

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

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du grade de
MAGISTER en Sciences
en Chimie organique
Option Phytochimie

INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT
CHLOROFORME DE *CENTAUREA PARVIFLORA* DESF.

Sous la direction du professeur :
M^{me} BENAYACHE Fadila

Par :
M^{elle} BELBACHE Hanene

Devant les jury :

Mr S. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Président
M ^{me} F. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Rapporteur
Mr A. BELATTAR	Pr. Université Mentouri	Examineur
Mr A. TENIOU	Pr. Université Mentouri	Examineur
M ^{elle} R. MEKKIOU	M. C. Université Mentouri	Examinatrice

Dédicace



Je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère, qui m'a soutenue moralement et matériellement dans ma vie et mes études en particulier et je dis ici :

« Tu es précieuse dans ma vie dans la joie comme dans l'ennui ; merci pour tout et que Dieu te garde pour nous ».

A la mémoire de mon admirable père.

A mon frère Marouane et mes sœurs : (Sabrina, Zahia) ainsi que leur familles, Waffa, Wided et mon petit ange Nahla, pour leur aide et leur soutien

A toute la famille Belbache.

A mes amies.



Remerciement

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Phytochimie et Analyses Physico-Chimiques et Biologiques, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri de Constantine, sous la direction de Madame F. Benayache, Professeur à l'université Mentouri de Constantine, que je tiens à remercier pour sa gentillesse, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vie à ce travail.

Je remercie spécialement Monsieur S. Benayache, Professeur à l'université de Constantine, pour son aide, ses conseils et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur A. Belattar, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je prie Monsieur le Professeur A. Teniou qui m'a fait l'honneur de juger ce travail, de recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Mademoiselle R. Mekkiou Maître de conférences qui me fait l'honneur de juger ce travail, j'adresse l'expression de ma sincère reconnaissance.

Ma sincère gratitude est adressée à :

Monsieur Seghiri Ramdane, pour sa disponibilité, son encouragement et sa bonne humeur, Madame Boumaza Ouahiba, Monsieur Bentamene Ali, Monsieur Bouhroum Mohamed.

J'exprime toute reconnaissance à mes amies et mes collègues de la promotion et je leur souhaite la réussite et une bonne continuation, je cite ici : Souada, Zahia, Kawtar, Manel, Tiba, Wassima, Souhaila, Zahra, Souhaila, Chawki, Ameer et Rachid.

Je remercie infiniment mes amies : Sabrina, Wissaf, Leila, Ratiba, Hassina et Habiba.

Je ne saurais oublier de remercier l'équipe du laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri de Constantine je cite ici : Wahiba, Souad, Amel, Adlene, El Hadj et Chouaib.

Mes remerciements vont enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I : L'usage des plantes à travers les époques

I-1-Introduction.....	03
I-2-Les médecines anciennes.....	04
I-2-1- La médecine chinoise et indienne.....	04
I-2-1-1- La médecine chinoise.....	04
I-2-1-2-La médecine indienne.....	06
I-2-2-La médecine grecque et romaine.....	06
I-2-2-1- La médecine grecque.....	06
I-2-2-2- La médecine romaine.....	07
I-2-3-La médecine égyptienne et sumérienne.....	07
I-2-4- La médecine arabe.....	08
I-3- Les plantes de nos jours.....	09
I-4- L'histoire des plantes en Algérie.....	10

Chapitre II : Les métabolites secondaires

II-1-Introduction.....	13
II-2-Les terpenoïdes.....	14
II-2-1-Monoterpènes.....	16
II-2-2-Diterpènes.....	17
II-2-3-Triterpènes.....	18
II-2-4-Tétraterpènes.....	19
II-2-5-Sesquiterpènes.....	20
II-2-6-1-La biosynthèse des lactones sesquiterpéniques.....	20
II-2-6-2-Les méthodes de séparation et d'analyse des lactones Sesquiterpéniques.....	28
II-2-6-2-1-Les Méthode de séparation.....	28
II-2-6-2-2-Les Méthodes d'analyse.....	30
II-2-6-3-Activités biologiques des lactones sesquiterpéniques.....	31
II-2-6-4-Quelques lactones sesquiterpéniques isolées des centaurees durant ces dernières années dans notre laboratoire	34
II-3-Les composés phénoliques.....	37
II-3-1-Les coumarines.....	37

II-3-2-Les flavonoïdes.....	38
II-3-2-1-Structure chimique et classification des flavonoïdes.....	39
II-3-2-2-Origine biosynthétique de flavonoïdes.....	41
II-3-2-3-Les Méthodes de séparation et d'analyses des flavonoïdes.....	45
II-3-2-3-1-Les méthodes de séparation.....	45
II-3-2-3-2-Les méthodes d'analyse.....	46
II-3-2-4-Activités biologiques des flavonoïdes.....	54
II-3-2-4-1-Activités anti-oxydantes.....	54
II-3-2-4-2-Activité antimicrobienne.....	54
II-3-2-5-Quelques exemples de flavonoïdes isolés des centaurees dans notre laboratoire.....	55

Chapitre III : L'étude phytochimique de *Centaurea parviflora*

III-1- Place dans la systématique.....	58
III-2- Description de l'espèce <i>parviflora</i>	59
III-2-3- Les travaux antérieurs.....	60
III-3-Travaux personnels.....	61
III-3-1- Extraction de <i>Centaurea parviflora</i>	61
III-3-2- Séparation chromatographique sur colonne.....	64
III-3-3- Séparation et la purification des fractions sélectionnées	69
III-3-4- Conclusion.....	70

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1- Introduction.....	72
IV-2- Identification du composé F ₄₁	72
IV-3- Identification du composé F ₉	93
IV-4- Identification du composé F _{26-b1}	102
IV-5- Identification du composé F _{26-b2}	108
Conclusion générale.....	115
Références bibliographiques.....	116

Les Abréviations

CHCl₃ : Chloroforme

EtOH : Ethanol

MeOH : Méthanol

SiO₂ : Silice

CCM : Chromatographie sur couche mince

R_f : Facteur de retardation (retardation factor)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

DEPT: Sequence Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert

ppm : Partie par million

δ : Déplacement chimique

J : Constante de couplage

s : Singulet

d : Doublet

m : Multiplet

SMIE : Spectrométrie de masse en mode impacte électronique

FAB : Bombardement par atomes rapides (Fast Atom Bombardment)

m/z : Masse / charge électrique

IR : Infra Rouge

INTRODUCTION GENERALE

L'**O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté (**O.M.S**) a déclaré au cours de sa cinquante sixième assemblée en mars 2003 que pendant la dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt à travers le monde dans une société profondément marquée par la recherche d'une vie saine, d'un retour à la nature aux valeurs essentielles.

Cet intérêt limité jadis au pays pauvres ou en voie de développement, est de nos jours en vogue dans les pays les plus développés à titre d'exemple : l'Australie, les Etats-Unis d'Amérique et la France où, à côté des médicaments fournis par l'industrie pharmaceutique évoluent des préparations obtenues par traitement chimique de substances naturelles, végétales ou animales, mais aussi des remèdes purement naturels qui, rarement d'origine animale comme le miel ou minérale comme la tourbe médicinale, proviennent presque exclusivement des plantes. Il faut noter toutefois, que parmi celles-ci, seules certaines sont médicinales et la **substance thérapeutique** efficace n'est, en outre, logée que dans un certain organe que l'on cueille alors à cet effet. Il arrive très rarement d'utiliser la plante entière.

Les médicaments d'origine chimique ont permis de sauver des millions de vies humaines durant le dernier siècle mais cette efficacité s'est accompagnée de nombreux incidents.

Selon l'**O.M.S** 60% des maladies actuelles seraient dues aux médicaments synthétiques. Cela a entraîné une prise de conscience et un retour à la **phytothérapie** dont le succès s'explique avant tout par le niveau de maîtrise technique et scientifique atteint dans ce domaine. Il faut cependant, savoir faire la part des choses à savoir, éviter la destruction sauvage des forêts et de la végétation et préserver le patrimoine végétal dans sa diversité et dans son étendue car, si la plante est la meilleure usine de la substance thérapeutique, cette substance doit être utilisée comme modèle qualitatif et non comme modèle quantitatif d'où le regain d'intérêt pour les méthodes extractives à la recherche

de molécules à activité biologique potentielle pouvant servir comme modèle pour la mise au point de nouveaux médicaments.

Cet axe de recherche est privilégié par notre laboratoire depuis une vingtaine d'années où plusieurs molécules nouvelles ont été isolées et déterminées notamment d'espèces du genre *Centaurea* (Compositae). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Centaurea parviflora* notamment l'investigation de la phase chloroforme de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes.

Notre travail à caractère phytochimique contient une introduction générale, quatre chapitres et une conclusion.

CHAPITRE I

L'usage des plantes à travers les époques

I-1-INTRODUCTION :

La survie et la reproduction de toutes les espèces animales dépendent essentiellement :

- ❖ De l'abondance et de la qualité de la nourriture
- ❖ De leur état de santé et de leur bien être
- ❖ Des conditions de l'environnement

Ainsi, pour les animaux, le maintien de leur santé et la recherche de leur bien être figurent au rang de leur principale occupation. Ils utilisent intuitivement ou instinctivement des plantes non seulement pour se nourrir mais aussi pour se soigner, d'où l'observation de la façon dont se soignent les animaux, fournit des indications précises sur la façon dont se soignaient les hommes primitifs. A titre d'exemple, en Tanzanie, certains singes ont l'habitude de consommer à des moments précis les feuilles d'une petite plante ressemblant à une marguerite. La plante a été analysée et un composé abondant fut isolé et caractérisé : la thiarubrine-A. Cette molécule est très active vis-à-vis des champignons. Elle a aussi une action très toxique vis-à-vis des vers intestinaux qui parasitent régulièrement le tube digestif des singes [1].

Comme les animaux, l'homme n'échappe pas de la règle précédente, c'est une longue et vieille histoire d'alliance homme -plantes quelques fois redoutable et redoutée.

Etroitement lié à la culture et au développement des sociétés l'«art de guérir » était souvent lié à des croyances religieuses ou à la magie et de ce fait on leur attribuait des pouvoirs surnaturels. La maladie était ainsi une punition divine pour des actes répréhensibles ou encore une possession par des êtres malfaisants. Exorciser le mal revenait à avoir recours à la sorcellerie utilisant certaines plantes, des plantes qui guérissaient ! Mais l'évolution de l'homme a fait apparaître des « modes d'emploi » et c'est le début de la médecine.



I-2-Les médecines anciennes :

On distingue plusieurs époques dont certaines se chevauchent :

I-2-1-La médecine Chinoise et Indienne :

I-2-1-1-La médecine chinoise :

La médecine chinoise est une médecine très ancienne, d'après l'association suisse de la médecine traditionnelle chinoise (MTC) [2] la médecine chinoise est une médecine énergétique dont le but est de restaurer un équilibre au niveau des différentes fonctions de l'organisme et ainsi de lui permettre d'envisager les «agressions» du milieu extérieur de la meilleure façon possible. C'est donc une médecine complète, à la fois préventive et curative. Elle se base sur trois piliers fondamentaux qui sont

中醫

❖ L'acupuncture :



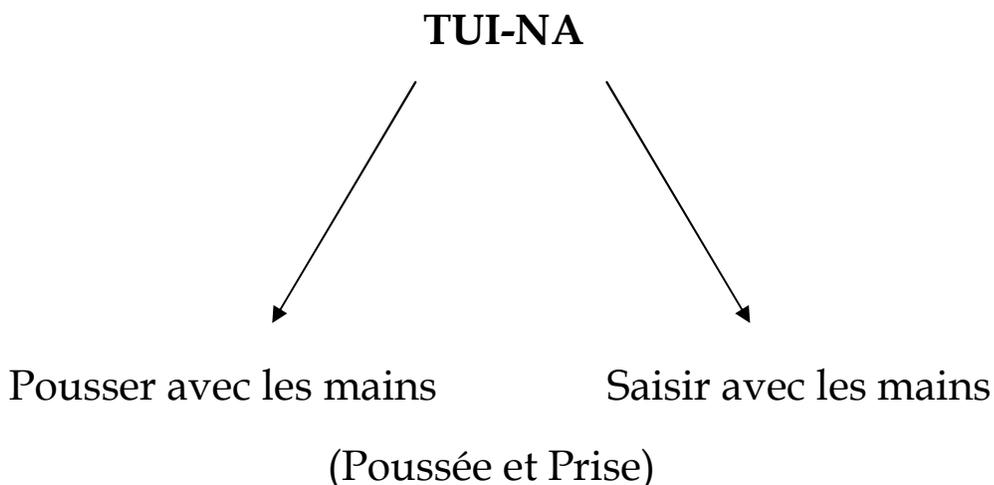
L'acupuncture consiste en l'insertion d'aiguilles fines à des points précis dans le corps dans le but de soigner. Les points choisis l'hors d'un traitement sont spécifiques aux désordres de chaque organe.

❖ **La phytothérapie :**

Selon les chinois, la découverte des premiers remèdes naturels essentiellement issus du règne végétal ne fut pas seulement le fruit du hasard. La tradition rapporte que les maîtres anciens initiés à la connaissance des mystères de l'univers, transmirent un enseignement cohérent, fondé sur des lois universelles et sur une perception intime de la nature humaine.

❖ **Le massage chinois : TUI-NA :**

L'histoire remonte en chine, pour ainsi dire, aux origines de l'humanité. La théorie par le massage manuel est une méthode de traitement, elle stimule des points précis du corps et provoque des réactions locales ou générales de manière à régulariser les fonctions de l'organisme, éliminer les facteurs pathogènes et guérir certaines maladies.



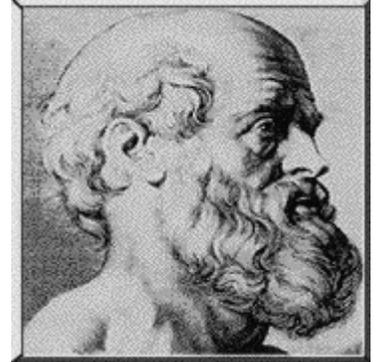
I-2-1-2-La médecine indienne :

Contemporaine de la médecine chinoise, elle est dominée par deux médecins, Charaka (I^{er} siècle apr. J. C.) Et Suçruta (IV^{ème} siècle apr. J. C.), qui rédigent chacun un traité, les plus anciens recueils conservés (Samshita) apportent que la médecine traditionnelle est fondée sur l'analogie entre le macrocosme (l'univers) et le microcosme (l'homme) [3].

I-2-2-La médecine grecque et romaine

I-2-2-1-La médecine grecque :

Ce sont les Grecs qui ont donné son essor à la médecine par les plantes Grâce à **Hippocrate** (460-377av. J. C.) qui fonda l'observation clinique connue sous **Corpus Hippocratum**.



Les recettes qu'il utilisait étaient pour la plupart d'origine végétale. Ainsi près de 400 remèdes basés sur l'établissement de relations entre la forme ou la couleur de plante et la maladie qu'elle pouvait guérir, furent mentionnés, à titre d'exemple, le grenadier, fruits et fleurs, guérissaient les hémorragies[4]. Après Hippocrate, le deuxième grand médecin de l'antiquité est « **Claude Galien** » dont les théories servirent au fondement à toute la médecine du Moyen Âge et marqua de son influence au moins 15 siècles de la médecine et de la pharmacie en Europe [3].



I-2-2-2-La médecine romaine :

En conquérant grèce, les romains adopteront la médecine grecque dans son intégralité. A partir du I^{er} siècle av. J. C., les médecins de l'école d'Alexandrie se rendent à Rome, où ils se regroupent en d'autres écoles, à titre d'exemple l'école des atomistes, conduits par Asclépiade de Bithynie, s'opposent à la doctrine humorale d'Hippocrate et considèrent le corps humain comme un ensemble d'« atomes » s'échangeant à travers des « pores » ; la mauvaise disposition de ces atomes déterminerait la fièvre, l'inflammation ou les douleurs [3].

I-2-3-La médecine égyptienne et sumérienne :

De toutes les disciplines scientifiques de l'Egypte ancienne, aucune n'a pu atteindre la popularité de la médecine. Selon les écrits, celle-ci atteignait un niveau de spécialisation, assez remarquable pour l'époque

D'après Hérodote : « En Egypte, chaque médecin ne soigne qu'une seule maladie. Aussi sont-ils légion ; il en a pour les yeux, d'autres pour la tête, les dents, le ventre, et même les maladies non localisés »[5].



L'exercice de la médecine égyptienne s'étendait sur plus de cinq mille ans, elle se dotait ainsi d'une médecine riche et complète permettant de guérir tous les maux de la vie quotidienne allant des morsures de serpents à la gynécologie, en passant par les fractures et les tumeurs.

L'étude des papyrus médicaux et l'examen scientifique des momies ont permis de bien connaître la pratique médicale dans l'égypte ancienne, mais aussi de déterminer la nature des maladies.

Malgré l'omniprésence des divinités, comme le dieu guérisseur, et malgré le fait que la médecine restait fortement mêlée à des pratiques magiques, les égyptiens parviennent à rationaliser la médecine en classant les maladies par « **spécialité** » [3]. A cet effet, plus

de 800 remèdes sont décrits. De nos jours, certaines plantes de la médecine égyptienne sont toujours utilisées comme sédatifs (**Pavot, Jusquiame**) et autres.

Par ailleurs, les traités de la médecine ancienne rapportent que 4000 ans avant J. C. les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient des plantes pour se soigner grâce à la découverte de 600 tablettes d'argile mentionnant 1000 plantes telles que le Pavot, la mandragore pour leur vertu curative [1].

I-2-4-La médecine arabe :

« La médecine est l'art de conserver la santé et éventuellement de guérir la maladie dans le corps » poème de la médecine **Ibn sina** (980-1037).



La médecine Arabe a eu son heure de gloire il y a plusieurs siècles. La civilisation arabo-islamique appartient aux grandes civilisations et la médecine arabe fait partie de ce patrimoine. La situation géographique du monde musulman, entre le monde méditerranéen et l'orient plus ou moins lointain, a favorisé le rayonnement de sa médecine grâce à la langue arabe commune de l'Andalousie à l'Asie centrale. Cette médecine s'inscrit dans une longue tradition scientifique qui remonte à la grèce classique, à la perse ancienne et à l'inde sanscrit [6].

A partir des ouvrages traduits grecs, perses et indiens, les savants musulmans ont assimilé la somme des traditions thérapeutiques gréco-romaines. Ils étaient encouragés en cela par les princes et califes arabes dont « **Haroun Erashid** ». Ils ont alors développé leur propre recherche, observations chimiques et expérimentations, dans les domaines de la médecine et de la pharmacie.

Des savants célèbres dans le monde entier témoignent de cet âge d'or de la médecine chez les musulmans.

Parmi ceux qui influencèrent profondément le cours de la médecine arabe on cite :

-AL RAZI (RAZES): (864-932)

-IBN SINA (AVICENNE): (980-1037) nommé le prince de la médecine avec son écrit *KANOUN FI-ELTIB* Figure 1.

Mais le plus grand d'entre eux fut sans aucun doute IBN AL BAYTAR : (1197-1248) qui émigra en Orient où il rédigea le très complet *SOMME DES SIMPLES* [4].



Figure 1 : une page du livre KANOUN FI-ELTIB de IBN SINA

I-3-Les plantes de nos jours :

D'après notre étude établie sur les différentes médecines de l'antiquité on remarque que les plantes avaient une grande importance dans la vie des anciennes civilisations et cette importance se manifeste aujourd'hui, puisque les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments.

En fait, la phytothérapie a toujours su rebondir d'une époque à l'autre, preuve que l'homme et les plantes ont non seulement un passé mais, un présent et un avenir communs si on ne néglige pas de les préserver et de préserver ces savoirs ancestraux, fruits d'un longue coopération transfrontalière sur notre terre patrie. C'est suite aux connaissances anciennes des bienfaits des plantes que la persévérance des Botanistes, Herboristes et Chimistes a réussi à percer le secret des métabolismes des plantes permettant ainsi l'isolement de nombreux principes actifs des végétaux tels des alcaloïdes, parmi lesquels : la morphine, la quinine, la codéine, cocaïne...etc

I-4-l'histoire des plantes en Algérie :

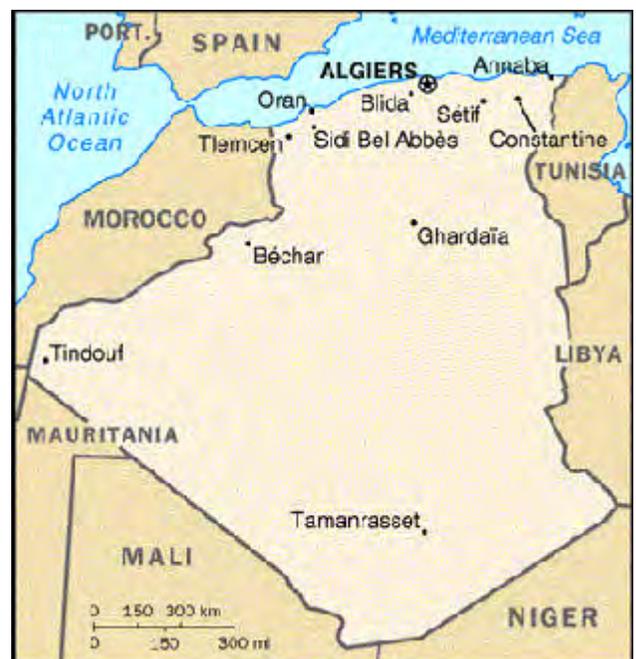
Chaque culture a une histoire d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies. En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans.

Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été fait au IX^{ème} siècle par **Ishâ-Ben-Amran** et **Abdallah-Ben-Lounès** né à Oran, et qui décrit l'usage de beaucoup de plantes médicinales, mais la plus grande production de livres a été réalisée au dix-septième et au dix-huitième siècle.

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par **Fourment et Roques** où ils ont mentionné décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara [7]. Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de **Bloued** (1998) [8] et **Baba Aissa** (1999) [9].

L'Algérie couvre une surface de 2,381.741 km² est c'est le deuxième plus grand pays d'Afrique après le Soudan.

Deux chaînes montagneuses importantes, l'Atlas Tellien au Nord et l'Atlas Saharien au Sud, séparent le pays en trois types de milieu qui se distinguent par leur relief et leur morphologie, donnant lieu à une importante diversité biologique.



Quant à la grande diversité des plantes médicinales en Algérie et leur usage, une synthèse regroupant toutes ces informations à l'échelle nationale devrait être rapidement entreprise. De tout temps, les plantes médicinales ont eu une grande influence et occupé une place importante dans la vie quotidienne en Algérie, on peut observer cette influence même sur les timbres postaux [10].



Parmi les plantes médicinales qui ont acquis une très grande importance, les plantes de la famille des composées qui constituent la plus vaste subdivision du règne végétal.

Cette famille comprend en effet 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [11]. Cette immensité systématique est disponible par sa répartition à travers tous les continents et se caractérise par son pouvoir d'adaptation aux milieux climatiques et pédologiques les plus divers.

Parmi les 1000 genres de cette famille le genre *Centaurea* qui compte environ 700 espèces et 600 sous-espèces [12]. Il est répandu aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent américain. Ce genre est présent en Algérie en majorité dans l'est et le sud-est dont 7 espèces sont sahariennes [13].

Les centaurées ont été amplement étudiées et restent un objet de plusieurs études et recherches phytochimiques qui ont révélé la présence de flavonoïdes [14], de composés acétyléniques [15], de lactones sesquiterpéniques [16], d'alcaloïdes [17], et de stéroïdes [18].

Les espèces du genre *Centaurea* possèdent plusieurs vertus thérapeutiques et ont montré des activités stimulantes, toniques, diurétiques, antidiabétiques.

Le tableau 1 renferme quelques exemples dans ce sens.

Espèces du <i>Centaurea</i>	Activité	Réf
<i>C. calcitrapa</i> <i>C. mélittensis</i> <i>C. aspera</i>	Antidiabétique	[19]
<i>C. musimomum</i> <i>C. furfuracea</i> <i>C. granata</i>	-Cytotoxique -Antiparasitaire	[20]
<i>C. incana</i>	Utilisé pour les maladies du foie	[21]
<i>C. chilensis</i>	Antirhumatisme	[22]

Tableau 1 : Activité de quelques espèces du genre *Centaurea*

CHAPITRE II

Les métabolites secondaires

II-1-INTRODUCTION :

Les plantes synthétisent les éléments du sol et de l'atmosphère qu'elles absorbent par les racines et par les feuilles, l'eau, l'acide carbonique et les matières minérales et inorganiques.

Le processus de base est l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique appelé *photosynthèse*. Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à basse molécularité appelés *métabolites primaires* : les saccharides (sucres), puis les acides gras, les acides aminés. En suite sont produits les *métabolites spécialisés* ou *secondaires*. Certaines possèdent des vertus thérapeutiques.

Parmi les métabolites spécialisés, les principaux sont **les flavonoïdes**, qui renforcent les parois des capillaires sanguins, **les corps terpéniques** (le terpène se trouve dans le menthol, la camphre etc....) eux même forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. **Les principes amers** permettant la digestion des matières grasses, les saponines (sapo=savon) sont employés comme expectorants et diurétiques ; **les alcaloïdes** à effets thérapeutiques nombreux peuvent être aussi des poisons mortels ; on pourrait prolonger l'énumération : d'autres métabolites spécialisés agissent contre les allergies, l'hypertension, les maladies infectieuses et forment même la base de produits anticonceptionnels.

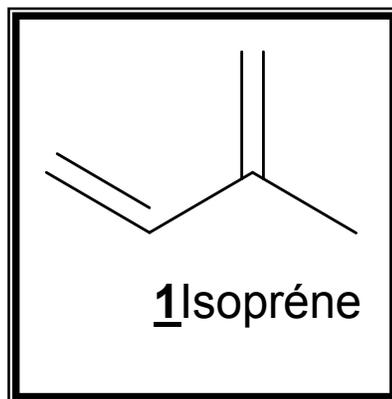
Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressés au genre *Centaurea* de la famille des composées dont le métabolisme secondaire est réputé dans l'accumulation des terpénoïdes en particulier des **lactones sesquiterpéniques** [23-27] et des composés phénoliques de type **flavonoïdes** [28-31]. Ces deux classes de substances naturelles sont reconnues dans diverses activités biologiques. Cette étude concerne l'extraction, l'isolement, la purification et la détermination structurale de la composante de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcolique de *Centaurea parviflora* Desf.

II-2-LES TERPENOIDES :

Les terpènes sont des constituants habituels des cellules végétales, Ils peuvent s'impliquer dans les fonctions métaboliques essentielles.

Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux, cette odeur est due à la libération de molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbone. Extraites du végétal, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande).

Un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques [32], d'où divers emplois dont l'embaumement qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles qui en sont tirées. Les terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage d'au moins 2 entités à 5 atomes de carbone dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène 1.



Selon le nombre d'entités isopréniques les terpènes sont classés en :

- monoterpène à 10 atomes de carbone.
- sesquiterpène à 15 atomes de carbone.
- diterpène à 20 atomes de carbone.
- tri, tétra à 30, 40 atomes de carbone etc.

La figure 2 montre quelques exemples des différents types de terpenoïdes.

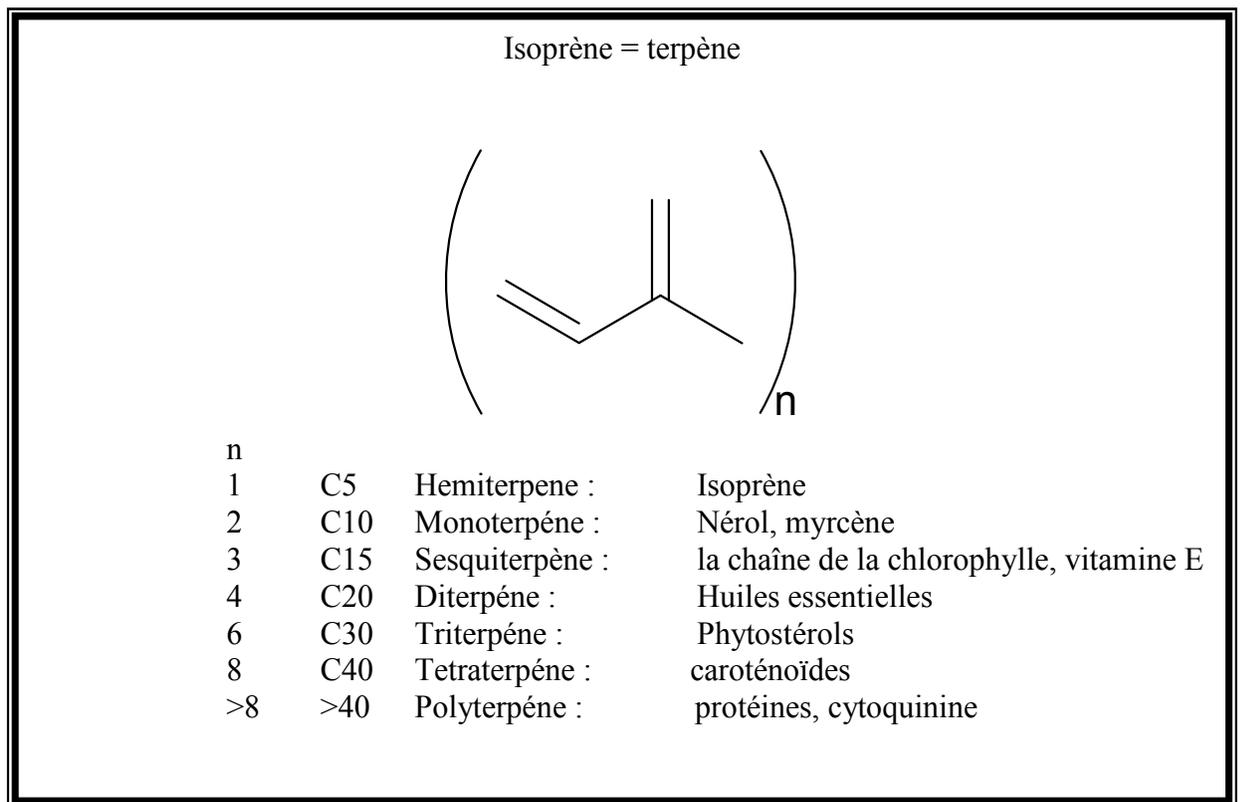


Figure 2 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes

Bien que les terpènes au sens strict ne soient que des hydrocarbures, de nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques. Il n'y a pas de fonctions chimiques propres aux terpènes, seules leur structure et leur biosynthèse en font une catégorie, aussi se contente-t-on ici d'en citer quelques exemples et certaines de leur propriétés.

II-2-1-Monoterpènes :

Ce sont des molécules légères, très peu fonctionnalisées, très odorantes, la plupart ont des activités biologiques reconnues et sont caractéristiques des plantes d'où elles sont originaires si bien que leur odeurs se confondent et leurs noms évocateurs. A cet effet, quelques exemples 2 à 11 sont reportés dans la figure 3.

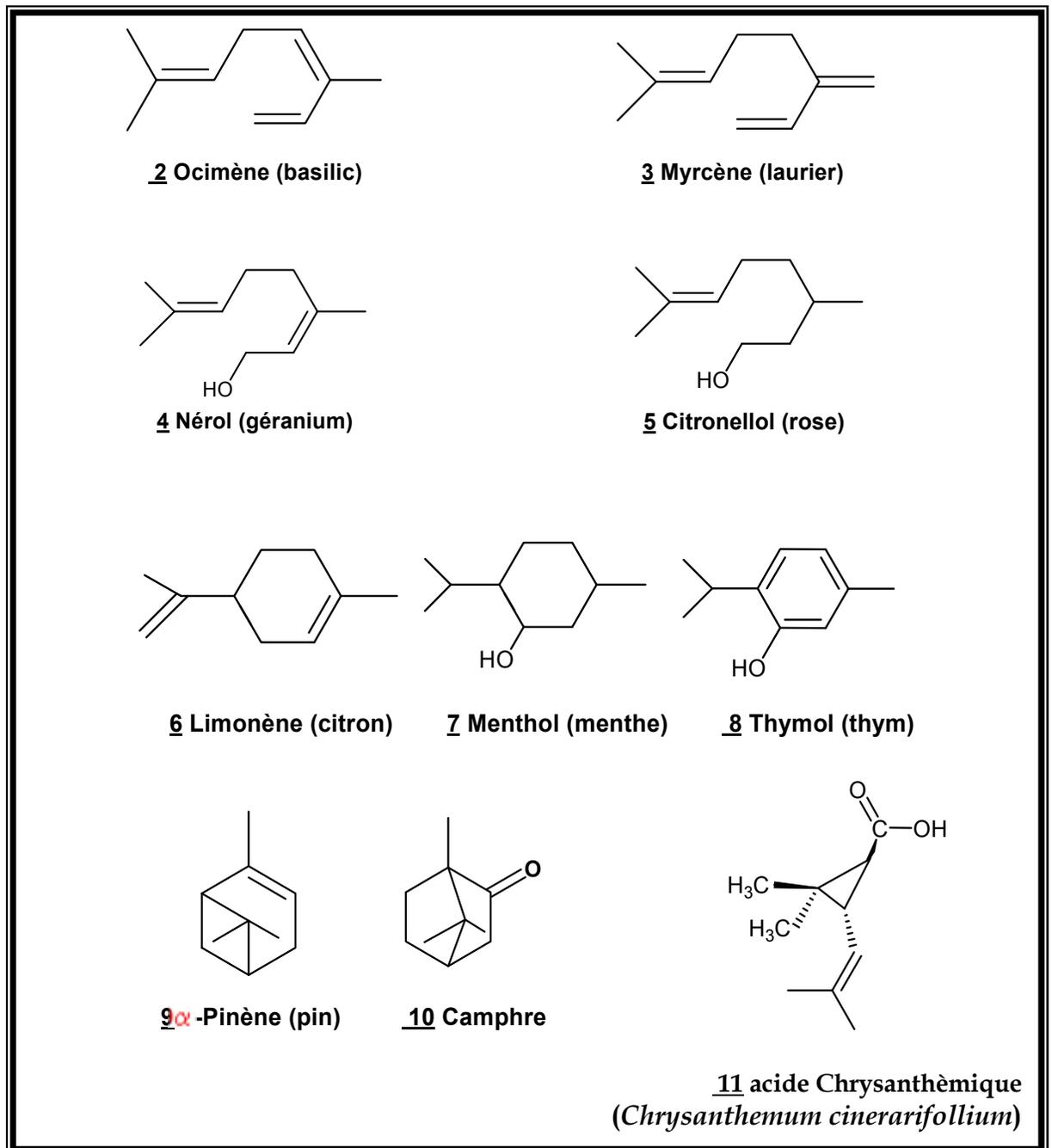


Figure 3 : Structure de quelques monoterpènes et leur source

II-2-2-Diterpènes :

Ayant un squelette principal formé de vingt atomes de carbone, ils dérivent tous du géranylgéraniol. Ils peuvent être acycliques comme le phytol **12**, cependant après divers réarrangements, ils peuvent être monocycliques comme le vitamine A **13**, bicycliques comme le sclaréol **14**, tricycliques comme l'acide abiétique **15**. La figure 4 rassemble les diterpènes cités.

