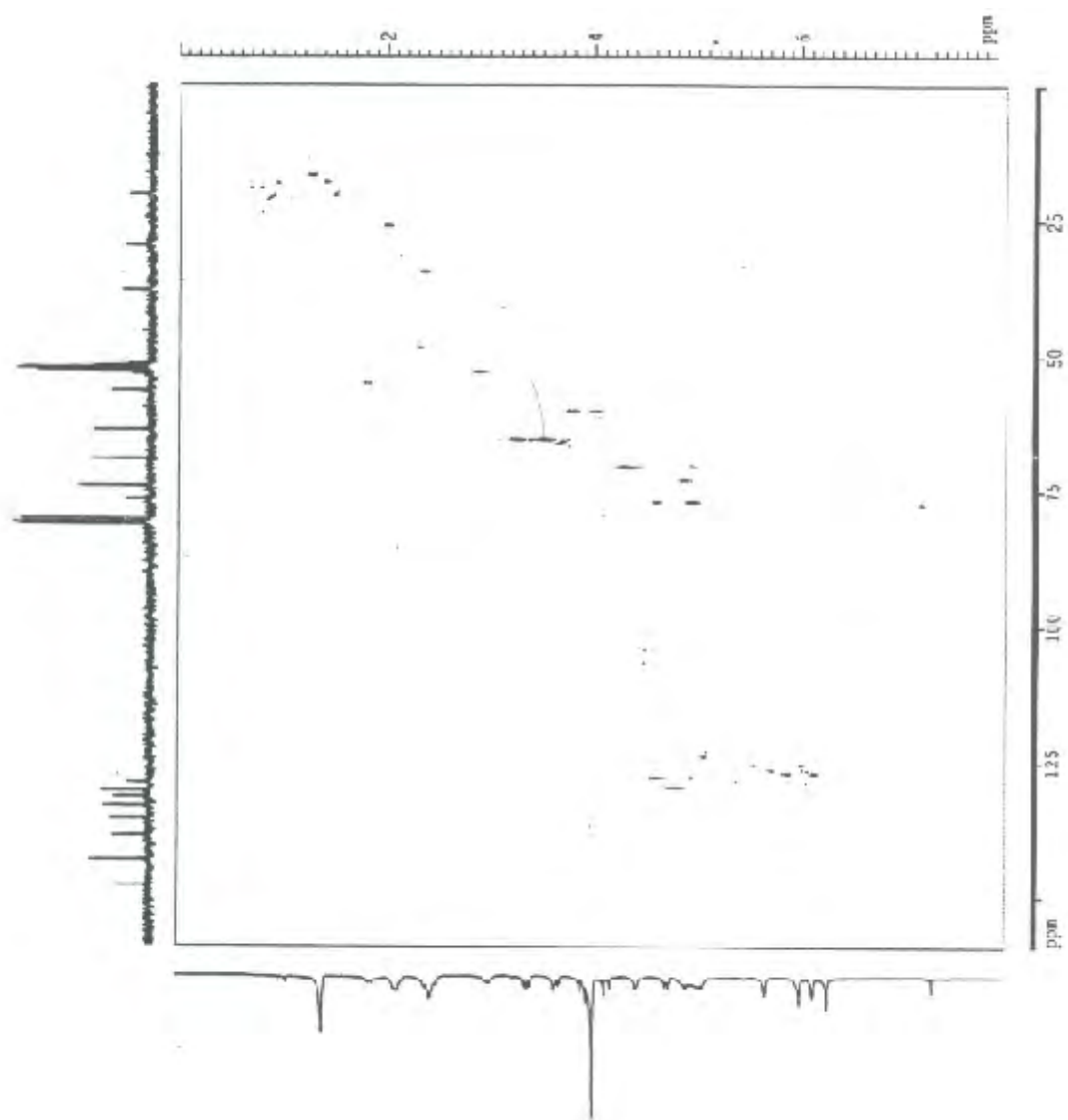


Fig.25: Spectre COSY (^1H , ^{13}C) du CC1 dans CDCl_3

Fraction	Produit	
F5	CB7R	Eupatorine(5,3' dihydroxy,6,7,4' -trimethoxyflavone)
F6	CD1	Apigénine (4', 5, 7-trihydroxyflavone)
F6	CD3	Cirsiliol(3',4',5-trihydroxy6,7dimethoxyflavone)
F6	CD4R	Eupatiline(5,7-dihydroxy,6,3',4' -trimethoxyflavone)
F7	CF3R	Jaceosidine(5,7,4',trihydroxy6,3',dimethoxyflavone)
F8	CE1	Hispiduline(4',5,7-trihydroxy 6methoxyflavone)
Précipité blanc	CC1	Cnicine

Tableau récapitulatif des produits purs obtenus

Conclusion

Le but de ce travail est la séparation et la détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce « *Centaurea calcitrapa* ».

