

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

UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série:

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle (LMD)

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Option : Analyse physicochimique, contrôle de la qualité et synthèse de substances bioactives

Par

Mme AZZOUZI Djihane

Thème

**Investigation phytochimique et recherche d'activité  
biologique de deux espèces du genre *Centaurea*  
(Asteraceae)**

Devant le jury:

<b>Pr. Fadila BENAYACHE</b>	Université des frères Mentouri, Constantine 1	<b>Présidente</b>
<b>Pr. Ratiba MEKKIOU</b>	Université des frères Mentouri, Constantine 1	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Smail KHELLILI</b>	Université Mohammad Seddik Benyahia, Jijel	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Ouahiba BOUMAZA</b>	Université des frères Mentouri, Constantine 1	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. Souad AMEDDAH</b>	Université des frères Mentouri, Constantine 1	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. Fatma BITAM</b>	Université El Hadj Lakhdar, Batna	<b>Examinatrice</b>

Soutenue le 30/01/2017

## *Dédicaces*

*À mes très chers parents qui m'ont soutenu et  
encouragé durant toute la période de mes études et  
à qui je souhaite une longue et heureuse vie,*

*À mon cher mari Ahmed qui m'a tant soutenu*

*À ma fille Tala Ranime*

*À mes sœurs: Nihad, Rimeh et mon frère Yecer*

*À ma famille*

*À tous mes amis et collègues*

*Djihane*

## *Remerciements*

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout-puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

*J'*ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), sous la direction du professeur **Samir Benayache**, à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour la réalisation de l'analyse de l'huile essentielle.

*M*es remerciements les plus sincères en direction de Madame **Ratiba Mekkiou** professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses conseils, ses commentaires aussi sa bienveillance et son humour qui m'ont été fort utiles.

*Je* remercie sincèrement Madame le Professeur **Fadila Benayache**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide et ses conseils aussi pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

*J'*adresse également mes remerciements à Madame **Ouahiba Boumaza**, professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide, et pour avoir accepté de juger ce travail.

*J'*exprime mes vifs remerciements à Madame **Souad Amaddah**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide dans la partie de l'activité antioxydante ainsi que pour avoir accepté de faire partie du jury.

*M*es remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Smail Khellili**, de l'université Mohammad Seddik Benyahia (Jijel) et Madame le Professeur **Fatma Bitam** de l'université El Hadj Lakhdar (Batna) d'avoir accepté de juger ce travail.

*J'*exprime ma sincère reconnaissance au professeur **Ibrahim Demirtas** de l'université de Çankiri Karatekin, Türkiye qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pour un stage où j'ai effectué une partie de mes travaux. J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Ali Riza** pour son aide durant mon séjour en Türkiye.

*Je* remercie également Monsieur **Ramadane Seghiri**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1 pour son aide précieuse au cours de ce travail.

*Je* tiens à remercier Monsieur **Ahmed Menad**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1 pour son aide précieuse dans la partie de l'activité antioxydante.

*Je remercie également tous les membres du laboratoire et particulièrement Monsieur **Hicham Hazmoune** pour sa gentillesse et son aide précieuse.*

*Mes remerciements les plus forts reviennent également à ma famille qui m'a soutenu et qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire, je citerai mes parents, mes sœurs et mon frère et notamment mon mari pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles.*

## *Communications scientifiques*

La présente étude a été réalisée de octobre 2011 à juin 2015 au niveau de l'Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie, sous la direction de Pr. Ratiba Mekkiou. Les résultats de ce présent travail ont été partiellement publiés ou présentés sous forme de posters lors de congrès internationaux:

### **Publications**

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

**Azzouzi, D.**, Mekkiou, R., Demirtas, I., Gül, F., Seghiri, R., Boumaza, O., Benayache, S., Benayache, F., (2016), Qualitative and Quantitative Analysis of Polar Extract from *Centaurea fragilis* Dur. Using HPLC-TOF/MS, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(9): 1526-1528.

**Azzouzi, D.**, Bioud, K., Demirtas, I., Gül, F., Sarri, D., Benayache, S., Benayache, F., Mekkiou, R., (2016), Phenolic profile and antioxidant activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) extracts, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19: 1-6.

### **Posters**

**Azzouzi D.**, Mekkiou R., Seghiri R., Benayache F., Benayache S. "Extraction of Secondary Metabolites, Phytochemical Screening and Estimation of Total Phenolic content from *Centaurea* species (Asteraceae)". Presented at the 15th International Congress of The International Society for Ethnopharmacology, (Jordan), 05th -08th may 2015.

**Azzouzi D.**, Mekkiou R., Seghiri R., Benayache F., Benayache S. "Biological activity and phytochemical study of *Centaurea* species" Presented at the organizing committee of the 3rd International Congress of Biotechnology and Bio-Resources Valorisation (AT-BVBR) (Tunisia), 20th-23th march 2015.

**Azzouzi D.**, Bencharchar I., Mekkiou R., Benayache F., Benayache S. "Phytochemical screening and Estimation of total phenolic content in polar extracts from *Centaurea* species (Asreraceae)". Presented at the 5th International Scientific Day on Valuation of Bioresources, (Tunisia), 02th-04th may 2014.

**Azzouzi D.**, Mekkiou R., Seghiri R., Benayache F., Benayache S. "phytochemical study of *Centaurea* species" Presented at the organizing committee of the 3rd International Congress of Biotechnology and Bio-Resources Valorisation (AT-BVBR) (Tunisia), 18th-20th march 2014.

Bioud K., **Azzouzi D.**, Benrebai M., Aissous I., Mekkiou R., Benayache F., Benayache S. "Cisplatin-nephrotoxicity attenuation by *Centaurea acaulis* in mice" Presented at the Seninaire International des Biotechnologies ( SIBC) Constantine le 19, 20 et 21 octobre 2015.

Bencharchar I., **Azzouzi D.**, Mekkiou R., Benayache F., Benayache S. "Screening phytochimique et quantification des polyphénols et des flavonoides dans une plante de la famille des légumineuses" Presented at the 5th International Scientific Day on Valuation of Bioresources, (Tunisia), 02th-04th may 2014.

## *Liste des abréviations*

### *Techniques chromatographiques*

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CPP	Chromatographie sur Plaque Préparative
C18	Silice greffée
SiO <sub>2</sub>	Silice normale
VLC	Chromatographie liquide sous vide
Rf	Facteur de rétention

### *Détermination structurale*

A <sub>x</sub>	Axial
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	<b>D</b> istortionless <b>E</b> nhancement by <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfert
Glc	<b>G</b> lucose
Gal	<b>G</b> alactose
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>B</b> onding <b>C</b> onnectivity
HSQC	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>C</b> onnectivity
J (Hz)	Constante de couplage exprimée en Hertz
ppm	partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN <sup>13</sup> C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ROESY	ROtating Overhauser Effect Spectroscopy
δC	Déplacement chimique du carbone en ppm
δH	Déplacement chimique du proton en ppm
ESI	ElectroSpray Ionization (ionisation par électronubélisation)
HR	Haute résolution
m/z	Masse/charge
SM	Spectrométrie de Masse
UV	Ultra-Violet
λ max	longueur d'onde maximale

### *Activités biologiques*

DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
GC/MS	Analyse par Chromatographie gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse
HE	Huiles essentielles
HPLC-TOF/MS	La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse munie d'un analyseur à temps de vol
IC <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice à 50%
PTFE	polytétrafluoroéthylène

## Liste de figures

<b>Figure I.1 :</b> Quelques espèces de genre <i>Centaurea</i> (Asteraceae).....	7
<b>Figure II.1:</b> Squelette de base des flavonoïdes.....	35
<b>Figure II.2:</b> Structure des différentes classes des flavonoïdes.....	36
<b>Figure II.3:</b> Structure de base de Coumarine.....	38
<b>Figure II.4:</b> Squelette de base des germacranolides.....	40
<b>Figure II.5:</b> Squelette de base des élémanolides.....	41
<b>Figure II.6:</b> Squelette de base des eudesmanolides.....	42
<b>Figure II.7:</b> Squelette de base des guaianolides.....	42
<b>Figure II.8:</b> Squelette de base des héliangolides.....	43
<b>Figure II.9:</b> Structure de l'isoprène .....	49
<b>Figure III.1:</b> Image de l'espèce <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel.....	60
<b>Figure III.2:</b> Organigramme d'extraction du <i>C. choulettiana</i> .....	62
<b>Figure III.3:</b> Schéma de séparation de l'extrait cyclohexane de <i>C. choulettiana</i> .....	66
<b>Figure III.4:</b> Schéma de séparation de l'extrait acétate d'éthyle de <i>C. choulettiana</i> .....	70
<b>Figure III.5:</b> Schéma de séparation de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. choulettiana</i> .....	74
<b>Figure III.6:</b> Image de l'espèce <i>Centaurea fragilis</i> Dur.....	77
<b>Figure III.7:</b> Organigramme d'extraction du <i>Centaurea fragilis</i> .....	79
<b>Figure III.9:</b> Schéma de séparation de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. fragilis</i> .....	83
<b>Figure IV.1:</b> chromatogramme GC/MS du composé CP4.....	86
<b>Figure IV.2: A.</b> Spectre de masse IE de l'ion à $m/z$ 412,3 du composé CP4-1 A'. Spectre de masse IE du témoin Stigmastérol.....	87
<b>Figure IV.3: B.</b> Spectre de masse IE de l'ion à $m/z$ 414,4 du composé CP4-2 B'. Spectre de masse IE du témoin $\gamma$ -Sitostérol.....	88
<b>Figure IV.4:</b> Spectre RMN du $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ - $d_6$ , 600 MHz) du CP4.....	89
<b>Figure IV.5:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ - $d_6$ , 150 MHz) du CP4.....	90
<b>Figure IV.6:</b> Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé CP6.....	91
<b>Figure IV.7:</b> Spectres HPLC-TOF/MS en mode négatif du composé CP6.....	92
<b>Figure IV.8:</b> Spectres de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) du composé CP6.....	93
<b>Figure IV.9:</b> Spectres de DEPT ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) du composé CP6.....	93
<b>Figure IV.10:</b> Structure partielle du composé CP6.....	94
<b>Figure IV.11:</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz) du composé CP6.....	95
<b>Figure IV.12:</b> HSQC ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz) du composé CP6.....	96
<b>Figure IV.13:</b> spectre de HMBC ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 600 MHz) du composé CP6.....	96
<b>Figure IV.14:</b> COSY ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ ) ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 600 MHz) du composé CP6.....	99
<b>Figure IV.15:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ppm) du composé CP7.....	103

<b>Figure IV.16:</b> Spectre DEPT (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP7.....	103
<b>Figure IV.17:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP7.....	104
<b>Figure IV.18:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP7 étalement de la partie du sucre.....	105
<b>Figure IV.19:</b> Spectre COSY de la partie glucose du composé CP7.....	106
<b>Figure IV.20:</b> Spectre HSQC du composé CP7.....	107
<b>Figure IV.21:</b> Spectre HSQC du composé CP7 de la partie du sucre. ....	107
<b>Figure IV.22:</b> Spectre HMBC du composé CP7.....	108
<b>Figure IV.23:</b> Spectre de masse du composé CP8.....	110
<b>Figure IV.24:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone <i>d</i> <sub>6</sub> ) du produit CP8.....	111
<b>Figure IV.25:</b> Spectre de DEPT (150 MHz, acétone <i>d</i> <sub>6</sub> ) du produit CP8.....	112
<b>Figure IV.26:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (150 MHz, acétone <i>d</i> <sub>6</sub> ) du produit CP8.....	112
<b>Figure IV.27:</b> Spectre de HSQC du produit CP8.....	113
<b>Figure IV.28:</b> Spectre de COSY du produit CP8.....	115
<b>Figure IV.29. A.</b> Fragmentation GC/MS de l'ion <i>m/z</i> = 256,3 du composé CP9.	
<b>A'.</b> Fragmentation GC/MS de l'ion <i>m/z</i> = 256 du témoin acide hexadécanoïque.....	116
<b>Figure IV.30:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit CP9.....	117
<b>Figure IV.31:</b> Spectre de DEPT (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit CP9.....	118
<b>Figure IV.32:</b> spectre de HSQC du produit CP9.....	118
<b>Figure IV.33:</b> spectre de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit CP9.....	119
<b>Figure IV.34:</b> spectre de COSY du produit CP9.....	120
<b>Figure IV.35:</b> Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP10.....	122
<b>Figure IV.36:</b> Série spectrale UV du Composé CP10.....	123
<b>Figure IV.37:</b> Structure partielle du composé CP10.....	123
<b>Figure IV.38:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) du composé CP10.....	125
<b>Figure IV.39:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) du composé CP10.....	126
<b>Figure IV.40:</b> Spectre et chromatogramme de HPLC-TOF/MS du composé CP11.....	127
<b>Figure IV.41: A.</b> Fragmentation GC/MS de l'ion <i>m/z</i> 144,04 [M-H] <sup>-</sup> du composé CP11	
<b>B.</b> Fragmentation GC/MS de l'ion <i>m/z</i> 144 [M-H] <sup>-</sup> du témoin 1H-Indole-3- carboxaldehyde.....	128
<b>Figure IV.42:</b> Structure partielle du Composé CP11. ....	129
<b>Figure IV.43:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) du composé CP11.....	129
<b>Figure IV.44:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) du composé CP11.....	130
<b>Figure IV.45:</b> Spectre COSY du composé CP11.....	131
<b>Figure IV.46:</b> Spectre HSQC du composé CP11.....	132
<b>Figure IV.47:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP12.....	134
<b>Figure IV.48:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP12.....	135

<b>Figure IV.49:</b> Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé CP13.....	136
<b>Figure IV.50:</b> Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP13.....	137
<b>Figure IV.51:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (150MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP13.....	137
<b>Figure IV.52:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP13.....	138
<b>Figure III. 53:</b> Spectre de COSY du composé CP13.....	139
<b>Figure IV.54:</b> Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé CP13.....	139
<b>Figure IV.55:</b> Structure partielle du Composé CP13.....	140
<b>Figure IV.56:</b> Structure partielle du Composé CP13.....	140
<b>Figure III. 57:</b> Spectre de HMBC du composé CP13.....	141
<b>Figure III. 58:</b> Spectre de HMBC du composé CP13 étalement de l'acide cafféique.....	141
<b>Figure III. 59:</b> Spectre de COSY du composé CP13 étalement de l'unité acide quinique.....	142
<b>Figure IV.60:</b> Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP14.....	144
<b>Figure IV.61:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé CP14 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	145
<b>Figure IV.62:</b> Structure partielle du Composé CP14.....	145
<b>Figure IV.63:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C du composé CP14 (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	146
<b>Figure IV.64:</b> Spectre RMN de DEPT du composé CP14 .....	147
<b>Figure IV.65:</b> Spectre HSQC du composé CP14.....	147
<b>Figure IV.66:</b> Spectre RMN de HMBC du composé CP14 .....	149
<b>Figure IV.67:</b> Spectre de masse TOF-MS en mode négatif du composé CP15.....	150
<b>Figure IV.68:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C du composé CP15 (150 MHz, acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	151
<b>Figure IV.69:</b> Spectre RMN DEPT du composé CP15 (150 MHz, acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	152
<b>Figure IV.70:</b> Spectre RMN de <sup>1</sup> H du composé CP15 (600 MHz, acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	153
<b>Figure IV.71:</b> Spectre HSQC du composé CP15.....	154
<b>Figure IV.72:</b> Spectre HMBC du composé CP15 .....	155
<b>Figure IV.73:</b> l'étalement de Spectre HMBC du composé CP15 .....	155
<b>Figure IV.74:</b> structure partielle du compose CP15.....	156
<b>Figure IV.75:</b> Diagramme représentatif des pourcentages de différents groupes chimiques d'huile essentielle des fleurs de <i>C. choulettiana</i> .....	160
<b>Figure IV.76:</b> Série spectrale UV du composé CP19.....	162
<b>Figure IV.77:</b> Structure partielle du composé CP19.....	163
<b>Figure IV.78:</b> Spectre de masse TOF-MS en mode négatif du composé CP19.....	163
<b>Figure IV.79:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) du composé CP19.....	164
<b>Figure IV.80:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) du composé CP19.....	166
<b>Figure IV.81:</b> Spectre COSY du compose CP19.....	167
<b>Figure IV.82:</b> Spectre HSQC du compose CP19.....	168
<b>Figure IV.83:</b> Spectre HMBC du compose CP19.....	168
<b>Figure IV.84:</b> Chromatogramme HPLC du composé CP20.....	170

<b>Figure IV.85:</b> Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP20.....	170
<b>Figure IV.86:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm) du composé CP20.....	172
<b>Figure V.1:</b> courbe d'étalonnages de l'acide gallique.....	178
<b>Figure V.2:</b> courbe d'étalonnages de la quercétine.....	180
<b>Figure V.3:</b> réaction du radical DPPH avec un phénol.....	183
<b>Figure V.4:</b> Profil chromatographique des extraits de <i>C. choulettiana</i> analysés par HPLC-TOF/MS.....	188
<b>Figure V.5:</b> Structures des composés identifiés dans les extraits de <i>C. choulettiana</i> par HPLC-TOF/MS.....	190
<b>Figure V.6:</b> courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de <i>C. choulettiana</i> ainsi que l'acide ascorbique (standard) en fonction de la concentration.....	191
<b>Figure V.7:</b> Valeurs de l'IC50 des extraits de <i>C. choulettiana</i> et du standard.....	192
<b>Figure V.8 :</b> % d'inhibition d'acide linoléique des différents extraits.....	193
<b>Figure IV.9:</b> l'inhibition de la peroxydation lipidique de <i>C. choulettiana</i> .....	193
<b>Figure V.10:</b> Une activité anticancéreuse des extraits AcOEt, cyclohexane et <i>n</i> -BuOH de <i>C. choulettiana</i> , contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain).....	195
<b>Figure V.11:</b> Structures des flavonoïdes identifiés dans l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. fragilis</i> par HPLC-TOF/MS.....	199
<b>Figure V.12:</b> Structures des acides phénoliques identifiés dans l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. fragilis</i> par HPLC-TOF/MS.....	200
<b>Figure V.13:</b> Une activité anticancéreuse de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. fragilis</i> contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain).....	201

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I.1:</b> Les structures des lactones sesquiterpéniques les plus prédominantes dans le genre <i>Centaurea</i> .....	9
<b>Tableau I.2:</b> Les structures des flavonoïdes les plus prédominantes dans le genre <i>Centaurea</i> .....	10
<b>Tableau I.3:</b> Quelques composés de type stéroïdes isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i> .....	11
<b>Tableau I.4:</b> Quelques lactones sesquiterpéniques isolés dans l'unité VARENBIOMOL.....	12
<b>Tableau II.1:</b> Principaux acides hydroxybenzoïques .....	37
<b>Tableau II.2:</b> Principaux acides hydroxycinnamiques.....	37
<b>Tableau II.3:</b> Quelques exemples de coumarines.....	38
<b>Tableau III.1:</b> Masses et rendements des extraits de <i>C. choulettiana</i> .....	63
<b>Tableau III.2:</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait cyclohexane feuille de <i>C. choulettiana</i> .....	64
<b>Tableau III.3:</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle feuille de <i>C. choulettiana</i> .....	67
<b>Tableau III.4:</b> Résultats de la séparation de la fraction F6 sur colonne de Sephadex.....	68
<b>Tableau III.5:</b> Résultats de la séparation de la fraction F7 sur colonne de Sephadex.....	68
<b>Tableau III.6:</b> Résultats de la séparation de la fraction F11 sur colonne de Sephadex.....	69
<b>Tableau III.7:</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol feuille de <i>C. choulettiana</i> .....	72
<b>Tableau III.8:</b> Masses et rendements des extraits de <i>C. fragilis</i> .....	78
<b>Tableau III.9:</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Centaurea fragilis</i> .....	80
<b>Tableau III.10:</b> Résultats de la séparation de la fraction F11 par chromatographie sur colonne de Sephadex.....	81
<b>Tableau III.11:</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de Sephadex de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Centaurea fragilis</i> .....	82
<b>Tableau IV.1:</b> Données du spectre RMN <sup>13</sup> C et RMN <sup>1</sup> H du produit CP6.....	102
<b>Tableau IV.2:</b> Données du spectre RMN <sup>13</sup> C et RMN <sup>1</sup> H du produit CP7. ....	109
<b>Tableau IV.3:</b> Données du spectre RMN <sup>1</sup> H du produit CP8.....	114
<b>Tableau IV.4:</b> Données du spectre RMN <sup>13</sup> C du produit CP8.....	114
<b>Tableau IV.5:</b> Données du spectre RMN <sup>1</sup> H du produit CP9.....	120
<b>Tableau IV.6:</b> Données du spectre RMN <sup>13</sup> C du produit CP9.....	121

<b>Tableau IV.7:</b> Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\max}$ nm) du composé CP10.....	124
<b>Tableau IV.8:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ du produit CP10.....	124
<b>Tableau IV.9:</b> Données du spectre RMN $^{13}\text{C}$ du produit CP10.....	126
<b>Tableau IV.10:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ et RMN $^{13}\text{C}$ du produit CP11.....	133
<b>Tableau IV.11:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ et RMN $^{13}\text{C}$ du produit CP13.....	143
<b>Tableau IV.12:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ et DEPT du produit CP14.....	150
<b>Tableau IV.13 :</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ et RMN $^{13}\text{C}$ du produit CP15.....	157
<b>Tableau IV.14:</b> Composition d'huile essentielle des fleurs de <i>C. choulettiana</i> .....	159
<b>Tableau IV.15:</b> Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\max}$ nm) du composé CP19.....	162
<b>Tableau IV.16:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ et RMN $^{13}\text{C}$ du produit CP19.....	169
<b>Tableau IV.17:</b> Données du spectre RMN $^1\text{H}$ du produit CP20.....	172
<b>Tableau V.1:</b> Programme de la phase mobile A et B.....	182
<b>Tableau V.2:</b> Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de <i>C. choulettiana</i> .....	187
<b>Tableau V.3:</b> Composés identifiés dans les extraits de <i>C. choulettiana</i> par HPLC-TOF/MS.....	189
<b>Tableau V.4:</b> Activités antibactériennes des huiles essentielles de <i>C. choulettiana</i> .....	196
<b>Tableau V.5:</b> Composés identifiés dans l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. fragilis</i> par HPLC-TOF/MS.....	198

# *Table des Matières*

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

## **CHAPITRE I: Aperçu bibliographique sur le genre *Centaurea***

I.1. Introduction.....	6
I. 2. Description botanique du genre <i>Centaurea</i> .....	6
I.3. Principaux métabolites secondaires du genre <i>Centaurea</i> .....	8
I.3.1 Lactones sesquiterpéniques du genre <i>Centaurea</i> .....	8
I.3.2 les flavonoïdes du genre <i>Centaurea</i> .....	10
I.3.3 Stéroïdes du genre <i>Centaurea</i> .....	11
I.3.4 Principaux métabolites secondaires isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i> dans notre unité de recherche VARENBIOMOL.....	12
I.3.4.a Lactones sesquiterpéniques du genre <i>Centaurea</i> isolés dans l'unité de recherche VARENBIOMOL.....	12
I.3.4.b Flavonoïdes du genre <i>Centaurea</i> isolés dans l'unité de recherche VARENBIOMOL.....	20
I.4 Utilisation en médecine traditionnelle.....	27
I.5 Intérêts biologiques du genre <i>Centaurea</i> et de ses principaux métabolites secondaires.....	28
I.6 Conclusion.....	28
Références bibliographique.....	29

## **CHAPITRE II: Métabolites secondaires**

II. Introduction.....	34
II.1. Les alcaloïdes.....	34
II.2. Composés phénoliques.....	34
II.2.1 Les flavonoïdes.....	35
II.2.1.1 Structure chimique et classification.....	35
II. 2.1.2 Activités biologiques des Flavonoïdes.....	36
II. 2.2 Les non flavonoïdes.....	37
II. 3 Coumarines.....	37

II.4 Les terpènes.....	38
II.4.1 Les sesquiterpènes lactones.....	39
II.4.1.1 Nomenclature des lactones sesquiterpéniques.....	39
II. 4.1.2 Structures des sesquiterpènes lactones.....	40
II.4.1.2.a Les germacranolides.....	40
II.4.1.2.b Les élémanolides.....	41
II.4.1.2.c Les eudesmanolides.....	42
II.4.1.2.d Les guaianolides.....	42
II. 4.1.2.e Les héliangolides.....	43
II. 4.1.3 Intérêt thérapeutique des lactones sesquiterpéniques.....	44
II.4.2 Les Triterpènes et stéroïdes.....	45
II. 5 Rôle et intérêt des composés phénoliques.....	45
II.6. Extraction des composés phénoliques.....	45
II.7. Méthodes de séparation et de purification.....	46
II.7.1. La chromatographie sur couche mince.....	46
II.7.2. La chromatographie sur couche mince préparative.....	46
II.7.3. Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	47
II.8. Les techniques d'identification structurale.....	47
II.8.1. La spectrophotométrie UV-Visible.....	47
II.8.2. La Spectrométrie de masse.....	47
II.8.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	48
II.9. Huiles Essentielles (HE).....	49
II.9.1 Définition.....	49
II.9.2 Caractères chimiques des HE.....	49
II.9.3 Les procédés d'extraction des HEs.....	50
II.9.3.a Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	50
II.9.3.b Hydro-distillation.....	51
II.9.3.c Distillation à vapeur saturée.....	51
II.9.3.d Hydro-diffusion.....	51
II.9.3.e Extraction par CO2 super critique.....	51
II.9.4 Utilisation des HEs.....	52
II.9.4.1 En pharmacie.....	52
II.9.4.2 Dans l'industrie.....	52
II.9.5 Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	52

II.9.5.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	52
II.9.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	53
Références bibliographique.....	54

### **CHAPITRE III: L'étude phytochimique de *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur.**

III Introduction.....	59
III. a Choix des deux espèces.....	59
III. b Place dans la systématique des deux espèces.....	59
Partie 1: <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel.....	60
III.1.1 Description botanique.....	60
III.1.2 Récolte du matériel végétal.....	60
III.1.3 Extraction.....	60
III.1.4 Etude des extraits.....	63
III.1.4.1 Fractionnement de l'extrait cyclohexane.....	63
III.1.4.2 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	66
III.1.4.3 Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	70
III.1.5 les huiles essentielles.....	75
III.1.5.1 Composition de l'huile essentielle des fleurs de <i>C. choulettiana</i> .....	75
Partie 2: <i>Centaurea fragilis</i> Dur.....	77
III.2.1 Description botanique.....	77
III.2.2 Récolte du matériel végétal.....	77
III.2.3 Extraction des feuilles de <i>C. fragilis</i> .....	77
III.2.4 Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	79
III.2.5 Séparation de l'extrait <i>n</i> -butanol par colonne de Sephadex.....	81
Références bibliographiques.....	84

### **CHAPITRE IV: Discussion des résultats**

Appareillages.....	85
Partie 1: Résultats de l'étude phytochimique de <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel...86	
IV.1.1 Détermination structurale des composés isolés.....	86

IV.1.1.1 Détermination de la structure du composé CP4.....	86
IV.1.1.2 Détermination de la structure du composé CP6.....	91
IV.1.1.3 Détermination de la structure du composé CP7.....	102
IV.1.1.4 Détermination de la structure du composé CP8.....	110
IV.1.1.5. Détermination de la structure du composé CP9.....	116
IV.1.1.6 Détermination de la structure du composé CP10.....	121
IV.1.1.7 Détermination de la structure du composé CP11.....	127
IV.1.1.8 Détermination de la structure du composé CP12.....	133
IV.1.1.9 Détermination de la structure du composé CP13.....	136
IV.1.1.10 Détermination de la structure du composé CP14.....	144
IV.1.1.11 Détermination de la structure du composé CP15.....	150
IV.1.2 Interprétation des résultats des HE des parties aériennes fleurs et feuilles de <i>C. choulettiana</i> .....	158
Partie 2: Résultats de l'étude phytochimique de <i>Centaurea fragilis</i> Dur.....	161
IV.2.1 Détermination de la structure du composé CP19.....	161
IV.2.2 Détermination de la structure du composé CP20.....	170
Références bibliographique.....	174

## **CHAPITRE V: Activité biologiques**

V Introduction .....	177
Partie 1: <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel.....	177
V.1 Activité antioxydante.....	177
V.1.a Introduction.....	177
V.1.b Qu'est-ce qu'un radical libre ?.....	178
V.1.c Les polyphénols comme antioxydants.....	178
V.1.d Activité des flavonoïdes vis-à-vis des espèces radicalaires.....	179
V.1.1 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	179
V.1.1.a Dosage des polyphénols totaux.....	179
V.1.1.b Dosage des flavonoïdes totaux.....	180
V.1.2 Criblage chimique par HPLC-TOF/MS.....	181
V.1.3 Évaluation du potentiel anti-radicalaire.....	182
V.1.3.a Test au DPPH.....	183
V.1.3.b L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.....	184

V.1.4	Activité antiproliférative.....	185
V.1.4.a	Généralités.....	185
V.1.4.b	Types de cancers.....	185
V.1.4.c	Activité anticancéreuse utilisant le système xCELLigence.....	185
V.1.5	Résultats et discussion.....	186
V.1.5.1	Dosages des polyphenols et des flavonoïdes totaux.....	186
V.1.5.2	Identification et quantification des acides phénoliques par HPLC-TOF/MS.....	187
V.1.5.3	Evaluation de l'activité antioxydante.....	191
V.1.5.3.a	Le test au DPPH.....	191
V.1.5.3.b	Inhibition de la peroxydation lipidique.....	192
V.1.5.4	L'évaluation de l'activité antiproliférative.....	194
V.1.5.5	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	196
Partie 2: <i>Centaurea fragilis</i> Dur.....		197
V.2	Criblage chimique par HPLC -TOF/MS.....	197
V.3	Activité anticancéreuse en utilisant le système xCELLigence.....	197
V.4	Résultats et discussion.....	197
V.4.1	Identification des acides phénoliques et des flavonoïdes par HPLC-TOF/MS.....	197
V.4.2	L'évaluation de l'activité antiproliférative .....	201
	Références bibliographiques.....	203

# Introduction générale

## ***Introduction générale***

**D**e part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe et le Sahara. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie du pays et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région.

**L**a flore algérienne est estimée à plus de 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques et appartiennent à plusieurs familles botaniques [1-2]. Ce potentiel floristique, d'intérêt biomédical a poussé les chercheurs algériens à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

**P**endant longtemps, les remèdes par les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos aïeux. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres [3].

**D**e multiples études portent sur la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les huiles essentielles qui ont des intérêts multiples mis en faveur de l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, malheureusement l'exploitation et la valorisation de ces ressources naturelles reste à nos jours très limitée et très artisanale.