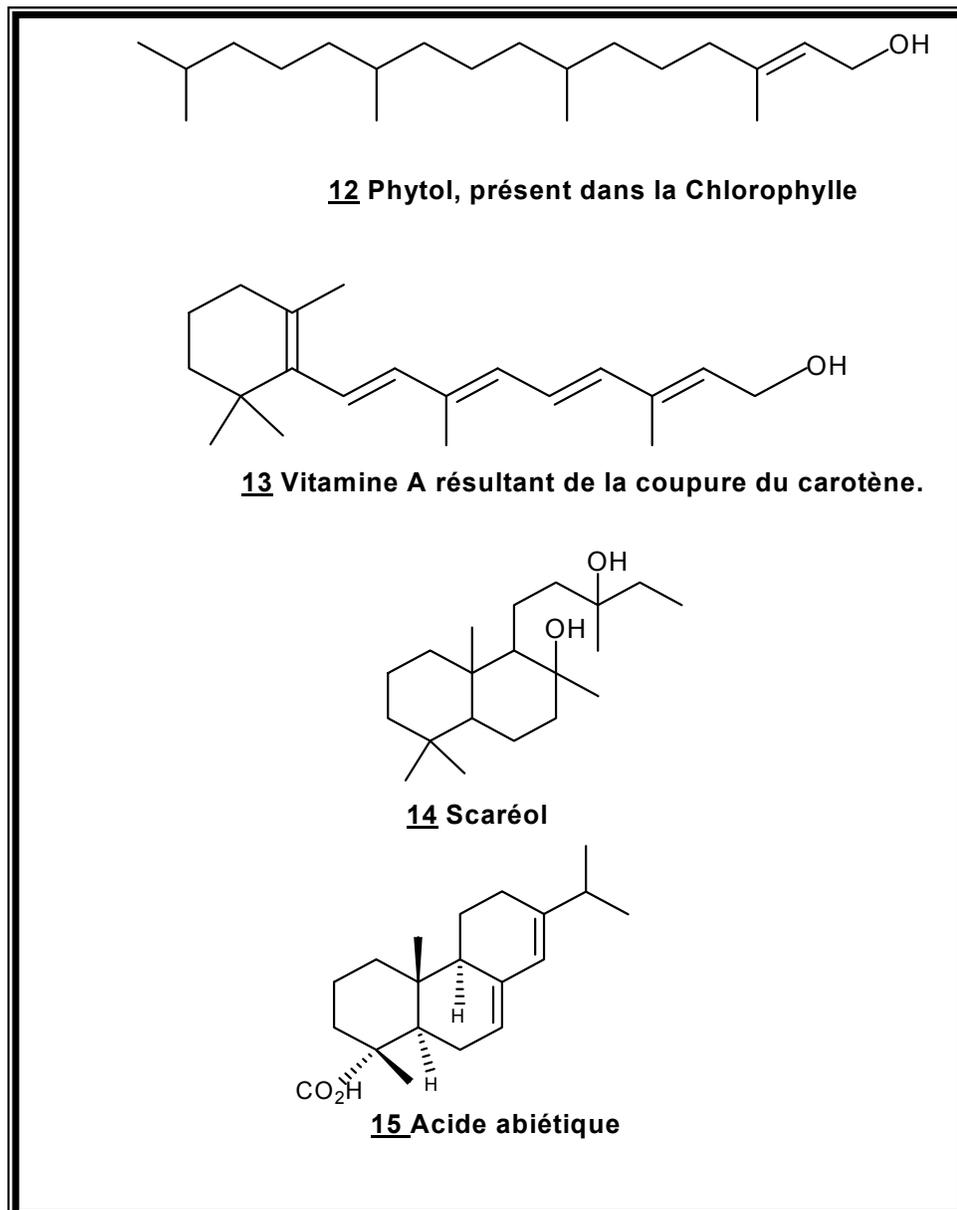
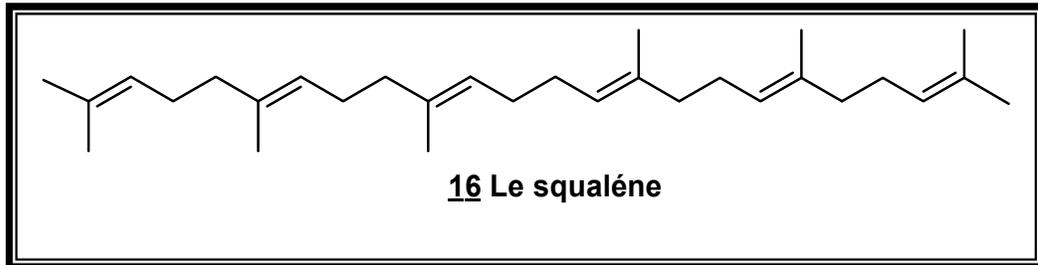


Figure 4 : Structure de quelques diterpènes et leur nom

II-2-3-Triterpènes :

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone. Ils ont comme précurseur le squalène 16



La figure 5 montre que le squalène est le précurseur du lanostérol 17 Ceci fait apparaître le lien entre les terpènes et les stéroïdes. Le lanostérol est ensuite transformé en cholestérol, c'est de plus un des constituants de la graisse de la laine de mouton, le suint ou lanoline mélange complexe de graisses et de cires contenant 33 alcools de haut poids moléculaire et 36 acides gras.

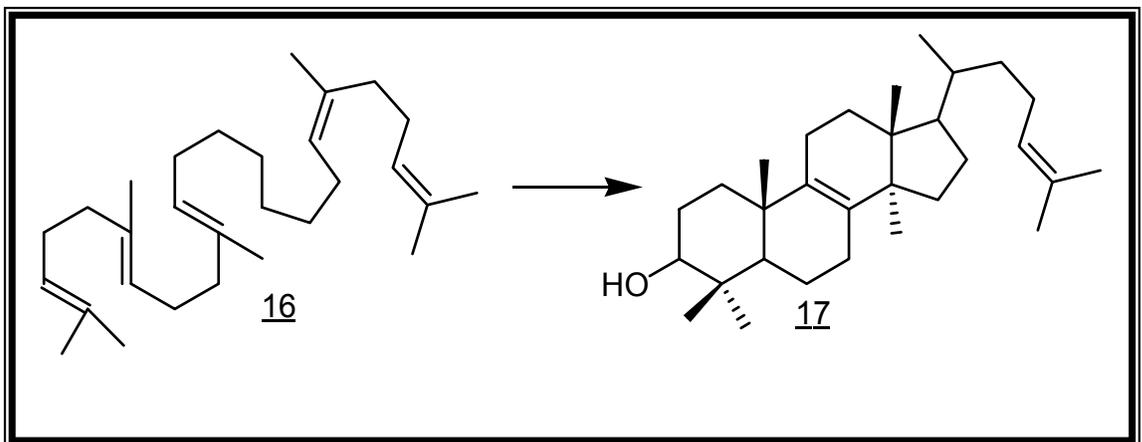
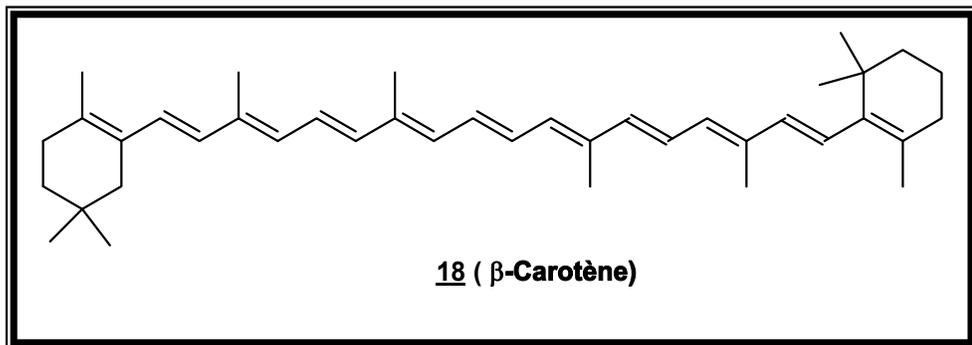


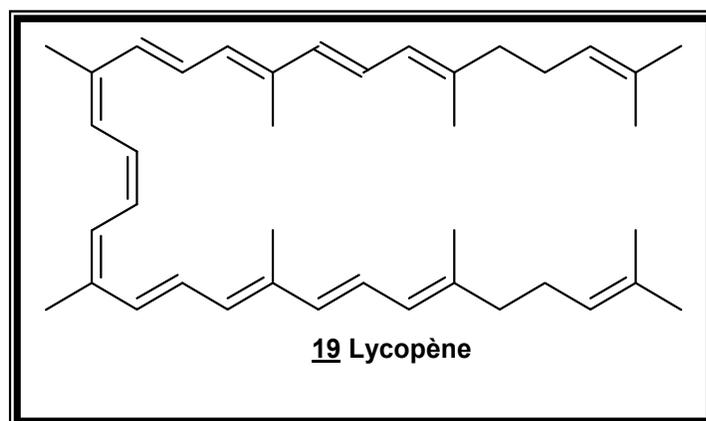
Figure 5 : La transformation du squalène en lanostérol

II-2-4-Tétraterpènes :

Des molécules de 40 atomes de carbone, la molécule la plus réputée est le β -Carotène 18. Il possède 11 doubles liaisons conjuguées, d'où sa couleur, qu'il donne aux carottes. Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la vision, son oxydation provoque la coupure de la double liaison centrale et la formation de deux molécules d'un aldéhyde le Rétinal dont la réduction donne la vitamine A.

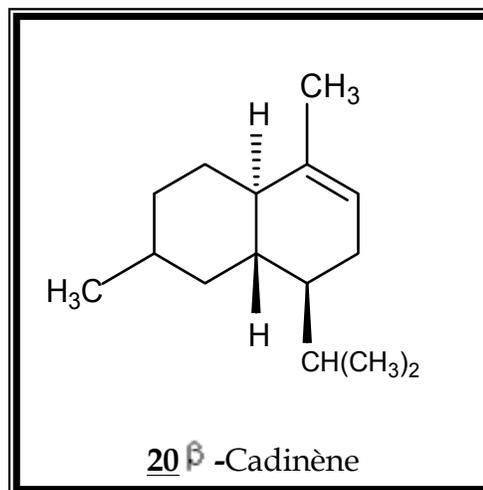


Parmi les autres molécules le lycopène 19 que l'on trouve dans la tomate mure (0,02 g/kg), il est entièrement acyclique.



II-2-5-Sesquiterpènes :

Les sesquiterpènes sont formés de quinze atomes de carbone, on les trouve aussi bien sous forme d'hydrocarbures comme le β -Cadinène **20** issu du cade que sous forme fonctionnalisée notamment oxygénée. Ils sont issus du pyrophosphate de farnésyle lui-même produit par un couplage **tête-queue** entre le GPP et l'IPP. Ils peuvent être acycliques, mono ou bicycliques. Par cyclisation du FPP on obtient un cation germacradiényle qui mène, via le germacranolide, aux lactones sesquiterpéniques.



II-2-6-Les lactones sesquiterpéniques :

Les terpènes de type sesquiterpènes et lactones sesquiterpéniques sont très connus pour leurs activités biologiques, ces dernières étaient appelées *principes amers*. Elles ne sont pas volatiles et leur structure casse à des températures élevées. On dénombre plus de 3000 structures différentes, et on les trouve principalement chez les **Asteraceae** au niveau des poils sécréteurs pluricellulaires des feuilles, bractées et inflorescences [33].

II-2-6-1 La biosynthèse des lactones sesquiterpéniques :

En 1887 **Wallach** a envisagé la biosynthèse des terpènes à partir de trois unités isopréniques. Cette hypothèse a été confirmée par **Ruzika** expérimentalement en 1953 [34,35]. Plus tard **Hendrikson** [36], montra toutes les étapes de cette biosynthèse à partir d'unités acétates.

Pour cette hypothèse, la biosynthèse des lactones sesquiterpénique se fait en plusieurs étapes :

a)- La formation de l'acide mévalonique : (MVA)

Connu depuis 1956, l'acide mévalonique **21** se forme à partir de la condensation de trois unités acétates après réduction par le NADPH. Au cours de cette biosynthèse, deux molécules se combinent par une **condensation de Claisen**, pour donner l'acétoacetyl CoA et une troisième molécule d'acétyl coenzyme A est additionnée stéréospécifiquement pour donner la chaîne **β -hydroxy- β -methylglutaryl -CoA** (HMG-SCoA). La transformation en acide mévalonique, se fait en deux étapes réductrices du groupe thioester en alcool primaire comme reporté dans la figure 6.

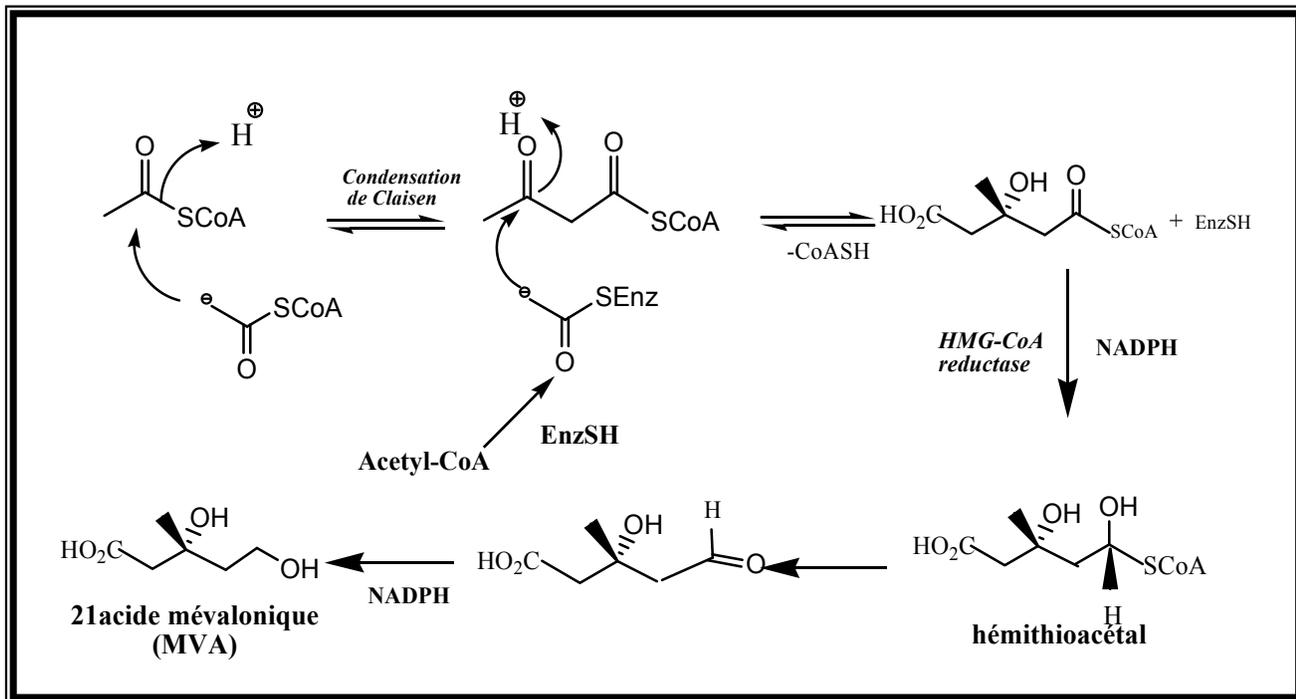


Figure 6 : Formation de l'acide mévalonique à partir des trois unités acétates

b)- La formation de l'isopentyl pyrophosphate : (IPP)

Le **MVA** est considéré comme la clé de la biosynthèse de tous les terpènes où il est phosphorylé par l'**ATP** qui lui cède en deux temps 2 groupements phosphates formant un pyrophosphate. En présence d'une nouvelle molécule d'**ATP** le mévalonyl 5 pyrophosphate est converti en pyrophosphate d'isopentenyle (**IPP**) 22 avec perte de CO_2 et libération de phosphate comme reporté dans la figure 7.

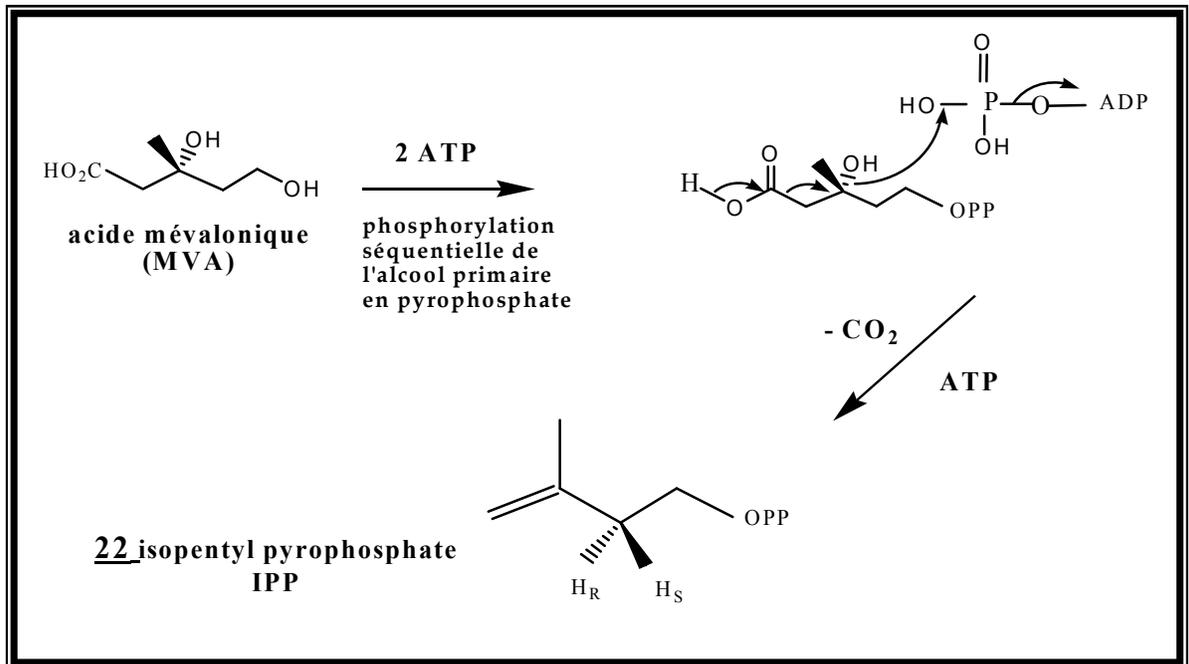


Figure 7 : Transformation du MVA en Isopentyl pyrophosphate (IPP)

c)- La formation du diméthylallyl pyrophosphate : (DMAPP)

Le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) 23 résulte de l'isomérisation de l'isopentyl- pyrophosphate (IPP). Comme indiqué sur la figure 8, le sens de l'équilibre vers la formation du DMAPP est en effet, largement favorisé, vu que la double liaison résultante est plus substituée.

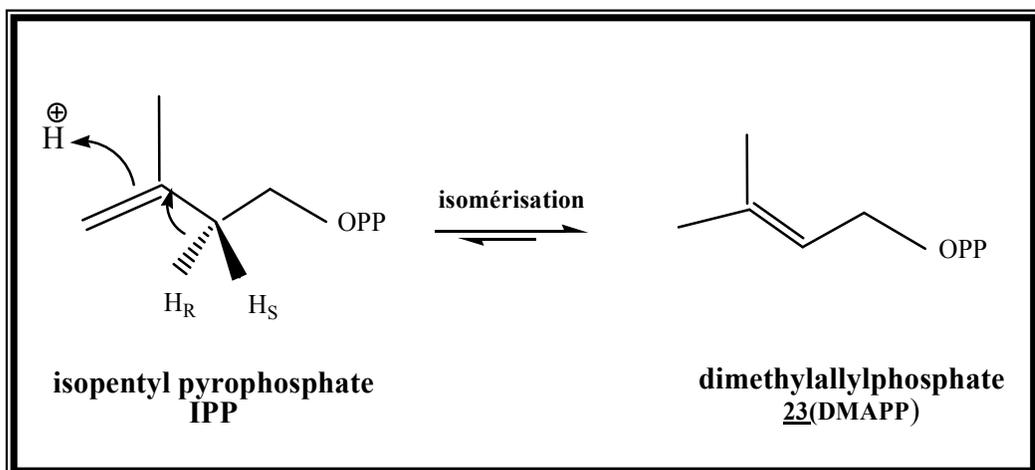


Figure 8 : Isomérisation de l' isopentyl pyrophosphate (IPP) en DMAPP

d)- La formation du géranyl pyrophosphate : (GPP)

Comme reporté dans la figure 9, le géranyl pyrophosphate (GPP) 24 résulte de la combinaison d'une molécule de DMAPP et d'une molécule d'isopentyl pyrophosphate en présence de l'enzyme **prenyl transférase**.

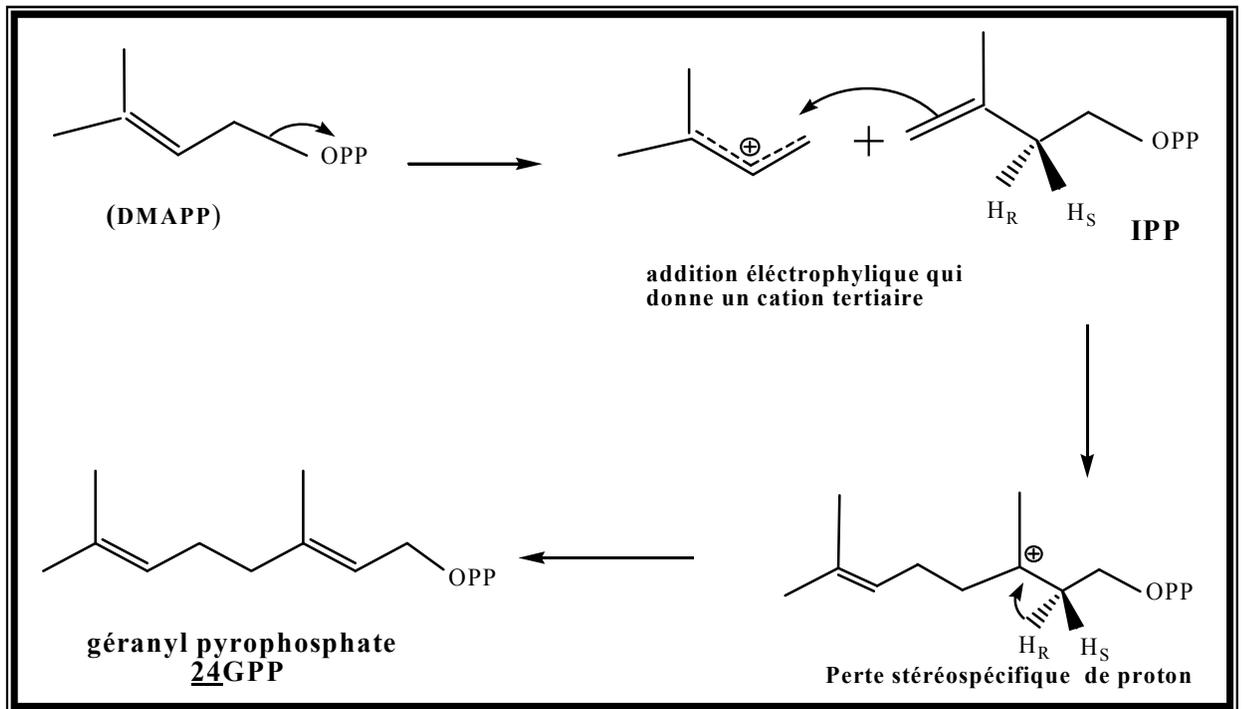


Figure 9 : Formation du géranyl pyrophosphate

e)- La formation du précurseur des lactones sesquiterpéniques : (FPP)

L'addition d'une autre molécule de IPP au GPP donne le squelette sesquiterpénique fondamental le farnesyl pyrophosphate (FPP) 25. Ce dernier est considéré comme le précurseur universel pour les lactones sesquiterpéniques [37-42]. La Figure 10 renferme les étapes de sa formation.

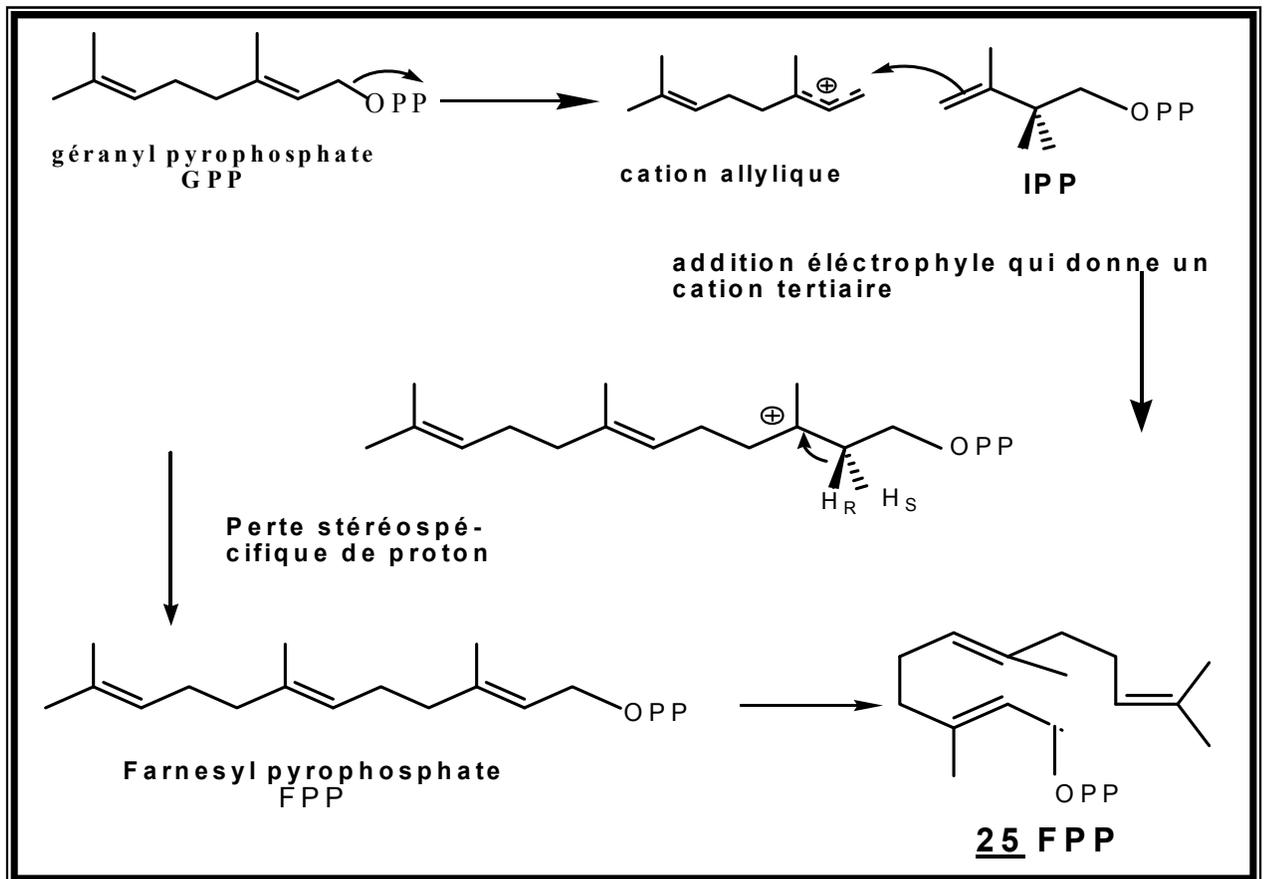


Figure 10 : La formation du FPP

Selon la stéréochimie des deux premières des trois doubles liaisons : **EE**, **ZE**, **EZ** et **ZZ** du Farnesyl pyrophosphate, on obtient quatre isomères géométriques de sesquiterpènes monocycliques formés à la base de germacra, 1(10), 4(5)-diène-6,12-olide connus sous les noms de germacranolide, héliangolide, mélampolide et germacranolide **ZZ** respectivement comme indiqué dans la figure 11.

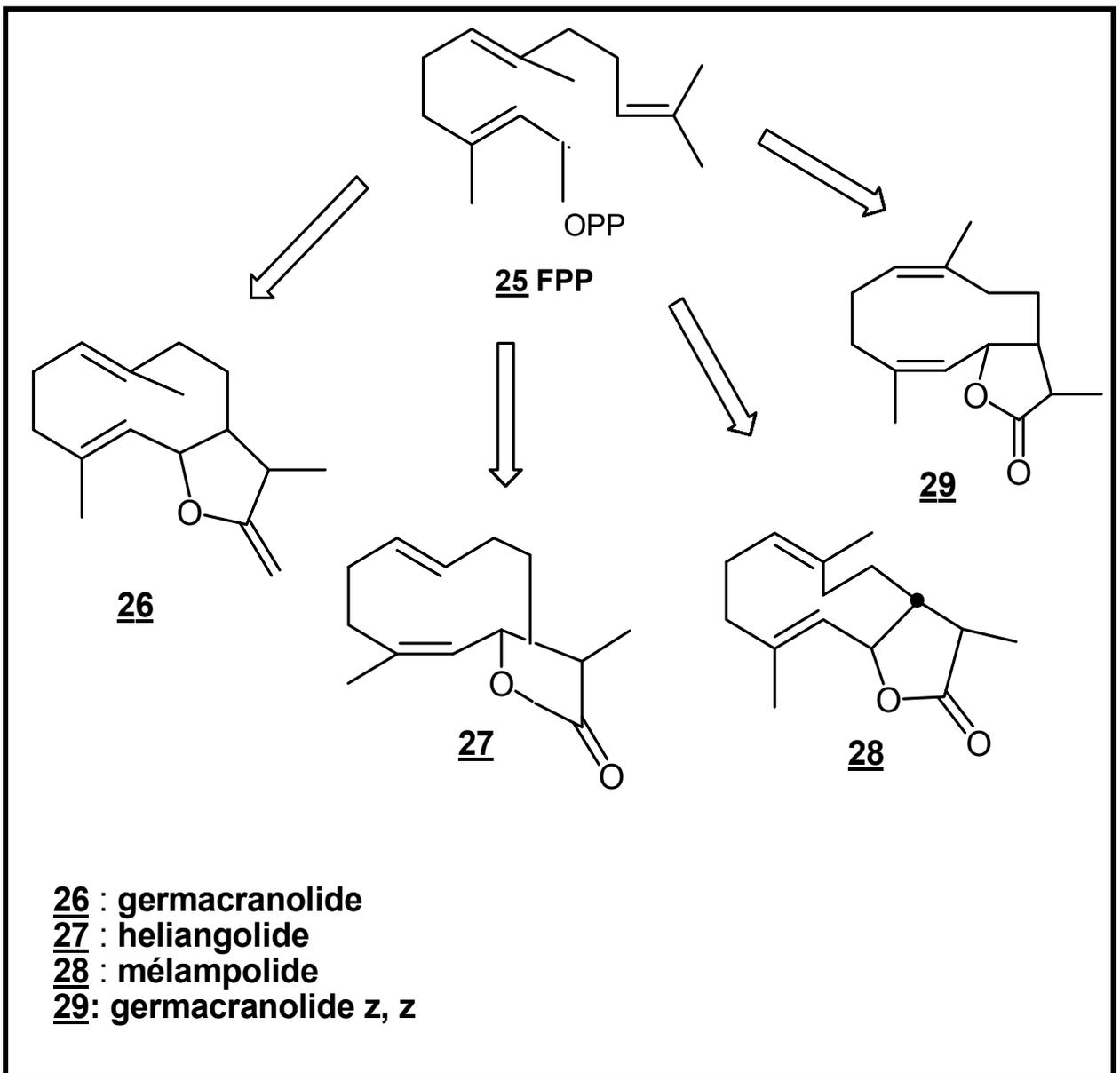


Figure 11 : Les quatre isomères formés à partir du FPP

Après cyclisation du cation cyclodécadiénylique et formation de la fonction γ -lactone donnant les germacranolides, Il est admis que les principaux squelettes sesquiterpéniques proviennent de divers réarrangements de ces derniers [33]. La figure 12 résume quelques uns de ces squelettes.