Nous avons séparé à partir de cette espèce six flavonoïdes et une sesquiterpène lactone, en utilisant les techniques chromatographiques, chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince et colonne de séphadex LH20. Les structures ont été établies en utilisant les méthodes spectroscopiques RMN 1H et UV.

Ces composés sont tous de type flavones : 4', 5, 7-trihydroxyflavone (apigénine), 4', 5, 7-trihydroxy 6-méthoxyflavone (Hispiduline), 5, 7, 4', trihydroxy 6, 3', diméthoxyflavone (Jaceosidine), et 3', 4', 5-trihydroxy 6,7 diméthoxyflavone (Cirsiliol), 5,3' dihydroxy, 6, 7, 4'-triméthoxyflavone (Eupatorine), 5,7-dihydroxy, 6, 3', 4'-triméthoxyflavone (Eupatiline). Ces résultats sont conformes à la chimiotaxonomie des centaurees.

Hormis l'apigénine, l'hispiduline et la Jaceosidine les trois aglycones restantes sont décrites pour la première fois pour cette espèce.

Il est également à relever que la sesquiterpène identifiée, la cnicine a été obtenue avec des rendements remarquables ce qui fait de cette espèce une source naturelle pour cette lactone bioactive.

Les perspectives de recherche futures sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea calcitrapa*. Afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- Etudier l'activité de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmer l'activité biologique attribuée à cette plante.

Références

References

- [1] Abdelhaï Sijelmassi, Les Plante Médicinales du Maroc, édition le Fennec, 1990.
- [2] Jean Bruneton, Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales, 3^{ème} édition, édition lavoisier, 1993.
- [3] Brody, Jane, Rootin'shoin' Raiders Conquer native ground, New York Times, Tuesday, June 9, 1998, PG B11, American Botanical Council, Herb Clip.
- [4] Harro J Bouw Neester, Radoslava, Matusova, Sun Zhougkui and Michael 4 Beale, Current Opinion in Plant Biology 2003 ; 6 :358-364.
- [5] Fatima Hilmi, Otto Stricher, Jörg Heilmann, Letter...Planta Med 2003 ; 69 :462-464.
- [6] Maurizio Bruno, Sergio Rosselli, Antonella Maggio, Rossa Angela Raccuglia, Francesco Napolitano, Felice Senatore, Letter...Planta Med 2002 ; 68 :649-652.
- [7] Jadwiga Jodyins Lilbert, Mark Murias, Elzbieta Bloszyk, Planta Med 1999 ; 65 :320-324.
- [8] N. Heimeur, L. M. Idrissi Hassani, et M. Amine Serghini, Reviews in Biology and Biotechnology 2004 ; 3 : 37-42.
- [9]- Peter A. Whitton, Andrew Lau, Alicia Salisbury, Julie Whitehouse, Christine S. Evans, Phytochemistry 2003 ; 64 :673-679.
- [10] A. Bisio, A. Corallo, P. Gastaldo, G. Romussi, G. Ciarallo, N. Fontana, N. De Tommasi and P. Profumo, Annals of Botany 1999 ; 83 :441-452.
- [11] Paul Cos, Mario Calomme, Jean-Bosco Sindambiwe, Tess De Bruyne, Kanyanga Cimanga, Luc Pieters, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe, Planta Med 2001 ; 67 : 515-519.