**L**e genre *Centaurea* qui appartient à la famille Asteraceae, compte environ 700 espèces dans le monde. En Algérie, ce genre est représenté par 45 espèces [4-5] dont certaines sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités antimicrobienne, antivirale [6-7], antifongique [8], cytotoxique [9] et anticancéreuse [10]. Des études chimiques de quelques espèces de ce genre ont montré leur richesse en métabolites secondaires tels que les lactones sesquiterpéniques [11-13], les stéroïdes [14] et les flavonoïdes [15-17].

**L'**investigation phytochimique des plantes passe tout d'abord par la récolte et l'identification des espèces végétales présentant un intérêt en médecine traditionnelle en particulier, à l'extraction de la matière végétale, au criblage biologique des extraits obtenus, à l'isolement des biomolécules ainsi qu'à leur caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques.

**D**ans notre laboratoire plusieurs Centaurées ont été étudiées, ces travaux ont mené à des résultats conformes à ceux de la littérature. En effet, ils ont montré la richesse importante de ce genre en composantes sesquiterpéniques [18-23] et flavoniques [24-29].

**L**e présent travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche du laboratoire et consiste à effectuer l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires ainsi que l'activité biologique de deux plantes médicinales algériennes appartenant au genre *Centaurea* de la famille des Asteraceae: il s'agit de *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur. toute deux endémiques à l'Algérie.

**C**e manuscrit est réparti en cinq chapitres:

- ✓ **Le premier chapitre** est consacré à une recherche bibliographique, comportant une présentation botanique et phytochimique du genre *Centaurea*, les différentes classes de métabolites secondaires les plus connus, ainsi que les utilisations thérapeutiques de ce genre.
- ✓ **Le deuxième chapitre** renferme une présentation des métabolites secondaires
- ✓ **Le troisième chapitre** est divisé en deux parties: la première comporte la description de nos travaux d'extraction, d'isolement et de purification des métabolites secondaires, Ainsi que l'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel. Alors que la deuxième renferme l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea fragilis*.
- ✓ **Le quatrième chapitre** affiche la détermination structurale des métabolites secondaires isolés des deux espèces en combinant différentes méthodes spectroscopiques (UV, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC et HMBC) ainsi que les résultats de l'huile essentielle de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel.
- ✓ **Le cinquième chapitre** comprend toute l'étude biologique y compris le screening chimique par HPLC-TOF/MS et les méthodes utilisées dans l'évaluation des activités antioxydante et antiproliférative des extraits suivi de la discussion des résultats obtenus, et on termine par une conclusion générale.

Ces travaux ont fait l'objet de trois publications internationales et six communications internationales dans des congrès de spécialité.

## Références bibliographiques

- [1] Gaussen, H., Leroy, H.F., (1982), Précis de Botanique (végétaux supérieurs), 2<sup>ème</sup> Ed, 426.
- [2] Ozenda P., (1977), Flore du Sahara, Ed CNRS, Paris. France, 250-259.
- [3] Bammou, M., Daoudi, A., Sellam, K., EL Rhaffari, L., Ibjibjen, J., Nassiri, L., Étude Ethnobotanique des Astéracées dans la Région Meknès-Tafilalet (Maroc): [ Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco) ], (2015) 13, (4) : 789-815.
- [4]. Mabberley D.J., (1987), The Plant Book, Cambridge University Press.
- [5] Quezel, P., Santa, S., (1963), Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France.
- [6] Toribio, M.S., Oriani, D.S., Skliar, M.I., (2004), actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis*, *Ars. Pharm*, 45(4), 335-341.
- [7] Berrin, O., Ilhan, G., Taner, K., Erdem, Y., (2007), antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L., *Microbiol. Res*, 1-8.
- [8] Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M., (2000), sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. antifungal activity, *Phytochemistry*, 55(8), 903-908.
- [9] Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., (2005), sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. antiplasmodial and cytotoxic activities, *Fitoterapia*, 76, 744-746.
- [10] Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Celik, S., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K., Sarker, S.D., (2007), anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the arial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae), *Journa of Naural Medicine*, 61, 164-169.
- [11] Trendafilova, A., Todorova, M., Bancheva, S., (2007), secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*, *Biochemical Systematic and Ecology*, 35, 544-548.
- [12] Gadeschi, E., Jorge, D.Z., Massanet, G.M. and Luis, F.R., (1989), two Derivatives of costic acid from *Centaurea arguta*, *Phytochemistry*, 28(8), 2204-220.
- [13] Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I.A., (2007), elemanolide sesquiterpene and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*, *Phytochemistry*, 68, 609-615.
- [14] Djeddi, S., Argyropoulou, C., Skaltsa, H., (2008), secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*, *Biochemical Systematic and Ecology*, 36, 336-339.
- [15] Flamini, G., Paridini, M., and Morelli, I., (2001), a flavonoid sulphate and other compounds from roots of *Centaurea bracteata*, *Phytochemistry*, 58, 1229-1233.

- [16] Aslan, Ü., Oksuz, S., (1999), Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*, *Turkish Journal of Chemistry*, 23, 15-20.
- [17] Flamini, G., Paridini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y., Kargioglu, M., (2002), flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp *pseudoscabiosa* from Turkey, *Phytochemistry*, 61, 433-437.
- [18] Kolli, E., Leon, F., Benayache, F., Estevez, S., Quintana, J., Estevez, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, S., (2012), Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*, *J. Braz. Chem. Soc.*, 23, 977-983.
- [19] Bicha, S., Chalard, P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, V. P., Lobstein, A., Bentamene, A., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache F., (2013), Maroccanin: A New g-lactone and Other Constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae), *Rec. Nat. Prod.*, 7(2) 114-118.
- [20] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Kaabeche, M., Tillequin, F. and Seguin, E., (1998), eudesmanolide from *Centaurea Granata*, *Phytochemistry*, 49(8), 2425-2427.
- [21] Medjroubi, K., Bouderdara, N., Benayache, F., Akkal, S. and Tillequin, F., (2003), sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*, *Chemistry of Natural Compounds*, 39(5), 506-507.
- [22] Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Bermejo, J. and Benayache, F., (2007), sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), 749-750.
- [23] Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Geneviève, P., Bermejo, J., Leon, F. and Benayache, F., (2005), a new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae), *Biochemical Systematic and Ecology*, 33, 1061-1065.
- [24] Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F., (2006), phenolic compounds from *Centaurea africana*, *Chemistry of Natural Compounds*, 42(6), 491-492.
- [25] Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K. and Tillequin, F., (2007), flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(3), 319-320.
- [26] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E. and Tillequin, F., (2003), flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*, *Chemistry of Natural Compounds*, 39(2), 165-166.

- [27] Medjroubi, K., Mezhoud, S., Benayache, F., Seguin, E. and Tillequin, F., (2005), flavonoids of the aerial parts of *Centaurea pullata*, *Chemistry of Natural Compounds*, 41(2), 226-227.
- [28] Mezaache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, F., (2010), secondary metabolites from *Centaurea lippii*, *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (5), 801-802.
- [29] Bicha, S., Bentamène, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V. P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J. and Benayache, F., (2011), flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*, *Chemistry of Natural compounds* 47(1), 105-106.

# *Chapitre I*

## *Aperçu bibliographique sur le genre Centaurea*

## I.1. Introduction

La famille des Astéracées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 23 000 espèces réparties en 1 500 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille.

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre [1].

La marguerite, ou la famille du tournesol, est la plus grande famille d'usines vasculaires, avec près de 1500 genres et plus de 23000 espèces décrites dont 750 endémiques [2-4]. Les plus grands genres sont *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (700 espèces). D'après Quezel et Santa, en Algérie il en existe 109 genres et 408 espèces [4].

## I. 2. Description botanique du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Les fleurs sont toutes tubulées, multiflores en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque [4].

Le genre *Centaurea* se rencontre en Europe méridionale, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent Américain [5]. Dans la nouvelle flore d'Algérie, Quezel et Santa ont reporté et décrit 45 espèces du genre *Centaurea* sur le sol Algérien [4]. La figure I-1 représente quelques espèces du genre *Centaurea*.



Figure I.1 : Quelques espèces de genre *Centaurea* (Asteraceae) [6].

### I.3. Principaux métabolites secondaires du genre *Centaurea*

De nombreuses études phytochimiques sur des espèces du genre *Centaurea* ont révélé la richesse de ces dernières en métabolites secondaires tels que les stéroïdes (stérols) [7-11], les composés phénoliques, quelques alcaloïdes [12-16] et les lactones sesquiterpéniques ainsi que les flavonoïdes qui sont les principaux métabolites secondaires de ces espèces [16-21].

#### I.3.1 Lactones sesquiterpéniques du genre *Centaurea*

Il existe plusieurs structures de sesquiterpènes lactones, mais toutes se rattachent au produit de la cyclisation du (2*E*, 6*E*)-farnésyl pyrophosphate [22].

Le genre *Centaurea* est caractérisé par la présence des lactones sesquiterpéniques dont la majorité est de type guaiane et germacrane [21-24], cependant des élémanolides, des eudesmanolides ainsi que des héliangolides y ont été isolés [25-27]. On note également la présence de quelques sesquiterpènes de type élémane [21].

Les études bibliographiques sur le genre *Centaurea* du point de vue composition en lactones sesquiterpéniques ont montré la prédominance du squelette des guaianolides en premier lieu, les germacranolides en deuxième lieu, puis les élémanolides et anciennement les héliangolides et les élémanes.

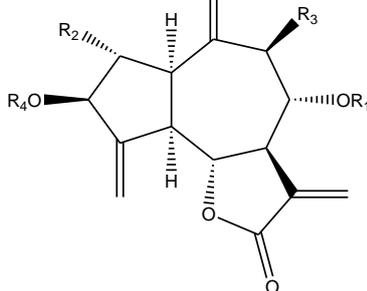
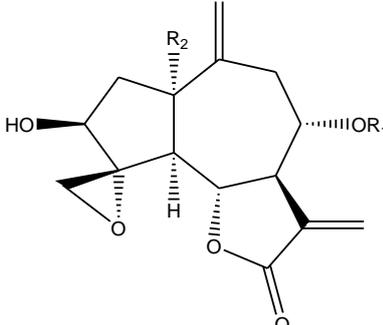
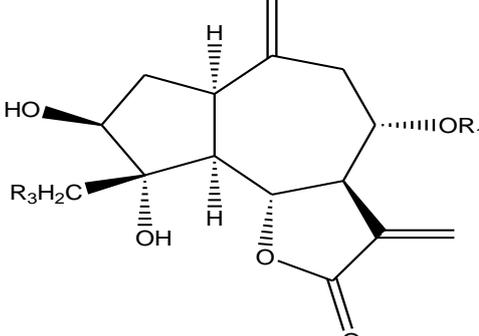
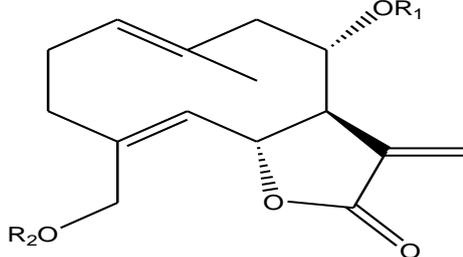
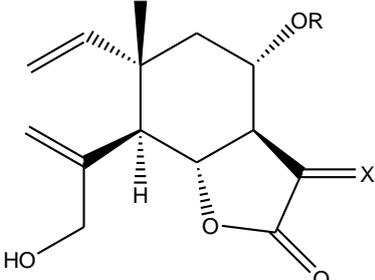
Les investigations phytochimiques menées sur des espèces du genre *Centaurea* [17-20] ont montrées que les lactones du type guaianolide les plus rencontrées sont :

La cynaropicrine **1**, la déacylcynaropicrine **2**, la linichlorine B **3**, la 15-déoxyrépine **4**, l'aguérine B **5**, la répine **6**, la janérine **7**, l'acroptiline **8**, la centaurépensine **9**, la chlorojanérine **10**, la cébelline D **11**, et celles de type germacranolide les plus rencontrées sont : la salonitenolide **12**, la cnicine **13** et l'acétoxycnicine **14**.

Pour les lactones du type élémanolide les plus fréquemment trouvées sont : la mélitensine **15**, la 11, 13 dehydromélitensine **16** et la 15-hydroxy-8 $\alpha$ -(1',2'-dihydroxy-ethyl)-acryloxy-elema-1, 3,11(13)-trien-6,12-olide **17**.

Les structures des lactones sesquiterpéniques les plus prédominantes dans le genre *Centaurea* de **1** à **17** sont représentées dans le tableau I.1.

**Tableau I.1:** Les structures des lactones sesquiterpéniques les plus prédominantes dans le genre *Centaurea*.

Nom de composé	Structures
<p><b>1</b> Cynaropicrine; R1= 4'-hydroxyméthacrylate, R2= R3= R4 = H</p> <p><b>2</b> Déacylcynaropicrine; R1= R2= R3= R4= H</p> <p><b>3</b> Linichlorine B; R1= (2'-OH- 4'-Cl) isobutyrate, R2= R3 = R4 = H</p> <p><b>4</b> 15-déoxyrépine; R1=epoxyméthacrylate, R2 = R3= R4 = H</p> <p><b>5</b> 8-O-[(S)-3-hydroxy-2 méthylpropionate] deacylcynaropicrine; R1= 4'-hydroxyisobutyrate, R2 = R3= R4 = H</p>	
<p><b>6</b> Répine; R1 = epoxyméthacrylate, R2 = H</p> <p><b>7</b> Janérine; R1 = 4'- OH méthacrylate, R2 = H</p> <p><b>8</b> Acroptiline (Chlorohyssopifoline C); R1= 2'-OH- 4'-Cl) isobutyrate, R2 = H</p>	
<p><b>9</b> Centaurépensine; R1 = S-(2'-β-OH-4'-Cl) isobutyrate, R3 = Cl</p> <p><b>10</b> Chlorojanérine; R1= 4'-OH-méthacrylate, R3= Cl</p> <p><b>11</b> Cébelline D; R1 = 4'-OH-tiglate, R3 = Cl</p>	
<p><b>12</b> Salonitenolide; R1= R2 = H.</p> <p><b>13</b> Cnicine; R1= (1',2'-dihydroxyéthyle) acrylate, R2 = H.</p> <p><b>14</b> Acétoyncicine; R1= (l'acétoxy-2'-hydroxyéthyle) acrylate, R2 = H.</p>	
<p><b>15</b> Mélitensine; R= H, X = β-H, α-Me</p> <p><b>16</b> 11β, 13-dihydromélitensine; R= H, X= CH2</p> <p><b>17</b> 15-hydroxy-8α-(1',2'-dihydroxy-éthyle)-dehydromélitensine. R = (1',2'- dihydroxyéthyle) acrylate, X= CH2</p>	

### I.3.2 les flavonoïdes du genre *Centaurea*

Les flavonoïdes font partie de la classe des polyphénols, ces derniers occupent un rôle central dans la recherche chimique durant des années et jusqu'à présent. En effet, on rencontre plus de 2000 publications annuelles contenant "flavonoïdes" comme mot clé [28-29].

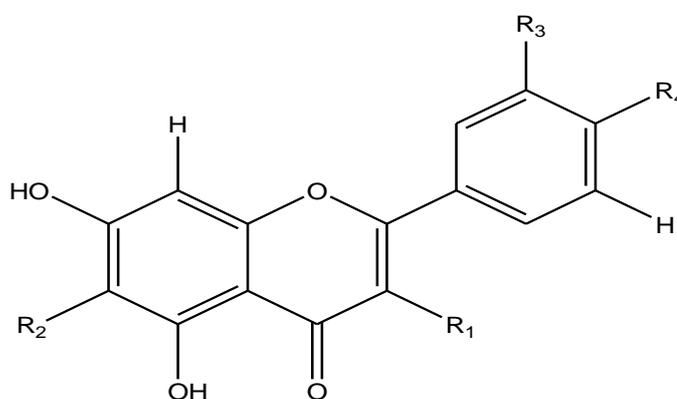
Des études phytochimiques effectuées sur le genre *Centaurea* ont montré la richesse de ce dernier en flavonoïdes [13,16 et 19,30], la majorité de ces flavonoïdes est de type flavone et flavonols.

D'après les recherches bibliographiques [19,31], nous constatons une prédominance de l'apigénine **18**, l'hispiduline **19** et la jaceosidine **20** comme flavones présentes dans ce genre.

Concernant les flavonols, les plus accumulées dans ce genre sont la quercétine **21**, suivie par le Kaempférol **22** et la centaureidine **23**. Ces études ont montré également que les flavonoïdes-*O*-glycosylés sont les plus abondants par rapport aux *C*-glycosylés qui sont rares dans les espèces du genre *Centaurea*.

Notons aussi qu'un apport élevé en flavonoïdes glucosylés est signalé dans ce genre.

Le tableau I.2 représente les structures des flavonoïdes prédominantes du genre *Centaurea*



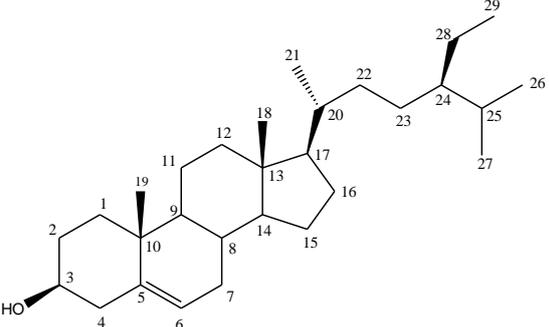
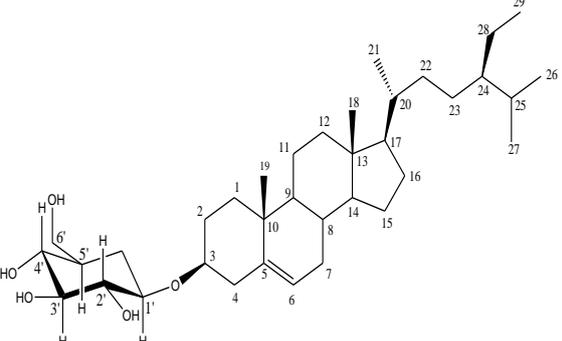
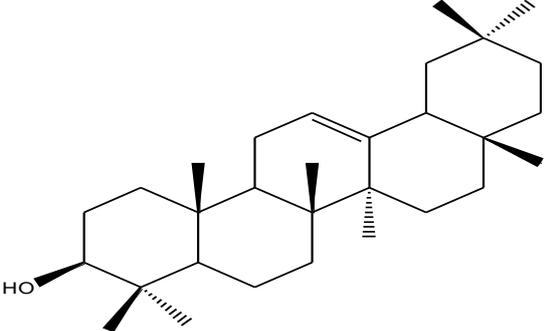
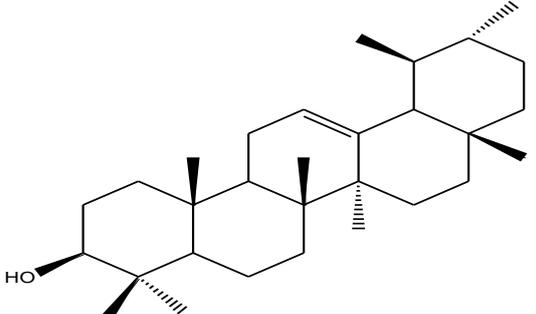
**Tableau I.2:** Les structures des flavonoïdes les plus prédominantes dans le genre *Centaurea*.

		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R
<b>18</b>	Apigénine	H	H	H	OH
<b>19</b>	Hispiduline	H	OMe	H	OH
<b>20</b>	Jaceosidine	H	OMe	OMe	OH
<b>21</b>	Quercétine	OH	H	OH	OH
<b>22</b>	Kaempférol	OH	H	H	OH
<b>23</b>	Centaureidine	OMe	OMe	OH	OMe

I.3.3 Stéroïdes du genre *Centaurea*

Ces composés sont largement répandus dans de nombreuses plantes appartenant au genre *Centaurea*. Le tableau I.3 représente quelques composés de types stéroïdes isolés des espèces de ce genre [31].

**Tableau I.3:** Quelques composés de types stéroïdes et triterpènes isolés des espèces du genre *Centaurea*.

Nom de composé	structures
β-sitostérol	
Daucosterol: 3-O-β-D-glucopyranosyl β-sitostérol	
β-amyrine	
α-amyrine	

### I.3.4 Principaux métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Centaurea* dans notre unité de recherche VARENBIOMOL.

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques dans notre laboratoire. Ces espèces constituent encore une source importante de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique.

#### I.3.4.a Lactones sesquiterpéniques du genre *Centaurea* isolés dans l'unité de recherche VARENBIOMOL.

**Tableau I.4:** Quelques lactones sesquiterpéniques isolés dans l'unité VARENBIOMOL

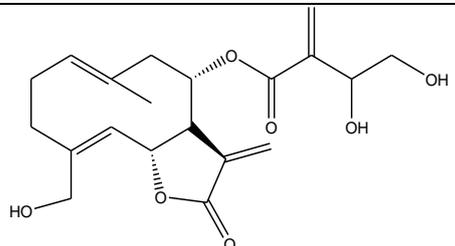
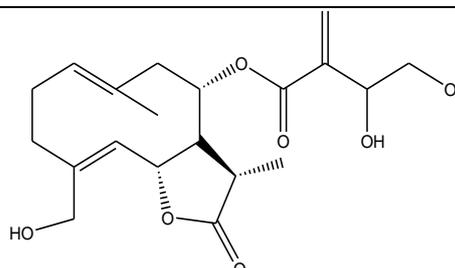
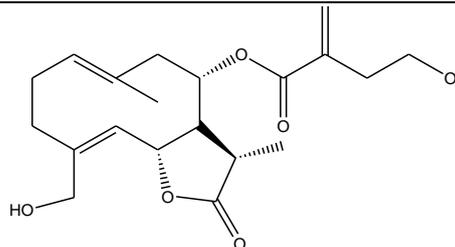
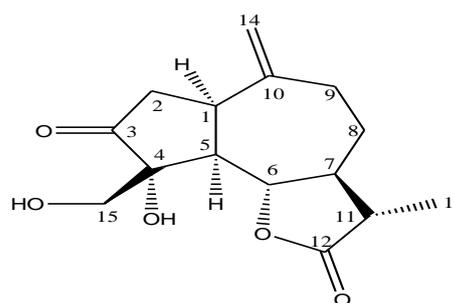
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea calcitrapa</i>	cnicine		[32, 33]
<i>Centaurea pullata</i>	11 $\beta$ ,13- dehydro-cnicine		[34]
	Dehydro-11 $\beta$ ,13dihydroxy18 cnicine		
<i>Centaurea musimomum</i>	3-oxo-4 $\alpha$ -hydroxy-15-hydroxy-1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H,6 $\beta$ H, 7 $\alpha$ H,11 $\beta$ H-guai-10(14)-ene-6,12-olide		[35-36]

Tableau I.4: (suite)

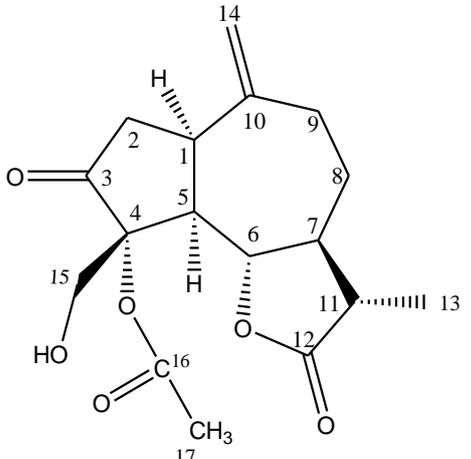
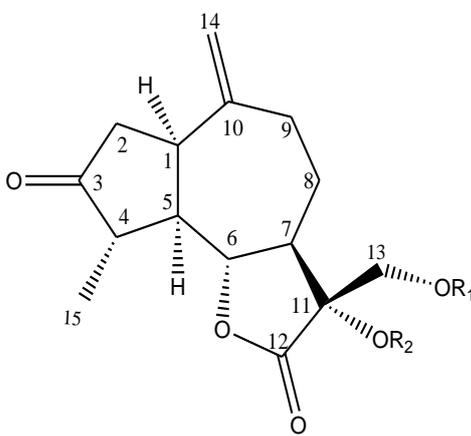
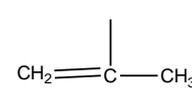
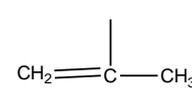
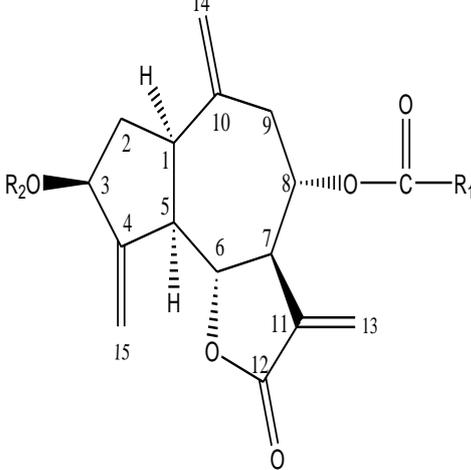
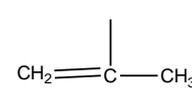
Espèce	Nom de composé	structure	Ref												
<p><i>Centaurea musimomum</i></p>	<p>3-oxo-4<math>\alpha</math>-acétoxy-15-hydroxy-1<math>\alpha</math>H,5<math>\alpha</math>H,6<math>\beta</math>H,7<math>\alpha</math>H,11<math>\beta</math>H-guai-10(14)-ene-6,12-olide</p>		<p>[35-36]</p>												
	<p><b>1.</b> 4<math>\beta</math>, 15-dihydro-3-dehydro-solstitialine A monoacétate</p> <p><b>2.</b> 4<math>\beta</math>, 15-dihydro-3-dehydro-solstitialine A</p> <p><b>3.</b> 4<math>\beta</math>, 15-dihydro-3-dehydro-solstitialine A diacétate</p> <table border="0" data-bbox="478 1232 766 1411"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>1</b></td> <td>Ac</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td><b>2</b></td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td><b>3</b></td> <td>Ac</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	<b>1</b>	Ac	H	<b>2</b>	H	H	<b>3</b>	Ac	Ac		
		R1	R2												
<b>1</b>	Ac	H													
<b>2</b>	H	H													
<b>3</b>	Ac	Ac													
<p><b>4.</b> Aguérine B</p> <table border="0" data-bbox="446 1590 798 1747"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>4</b></td> <td></td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	<b>4</b>		H									
	R1	R2													
<b>4</b>		H													

Tableau I.4: (suite)

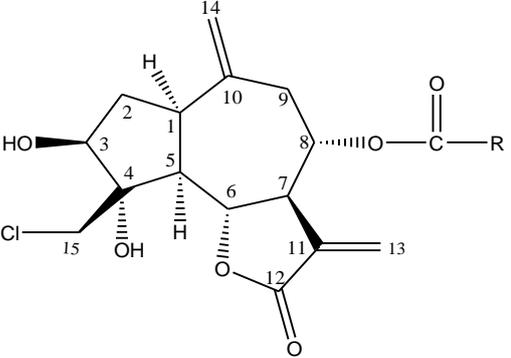
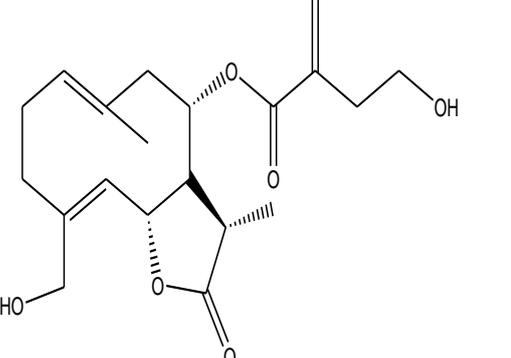
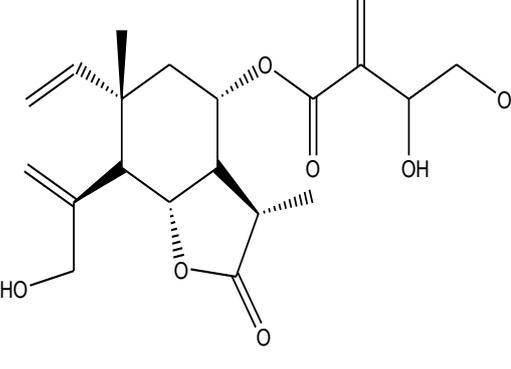
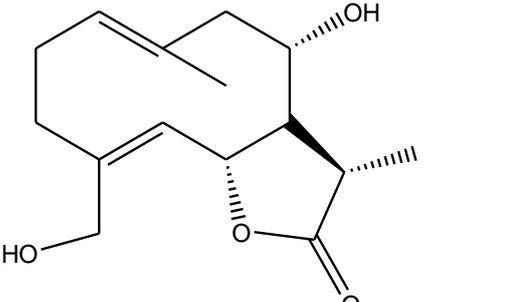
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea musimomum</i>	<p>5. 19-désoxy-chlorojanérine  6. Chlorojanérine  7. 17-épi-centaurepensine  8. Centaurepensine  (Chlorohyssopifoline A)</p> <p> <math display="block">\begin{array}{l} \text{R1} \\ \text{5} \quad \text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_3 \\ \text{6} \quad \text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \text{7} \quad (\text{R}) \quad \begin{array}{l} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_2\text{C} \\   \\ \text{Cl} \end{array} \\ \text{8} \quad (\text{S}) \quad \begin{array}{l} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \end{array}</math></p>		[35]
<i>Centaurea nicaensis</i>	Dihydro-11 $\beta$ ,13-dihydroxy-19-ncicine		[37]
	(5R, 6R, 7R, 8S, 10S, 11S)-15-hydroxy-8-(1, 2-dihydroxy-éthyl)-acryloxyelema-1,3-diène-6,12-olide.		
	11 $\beta$ , 13-dihydrosalonitenolide		

Tableau I.4: (suite)

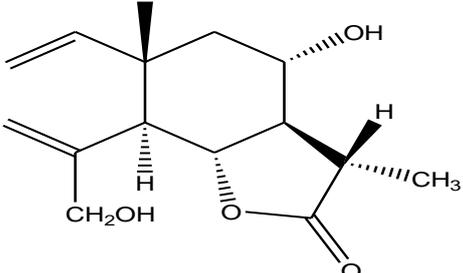
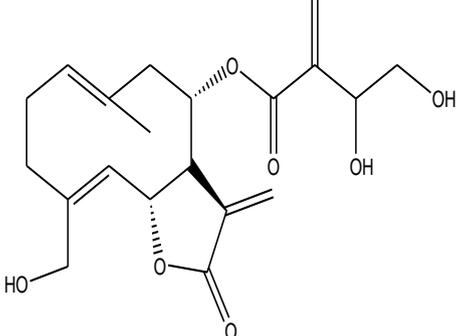
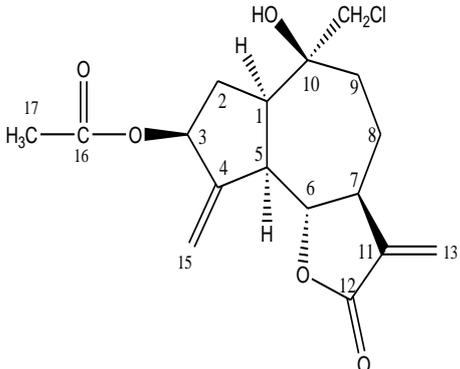
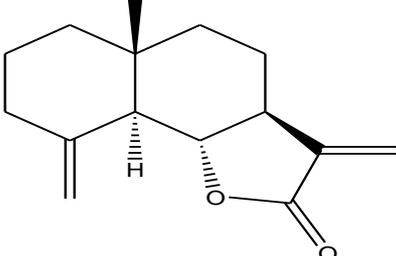
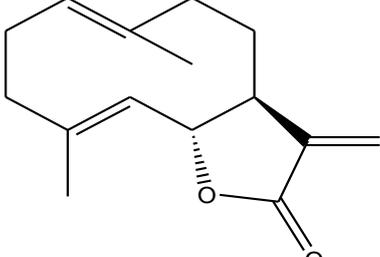
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea nicaensis</i>	Melitensine		[38]
<i>Centaurea napifolia</i>	cnicine		[39-40]
	3β-acetoxy-14-chloro-10β-hydroxy-1αH, 5αH,6βH,7αH-guaia-4(15),11(13)-dien-6,12-olide).		
<i>Centaurea acaulis</i> L.	β-cyclocostunolide		[41]
	costunolide		