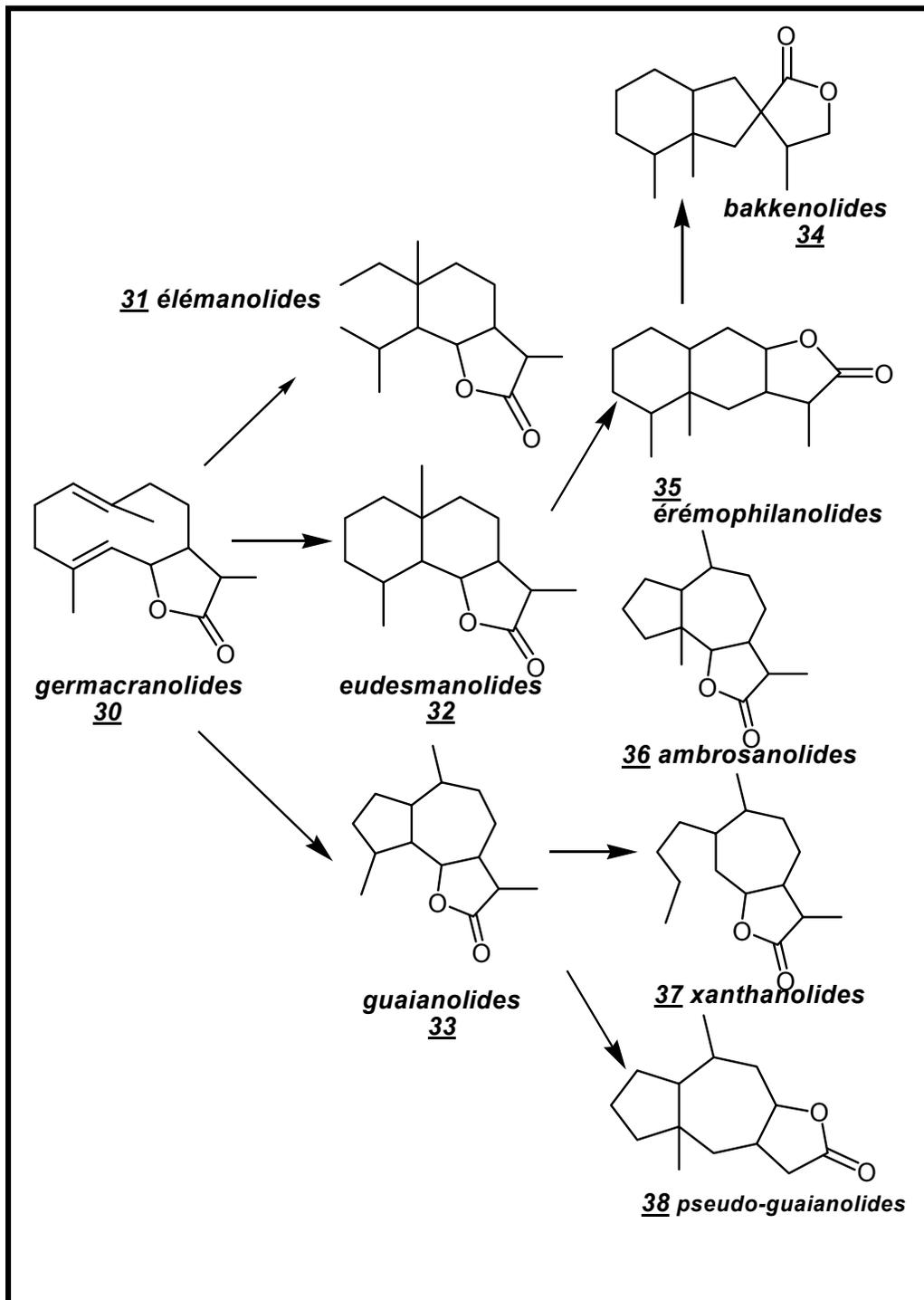


Figure 12 : Quelques réarrangements pour arriver aux autres squelettes sesquiterpéniques

II-2-6-2- Les méthodes de séparation et d'analyse des lactones sesquiterpéniques

II-2-6-2-1- Les Méthode de séparation :

Les travaux de la littérature montrent que plus de 90% des lactones sesquiterpéniques isolées et déterminées l'ont été à partir d'espèces de la famille des composées. Cependant, bien que certaines plantes soient de grandes accumulatrices de ces métabolites, le passage par des techniques de séparations chromatographiques différentes est obligatoire pour les atteindre.

Chercher des lactones sesquiterpéniques et faire leur séparation commence d'abord par l'extraction d'une quantité importante de plante macérée dans du méthanol ou de l'éthanol (solvant polaire) en présence ou non d'eau. Après filtration et concentration, l'extrait obtenu additionné d'eau distillée subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante menant ainsi à une séparation partielle en fonction de la polarité des constituants. En général, ce travail débute par de l'hexane ou de l'éther de pétrole pour récupérer les cires et les hydrocarbures suivi par au moins trois extractions au chloroforme pour avoir les lactones sesquiterpéniques moyennement polaires. Ces deux étapes sont suivies par une extraction à l'acétate d'éthyle dont l'extrait pourrait contenir des lactones sesquiterpéniques trop fonctionnalisées et enfin par des affrontements au *n*-butanol pour rechercher les produits beaucoup plus polaires tels les hétérosides souvent de type flavonoïde.

Les phases organiques ainsi obtenues sont séchées, concentrées et soumises à la batterie chromatographique pour la séparation. Les techniques usuelles utilisées pour la séparation des lactones sesquiterpéniques sont en général la chromatographie sur colonne et la chromatographie sur couche mince.

a)- La chromatographie sur colonne :

Les lactones sesquiterpéniques ont des polarités similaires. En effet, leur séparation en produits purs est souvent complexe et consomme énormément de temps et de solvants. L'étape initiale pour leur séparation est la chromatographie sur colonne utilisant le gel de silice comme phase stationnaire éluée par des systèmes de solvants en mode gradient ou en mode isocratique. Cette étape doit être précédée par une analyse par chromatographie sur couches minces pour rechercher l'éluant donnant la meilleure séparation. Le tableau 2 rapporte quelques systèmes de solvants utilisés pour séparer les lactones sesquiterpéniques sur colonne.

Systèmes de solvant	Proportions
CHCl ₃ -acétone	9 :1 ; 7 :1 ; 5 :1 ; 3 :1, 3 :2 ; 1 :1 ; 2 :3 ; 1 :3
Hexane-AcOEt	9 :1 ; 4 :1 ; 2 :1 ; 1 :1 ; 2 :3 ; 1 :3
Hexane-CHCl ₃ - AcOEt	1 :1 : 1 ; 1 :1 :2 ; 2 :2 :1
CHCl ₃ -MeOH	99.5 :0.5 ; 99 :1 ; 98 :2 ; 95 :5 ; 50 :1 ; 10 :1
CHCl ₃ -AcOEt	1 :1
Hexane-Et ₂ O	1 :3
CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO	1 :1
CH ₂ Cl ₂ -isPrOH	99 :1 ; 98 :2 ; 97 :3 ; 19 :1 ; 9 :1 ; 3 :1
Et ₂ O-Toluène-CH ₂ Cl ₂	1 :1 :1

Tableau 2 : Systèmes de solvants utilisés pour séparer les lactones sesquiterpéniques sur colonne

b)- Chromatographie sur couche mince :

Découverte par le botaniste russe **Michel Tswett** en 1906, elle reste jusqu'en 1931 presque ignorée du monde scientifique.

Cette méthode utilisée de manière analytique donne une idée sur la composition de l'extrait à étudier. De manière préparative, elle permet des séparations correctes suivies de purifications. Dans notre cas pour les lactones sesquiterpéniques le support

fréquemment utilisé reste le gel de silice 60 avec indicateur fluorescent. La révélation des plaques préparatives se fait sous lumière UV à 254 nm.

Les plaques analytiques, peuvent être révélées sous lumière UV à 254 nm ou par pulvérisation de l'acide sulfurique suivie de chauffage à 100 °C pendant 3 minutes.

Cette dernière technique de révélation peut donner des informations sur la nature et la position de certains substituants sur le squelette sesquiterpénique de type guaianolide de la lactone en question en fonction de la couleur que prennent les spots après chauffage. Par exemple, une couleur verte indique la présence d'un groupement chlorométhylène en C-4 et un groupement hydroxyle en C-3 [43].

II-2-6-2-2- Les Méthodes d'analyse :

Le développement des méthodes d'analyse de nos jours a facilité l'investigation structurale des molécules complexes, notamment celles des lactones sesquiterpéniques.

a)-La spectroscopie d'absorption infrarouge (IR) montre la présence de la fonction γ - lactone α , β -saturée ou α , β - insaturée par l'existence de bandes caractéristiques à 1780 ou 1755 cm^{-1} respectivement. Les bandes à 1740, 1735 et 1720 cm^{-1} respectivement confirment la présence d'un groupement acétate [44,45], esters saturés et esters insaturés. Cette étape est définie comme étape initiale de l'identification des lactones sesquiterpéniques.

b)- La spectrométrie de masse avec ses divers modes d'ionisation permet en plus de la visualisation d'un pic pseudo moléculaire (ionisation douce) permettant d'arriver à la masse moléculaire [46], la détermination de la nature des substituants sur le squelette sesquiterpénique.

c)- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est la technique la plus performante dans la recherche structurale des lactones sesquiterpéniques. En effet, les expériences multiimpulsionnelles et bidimensionnelles homo et hétéronucléaires permettent non seulement d'arriver à la structure mais peuvent donner d'excellentes informations sur la stéréochimie des centre asymétriques.

d)- La diffraction des rayons X est également très utilisée. Elle donne toutes les informations nécessaires à l'établissement de la structure y compris la stéréochimie des centres chiraux mais exige une bonne cristallisation de l'échantillon.

II-2-6-3-Activités biologiques des lactones sesquiterpéniques :

Les lactones sesquiterpéniques, molécules naturelles également appelées substances amères sont très intéressantes dans le domaine biologique et pharmacologique. Ces substances présentent des propriétés cytotoxique ou antitumorale [47-51], anti-inflammatoire [52-54], antimigraineuse [55], antioxydante [56], antifongique [57-59], cytoprotectrice gastrique [60].

Le tableau 3 présente les activités biologiques relatives à quelques lactones sesquiterpéniques :

<i>Lactones Sesquiterpéniques</i>	<i>Activités biologiques</i>	<i>Réf</i>
2 α -hydroxyalantolactone	Antileucémique	[61]
Eupaserrine, deacetylepupaserrine	Antileucémique	[62]
Salograviolide	Antifongique	[26]
Cumambrine A	Antimicrobienne	[63]
Onopordopicrine	Cytotoxique, antifongique, antibactérienne	[64]
Centratherine	Anti-inflammatoire, antimicrobienne, tripanocidale	[65]
Grosheimine	Cytostatique sur cellules KB	[66]
Cnicine	Cytotoxique	[67]
Parthenine	Genotoxicité	[68]

Tableau 3 : Les activités biologiques relatives à quelques lactones sesquiterpéniques

L'activité des lactones sesquiterpéniques est liée à la présence de groupement α -méthylène- γ -lactone [69], cette fonction est responsable des activités antibactériennes, cytotoxique et anti-inflammatoire.

Les germacranolides par une addition de Michaël donnent des composés S-alkylés, ceux-ci s'additionnent sur les fonctions glutathion, thiol et amine (nucléophiles biologiques). Cette interaction va à l'encontre de diverses enzymes et provoque leur alkylation irréversible. On retrouve ces activités dans des anti-inflammatoires de synthèse.

Il y a aussi inhibition de messagers intracellulaires. Ceux-ci ordinairement se dissocient lors de l'activation par un radical libre et un des fragments est transporté jusqu'au noyau où il réagit avec l'ADN pour engendrer un stress inflammatoire. Cette inhibition explique à nouveau l'activité anti-inflammatoire.

L'activité anti-ulcère est aussi expliquée par l'addition de Michaël : il y a interaction avec des enzymes de la muqueuse gastrique. Pour terminer on explique l'activité antibactérienne par un blocage cette fois-ci réversible de diverses enzymes au niveau de leurs fonctions thiols ou amines [33].

Malgré l'importance des lactones sesquiterpéniques ces substances peuvent aussi être allergisante et neurotoxique, car des allergies peuvent apparaître lors d'un contact direct ou indirect avec la plante. Des études ont montré que leur présence dans des plantes est responsable d'empoisonnement de mammifères. Le tableau 4 renferme quelques données sur les plantes et les lactones sesquiterpéniques présentes dans celles-ci avec la liste des animaux en risque d'empoisonnement en cas de consommation.

Plantes	Lactones sesquiterpéniques	Animaux affectés
<i>Centaurea solstitialis</i>	Cynaropicrine	Chevaux
<i>Lactuca virosa</i>	lactucine	Bétail
<i>Helium autumnale</i>	Helenaline Mexicanine-E Tenuline	Moutons, Bétail
<i>Baccharis cardifolia</i>	Baccharis oil	Mouton, Bétail
<i>Geigeria sp</i>	Geigerine, Vermeerine	Moutons

Tableau 4 : Les différents animaux en risques d'empoisonnement

II-2-6-4-Quelques lactone sesquiterpéniques isolées des centaureés durant ces dernières années dans notre laboratoire

Le tableau 5 contient quelques exemples de lactones sesquiterpéniques isolées dans notre laboratoire, montre une fois de plus la richesse du genre *Centaurea* en ce type de composés.

Les Centaurées	Les lactones sesquiterpéniques isolées	Structures	Réf
<i>C. nicaensis</i> ALL	11 β ,13-dihydrocinine	<u>39</u>	[70]
	11 β ,13-dihydrosalonitenolide	<u>40</u>	
	La Mélitensine	<u>41</u>	
	5 α ,6 β ,7 α ,8 β ,11 β -15-hydroxy-8-(1',2' dihydroxy-ethyl)-acryloxy-elema-1,3-dien-6,12-olide	<u>42</u>	
<i>C. lippi</i>	La cnicine	<u>43</u>	[67]
<i>C. accaulis</i> L	β -cyclocostunolide (5 α H, 6 β H, 7 α H, 10 β CH ₃ -eudesma-4(15), 11(13)-dien costunolide	<u>44</u>	[71]
	costunolide (6 β H, 7 α H-germacra-1(10),4(5)-dien-6,12-olide)	<u>45</u>	
	14-chloro-10 β -hydroxy-10(14)	<u>46</u>	
	dihydrozalzanin D(3 β -acetoxy-14-chloro-10 β -hydroxy-1 α H, 5 α H,6 β H,7 α H-guaia-4(15),11(13)-dien-6,12-olide		
<i>C. musimomum</i>	13,11 α -dihydroxy-3oxo-1 α H, 4 β H, 5 α H, 6 β H, 7 α H-guaia-10(14)-en-6,12-olide	<u>47</u>	[72]
	13-acetoxy-11 α -hydroxy-3-oxo-1 α H, 4 β H, 5 α H, 6 β H, 7 α H-guaia-10(14)-en-6,12-olide	<u>48</u>	

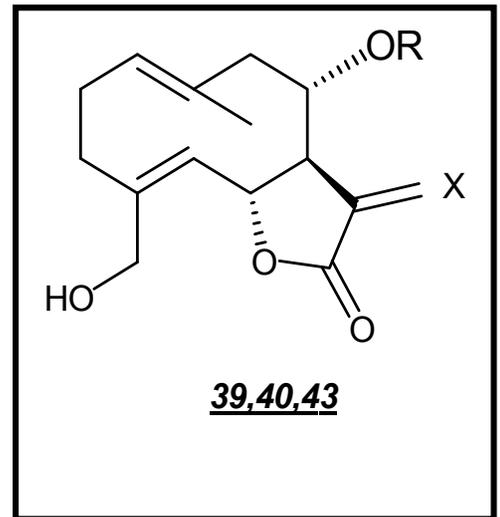
Tableau 5 : Quelques lactones sesquiterpéniques isolées dans notre laboratoire

Les structures des lactones sesquiterpéniques de 39 à 48 sont les suivantes :

39 R= (1',2'-OH-Et) Acr ; X= β -H, α -Me

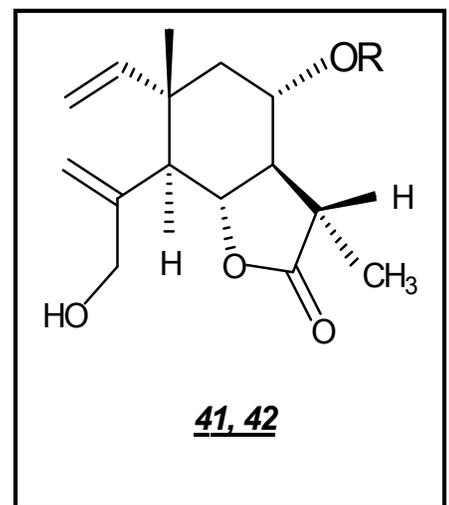
40 R= H ; X= β -H, α -Me

43 R= (1',2'-OH-Et) Acr ; X= CH₂

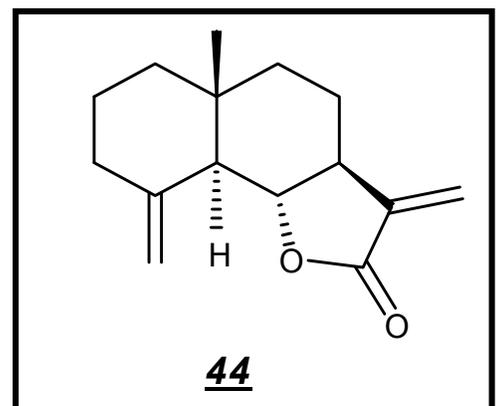


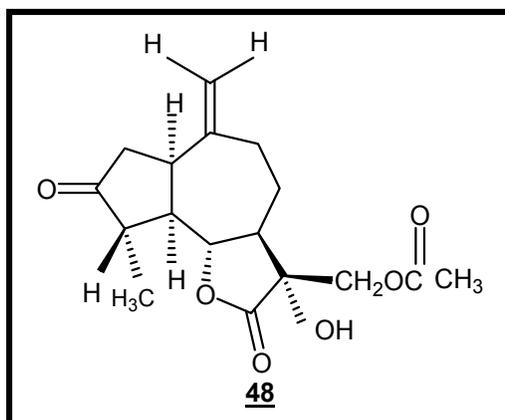
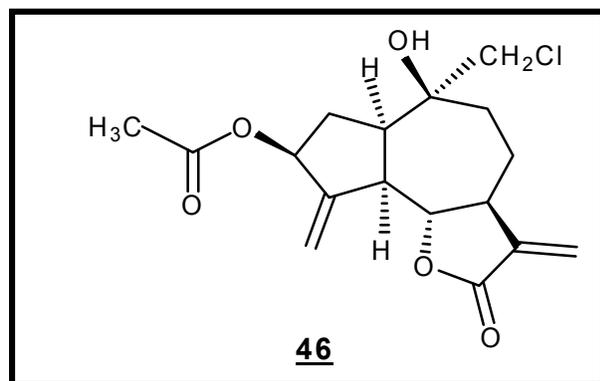
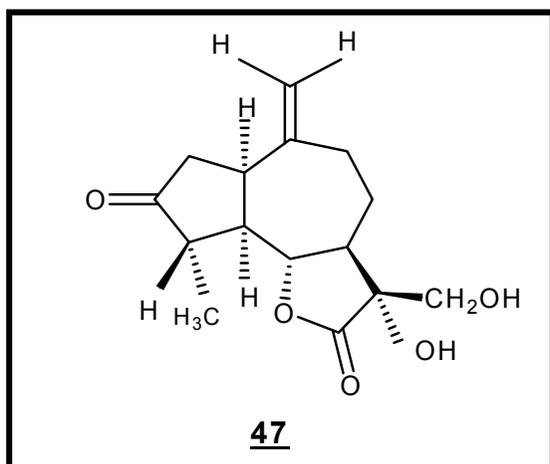
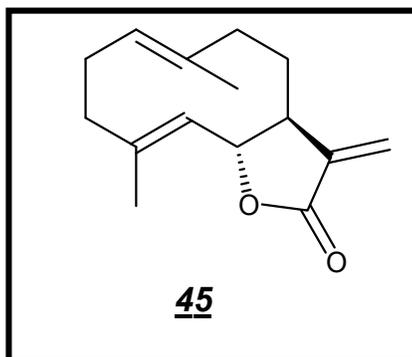
41 R=H

42 R= (1',2'-OH-Et) Acr



44





II-3- LES COMPOSES PHENOLIQUES :

Les coumarines et les flavonoïdes sont parmi les composés phénoliques les plus connus et les plus actifs biologiquement.

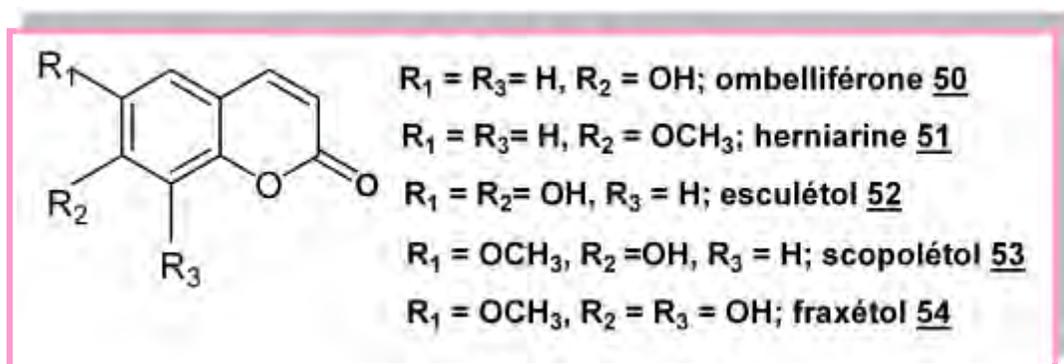
II-3-1- Les coumarines :

Les coumarines tirent leur nom de « **coumarou** », nom vernaculaire de la fève Tonka, *coumarouna odorata* (légumineuses) d'où la coumarine fut isolée, en 1820, elles sont largement distribuées dans le règne végétal [73].

En dehors de quelques rares cas, dont la coumarine elle-même 49, toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone 50, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées.



Quelques exemples des coumarines de ce type sont reportés ci-après :



Propriétés Pharmacologiques et emplois :

La coumarine connue pour ses propriétés anti-oedémateuses, a fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés car elle est rapidement métabolisée au niveau du foie en 7-hydroxycoumarine [74]. Il n'est pas exclu que les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques attribués au frêne soient dues aux coumarines [75,76].

L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques [77], antivirale [78], antimicrobienne [79].

Les coumarines utilisées dans l'industrie comme fixatif, des parfums (3,4-dihydrocoumarine) est l'un des composés des huiles essentielles de la lavande [80].

II-3-2- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés naturels de la famille des polyphénols présents en quantités importantes dans une grande variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'homme le tableau 6 indique la présence de différents types de flavonoïdes dans les fruits et les légumes.

Les flavonoïdes	Légumes et fruits
Flavonols (quercétine)	Brocoli, pomme
Flavonones	Citron
Catéchines	Thé vert et noir
Anthocyanines	Fruits rouges, raisin

Tableau 6 : Quelques flavonoïdes présents dans les légumes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Même si le terme flavonoïde signifie jaune en latin [81], les couleurs des flavonoïdes varient et dans certains cas quand la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est perçue que par les insectes [33].

II-3-2-1 Structure chimique et classification des flavonoïdes :

Comme la figure 13 le montre les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3

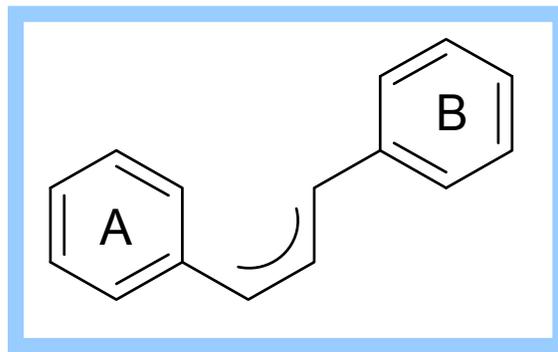


Figure 13 : Squelette de base des flavonoïdes

La chaîne en C3 formant un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A [82]. La structure chimique des flavonoïdes reportée dans la figure 14 contient un squelette C15 constitué par un noyau chromane et un noyau aromatique placé en position 2, 3 ou 4.

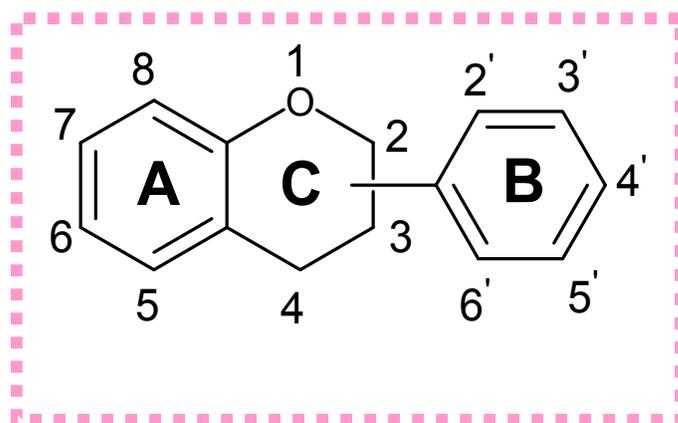


Figure 14 : La structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs familles de composés comme la figure 15 le montre :

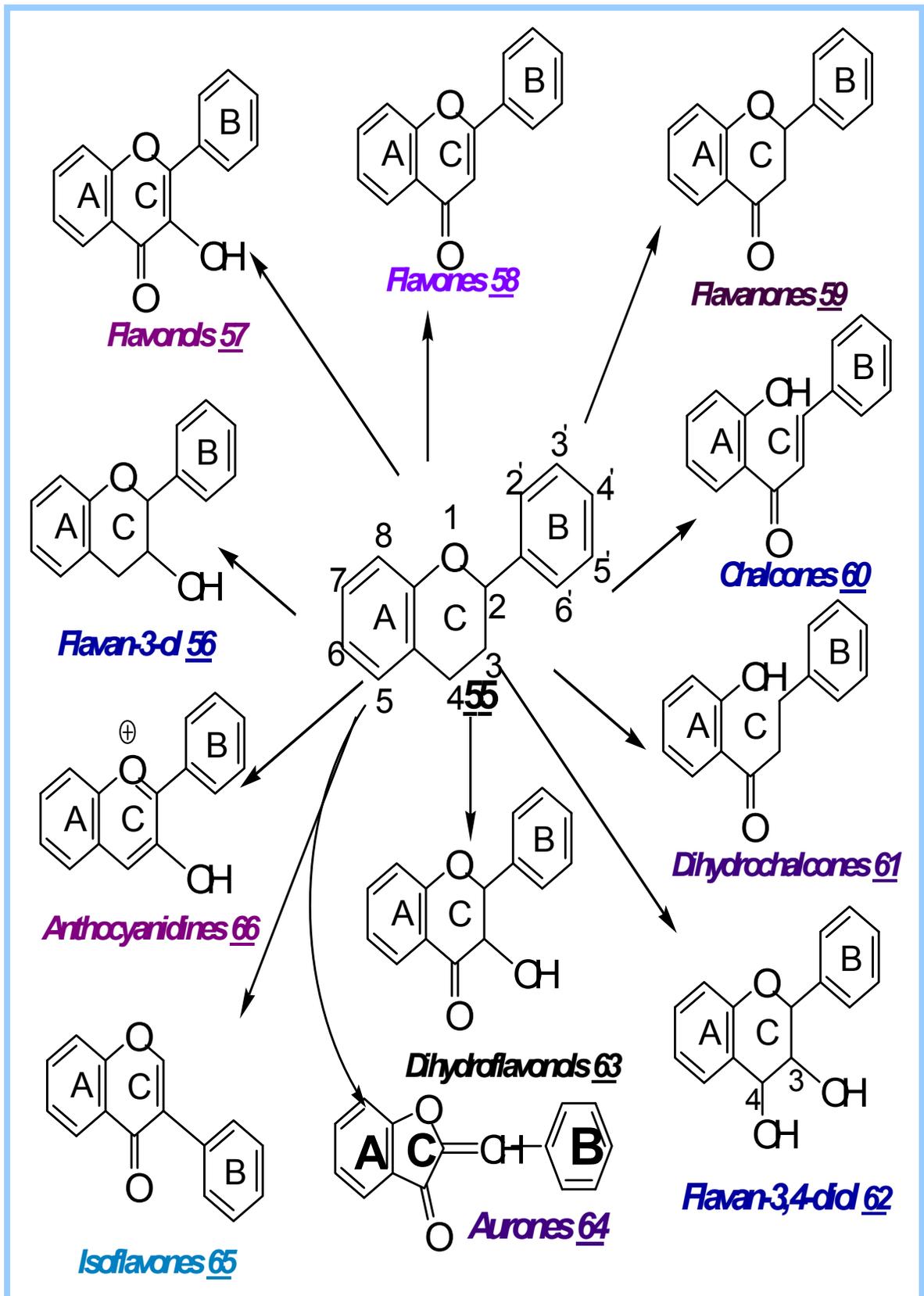


Figure 15 : Les différents familles des flavonoïdes

II-3-2-2-Origine biosynthétique des flavonoïdes :

L'origine des flavonoïdes est inscrite en filigrane dans leur structure, elle apparaît bien dans celle des chalcones : condensation d'un « triacétate » (cycle A) et d'un acide cinnamique (cycle B), la condensation engendrant le cycle pyranique central [33].

Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation des précurseurs radiomarqués (**Grisebach**) [64] et par des études au niveau enzymatique (**Bohm**) [84].

La biosynthèse des flavonoïdes se fait en plusieurs étapes, l'étape clé est celle de la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme et d'un acide hydrocinnamique. Ces étapes peuvent être résumées comme suit :

a)-La biosynthèse de la chalcone à partir de l'acide shikimique :

Davis a confirmé en 1955 [85] le rôle de l'acide shikimique dans la formation du noyau (B) et la chaîne carbonique (C₃). La figure 16 explique la biosynthèse de la chalcone.

Remarques:

1)-Les enzymes utilisées au cours de la formation de l'acide p-Coumarique :

- Aldolase, 3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase.
- Déshydroquinone synthase.
- Préphénate déshydrogénase.
- Tyrosine ammonia-lyase.

2)-Dans la figure 16, 1: NADPH, H⁺ et 2 : NADPH⁺

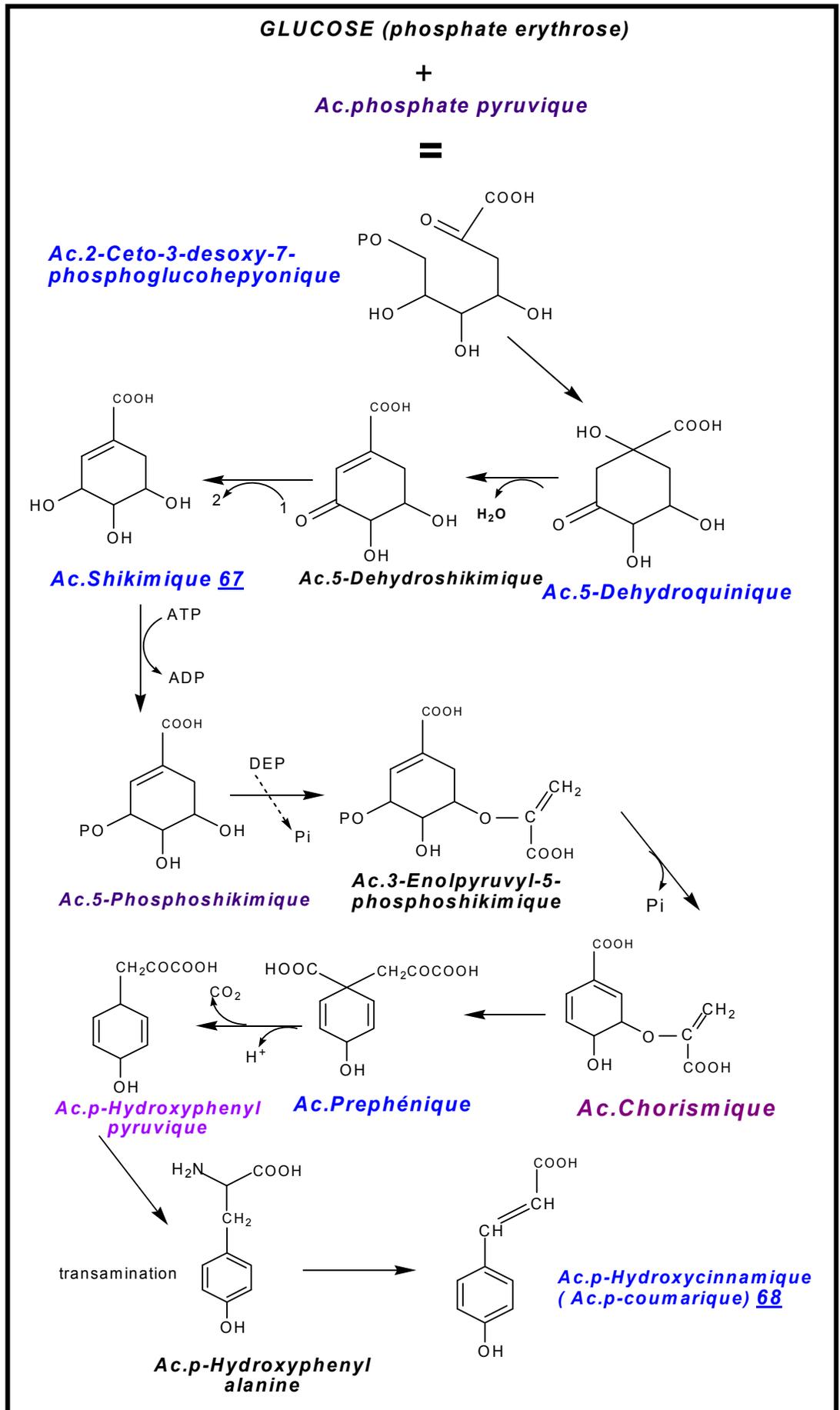


Figure 16 : La biosynthèse de la chalcone à partir de l'acide shikimique

d)-la biosynthèse des squelettes falavoniques à partir de la chalcone :

D'après Grisébach [86].