- [12] Sandra Landgraf, thèse de doctorat De l'institut pour nourriture d'animal et physiologie de métabolisme Université Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- [13] W. Kisiel, K. Michalska, and E. Szneler, Polish J. Chem, 2002 ; 76 : 1571-1576.
- [14] K. Michalska and W. Kisiel, Polish J. Chem., 2001 ; 75 : 1587-1589.
- [15] Juliana S. Chaves and Dionéia C. R. de Oliveira, J. Braz. Chem. Soc., 2003 ; 14 : 734-737.
- [16] Elena Mustakerova, Milka Todorova, and Elena Tsankova, Z. Naturforsch. 2002 ; 57 : 568-570.
- [17] Fatima Hilmi Thèse de doctorat Swiss Federal Institut of Technology Zurich.
- [18] Hongyan Wang, Kwok Min Hui, Ying Jie chen, Suixu xu, J.Tze-Fei Wong, Hong Xue, Planta Med 2002 ; 68 : 1059-1062.
- [19] Myung Sun Lee, Won Keun Oh, Bo Yeon Kim, Soon Cheol Ahn, Planta Med 2002 ; 68 : 1063-1065.
- [20] Gerhard Rucker, Klemens Heiden , Elor Schenkel, J. Indian Inst. Sci., 2001 ; 81 : 333-334.
- [21] P. Ribereau - Gayon, les composés phénoliques des végétaux, 1968.
- [22] Jean - François Gonnet, Thèse Lyon, 1989.
- [23] K. R. Markham, Techniques of flavonoïdes identification, 1982, Academic press.
- [24] J. B. Harbone, The flavonoïdes, Published in 1988 by champman et hall.
- [25] Alain Puppò, Phytochemistry, Vol.31, N°1, pp: 88-89, 1992.
- [26] J.B. Harbone et T.J. Marbry, The flavonoïdes, 1975, Tome II, academic press.

- [27] J.B.Harbone, *The flavonoïdes*, Advances in Research Science 1986, Published in 1993 by Chapman and Hall.
- [28] M.Paris et M.Hurabielle, *Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie*, Tome I, 1981, Ed: Masson.
- [29] Ahmed, Z.F., Rimpler, H., Hamouda, F.M., Rizk A.M., *Phytochemistry* 1970: 9(7); 1595-1601
- [30] Ahmed, Z.F., Rizk, A.M., Hamouda, F.M., *Postep Dziedzinie Leku Rosl., Pr. Ref Dosw. Wygloszone Symp*, 1970; 20-23.
- [31] Collado, I.G., Macias, F.A., G.M., Lius, F.R., *Tetrahedron Lett*, 1986: 42(13) ; 3611-3622.
- [32] Negrett, R.E., Lator.I., Backhouse.N., Pena.R., and Delport. C, *Plant Med. Phytother*, 1988: 22 (1); 1-10.
- [33] Kamanzi, K, Raymond, Jand Voirin.B, *Plante Med.Phytother*, 1982: 16; 30-33.
- [34] Oksuz, S, Putun.E, Doga .Kim. Ser, 1987: 11(2); 66-71
- [35] Bandyukova, V.A, Khalmatov, Kh.Kh, and Alimov, Kh.I., *Khim.Prir.Soedin*, 1969:5(4) ;324-325.
- [36] Akkel, S., Benayache, F., Benayache, S and Jay, M, *Biochemical Systematic and Ecology*, 1997; 361-362.
- [37] Fathallah, H.M., Kassem, F.F., El-Shaer, N.S., *Alexandria J.Pharm.Sci*, 1994:8(3); 219-222.
- [38] Kamanzi, K., Raymond, J. and Voirin, B., *Plant Med et Phytother*, 1983: 17(1);47-51.
- [39] Bencheriet, R., *Thèse de magister, Université de Constantine*, 1989.
- [40] Aqil, M., Khan, I.Z. and Goni A.Diamari, *Chem.Soc.Ethiop*, 1998: 12(2); 177-180.