Tableau I.4: (suite)

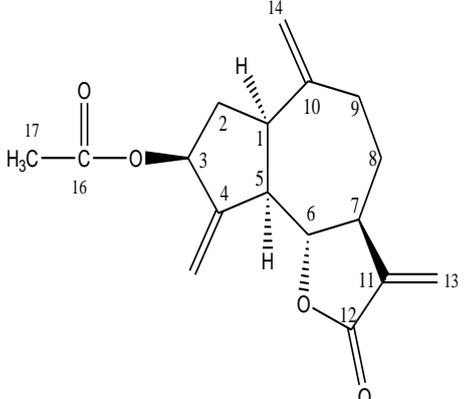
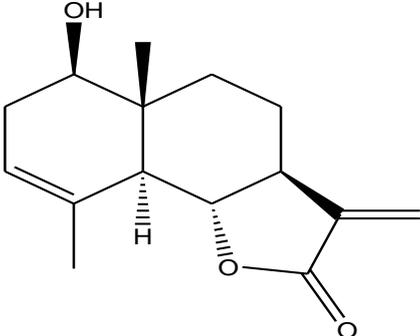
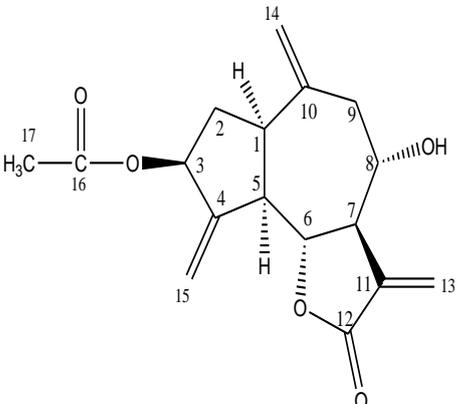
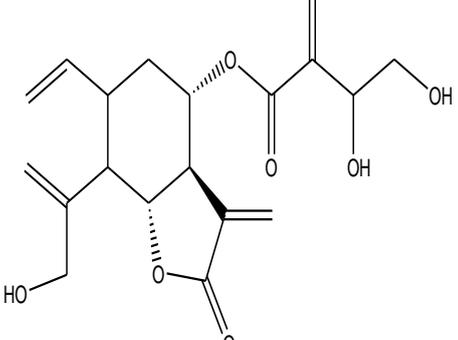
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea acaulis</i> L.	zaluzanine D		[41]
	santamarine		
	kandavanolide		
<i>Centaurea maroccana</i>	5 $\alpha$ H, 6 $\beta$ H, 7 $\alpha$ H, 15-hydroxy-8 $\alpha$ -(1',2'-dihydroxyéthyl)acryloylema1(2),3(4),11(13)-trien-6,12-olide		[41]

Tableau I.4: (suite)

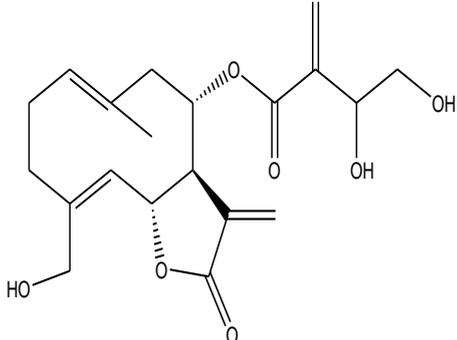
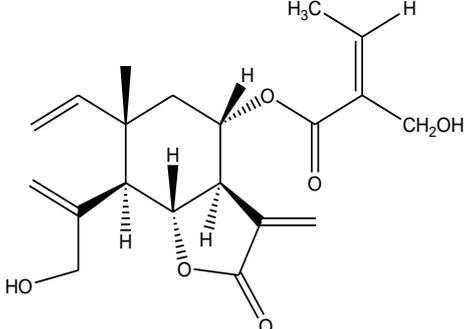
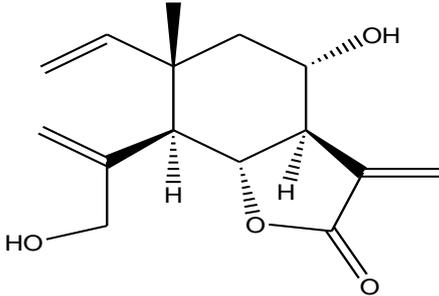
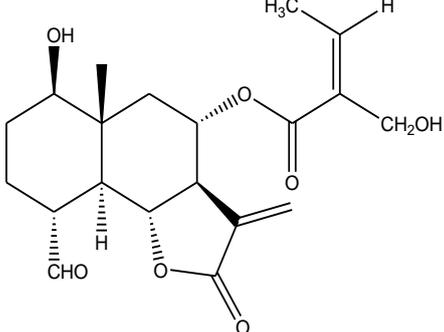
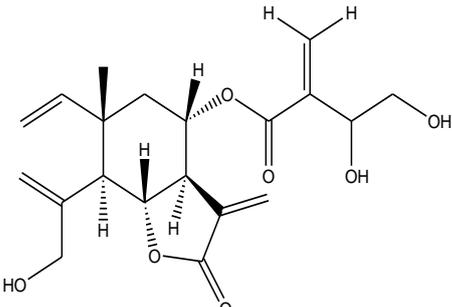
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
	cnicine		[41]
<i>Centaurea maroccana</i>	8 $\alpha$ -(2'-hydroxyméthyl-2'-butenoyloxy) dihydromelitensine		[42]
	11,13-dehydromelitensine		
	8 $\alpha$ -(2'-hydroxyméthyl-2'-butenoyloxy)-sonchucarpolide		
	5H $\alpha$ , 6H $\beta$ , 7H $\alpha$ , -15-hydroxy-8 $\alpha$ -(1',2'- dihydroxyéthyl-acryloxy)-elema-1(2), 3(4), 11(13)- trien-6,12-olide		

Tableau I.4: (suite)

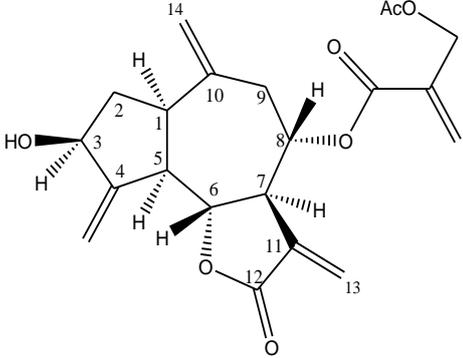
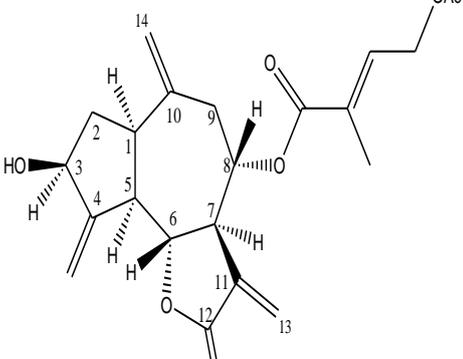
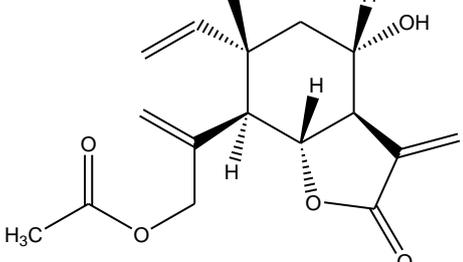
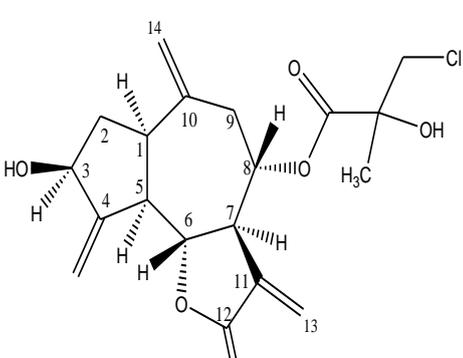
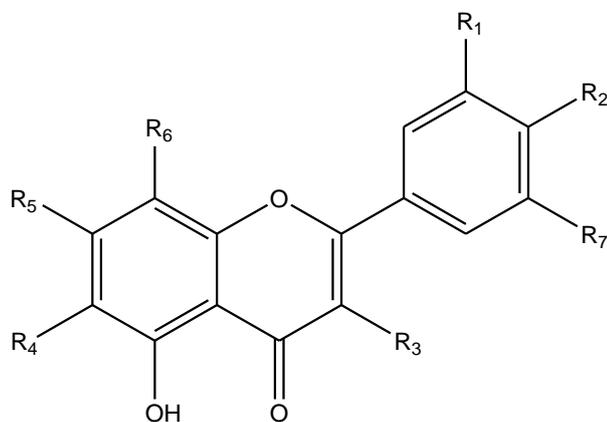
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea Omphalotricha</i>	4'-Acétyl cynaropicrine	 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene core with a lactone ring fused to a cyclohexane ring. The lactone ring has a carbonyl group at C12 and an oxygen at C11. The cyclohexane ring has a hydroxyl group at C3 and a methyl group at C4. A side chain at C9 includes a double bond at C14 and an ester group at C8. The ester group is a 4'-acetyl group, consisting of a methylene group attached to a carbonyl group, which is further attached to a methyl group.</p>	[43]
	4'-acétyl cébéline F	 <p>The structure is similar to 4'-acetyl cynaropicrine but with a different side chain at C9. It features a double bond at C14 and an ester group at C8. The ester group is a 4'-acetyl group, consisting of a propene chain attached to a carbonyl group, which is further attached to a methyl group.</p>	
	15-Acétyl dehydromelitensine	 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene core with a lactone ring fused to a cyclohexane ring. The lactone ring has a carbonyl group at C12 and an oxygen at C11. The cyclohexane ring has a hydroxyl group at C3 and a methyl group at C4. A side chain at C9 includes a double bond at C14 and an ester group at C8. The ester group is an acetyl group, consisting of a methylene group attached to a carbonyl group, which is further attached to a methyl group.</p>	
	Linichlorine B	 <p>The structure is similar to 4'-acetyl cébéline F but with a different side chain at C9. It features a double bond at C14 and an ester group at C8. The ester group is a 4'-chloro-1-hydroxybutyl group, consisting of a butyl chain with a hydroxyl group at C4 and a chlorine atom at C1, attached to a carbonyl group, which is further attached to a methyl group.</p>	

Tableau I.4: (suite)

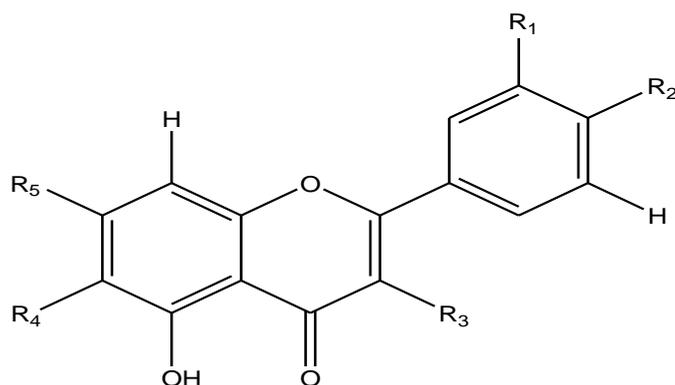
Espèce	Nom de composé	structure	Ref
<i>Centaurea Omphalotricha</i>	3-Acétyl cynaropicrine		[43]
	15-Acétyl melitensine		
	cynaropicrine		
	désacyl cynaropicrine		
	8-hydroxy-11β,13-dihydrozaluzanine		

**I.3.4.b Flavonoïdes du genre *Centaurea* isolés dans l'unité de recherche VARENBIOMOL**

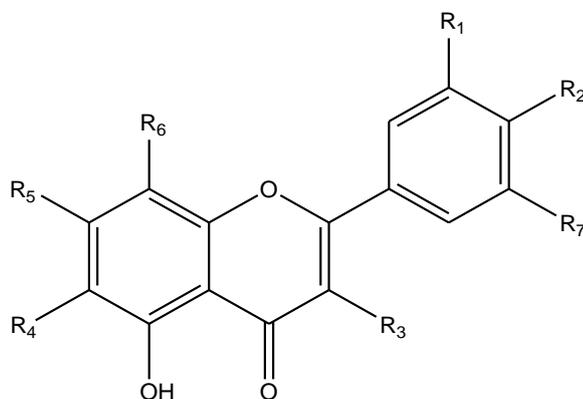
Les tableaux suivants présentent les flavonoïdes isolés des espèces étudiées dans notre unité de recherche VARENBIOMOL.

✓ *Centaurea incana* [44]

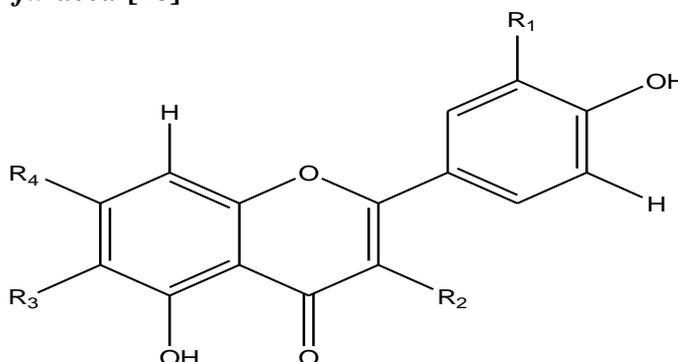
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
7,3',5'- tri-méthoxy-tricétine	OMe	OH	H	H	OMe	H	OMe
7,3',4',5'- tétra-méthoxy-tricétine	OMe	OMe	H	H	OMe	H	OMe
7- <i>O</i> -glucosyl 3,5'-diméthoxy-myricétine	OH	OH	OMe	H	<i>O</i> -glu	H	OMe
6- <i>C</i> -glucosyl- <i>O</i> - glucosyl apigénine	H	OH	H	<i>C</i> -glu- <i>O</i> -glu	OH	H	H
7- <i>O</i> -Glucosyl laricitrine	OMe	OH	OH	H	<i>O</i> -glu	H	H
6- méthoxy apigénine	H	OH	H	OMe	OH	H	H
6- méthoxy lutéoline	OH	OH	H	OMe	OH	H	H
6- méthoxy kaempférol	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
6- méthoxy quercétine	OH	OH	OH	OMe	OH	H	H
7- méthoxy 6- Glucosyl apigénine	H	OH	H	<i>O</i> -glu	OMe	H	H
7-méthyl galacturonide apigénine	H	OH	H	H	Me- Gala	H	H
7- <i>O</i> -Glucosyl 6- méthoxy quercétine	OH	OH	OH	OMe	<i>O</i> -glu	H	H
3- <i>O</i> -rhamno glucosyl quercétine	OH	OH	<i>O</i> -glu- <i>O</i> -rham	H	OH	H	H
6,8- di- <i>C</i> -glucosyl apigénine	H	OH	H	Glu	OH	Glu	H

✓ *Centaurea calcitrapa* [33,45]

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Apigénine	H	OH	H	H	OH
Hispiduline	H	OH	H	OMe	OH
Pectolinargéne	H	OMe	H	OMe	OH
Jacéosidine	OMe	OH	H	OMe	OH
Kaempférol	H	OH	OH	H	OH
6-méthoxykaempférol	H	OH	OH	OMe	OH
7-O-glucosylapigénine	H	OH	H	H	O-glu
3-O-glucosylquercétine	OH	OH	O-glu	H	OH
3-O-rutinosylkaempférol	H	OH	O-rutin	H	OH
7-O-glucosyl 6-méthoxykaempférol	H	OH	OH	OMe	O-glu
3-O-glucosylkaempferol	H	OH	O-glu	H	OH
3-O-glucosyl 6- méthoxy kaempférol	H	OH	O-glu	OMe	OH
5,7-dihydroxy, 6, 3', 4'- triméthoxyflavone (Eupatiline)	OMe	OMe	H	OMe	OH
5,3'dihydroxy, 6, 7, 4'- triméthoxyflavone (Eupatorine)	OH	OMe	H	OMe	OMe
3',4',5-trihydroxy 6,7 diméthoxyflavone (Cirsiliol)	OH	OH	H	OMe	OMe

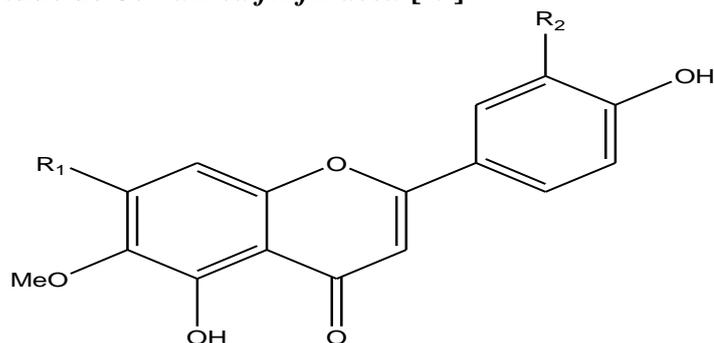
✓ *Centaurea nicaensis* [38, 46,47]

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
6,7 - diméthoxy chrysoériol	OMe	OH	H	OMe	OMe	H	H
7- <i>O</i> -glucosyl isoorientine	H	OH	H	glu	<i>O</i> -glu	H	OH
6- <i>O</i> -glucosyl isoorientine	H	OH	H	<i>O</i> -glu C-glu	OH	H	OH
6-méthoxy quercétine	OH	OH	OH	OMe	OH	H	H
6-méthoxy chrysoériol	OMe	OH	H	OMe	OH	H	H
6-méthoxy lutéoline	OH	OH	H	OMe	OH	H	H
6-méthoxy kaempférol	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
3'-méthoxy salvigénine	OMe	OMe	H	OMe	OMe	H	H
6,8-di-C-glycosyl apigénine	H	OH	H	C-glu	OH	C-glu	H
7- <i>O</i> -glucosyl 6-méthoxy quercétine	OH	OH	OH	OMe	<i>O</i> -glu	H	H
7- <i>O</i> -glucosyl hispiduline	H	OH	H	OMe	<i>O</i> -glu	H	H
7- <i>O</i> -glucosyl isorhamnétine	OMe	OH	OH	H	<i>O</i> -glu	H	H
5,4'-dihydroxy 6,7,3'- triméthoxyflavone	OMe	OH	H	OMe	OMe	H	H
Jacéosidine	OMe	OH	H	OMe	OH	H	H
Apigénine	H	OH	H	H	OH	H	H
7-(6''-méthylglucoronyl) apigénine	H	OH	H	H	OMe- glu	H	H
4'-(6''-méthylglucoronyl) apigénine	H	OMe- glu	H	H	OH	H	H

✓ *Centaurea furfuracea* [48]

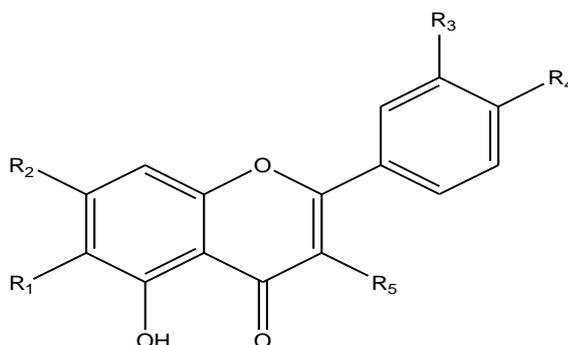
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Apigénine	H	H	H	OH
Hispiduline	H	H	OMe	OH
Cirsimaritine	H	H	OMe	OMe
3-méthyl kaempférol	H	Me	H	OH
7- <i>O</i> -glucosyl apigénine	H	H	H	<i>O</i> -glu
7- <i>O</i> -glucosyl hispiduline	H	H	OMe	<i>O</i> -glu
7- <i>O</i> -glucosyl patulétine	OH	OH	OMe	<i>O</i> -glu
7- <i>O</i> -méthyl-glucoronyl hispiduline	H	H	H	OMe- gluc
7- <i>O</i> -méthyl-glucoronyl apigénine	H	H	H	OMe- gluc

- Une autre étude de *Centaurea furfuracea* [49]



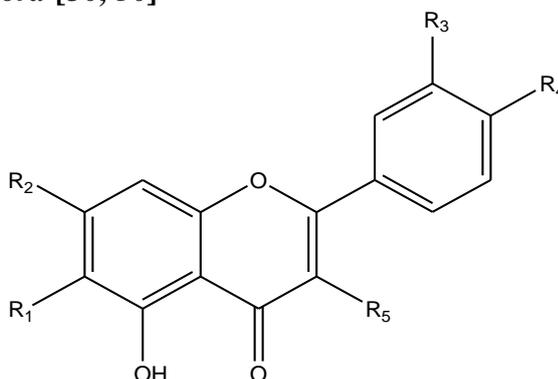
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
5,7,4'-trihydroxy 6-méthoxy flavone	OH	H
5,4'-dihydroxy 6,7-diméthoxy flavone	OMe	H
5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-méthoxy flavone	OH	OH

- ✓ *Centaurea napifolia* [39-40]



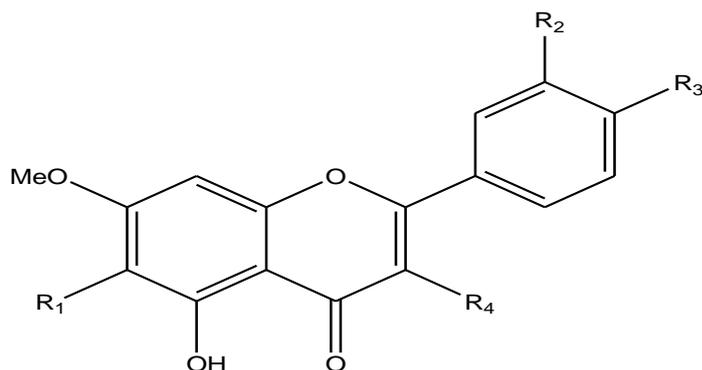
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
3,3',4',5 – tetrahydroxy flavone	H	H	OH	OH	OH
4',5,7– trihydroxy 6 - méthoxy flavone	OMe	OH	H	OH	H
4',5 - dihydroxy 6,7 - diméthoxy flavone	OMe	OMe	H	OH	H
4',5 - dihydroxy 3',6,7 – triméthoxy flavone	OMe	OMe	OMe	OH	H
5 - hydroxy 3',4',6,7 - tetraméthoxy flavone	OMe	OMe	OMe	OMe	H

- ✓ *Centaurea parviflora* [30, 50]



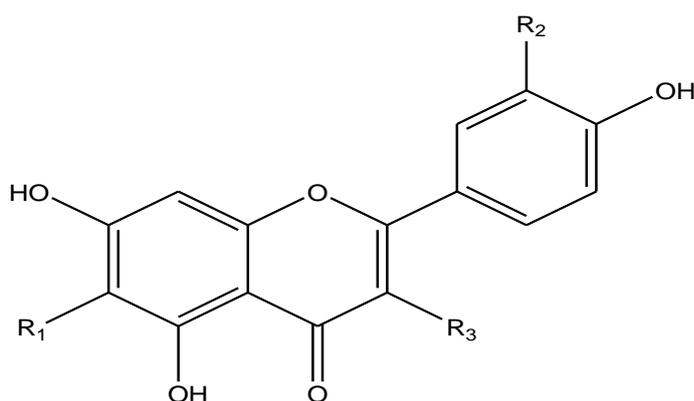
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
5,3'- dihydroxy 6,7,4'-triméthoxy flavone	OMe	OMe	OH	OMe	H
5,7 -dihydroxy 6,3',4'-triméthoxy flavone	OMe	OH	OMe	OMe	H
5,4'-dihydroxy 6,7,3'- triméthoxy flavone	OMe	OMe	OMe	OH	H
5,7,4'-trihydroxy 6,3'-diméthoxy flavone	OMe	OH	OMe	OH	H
3-rutinosyl kaempférol	H	OH	H	OH	<i>O</i> -rutin

✓ *Centaurea pungens* [51]



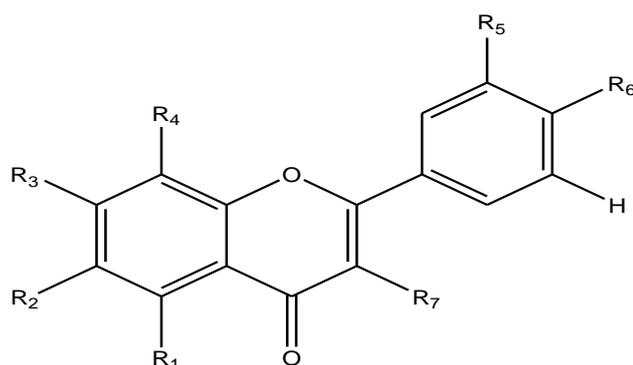
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
5-hydroxy 6,7,4'-triméthoxy flavone	OMe	H	OMe	H
5-hydroxy 6,7,3',4'-tetraméthoxy flavone	OMe	OMe	OMe	H
5,3'-dihydroxy 6,7,4'-triméthoxy flavone	OMe	OH	OMe	H
5,4'-dihydroxy 3,7-diméthoxy flavone	H	H	OH	OMe

✓ *Centaurea lippii* [52]



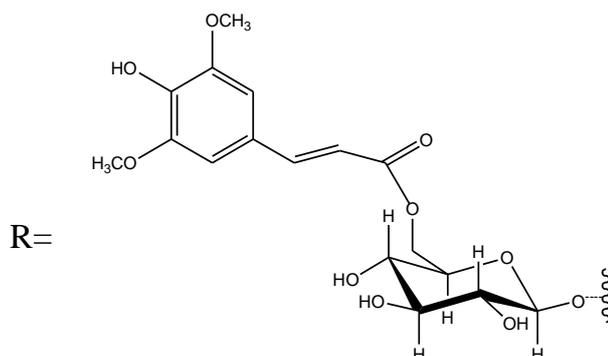
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
6- <i>C</i> -glucosyl apigénine	Glu	H	H
3- <i>O</i> -glucosyl quercétine	H	OH	<i>O</i> -glu
3- <i>O</i> -rutinosyl kaempférol	H	H	<i>O</i> -rutin

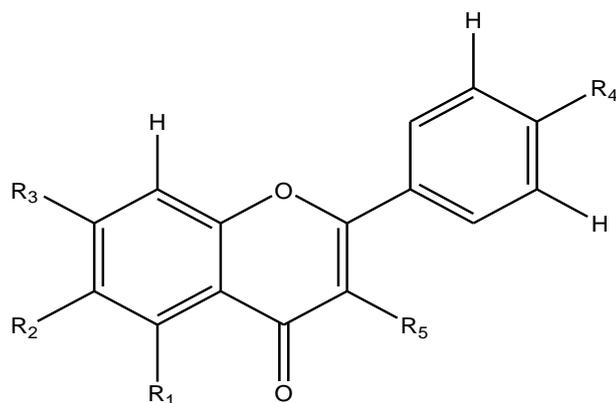
✓ *Centaurea africana* [47]



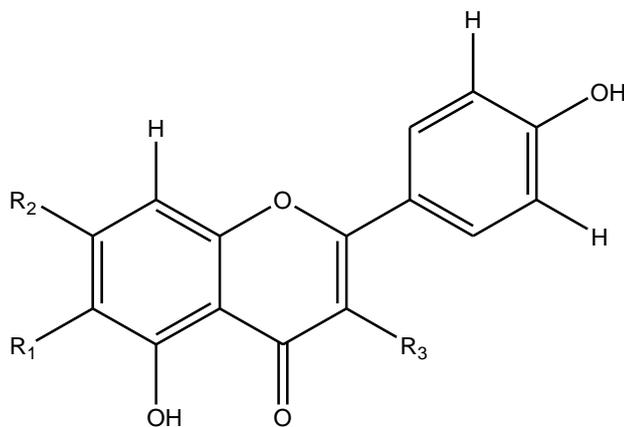
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
5,7,3'-trihydroxy 6, 3,4'-triméthoxyflavone (Centaureidine)	OH	OMe	OH	H	OH	OMe	OMe
7-O-β-D-glucopyranosyl centaureidine	OH	OMe	O-glu	H	OH	OMe	OMe
5,7,8-trihydroxy-3' -O-rhamnosylflavone	OH	H	OH	OH	O-rha	H	H
5,6,8,3'-tetrahydroxy-3,7,4'-triméthoxyflavone	OH	OH	OMe	OH	OH	OMe	OMe
5,3'-dihydroxy-3,7,8,4'-tetraméthoxyflavone	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	OMe
5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyflavone	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
5,7,4'-dihydroxy-6-méthoxyflavone	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
5,7,4'-trihydroxy-3,6,3'-triméthoxyflavone	OH	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe
4'-méthyl gossypetine	OH	H	OH	OH	OH	OMe	OH
8-méthylgossypétine ou corniculatine	OH	H	OH	OMe	OH	OH	OH
3',4',5,7-tetrahydroxy-6-méthoxyflavone ou népétine	OH	OMe	OH	H	OH	OH	H
7-(6''-sinapyl-O-β-D- glucopyranosyle) (Algérianine)	OH	OMe	O-glu-OR	H	OH	OMe	OMe

Algérianine:

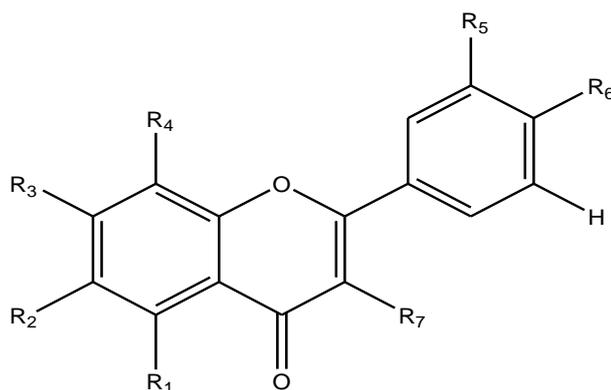


✓ *Centaurea acaulis* L. [19]

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
6-méthoxyisopratol	H	OMe	OMe	OH	H
Hispiduline	OH	OMe	OH	OH	H
Ermanine	OH	H	OH	OMe	OMe

✓ *Centaurea maroccana* [15, 53, 54]

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
4',5,7-trihydroxy-6-méthoxyflavone ou hispiduline	OMe	OH	H
7-O-Méthylglucuronyl apigénine	H	OMe-gluc	H
4',5-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone ou cirsimaritrine	OMe	OMe	H
4',5,7-trihydroxy-3,6-méthoxyflavone ou 6-méthoxyisokaempferide	OMe	OH	OMe
4',5,7-trihydroxyflavone ou apigénine	H	OH	H
Isokaémpféride	H	OH	OMe

✓ *Centaurea Omphalotricha* [43]

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
4',3, 5, 7-tetrahydroxyflavone ou Kaempferol	OH	H	OH	H	H	OH	OH
3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone ou Luteoline	OH	H	OH	H	OH	OH	H
4', 5, 7-trihydroxyflavone ou Apigénine	OH	H	OH	H	H	OH	H

✓ *Centaurea Sphaerocephala* [55, 56]

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
7-O- glucosyl chrysoeriol	OH	H	O-glu	H	OMe	OH	H
7-O- glucosyl apigénine	OH	H	O-glu	H	H	OH	H

**I.4 Utilisation en médecine traditionnelle**

Dans la littérature, plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référenciées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle [57-58].