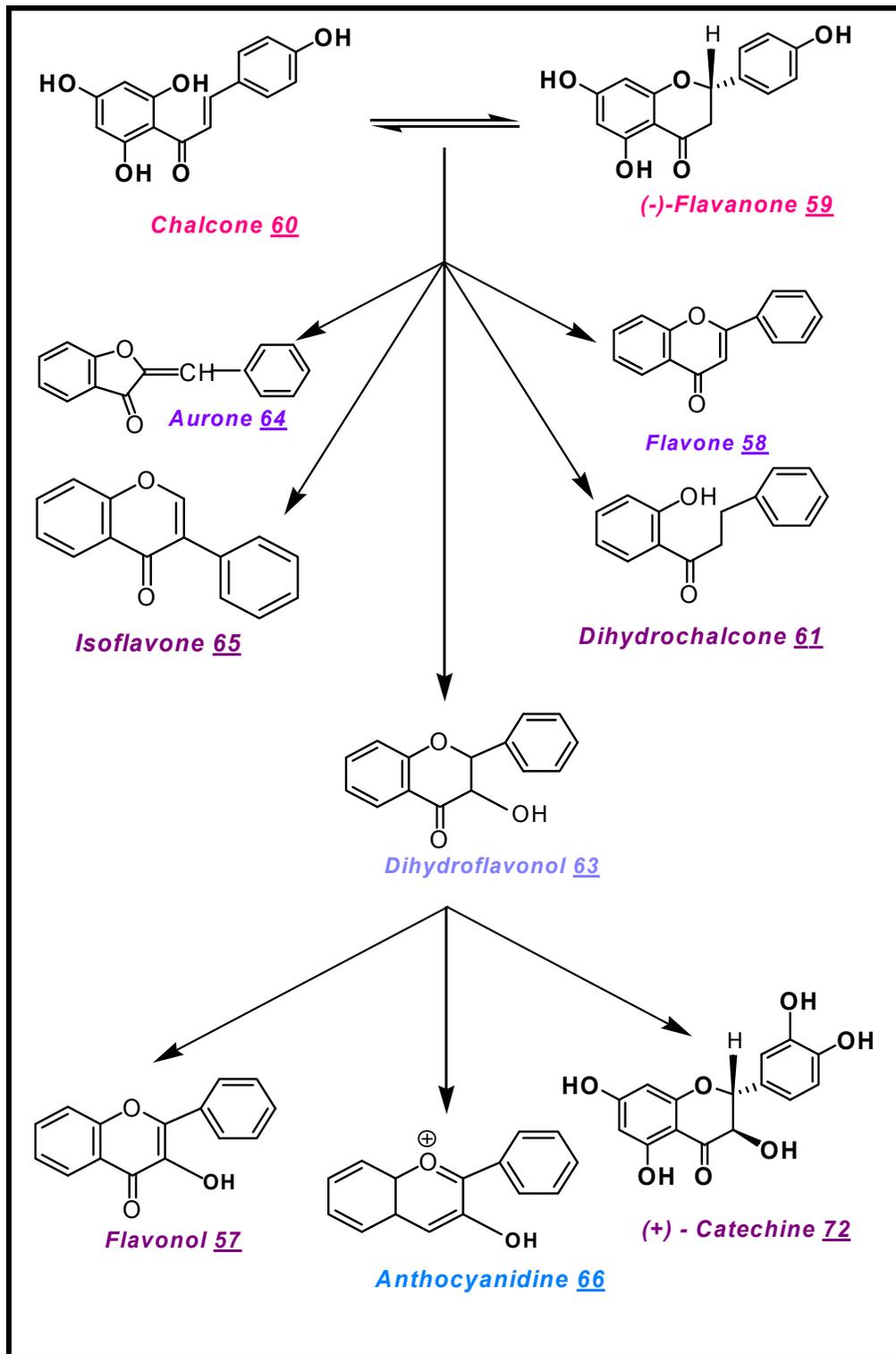


Figure 17 : La biosynthèse des squelettes falavoniques à partir de la chalcone

II-3-2-3 Les Méthodes de séparation et d'analyse des flavonoïdes :

II-3-2-3-1-Les méthodes de séparation :

Comme toutes les substances naturelles la séparation des flavonoïdes se fait par les méthodes de séparation chromatographiques.

a)- la chromatographie sur colonne :

C'est une technique qui conduit à une première séparation et Les supports connus et le plus utilisé est le polyamide SC₆ « polycaprolactame » ce dernier est caractérisé par sa fonction *carbonyle- amide*, cette fonction permet de donner naissance à des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles des produits phénoliques [87,88], ce qui conduit à la séparation des flavonoïdes. Les systèmes d'éluants dans se cas :

1- Toluène, Méthanol

2- Eau, Méthanol

b)- la chromatographie sur papier :

Cette méthode est très ancienne mais intéressante car elle permet la séparation d'une grande quantité de produit et détache le maximum d'acides phénoliques [89]. Le support utilisé ici est le papier Whattman et les systèmes de solvants contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer la séparation et éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules [90].

c)- la chromatographie sur couche mince :

La séparation se fait sur des plaques en verre en utilisant soit du polyamide ou de la silice et dans certains cas de la cellulose comme phase stationnaire. La phase mobile est choisie suivant la phase stationnaire et la nature de l'adsorption des produits à séparer. Cette méthodes nous permet entre autre d'avoir une bonne séparation pour les mélanges d'isomères, il suffit de bien choisir le système d'élution [91].

II-3-2-3-2- Les méthodes d'analyse :

a)- la coloration sous UV :

L'examen des flavonoïdes sous lumière UV 365 nm est très utilisé pour leur l'identification. Tous les flavonoïdes apparaissent sous UV sous forme de spots colorés, permettant d'avoir des renseignements pour déterminer leur structure [92-94]. Le tableau 7 résume la relation entre la fluorescence et la nature du produit.

<i>La coloration</i>	<i>Type de flavonoïdes</i>
Jaune pâle	Dihydroxyflavonols sans OH libre en 5
Jaune fluorescent	Aurones avec OH libre en 4' et quelques chalcones avec OH en 2 ou en 4
Jaune vert brillant	Aurones sans OH libre en 4' Flavanones sans OH libre en 5
Jaune orange	Flavonols avec ou sans OH libre en 5.
Bleu-claire	Flavones et flavanones 5-O-substituées. Flavonols avec OR en 3 et sans OH libre en 5.
Violet	5,4'-Dihydroxy flavone ou 3-O-substitué flavonols avec 5-OH, 4'-OH. Quelque flavanones avec OH libre en 5
Invisible	Isoflavones sans OH libre en 5

Tableau 7 : La relation entre la fluorescence et la nature du produit flavonoïque

b)- Relation R_f –Structure :

Le R_f est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme étant le rapport entre la distance d parcourue par la substance et la distance D parcourue par le front du solvant.

$$R_f = d/D$$

Le R_f (retardation factor) est une caractéristique d'un composé dans des conditions chromatographiques données (éluant, température, phase stationnaire).

Le tableau 8 montre la relation entre le R_f et la structure des flavonoïdes.

Structure flavonique	R_f
Augmentation des OH	R_f diminue dans les systèmes organiques
Glycosylation	R_f augmente dans les systèmes aqueux R_f diminue dans les systèmes organiques
Méthylation des OH	R_f augmente dans les systèmes organiques R_f diminue dans les systèmes aqueux
Acylation	R_f augmente dans les systèmes organiques R_f diminue dans les systèmes aqueux

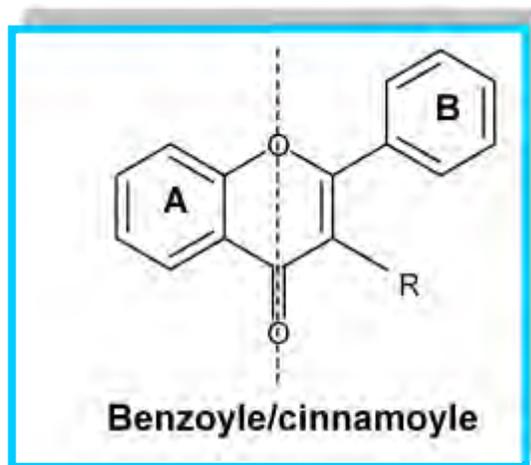
Tableau 8 : relation R_f -structure

c)- La spectrométrie UV-visible :

C'est une méthode très importante pour l'analyse des flavonoïdes, pour cela l'enregistrement d'un spectre d'absorption ultraviolette dans le méthanol est indispensable. L'addition de réactifs aux échantillons donne des informations importantes, la nature et la position des groupements de substitution [95-97].

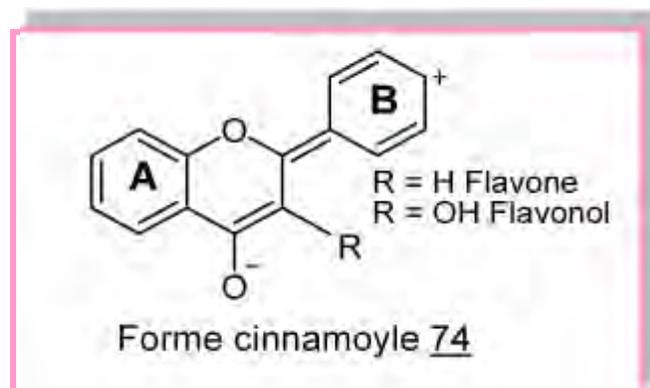
c)-1-le spectre UV visible dans le méthanol :

Le spectre d'absorption UV-Vis des composés phénoliques (flavones et flavonols), dans le méthanol est caractérisé par deux bandes :



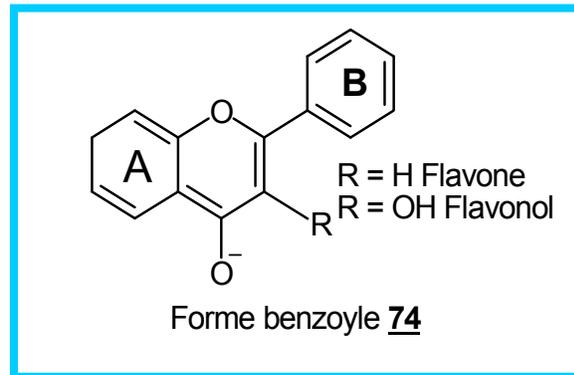
❖ La bande I :

Située entre 304-385 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau B conjugué avec le groupe énone donnant la forme cinnamoyle 74 [98].



❖ **La bande II :**

Située entre 250-280 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau A conjugué avec la fonction cétone donnant la **forme benzoyle 74** [99].



La nature des flavonoïdes peut être déterminée selon les valeurs de la bande I et la bande II le tableau 9 montre la relation entre le squelette flavonique et la position des bandes I et II.

Type de flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Isoflavones	310-330	245-275
Flavanones et dihydroflavanols	300-330	275-295
Chalcones	340-390	230-270 faible intensité
Aurones	380-430	230-270 faible intensité
Anthocyanidines et anthocyanines	465-560	270-280

Tableau 9 : Relation entre les squelettes des flavonoïdes et la position des bande I et II [92]

L'addition de divers réactifs au flavonoïde permet de localiser les substituants sur le squelette flavonique où en général la présence d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'ondes). Pour une méthylation ou glycosylation des positions 3, 5 et 4' hydroxylées, un déplacement hypsochrome est noté par la bande I.

c)-2- le spectre UV en présence de réactifs :

Les réactifs souvent utilisés sont : NaOH, NaOAc, NaOAc + H₃BO₃, AlCl₃ et AlCl₃+HCl. Certains d'entre eux forment des complexes tels que AlCl₃ et H₃BO₃.

c)-2-1-l'addition de AlCl₃ et AlCl₃ + HCl :

L'addition de AlCl₃ à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et la fonction carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et la fonction carbonyle [100]. Ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I mais l'addition de HCl provoque la disparition des complexes instables et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle). Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence de AlCl₃ et bien évidemment un effet bathochrome moins important par rapport au spectre dans le méthanol pris comme référence.

c)-2-2- l'addition de NaOAc + H₃BO₃ :

Le H₃BO₃ est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence d'hydroxyle ortho sur le cycle B ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) à cause des complexes formés, l'effet qui se manifeste est un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre dans le méthanol [97].

c)-2-3-l'addition de NaOH et de NaOAc :

❖ NaOH:

L'addition du NaOH indique le nombre et la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement les OH des positions 7, 4', 3 par effet bathochromique de la bande I.

❖ NaOAc:

Ce réactif sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des positions 3,7 et 4' [97]. Le tableau 9 donne les informations obtenues des spectres en présence de réactifs [92, 96, 98].

Réactifs	Déplacement en nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	Flavones
	352-385	250-280	Flavonols (3-OH)
	350-380	250-280	Flavonols (3-OR)
NaOH	+44 à 65 1)- avec stabilité ou augmentation d'intensité 2)-avec diminution d'intensité une nouvelle bande entre 320-335		4'-OH 3-OH et 4'-OR 7-OH
AlCl ₃ /MeOH	+ 20 à 45 + 60		5- OH 3- OH
AlCl ₃ +HCl/ AlCl ₃	-20 à -40 -20 à -25		Ortho di OH (noyau B) Ortho di OH (noyau A) +ortho di OH (noyau B)
AlCl ₃ +HCl/MeOH	+ 17 à 20 + 35 à 55 + 50 à 60		5- OH (avec 6- oxygénation) 5-OH flavone et 3-OMe flavone 3- OH avec ou sans 5- OH
NaOAc /MeOH	+ 5 à 20 Déplacement très faible Diminution d'intensité Avec le temps Le spectre se décompose Avec le temps		7- OH 7- OR 6, 7 ; 7, 8 ou 3', 4' di OH 5, 6, 7 ; 5, 7, 8 ou 3, 3', 4' - tri OH
NaOAc + H ₃ BO ₃	+ 12 à 36 + 5 à 10		3', 4' di OH 6, 7, ou 7, 8 di OH

Tableau 10 : Les informations obtenues en présence de réactifs

d)- Spectrométrie de masse :

Elle permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituant hydroxyles ou méthoxyles [101]. Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent les renseignements sur la répartition des substitutants entre les noyaux A et B. Actuellement cette technique connaît un véritable succès avec le développement de divers modes d'ionisation permettant l'analyse de structure glycosylées tels que la FAB, l'électron- spray. Cet appareillage est souvent utilisé comme détecteur en HPLC.

e)- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Très précise et très efficace, elle est couramment utilisée et permet entre autre :

- ❖ La localisation des protons de la molécule [99].
- ❖ De déterminer le nombre, la nature et la position des sucres [102,103].
- ❖ D'identifier les liaisons C-(et O-) sucres.
- ❖ D'identifier les substituants acylés et leur sites d'acylation.
- ❖ L'identification des substituants oxygénés

Les tableau 11 et 12 contiennent quelques déplacements chimiques et constantes de couplages des protons du noyau A et du noyau B [104].

Protons du noyau A	(H-5)	(H-6)	(H-8)
Nature du flavonoïde	δ , ppm <i>J</i> , Hz	δ , ppm <i>J</i> , Hz	δ , ppm <i>J</i> , Hz
5, 7 - OH		6,0-6,2 d 2,5	6,3-6,5 d 2,5
5-OH, 7OR (R=Gluc.)		6,2-6,4 d 2,5	6,5-6,9 d 2,5
7-OR (R=H, sucre)	8,0 d 9	6,7-7,1 dd (9,0 ; 2,5)	6,7-7,0 d 2,5
5, 6, 7-OR R=H, sucre 5, 7, 8-OR		6,3 s	6,3 s

Tableau 11 : Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A

Protons du noyau B	(H2'-H6')		(H3'-H5')	
	δ , ppm	J, Hz	δ , ppm	J, Hz
Flavone (4'-OR)	7,7-7,9 d	8,5	6,5-7,1 d	8,5
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1 d	8,5	6,5-7,1 d	8,5

Tableau 12 : Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B

II-3-2-4- Activités biologiques des flavonoïdes :

La plupart des flavonoïdes présentent des activités biologiques intéressantes telles que : des activités anti-oxydante et antimicrobienne.

II-3-2-4-1- Activité anti-oxydante :

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent de fortes propriétés **anti-oxydantes**. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure flavonique et l'activité antioxydante [105]. Parmi les agents qui augmentent cette activité le nombre des groupements hydroxyles sur le noyau B, quand le nombre augmente l'activité augmente [106].

II-3-4-2-Activité antimicrobienne :

Il est connu que certains flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne [107], il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes [108,109].

II-3-2-5-Quelques exemples des flavonoïdes isolés des Centaurees dans notre laboratoire :

Les flavonoïdes isolés dans notre laboratoire de recherche, sont en général de type flavone et flavonol. Le tableau 13 rassemble quelques exemples de ces flavonoïdes.

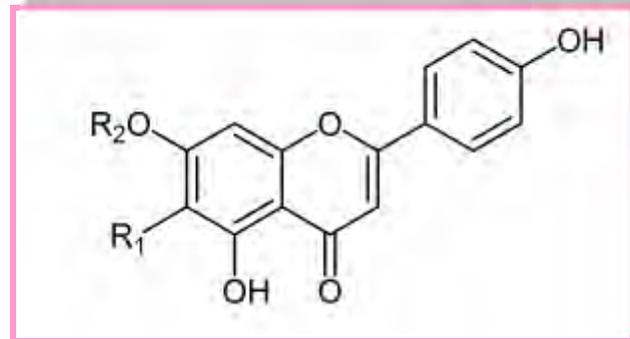
Les Centaurées	Flavonoïdes	Structures	Réf
<i>C. incana</i>	7-methyl glucuronosyl Apigénine	<u>75</u>	[110]
	Hispiduline	<u>76</u>	
	7-glucosyl Hispiduline	<u>79</u>	
	6-methoxy Kaempférol	<u>81</u>	
<i>C. acaulis</i>	4'-methyl Kaempférol	<u>83</u>	[111]
<i>C. calcitrapa</i> L.	Apigénine	<u>77</u>	[112]
	6-methoxy Kaempférol	<u>17</u>	
	7-glucosyl Apigénine	<u>78</u>	
<i>C. lippii</i>	Isovitéxine	<u>80</u>	[67]
	3-rutinosyl Kaempférol	<u>82</u>	

Tableau 13 : Des exemples de flavonoïdes séparés dans notre laboratoire

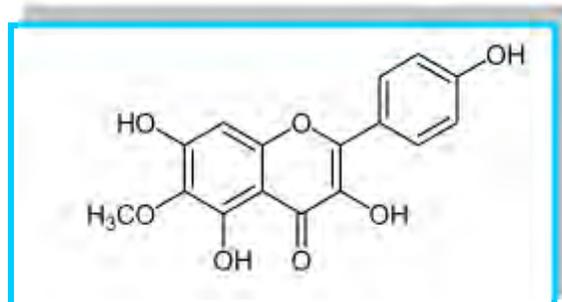
Les structures des flavonoïdes de 75 à 83 sont les suivantes :

■ Structure des flavonoïdes de 75 à 80.

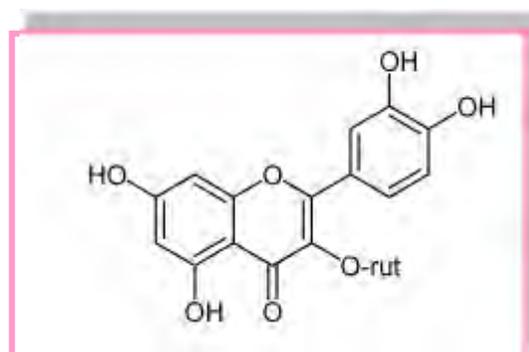
N ^o	R ₁	R ₂
<u>75</u>	H	Meglur
<u>76</u>	OCH ₃	H
<u>77</u>	H	H
<u>78</u>	H	Glc
<u>79</u>	OCH ₃	Glc
<u>80</u>	C-glc	H



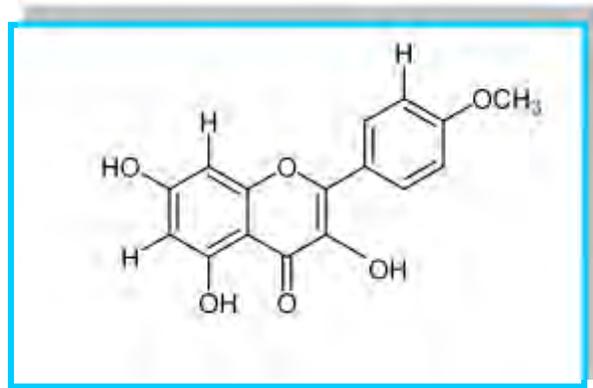
■ La structure 81 est la suivante :



■ La structure 82 est la suivante :

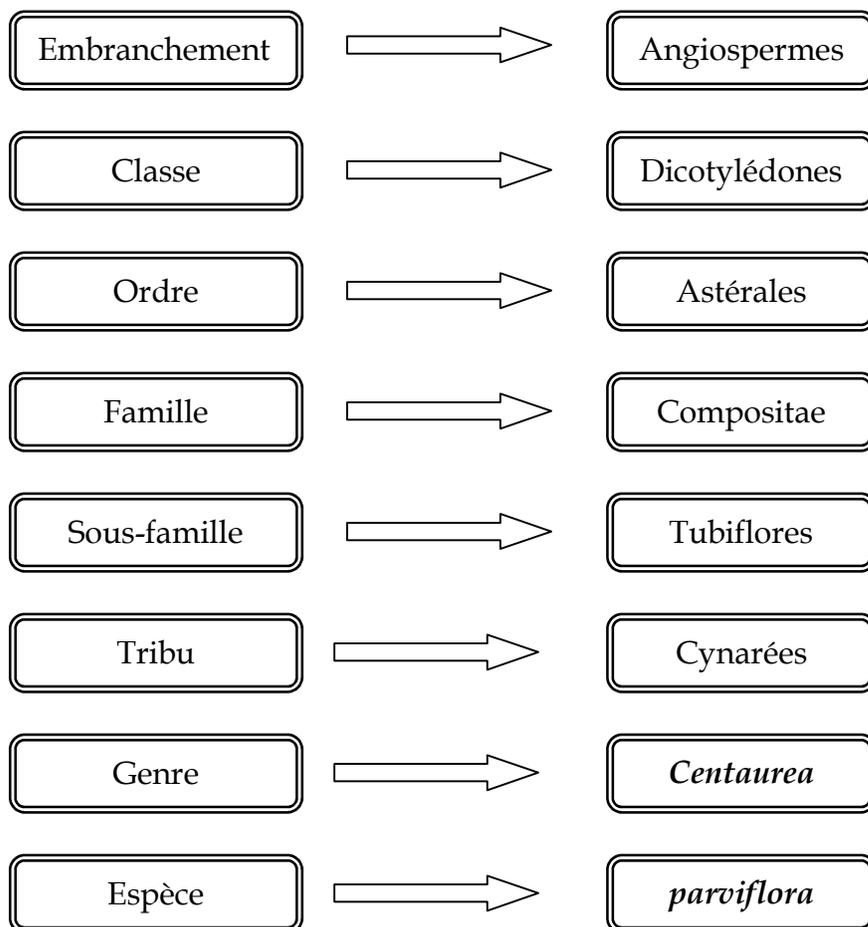


■ La structure 83 est la suivante :



CHAPITRE III

L'étude phytochimique de Centaurea parviflora

III-1-Place dans la systématique :

III-2-Description de l'espèce *parviflora* :

Appendice des bractées sans partie scarieuse blanchâtre ou à partie scarieuse peu marquée; à 8-12 laciniures latérales. Plantes suffrutescentes à la base, de 40-60 cm, très rameuses, formant des buissons serrés, intriqués.

Feuilles supérieures non décurrentes sur la tige. Petits capitules de 5 mm de large sur 15 mm de long, solitaires. Appendices à épine médiane fortement récurvée.

Fleurs supérieures. Akènes pubescents, ventrus, noirs, à 4 stries marquées. Aigrette également le 1/3 de l'akène.

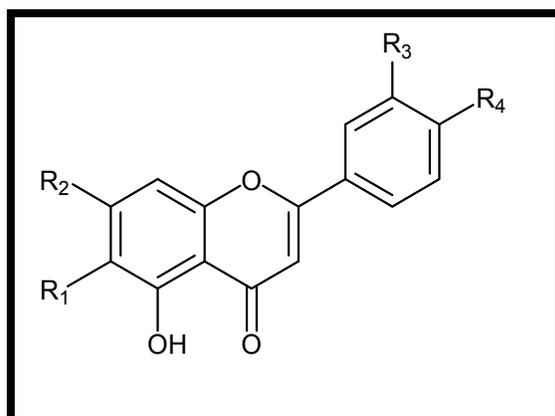
Assez rare : en sol algérois, Oran et Tlemcen, Constantine, Hauts plateaux. Elle existe en Algérie et en Tunisie.



Centaurea parviflora

III-2-3- Les travaux antérieurs :

Les seuls travaux effectués sur *Centaurea parviflora* l'ont été au sein de notre laboratoire. Ces travaux ont mené à l'isolement et la détermination de quatre flavonoïdes de type flavone rassemblés dans le tableau 14 de **84** - **87** et détecté la présence de lactones sesquiterpéniques [113].



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Composés
OMe	OMe	OH	OMe	5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone 84 Eupatorin
OMe	OH	OMe	OMe	5,7-dihydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone 85 Eupatilin
OMe	OMe	OMe	OH	5,4'-dihydroxy-6,7,3'-trimethoxyflavone 86 Cirsilineol
OMe	OH	OMe	OH	5,7,4'-trihydroxy-6,3'-trimethoxyflavone 87 Jaceosidin

Tableau 14 : Les flavonoïdes isolés de *Centaurea parviflora*

III-3- Travaux personnels :

III-3-1-Extraction de *Centaurea parviflora* :

La plante a été récoltée au mois de juin de l'année 2000, de la région d'Oum El Bouaghi, après séchage dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes broyées sont pesées (M = 2397,5g) et mises à macérer pendant 24h dans un mélange (EtOH/H₂O) avec les proportions 70 : 30.

Après filtration, concentration à environ 800 ml, à une température n'excédant pas 35°C, cet extrait contenant toujours de l'éthanol, est additionné d'eau distillée (960 ml). L'élimination de la chlorophylle se fait par précipitation par le tétra acétate de plomb Pb(CH₃COO)₄ sous agitation continue jusqu'à ce que la solution devienne rouge-brune, après quoi le mélange est filtré.

Le filtrat est épuisé trois fois par du chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, séchées avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées à sec à une température n'excédant pas 35°C pour donner l'**extrait chloroforme** de 25 g.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 18 :

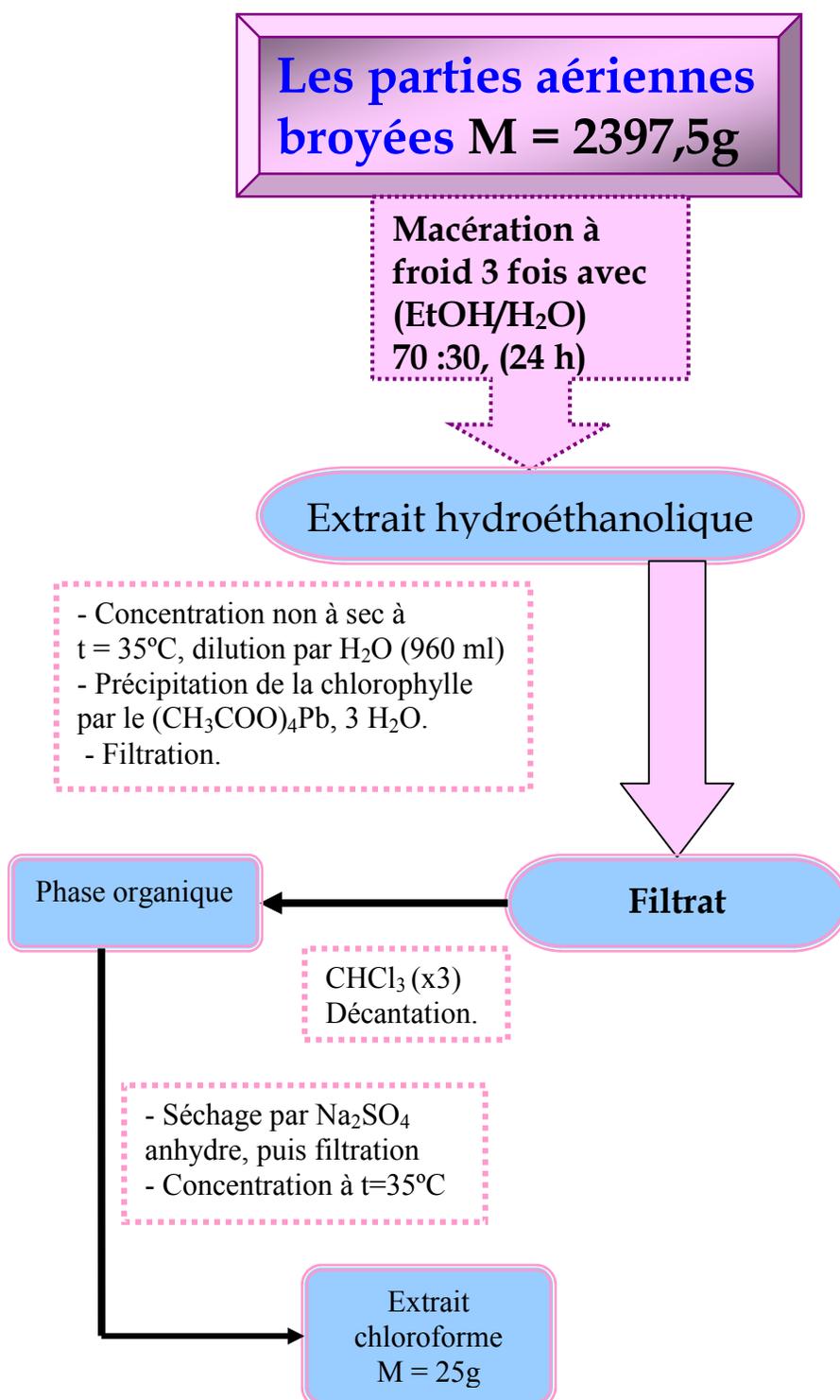
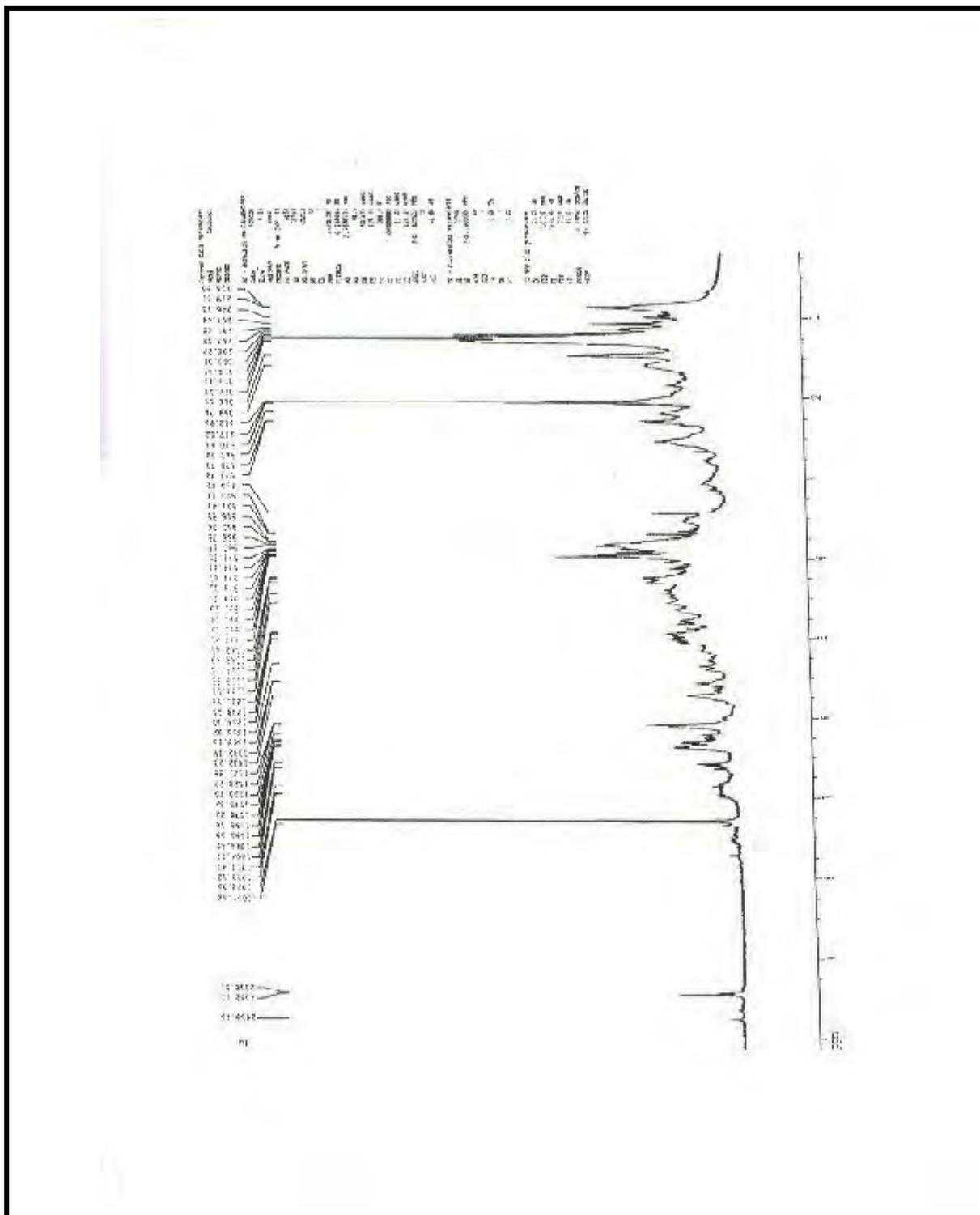


Figure 18 : Protocole d'extraction de *C. parviflora* Desf.

L'investigation de l'extrait chloroforme a débuté par l'enregistrement d'un spectre de RMN de proton (spectre n°1). Ce spectre montre la présence de signaux dans la zone attribuée aux terpenoïdes et également dans celle attribuée aux flavonoïdes.



Spectre n°1 : Spectre de RMN du proton de l'extrait chloroforme

III-3-2- Séparation chromatographique sur colonne:

La séparation sur colonne a débuté par une recherche sur plaques analytiques de gel de silice 60, du meilleur système d'élution. Les tests effectués ont montré que la meilleure séparation est obtenue avec le système (CHCl₃/ (CH₃)₂CO/MeOH) dans les proportions 9/1/1. La plaque CCM test révélée à l'acide sulfurique est représentée dans la figure 19.