- [41] Kamanzi, K., Raymond, J. and Voirin, B., *Pharmazie*, 1982: 38(7); 494-495.
- [42] Mabry, T.J, Markham, K.R, Thomas, M.B, *The Systematic Identification Of Flavonoïdes*, Springer-Verlag, New York (1970).
- [43] Mekkiou, R, Thèse de doctorat d'état, Université de Constantine ,2005.
- [44] Markham, K.R, *Technic of flavonoïdes identifications*, 1982.
- [45] Markham, K.R, Mabry, T.J, *Ultra Violet Visible and proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids*, Chapman and Hall, 1976:45-77.
- [46] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., *Life Sci.* 1999, 65: 337-353.
- [47] Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M. , *Biochem Pharmacol*, 1984, 33:1525-1530.
- [48] Izzo, A.A. , *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48: 1103-1111.
- [49] Bracke, M., Vyncke, B., Opdenakker, G., Foidart, J.M., De Pestel, G., Mareel, M. , *Clin Exp Metastasis*, 1991,9 :13-25.
- [50] Larocca, L.M., Giustacchini, M., Maggiano, N., Ranelletti, F.O., Piantelli, M., Alcini, E., Capelli, A., *J Urol*, 1994, 152: 1029-1033.
- [51] Scutt, A., Meghji, S., Canniff, J.P., Harvey, W., *Experientia*, 1987, 43: 391-393.
- [52] Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T., Otake, S., *J Periodontol*, 1993, 64: 630-636.
- [53] Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., , *Biochem Pharmacol*, 1983, 32: 1995.
- [54] Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., *Lancet*, 1993, 342:1007-1011.
- [55] Chu, S.C., Hsieh, Y.S., Lin, J.Y., *J Nat Prod*, 1992, 55: 179-183.
- [56] Ong, K.C.; Khoo, H.E., *General Pharmacol*, 1997, 29: 121-126.

- [57] Ong, K.C., Khoo, H.E., *Life Sci.* 2000, 67: 1695-1705.
- [58] Fraga, B., *Naturel sesquiterpenoides, Naturel product reports*, 1998 :15 ; 73-92.
- [59] Bruneton, *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 1993, Technique et documentation, lavoisier.
- [60] W.Kahlek, *Arch.Pharm*, 1830 :34 ; 318, *Belestiens Hanbuchder Organischen Chimie*, 1933 :17 ; 499.
- [61] Fischer.N.H, Harborn.J.B, Fischer H.D, *Progressing The Chemistry Of Organique Naturel Products*, 1979 :38 ; 47.
- [62] Heywood V.H, Harborne J.B, Turner B.L, *The Biology and Chemistry Of The Compositae*, academic presse, New York, 1977.
- [63] Ruzika.L, *The Isoprene Rule and The Biogenesis Of Terpenic Componds*, *Experientia*, 1953 :9 ; 357.
- [64] Ruzika.L, *Faraday leecture, History Of The Isoprene Rule*, *Proc. Chem.Soc*, 341, London 1959.
- [65] Hendrickson .J.B, *Stereochemical Implications In Sesquiterpene Biogenesis*, *Tetrahedron*, 1959 :7 ; 82.
- [66] Medjroubi, K, *Thèse de magister, Université de Constantine* ,1991.
- [67] Shumacher.R, Gutzwiller.J, Tamm .C.H, *Chim.Acta*, 1971 :54 ; 2080.
- [68] Rucker.G, *Angewandt, Chem, Int Ed*, 1973 :10 ; 793.
- [69] Lee.K.H, Meck.R, *J Of Med Chem*, 1973 :16 ; 299.
- [70] Kupchen.S.M, Eakin.M.A, Thomas.A.M, *J Of Med Chem*, 1974 :168 ; 376.
- [71] Haynes.L.J, *Quart.Rev*, PP:46, 1948.
- [72] Rucker.G, Klemens.H, Schenkel.E, *J. Indian Inst. Sci.*, May-June 2001, 81, 333-334.
- [73] RUCKER.G. *et al*, *Nat. Toxins*, 1997 :5 ; 223-227.