Parmi les propriétés thérapeutiques reconnues chez les espèces de ce genre nous pouvons citer:

- Soigner certaines maladies comme le diabète, les rhumatismes, la malaria, l'hypertension... [59].
- Des pouvoirs diurétiques, antipyrétiques, cytotoxiques et antibactériens [60].
- Un pouvoir antidiabétique et anti-diarrhéique [60-61].
- Un pouvoir antirhumatismal [60].
- Effet hypoglycémiant et activité antipyrétique [62].

Dans la médecine traditionnelle turque, des variétés d'espèces du genre *Centaurea* sont utilisées pour soulager la douleur et l'inflammation, les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, la fièvre et les maux de tête [63].

### **I.5 Intérêts biologiques du genre *Centaurea* et de ses principaux métabolites secondaires**

Le genre *Centaurea* présente un grand intérêt thérapeutique, notamment comme source naturelle de sesquiterpènes lactones et flavonoïdes qui sont les constituants majoritaires de ce genre.

Aux cours de ces dernières décennies, l'investigation biologique des extraits et des constituants chimiques des espèces du genre *Centaurea*, a montré que ces derniers possèdent diverses activités biologiques, par exemple, le pouvoir anti-inflammatoire de certaines d'entre elles est attribué à la présence des sesquiterpènes lactones qui possèdent un groupe  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone responsable de ce pouvoir [64-65].

Parmi les travaux reportés sur les espèces du genre *Centaurea*, on peut citer comme exemple: Les espèces *C. malacitana* et *C. corcubionensis* qui possèdent respectivement des propriétés anti-inflammatoires, digestives, diurétiques, astringentes, cholagogues et peuvent être utilisées seules ou mélangées avec d'autres plantes en médecine traditionnelle [66-67].

Le costunolide (sesquiterpène lactone) isolé de *Centaurea acaulis* [68], exerce des effets inhibiteurs sur la fonction tueuse des lymphocytes T cytotoxiques [69]. D'autres études ont également montré que le costunolide inhibe la synthèse de l'oxyde nitrique (NO), déclencheur chimique de l'inflammation [70] et déprime la croissance des cellules cancéreuses [71].

L'espèce *Centaurea calcitrapa* est utilisée dans le traitement de la fièvre [57].

### **I.6 Conclusion**

L'étude bibliographique réalisée sur la composition chimique des espèces du genre *Centaurea*, confirme bien la richesse de ces derniers en métabolites secondaires de types lactone sesquiterpénique et flavonoïde qui sont bien connues pour leur grande importance en activités biologiques. La richesse en métabolites secondaires de ce genre nous a incités à entreprendre l'investigation phytochimique de deux espèces endémiques : *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur., qui n'ont fait l'objet d'aucune étude auparavant.

## Références bibliographiques

- [1] Bonnier., G. (1934). Flore complète de France, Suisse et Belgique, 10<sup>ème</sup> Éd. 118.
- [2] Gaussen, H., Leroy, H. F. (1982). Précis de Botanique (végétaux supérieurs). 2<sup>ème</sup> Ed: Masson, 426.
- [3] Ozenda, P., (1977), Flore du Sahara, Ed CNRS, Paris. France. 250-259.
- [4] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France.
- [5] Mabberley, D.J., (1987), The Plant Book 110, Combridge University Press.
- [6]. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Centaurea>.
- [7] Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., (2002), Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning, *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 1051–1054.
- [8] Flamini, G., Giuseppe Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Osman Tugay, O., Demirelma, H., (2004), Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 553–557.
- [9] Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., (2001), A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*, *Phytochemistry*, 58, 1229–1233.
- [10] Flamini, G., Antognoli, E. and Morelli, I., (2001), Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy, *Phytochemistry*, 57, 559–564.
- [11] Picher, M. T., Seoane, E., Tortajada, A., (1984), two new anti-inflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*, *Phytochemistry*, 23(9), 1995-1998.
- [12] Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S. D., (2006), Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea Americana*. *Tetrahedron*, 62, 11172-11177.
- [13] Akkal, S., Benayache, F., Medjrubi, K., and Tillequin, F., (2007), Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(3), 319-320.
- [14] Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S. M., Nahar, L., Paul, K. T., Sarker, S. D., (2006), Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its *in vitro* cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*, 62(48), 11172-11177.
- [15] Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Bermejo, J., Benayache, F., (2007), Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*, *Chemistry of Natural Compounds* 43(6), 749-750.

- [16] Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F., (2006), Phenolic compounds from *Centaurea Africana*. *Chemistry of Natural Compounds* 42(6), 491-492.
- [17] Medjroubi, K., (1999), Thèse de doctorat, Université de Constantine 1.
- [18] Nacer, A., (2009), Thèse de Doctorat, Université de Constantine 1.
- [19] Bicha, S., (2010), Thèse de Doctorat, Université de Constantine 1.
- [20] Ayad, R., (2013), Thèse de Doctorat, Université de Constantine 1.
- [21] Marco, J., A., Sanz-Cervera, J., F., Yuste, A., Sancenón, F., Carda, M., (2005), Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry* 66, 1644-1650.
- [22] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. (1999), 3<sup>ème</sup> édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [23] Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., (2005), Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*., Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 76, 744-746.
- [24] Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A., M., Raccuglia, R., A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M., (2006). Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa* . *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 349-352.
- [25] Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I., A., (2007), Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry* 68, 609-615.
- [26] Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C., Skaltsa, H., (2008), A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 3725-3731.
- [27] Nacer, A., Merza, J., Kabouche, Z., Rhouati, S., Boustie, J., Richomme, P., (2012), Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 163-165.
- [28] Havsteen, B.H., (2002), The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.
- [29] Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., (2000), The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751.
- [30] Belbache, H., (2007), Thèse de magister, Université Mentouri Constantine 1.
- [31] Seghiri, R., (2007), Thèse de doctorat, Université de Constantine 1
- [32] Medjroubi, K., (1991), Thèse de Magistère, Constantine 1.

- [33] Kitouni, R., (2007), Thèse de magister, Université Mentouri Constantine 1.
- [34] Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou, P., Drodz, B., Nowak, G., Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* *Phytochemistry*, 31(12), 4359-4360.
- [35] Medjroubi, K. Benayache, F. Benayache, S. Akkal, S. Khalfallah, N.P., (1997), Aclinou, Guaianolide from *Centaurea musimomum*, *Phytochemistry*, 45(7), 1449.
- [36] Platas, J.G., Ruiz-Pérez, C., Ganzalez, A.G., Bermejo, J., Medjroubi, K., (1999), 4 $\beta$ ,15-dihydro-3-dehydrosolstitialin A, *Acta Cryst*, 55,1837.
- [37] Medjroubi, K., Bouderdara, N., Benayache, F., Akkal, S., Seguin, E., Tillequin, F., (2003), Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*, *Chemistry of natural compounds*, 39(5), 506 - 507.
- [38] Hammoud, L., (2009), Thèse de magister, Université Mentouri Constantine 1.
- [39] Bentamene, A., (1997), Thèse de Magister, Constantine 1.
- [40] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E. and Tillequin, F., (2003), flavonoids aglycones from *Centaurea napifolia*, *Chemistry of Natural Compounds*, 39(2), 165-166.
- [41] Bentamene, A., 2005. Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine 1.
- [42] Bicha, S., Chalard, P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, V. P., Lobstein, A., Bentamene, A., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache F., (2013), Moroccan: A New  $\gamma$ -lactone and Other Constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae), *Rec. Nat. Prod.*, 7(2) 114-118.
- [43] El-hadj, K., (2013), Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine 1.
- [44] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Jay, M., (1997), Flavonids from *Centaurea incana*, *Biochemical systematics and Ecology*, 4, 361.
- [45] Bencherait, R., (1989), Thèse de Magister, Constantine 1.
- [46] Athmani, G., Benayache, S., Benayache, F., Dendoughi, H., Jay, M., (1998), Flavonoids extracted from *Centaurea nicaeensis* All, *J. Soc Alger. Chem*, 8(1), 29-36.
- [47] Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estévez, F., León, F., Bermejo, J., Benayache, F., (2009), A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*, *Phytochemistry Letters*, 2, 114-118.
- [48] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Jay, M., Tillequin, F., Seguin, E., (1999), New flavone glycoside from, *Centaurea furfuracea*, *Fitoterapia*, 70, 368-370.
- [49] Delouche, S., (2003), Thèse de Magister, Constantine 1.
- [50] Boubekri, C., (2003), Thèse de Magister, Constantine 1.

- [51] Benakcha, R., (2001), Thèse de Magister, Constantine1.
- [52] Mezache, N., (2002), Thèse de Magister, Constantine1.
- [53] Bentamène, A., (2005), *Thèse de doctorat d'Etat*, Université Mentouri de Constantine.
- [54] Bensouissi, C., (2008), *Thèse de magister*, Université Mentouri de Constantine,
- [55] Bentamène, A., Baz, M., Boucheham, R., Benayache, S., Creche, J. and Benayache, F., (2008), Flavonoid aglycones from *Centaurea Sphaerocephala*. *Chemistry of Natural compounds*, 44(2), 234-235.
- [56] Bentamène, A., Boucheham, R., Baz, M., Benayache, S., Creche, J. and Benayache, F., (2010), Flavonoid glucosides from *Centaurea Sphaerocephala*. *Chemistry of Natural compounds*, 46(3), 452-453.
- [57] Yesilada, E., (2002), *Biodiversity in Turkish Folk Medicine*. In: Sener, B. (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK, pp. 119–135.
- [58] Kamanzi, K., Raynaud, J., Voirin, B., (1983), The C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea malitensis*. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 17, 47–51.
- [59] Mohammad, S., Sezgin, C., Marcel, J., Yashodharan, K., Stephen, M.M., Lutfun, N., Paul, K.T., Satyajit, D.S., (2005), Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*, *Tetrahedron*, 61(38), 9001–9006.
- [60] Kose, Y.B., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Celik, S., (2007), Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis* *Fitoterapia*, 78, 253–254.
- [61] Mohammad, S., Sezgin, C., Marcel, J., Yashodharan, K., Stephen, M.M., Lutfun, N., Paul, K.T., Satyajit, D.S., (2005), Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*, *Tetrahedron*, 61, 9001–9006.
- [62] Masso, J.L., Bertran, M., Adzet, T., (1979), Contribution to the chemical and pharmacological study of some species of *Centaurea*, *Plant Méd. Phytother.* 13, 41-45.
- [63] Esra, K.A., Reyhan, A., Fatma, E., Erdem, Y., (2009), Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species, *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 210–215.
- [64] Kupchen, S.M., Eakin, M.A., Thomas, A.M., structure cytotoxicity relationship among the sesquiterpen lactones, *J of Med Chem*, (1971), 14, 1147- 1152.
- [65] Catherine, K., George, D.G., Helen, S., (2006), A simulation study of the interaction of sulfhydryl nucleophiles with several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp., *Journal of Molecular Structure*, 759, 215–224.

[66] Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., Gravalos, D.G., (1997), Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*, *Fitoterapia*, 68(3): 281-283.

[67] Orallo, F., Lamela, M., Camiña, M., Uriate, E., Calleja, J. M., (1998), Preliminary Study of the Potential Vasodilator Effects on Rat Aorta of Centaurein and Centaureidin, Two Flavonoids from *Centaurea corcubionensis*, *Planta Medica*, 64(2): 116-119.

[68] Bentamène, A., Benayache, S., Crèche, J., Petit, G., Bermejo, 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.

[69] Taniguchi, M., Kataoka, T., Suzuki, H., Uramoto, M., Ando, M., Arao, K., Magae, J., Nishimura, T., Otake, N., Nagai, K., 1995. Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2064–2067.

[70] Lee, H.J., Kim, N.Y., Son, H.J., Kim, K.M., Sohn, D.H., Lee, S.H., Ryu, J.H., (1999), A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha in LPS-activated macrophages. *Planta Med.* 65, 104– 108.

[71] Hall, I.H., Lee, K.H., Mar, E.C., Starnes, C.O., Wadell, T.G., (1977), Antitumor agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones. *J. Med. Chem.* 20, 333– 337.

# *Chapitre II*

## *Métabolites secondaires*

## II. Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions même de vie de la plante. La plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : **les métabolites secondaires**.

La pharmacodynamie (discipline qui étudie l'effet des médicaments sur l'organisme) est utile pour justifier l'activité des principes actifs isolés ou associés. Par ailleurs, pour toute utilisation de plantes, il faut recourir soit à des médecins soit à des pharmaciens compétents dans ce domaine [1].

Les métabolites secondaires peuvent être classés en 3 principales familles : **les alcaloïdes, les polyphénols et les terpènes**.

### II.1 Les alcaloïdes

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20% des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques [2]. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et leur véritable valeur ne s'affirme qu'entre les mains du médecin car ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques.

### II.2 Composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols, excluant ainsi les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. La désignation générale « composés phénoliques » concerne donc à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [3]. Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en flavonoïdes et non flavonoïdes.

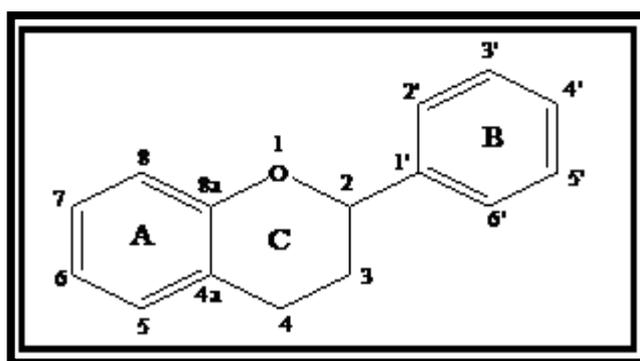
## II.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols [4].

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxyles, méthoxyles, méthyles, benzyles, isoprényles et autres [5].

### II.2.1.1 Structure chimique et classification

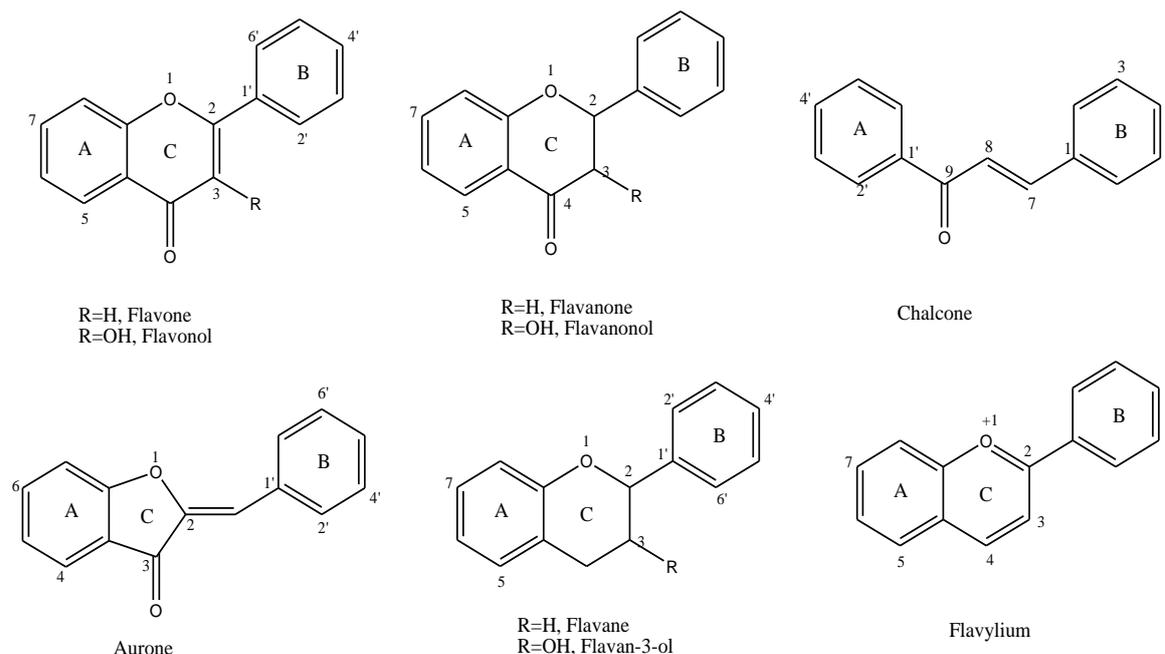
Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C [4].



**Figure II.1:** Squelette de base des flavonoïdes [4]

D'une façon générale, les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de *C*- ou *O*-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères [4,6].

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, aurones, chalcones, anthocyanines.



**Figure II.2:** Structure des différentes classes des flavonoïdes [4].

### II.2.1.2 Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes dont la principale raison de leur biosynthèse est de lutter contre les agressions de leur environnement extérieur.

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antioxydante [7-10], antiulcéreux, antiallergique, anti-inflammatoire [7, 11-12], anti-tumorale, antivirale [7], antispasmodique, cytotoxique, anti-carcinogène [13] et antidépressive [14].

A cause de leur diversité structurale, les flavonoïdes sont reconnus comme des piègeurs de radicaux libres tels que les superoxydes, les peroxydes ou radicaux hydroxyles [15]. Ils inhibent certaines enzymes comme l'histidine décarboxylase, l'elastase, l'aldose réductase, lipooxygénase et cyclooxygénase [16]. Ceci par la formation de complexes avec les métaux comme le fer et le cuivre. De plus, ils augmentent la fluidité des membranes cellulaires et diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants : c'est une propriété connue sous le nom de «vitaminique P». Egalement, ils jouent un rôle important dans la lutte contre les maladies cancérogènes [17- 18].

Par ailleurs, certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [19].

Les effets antiviraux des flavonoïdes ont été également démontrés [20].

## II. 2.2 Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels, on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones. On distingue deux principales classes d'acide phénolique : les dérivés de l'acide benzoïque et ceux de l'acide cinnamique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine contrairement à ceux de l'acide hydroxycinnamique [21].

**Tableau II.1:** Principaux acides hydroxybenzoïques

	R1	R2	R3	R4	Formule
<b>Acide parahydroxybenzoïque</b>	H	H	OH	H	
<b>Acide protocatéchique</b>	H	OH	OH	H	
<b>Acide vanillique</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<b>Acide gallique</b>	H	OH	OH	OH	
<b>Acide salicylique</b>	OH	H	H	H	
<b>Acide gentisique</b>	OH	H	H	OH	

**Tableau II.2:** Principaux acides hydroxycinnamiques

	R1	R2	R3	Formule
<b>Acide paracoumarique</b>	H	OH	H	
<b>Acide caféique</b>	OH	OH	H	
<b>acide férulique</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<b>acide sinapique</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
<b>acide 3,4-diméthoxycinnamique</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	

## II. 3 Coumarines

Les coumarines constituent une classe importante des produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont les Fabacées, les Rutacées, les Apiacées et les Thymelacées.

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Elles ont un spectre UV caractéristique [22].

Les coumarines (Tableau II.3) présentent des propriétés cytotoxiques, antivirales, Immunostimulants, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives, elles sont aussi bénéfiques en cas d'affections cutanées [23].

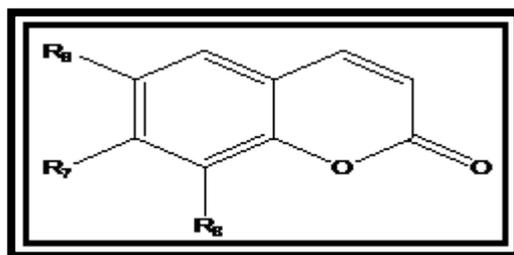


Figure II.3: Structure de base de Coumarine [23].

Tableau II.3: Quelques exemples de coumarines.

Nom de coumarine	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
Ombelliférone	H	OH	H
Herniarine	H	OCH <sub>3</sub>	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Scopanone	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

#### II.4 Les terpènes

Ces substances appelées également terpénoïdes, constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatils et unis par une origine commune. Ils sont formés d'unités de cinq atomes de carbone, unité isoprène.

L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire [20].

A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre:

- ✓ **Monoterpènes** qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone.
- ✓ **Sesquiterpènes** qui contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone.
- ✓ **Diterpènes** qui comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone.
- ✓ **Sesterpènes** qui comptent 25 atomes de carbone.
- ✓ **Triterpènes** qui comportent 30 atomes de carbone.
- ✓ **Tétraterpènes** qui contiennent 40 atomes de carbone.

### II.4.1 Les lactones sesquiterpènes

Les lactones sesquiterpéniques sont des métabolites présents chez de nombreuses familles de plantes, de champignons et de bryophytes, elles ont été mises en évidence chez les Angiospermes (Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae, ...) et très abondamment chez la famille décomposée d'où l'intérêt de ce travail.

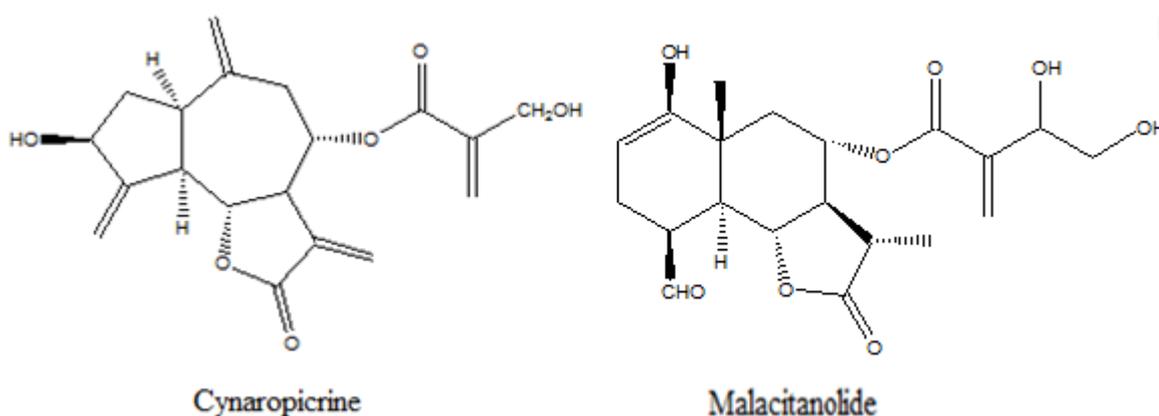
Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe très important de produits naturels largement répandus notamment chez les astéracées, plus de 3000 structures ont été identifiées [24].

Les lactones sesquiterpéniques sont en général issues des parties aériennes et localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Elles sont par contre rares dans les parties souterraines d'où quelques rares structures ont été isolées, notamment la lactucine des racines de chicorée et l'hélénaline de l'aunée.

La particularité structurale des sesquiterpènes lactones leur confère des possibilités de réactivité biologique incontestables compte tenu de l'enchaînement  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone et des fonctions époxydes fréquentes dans les majeures parties de ces molécules [25].

#### II.4.1.1 Nomenclature des lactones sesquiterpéniques

Elle consiste à ajouter le suffixe « olide » au nom du squelette sesquiterpénique indiquant le caractère lactonique, ou un nom trivial le plus souvent inspiré par l'origine botanique de la structure. On peut citer à titre d'exemple le guaianolide: Cynaropicrine extrait de *Centaurea ptosimopappoides* et l'eudesmanolide: malacitanolide extrait de *Centaurea malacitana* [26-27].



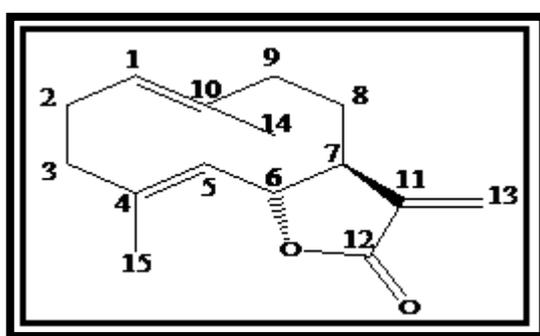
### II.4.1.2 Structures des sesquiterpènes lactones

Le précurseur universel des sesquiterpènes lactones est le farnésyle diphosphate (FDP) qui résulte de la condensation de type tête-à-queue entre l'isopentényle Pyrophosphate (IPP) et le géranyle diphosphate (GDP). La cyclisation du farnesyl pyrophosphate donne le germacradiène qui est le squelette de base de tous les types de lactones sesquiterpéniques.

Selon la structure des lactones sesquiterpéniques, on peut les subdiviser en plusieurs types:

#### II.4.1.2.a Les germacranolides

Les lactones sesquiterpéniques de type germacranolide ont comme squelette de base un cycle à dix atomes de carbone (Figure II.4).

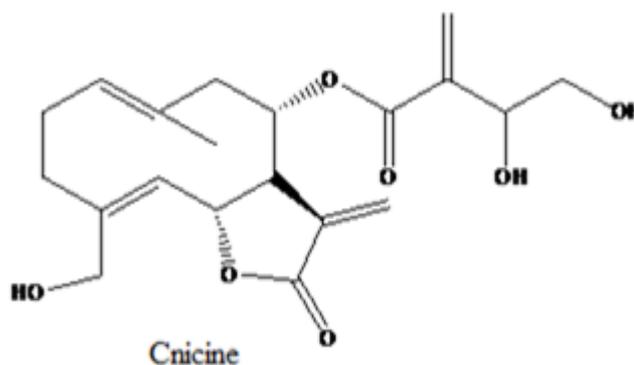


**Figure II.4:** Squelette de base des germacranolides

La plupart de ces structures contiennent deux doubles liaisons, une entre C-1 et C-10 et l'autre entre C-4 et C-5 de configuration (E, E). Ces doubles liaisons peuvent être remplacées par des fonctions époxydes avec les stéréochimies  $\beta$  C-1-  $\beta$  C-5. La double liaison exocyclique en C-11 peut être réduite en  $11\alpha$ -H,  $13\beta$ -Me ou  $11\beta$ -H,  $13\alpha$ -Me. Dans la plupart des composés de ce type, isolés du genre *Centaurea* le carbone C-4 porte le groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

Parmi ces composés on peut citer :

La Cnicine isolé de *Centaurea cnicus benedictus* [28].



### II.4.1.2.b Les élémanolides

Les lactones sesquiterpéniques de type élémanolide ont comme squelette de base un monocycle comme le montre la figure II.5.

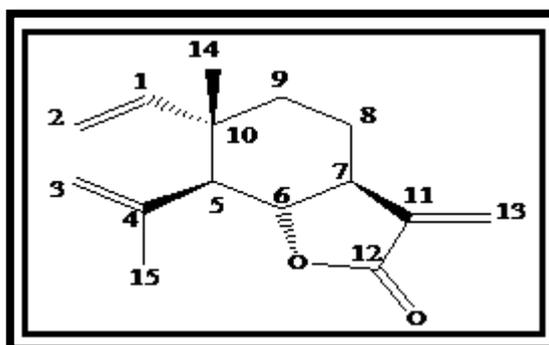


Figure II.5: Squelette de base des élémanolides

L'ossature principale est caractérisée par la stéréochimie  $\alpha$  de la liaison C-1 - C-10 et  $\beta$  de la liaison C-4 - C-5,  $\alpha$  de l'hydrogène porté par le carbone C-5 et  $\beta$  du méthyle porté par le carbone C-10.

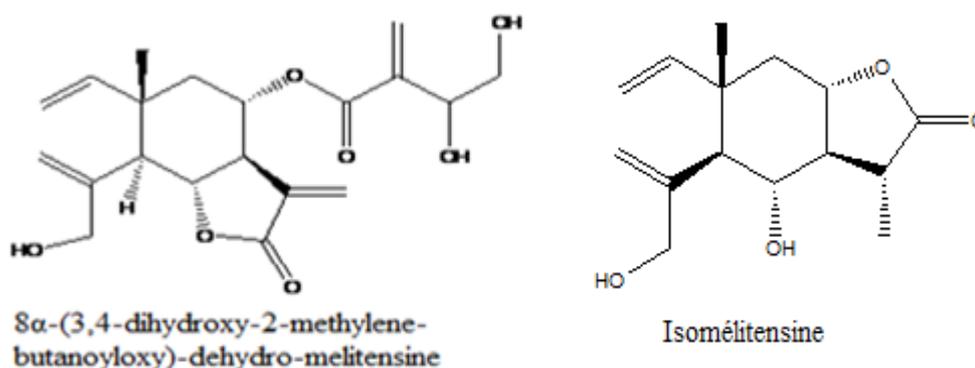
Tous les élémanolides du genre *Centaurea* contiennent une double liaison entre C-1 et C-2 et une autre entre C-3 et C-4 et en général une double liaison exocyclique en C-11 qui peut être réduite en 11  $\beta$ -H, 13  $\alpha$ -Me ou 11  $\beta$ -OH, 13  $\alpha$ -Me.

Le carbone C-4 porte souvent le groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$ , mais ce groupement peut être oxydé et donne un CHO.

La lactonisation se fait normalement en C-6, cependant elle se fait également en C-8, quel que soit le carbone de lactonisation, les carbones C-6 ou C-8 portent souvent des groupes esters ou hydroxyles avec une stéréochimie  $\alpha$ .

Parmi les composés isolés on peut citer à titre d'exemple :

Le 8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-déhydro-mélitensine extrait de *Centaurea thessala* et Isomélitensine extrait de *Centaurea seridis* [29-30].



### II.4.1.2.c Les eudesmanolides

Les eudesmanolides ont comme squelette de base deux cycles hexagonaux comme le montre la figure II.6.