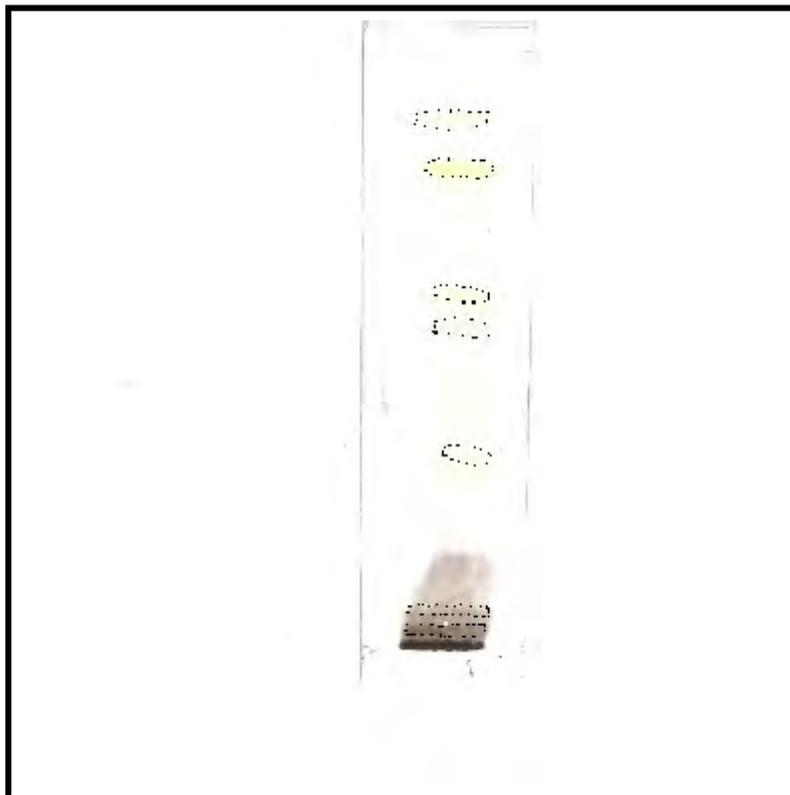


Figure 19 : Plaque CCM éluee avec le système (CHCl₃/ (CH₃)₂CO/MeOH : 9/1/1) puis révélée

Sur la base des résultats de la chromatographie analytique, 12 grammes de l'extrait chloroforme des parties aériennes de *C. parviflora* préalablement dissous dans du chloroforme ont été déposés sur une colonne de gel de silice normale ("63-200" μ m) préparée dans du chloroforme. L'élution a été réalisée avec du chloroforme et un gradient d'acétone avec une incorporation graduelle de méthanol jusqu'aux proportions 15/65/20. Le suivi de la colonne a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice, les plaques ont été visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révéllées avec un révélateur à base d'acide sulfurique puis chauffées à 100°C, pendant trois minutes. Le tableau 15 reporte le résultat du fractionnement de cette colonne.

FRACTIONS	TUBES (25 ml)	ELUANT		
		CHCl ₃ %	Acétone %	MeOH %
f ₁	1 - 36	100	0	0
f ₂	37 - 40			
f ₃	41 - 54			
f ₄	55 - 62			
f ₅	63 - 70	99	1	0
f ₆	71 - 72			
f ₇	73 - 78			
f ₈	79			
f ₉	80 - 81			
f ₁₀	82 - 83			
f ₁₁	84 - 97	98	2	0
f ₁₂	98 - 109			

Tableau 15 : Le fractionnement de la colonne

f ₁₃	110 - 122	96.5	3.5	0
f ₁₄	123 - 136			
f ₁₅	137 - 142			
f ₁₆	143 - 148			
f ₁₇	149 - 163			
f ₁₈	164 - 181			
f ₁₉	182 - 192	95	5	0
f ₂₀	193 - 204	92.5	7.5	0
f ₂₁	205 - 222			
f ₂₂	223 - 247	90	10	0
f ₂₃	248 - 258			
f ₂₄	259 - 267	87	13	0
f ₂₅	268 - 276			
f ₂₆	277 - 292			
f ₂₇	293 - 316	85	15	0
f ₂₈	317 - 327			
f ₂₉	328 - 350	82	18	0
f ₃₀	351 - 358			
f ₃₁	359 - 364	80	20	0
f ₃₂	365 - 376			
f ₃₃	377 - 385			
f ₃₄	386 - 404			

Tableau 15 : le fractionnement de la colonne (suite)

f ₃₅	405 - 413			
f ₃₆	414 - 436	75	25	0
f ₃₇	437 - 452			
f ₃₈	453 - 492			
f ₃₉	493 - 509	70	30	0
f ₄₀	510 - 524			
f ₄₁	525 - 549	65	35	0
f ₄₂	550 - 557	60	40	0
f ₄₃	558 - 589	60	40	0
f ₄₄	590 - 596			
f ₄₅	597 - 620	50	50	0
f ₄₆	621 - 653			
f ₄₇	654 - 676			
f ₄₈	677 - 692	45	50	5
f ₄₉	693 - 717			
f ₅₀	718 - 732	30	60	10
f ₅₁	733 - 748			
f ₅₂	749 - 784	25	60	15
f ₅₃	785 - 824	15	65	20

Tableau 15 : Le fractionnement de la colonne

Les fractions obtenues sont retestées avec plusieurs systèmes d'éluant, ce qui a permis de les rassembler une autre fois dans le tableau 16 en 13 fractions.

Les résultats de ce regroupement sont reportés dans le tableau 16

FRACTIONS PRECEDENTES	NOUVELLES FRACTIONS	OBSERVATIONS
f ₁ - f ₂	F ₈	Mélange séparable avec une quantité faible
f ₉	F ₉	Précipite + chlorophylle
f ₁₀	F ₁₀	Mélange complexe
f ₁₁	F ₁₁	Mélange complexe
f ₁₂ - f ₂₃	F ₂₃	Mélange complexe
f ₂₄ - f ₂₅	F ₂₅	Mélange séparable
f ₂₆	F ₂₆	Mélange séparable
f ₂₇ - f ₂₈	F ₂₈	Mélange séparable avec quantité faible
f ₂₉ - f ₃₅	F ₃₅	Mélange complexe
f ₃₆ - f ₄₀	F ₄₀	Mélange complexe
f ₄₁	F ₄₁	Des cristaux + chlorophylle
f ₄₂ - f ₄₆	F ₄₆	Mélange complexe
f ₄₇ - f ₅₃	F ₅₃	Traînée, fin de la colonne

Tableau 16 : Résultat après regroupement des fractions

Les fractions de F₁₀ à F₂₅ renferment d'après les tests sur plaque analytique et cochromatographie quatre flavones, isolées dans une étude précédente réalisée dans notre laboratoire [113].

Parmi les autres fractions, celles sélectionnées pour étude sont celles qui sont les moins complexes et les plus avec quantité importante. Ainsi les fractions F₉, F₂₆ et F₄₁ ont été choisies pour étude dans le cadre de ce travail.

Ces fractions se présentent comme suit :

- | | | |
|--------------------|---|-----------------------------|
| 1. F ₉ | → | Précipite + chlorophylle |
| 2. F ₂₆ | → | Mélange séparable |
| 3. F ₄₁ | → | Des cristaux + chlorophylle |

III-3-3- Séparation et purification des fractions sélectionnées :

- La fraction F₂₆ :

La plaque analytique de la fraction F₂₆ après élution par le système hexane- acétate d'éthyle (1 : 2) et révélation par H₂SO₄ puis chauffage pendant 3 mn a donné 6 spots.

La séparation sur chromatographie préparative sur couche mince a donné les produits F_{26-c}, F_{26-f} et la sous fraction F_{26-b}. Cette dernière, rechromatographiée sur plaques préparatives de gel de silice, éluées par le système éther de pétrole- acétone (2 :1) a donné 2 produits : F_{26-b1} et F_{26-b2}.

Ainsi cette fraction a permis l'isolement de 4 produits à l'état pur et natif. Vu les quantités obtenus, nous n'avons soumis à l'étude structurales que deux d'entre eux :

F_{26-b1} et F_{26-b2}. dans le cadre de ce travail.

- La fraction F₉ :

Contenant un précipité mêlé à de la chlorophylle, la fraction F₉ a subi un lavage avec de l'éther de pétrole et quelques gouttes de CHCl₃, l'opération a été répétée plusieurs fois. Le précipité jaunâtre ainsi obtenu est ensuite solubilisé dans le CHCl₃. Testé sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système : chloroforme- acétone (1 : 1), ce précipité donne un spot unique de fluorescence noire-violet sous lumière de Wood. Ce qui prouve que le produit F₉ est probablement un flavonoïde.

- La fraction F₄₁ :

Cette fraction se présente sous forme de cristaux, mêlés à de la chlorophylle. Après lavage avec de l'hexane additionnée de quelques gouttes d'acétone, les cristaux blancs obtenus sont dissous dans l'acétone et testés sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système : chloroforme- acétone (1 : 2), ces cristaux donnent un spot unique de fluorescence noire sous lumière UV à $\lambda = 254 \text{ nm}$; révélée à l'acide sulfurique et échauffée pendant 3 mn, la plaque présente toujours un spot unique signifiant la pureté de ce produit.

La figure 20 résume les travaux chromatographiques effectués sur colonne et plaques préparatives sur couches minces de gel de silice.

III-3-4- Conclusion :

Les travaux de séparation chromatographiques ont permis l'obtention à l'état pur et natif de six produits.

Nous avons soumis à l'étude structurale quatre d'entre eux :

F₉, F_{26-b1}, F_{26-b2} et F₄₁.

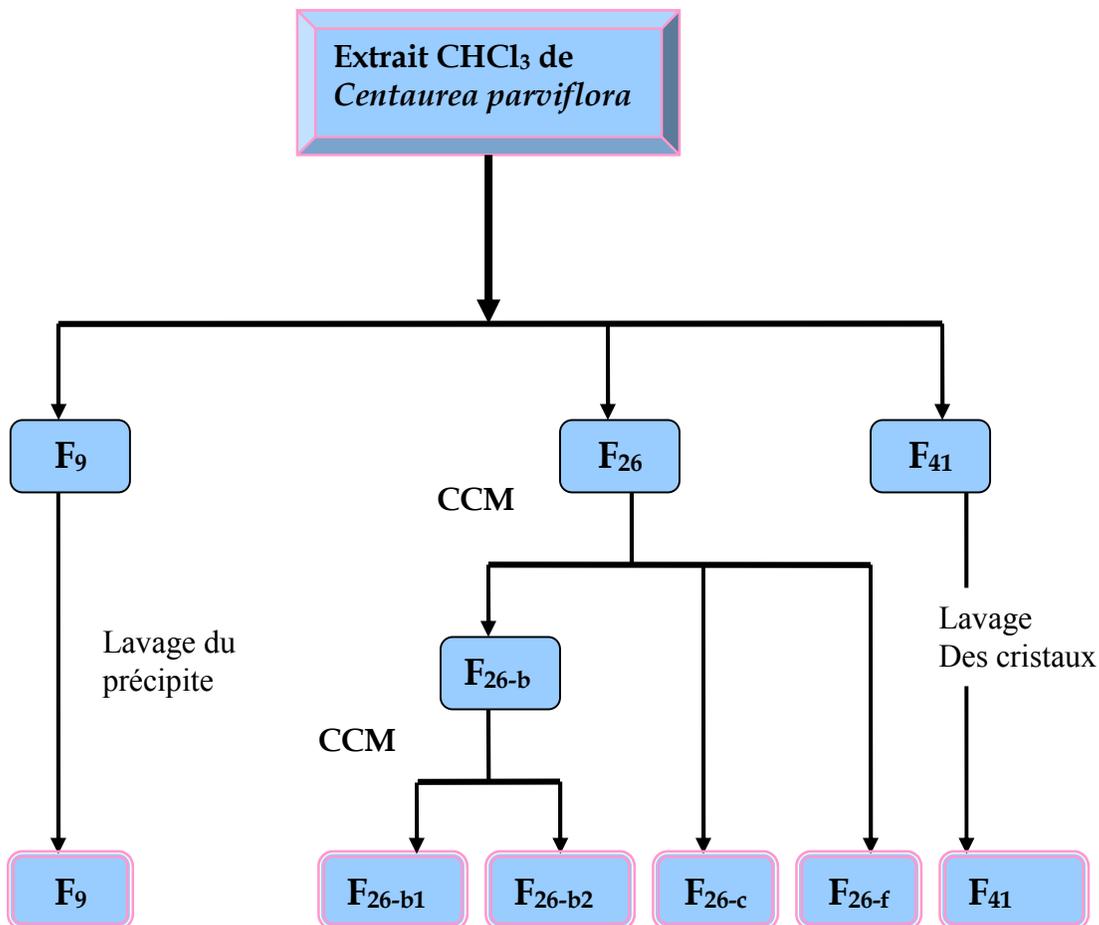


Figure 20 : Résumé des travaux chromatographiques effectués

CHAPITRE IV

Résultats et discussion

IV-1-Introduction :

Pour arriver à déterminer et établir une bonne identification structurale des composés isolés, nous avons fait appel aux différentes méthodes spectroscopiques notamment UV-Visible, IR et la spectrométrie de masse, la RMN-¹H, la RMN-¹³C et les expériences de la RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC...).

IV-2- Identification du composé F₄₁ :

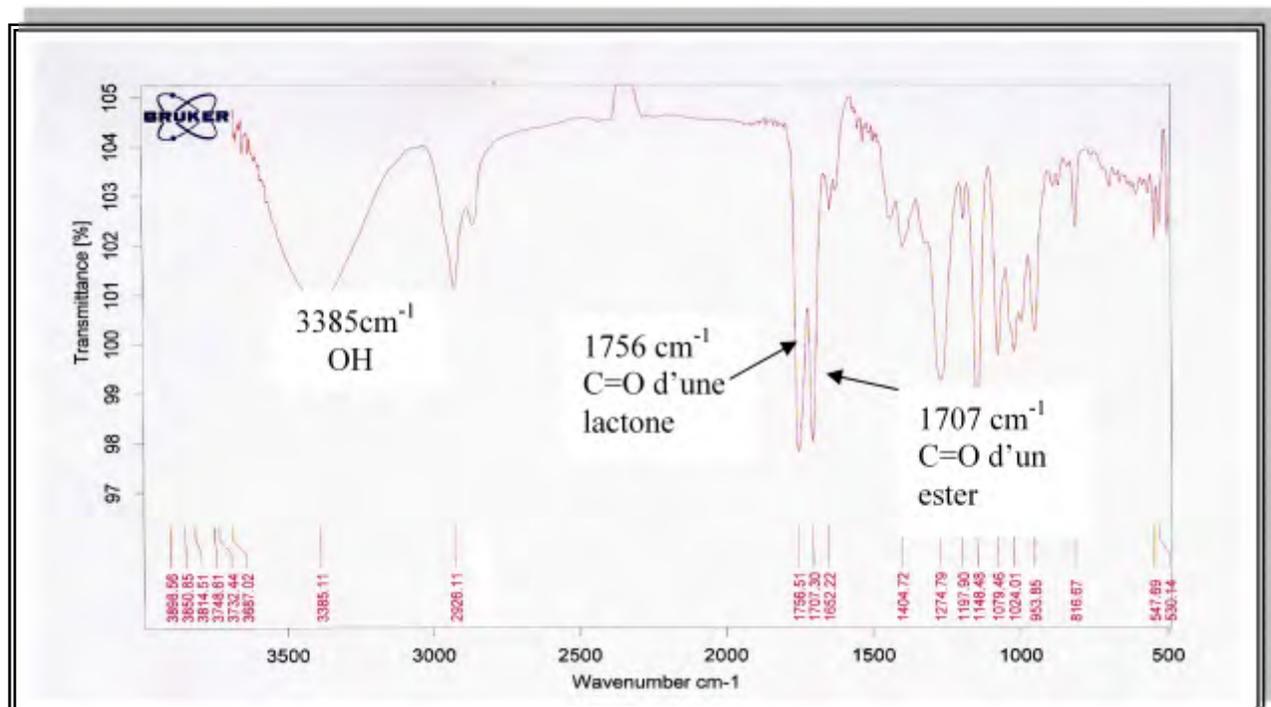
❖ La fluorescence :

Le composé F₄₁ est caractérisé par une couleur **noire** sous lumière UV 254 nm.

Analyse structurale :

Le spectre IR (spectre n° 2) montre :

- Une bande d'absorption d'une fonction hydroxyle à 3385 cm⁻¹.
- Une bande à 1756 cm⁻¹, caractérisant la fonction carbonyle d'une γ -lactone α , β -insaturée.
- Une bande attribuable à la fonction carbonyle d'un ester α , β -insaturé à 1707 cm⁻¹.



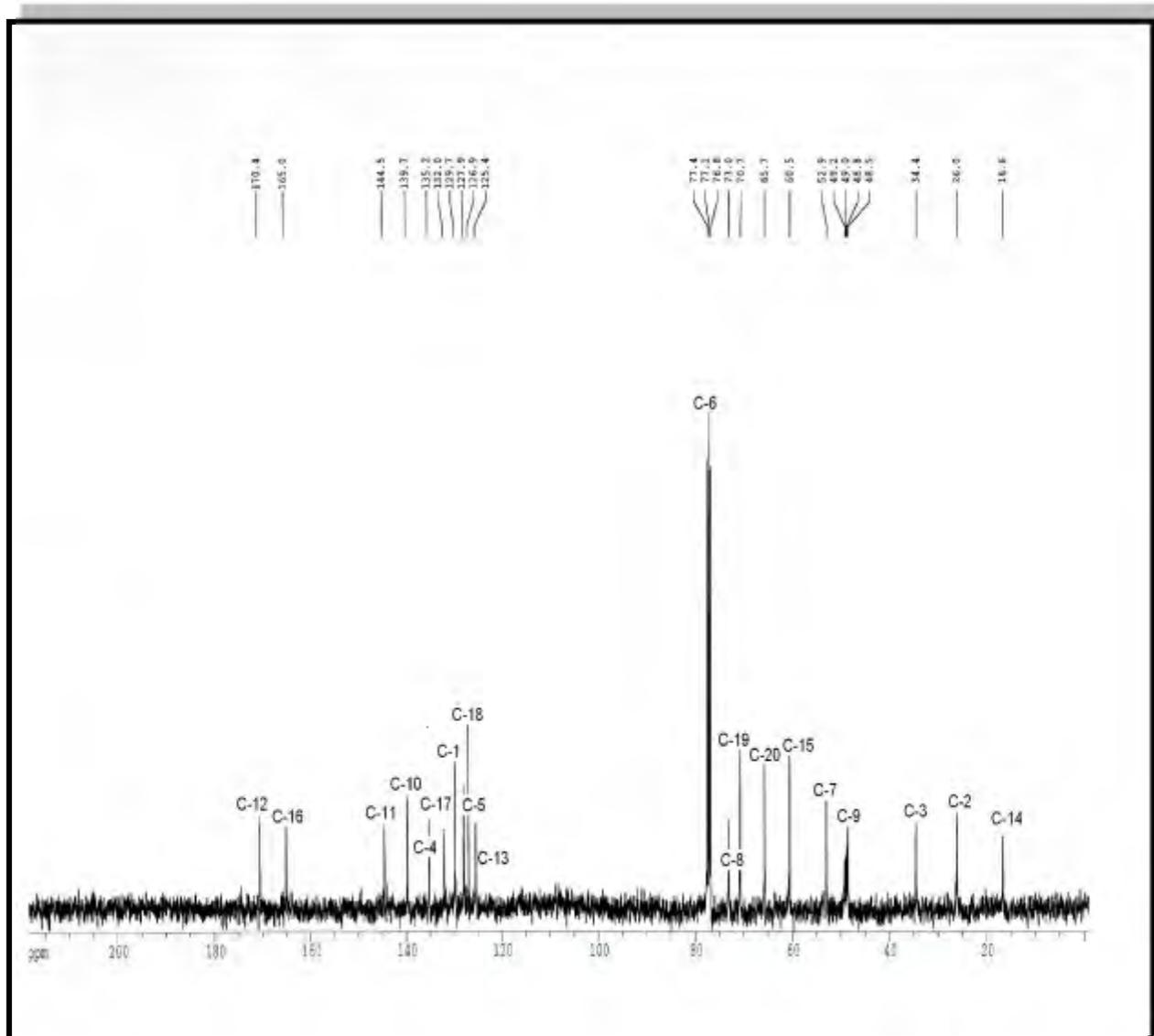
Spectre n°2 : IR du composé F₄₁

Le spectre RMN-¹³C (spectre n°3) dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 17 montre la présence de 19 atomes de carbone, grâce aux expériences dept, notamment le dept 90, nous avons pu constater, la présence d'un signal relatif à un groupement CH, qui était recouvert par les signaux du solvant. Ce qui porte à 20, le nombre d'atomes de carbone dans cette molécule.

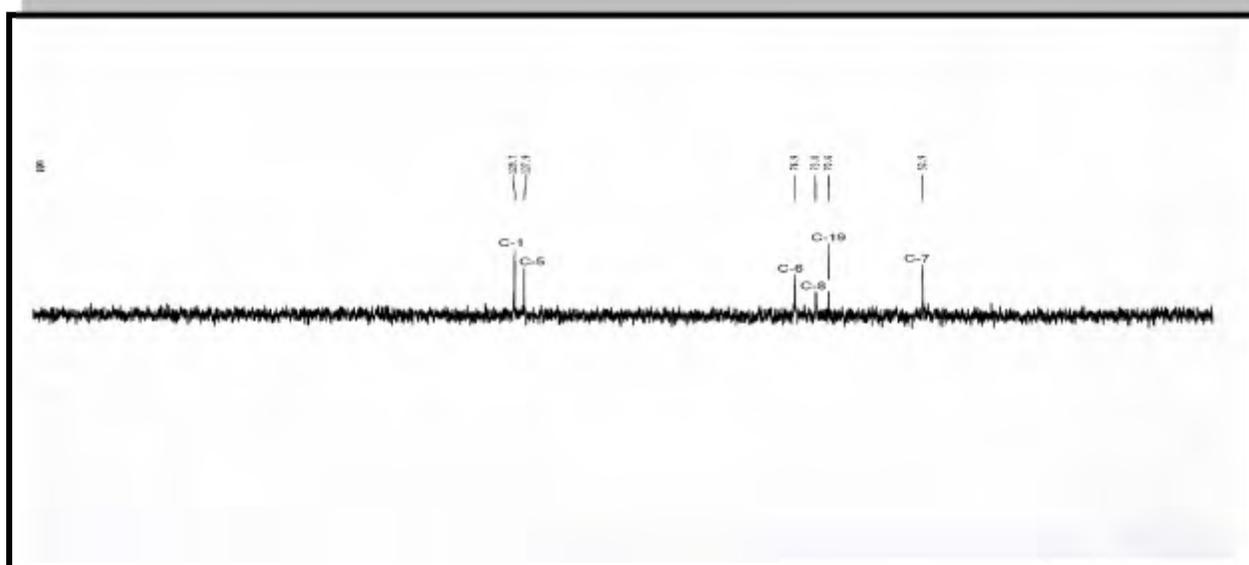
La combinaison des données de la RMN-¹³C et des expériences dept 90 (spectre n°4), 135 (spectre n°5) et 45 (spectre n°6) montre la présence dans cette molécule de :

- Sept groupements méthylène (CH₂) dont deux éthyléniques et cinq CH₂ hybridés Sp³, parmi ces derniers deux groupements CH₂ oxygénés à $\delta = 60,3\text{ppm}$ et $\delta = 65,4\text{ppm}$.
- Six groupements méthynes (CH) dont deux éthyléniques et quatre hybridés Sp³, trois d'entre eux sont oxygénés : à $\delta = 70,6\text{ppm}$, $\delta = 72,8\text{ppm}$ et $\delta = 76,9\text{ppm}$. Le CH qui reste est à $\delta = 52,7\text{ppm}$.
- Un groupement méthyle (1CH₃)

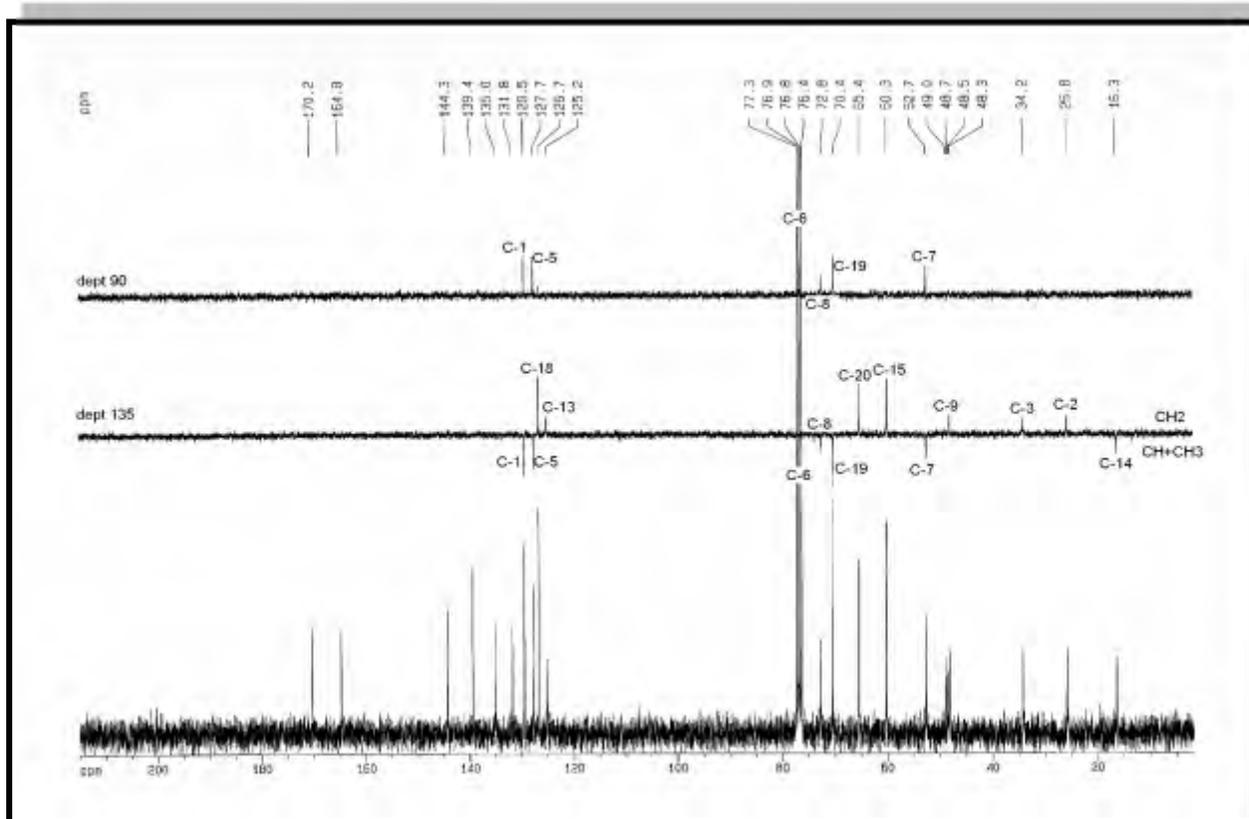
- 6 atomes de carbone quaternaires, tous hybridés Sp^2 , parmi lesquels on peut attribuer les signaux à $\delta = 170,4\text{ppm}$ et $\delta = 164,8\text{ppm}$ au carbonyle de la γ -lactone α, β -insaturée et au carbonyle d'un ester également α, β -insaturé respectivement.



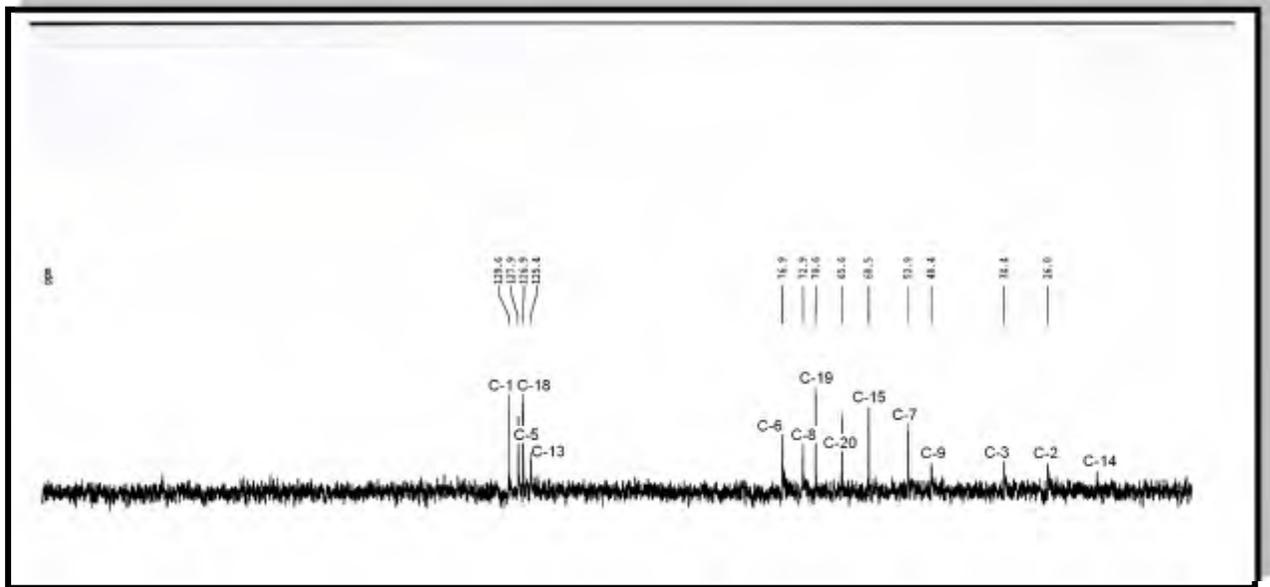
Spectre n°3 : RMN- ^{13}C du composé F $_{41}$



Spectre n°4 : Dept 90 du composé F₄₁



Spectre n°5: Dept 135, 90 et RMN-¹³C du composé F₄₁



Spectre n°6 : Dept 45 du composé F₄₁

Les données précédentes des spectres de RMN permettent de déterminer la formule brute partielle de ce composé : $C_{20}H_{23}O_7$

Le nombre 20 atomes de carbone signalé plus haut découle du nombre de signaux des spectres ^{13}C et dept.

Le nombre 23 des atomes d'hydrogène n'est autre que le résultat de l'addition des protons des groupements hydrocarbonés signalés dans cette molécule.

Le nombre 7 d'atomes d'oxygène est obtenu comme suit :

- La fonction γ -lactone dans cette molécule signifie la présence de 2 atomes d'oxygène.
- La fonction ester dans cette molécule signifie la présence de 2 atomes d'oxygène.
- Les deux CH_2 oxygénés signifient la présence de deux autres atomes d'oxygène.
- Les trois CH oxygénés signifient par contre la présence d'un autre oxygène dans cette molécule, car l'un des 3 CH oxygénés pourrait être le pont de fermeture de la γ -lactone et le deuxième CH pourrait être le point de substitution de l'ester.

Ces dernières données ne pourraient être affectives sans confirmation par d'autres études de RMN ou de spectrométrie de masse.

Dans ce sens nous avons enregistré un spectre de masse en mode FAB (spectre n°7) sur lequel nous observons :

Trois pics quasi-moléculaires représentant $[MH]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ à $m/z = 379$; 401 et 421... respectivement. Ces ions permettent de déduire une masse moléculaire de 378 pour ce composé et une formule brute de $C_{20}H_{26}O_7$ cette dernière donnée mène à une structure comportant 8 insaturations.

Par ailleurs, le spectre de masse (spectre n° 8) Enregistré par ionisation sous impact électronique montre entre autre un signale à $m/z = 247$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{19}O_3$. Connaissant le mode de fragmentation des lactones sesquiterpéniques, cet ion indicateur de la présence d'une chaîne latérale de formule brute $C_5H_7O_4$ représente la partie squelette sesquiterpénique.

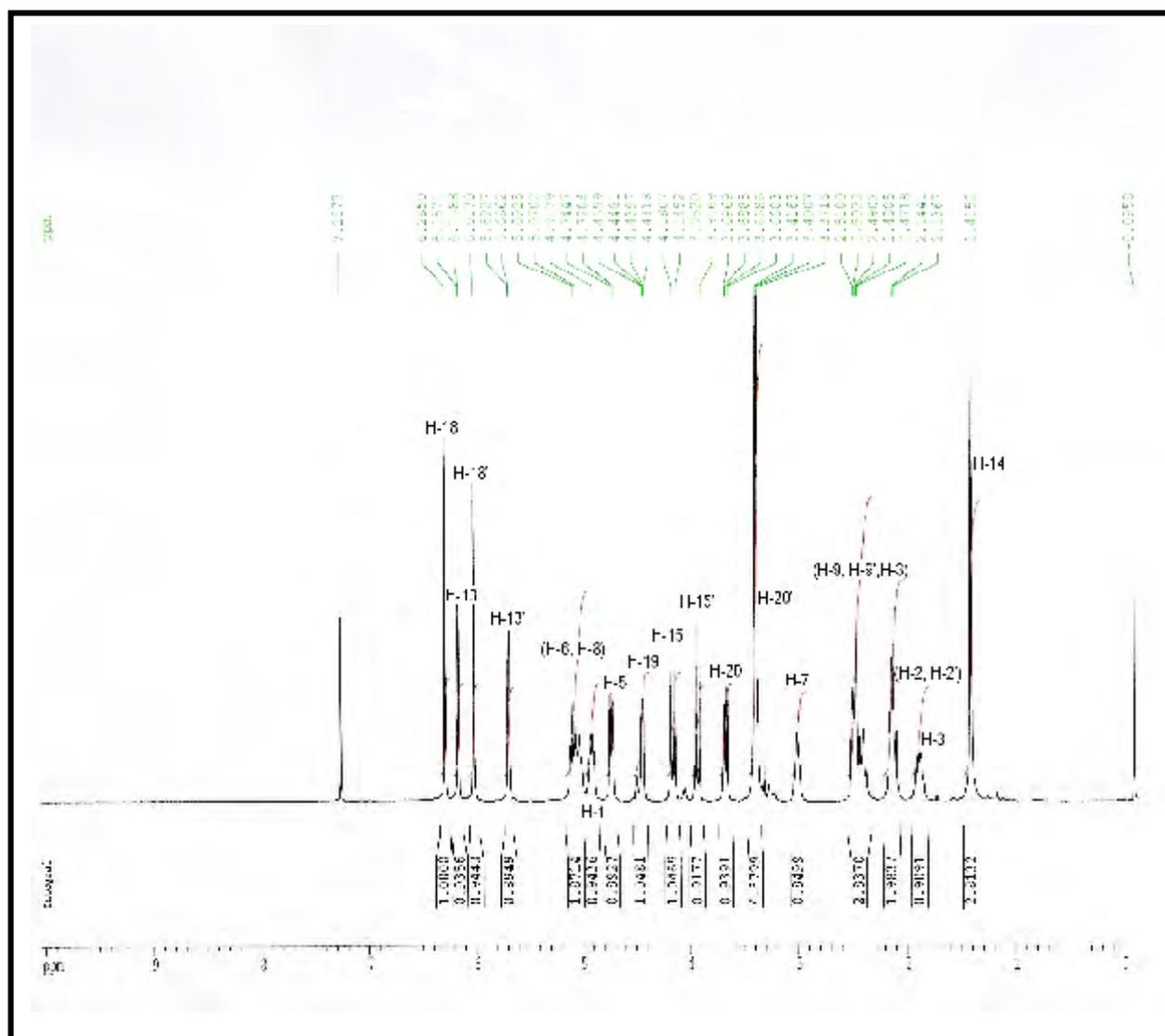
Ce spectre montre également un signale à $m/z = 228$ correspondant à la formule $C_{15}H_{16}O_2$, soit $[M^{+\bullet}-C_5H_{10}O_5]$.