- [74] Heiden.K, Peroxide und andere inhaltsstoffe aus Kaunia rufescens und Eupatorium cannabinum, Ph. D. Dissertation, Univeritat Bonn, 1996.
- [75] Doskotch.R.W., El feraly. F. S, Cytotoxic sesquiterpenes from Liriodendron tulipifera L., J. Org. Chem.,1970 : **35** ; 1928-1936.
- [76] Paul Iserin, Michel Masson, Jean Pierre Restellini, Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse, bardas, Edition En Langue Française p 48.
- [77] Engler, A.Syllabusder, P Flanzen, Familier, 1964 ; II : 480-497.
- [78] Dittrich, M.Cynarae, Systematic Review, The Biology and Chemistry Of the Compositea (Ed. Heywood, V.H., Harborne, J.B., Turner, B.L.) 1977 ; vol II :999-1015, Academie Press London, New york, San Francisco.
- [79] Quezel, P. and Sanata, S, Nouvelle Flore de L'algerie Est Des Régions Désertiques est Méridionales, 1963 ; Tome II, CNRS, Paris.
- [80] Gousiadou, C, Skaltsa, H, Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31, 389-396.
- [81] Mabberley, D.J., The Plant Book, 1987, 110, Cambridge University Press.
- [82] . Bouchama K.E, Thèse de magister, Université de Constantine, 2003.
- [83] Wat, J.M and Breyer-Brand Wijik, M.G., The Medicinal and Poisonons Plants Of Southern and Easter Africa, 1962, 210, Livingtone, Edinburgh.
- [84] Leclerc, H., Précis De Phytothérapie, 1983, 5^{ème} Edition, Masson, Paris.
- [85] Monya, M. and Raez, G., Plante Médicinale et Phytothérapie, 1974, 8, 126.
- [86] Kaiji. A.Kamb, M. ,Amoros, M. and Girrel, L. , Pharma Acta Helventia, 1992, 67, 178.
- [87] Gonzalez, A.G. , Bermejo, J., Caberar, J., Galido, A., and Messanet, G.M., Annals de Quinica, 1977, 73, 86.
- [88] Negrette, R.E., Lattore, I., Back House, N. and Delpote, C., Plant Médicinale et Phytothérapie, 1988, 53, 503.

- [89] Paseul, Teresa, J., Caballero, E., Anaya, Caballero, M.C., Gonzalez, M.S., *Phytochemistry*, 1986 ; 25 :1365.
- [90] A.A. El-Ghonemy, *Encyclopedia of Medicinal Plants of the United Arab Emirates*, First Edition, University Of United Arab Emirates, 1993 :51-62.
- [91] Harraz.F.M, Kassem.F.F, and El-shaer, Alex.J.Pharm.Sci, 1994 : 8(3) ; 219.
- [92] Geppert.B, Drozd.B, Kielezewki.M, Holub.M, *Acta.Soc.Bot.Pol*, 1983 :52 ; 23.
- [93] Drozd.B, *Diss Pharmac.Pharmacol*, 1967 :19 ; 223.
- [94] Breton.G.I, Gonzales.A.G, and Rodriguez.M.R, *Anquim*, 1969 :64(2) ; 297-301.
- [95] Gonzalez, A.G, Barera, J.B, Garcia, T.Z, and Rosas, F.E, *Phytochemistry*, 1984; 2071-2072.
- [96] Gadeschi, E., Jorge, Z.D., Massanet, G.M. and Luis, F.R, *Phytochemistry*, 1989:28(8); 2071.
- [97] Bruno, M. and Herz,W., *Phytochemistry*, 1988:27(6);1873.
- [98] Oksuz.S, Halfon.B, and Terem.B, *Planta Med*, 1988:54(1); 89.
- [99] Santos, M.B.P, Broti Balma, F., Grande, M.B., *Flavonoids from Centaurea rothmalerana, groupe polyphenol*, 1992, 153-156.
- [100] Oksuz.S, Ayyilidiz, and Johansson.C, *J.Nat.Prod*, 1984: 47(5); 902.
- [101] Kupchan,S.M.et al, *J.Pharm.Sci*, 1965 :54 ;929.
- [102] Picher.M.T, Seon.E, and Tortadjada.A, *Phytochemistry*, 1984 :23 (9) ; 1995-1998.
- [103] Kupchan, S.M et al, *Tetrahedron*, 1969: 25; 1603.
- [14] Roesler,H.,Star, A.E, Mabry, T.J, *Phytochemistry*, 1971:10(2); 450.
- [104] Barrero, F.A, Sanchez, J.F. and Rodriguez, I, *Phytochemistry*, 1989:28; 1975.

- [105] Ali, Y.E, Omar.A.A, Sarg.T.M, and Slatkin.D.J, *Planta Med.*, 1987:53(5); 503.
- [106] Kery.A, Tawaij, H.A.A and El-Khazraji, N.K, *Harba Hung*, 1985: 24(2-3); 183.
- [107] Tawaij, H.A.A, Kery.A and El-Khazraji, N.K, *J.Ethnopharmacol*, 1983:9(2-3):299.
- [108] Al-Easa, H.S,PHD.Thesis, University of Reading, Reading England.
- [109] Ulubelen. A and Oksuz.S, *J.Nat.Prod*, 1982:45(3); 373.
- [110] Akkal, S, Benayache, F, Benayache, S, Medjroubi, K. and Jay, M, 2^{ème} Symposium National sur la chimie organique indetriel et pharmacetique Biskra, 03-05 Mai, Biskra- Algérie.
- [111] Ferreres.F, and Tomas.F, *Bull.Liaison-Groupe Polyphenol*, 1980: (9); 294.
- [112] Negrett, R.E, Backhouse.N, Pravo.B, Erazo.S, Garcia.R and Avendano.S, *Plant.Med.Phytother*, 1987:22(2); 168.
- [113] Akkal, S, Benayache,F, Benayache,S and Jay, M., *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997; 361.
- [114] Akkal.S, Thèse de doctorat, Université de Constantine, 2001.
- [115] Akkal, S, Benayache,F, Benayache,S, Medjroubi,K. and Bentamene,A.,1999, 5^{ème} Congres de la S.A.C Bejaia.