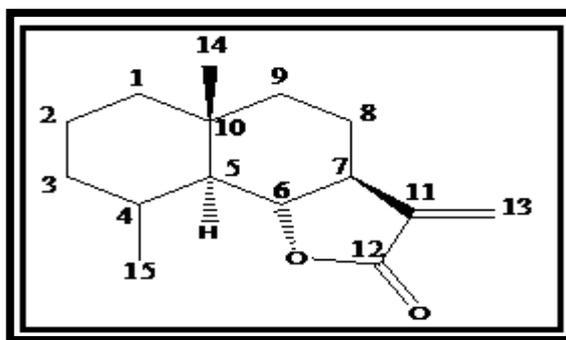
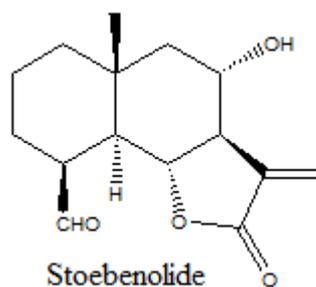


Figure II.6: Squelette de base des eudesmanolides

Ils se distinguent par la stéréochimie  $\alpha$  de l'hydrogène H-5 et par la stéréochimie  $\beta$  du méthyle porté par le carbone C-10. Le déplacement chimique de ce méthyle est caractéristique par sa valeur qui n'excède pas 1 ppm. A notre connaissance, les eudesmanolides du genre *Centaurea* décrits jusqu'à présent ont leur groupe lactonique fermé en C-6. Si le carbone C-8 porte des groupes esters ou des hydroxyles, leur stéréochimie est  $\alpha$ .

On peut citer à titre d'exemple: Stoebenolide isolé de *Centaurea cadmea* [31].



### II.4.1.2.d Les guaianolides

Les lactones sesquiterpéniques de type guaianolide ont comme squelette de base un cycle pentagonal et un autre heptagonal comme le montre la figure II.7.

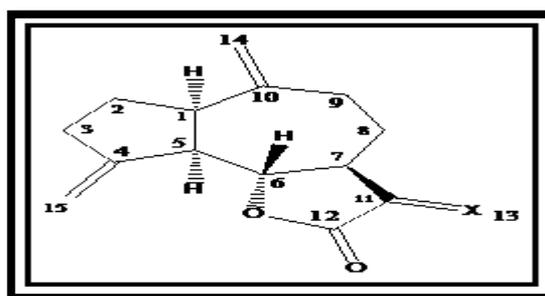
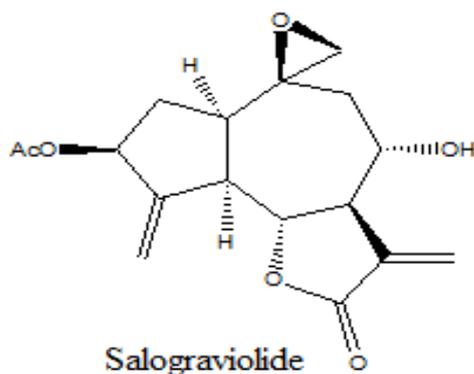


Figure II.7: Squelette de base des guaianolides

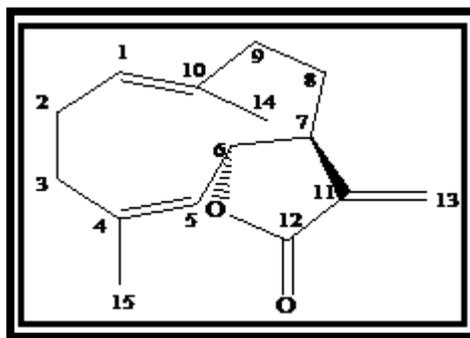
Les guaianolides du genre *Centaurea* se distinguent par la stéréochimie  $\alpha$  des protons H-1, H-5 et H-7 et la stéréochimie  $\beta$  des protons H-6 et H-8. Dans la plupart des cas, ils renferment une substitution en C-8 et présentent une lactonisation en C-6.

On peut citer à titre d'exemple: Le salograviolide isolé de l'espèce *Centaurea nicolai* [32].



#### II.4.1.2.e Les héliangolides

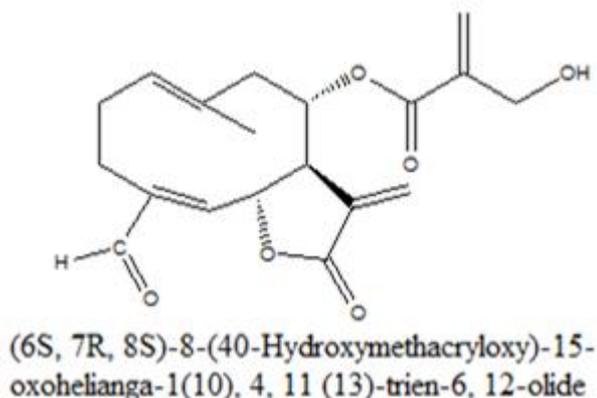
Ce sont des germacranolides avec des doubles liaisons de configuration E pour C-1, C-10 et Z pour C-4, C-5. Le squelette de base de ce type de composés est représenté dans la figure II.8.



**Figure II.8:** Squelette de base des héliangolides

Les structures isolés de ce genre sont toutes fermées en C-6, présentent une stéréochimie  $\beta$  H-6,  $\alpha$  H-7,  $\beta$  H-8, le substituant  $\text{CH}_2\text{OAc}$  en C-4 et une double liaison exocyclique en C-11. La double liaison C-4 et C-5 est permanente dans toutes les structures, par contre celle entre C-1 et C-10 peuvent être transformée en  $1\beta$ ,  $10\alpha$  -époxyde ou substituées par un  $\beta$ -OH en C-1 avec une double liaison exocyclique en C-10. Toutes ces structures sont substituées en C-8. Ce substituant est souvent soit un hydroxyle, soit un (1',2'-dihydroxyethyl) acrylate, soit un (1'-acetoxy-2'-hydroxyethyl) acrylate.

On peut citer comme exemple: (6S, 7R, 8S)-8-(4'-Hydroxymethacryloxy)-15- oxohelianga-1(10), 4, 11 (13)-trien-6, 12-olideisolés de *Calea tweediei* [33].



#### II.4.1.3 Intérêt thérapeutique des lactones sesquiterpéniques

De nombreuses recherches ont prouvées que la diversité large des activités biologiques est directement liée à la grande variété de structures chimiques [34].

Durant la recherche consacrée aux composés anti-tumoraux isolés des plantes, les lactones sesquiterpéniques prennent une importance croissante notamment grâce à leurs activités sur différents types d'organismes et systèmes. En effet, elles forment un des plus large groupes des composés cytotoxiques et anti-tumoraux d'origine végétale, dont la majorité a été isolé des espèces de la famille Asteraceae.

Des études expérimentales ont montrés que les lactones sesquiterpéniques, inhibent la croissance des tumeurs par l'alkylation sélective des macromolécules biologiques régulatrices de croissance, comme les enzymes clés qui contrôlent la division cellulaire, ce qui permet aux cellules de subir le phénomène d'apoptose naturel [35-36].

Aux cours de ces dernières décennies, l'investigation biologique des extraits et des constituants chimiques du genre *Centaurea*, a montrée qu'ils possèdent diverses activités biologiques, le pouvoir anti-inflammatoire de certaines centaurees est attribué à la présence des sesquiterpènes lactones. Ces substances possèdent un groupe  $\alpha$ - méthylène  $\gamma$ -lactone qui est à l'origine de ce pouvoir [37].

D'autres études d'activité biologique ont montré que certaines lactones sesquiterpéniques sont antibactériennes à l'encontre des germes Gram positif. C'est le cas de l'hénélanine de l'aunée (*Inula helenium L.*) et de la cnicine du chardon béni (*Cnicus beniductus L.*) [38].

### II.4.2 Les Triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont des composés qui renferment dans leur squelette 30 carbones issus de la cyclisation de l'époxysqualène. Ils sont très abondants dans le règne végétal et animal sous forme libre ou étherifiée. La cyclisation du cation formé par l'époxysqualène peut conduire à la formation de plusieurs formes triterpéniques acycliques, tétracyclique ou pentacyclique. Le carbone en position 3 est presque toujours hydroxylé à cause de l'ouverture de l'époxyde [39-40].

Les stéroïdes ne sont pas de vrais terpènes mais des composés de biodégradation de triterpènes qui dérivent du noyau perhydrocyclopentenophenanthrene. En général, le squelette de base des stéroïdes en forme tétracyclique renferment 25 atomes de carbone [38].

### II.5 Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes). Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [41]. Des études épidémiologiques ont établi une corrélation entre la consommation de polyphénols végétaux et une faible incidence de maladies coronariennes, probablement par leurs capacités à modifier de nombreux facteurs à l'origine de ces maladies. Au niveau de l'endothélium vasculaire, les polyphénols stimulent la production de facteurs relaxants comme le monoxyde d'azote. Enfin, ils contribuent à préserver l'intégrité de l'endothélium vasculaire en agissant à la fois sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules endothéliales. Grâce à ces propriétés, les polyphénols pourraient interférer avec le processus athérogène et/ou les phénomènes thrombotiques associés à l'athérosclérose et pourraient expliquer les effets vasculo- et cardio-protecteurs de ces composés [42].

### II.6. Extraction des composés phénoliques

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques [24,43]. Les étapes essentielles sont:

- ✓ La macération est une opération qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.

- ✓ Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont: le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type *C*-glycosyle.
- ✓ Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement de séparation chromatographique.

## II.7. Méthodes de séparation et de purification

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes [44].

### II.7.1. La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption avec comme phase stationnaire une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé [43].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueur d'ondes  $\lambda = 254$  nm et 365 nm). Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés.

### II.7.2. La chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silice correspondante aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. En utilisant diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés, on examine les bandes des constituants sous lumière UV ou on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat [44].

La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de Sephadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant.

### II.7.3. Chromatographie d'adsorption sur colonne

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [43].

L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

## II.8. Les techniques d'identification structurale

L'identification des structures organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N) avec ses différentes techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, etc.), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement par des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible [45-46].

### II.8.1. La spectrophotométrie UV-Visible

C'est une technique très importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle permet la localisation des hydroxyles libres et leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol. Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II [47].

### II.8.2. La Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

Les ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire donnent des ions fragments caractéristiques, ces derniers fournissent des renseignements utiles dans la détermination structurale [48].

### II.8.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés dans les composés organiques sont le proton  $^1\text{H}$  et le carbone  $^{13}\text{C}$ .

Cette méthode renferme plusieurs technique telles que:

#### a) RMN monodimensionnelle

- ✓ **RMN du proton ( $^1\text{H}$ ):** Le spectre RMN du proton informe sur les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogène présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.
- ✓ **RMN carbone ( $^{13}\text{C}$ ), DEPT 135° et J mod:** Ces techniques permettent de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Ces expériences permettent la mise en évidence des carbones primaires ( $\text{CH}_3$ ), secondaires ( $\text{CH}_2$ ), tertiaire ( $\text{CH}$ ) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135° et le J mod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J mod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

#### b) RMN bidimensionnelle

Les expériences de RMN bidimensionnelles reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [49].

#### Corrélations homonucléaires

- ✓ **COSY ( $1\text{H} - 1\text{H}$ ):** cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires  $^2J$  et  $^3J$  (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins

- ✓ **NOESY** (1H – 1H) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

### Corrélations hétéronucléaires

- ✓ **HSQC** ( $^1J_{H-C}$ ) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbone quaternaires.
- ✓ **HMBC** ( $^2J_{H-C}$ ,  $^3J_{H-C}$ ) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance  $^2J_{H-C}$ ,  $^3J_{H-C}$ , et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

## II.9. Huiles Essentielles (HE)

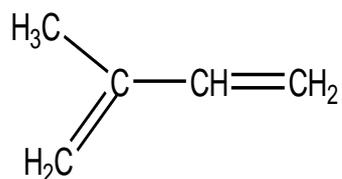
### II.9.1 Définition

Ce sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, par pressage ou par incision des végétaux qui les contiennent. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

Au point de vue chimique, il s'agit des mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles (HE) sont constituées de différents composants terpéniques [38].

### II.9.2 Caractères chimiques des HES

Les HES sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule  $(C_5H_8)_n$ . Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 structures sesquiterpènes. Du strict point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique, l'isoprène.



**Figure II.9: Structure de l'isoprène**

La structure des composés des HEs est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés [50].

Selon le nombre de résidus isoprènes que regroupent les composés terpéniques, on distingue :

- ✓ Les terpènes simples, formés de deux isoprènes,  $C_{10} H_{16}$ .
- ✓ Les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes,  $C_{15} H_{24}$ .
- ✓ Les di-terpènes, formés de quatre isoprènes,  $C_{20} H_{32}$ .

Ces trois premiers groupes sont à l'origine de très nombreuses essences :

- ✓ Les triterpènes (six isoprènes) qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines.
- ✓ Les tétraterpènes (huit isoprènes) qui conduisent aux caroténoïdes.
- ✓ Les polyterpènes (n isoprènes) qui comprennent, en particulier, le caoutchouc et la guttapercha.

### II.9.3 Les procédés d'extraction des HEs

La quantité des HEs contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'HE.

L'extraction des HEs est certainement la phase la plus délicate. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal.

Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation. L'entraînement par la vapeur ou l'hydro-distillation de la plante fraîche ou sèche reste la technique la plus utilisée. On distingue les procédés suivants:

#### II.9.3.a Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La plupart des HEs sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau. Le but est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentín de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les HEs). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner HE. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de

distillation (ou hydrolat ou eau florale) [51]. Les parties insolubles sont séparées de l'eau par décantation pour donner l'HE [52-53].

### **II.9.3.b Hydro-distillation**

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HEs se séparent de l'eau par différence de densité. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est la non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de la couleur, de l'odeur et de la composition de l'HE au cours de la distillation [54].

### **II.9.3.c Distillation à vapeur saturée**

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi [55].

### **II.9.3.d Hydro-diffusion**

L'hydro-diffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes [55].

### **II.9.3.e Extraction par CO<sub>2</sub> super critique**

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO<sub>2</sub> en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C) [38]. A l'état supercritique, le CO<sub>2</sub> n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO<sub>2</sub> sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux [56].

L'extraction des HEs par le CO<sub>2</sub> supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques [55].

En conclusion, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque méthode possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commande ainsi que l'aspect économique qui est tout aussi important [57].

### **II.9.4 Utilisation des HEs [58]**

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activités tels que:

#### **II.9.4.1 En pharmacie**

Les HEs peuvent être utilisés dans l'aromatisation des médicaments destinés à la voie orale pour leurs actions physiologiques (Menthe, Verveine, Camomille).

#### **II.9.4.2 Dans l'industrie**

##### **✓ Parfumerie et cosmétologie**

De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines HEs constituent des bases des parfums. Exemples: Rose, Jasmin etc....

##### **✓ Alimentation**

Les HEs (huile de citron, de menthe, de girofle) sont très utilisées dans l'aromatisation des aliments (jus de fruits, pâtisserie).

### **II.9.5 Les méthodes d'analyse des huiles essentielles**

Quelque soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [59].

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [60]. Plusieurs méthodes existent:

#### **II.9.5.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir). Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration

différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur [61].

#### **II.9.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)**

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CG/SM), après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique [62]. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur rapport masse/charge [63]. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention ( $I_r$ ) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [64].

## Références bibliographiques

- [1] Kansole, M., (2009), Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de leucas Martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia Opposita Vahl et Orthosiphon Pallidus Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.
- [2] Zenk, M.H., Juenger, M., (2007), Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds, *Phytochemistry*, 68(22-24):2757-72.
- [3] Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix, J.J., (2005), Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes. 121-216.
- [4] Harborne, J.B., The Flavonoids, Advances in Research, (1986) 1<sup>ère</sup> Ed: Chapman & Hall, London.
- [5] Kueny-Stotz, M., Chassaing, S., Brouillard, R., Nielsen, M.P. C., Goeldner, M., (2008), Flavylium salts as in vitro precursors of potent ligands to brain GABA-A receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(17): 4864-4867.
- [6] Zhang, J., Brodbelt, S.J., (2005), Threshold dissociation and molecular modeling of transition metal complexes of flavonoïds, *J An Soc Mass Spectrom* 16,139- 151.
- [7] Hanasaki, Y., Ogawa, S., Et Fnkui, S., (1994), The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biol. Med*, 16, 845-850.
- [8] Pignol, B., Etienne, A., Crastes de Paulet, A., Deby, C., Mencia- Huerta, J.M., Et Braquet, P., (1988), Role of flavonoids in the oxygen-free radical modulation of the immune response, In Plant Flavonoids in Biology and Medicine li. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties, 173-182.
- [9] Fraga, C.G., Martino, V.S., Ferraro, G.E., Coussio, J.D., Et Boveris, A., (1987), Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence, *Biochem. Pharmacol*, 36, 717-720.
- [10] Cavallini, L., Bindoli, A., Et Siliprandi, N., (1978), Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids, *Pharmacol. Res. Commun.* 10, 133-136.
- [11] Middleton, E., Et Kandaswami, C., (1994), "The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer, *J of Indian medicine*, p. 619-652.
- [12] Hope, W.C., Welton, A.F., Fielder-Nagy, C., Batula-Bernardo, C., Et Coffey, J.W., (1983), In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin, *Biochem. Pharmacol.* 32, 367-371.
- [13] Weber, G., Shen, F., Yang, H., Prajda, N., Li, W., (1999), Regulation of signal transduction activity in normal and cancer cells, *Anticancer Res*, 19, 3703– 3709.

- [14] Butterweck, V., Jurgenliemk, G., Nahrstedt, A., Et Winterhoff, H., (2000), Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test, *Planta Med*, 66, 3–6.
- [15] Pietta, P., (2000), Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
- [16] Havsteen, B., (1993), Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141.
- [17] Hollman, P.C.H., (2001), Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?, *J. Sci. Food Agric*, 81, 842–852.
- [18] Duarte-Almeida, J.M., Negri, G., Salatino, A., de Carvalho, J.E., Lajolo, F.M., (2007), Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice, *Phytochemistry*, 68(8): 1165–1171.
- [19] Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D., Lancet, (1993), Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *The Lancet*, 342(8878):1007-1011.
- [20] Chu, S.C., Hsieh, Y.S., Lin, J.Y., (1992), Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity, *J Nat Prod*, 55: 179-183.
- [21] Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., Teissèdre, P.L., (2008), Les polyphénols du raisin, *Phytothérapie*, 6(2), 75–82.
- [22] Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska, T., Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, Taylor and Francis groupe, 1<sup>st</sup> Edition.
- [23] Lesley B., (1996), Plantes médicinales et aromatiques, Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61.
- [24] Bruneton, J., (1999), Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, lavoisier, Paris.
- [25] Kupchen, S.M., Eakin, M.A., Thomas. A.M., (1971), Structure cytotoxicity relationship among the sesquiterpen lactones, *J of Med Chem*, 14, 1147- 1152.
- [26] Mattern, G., Weckert, E., Youssef, D., Frahm, A.W., (1996), Absolute Configuration of Chlorojanerin, a Chlorine-Containing Guaianolide from *Centaurea scoparia*, *Acta Cryst, C52*, 1791-1793.
- [27] Alejandro, F., Barrero, J., Oltra, E., Morales, V., Álvarez, M., (1997), Biomimetic Cyclization of Cnicin to Malacitanolide, a Cytotoxic Eudesmanolide from *Centaurea malacitana*, *J. Nat. Prod.*, 60 (10), 1034–1035.
- [28] Vanhaelen-Fastré, R., (1972), Activité antibiotique et cytotoxique de la cnicine, isolée de *cnicus benedictus* L., *J. Pharma. Belg.*, 27, 683-688.

- [29] Helen, S., Diamanto, L., Constantinos, P., Evanthia, G., Begon, G., Marina, S., (2000), Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity, *Phytochemistry*, 55, 903-908.
- [30] Gonzalez, A.G., Arteaga, J.M., Breton, J.L., (1973), germacranolides from *Centaurea seridis*, *Phytochemistry*, 12, 1333.
- [31] Karamenderes, C., Bedir, E., Abou-Gazar, H., Khan, I., (2007), chemical constituents of *Centaurea cadmea*, *Chemistry of Natural compounds*, 43(6), 694-695.
- [32] Vlatka, V., Nina, T., Marina, R., Vele, T., Borislav, T., Pedja, J., Petar, M., Et Slobodan, M., (1999), Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity, *Phytochemistry*, 52, 383-386.
- [33] Antonio, M.F., Elmira, C.R., César, A.N.C., Thomas, E., Get, Werner, H., (2001), Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 967-971.
- [34] Picman, A.K., (1986), Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 14, 255-281.
- [35]. Schmidt, T.J., (1999), Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. *Curr. Org. Chem.* 3, 577-608.
- [36]. Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., (2001), Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by over expression of Bcl-x(L) or Bcl-2. *Cancer Res*, 61, 5817-5823.
- [37] Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Eakin, M.A., Giacobbe, T.J., (1970), Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles, *J of Med Chem*, 168, 376.
- [38] Bruneton, J., (1993), Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition, lavoisier, Paris.
- [39] Raphel, I., (1969), Natural products, Deuxième édition, Academic Press, INC.A laboratory guide, pp: 1-21, pp 169181.
- [40] Dey, P.M., Harborne, J.B., (1991), Methods in plant biochemistry, Volume 7, Academic press.
- [41] Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., (2009), Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* 4, 25-39.
- [42] Martin, S., Andriantsitohaina, R., Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, (2002), *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51(6), 304-315.
- [43] Ribereau-Gayou, J.B., (1968), The phenolic compounds of vegetals, Edition Dunod, Paris.

- [44] Berthillier, A., (1972), La chromatographie et ses applications, Edition Dunod, Paris.
- [45] Markham, K.R., (1982), Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
- [46] Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., (1970), The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [47] Jurd, L. and Horowitz, R., (1962), Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [48] Hoffmann, E., Stroobant, V., (2007), Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition, Wiley.
- [49] Günther, H., (1994), La spectroscopie de RMN, Masson, Paris
- [50] Pibiri, M.C., (2006), Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.
- [51] Benjlali, B., (2004), Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements, Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation, 17-59.
- [52] Garnerio, J., (1991), Phytothérapie-aromathérapie, *Encycl. Méd. Nat*, p : 20.
- [53] Belaiche, P., (1979), Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine.
- [54] Chalchat, J.K., Carry, L.P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., Chopineau, J., (1997), Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils, *J. Essent. Oil Res*, 9: 67-75.
- [55] Scheffer, J.J.C., (1996), Various methods for the isolation of essential oils, *Phytother. Res*, 10:S6-S7.
- [56] Peron, L., Richard, H., (1992), Epices et aromates, techniques et documentations Lavoisier,
- [57] Collin, G., (2000), Quelques techniques d'extraction de produits naturels, *Info-essences*, 13: 4-5.
- [58] Cavalli, J.F., (2002), Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de madagascar, Thèse Université de Corse Pascal Paoli.
- [59] Joulain, D., (1994), Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 19: 5-17.
- [60] Schwedt, G., (1993), Méthodes d'analyse, Ed. Flammarion. médecine-sciences.

- [61] Tranchant, J., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, (1995) Masson, 4ème édition.
- [62] De Maack, F., Sablier, M., Couplage chromatographique avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse, (1994), P2614.
- [63] Desjobert, J.M., Bianchini, A., Tommy, P., Costa, J., Bernardini, A.F., (1997), Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse, *Analysis* 25 (6) : 13- 16.
- [64] Paolini, J., (2005), Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endemiques de corse : *eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *doronicum corsicum*. Thèse de doctorat.

## *CHAPITRE III*

*L'étude phytochimique de  
Centaurea choulettiana Pomel  
et Centaurea fragilis Dur.*

### III Introduction

Ce chapitre est divisé en deux parties, la première comporte la description de nos travaux d'extraction, d'isolement et de purification des métabolites secondaires des extraits cyclohexane, AcOEt, et *n*-BuOH ainsi que l'extraction des huiles essentielles de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel. La deuxième partie renferme l'étude phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Centaurea fragilis* Dur.

#### III. a Choix des deux espèces

Le choix des deux espèces présentées dans ce travail, à savoir *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur, repose essentiellement sur le fait:

- Qu'elles appartiennent au genre *Centaurea*, très connu pour son utilisation en médecine notamment comme anti-inflammatoire [1], antimicrobienne [2] ainsi que pour le traitement du cancer [3].
- Que ce genre est un excellent accumulateur de molécules de types flavoniques [4] et lactones sesquiterpéniques [5-6] et que plusieurs travaux ont montré que ces molécules sont douées d'activités biologiques intéressantes [7-8].
- Que ces deux espèces sont endémiques à l'Algérie et elles n'ont fait objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant [9].

#### III. b Place dans la systématique des deux espèces

<b>Embranchement</b>	—————>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	—————>	Angiospermes
<b>Classe</b>	—————>	Dicotylédones
<b>Ordre</b>	—————>	Astérales
<b>Famille</b>	—————>	Asteraceae
<b>Sous-famille</b>	—————>	Tubiflores
<b>Tribus</b>	—————>	Cynarées
<b>Genre</b>	—————>	<i>Centaurea</i>
<b>Espèces</b>	}—————>	<i>Centaurea choulettiana</i> Pomel
		<i>Centaurea fragilis</i> Dur.

## Partie 1: *Centaurea choulettiana* Pomel

### III.1.1 Description botanique

C'est une plante vivace à bractées moyennes (au moins les moyennes du type palmé), très large (1cm) et très court (5-6 mm), scarieux et cilié de part et d'autre d'une épine courte, acaule ou subacaule. Les fleurs jaunes ou jaunâtres et les akènes soit sans aigrette soit à aigrette double [9].



**Figure III.1:** Image de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel.

### III.1.2 Récolte du matériel végétal

La récolte de la matière végétale a été réalisée au mois de mai 2013 des environs de la ville de M'Sila, et authentifié par Dr. Sarri (Département de biologie ; Université de M'Sila). Un échantillon (CCA/05/2013) a été déposé à l'Unité de recherche VARENBIOMOL, Université des Frères Mentouri, Constantine.

### III.1.3 Extraction

Le séchage a été fait à l'ombre loin des rayons solaires et de l'humidité. Les parties aériennes de la plante ont été séparées (feuilles et fleurs), coupées en petits morceaux et pesées. Nous avons obtenu 840g de fleurs et 1370g d'un mélange de feuilles et tiges qu'on a choisi de nommer dans ce manuscrit feuille.

Après séchage, la masse de 1370 g des feuilles a été mise à macérer à température ambiante dans le cyclohexane. Cette opération a été répétée 3 fois avec le même volume dans le but d'éliminer les cires et la chlorophylle. Après filtration et évaporation du solvant, une masse de 11 g de l'extrait cyclohexane a été obtenu. Les feuilles mises à macérer encore une fois à

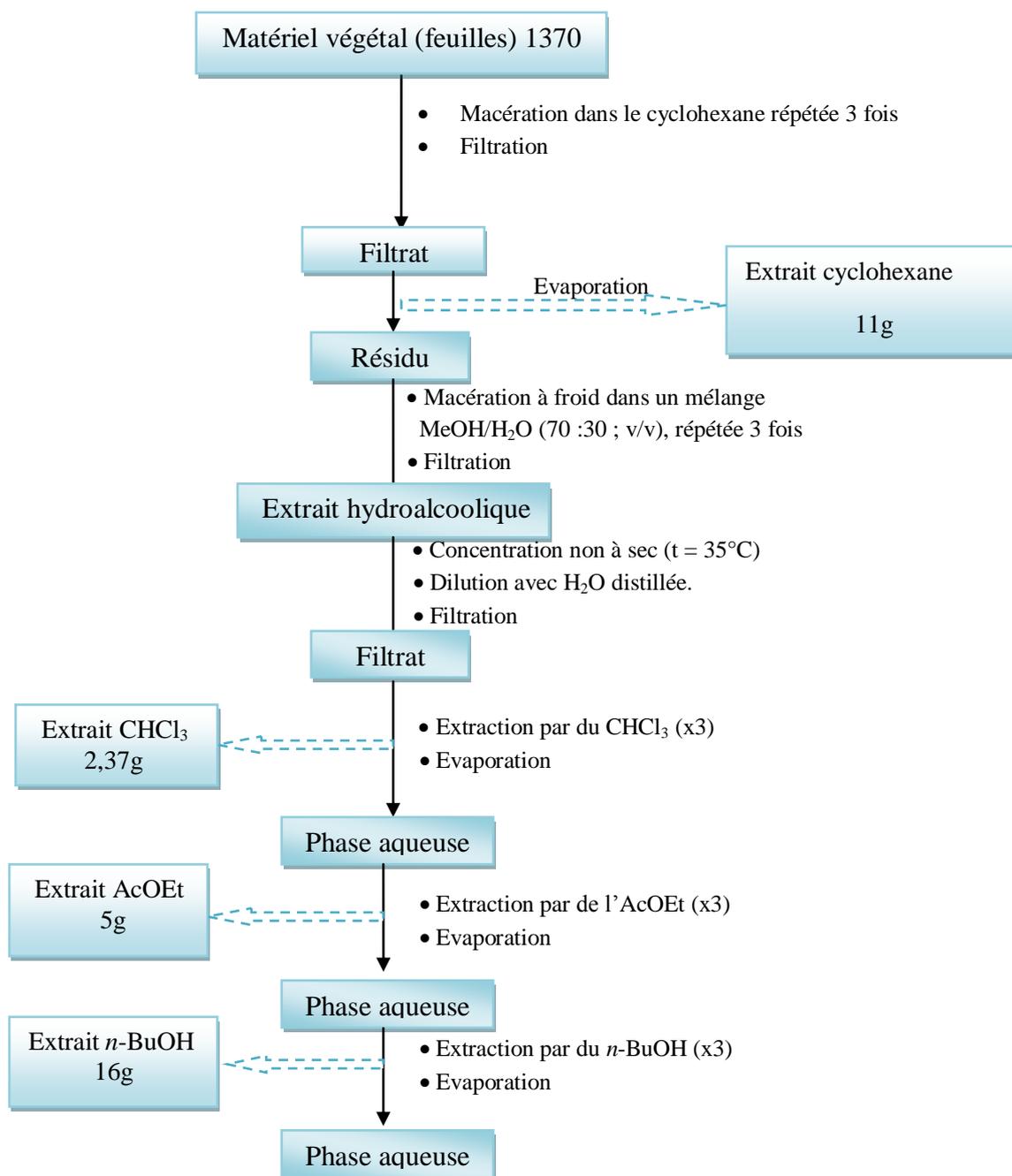
température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/Eau ; 70/30 ; v/v). Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Après filtration, concentration à une température n'excédant pas 35°C, cet extrait est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche.

Après une nuit de repos la solution est filtrée. Le filtrat est épuisé 3 fois avec du chloroforme. La phase organique concentrée à sec donne un extrait chloroforme de masse 2,37 g. La phase aqueuse est reprise et épuisée successivement avec 3 fois d'acétate d'éthyle, puis 3 fois au *n*-butanol. Les trois phases de chaque solvant sont rassemblées et concentrées à sec pour donner des extraits de 5g d'acétate d'éthyle et 16 g de *n*-butanol.

Les fleurs d'une masse de 840 g subissent les mêmes étapes dans un milieu hydroalcoolique 70/30 (v/v) (MeOH/H<sub>2</sub>O), suivi d'une extraction liquide-liquide au CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH respectivement pour obtenir les extraits correspondants:

- Chloroforme (1g).
- Acétate d'éthyle (2g).
- *n*-butanol (10g).