Sachant que cette molécule renferme un ester α, β -insaturé, qui ne peut être que dans la chaîne latérale, l'entité $C_5H_{10}O_5$ ne peut être que l'acide correspondant à la chaîne latérale soit : $C_5H_8O_4$ et une molécule d'eau : (H_2O) .

Cette hypothèse permet de déduire la présence d'une fonction hydroxyle sur le squelette sesquiterpénique.

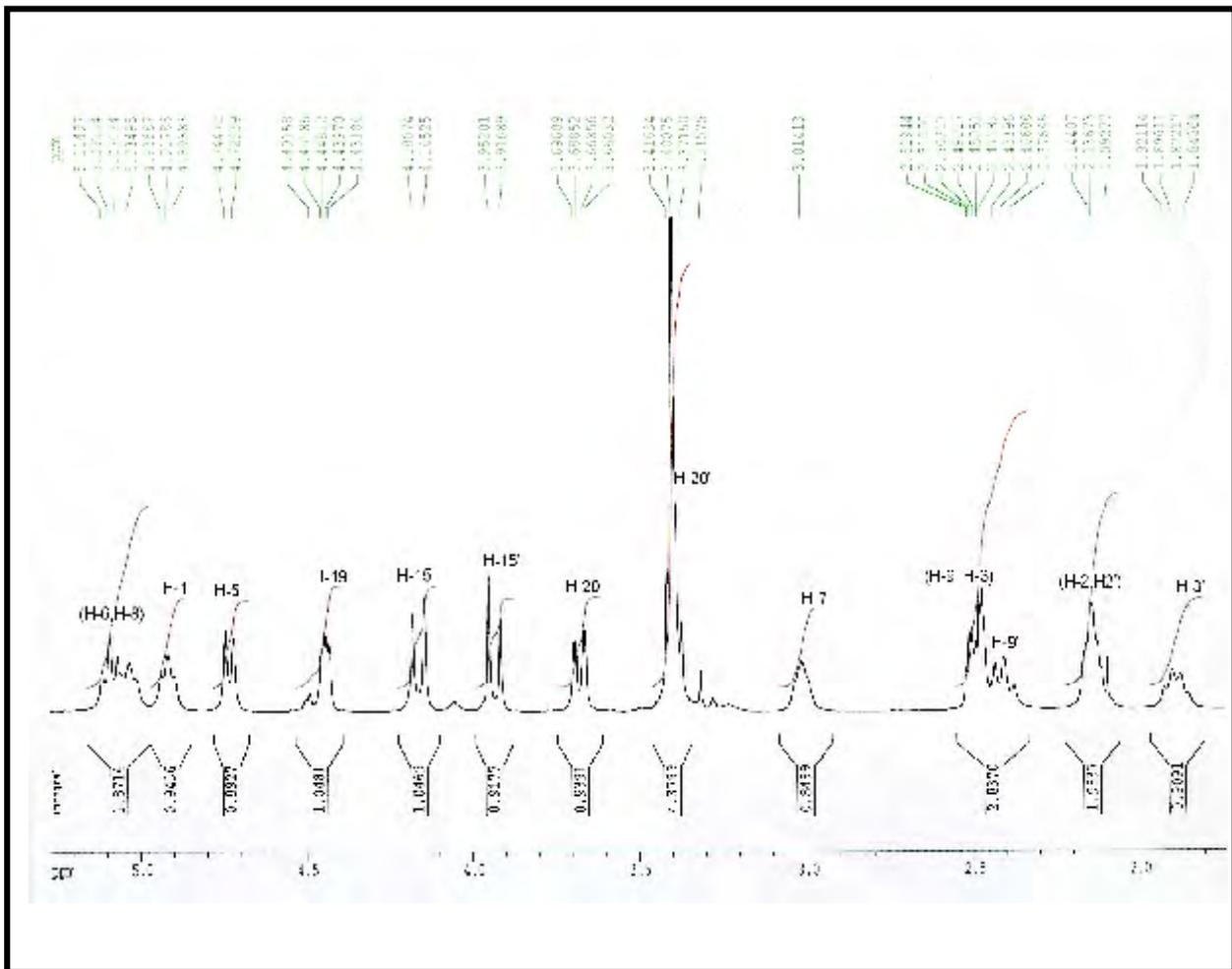
Sur le même spectre, le signale à $m/z = 347$ pourrait être attribué à $[M-CH_2OH]^+$ ce qui laisse attendre ce type de substitution sur cette molécule.

Le spectre RMN ^1H (spectre n° 9) dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 18 montre :



Spectre n°9 : RMN ^1H du composé F_{41}

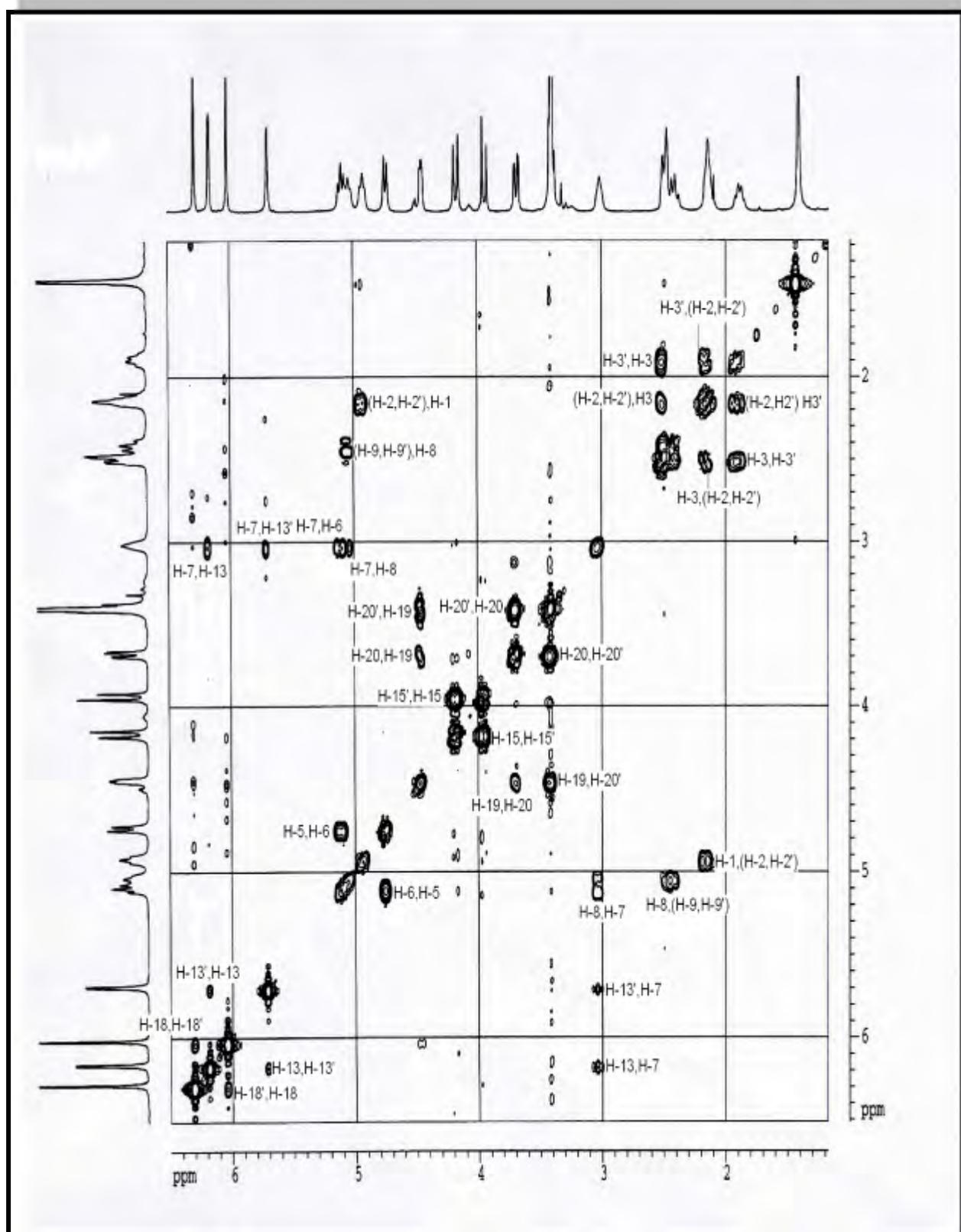
Deux signaux sous forme de doublets à $\delta = 6,20$ et $\delta = 5,70$ ppm. $J = 2,6$, $J = 3,6$ Hz, caractéristique d'une double liaison exocyclique conjuguée avec une fonction carbonyle relative à une lactone sesquiterpénique. Ces deux signaux sont attribuables aux protons H-13 et H-13' respectivement.



Spectre n°10 : Etallement du spectre proton du composé F_{41}

L'examen du spectre cosy ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) (spectre n°11) et l'attribution des protons H-13, H-13' permettent d'attribuer le signal à $\delta = 3\text{ppm}$ au proton H-7, grâce à ses taches de corrélations avec ces deux protons. Ce noyau corrèle également avec deux autres protons à $\delta = 5,10$ et $\delta = 5,20$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces noyaux qui ne peuvent être que H-6 et H-8 indiquant qu'ils sont portés par des atomes de carbone oxygénés.

La multiplicité de leur signaux, triplet ($J = 8,9$ Hz) pour le signal à $\delta = 5,20$ ppm et multiplet pour celui à $\delta = 5,10$ ppm, fait qu'il peuvent être attribués qu'à H-6 pour le premier et H-8 pour le second.



Spectre n°11 : Cosy (¹H-¹H) du composé F₄₁

L'examen du spectre HSQC (spectre n°12) montre une corrélation entre le H-6 et le carbone du groupement CH à $\delta = 76,9$ ppm, caractéristique du point de fermeture de la lactone sesquiterpénique, ce qui mène à une lactone fermée en C-6.

En conséquence et vu la valeur du déplacement chimique de H-8, il est parfaitement envisageable de placer le groupement ester conjugué en C-8.

Sur Le spectre cosy (^1H - ^1H), la localisation de H-8 mènent à l'attribution de H-9 et H-9', à $\delta = 2,50$ et $2,40$ ppm. Ces protons corrélient entre eux et avec H-8 uniquement, ce qui signifie l'absence de protons sur le carbone C-10.

Comme d'après les spectres ^{13}C et dept tous les atomes de carbone quaternaires sont hybridés Sp^2 , cela suppose la présence d'une double liaison entre C-1 et C-10.

L'analyse du spectre de l'expérience HMBC (spectre n°13), optimisée à une constante de couplage de 8 Hz, montre une corrélation entre H-9, H-9' et le carbone du méthyle unique de cette molécule ($\delta = 16,3$ ppm), ce qui permet son attribution à C-14.

L'attribution de ce carbone mène à celle de H-1 résonant sous forme d'un multiplet à $\delta = 4,90$ ppm, grâce à leur corrélation sur le spectre de l'expérience HMBC.

La localisation de H-1 et un retour vers le spectre cosy (^1H - ^1H), permet l'attribution de H-2 et H-2' résonant sous forme de deux multiplets superposés à $\delta = 2,20$ ppm.

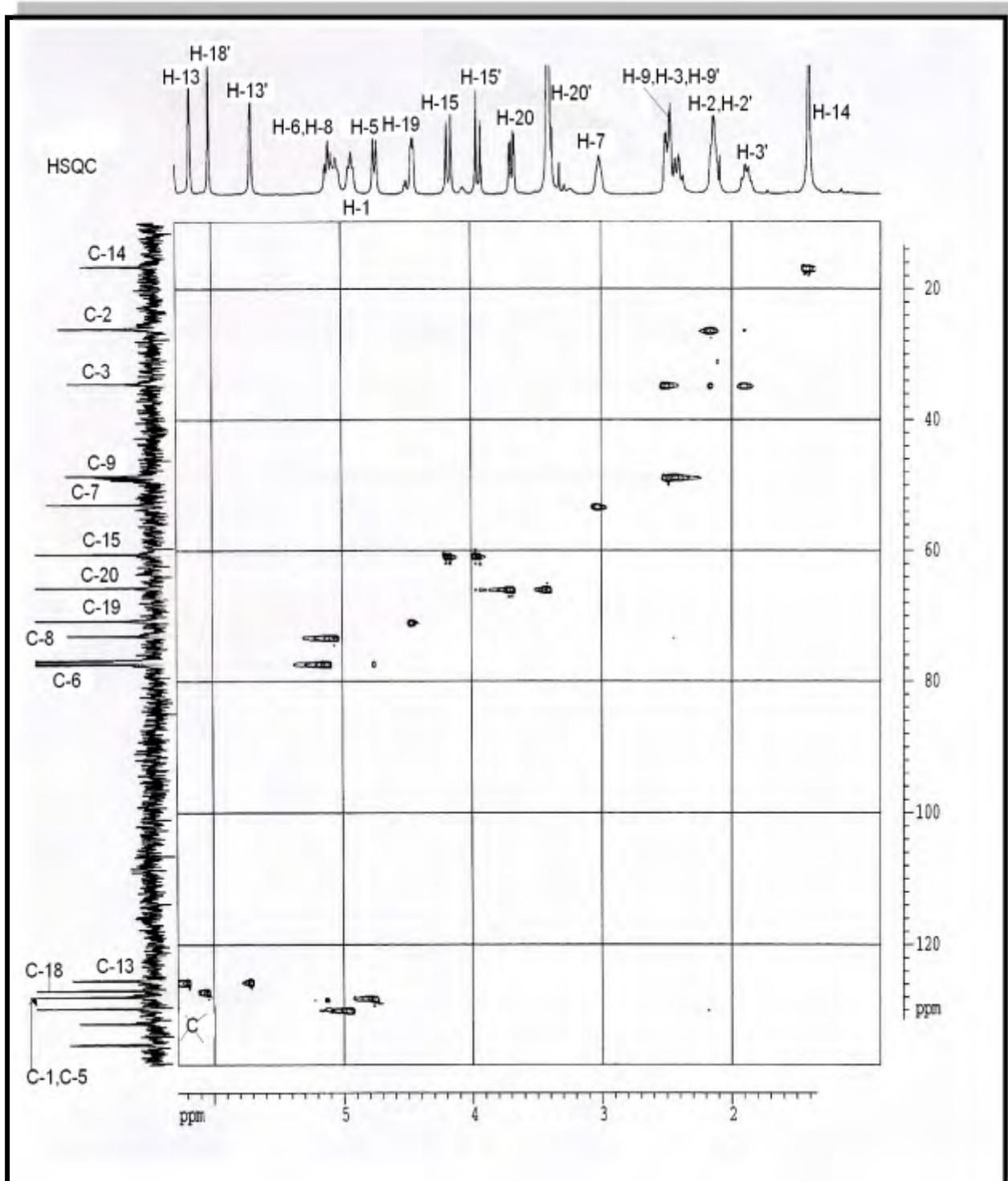
L'attribution de ces derniers noyaux mène à celle de H-3 et H-3' résonant sous forme de multiplets à $\delta = 2,50$ et $1,90$ ppm respectivement.

Après localisation de H-3 et H-3', il a été aisé d'attribuer le C-3 au signal à $\delta = 32,2$ ppm, grâce au spectre de l'expérience HSQC.

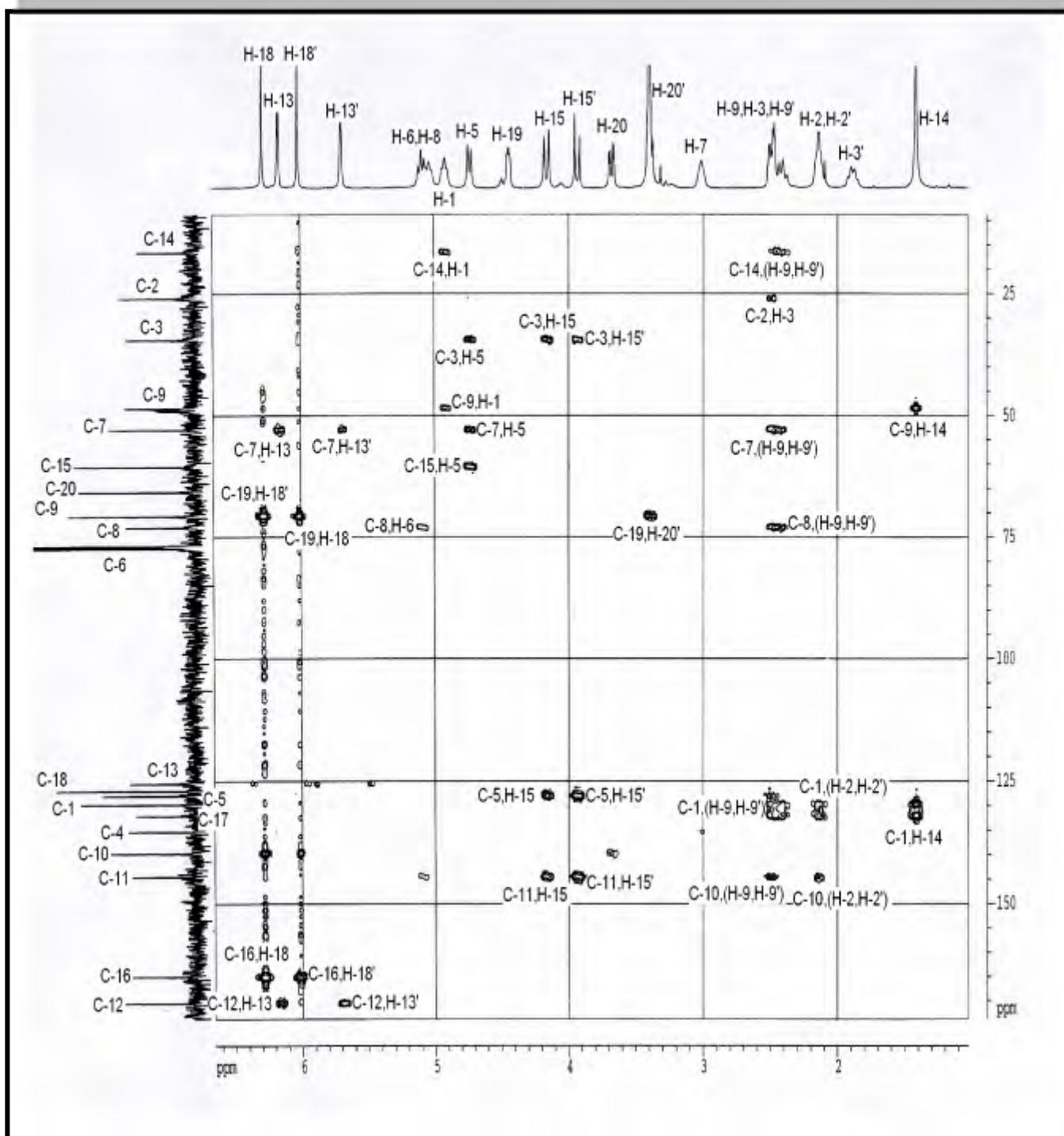
Un réexamen du spectre de l'expérience HMBC montre une corrélation nette entre ce dernier carbone et les protons au système AB à $\delta = 4,18$ et $3,92$ ppm, ($J = 14,1$ Hz) permettant ainsi leur attribution à H-15 et H-15'.

Comme cette molécule comporte un groupement hydroxyle sur son squelette sesquiterpénique, cela suppose que le C-15 est sous forme d'un groupement CH_2OH .

La multiplicité des signaux des protons de ce groupement et la valeur du déplacement chimique de H-5, imposent la présence d'une double liaison entre C-4 et C-5.

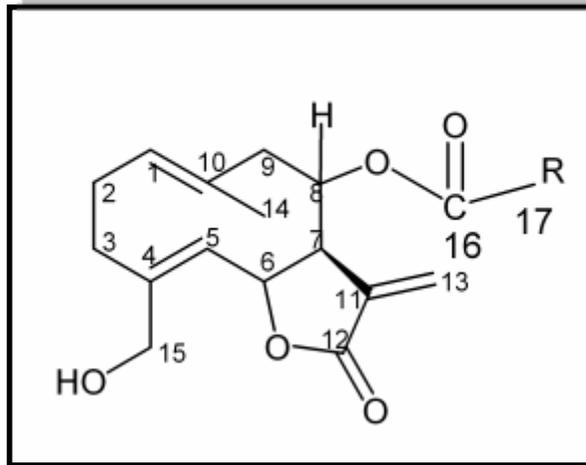


Spectre n°12 : HSQC du composé F₄₁



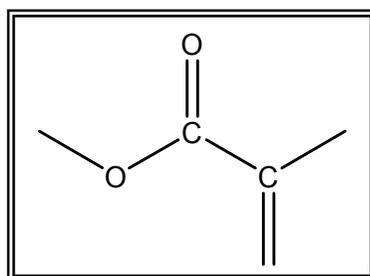
Spectre n°13 : HMBC du composé F₄₁

Ces données permettent de proposer un squelette sesquiterpénique pour cette molécule de type **germacranolide** substitué en C-8 par un groupement ester α, β -insaturé et en C-15 par un hydroxyle.



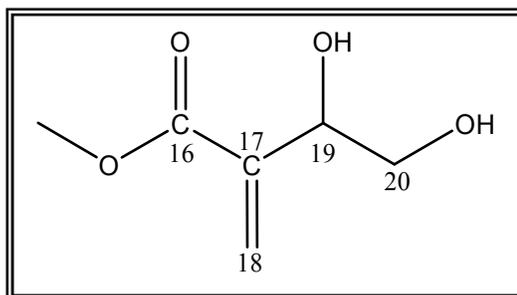
Pour déterminer la structure totale du substituant en C-8, un retour vers les données précédemment déduites des spectres de RMN, IR et SMI oriente vers la présence dans ce substituant de :

- un ester α, β -insaturé dont la double liaison doit être délimitée par un carbone quaternaire et un groupement CH_2 , soit la présence de :



- un groupement : CH-O-
- un groupement : $-\text{CH}_2\text{-O-}$

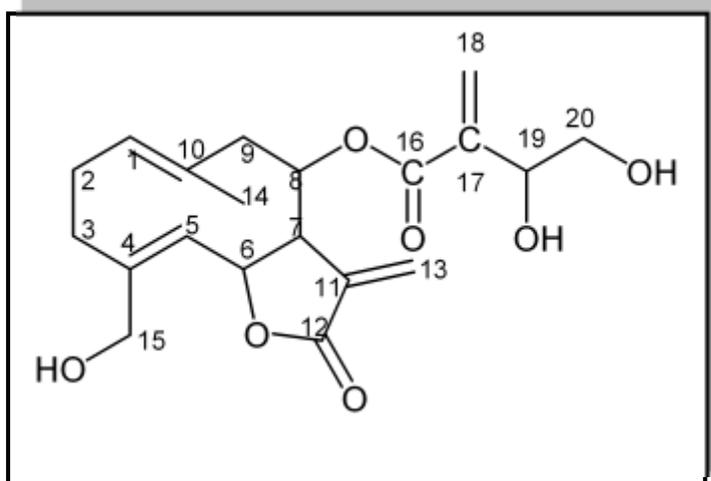
Sachant que la formule brute de ce substituant doit être : $C_5H_7O_4$; il vient par conséquent que ce substituant doit être de la forme



La présence de cette entité dans cette molécule est parfaitement appuyée par le spectre de RMN-¹H qui montre la présence d'un système AMX à $\delta = 4,45$ ppm

($J = 7,7 ; 3,3$ Hz), $\delta = 3,40$ ppm (partiellement couvert par le signal du solvant) et $\delta = 3,68$ ppm ($J = 11,3 ; 3,3$ Hz)

Ces données mènent à la structure pour le composé F₄₁ suivante :



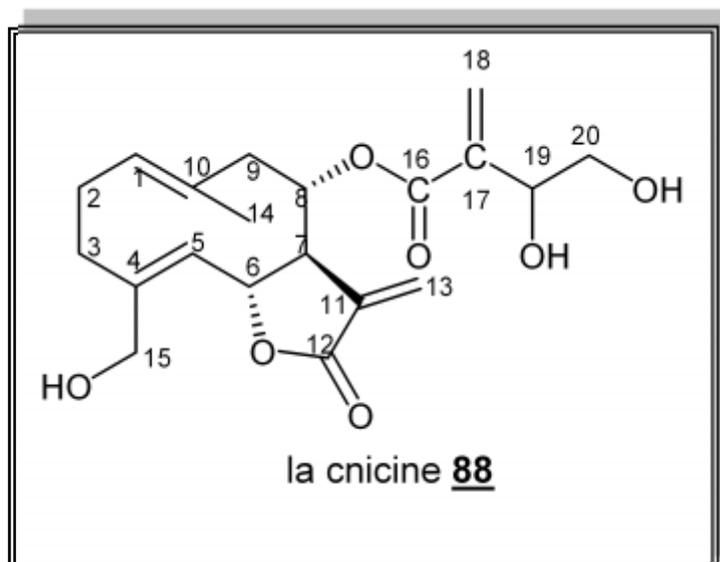
Le fait que H-6 donne un signal sous forme d'un triplet ($J = 8,9$ Hz) $J_{H5-H6} = J_{H6-H7} = 8,9$ Hz, permet de déduire une disposition trans pour H-5, H-6, H-7 par conséquent : H-5 admet une orientation α ; H-6 admet une orientation β et H-7 admet une orientation α .

La stéréochimie de C-8 est déduite de la valeur de la constante de couplage entre H-8 et H-9 axial.

En effet, H-9 axial soit dans notre numérotation H-9' donne un signal triplet ($J = 12$ Hz).

La valeur de cette constante de couplage oriente vers une interaction axial-axial entre H-9' et H-8. Ce qui place H-8 en position axial ou β .

L'ensemble de ces analyses mènent à la structure :



Le composé F_{41} est connu par la cnicine **88**, on le trouve en grande quantité dans le genre *Centaurea* [114].

C	δ (ppm)	DEPT (400MHz)
1	129,7	CH
2	25,8	CH ₂
3	32,2	CH ₂
4	135,2	C
5	127,9	CH
6	76,9	CH
7	52,7	CH
8	72,8	CH
9	49,0	CH ₂
10	139,7	C
11	144,5	C
12	170,4	C
13	125,4	CH ₂
14	16,3	C
15	60,3	CH ₂
16	164,8	C
17	132,0	C
18	126,9	CH ₂
19	70,4	CH
20	65,4	CH ₂

Tableau 17 : RMN-¹³C les déplacements chimiques du composé F₄₁

H	δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)
1	4,90	m	----
2	2,20	m	----
2'	2,20	m	----
3	2,50	m	----
3'	1,90	m	----
5	4,80	d	8,9
6	5,20	t	8,9
7	3,00	m	----
8	5,10	m	----
9	2,50	t	12
9'	2,40	dd	12 ; 4
13	6,20	d	3,6
13'	5,70	d	2,6
14	1,45	s	----
15	4,18	d	14,1
15'	3,92	d	14,1
18	6,28	s	----
18'	6,01	s	----
19	4,45	dd	7,7; 3,3
20	3,68	dd	11,3 ; 3,3
20'	3,40	-----	Partiellement couvert

Tableau 18 : RMN ^{-1}H du composé F₄₁

IV-3- Identification du composé F₉ :

❖ La fluorescence :

Sous la lumière UV 365 nm la fluorescence de ce composé est noire-violette, d'où l'on peut déduire que F₉ est une flavone ou un flavonol-3-OR.

❖ Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation:

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 19

Les REACTIFS	BANDE I (nm)	BANDE II (nm)	OBSERVATION
MeOH	339	276	FLAVONE
NaOH	333	281	Absence de 4 -OH et 7-OH
NaOH+ 5min	333	281	Spectre stable
AlCl ₃	367	289	5-OH
(AlCl ₃ +HCl)	362	289	5-OH avec 6-oxygénation, pas de système ortho di-OH
NaOAc	339	276	Absence de 7-OH
(NaOAc+H ₃ BO ₃)	339	276	Absence de système ortho di-OH

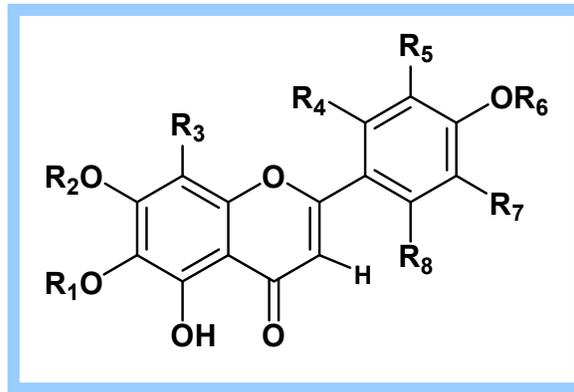
Tableau 19 : Résultats de la série spectrale UV-Visible

La fluorescence noire-violette sous la lumière UV-Visible 365 nm, et la valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le méthanol à 339 nm, oriente vers une flavone.

Le spectre enregistré après l'addition de NaOH dans l'échantillon ne provoque aucun changement notable par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui suppose l'absence d'hydroxyles ionisables dans cette molécule. Cette hypothèse est confirmée par le spectre enregistré en présence de NaOAc qui lui non plus ne présente aucun changement par rapport à celui enregistré dans le méthanol.

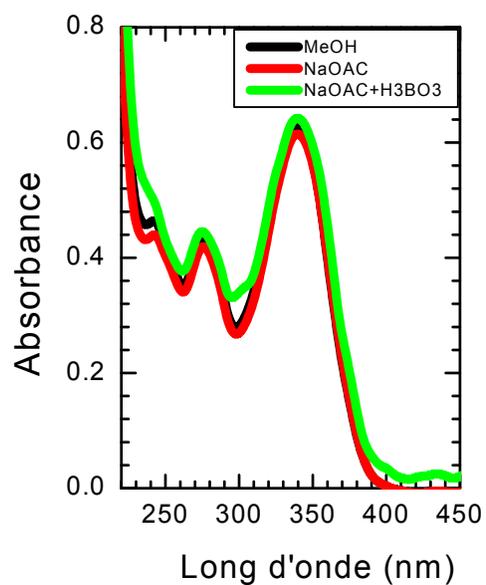
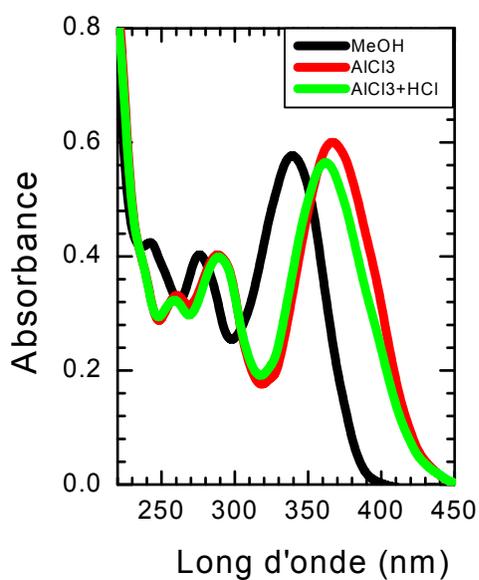
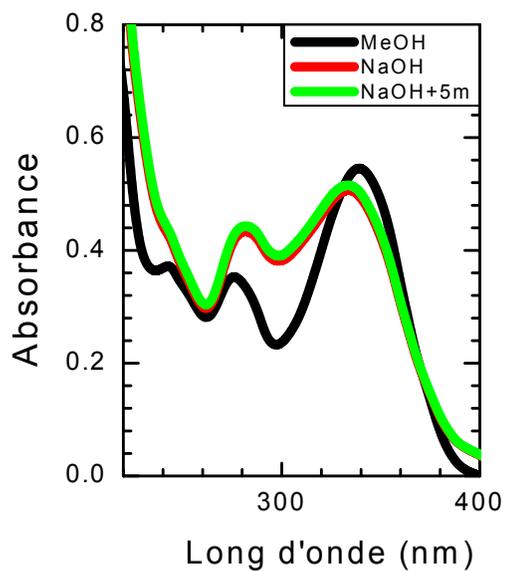
Le réactif ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) donne un déplacement bathochrome de 23 nm, de la bande I ce qui conclut l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6.

D'après cette interprétation nous proposons la structure partielle suivante :



Avec :

$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_6$ différents de H et $\text{R}_3, \text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_7, \text{R}_8$ différents de OH , vu que cette molécule ne doit pas contenir de OH ionisables même par une base forte comme NaOH .