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algériennes du genre *Centaurea* (*Compositae*).

Les études que nous avons entreprises concernent la détermination des composés flavoniques et les sesquiterpène lactones de l'espèce « *Centaurea calcitrapa* », ces études sont une poursuite des résultats précédents sur les métabolismes secondaires de cette espèce.

L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, et la résonance magnétique nucléaire, ont permis d'isoler six composés flavonoidiques: l'Eupatorine et le Eupatiline et le Jaceosidine et Cirsiliol et l'hispiduline et l'apigenine et un sesquiterpène lactones: Cnicine, à partir des parties aériennes.

Cependant, trois flavonoïdes aglycones (Eupatorine, Eupatiline, Cirsiliol) décrits dans ce travail sont signalés pour la première fois dans cette espèce.

Mots-clés :

Centaurea calcitrapa

Flavonoides

Sesquiterpène lactones

Compositae

Summary

This work makes part of our research program of Algerian medicinal plants of the genus *Centaurea* (*Compositae*).

Studies that we undertook concern the determination of flavonoids and sesquiterpene lactones of the genus *Centaurea calcitrapa*.

This work completes our pervious results of flavonoids and sesquiterpene lactones of the genus *Centaurea calcitrapa*.

The extraction and purification of the different constituents, based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination, performed by physico-chemical and spectroscopic methods, such as ultraviolet and nuclear magnetic resonance spectroscopy, allowed us to isolate six simples flavonoids derivatives: Eupatorine, Eupatiline, Jaceosidine, Cirsiliol, Hispiduline and Apigenin, and one sesquiterpene lactones: Cnicin were also isolated from aerial parts of this plant. These compounds were already reported from this plant but the three aglycons (Eupatorine, Eupatiline, and Cirsiliol) were described for the first time from this plant.

Key words

Flavonoids

Sesquiterpene lactones

Centaurea calcitrapa

Compositae

الملخص

يندرج هذا العمل ضمن برنامج بحث للنباتات الطبية الجزائرية للجنس سنتوريا من العائلة المركبة. الدراسات التي قمنا بها تتمثل في تحديد منتجات الأيض الثانوي (الفلافونويدات و السسكويتربينات اللاكتونية) التي يحتوي عليها النوع سنتوريا كالسيترابا. و تعتبر هذه الدراسات تكملة للنتائج السابقة و المتعلقة بنواتج الأيض الثانوي لهذا الجنس.

خلال هذا البحث قمنا بدراسة التنوع البنيوي للأبيض الثانوي للنوع سنتوريا كالسيترابا باستخدام طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية، تمكنا من خلال ذلك فصل ستة مركبات فلافونويدية وهي:

Eupatorine, Eupatiline, Jaceosidine, Cirsiliol, Hispiduline, Apigenin

إلى سيسكويتربان لاكتوني هو: Cnicin.

إن هذا البحث تطلب استعمال كل من تقنية الكروماتوغرافيا بأنواعها المختلفة وأيضا الاستعانة بطرق التحليل الطيفي الأكثر فعالية و بشكل خاص مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية.

المركبات المعزولة من الأجزاء الهوائية للنبات المدروسة المحدد بنيتها الكيميائية قد ذكرت في دراسات إلا أن هناك بعض الخصوصيات التي ظهرت، حيث أن الفلافونويدات التالية: Eupatorine, Eupatiline, Cirsiliol. لم يتم ذكرها من قبل بالنسبة لهذا الصنف.

العبارات المميزة

Centaurea calcitrapa

Flavonoides

Sesquiterpène lactones

Compositae