Les étapes extraction de *C. choulettiana* sont résumées dans la figure III.2.



**Figure III.2:** Organigramme d'extraction du *C. choulettiana*.

Le tableau III.1 rassemble les masses et les rendements d'extraction de *C. choulettiana*.

**Tableau III.1:** Masses et rendements des extraits de *C. choulettiana*.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
feuilles 1370g	Cyclohexane	11	0,80
	Chloroforme	2,37	0,17
	Acétate d'éthyle	5	0,36
	<i>n</i> -butanol	16	1,17
Fleurs 840g	Chloroforme	1	0,12
	Acétate d'éthyle	2	0,24
	<i>n</i> -butanol	10	1,19

### III.1.4 Etude des extraits

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté par le choix du système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats de séparation en utilisant la chromatographie analytique sur couche mince.

#### III.1.4.1 Fractionnement de l'extrait cyclohexane

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution : (éther de pétrole / éther diéthylique / Acétone) en gradient de polarité.

Nous avons débuté par le fractionnement des trois extraits cyclohexane, AcOEt et *n*-BuOH des feuilles à cause de leurs masses relativement importantes.

Une masse de 10 g d'extrait cyclohexanique est déposée sur une colonne confectionnée avec 320g de gel de silice (type 60, 230-400 Mesh) préparée dans l'éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système éther de pétrole / éther diéthylique / Acétone en commençant par l'éther de pétrole pur et en terminant par l'acétone avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par CCM. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à 100 °C pendant 3min.

Les pots présentant le même profil chromatographique sont réunis donnant ainsi 28 fractions. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.2.

**Tableau III.2:** Résultats de la séparation de l'extrait cyclohexane feuille de *C. choulettiana* par chromatographie sur colonne.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion			Poids de la fraction (mg)	Observations
		% éther de pétrole	%éther diéthylique	%Acétone		
1-35	F1	100	0	0	29	Traces
36-44	<b>F2</b>	100	0	0	105	Mélange séparable
45-57	F3	98	2	0	97	Mélange complexe
58-106	F4	98	2	0	154	Mélange complexe
107-114	<b>F5</b>	96	4	0	214	Mélange+ précipité
115-127	<b>F6</b>	94	6	0	207	Mélange+ précipité
128-136	<b>F7</b>	94	6	0	355	Mélange+ précipité
137-149	<b>F8</b>	92	8	0	198	Mélange séparable
150-168	F9	90	10	0	247	Mélange complexe
169-180	F10	88	12	0	379	Mélange complexe
181-189	F11	85	15	0	102	Mélange séparable
190-198	F12	85	15	0	115	Mélange complexe
199-200	F13	82	18	0	302	Mélange complexe
201-238	<b>F14</b>	80	20	0	321	Mélange+ précipité
239-243	F15	70	30	0	267	Mélange complexe
244-247	F17	60	40	0	55	Mélange complexe
248-258	F18	40	50	10	232	Mélange complexe
259-277	<b>F19</b>	40	45	15	124	Mélange+ précipité
278-288	F20	35	45	20	290	Mélange complexe
289-293	F21	35	35	30	215	Mélange complexe
294-296	F22	30	35	35	220	Mélange complexe
297-304	F23	20	30	50	255	Mélange complexe
305-316	F24	10	30	60	321	Mélange complexe
217-328	F25	0	25	75	325	Mélange complexe
329-339	F26	0	50	50	387	Mélange complexe
340-349	F27	0	20	80	1312	Mélange complexe
350-370	F28	0	0	100	2029	Mélange complexe

Parmi les lots obtenus, les fractions **F2, F5, F6, F7, F8, F14 et F19** ont été sélectionnées en raison soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important.

➤ **Etude de la fraction F2**

La fraction **F2** (105 mg), a subi une chromatographie sur des plaques préparatives de gel de silice éluée trois fois avec le système éther de pétrole/éther diéthylique (9,5:0,5), conduisant à un produit nommé **CP1** (5mg).

➤ **Etude des fractions F5, F6 et F7**

Les fractions **F5** (214 mg), **F6** (207 mg) et **F7** (355 mg) contenant des précipités blancs, ont subi une filtration suivi de purification sur des colonnes de Sephadex LH20 avec le MeOH comme éluant pour donner des produits nommés **CP2** (2mg), **CP3** (5mg) et **CP4** (6mg) respectivement.

Un test de vérification de la pureté de ces trois produits a été entrepris sur plaques CCM dans le système éther de pétrole/éther diéthylique (9:1) a montré qu'il s'agit du même produit, nommé **CP4**.

➤ **Etude de la fraction F8**

La fraction **F8** (198 mg) a été traitée sur des plaques préparatives de gel de silice éluée deux fois avec le système *n*-hexane/AcOEt (9:1), qui après une purification sur une colonne de Sephadex nous conduit au produit nommé **CP5** (4 mg).

➤ **Etude de la fraction F14**

La recristallisation est une technique de base pour purifier les solides. Elle repose sur la différence de solubilité entre le composé à purifier et ses impuretés dans le solvant choisi.

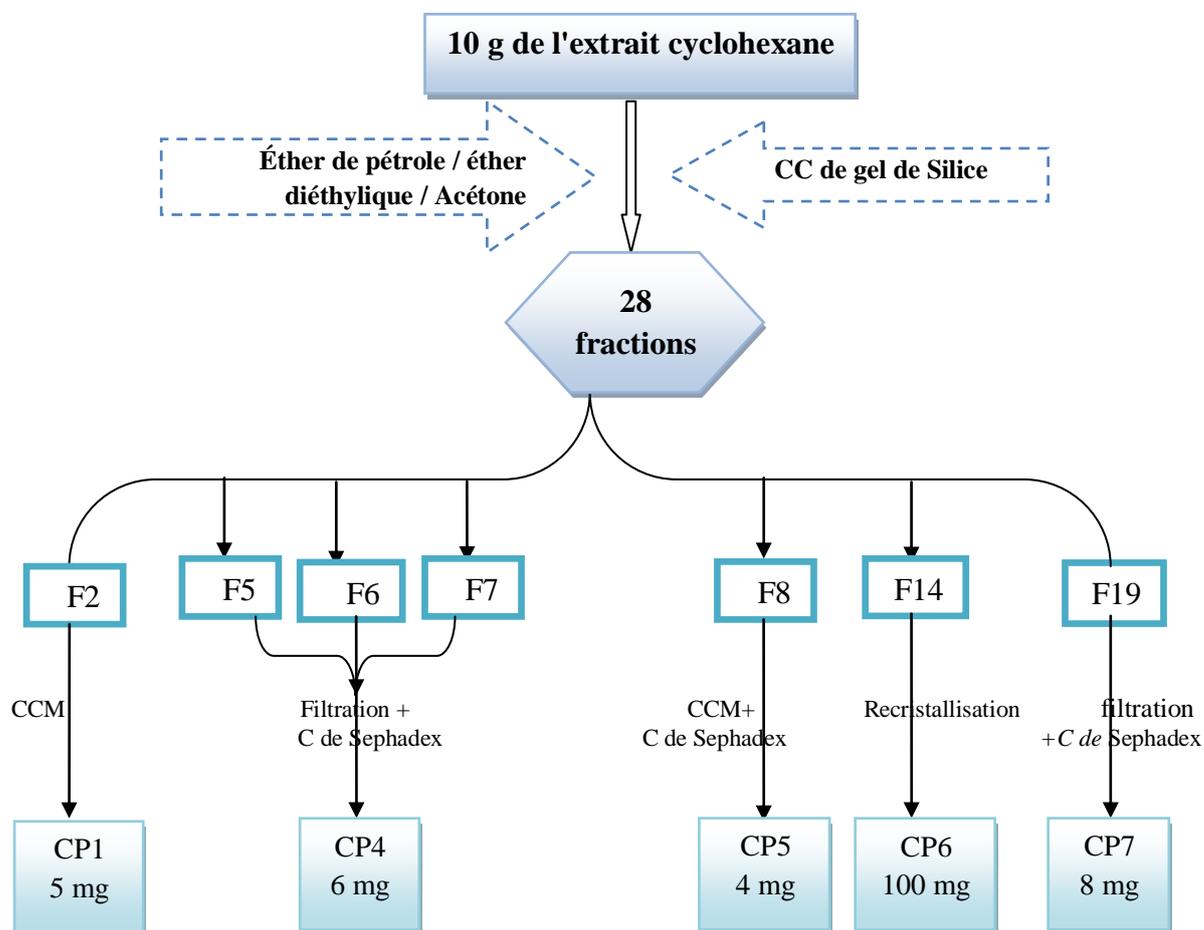
La fraction **F14** (321 mg) renfermant des cristaux blancs a été recristallisée dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH. Ces derniers ont été purifiés par plusieurs lavages avec l'acétone pour donner un produit nommé **CP6** (100 mg).

➤ **Etude de fraction F19**

La fraction **F19** (124 mg) comportant un précipité sous forme d'une poudre blanche, a été filtrée puis a subi une purification sur une colonne de Sephadex LH20 avec le MeOH comme éluant pour donner le produit nommé **CP7** (8 mg).

En conclusion, l'étude phytochimique de l'extrait cyclohexane de *C. choulettiana* a permis d'isoler au total sept produits purs, ce nombre a été réduit à cinq vu que les produits CP2, CP3 et CP4 étaient identiques (Figure III.3).

L'organigramme suivant rassemble les étapes de séparation et de purification



**Figure III.3:** Schéma de séparation de l'extrait cyclohexane de *C. choulettiana*

#### III.1.4.2 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Une masse d'environ 4g de l'extrait acétate d'éthyle est dissoute dans du méthanol et mélangée à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 128g de gel de silice (type 60, 230-400 Mesh) préparée dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système dichlorométhane/méthanol en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par le méthanol pur.

Des fractions de 50 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365nm), puis révélées par l'anisaldéhyde

et chauffées à 100 °C pendant 3min. Les pots présentant le même profil chromatographique sont réunis donnant ainsi 37 fractions. Les résultats de l'opération sont regroupés dans le tableau III.3.

**Tableau III.3:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle feuille de *C. choulettiana*.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion		Poids de la fraction (mg)	Observations
		% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	% MeOH		
1-3	F1	100	0	5	Traces
4-8	F2	100	0	12	Mélange de faible quantité
9-14	F3	100	0	21	Mélange de faible quantité
15-17	F4	100	0	5	Traces
18-33	F5	100	0	76	Mélange complexe
34-42	<b>F6</b>	100	0	85	Mélange séparable
43-49	<b>F7</b>	100	0	141	Mélange séparable
50-56	F8	100	0	157	Mélange complexe
57-58	F9	100	0	23	Mélange complexe
59-62	F10	100	0	27	Mélange complexe
63-65	F11	100	0	25	Mélange complexe
66-70	F12	100	0	33	Mélange complexe
71-73	F13	100	0	15	Mélange complexe
74-83	F14	100	0	78	Mélange complexe
84-86	F15	100	0	9	Traces
87-97	F16	100	0	12	Mélange de faible quantité
98-106	F17	99	1	177	Mélange complexe
107-114	F18	99	1	82	Mélange complexe
115-124	F19	99	1	114	Mélange complexe
125-132	F20	99	1	76	Mélange complexe
133-139	<b>F21</b>	98	2	110	Mélange séparable
140-146	F22	98	2	58	Mélange complexe
147-156	<b>F23</b>	98	2	84	Mélange séparable
157-158	F24	98	2	117	Mélange complexe
159-169	F25	98	2	21	Mélange de faible quantité
170-177	F26	96	4	54	Mélange complexe
178-194	<b>F27</b>	96	4	216	Mélange+ précipité
195-213	F28	96	4	124	Mélange complexe
214-239	F29	94	6	306	Mélange complexe
240-265	F30	92	8	229	Mélange complexe
266-284	F31	90	10	117	Mélange complexe
285-318	F32	85	15	258	Mélange complexe
319-333	F33	80	20	114	Mélange complexe
334-388	F34	60	40	141	Mélange complexe
389-402	F35	40	60	87	Mélange complexe
403-410	F36	20	80	124	Mélange complexe
411-435	F37	0	100	231	Traînée

Parmi les 37 fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des fractions **F6**, **F7**, **F21**, **F23** et **F27**, cela est basé sur leur simplicité ainsi que sur leurs poids relativement importants.

➤ **Etude de la fraction F6**

La fraction **F6** (85 mg) est déposée sur une colonne de Sephadex, éluée par le MeOH. Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4:** Résultats de la séparation de la fraction F6 sur colonne de Sephadex.

N° de la sous fraction	Lot de fractions	Observations	Masse (mg)
S1	1-2	Mélange complexe	3,3
S2	3-4	Mélange complexe	13
S3	5-7	Mélange complexe	22
S4	8	Mélange complexe	23
<b>S5</b>	9	Mélange séparable	8
S6	10-11	Mélange complexe	15

La séparation de la sous fraction **S5** sur des plaques analytiques de gel de silice éluées trois fois par le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9,5 /0,5), a permis d'isoler un produit à l'état pur, nommé **CP8** de masse 7 mg.

➤ **Etude de la fraction F7**

La fraction **F7** (141 mg) est chromatographiée sur une colonne de Sephadex, éluée par le MeOH. Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau III.5.

**Tableau III.5:** Résultats de la séparation de la fraction F7 sur colonne de Sephadex.

N° de la sous fraction	Lot de fractions	Observations	Masse (mg)
S1	1-4	Mélange complexe	14
<b>S2</b>	5-8	Mélange séparable	47
S3	9-11	Mélange complexe	28,4
S4	12-15	Mélange complexe	24
S5	16-18	Mélange complexe	27,2

La sous fraction **S2** (47 mg) a subi une séparation sur des plaques analytiques de gel de silice éluées deux fois par le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9,5/0,5), a permis d'isoler un produit à l'état pur, nommé **CP9** de masse 4,2 mg.

➤ **Etude de la fraction F21**

La fraction **F21** (110 mg) a subi une séparation par chromatographie sur couche mince en utilisant comme système d'éluion (Hexane/AcOEt ; 7/3) pour donner le produit **CP10**. Ce dernier a été purifié sur plaque CCM analytique élués trois fois par le système (Hexane/AcOEt; 5/5) pour donner le composé **CP10** (3,5 mg) à l'état pur.

➤ **Etude de la fraction F23**

La fraction **F23** (84 mg) a été déposée sur une colonne de Sephadex, élue par le MeOH. Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le tableau III.6.

**Tableau III.6:** Résultats de la séparation de la fraction F11 sur colonne de Sephadex.

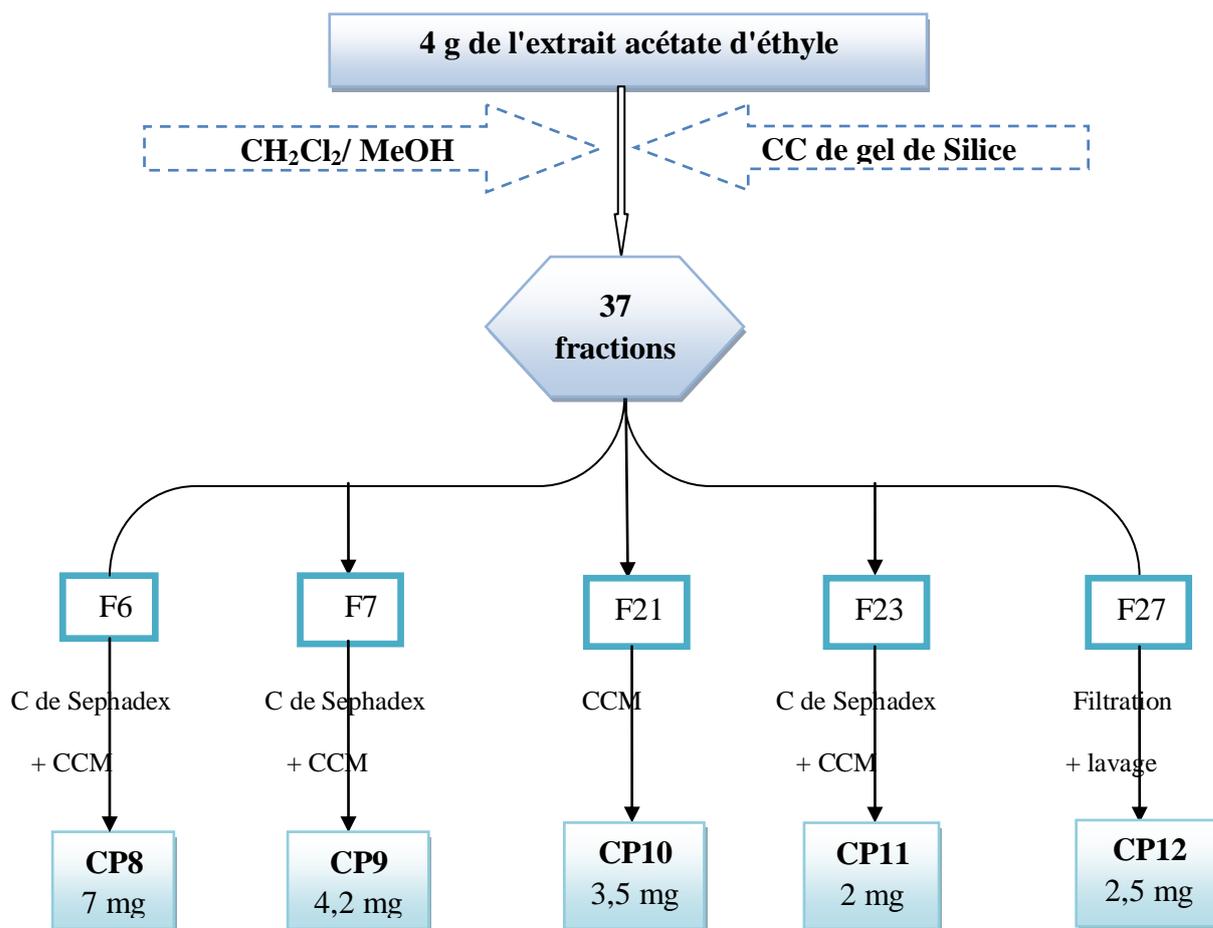
N° de la Sous fraction	Lot de fractions	Observations	masse (mg)
S1	1-7	Mélange complexe	5
S2	8-10	Mélange complexe	7
<b>S3</b>	11-12	Mélange séparable	27
S4	13-16	Mélange complexe	9,5
S5	17-18	Mélange complexe	23
S6	19-20	Mélange complexe	12

La sous fraction **S3** (27 mg) a subi une séparation sur des plaques préparative de gel de silice éluées par le système Hexane/AcOEt (7 /3) et a mené à l'isolement d'un produit pur **CP11** (2 mg).

➤ **Etude de la fraction F27**

Le précipité blanc formé dans la fraction **F27** (216 mg) a été séparé par filtration puis lavé par le MeOH pour donner le produit pur **CP12** (2,5 mg).

En résumé, l'étude phytochimique de l'extrait AcOEt de *C. choulettiana* a permis l'obtention de cinq produits purs. La figure III.4 récapitule les étapes de séparation et de purification.



**Figure III.4:** Schéma de séparation de l'extrait acétate d'éthyle de *C. choulettiana*

### III.1.4.3 Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Un premier fractionnement de 1g de l'extrait *n*-butanol de *C. choulettiana* a été réalisé par chromatographie sur papier Whatman en utilisant comme système d'élution l'acide acétique à 30%, ce qui a permis l'obtention de 7 bandes.

Les bandes ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince en utilisant le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) puis examinées sous lumière UV (365nm). Seule la bande 1 contenait un seul produit et a été purifiée sur colonne de Sephadex LH20 avec le MeOH comme éluant, pour donner le produit pur **CP13** (4mg). Les autres bandes étaient en très faible quantité et leurs profils sur plaques CCM ont montrés plusieurs taches difficile à séparer.

Dans le but de procéder à une séparation de cet extrait sur une colonne de gel de silice, plusieurs systèmes de solvants ont été essayés en utilisant des plaques analytiques. La meilleure séparation a été obtenue avec le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  dans les proportions

9,5/0,5. Cette étape indique la richesse de l'extrait *n*-butanol en composés phénoliques en montrant sous lumière de Wood des spots de couleur jaune, bleu et noir-violet.

Une masse de 14g de l'extrait *n*-butanol des feuilles a été déposée sur une colonne confectionnée avec 448g de gel de silice (type 60, 230-400 mesh) préparées dans le dichlorométhane. L'élution a été faite par le dichlorométhane avec un gradient de méthanol, et un fractionnement tous les 100 ml.

Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à 100 °C pendant 3min. Les pots de même composition sont rassemblés donnant ainsi 37 fractions. Le tableau III.7 rassemble les résultats de cette colonne.

**Tableau III.7:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol feuille de *C. choulettiana*.

Lot de Fractions	N° de la fraction	Système d'élution		Poids de la fraction (mg)	Observations
		% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	% MeOH		
1-49	F1	100	0	4	Traces
50-55	F2	99	1	34	Mélange complexe
56-58	F3	98	2	15	Mélange de faible quantité
59-62	<b>F4</b>	98	2	50	Mélange+ précipité
63-70	F5	98	2	42	Mélange complexe
71-74	F6	98	2	68	Mélange complexe
75-81	F7	98	2	72	Mélange complexe
82-87	<b>F8</b>	97	3	63	Mélange+ précipité
88-93	F9	97	3	186	Mélange complexe
94-111	<b>F10</b>	94	6	278	Mélange séparable
112-118	F11	94	6	135	Mélange complexe
119-123	<b>F12</b>	94	6	77	Mélange séparable
124-130	F13	92	8	250	Mélange complexe
131-142	F14	92	8	97	Mélange complexe
143-146	F15	92	8	298	Mélange complexe
147-160	F16	90	10	143	Mélange complexe
161-170	F17	90	10	1040	Mélange complexe
171-181	F18	90	10	243	Mélange complexe
182-186	F19	85	15	311	Mélange complexe
187-189	F20	85	15	354	Mélange complexe
190-196	F21	85	15	200	Mélange complexe
197-212	<b>F22</b>	80	20	331	Mélange+ précipité
213-115	F23	80	20	192	Mélange complexe
216-220	F24	80	20	298	Mélange complexe
221-223	F25	75	25	254	Mélange complexe
224-230	F26	75	25	476	Mélange complexe
231-235	F27	75	25	123	Mélange complexe
236-245	F28	65	35	540	Mélange complexe
246-251	F29	65	35	159	Mélange complexe
252-260	F30	55	45	235	Mélange complexe
261-268	F31	55	45	1536	Mélange complexe
269-276	F32	55	45	210	Mélange complexe
277-281	F33	45	55	1132	Mélange complexe
282-292	F34	20	80	421	Mélange complexe
293-297	F35	20	80	526	Mélange complexe
298-299	F36	20	80	743	Mélange complexe
300-304	F37	0	100	2300	Mélange complexe

Parmi les 37 fractions obtenues, seules les fractions **F4**, **F8**, **F10**, **F12** et **F22** ont été traitées.

➤ **Etude de la fraction F4**

La fraction **F4** (50 mg) a subi une recristallisation dans un mélange dichlorométhane /acétone, conduisant à la formation de cristaux blancs qui après plusieurs lavages successifs avec le dichlorométhane, a donné un produit pur nommé **CP14** de masse 10 mg.

➤ **Etude de la fraction F8**

La recristallisation de la fraction **F8** (63mg) dans un mélange dichlorométhane/acétone, a permis d'isoler un produit sous forme de cristaux (aiguilles blanches). Après plusieurs lavages avec le dichlorométhane, un produit pur nommé **CP15** (8 mg) a été obtenu.

➤ **Etude de la fraction F10**

La fraction **F10** (278 mg) a subi une séparation sur plaques CCM éluee deux fois dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1), cette opération a permis l'isolement du produit **CP16** de masse 4 mg qui a été purifié sur colonne de gel de Sephadex LH20 élué par du méthanol.

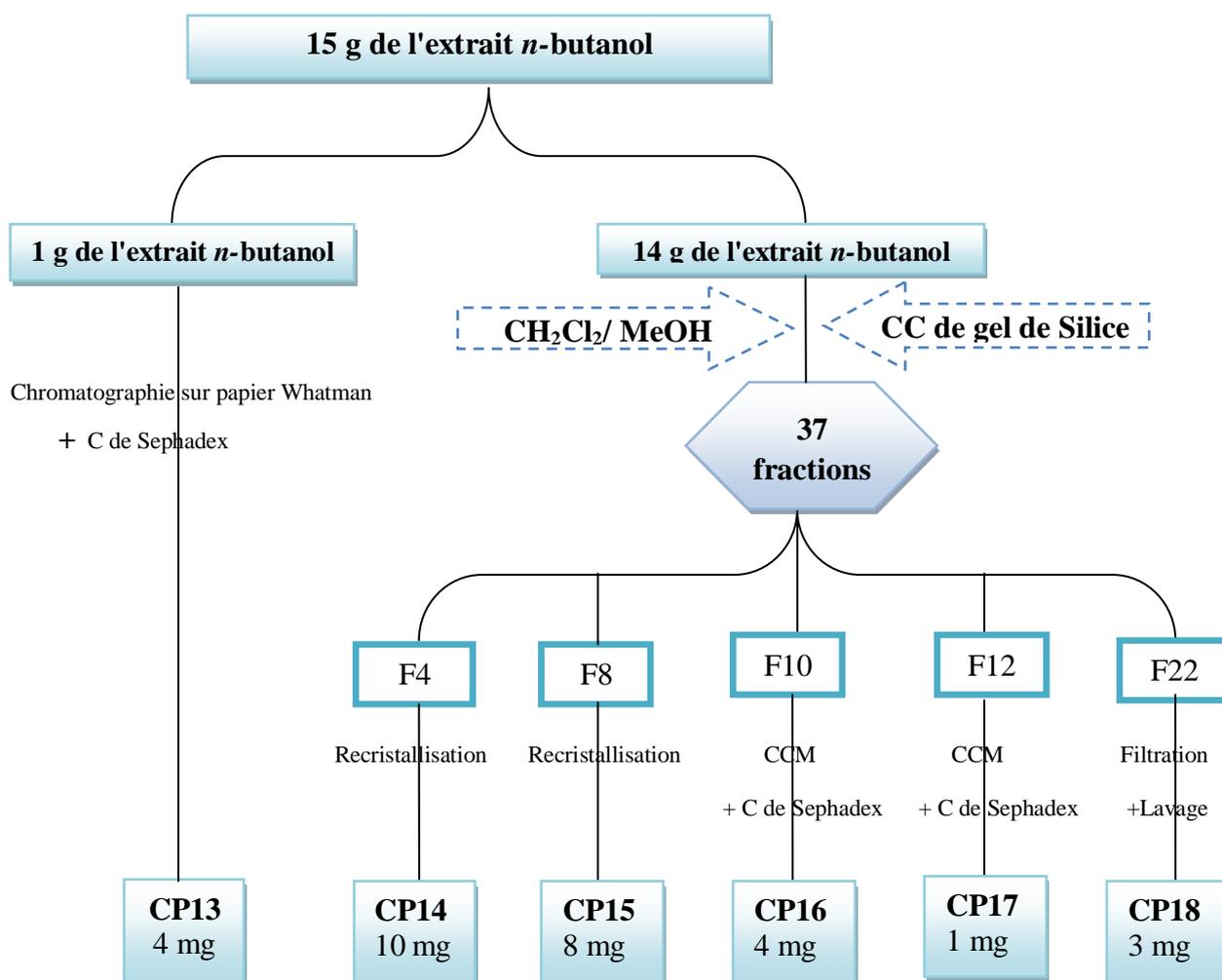
➤ **Etude de la fraction F12**

La fraction **F12** (60mg) a subi une séparation sur chromatographie sur couche mince en utilisant comme système d'élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1), cette opération a permis l'obtention du produit **CP17** (2 mg). Ce dernier a été purifié encore une fois sur colonne de gel de Sephadex LH20 élué par du méthanol.

➤ **Etude de la fraction F22**

La fraction **F22** (331mg) renferme un précipité qui apparait sous forme des cristaux blancs. Plusieurs lavages successifs avec le MeOH ont permis l'obtention du produit **CP18** de masse 3mg.

Le schéma ci-dessous (Figure III.5) résume les étapes de séparation de l'extrait *n*-butanol et de purification des fractions issues de la colonne.



**Figure III.5:** Schéma de séparation de l'extrait *n*-butanol de *C. choulettiana*.

Un test sur CCM des produits isolés a montré que:

- CP2 ≡ CP3 ≡ CP4
- CP10 ≡ CP17

#### ➤ Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes des extraits cyclohexane, AcOEt et *n*-BuOH des feuilles de *C. choulettiana* a mené à la séparation et la purification de 18 produits à l'état natif, ces produits sont:

- ❖ Pour l'extrait cyclohexanique: **CP1** (5 mg), **CP2** (2 mg), **CP3** (5 mg), **CP4** (6 mg), **CP5** (4 mg), **CP6** (100 mg) et **CP7** (8 mg).
- ❖ Pour l'extrait acétate d'éthyle: **CP8** (7 mg), **CP9** (4,2 mg), **CP10** (3,5 mg), **CP11** (2 mg), et **CP12** (2,5 mg).

- ❖ Pour l'extrait *n*-butanol: **CP13** (4 mg), **CP14** (10 mg), **CP15** (8 mg), **CP16** (4 mg), **CP17** (2 mg) et **CP18** (3 mg).

➤ **Remarque:**

Les produits CP1, CP5, CP16, CP18 n'ont pas été identifiés.

L'extrait cyclohexane nous conduit aux produits **CP4** (6 mg), **CP6** (100 mg) et **CP7** (8 mg).

On retrouve les produits (**CP8** (7 mg), **CP9** (4,2 mg), **CP10** (3,5 mg), **CP11** (2 mg) et **CP12** (2,5 mg) dans l'extrait acétate d'éthyle et enfin l'extrait *n*-butanol renferme les produits **CP13** (4 mg), **CP14** (10 mg) et **CP15** (8 mg).

Tous ces produits ont été soumis aux analyses physicochimiques afin d'en établir leurs structures. Les résultats et la discussion de ces analyses seront développés au chapitre IV.

### **III.1.5 les huiles essentielles**

La valorisation des huiles essentielles, considérées comme des ressources naturelles importantes, peut avoir des retombées économiques considérables pour notre pays. En effet, différentes plantes contiennent des huiles essentielles composées de molécules ayant des activités biologiques et ayant de fortes valeurs ajoutées.

Le chapitre IV résume l'étude qualitative et quantitative de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana*. En effet, une analyse par chromatographie gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) a été faite pour la première fois sur cette huile essentielle dans le but de déterminer la nature et les quantités des composés.

#### **III.1.5.1 Composition de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana***

L'analyse de la composition de l'huile essentielle des fleurs a été effectuée au laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174. France.

Après distillation à la vapeur d'eau des fleurs de *C. choulettiana*, à l'aide d'un appareil de type Kaiser-Lang, pendant une durée de 3h, le rendement d'extraction a été estimé 0,02%. L'huile essentielle de cette plante présente une couleur jaune et une odeur agréable et forte.