Série spectrale UV du composé F_9

❖ Spectroscopie RMN ^1H :

Le spectre RMN ^1H (spectre n°14) donne les informations suivantes :

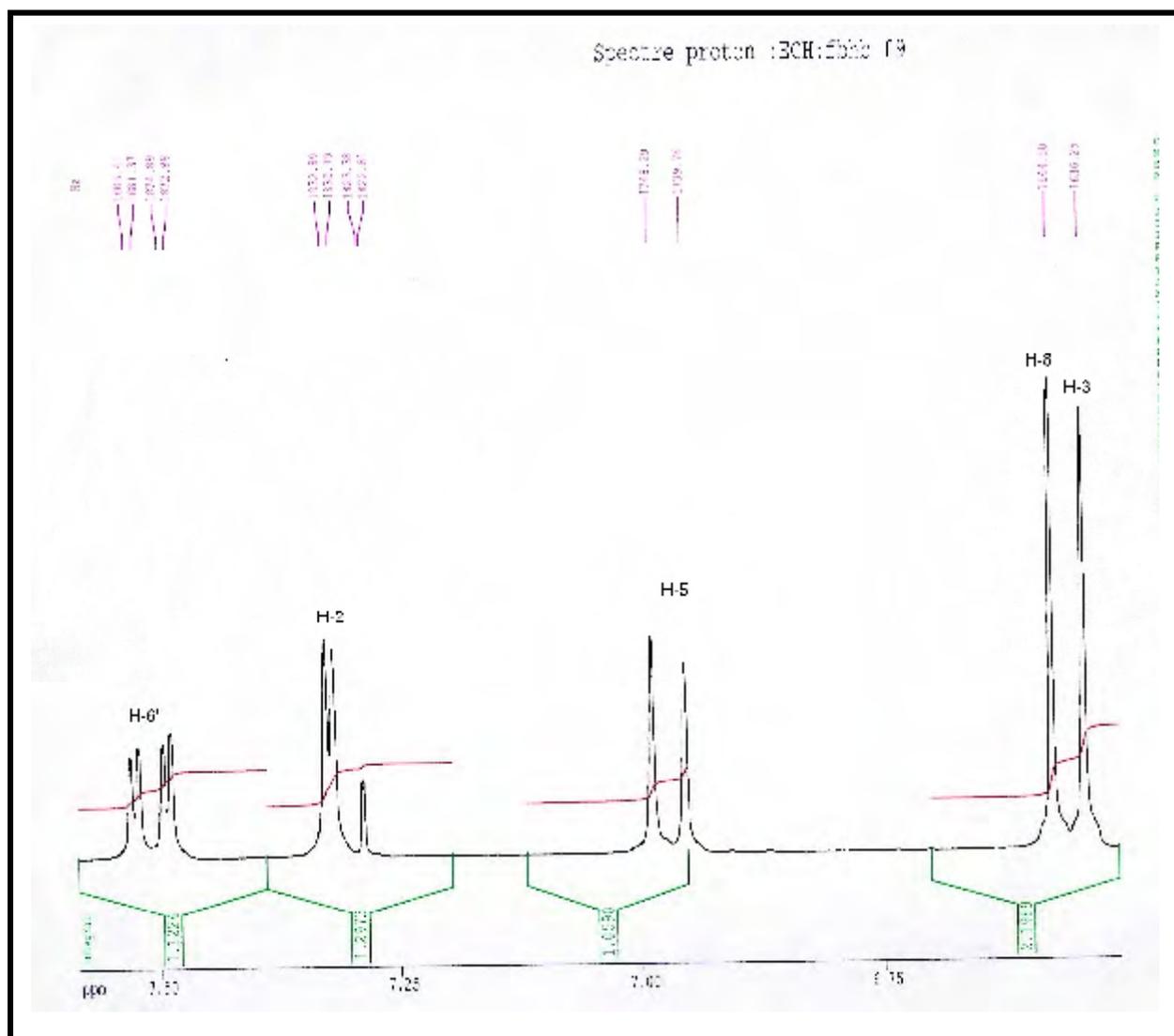
- Un doublet dédoublé à $\delta = 7,50$ ppm, $J = 8,5$ Hz et $J = 2,1$ Hz attribué à H-6' qui indique le présence de H-5' et H-2'.
- Un doublet à $\delta = 7,28$ ppm, attribué au proton H-2' avec $J = 2,1$ Hz.
- À $\delta = 6,96$ ppm, un doublet ($J = 8,5$ Hz), attribué à H-5'.
- Un singulet à $\delta = 6,50$ ppm, attribué à H-3.
- Un singulet à $\delta = 6,65$ ppm, attribue à H-8.
- L'étalement du spectre proton de la zone [3,90-4,00] ppm, montre quatre singulets, correspondant à des groupements méthoxyles à $\delta = 3,92$; 3,96 ; 3,97 et 3,99 ppm.
- un singulet à $\delta = 12,30$ ppm, correspondant au OH porte par C-5.

Les résultats de la RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) sont rassemblés dans le tableau 20

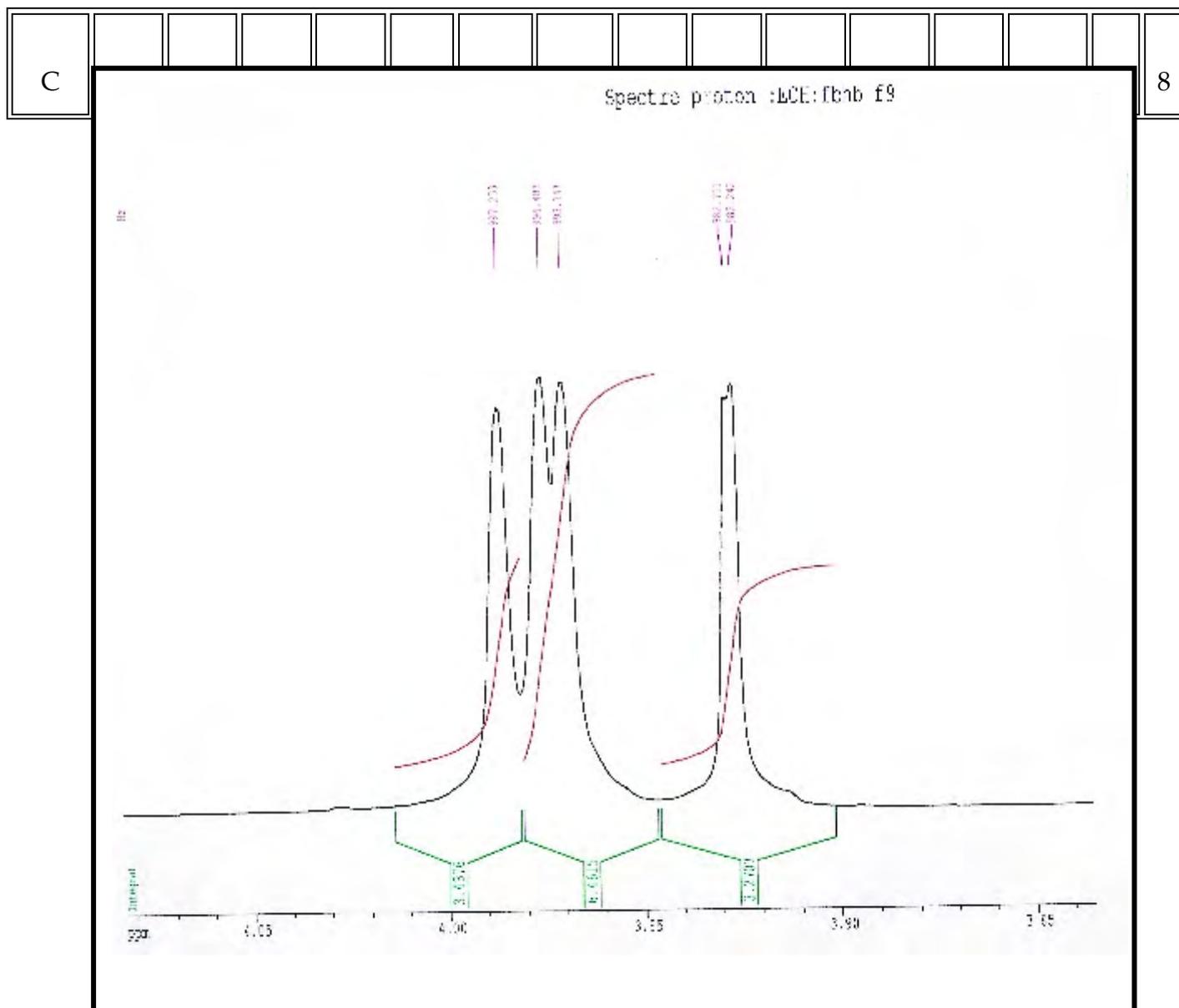
Les protons	Multiplicité	Déplacement (ppm)	J (Hz)
1-OCH ₃	s	3,92	/
1-OCH ₃	s	3,96	/
1-OCH ₃	s	3,97	/
1-OCH ₃	s	3,99	/
H-3	s	6,50	/
H-8	s	6,65	/
OH-5	s	12,30	/
H-2'	d	7,28	2,1
H-5'	d	6,96	8,5
H-6	dd	7,50	8,5; 2,1

Tableau 20 : Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H

Les spectre n°(15 et 16) montre l'étalement de la zone [6,5 -7,5] ppm et la zone [3,90 -4,0] ppm du spectre RMN ^1H du composé F₉.



Spectre n°15 : Etalement du spectre RMN ^1H de la zone [6,5-7,5] ppm



Spectre n°16 : Etalement du spectre RMN-¹H de la zone [3,9- 4,0]

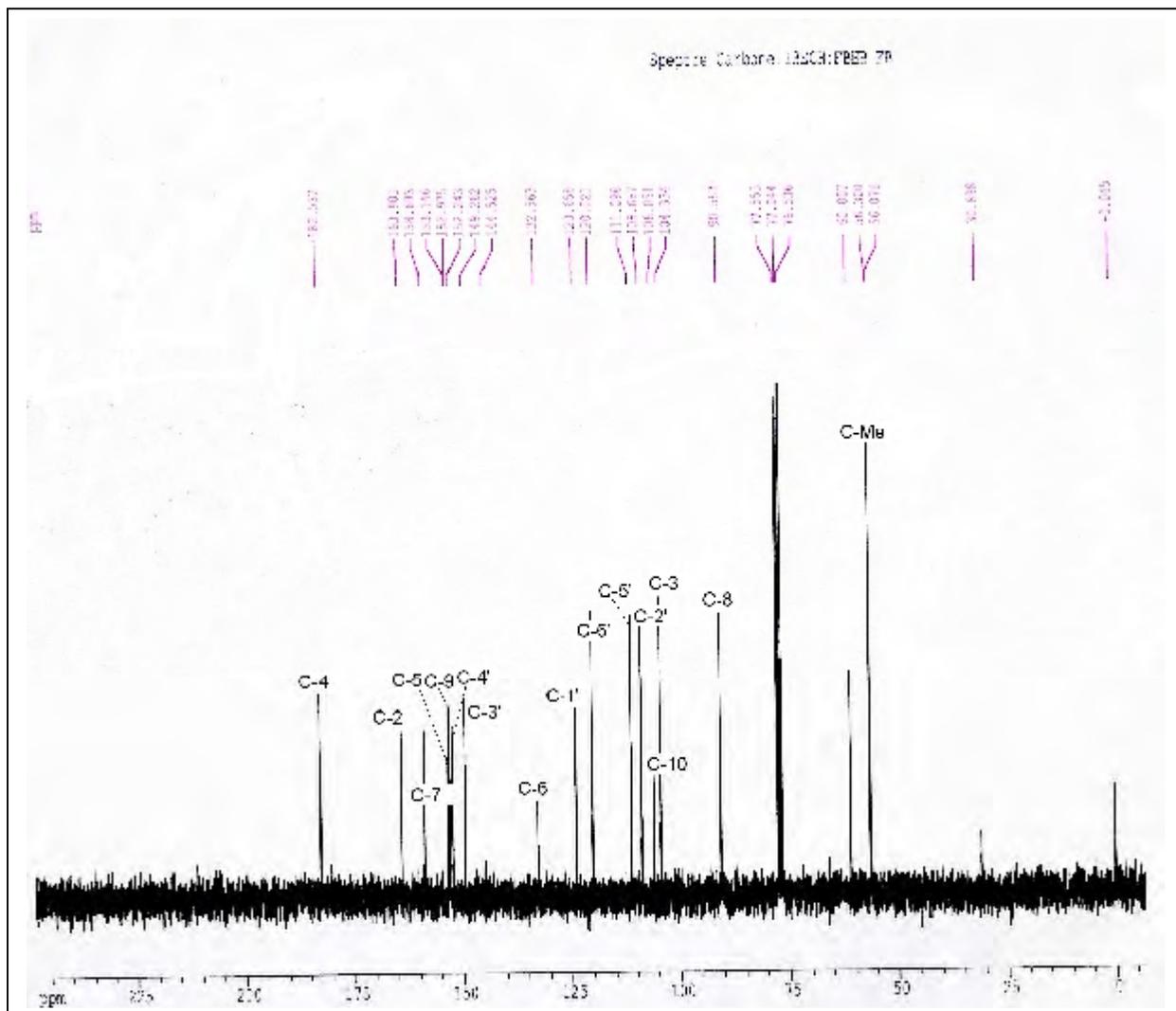
❖ **Spectroscopie RMN-¹³C :**

L'étude du spectre RMN-¹³C (Le spectre n°17) confirme cette structure et permet l'attribution de tous les atomes de carbone aux noyaux respectif.

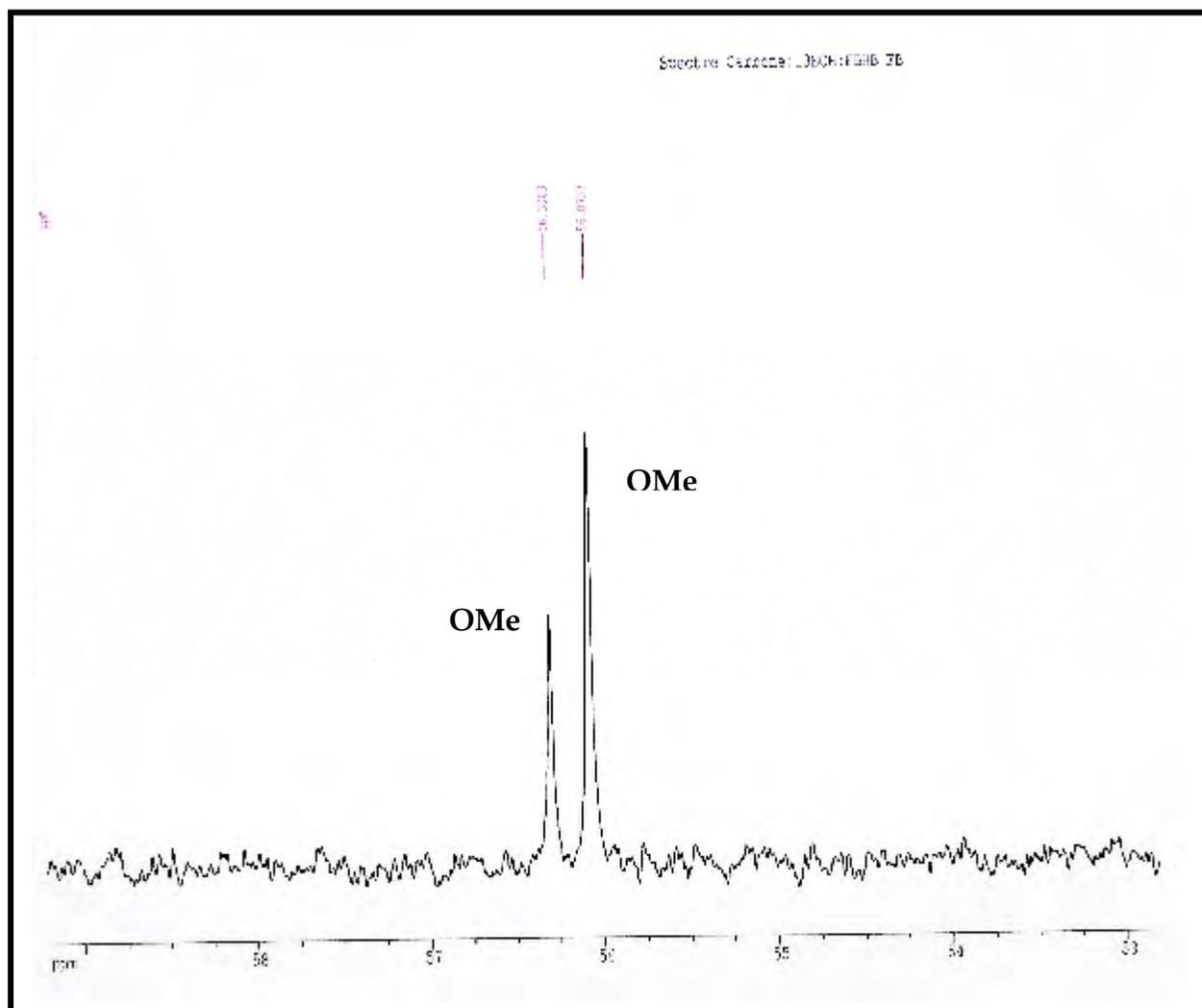
Ces résultats conformes à ceux de la littérature [116], sont reportés dans le tableau 21.

δ_{ppm}	182,5	163,9	158,6	153,1	152,9	152,2	149,2	132,5	123,6	120,0	111,0	108,6	106,0	10	90,
----------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	----	-----

Tableau n°21 : les données du spectre RMN-¹³C (CDCl₃; 62,9 MHz) du composé F₉



Spectre n°17 : RMN-¹³C (CDCl₃; 62,9 MHz) du composé F₉



Spectre n°18 : Etallement de la zone [55- 57] du spectre RMN-¹³C(CDCl₃; 62,9 MHz)

IV-4- Identification du composé F_{26-b1} :

❖ La fluorescence :

Le composé F_{26-b1} caractérisé par une couleur noire-violette sous lumière UV 365 nm, est soit une flavone ou un flavonol 3-OR.

❖ Spectroscopie de RMN ¹H :

Le spectre RMN ¹H (spectre n°19) donne les informations suivantes :

- Une para substitution du noyau B déduite de :

L'existence à $\delta = 7,75$ ppm, d'un doublet ($J = 8,7$ Hz), attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage à $\delta = 6,97$ ppm, attribuable à H-3' et H-5'.

- Un singulet large d'intégration 2H à $\delta = 6,70$ ppm, que l'on ne peut attribuer qu'à H-3 et H-8

- Un singulet à $\delta = 3,37$ ppm, caractéristique d'un groupement méthoxyle.

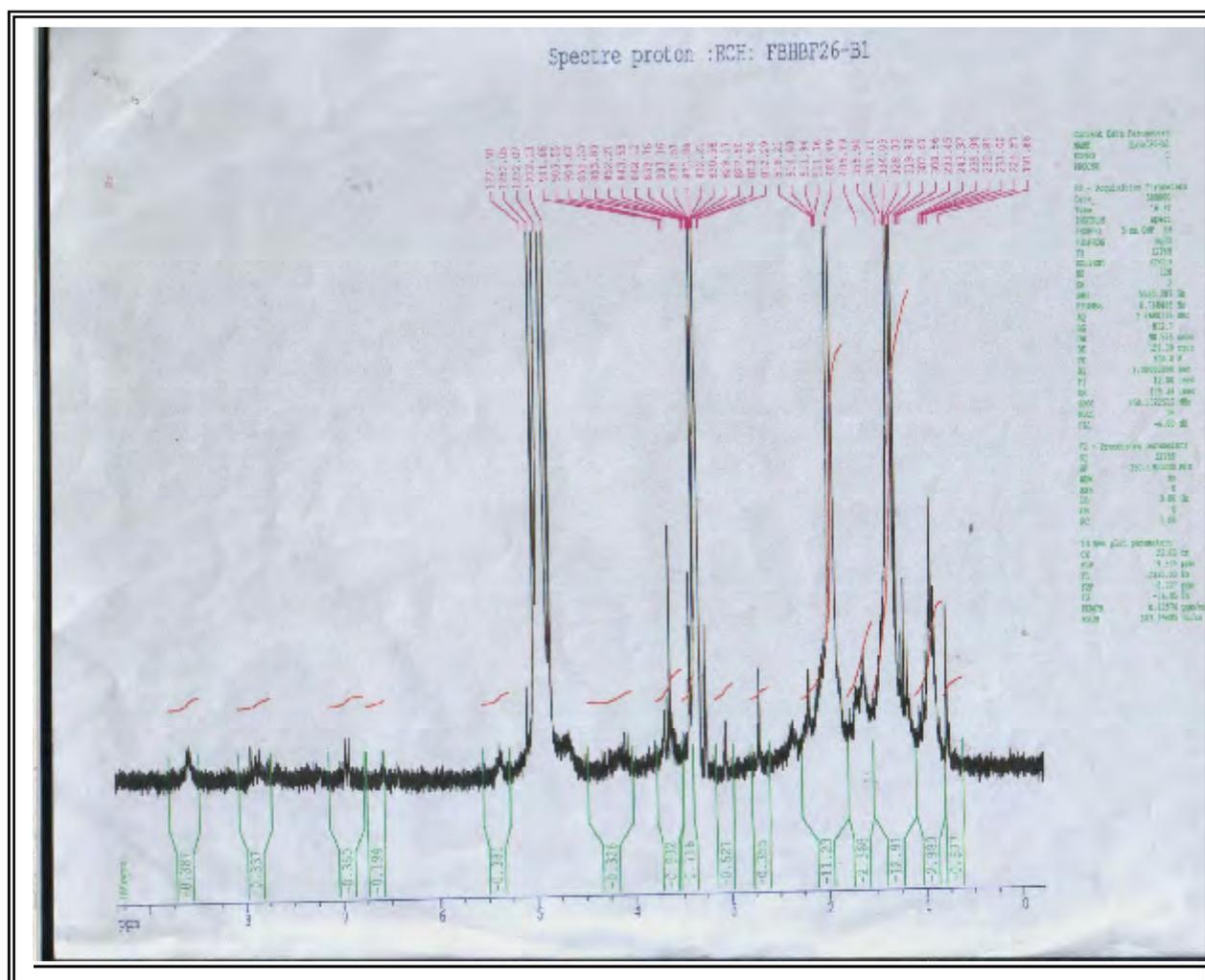
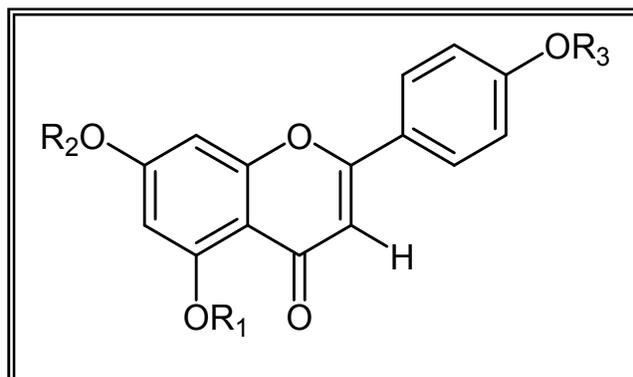
- Un singulet large à $\delta = 6,45$ ppm, attribuable à H-6

Ces données sont rassemblées dans le tableau 22

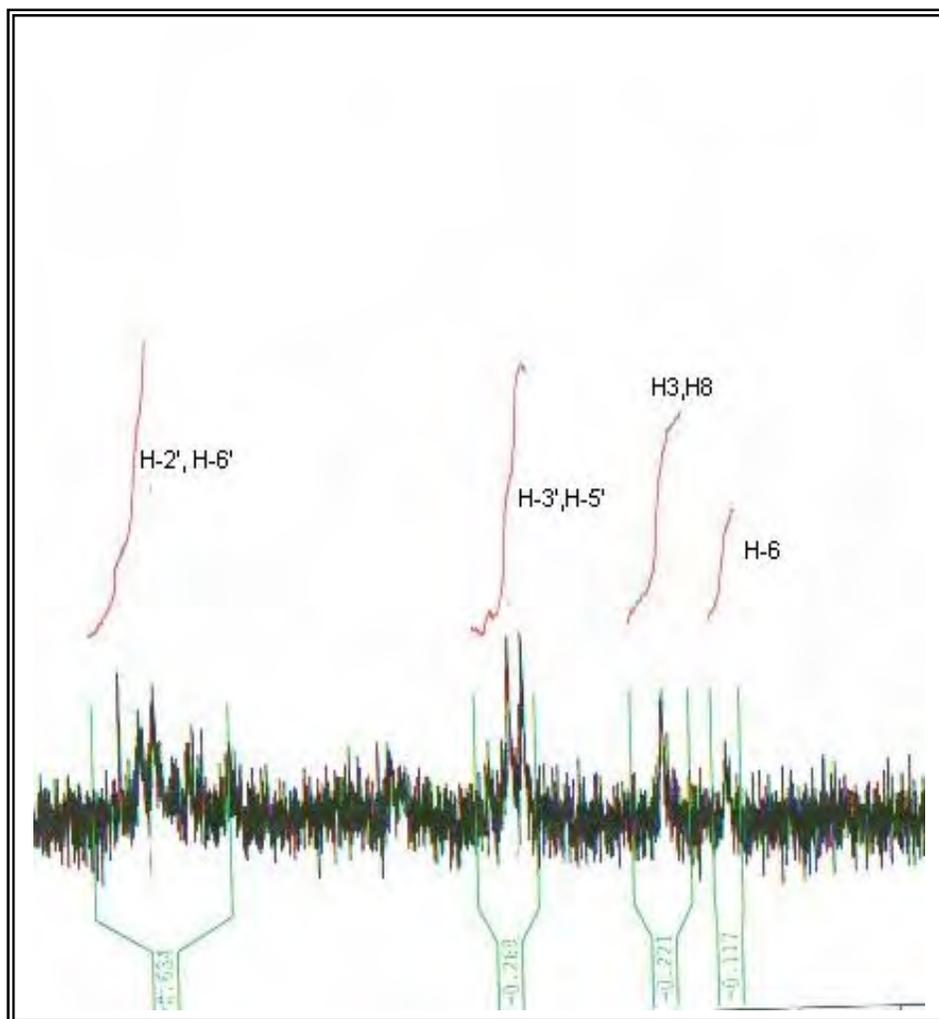
Les protons	Multiplicité	Déplacement (ppm)	J (Hz)
1-OCH ₃	s	3,37	/
H-2', H-6'	d	7,75	8,7
H-3', H-5'	d	6,97	8,7
H-3, H-8	s large	6,70	/
H-6	s large	6,45	/

Tableau 21 : Les résultats de la spectroscopie RMN ¹H (250 MHz ; MeOD)

Ces données mènent à la structure partielle suivante :



Spectre n°19 : RMN-¹H du composé F_{26-b1} (250 MHz ; MeOD)



Spectre n°20 : Etallement du spectre RMN ^{-1}H de la zone [6,4-7,8] ppm

❖ L'interprétation des résultats des spectres d'absorption l'UV-Visible :

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 22

Les REACTIFS	BANDE I (nm)	BANDE II (nm)	OBSERVATION
MeOH	340	270	FLAVONE
NaOH	393	270	Présence de 4'-OH
NaOH+ 5min	393	270	Spectre stable
AlCl ₃	384	270	Absence du système ortho di-OH sur le noyau B
(AlCl ₃ +HCl)	384	270	Présence de 5-OH
NaOAc	350	273	Absence de 7-OH
(NaOAc+H ₃ BO ₃)	350	273	Absence de système ortho di-OH

Tableau 22 : résultats de la série spectrale UV-Visible du composé F_{26-b1}

La fluorescence **noire-violette** du composé F_{26-b1} sous la lumière UV-Visible 365 nm et la valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le MeOH à 340 nm indiquent que le composé F_{26-b1} est une flavone.

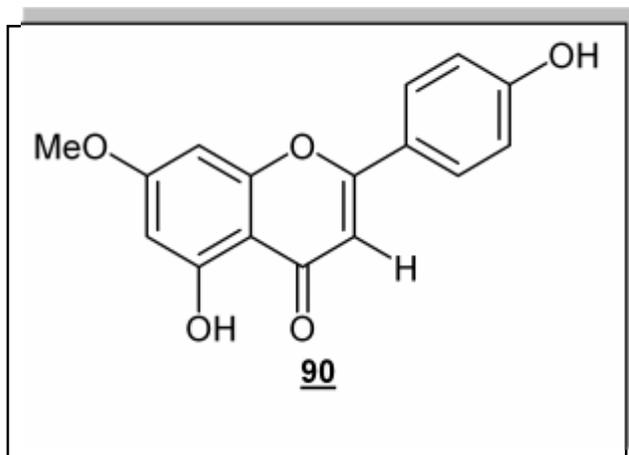
L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome + 53 nm de la bande I, avec une augmentation de l'intensité, ce qui indique l'existence d'un OH libre en position 4'.

La comparaison entre le spectre UV-Visible enregistré en présence de AlCl₃ est celui enregistré en présence de (AlCl₃+HCl) montre qu'il n'y a pas de changement notable entre les deux spectres. En déduit qu'il n'y a pas de système ortho di hydroxyle sur le noyau B.

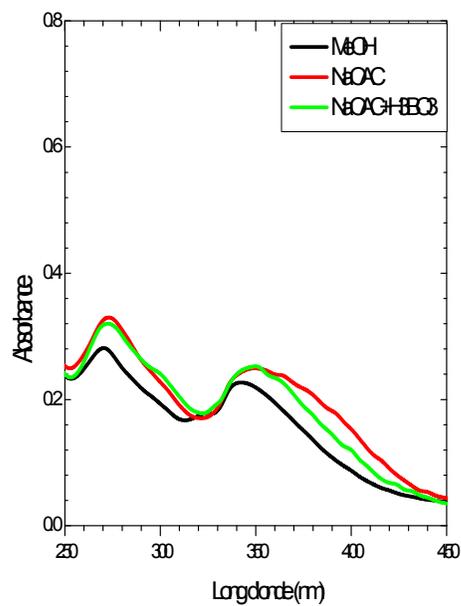
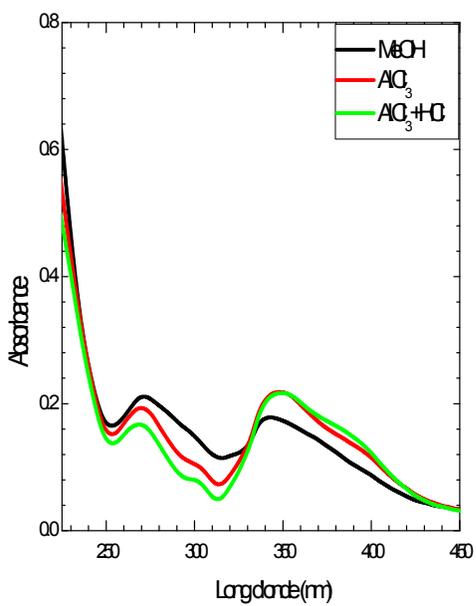
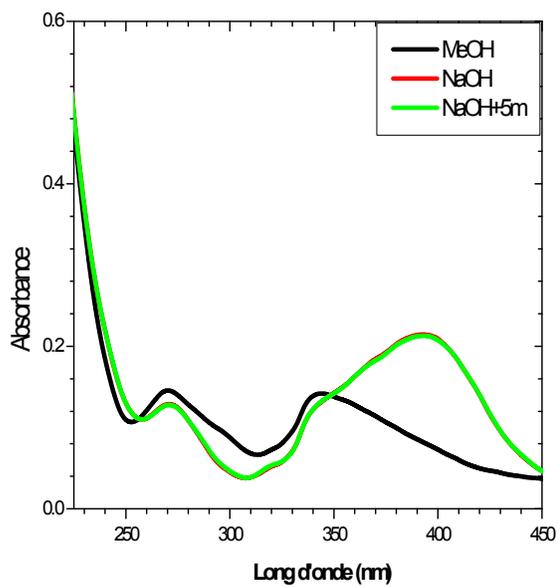
Par contre le spectre en présence de (AlCl₃ + HCl), montre un déplacement bathochrome de 44 nm, de la bande I comparé au spectre enregistré dans le MeOH. Ceci est en faveur de la présence d'un OH libre en C-5.

Cette dernière donnée, permet de placer le méthoxyle en C-7.

Les données de la spectroscopie d'absorption UV et les résultats de la RMN mènent à la structure suivante pour le composé F_{26-b1} :



5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (Genkwanin) 90 [117]



Série spectrale UV-Visible du compos F_{26-b1}

IV-5- Identification du composé F_{26-b2} :

❖ La fluorescence :

Le composé F_{26-b2} caractérisé par une couleur noire-violette sous lumière UV 365 nm, est soit une flavone ou un flavonol 3-OR.

❖ Spectroscopie de RMN ¹H :

L'interprétation des signaux du spectre RMN ¹H (spectre n°21) est la suivante :

- Une para substitution du noyau B, caractérisée par :

Un doublet à $\delta = 7,80$ ppm, avec la constante de couplage $J = 8,8$ Hz, caractéristique de H-2' et H-6' et un doublet à $\delta = 6,90$ ppm, avec $J = 8,8$ Hz attribuable à H-3' et H-5'.

- Un singulet à $\delta = 6,60$ ppm, attribuable à H-3.

- Un singulet large à $\delta = 6,30$ ppm, attribuable à H-8.

- Un singulet large à $\delta = 5,70$ ppm, attribuable à H-6.

- Un singulet à $\delta = 3,75$ ppm, caractéristique du groupement méthoxyle.

Le tableau 23 rassemble les données du spectre du RMN ¹H

Les protons	Multiplicité	Déplacement (ppm)	J (Hz)
1-OCH ₃	s	3,75	/
H-2', H-6'	d	7,80	8,80
H-3', H-5'	d	6,90	8,80
H-3	s	6,60	/
H-8	s large	6,30	/
H-6	s large	5,70	/

Tableau 23 : Les données de la RMN- ¹H du composé F_{26-b2} (250 MHz ; MeOD)

❖ L'interprétation des résultats des spectres d'absorption de l'UV-Visible :

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 24

Les REACTIFS	BANDE I (nm)	BANDE II (nm)	OBSERVATION
MeOH	340	272	FLAVONE
NaOH	395	276	Présence de 4'-OH
NaOH+ 5min	395	276	Spectre stable
AlCl ₃	346	274	Pas de système ortho di - OH
(AlCl ₃ +HCl)	350	275	Pas de 5-OH
NaOAc	356	273	/
(NaOAc+H ₃ BO ₃)	339	273	Absence de système ortho di-OH

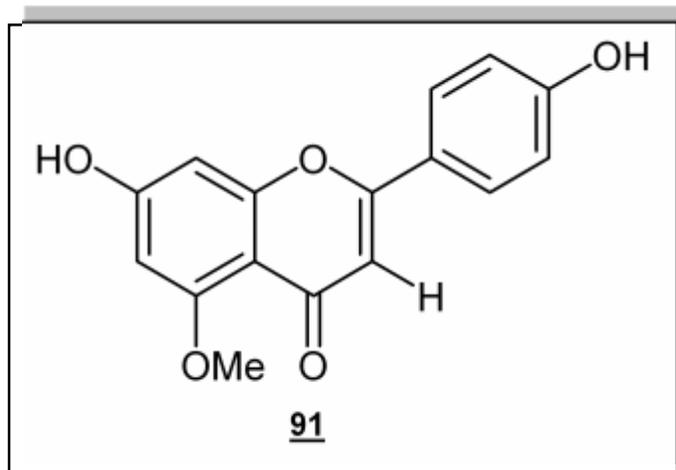
Tableau 24 : Résultats de la série spectrale UV-Visible du composé F_{26-b2}

La fluorescence noire-violette du produit F_{26-b2} sous lumière UV 365 nm et la valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le MeOH à 340 nm indiquent que F_{26-b1} est une flavone.