➤ **Analyse par Chromatographie gazeuse/Détecteur à Ionisation de Flamme (GC-FID)**

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Agilent 6890 (GC-FID), équipé d'une colonne capillaire HP-5ms de silice fondue (5% diphényle-95% diméthyl-polysiloxane (25 x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm), la programmation de la température consiste en une élévation de 50 °C (5 min) à 250 °C à 3°C/min, puis en palier de 10 min à 250 °C. La température de l'injecteur était de 280 et celle du détecteur de 300 °C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle a été diluée dans l'acétone à 3,5% (v / v) et 1 µl a été injecté. L'hélium est utilisé comme gaz porteur (1,0 ml/min). Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

➤ **Analyse par Chromatographie gazeuse / Spectrométrie de Masse (GC/MS)**

La spectrométrie de masse a été effectuée sur une chromatographie en phase gazeuse couplée d'un spectromètre de masse Agilent 7890/5975 (GC-MS), équipée d'une colonne capillaire HP-5 (25 m x 0,25 mm, épaisseur de film de 0,25 µm) programmé avec les mêmes conditions que pour GC-FID.

L'ionisation du spectromètre de masse (MS) a été réglée en mode impact électronique positif à 70 eV, et le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V. Les températures de la source d'ions et le quadripolaire MS étaient de 230 °C et 180 °C respectivement.

Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme  $m/z$  33-450. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés en comparant leur spectre de masse et leur indice de rétention (RI) avec ceux des composés de référence des bibliothèques [10-11].

## Partie 2: *Centaurea fragilis* Dur.

### III.2.1 Description botanique

C'est une plante rigide, de 30-40 cm de longueur. Les tiges sont anguleuses, grêles et rameuses. Les feuilles sont coriaces, non décurrentes sur la tige; les supérieures lancéolées entières. Les capitules sont petits de 10 cm de large sur 2-2,5 cm de long. Akènes marbrés à aigrette nettement marquée (1/2 de l'akène). Appendice des bractées à 5 épines minuscules (2-3 mm env.) et de couleur à peine plus foncée que le corps de la bractée [9].



**Figure III.6:** Image de l'espèce *Centaurea fragilis* Dur.

### III.2.2 Récolte du matériel végétal

La récolte de la matière végétale a été réalisée au mois de mai 2014 des environs de la ville d'El kala, et authentifié par Dr. Sarri (Département de biologie ; Université de M'sila). Un échantillon (CFA 05/14) a été déposé à l'Unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine.

### III.2.3 Extraction des feuilles de *C. fragilis*

Le séchage a été fait à l'ombre, loin des rayons solaires et de l'humidité. Les feuilles ont été séparées, coupées en petits morceaux et pesées.

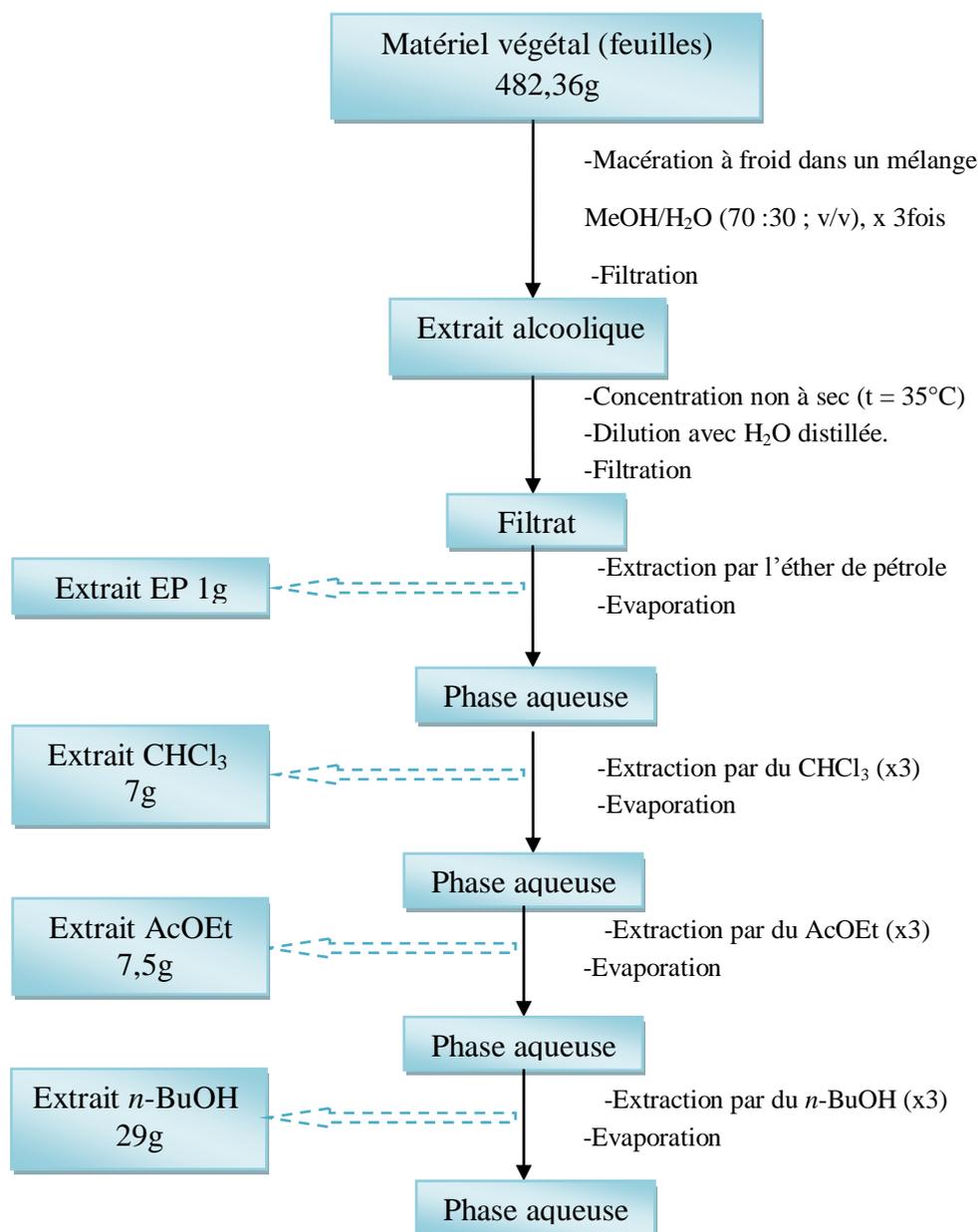
Une masse de 482,36 g des feuilles est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/Eau ; 70/30 ; v/v), en répétant cette opération 3 fois avec renouvellement du solvant (24 à 48 heures / 3 fois). L'extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 40°C, puis dilué avec de l'eau distillée à

raison de 400 ml pour 1Kg de matière sèche. Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (la chlorophylle, les cires, le sable etc...). La solution ainsi dégraissée subit une filtration pour obtenir une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi des extractions de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol (figure III.7).

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le tableau III.8:

**Tableau III.8:** Masses et rendements des extraits de *C. fragilis*.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement %
482,36 g	Ether de pétrole	1	0,21
	Chloroforme	7	1,45
	Acétate d'éthyle	7,5	1,55
	<i>n</i> -butanol	29	6,01



**Figure III.7:** Organigramme d'extraction de l'espèce *Centaurea fragilis*.

### III.2.4 Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Une masse de 10 g d'extrait *n*-BuOH est déposée sur une colonne confectionnée avec 320g de gel de silice (type 60, 200 Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système CHCl<sub>3</sub>/ MeOH en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le MeOH avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par CCM. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à 100 °C pendant 3min.

Les pots présentant le même profil chromatographique sont réunis donnant ainsi 32 fractions. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.9.

**Tableau III.9:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *Centaurea fragilis*.

Lot de Fractions	N° de la fraction	Système d'éluion		Poids de la fraction (mg)	Observations
		% CHCl <sub>3</sub>	% MeOH		
1-35	F1	100	0	8	Traces
36-44	F2	98	2	19	Mélange complexe
45-50	F3	98	2	21	Mélange complexe
51-62	F4	96	4	157	Mélange complexe
63-68	F5	96	4	96	Mélange complexe
69-73	F6	94	6	69	Mélange complexe
74-85	F7	94	6	182	Mélange complexe
86-95	F8	92	8	112	Mélange complexe
96-101	F9	90	10	153	Mélange complexe
102-111	F10	85	15	242	Mélange complexe
112-123	<b>F11</b>	85	15	120	Mélange séparable
124-129	F12	80	20	167	Mélange complexe
130-138	F13	75	25	150	Mélange complexe
139-149	F14	70	30	197	Mélange complexe
150-161	F15	65	35	230	Mélange complexe
162-173	F16	60	40	155	Mélange complexe
174-188	F17	55	45	139	Mélange complexe
189-201	F18	55	45	253	Mélange complexe
202-212	F19	50	50	311	Mélange complexe
213-229	F20	45	55	214	Mélange complexe
230-244	F21	40	60	220	Mélange complexe
245-256	F22	35	65	231	Mélange complexe
257-270	F23	30	70	152	Mélange complexe
271-282	F24	25	75	242	Mélange complexe
283-294	F25	20	80	217	Mélange complexe
295-313	F26	15	85	476	Mélange complexe
314-328	F27	10	90	223	Mélange complexe
329-338	F28	0	100	240	Mélange complexe
339-342	F29	0	100	329	Mélange complexe
343-362	F30	0	100	435	Mélange complexe
363-370	F31	0	100	1256	Mélange complexe
371-380	F32	0	100	2210	Mélange complexe

➤ **Etude de la fraction F11**

La fraction F11 (120 mg) est soumise à un fractionnement sur une colonne de Sephadex LH-20 éluee par le MeOH comme solvant. Le suivi des sous fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince visualisé sous lumière UV (254 et 365 nm). Cette étape s'est soldée par l'obtention de 7 sous fractions. Le tableau III.10 rassemble les résultats de cette colonne.

**Tableau III.10:** Résultats de la séparation de la fraction F11 par chromatographie sur colonne de Sephadex.

<b>fraction</b>	<b>lot</b>	<b>remarques</b>	<b>Masse des fractions (mg)</b>
S1	1-2	Mélange complexe	3
S2	3-7	Mélange complexe	16
<b>S3</b>	8-10	Mélange séparable	50
S4	10-13	Mélange complexe	12
S5	14-15	Mélange complexe	20
S6	16-19	Mélange complexe	9
S7	20-25	Mélange complexe	5

La sous fraction S3 (50 mg) a subi une séparation sur des plaques analytiques de gel de silice éluee trois fois dans le système chloroforme / méthanol (8/2), cette opération a permis l'isolement du produit **CP19** (5 mg) à l'état pur.

Vu la complexité des fractions de la colonne de gel de silice on a fait une autre séparation sur colonne de sephadex.

### **III.2.5 Séparation de l'extrait *n*-butanol sur colonne de Sephadex**

Une masse de 2g d'extrait est soumise à un fractionnement par une chromatographie sur colonne de Sephadex LH- 20 élué par le MeOH. Le suivi des fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince visualisé sous lumière UV (254 et 365 nm). Cette étape s'est soldée par l'obtention de 10 fractions. Le tableau III.11 rassemble les résultats de cette colonne.

**Tableau III.11:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de Sephadex de l'extrait *n*-butanol de *Centaurea fragilis*.

<b>fraction</b>	<b>lot</b>	<b>remarques</b>	<b>Masse des fractions (mg)</b>
F1	1-3	Mélange complexe	46
F2	4-7	Mélange complexe	92
F3	8-10	Mélange complexe	220
<b>F4</b>	11-12	Mélange séparable	250
<b>F5</b>	13-15	Mélange séparable	232
<b>F6</b>	16-17	Mélange séparable	260
F7	18-20	Mélange complexe	268
F8	21-25	Mélange complexe	228
F9	26-28	Mélange complexe	206
F10	29-36	Mélange complexe	156

➤ **Etude de la fraction F4**

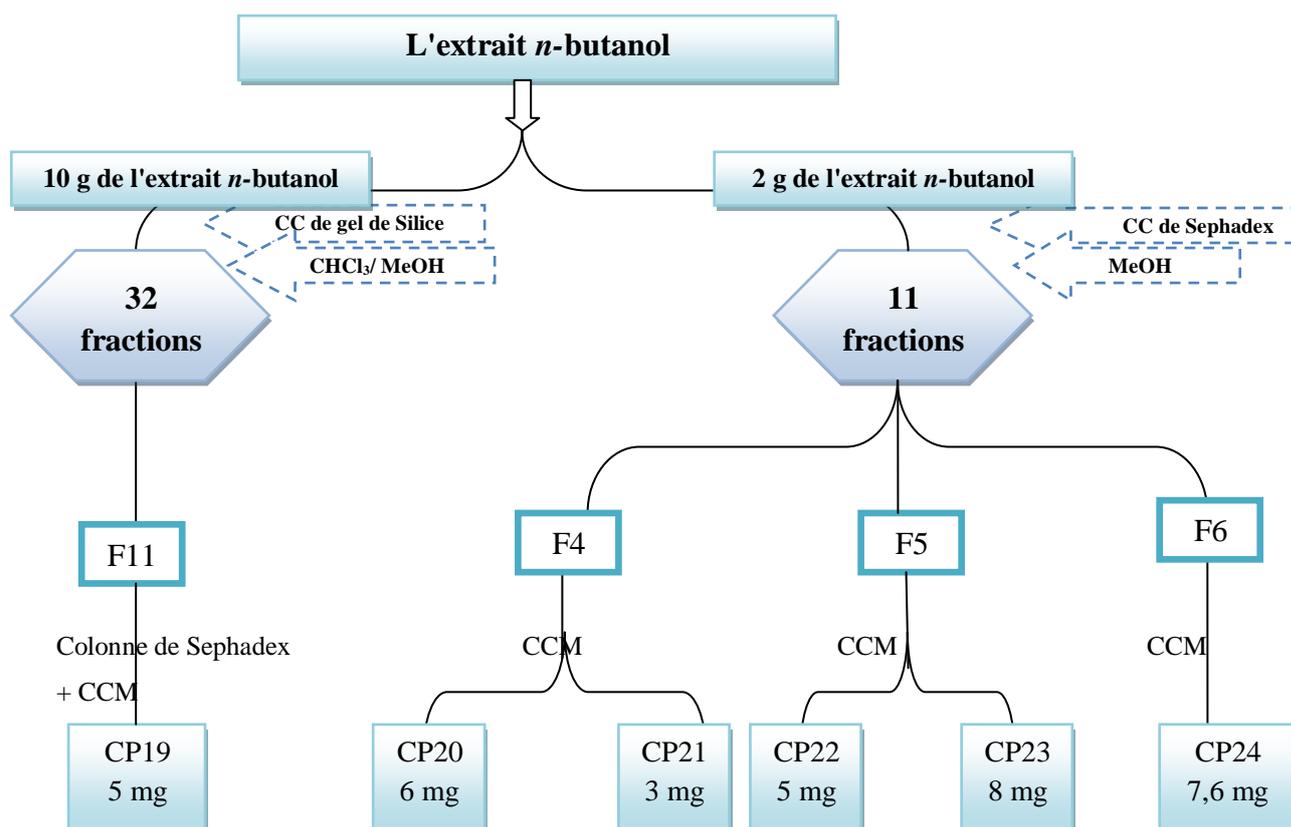
La chromatographie de cette fraction F4 (250 mg), sur plaques analytiques de gel de silice éluee trois fois dans le chloroforme / méthanol (8/2) a permis l'obtention de 2 produits **CP20** (6 mg), **CP21** (3 mg).

➤ **Etude de la fraction F5**

La fraction F5 (232 mg), a subi une séparation sur des plaques préparatives de gel de silice éluees trois fois dans le système AcOEt / méthanol /H<sub>2</sub>O (6/1/1) a mené à l'isolement de deux produits purs nommé **CP22** (5 mg) et **CP23** (8 mg).

➤ **Etude de la fraction F6**

La fraction F6 (260 mg), a subi une séparation sur des plaques préparatives de gel de silice éluee trois fois dans le système AcOEt/méthanol/H<sub>2</sub>O (6/1/1) et a mené à l'isolement du produit pur nommé **CP24** (7,6 mg)



**Figure III.8:** Schéma de séparation de l'extrait *n*-butanol de *C. fragilis*.

Un test des produits isolés sur CCM a montré que:

- CP19 ≡ CP22
- CP20 ≡ CP23

➤ **Conclusion**

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes de l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *C. fragilis* a mené à la séparation et la purification de 4 produits à l'état natif, ces produits sont:

**CP19** (5 mg), **CP20** (6 mg), **CP21** (3 mg), **CP22** (5 mg), **CP23** (8 mg) et **CP24** (7,6 mg). Parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle, la structure de deux composés **CP19** et **CP20**.

Ces produits ont été soumis aux analyses physicochimiques afin d'en établir leurs structures. Les résultats et la discussion de ces analyses seront développés au chapitre IV.

**Références bibliographiques:**

- [1] Talhouk, R.S., El-Jouni, W., Baalbaki, R., Gali-Muhtasib, H., Kogan, J., Talhouk, S.N., (2008), Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (2), 024-033.
- [2] Güven, K., Çelik, S., Uysal, İ., (2008), Antimicrobial Activity of *Centaurea* Species, *Journal Pharmaceutical Biology*, 43 (1), 67-71.
- [3] Hall, I.H., Lee, K.H., Mar, E.C., Starnes, C.O., Wadell, T.G., (1977), Antitumor agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones. *J. Med. Chem.* 20, 333-337.
- [4] Bicha, S., Amrani, A., Benaïssa, O., León, F., Zama, D., Brouard, I., Benayache, S. Bentamene, A., Benayache, F., (2013), A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L., *Der Pharmacia Lettre*, 5 (6): 24-30.
- [5] Bicha, S., Chalard, P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, V.P., Lobstein, A., Bentamene, A., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F., (2013), Moroccanin, A New  $\gamma$ -lactone and Other Constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). *Rec. Nat. Prod.*, 7(2): 114-118.
- [6] Bentamene, A., Benayache, S., Crèche, 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.
- [7] Hanasaki, Y., Ogawa; S., Et Fnkui, S., (1994), The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biol. Med*, 16, 845-850
- [8] Bruneton, J., (1993), Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition, lavoisier, Paris.
- [9] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France.
- [10] Adams, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois., 2007, 4<sup>th</sup> Ed.
- [11] Mc Lafferty, F.W. and Stauffer D.B. The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 1991, 5<sup>th</sup> Edition, J.Wiley and Son, New York.

# *CHAPITRE IV*

## *Discussion des résultats*

## *Appareillages*

### *1. Spectrométrie de masse*

Les spectres de masse des produits purs ont été enregistrés en mode électronébulisation (electrospray, ESI) en utilisant un spectromètre de masse à haute résolution du type HPLC-TOF/MS Agilent Technologie 1260 (Université de çankiri karatekin, Département de chimie, Turquie).

### *2. Spectroscopie de RMN*

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent 600 MHz, (Université de çankiri karatekin, Département de chimie, Turquie). Les solvants deutérés utilisés sont précisés, selon la solubilité des composés. Les données sont traitées à l'aide du logiciel MestRec pour RMN de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et ACD/NMR pour les RMN 2D.

### *3. Spectrophotométrie UV-Visible*

Les spectres UV-Vis des composés isolés ont été mesurés en solution méthanolique à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis de type Thermo Electron corporation, évolution 300. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz.

## Partie 1

Résultats de l'étude phytochimique de *Centaurea choulettiana* Pomel

## IV.1.1 Détermination structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyses spectroscopiques particulièrement, la RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ , RMN 2D (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC), HPLC-TOF/MS, GC/MS, spectrophotométrie UV et par comparaison avec les données de la littérature.

## IV.1.1.1 Détermination de la structure du composé CP4

Le composé CP4 a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Il donne une coloration violette sur CCM après révélation à l'anisaldéhyde et chauffage.

Ce composé a été identifié par GC/FID et son chromatogramme (figure IV.1) montre qu'il s'agit d'un mélange de deux produits. Les constituants de ce mélange ont été identifiés comme étant le stigmastérol (37%) et le  $\gamma$ -Sitostérol (63%) par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque des données NIST.

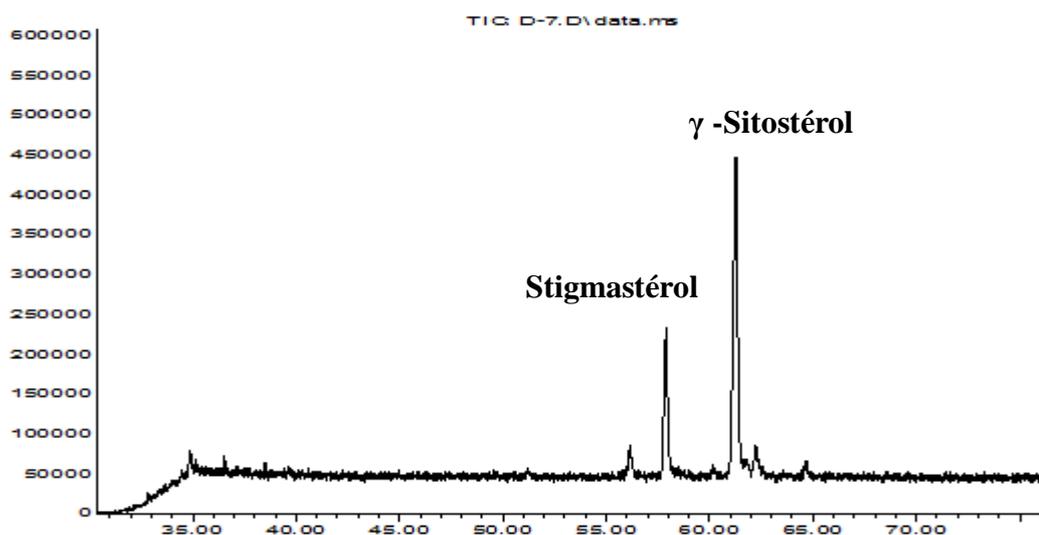
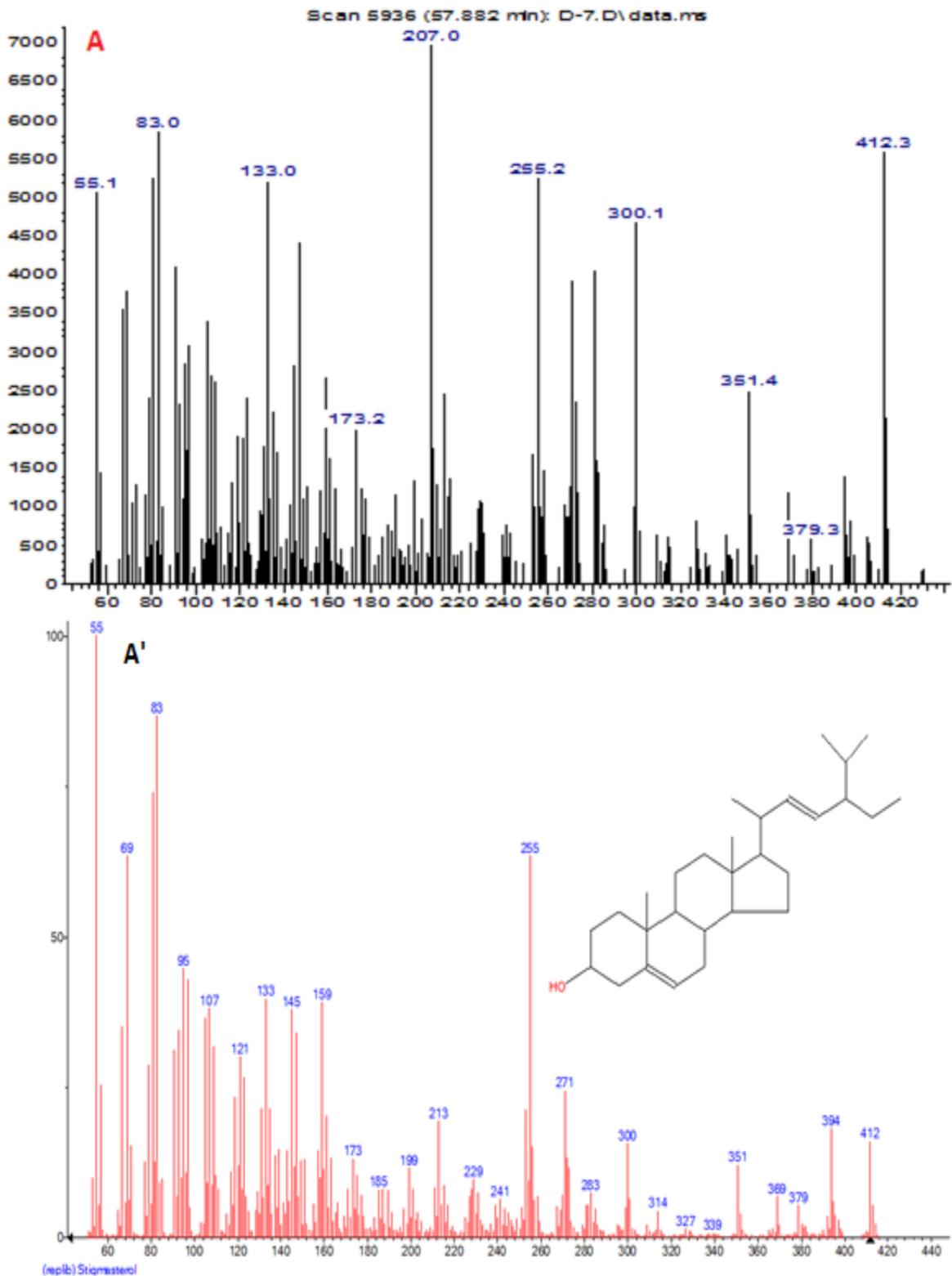


Figure IV.1: chromatogramme GC/MS du composé CP4

Les spectres de masse (figure IV.2 et IV.3) réalisés en mode impact électronique (IE) donnent les fragments caractéristiques de chaque composé:

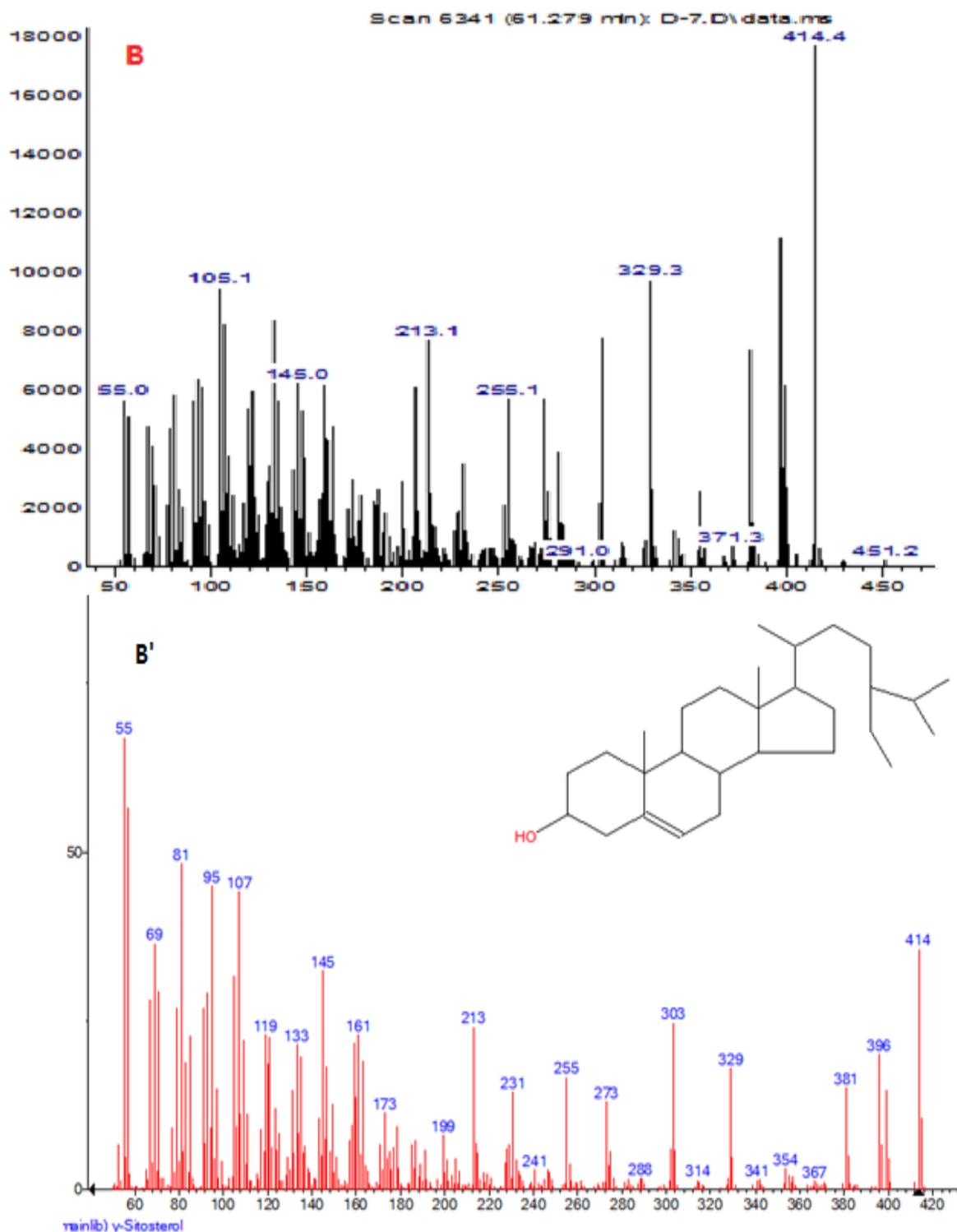
**A : Stigmastérol 37%**, dont les fragmentations principales sont caractéristiques des fragmentations des stérols telles que :  $(m/z) = 412 [M^+]$ , 379 correspondant à  $[M^+ - 15 - 18]$ , 255 correspondant à  $[M^+ - 18 - C_{10}H_{19}]$  et autres (figure IV.2).



**Figure IV.2: A.** Spectre de masse IE du composé CP4-1.

**A'.** Spectre de masse IE du témoin Stigmasterol

**B :  $\gamma$ -Sitostérol 63 %** présentant les fragmentations suivantes ( $m/z$ )= 414  $\equiv$  [ $M^{+\circ}$ ], 396  $\equiv$  [ $M^{+\circ}$ -18] indiquant la présence d'un groupement hydroxyle, 329  $\equiv$  [ $M^{+\circ}$ -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>] et 303  $\equiv$  [ $M^{+\circ}$ -C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>] correspondent à la perte de la chaîne latérale (figure IV.3).