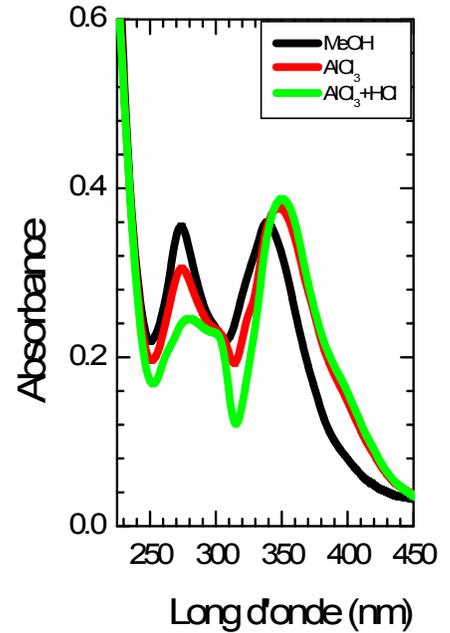
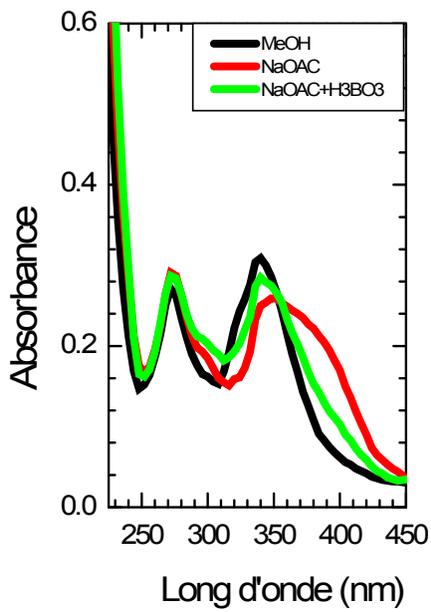
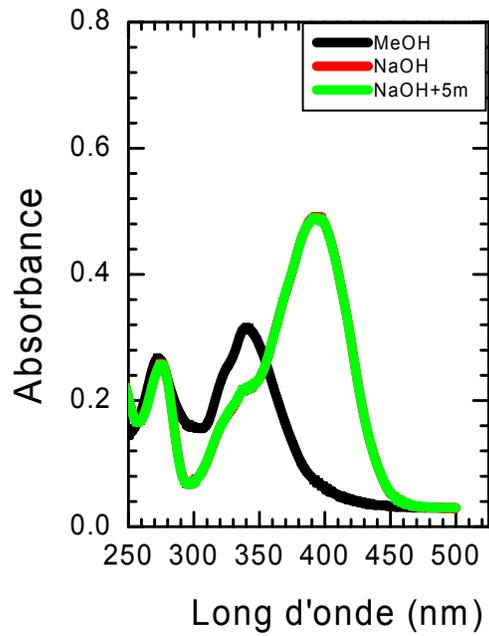
L'addition du réactif NaOH, conduisant à un déplacement bathochrome de + 55 nm de la bande I, avec une augmentation de l'intensité, indique l'existence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 339 nm, montre également l'existence d'un OH libre en position 7.

La comparaison du spectre enregistré en présence de (AlCl₃+HCl) avec celui enregistré dans le MeOH, montre que la bande I a subi un faible déplacement bathochrome, ce qui est en faveur de l'absence d'un OH en C-5.

La combinaison de l'ensemble des données permettant de placer le groupement méthoxyle en position C-5 ; mène à la structure suivante pour le composé F_{26-b2} :



7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavone 91



Série spectrale UV-Visible du compos F_{26-b2}

Conclusion :

Notre travail chromatographique a permis, la séparation et la purification de six produits purs et natifs dont quatre ont été déterminées :

Il s'agit :

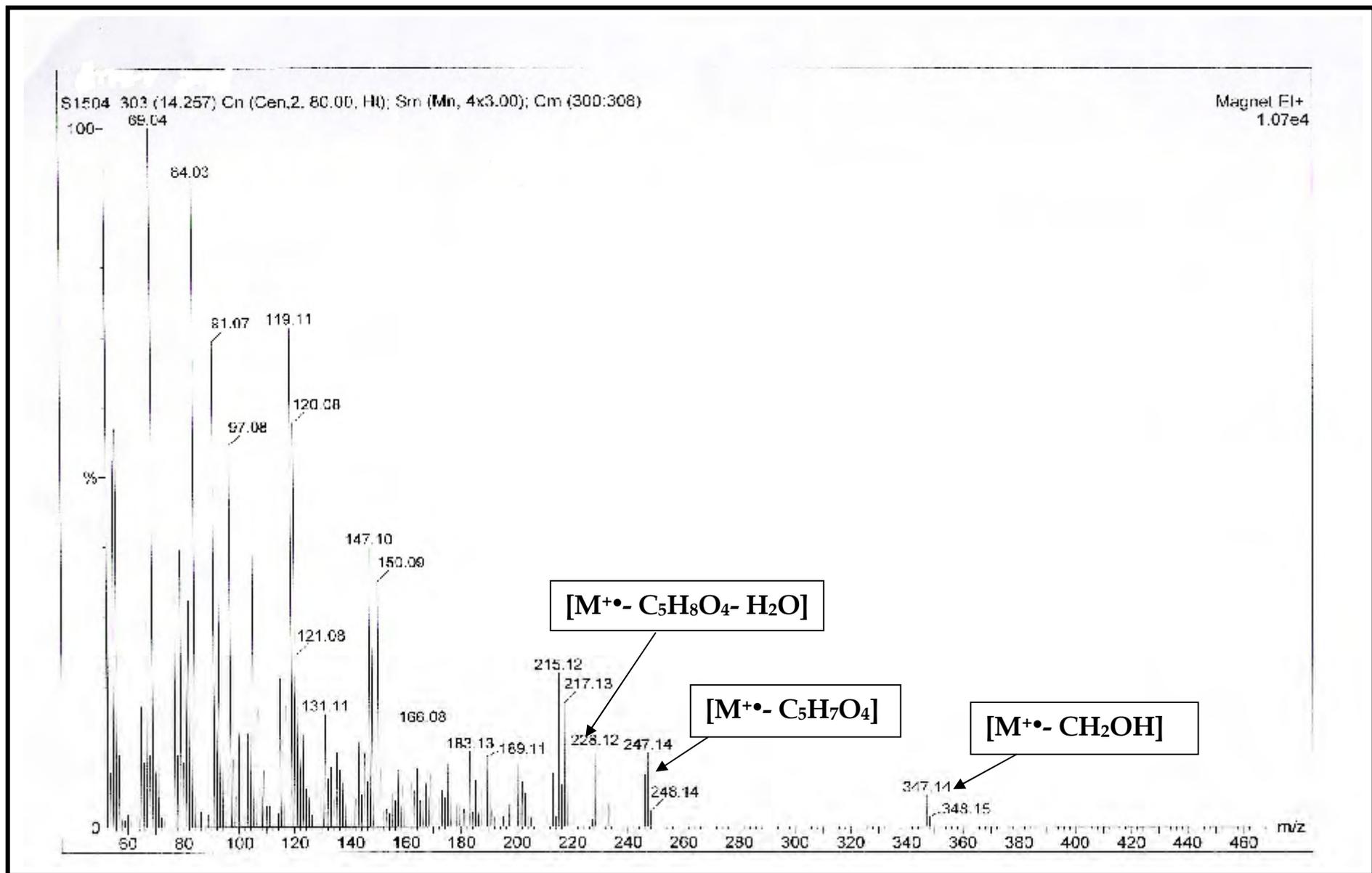
1)- d'une lactone sesquiterpénique : **la cnicine**

2)- trois flavonoïdes de type flavones :

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone

7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavone

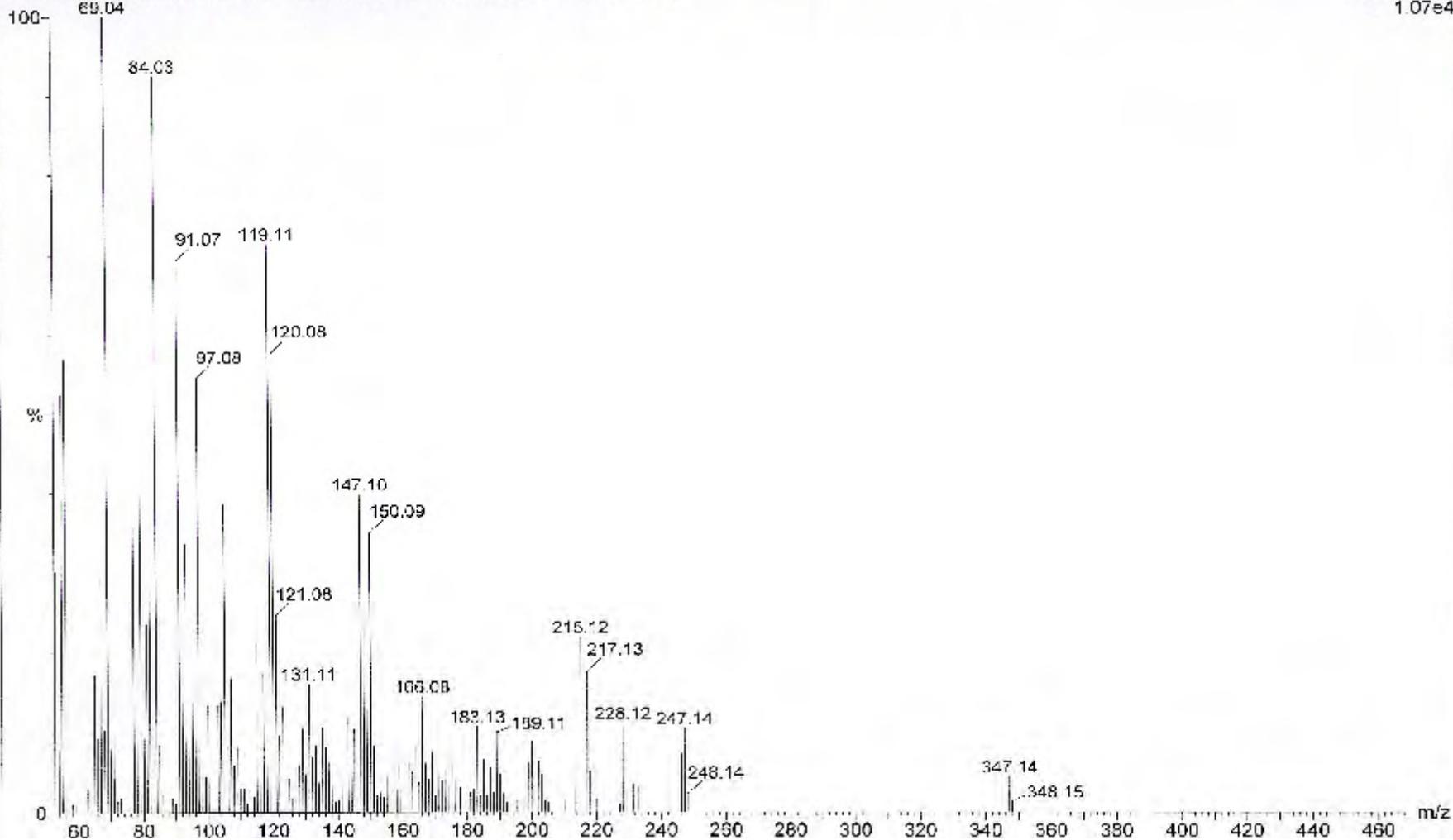
5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (Genkwanin)



Spectre n°8 : SMIE du composé F₄₁

S1504 303 (14.257) Cn (Cen.2, 80.00, HI); Sm (Mn, 4x3.00); Cm (300:308)

Magnet E+
1.07e4



Conclusion Générale

Ce travail à caractère phytochimique et structural portant sur l'investigation de la phase chloroforme de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* Desf. (Compositae) effectué en complément d'une étude réalisée dans notre laboratoire a permis l'isolement et l'établissement des structures de quatre composés.

Il s'agit d'une lactone sesquiterpénique **la cnicine**. Et de trois flavonoïdes de type flavone :

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone

7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavone

5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (Genkwanin)

Les structures ont été établies par la combinaison des données de RMN-¹H, RMN -¹³C, des expériences de la RMN bidimensionnelles et de spectrométrie de masse en mode FAB et Impact électronique. Dans le cas des flavonoïdes l'utilisation de la spectroscopie d'absorption ultraviolette a été nécessaire.

Références bibliographiques :

- [1] <http://www.home.tiscali.be/jp.boseret/les-plantes-médicinales.htm>
- [2] <http://www.acu.ch>
- [3] <http://www.memo.fr>
- [4] http://www.plantes_médicinales_ces_«_éternelle_»_amies_de_l'homme_phytothérapie_une_médecine_ancienne_toujours_attrayante.htm
- [5] <http://www.egyptos.net>
- [6] <http://www.perso.orange.fr/medecorient/imfor.htm>
- [7] <http://www.mediterranean.htm>
- [8] BELOUED, A. (1998), Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publications Universitaires, 277.
- [9] BABA AISSA, F. (1999), Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edas, 368.
- [10] <http://www.philalgerie.com>
- [11] MENZ, J., WINKELMANN, R. K. (1987), Contact dermatitis, **16**, 169.
- [12] TREASE, G. F. and EVANS, W. C. (1983), Pharmacognosy, 225, 514, Baillière, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong.
- [13] QUEZEL, P. et SANTA, S. (1963), Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, CNRS, Paris.
- [14] FLAMINI, G., BULLERI, C., BULLERI, C., MORELLI, I. and MANUNTA, A. (2000), A New Flavonoid Glycoside from *Centaurea horrida*, J. Nat. Prod., **63**, 622-663.
- [15] BOHLMAN, F., BURKHARDT, T. and ZDERO, C. (1973), Naturally Occuring Acetylenes, Academic Press, London, 452.
- [16] FORTUNA, A. M., RISCALA, E. C., CATALAN, C. A. N., GEDRIS, T. E. and HERZ, W. (2001), Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*, Biochemical Systematics and Ecology, **29**, 967-971.

- [17] AHMED, Z. F., HAMMOUD, F. M., RIZK, A. M. and ISMAIL, S. L. (1970), *Planta Med.*, **18**, 227-231.
- [18] PICHER, M., SAVANE, T. and AMPARA, T. J. (1984), *J. Nat. Prod.*, **47**, 184-185.
- [19] BELTRAN, F., VIGUERA, J. M. and CASABUENA, A. (1950), *Farmacognosia*, **10**, 197.
- [20] MEDJROUBI, K. (1999), Thèse de doctorat d'état, Université de Constantine.
- [21] ACLINO, P., BOUKERB, A., BOUQUANT, J., MASSIOT, G. et MEN-OLIVIER, L. (1982), *Plantes des Aurès, Constituants des racines de C. incana, Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 303-309.
- [22] NEGRETTE, R. E., LAIORRE, I., BACKHOUSE, N., PERSA, R. and DELAPOTE, C. (1988), *Plantes Médicinales et phytothérapie*, **53**, 503.
- [23] GONZALE, A. G., BERMEJO-BARRERA, J., GARCIA, T. Z. and ROSAS, F. E. (1984), *Sesquiterpene lactones from Centaurea species. Phytochemistry*, **23**, 2071-2072.
- [24] BARRERO, A. F., SANCHEZ, J. F., RODRIQUEZ, I. and SORIA SANZ, C. (1988), *Germacranolidas de Centaurea malacitana. An. Quim.*, **84**, C 344-347.
- [25] TESEVIC, V., VAJS, V., TODOROVIC, N., DOKOVIC, D., MARIN, P. and MILOSAVLJEVIC, S. (1998), *Sesquiterpene lactones from Plant species Centaurea solstitialis L., J. Serb. Chem. Soc.*, **63**, 131-135.
- [26] VAJS, V., TODOROVIC, N., RISTIC, M., TESEVIC, V., TODOROVIC, B., JANACKOVIC, P., MARIN, P. and MILOSAVLJEVIC, S. (1999), *Guaianolides from Centaurea nicolai. Antifungal Activity, Phytochemistry*, **52**, 383-386.
- [27] SKAL TSA, H., LAZARI, D., GARCIA, B. and PEDRO, J.R. (2000), *Sesquiterpene lactones from Centaurea achaia. A Greek endemique species, Antifungal Activity, Z. Naturforsch.*, **55c**, 543-539.
- [28] BRUNO, M., MAGGIO, A., PATERNOSTRO, M.P., ROSSELLI, S., ARNOLD, N. A. and HERZ, W. (2001), *Sesquiterpene lactones and other constituents from three Cardueae from Cyprus. Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 433-435.
- [29] GAYON, R. R. (1968), *les Composés Phénoliques des végétaux*, Donod, Paris.

- [30] ORALLO, F., LAMELA, M., CAMINA, M., URIATRE, E. and CALLEJA, J. M. (1998), Preliminary Study of the Potential Vasodilator Effects on Rat Aorta of Centaurein and Centaureidin, Two Flavonoids From *Centaurea corcubionensis*. *Planta Med.*, **64**, 116-119.
- [31] BRUNO, M. And HERZ, W. (1988), Sesquiterpene lactones and Flavonoids from *Centaurea cineraria* Subsp. *Umbrosa*, *Phytochemistry*, **27**, 1873-1875.
- [32] KLAAS, C. A., WAGNER, G., LAUFER, S., SOSA, S., LOGGIA, R. D., BOMME, U., PAHL, H. L. and MERFORT, I. (2002), Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers, *Planta Med.*, **68**, 385-391.
- [33] BRUNETON, J. (1999), *Pharmacognosie*, 3^e édition, Tec et Doc, Paris, 310, 316, 619, 620.
- [34] RUZICKA, L. (1953), The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compound, *Experientia*, **9**, 357.
- [35] RUZICKA, L. (1959), Faraday Lecture-History of the Isoprene Rule, *Proc. Chem. Soc.*, 341, London.
- [36] HENDRICKSON, J. B. (1959), Stereochemical Implications in Sesquiterpenes Biogenesis, *Tetrahedron*, **7**, 82.
- [37] CORDELL, G. A. (1976), Biosynthesis of sesquiterpenes, *Chem. Rev.*, **76**, 425.
- [38] GEISSAMAN, T. A. and CROUT, D. H. G. (1969), *Organic Chemistry on Secondary Plant Metabolism*, San Fransisco: Freeman, Cooper and Co.
- [39] GEISSMAN, T. A. (1973), The Biosynthesis of sesquiterpene Lactones of the Compositae, In: *Recent Advances in Phytochemistry* (RUNECKLES, V. C. and MABRY, T. J., Eds.), Vol., **6**, p65, New York and London Academic Press.
- [40] HERZ, W. (1971), Sesquiterpene lactones in Compositae, *Pharmacognosie and Phytochem.* (Wien: Springer), 1972, *Chem. Abstr.*, **76**, 59761 W.
- [41] HERZ, W. (1977), Biogenetic Aspects of Sesquiterpene Lactones Chemistry. *Israel J. Chem.*, **16**, 32.
- [42] PARKER, W., ROBERTS, J. S. and RAMAGE, R. (1967), Sesquiterpene Biogenesis, *Quert. Rev.*, **21**, 311, (Chem.Soc.London).
- [43] NOVAK, G. (1993), *J. Chromatographia*, **35**, 325.

- [44] DROŹDŹ, B. (1967), *Driss. Pharmac. Pharmacol*, **19**, 223.
- [45] DROŹDŹ, B. (1967), *Driss. Pharmac. Pharmacol*, **20**, 223.
- [46] MAC LAFFERTY. (1980), *Interpretation of mass spectra*, 3^{ème} edition,.
- [47] QUINTERO, A., PLCASTRE, A. And SOLANO, J. D. (1999), *Antitumoral Activity of New Pyridine Derivatives of Sesquiterpene lactones*, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **2**, 108-112.
- [48] DIRSCH, V. M., STUPPNER, H. and VOLLNAR, A. M. (2001), *Cytotoxic sesquiterpene Lactones Mediate Their Death-Inducing Effect in Leukemia T Cells by Triggering Apoptosis*, *Planta Med.*, **67**, 557-559.
- [49] JARVIS, B. B., STAHLY, G. P. et CURTIS, C. R. (1978), *Cancer, Treat. Rep.*, **62**, 1585-1586.
- [50] CHUNG, H. S. (2001), *Guaianolide Sesquiterpene Lactone from *Ixeris sonchifolia* Hance with Cytotoxicity in Cultured Human Stomach and Colon Cancer Cell Lines*, *Food Sci. Biotechnol.*, **10**, 433-436.
- [51] YSRAEL, M. C. and GROFT, K. D. (1990), *Planta Med.*, **56**, 268.
- [52] CHO, J. Y., BAIK, K. U., JUNG, J. H. and PARK, M. H. (2000), *In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, sesquiterpene lactones, from *Saussura lappa**, *Pharmacology*, **398**, 399-407.
- [53] HERNANDEZ, V., RECIO, M. D. C., MANEZ, S., PRIETO, J. M., GINER, R. M. and RIOS, J. L. (2001), *A Mechanistic Approach to the in vitro Ant-Inflammatory Activity of Sesquiterpenoids Compounds Isolated from *Inula viscosa**, *Planta Med.*, **67**, 726-731.
- [54] ZIDRON, C., DIESCH, V. M., RÜNGELER, P., SOSA, S., LOGGIA, R. D., MERFORT, I., PAHL, H. L., VOLLMAR, A. M. and STUPPNER, H. (1999), *Ant-Inflammatory Of Activies hypocretenolides from *Leontodon hispidus**, *Planta Med.*, **65**, 704-708.
- [55] GROENEWEGEN, W. A., KNICHT, D. W. and HEPTINSTALL, S. (1986), *Compounds extracted from *Feverfew* that have anti-secretory activity contain an alpha-mathylene-butylolactone unit*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 709-712.
- [56] KUBO, I., CHAUDHURI, S. K., KUBO, Y., SANCHEZ, Y., OGURA, T., SAITO, T., TSHIKAWA, H. and HARAGUCHI, H. (1996), *Planta Med.*, **62**, 427-430.
- [57] WEDGE, D. E., GALINDO, J. C. G. and MACIAS, F. A. (2000), *Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactones analogs*, *Phytochemistry*, **53**, 747-757.

- [58] GÖREN, N., JAKUPOPOVIC, J. and TAPUL, S. (1990), *Phytochemistry*, **53**, 803.
- [59] MAOZ, M., KASHMAN, Y. and NEEMAN, J. (1999), *Planta Med.*, **53**, 803.
- [60] GIORDANO, O. S., PESTCHANKLR, M. J., GURREIRO, E., SAAD, J. R., ENRIZ, R. D., RODRIGUEZ, A. M., JAUREGUI, E. A., GUZMAN, J., MARIA, A. O. and WENDEL, G. H. (1992), Structure-Activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several Sesquiterpene lactones, *J. Med. Chem.*, **35**, 2452-2458.
- [61] AL-YAHYA, M. A., KHAFAGY, S., SHIHATA, A., KOSLOWSKI, J. F., ANTOUN M. D., CASSADY, J. M. (1987), *Planta Med.*, **53**, 153.
- [62] KUPCHAN, S. M., FUJITA, T., MARUYAMA, M., BRITTON, R. W. (1991), *J. Med. Chem.*, **34**, 54.
- [63] JANG, D. S., YANG, M. S., HA, T. J., PARK, K. H. (1998), *Phytochemistry*, **49**, 157.
- [64] LONERGAN, G., ROUTIS, E., GEORGIADIS, T., AGELIS, G., HONDRELIS, J., MATSOUKAS, J., LARSEN, L. K., CAPLAN, F. R. (1992), *J. Nat. Prod.*, **55**, 225.
- [65] BURIM, R.V., CANALLE, R., LOPES, J. L., VICHNEWSKI, W., TAKAHASHI, C. S. (2001), TETRADOX CARCINOGEN MUTAGEN, **21**, 383.
- [66] BARBETTI, P., FARDELLA, G., CHIAPPINI, I., SCARCIA, V., CANDIANI, A. F. (1985), *FARMACO [Sci]*, **40**, 755.
- [67] MEZACHE, N. (2002), Thèse de magister, Université de Constantine.
- [68] RAMOS, A., RIVERO, R., VISOZO, A., PILOTO, J., GARCIA, A. (2002), *Muta Res*, **514**, 19.
- [69] HLADON, B., DROZDZ, B., HOLUB, M., SZAFAREK, P., KLIMASZEWSKA, O. (1975), *Arch Immunol Ther Exp*, **23**, 845.
- [70] MEDJROUBI, K., BOUDERDARA, N., BENAYACHE, F., AKKAL, S., SEGUIN, E., TILLEQUIN, F. (2003), Sesquiterpene Lactones of *Centaurea Nicaensis*, *Chemistry of Natural Compounds*, **39**, 506-507
- [71] BENTAMENE, A., BENAYACHE, S., CRECHE, J., PETIT, G., BERMEJO-BARRERA, J., LEON, F., BENAYACHE, F. (2005), A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 1061-1065
- [72] MEDJROUBI, K., BENAYACHE, F., LEON, F. and BERMEJO-BARRERA, J. (2003), Complete assignment of the ^{13}C and ^1H NMR spectra of two known guaianolides

isolated from *Centaurea musimomum.*, Revista Colombiana de Quimica, **32**, 17.

- [73] CASLEY-SMITH, J. R., R. G. et PILLER, N. B. (1993), Treatment of Lymphedema of the Arms and Legs with 5, 6-Benzo- α -pyrone, New Engel. J. Med., **329**, 1158-1163.
- [74] FUJIOKA, T., FURUMI, K., FUJII, H., OKABE, H., MIHASHI, K., NAKANO, Y., MATSUNGA, H., KATANO, M. et MORI, M. (1999), Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*. Chem. Pharm. Bull, **47**,96-100.
- [75] CHEN, Y. F., TSAI, H.Y. et WU, T. S. (1995), Anti-Inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*. Planta Med., **61**, 2-8.
- [76] GARCIA-AGAEZ, A. N., APAN, T. O. R., DELGADO, H. P., VELAZQUEZ, G. et MAETINEZ-VAZQUEZ, M. (2000), Anti-Inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. Planta Med., **66**, 279-281.
- [77] RESCH, M., STEIGEL, A., CHEM, Z. L. et BAUER, R. (1998), 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase- 1 inhibitory active compounds from *Atratyloides lancea*. J. Nat. Prod., **61**, 347-350.
- [78] YOSHIKAWA, M., HARADA, E., NAITOH, Y., INOUE, K., MATSOUDA, H., SHIMODA, H., YAMAHARA, J. et MURAKAMI, N. (1994), Developpement of bioactive Function in *Hydrangeae dulcis folium*. III. On the antiallergic and antimicrobial Principles of *Hydrangeae dulcis folium* Chem. Pharm. Bull, **42**, 2225-2230.
- [79] KAYSER, O. et KOLODZIEJ, H. (1997), Antibacterial activity of extrats and constituents of *Pelargomun sidoides* and *Plelargonium reniforme*. Planta Med., **63**, 509-510.
- [80] EGAN, D., O'KENNEDY, R., MORAN, E., COX, D., PROSSER, E. et THORNES, D. (1990), The pharmacology, methabolism, analysis and applications of coumarin-related compounds Drug Metabolism Reviews., **22**, 503-529.
- [81] RIBEREAU-GAYON, P. (1968), Les composés phénoliques des végétaux.
- [82] GUIGNARD, J. L., COSSON, L., HERY, M. (1985), Abrégé de phytochimie, Paris, New York, Barcelone.
- [83] GRISEBACH, H., Z. Naturf., **57**,126-227.
- [84] BOHM, B. A. (1965), In encyclopadia of plant physiology. W. Rehland Editeur

Springer Verlag Berlin.

- [85] DAVIS, B. D. (1955), *Advanced in enzymology*, **16**, 247.
- [86] GRISEBAH, H. (1965), *chemistry and biochemistry of plant pigments*, T. W. GOODWIN, Academic Press, New-York
- [87] ANDERSON, R. A. and SOWERS, J. A. (1968), *Phytochemistry*, **7**, 115-126.
- [88] ENDRES, H. and HORMANN, H., *Angew. Chem.*, (1963), **2**, 254, Ed. intrnatl.
- [89] HARBORNE, J. B. (1973), *Phytochemical Methods*, CHAPMAN and HALL, London.
- [90] LOISELEUR, J. (1973), *Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique*, Tome 1, Editeurs MASSON et CIE
- [91] VERNIN, G. (1970), *La chromatographie en couche mince, Techniques et application en chimie organiques*, Dunod, Paris.
- [92] MARKHAM, K. R. (1982), *Techniques of flavonoids identification*, Academic press, London.
- [93] HARBORNE, J. B., MABRY, T.J. and MABRY, H. (1975), *The flavonoids*, Tome I, Tome II, CHAPMAN and HALL, London.
- [94] MABRY, T. J., MAKHAM K, R. and THOMAS, M. B. (1970), *The systematic identification of flavonoids*, p. 12 et 35-230. Springer-Verlag, New York. Heidelberg. Berlin.
- [95] JURD, L. (1962), *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (GEISSMAN, T. A. Ed), 107-155, Pergamon Press, Oxford.
- [96] MARKHAM, K.R. (1989), *Method in plant biochemistry*, **1**, 197-235, Academic Press. London
- [97] BACON, J.D. and MABRY, T. A., *UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols.* (1976), *Rev. Latinoamer, Quim*, **7**, 83-86.
- [98] JURD L. and HOROWRIT, R. (1962), *Spectral properties of flavonoid compounds*, in *The chemistry of flavonoid compounds*, edited by T.A. GEISSMAN, Pergamon Press, New York, 107-155.
- [99] COMBIER, H. (1968), *Thèse de doctorat, Université de Lyon.*
- [100] JURD, L. and GEISSMAN, T. A. (1956), *J. Org. Chem*, **21**, 395.
- [101] NIELSON, J. G. et MOLLER, J. (1970), *Acta. Chem. Scand*, **24**, 2665

- [102] MARKHAM, K. R. (1989), Flavones, flavonols and their glycosides, in "Methods in plant biochemistry", (P.P. DEY and J.B. HARBORNE), 197-232. Academic press.
- [103] PAWAN, K. A. (1992), *Phytochemistry*, **10**, 3307-3330.
- [104] MARKHAM, E. R. et GEIGER, H. (1994), H^1 NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *Flavonoids*, HARBORNE, J. B. (1993), CHAPMAN and HALL, London.
- [105] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N. J., BOLWER, P.G., BRAMLEY, P.M. and RIDHAM, J.B. (1995), The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.*, **22**, 375-383.
- [106] COOK, M.C. and SAMMAN, S. (1996), Flavonoids chemistry, Metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**.
- [107] DIXON, R.A., DEY, P. M. and LAMB, C. J. (1983), Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol.*, **55**, 1-136.
- [108] COWAN, M. M. (1999), Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 564-582.
- [109] RECIO, M.C., RIOS, J. L. and VILLAR, A. (1989), A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phototherapy. Res.*, **3**, 117-125.
- [110] AKKAL, S., BENAYACHE, F., BENAYACHE, S. and JAY, M. (1997), *Biochemical Systematics and Ecology*, 361-362.
- [111] BENTAMENE, A. (1997), Thèse de magister, Université de Constantine.
- [112] BENCHERAIT, R. (1989), Thèse de magister, Université de Constantine.
- [113] BOUBEKRI, C. (2003), Thèse de magister, Université de Constantine.
- [114] BRUNO, M. and HERZ, W. (1988), *Phytochemistry*, **27**, 1873.
- [115] TOMAS-LORENTE, F., FERRERES, F., BARBERAN, A. T., RIVERA, D. And OBEN, C. (1989), *Phytochemistry*, **28**, 2141.
- [116] AGRAWAL, R. K. (1989), *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Amsterdam, Oxford, New-York, Tokyo.
- [117] AHMED, Z. F., RIMPLER, H., HAMOUDA, F. M. and ISMAIL, S. I. (1970), *Phytochemistry*, **9**, 1595.

Résumé

Notre but dans ce travail, est d'isoler et de déterminer des métabolites secondaires contenus dans la phase chloroforme de l'extrait hydroéthanolique de *Centaurea parviflora* (Compositae), une espèce poussant en Algérie et en Tunisie.

Notre choix repose sur le fait que le genre *Centaurea* a montré d'une part qu'il est doué d'activités biologiques et d'autre part que c'est un excellent accumulateur de molécules de type lactones sesquiterpéniques et flavoniques, des classes de substances naturelles qui ont montré des activités biologiques diverses notamment cytotoxique pour les premières et antioxydante pour les secondes.

Après macération des parties aériennes de *C. parviflora* dans une solution éthanol-eau (7 :3), filtration, concentration, précipitation de chlorophylle au tétra acétate de plomb et affrontement au CHCl_3 , la phase organique, est séchée, concentrée et soumise aux séparations et purifications par chromatographies liquides (colonne, CCM).

A cette étape de notre étude, les travaux ont mené à l'isolement et la purification de quatre produits natifs :

-Une lactone sesquiterpénique **la cnicine**.

- trois flavonoïdes de type flavones :

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone

7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavone

5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (Genkwanin)

Les structures ont été établies par la combinaison des données de RMN¹H, RMN ¹³C, des expériences de la RMN bidimensionnelle et la spectrométrie de masse en mode FAB⁺ et Impact électronique. Dans le cas des flavonoïdes, l'utilisation de la spectroscopie d'absorption ultraviolette a été nécessaire.

Mots clés :

Lactone sesquiterpénique, flavonoïdes, *Centaurea parviflora*, Compositae

Summary:

Our aim in this work was, the isolation and the structural determination of the secondary metabolites in the chloroform soluble part of the aqueous-ethanol extract of the aerial parts of *Centaurea parviflora* (Compositae), a species growing in Algeria and in Tunisia.

Our choices of the genus *Centaurea* was based on the fact that, these plants exhibit a wide range of biological activities and were known to contain sesquiterpene lactones and flavonoids.

These two classes of natural compounds showed several biological activities notably cytotoxic for the first one and antioxidant for the second.

After extraction with water - ethanol of the aerial parts of *C. parviflora*, filtration, concentration and precipitation of chlorophyll with lead tetra acetate, the yellowish solution was reextracted with chloroform. The organic phase was dried, concentrated and submitted to liquid chromatographic methods giving four native and pur natural compounds, namely:

- A sesquiterpene lactone: cnicin

- Three flavonoids:

5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone

7, 4'-dihydroxy-5-methoxyflavone

5, 4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (Genkwanin)

The structures were established by modern spectroscopic methods notably IR, mass spectrometry, ¹H NMR, ¹³C NMR and 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC...) In the case of flavonoids the use of the ultraviolet absorption spectroscopy was necessary.

Key words: Sesquiterpene lactones, flavonoids, *Centaurea parviflora*, Compositae.