**Figure IV.3: B.** Spectre de masse IE du composé CP4-2.  
**B'.** Spectre de masse IE du témoin  $\gamma$ -Sitostérol.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré dans le  $\text{CDCl}_3$  (figure IV.4) présente un ensemble de signaux allant de 0,68 à 5,35 ppm confirmant un squelette stéroïdien. En effet, on peut distinguer :

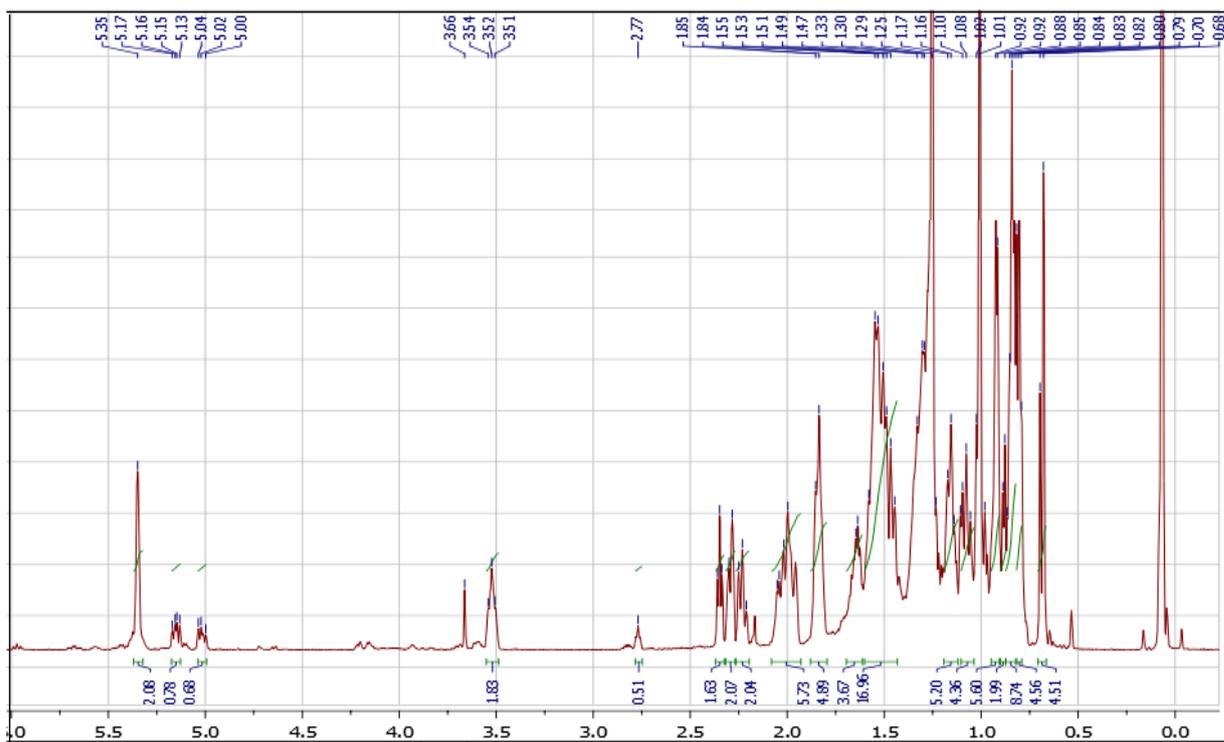
- une série de pics très denses dans l'intervalle 0,68 - 2,36 ppm indiquant la présence de protons aliphatiques caractéristiques des dérivés stéroïdiens.

- Un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,52$  ppm correspondant à un proton porté par un carbone oxygéné attribuable au proton H3.
- Un singlet large éthylénique à  $\delta_{\text{H}} = 5,35$  ppm attribuable au proton H6.

En plus, le même spectre montre la présence de deux protons éthyléniques à  $\delta_{\text{H}} = 5,15$  et  $5,02$  ppm sous forme de deux doublets dédoublés ( $J = 13,8$  ;  $7,2$  Hz) qui ne peuvent être attribués qu'aux protons H22 et H23 du stigmastérol respectivement.

Une lecture attentive du spectre proton (Figure IV.4) montre une intégration d'environ 2.08 pour le signal relatif à H-6, alors que cette intégration est d'environ 0,78 pour chacun des signaux relatifs à H-22 et H-23. Cette observation confirme qu'on est en présence d'un mélange de stigmastérol (CP4-1) et le  $\gamma$ -Sitostérol (CP4-2).

Un simple calcul mené sur les intégrales des signaux des protons montre qu'il s'agit d'un mélange d'environ **37-63%** en faveur du  $\gamma$ -Sitostérol (CP4-2).



**Figure IV.4:** Spectre RMN du  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}d_6$ , 600 MHz) du CP4.

Ceci est confirmé par l'étude du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure IV.5) qui montre la présence de signaux correspondants aux 4 carbones oléfiniques C5 et C6 des deux stéroïdes ainsi qu'à ceux présents dans la chaîne latérale en position C22 et C23 du stigmastérol à  $\delta$  : 140,73 ; 121,69 ; 129,33 et 138,20 respectivement [1]. Les autres valeurs de tous les signaux comparées à celles

trouvées dans la littérature ont conduit aux structures ci-dessous qui sont celles du stigmastérol et du  $\gamma$ -sitostérol.

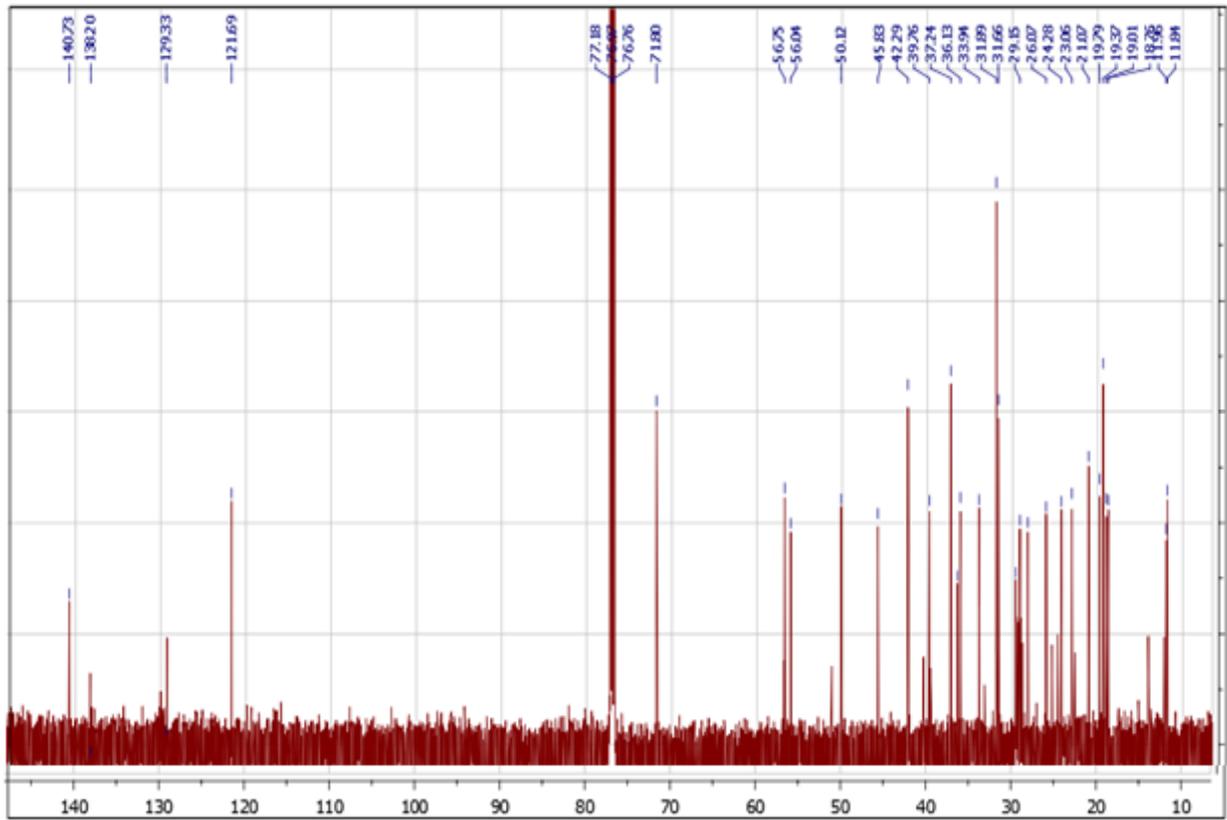
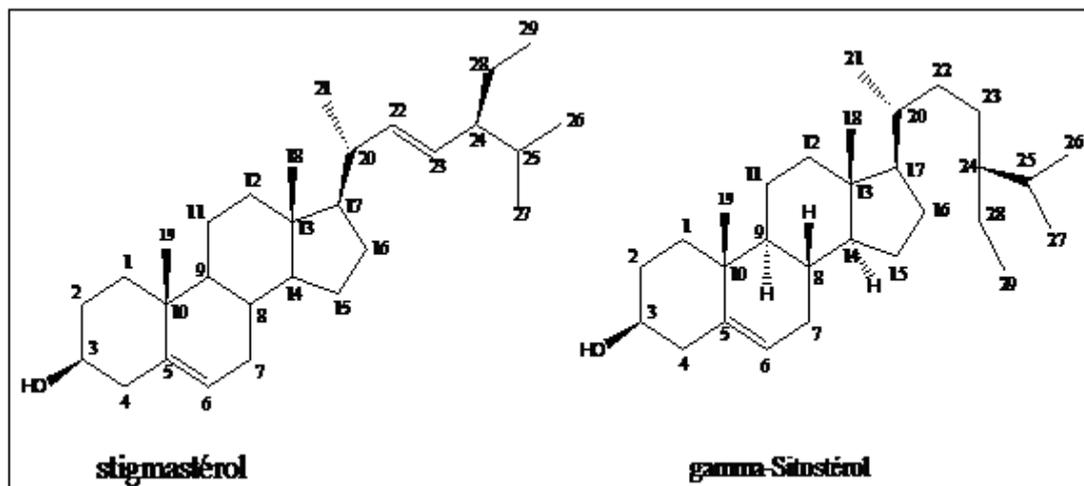


Figure IV.5: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}d_6$ , 150 MHz) du CP4.



#### Structures du mélange CP4: stigmastérol et $\gamma$ - sitostérol

Ainsi, le **mélange CP4** est constitué de  $\gamma$ -sitostérol et de stigmastérol. Ces composés font partie des stéroïdes largement répandus dans le règne végétal.

Le stigmastérol a été isolé à partir de nombreuses plantes jusqu'à ce jour et évalués pour de nombreuses activités pharmacologiques et biologiques, à savoir : L'activité anti-arthrosique,

l'activité antihypercholestérolémiques, la cytotoxicité, l'anti-tumorale, l'activité antioxydante, l'activité hypoglycémique et l'effet sur la thyroïde, l'activité antimutagène, l'activité anti-inflammatoire [2]. De nombreuses études pharmacologiques devraient être menées pour évaluer le potentiel inexploité de ce constituant.

Le  $\gamma$ -sitostérol a déjà été mentionné dans les parties aériennes de *Acroptilonrepens* (*Centaurea repens*) appartenant à la famille Asteraceae [3].

#### IV.1.1.2 Détermination de la structure du composé CP6

Le composé CP6 se présente sous forme de cristaux blancs soluble dans le chloroforme. L'analyse HPLC-TOF du composé CP6 (Figure IV.6) a montré que ce composé est d'une très grande pureté (100 %) et son temps de rétention est  $t_R = 13,03$  min.

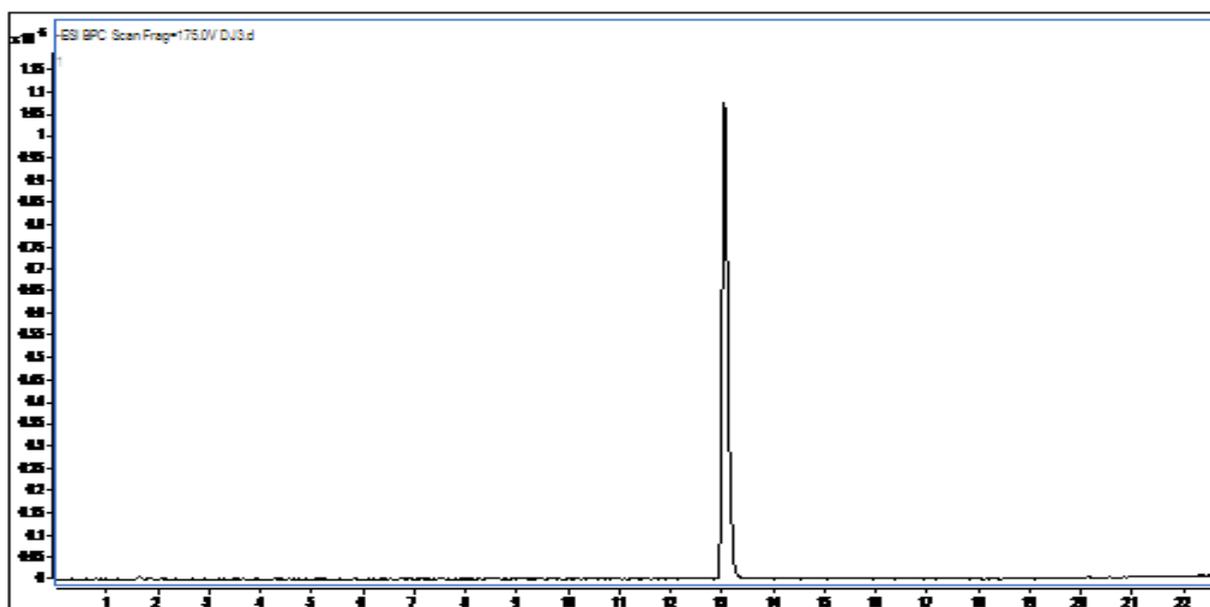
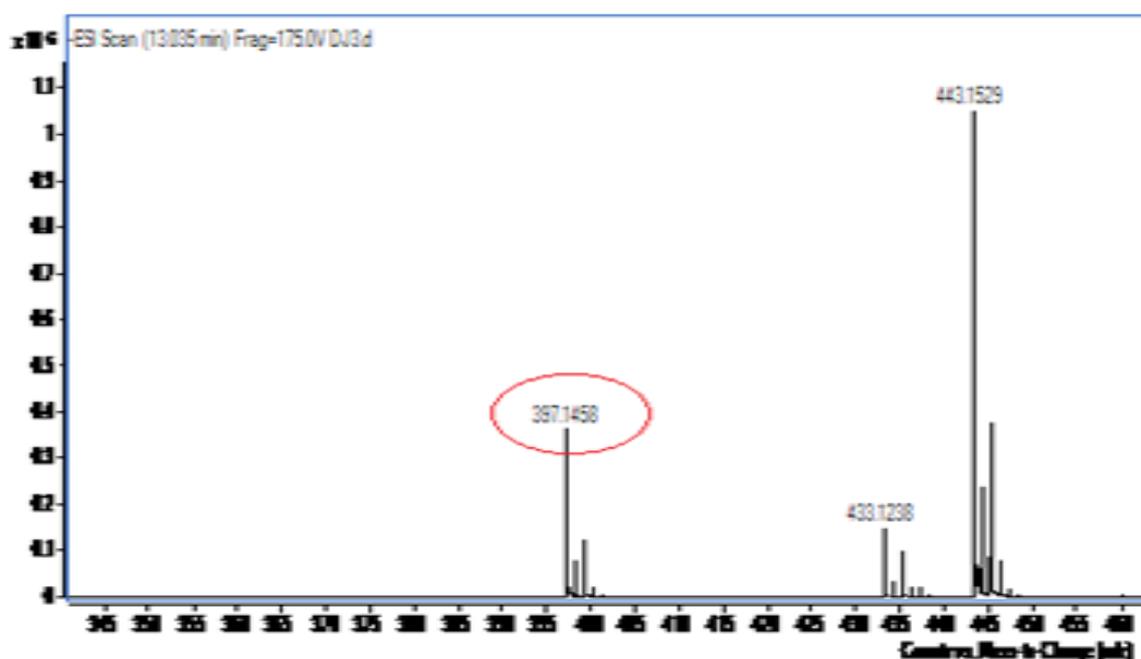


Figure IV.6: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé CP6

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation négatif (TOF-HRESI-MS négatif) (Figure IV.7) montre un ion quasimoléculaire  $[M+Fa-H]^-$  présenté par deux pics dont le premier à  $m/z=443,1529$  se trouve trois fois plus intense que le second à  $m/z=445$  indiquant la présence d'un atome de chlore dans la molécule. Un deuxième signal à  $m/z=433,15829$ , 435 et 437 dans les proportions 9/6/1 indiquant la présence d'un atome de Cl natif dans la molécule et un troisième signal à  $m/z=397,1458$  et 399 dans les proportions 3/1 confirme la présence de l'atome de Cl dans la molécule et correspondant à  $[M-H]^-$  et permet de déduire une formule brute de  $C_{19}H_{23}O_7Cl$  indiquant la présence de 8 insaturations dans cette molécule.



**Figure IV.7:** Spectre HPLC-TOF/MS en mode négatif du composé CP6.

L'examen des spectres RMN<sup>13</sup>C et DEPT (Figure IV.8 et 9) confirme la présence de 19 atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit:

**Six carbones quaternaires dont:**

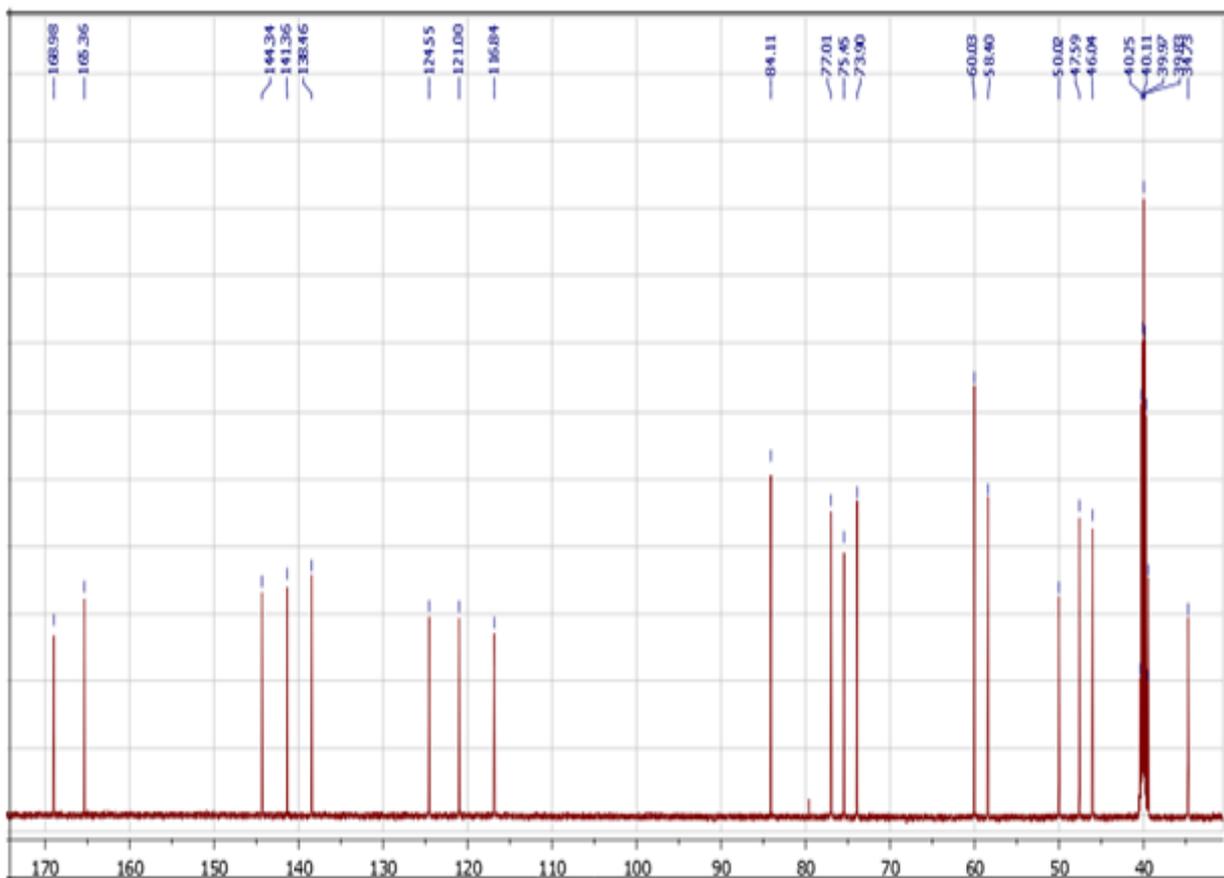
- ✓ 1 Cq à  $\delta_C = 84,11$  ppm attribuable à un carbone hybridé  $sp^3$  et oxygéné.
- ✓ 3 Cq à  $\delta_C = 144,3$  ;  $141,36$  et  $138,46$  ppm attribuables à trois carbones éthyléniques.
- ✓ 2 CO, l'un à  $\delta_C = 168,98$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée[4] et l'autre à  $\delta_C = 165,36$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'ester  $\alpha,\beta$ -insaturé.

**Six groupements CH dont:**

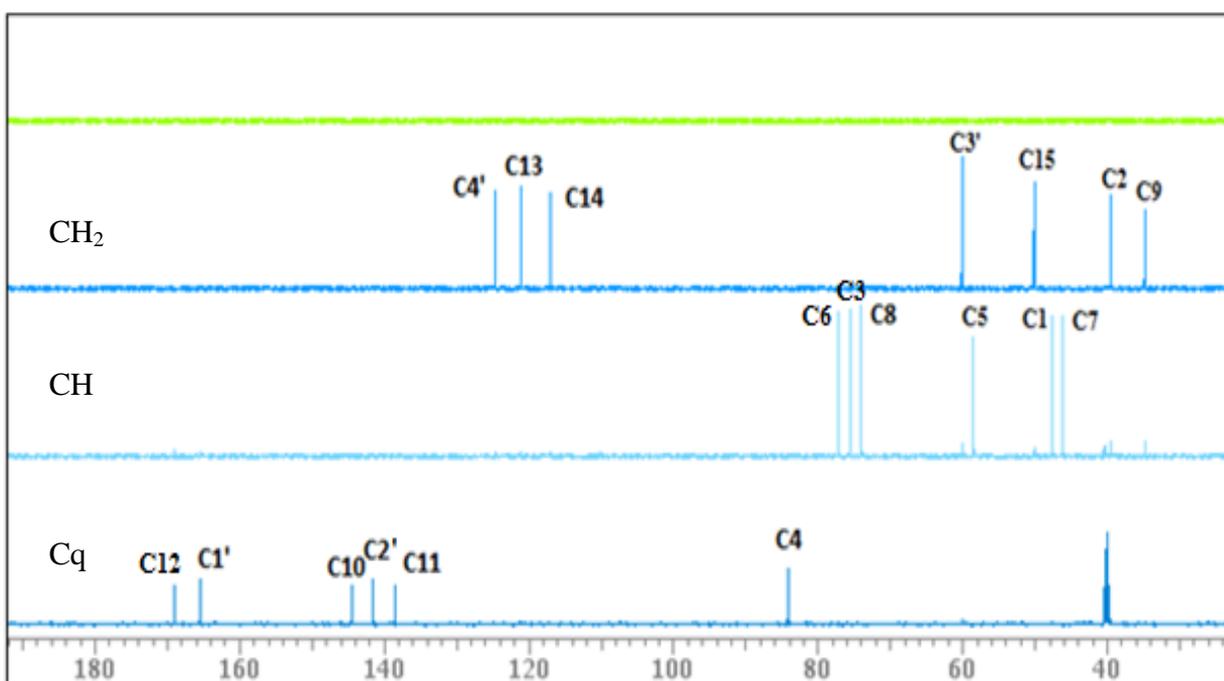
- ✓ 3 CH oxygénés à  $\delta_C = 73,91$  ;  $75,46$  et  $77,09$  ppm. Le déplacement chimique de ce dernier est caractéristique d'un CH de fermeture d'une lactone sesquiterpénique [4].
- ✓ 3 CH non oxygénés à  $\delta_C = 46,04$  ;  $47,60$  et  $58,40$  ppm.

**Sept groupements CH<sub>2</sub> dont:**

- ✓ 3 CH<sub>2</sub> éthyléniques à  $\delta_C = 124,56$  ;  $121,01$  et  $116,84$  ppm.
- ✓ 1 CH<sub>2</sub> oxygéné à  $\delta_C = 60,03$  ppm.
- ✓ 3 CH<sub>2</sub> non oxygénés à  $\delta_C = 34,73$  ;  $39,43$  et  $50,02$  ppm.



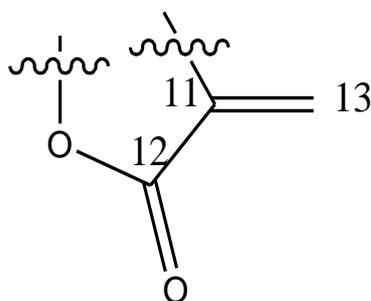
**Figure IV.8:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) du composé CP6.



**Figure IV.9:** Spectre DEPT ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) du composé CP6.

L'analyse simultanée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.11), HSQC (Figure IV.12) et HMBC (Figure IV.13) permet de mettre en évidence les corrélations suivantes:

- ✓ Les deux signaux sous forme d'un singulet large d'intégration 1H chacun à  $\delta_H=5,46$  et  $5,95$  ppm corrélient sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_c=121,0$  ppm. Ces deux protons corrélient sur le spectre HMBC avec le signal à  $\delta_c = 168,9$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone et le carbone à  $\delta_c=138,4$  ppm indiquant que ce carbone est quaternaire. Ces données indiquent clairement que ce dernier carbone ( $\delta_c=138,4$ ) est porteur de la double liaison exocyclique C11-C13 et se trouvant adjacente à la fonction  $\gamma$ -lactone. Cependant, ces deux protons sont connus par H13b et H13a respectivement.
- ✓ Deux autres signaux sous forme d'un singulet large et d'intégration 1H chacun à  $\delta_H=4,68$  et  $5,04$  ppm corrélient sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_c=116,84$  ppm. Ces deux protons montrent sur le spectre HMBC une tache de corrélation avec le signal d'un Cq à  $\delta_c = 144,34$  ppm permettant de déduire la présence d'une deuxième double liaison.
- ✓ Encore deux autres signaux à  $\delta_H=5,88$  et  $6,15$  ppm sous forme de singulet large et intégrant pour 1H chacun corrélient sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_c= 124,55$  ppm. Ces deux protons corrélient sur le spectre HMBC avec deux signaux, le premier à  $\delta_c=165,4$  ppm caractéristique du carbonyle de l'ester  $\alpha,\beta$ -insaturé et le deuxième à  $\delta_c=141,4$  ppm qui ne peut être que le Cq porteur de la double liaison. Ceci permet de déduire la présence d'une troisième double liaison qui se trouve adjacente au groupement carbonyle de l'ester.



**Figure IV.10:** Structure partielle du composé CP6

A ce niveau, nous comptons pour notre molécule trois insaturations caractérisant la présence de trois double liaisons, deux autres insaturations des carbonyles, rajoutons à ceci l'insaturation du cycle lactonique ce qui mène à 6 le nombre d'insaturation des 8 signalées plus haut. Ceci permet de déduire que le squelette de la molécule est bicyclique et vu la présence des doubles liaisons exocyclique.

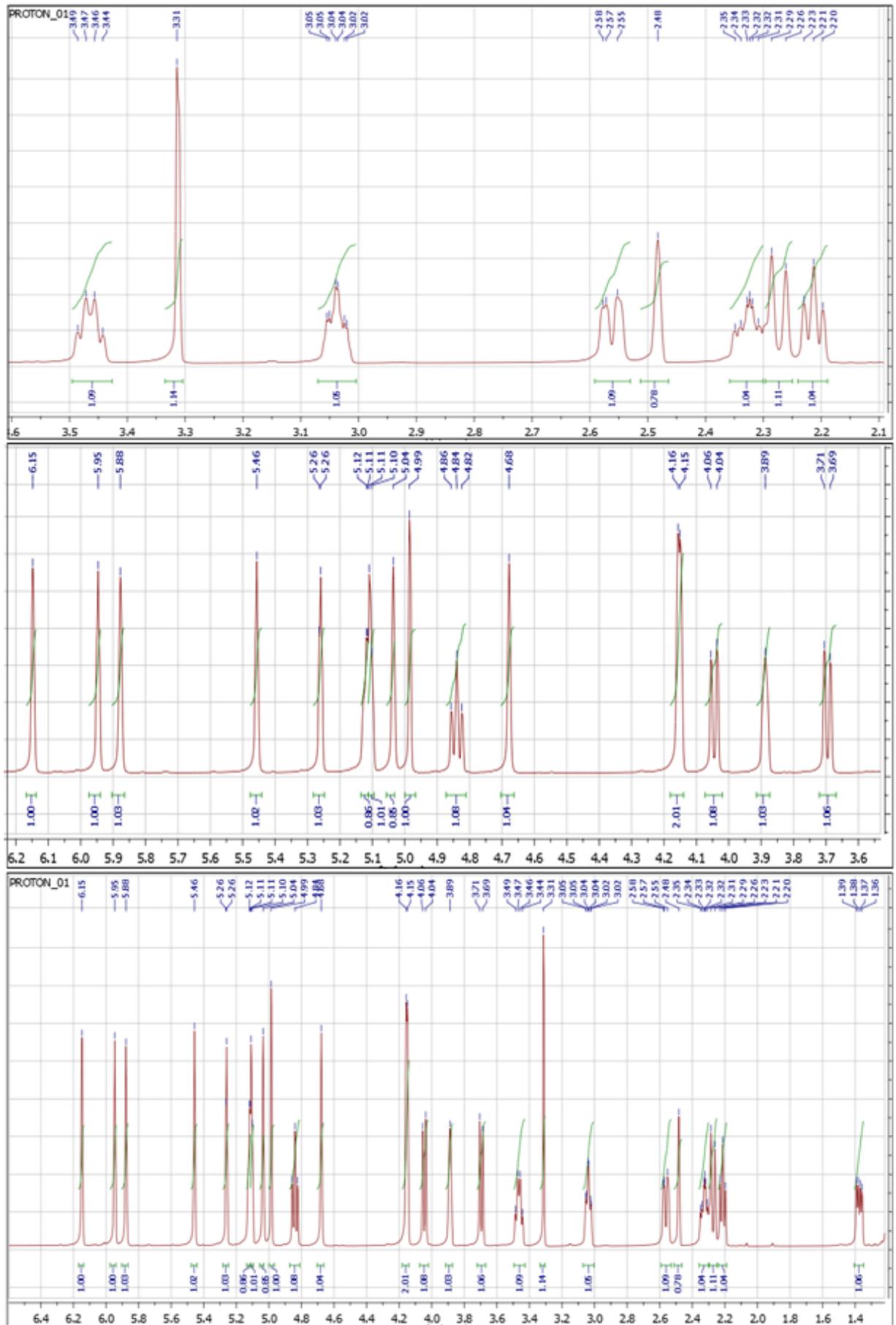


Figure IV.11: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz) du composé CP6.

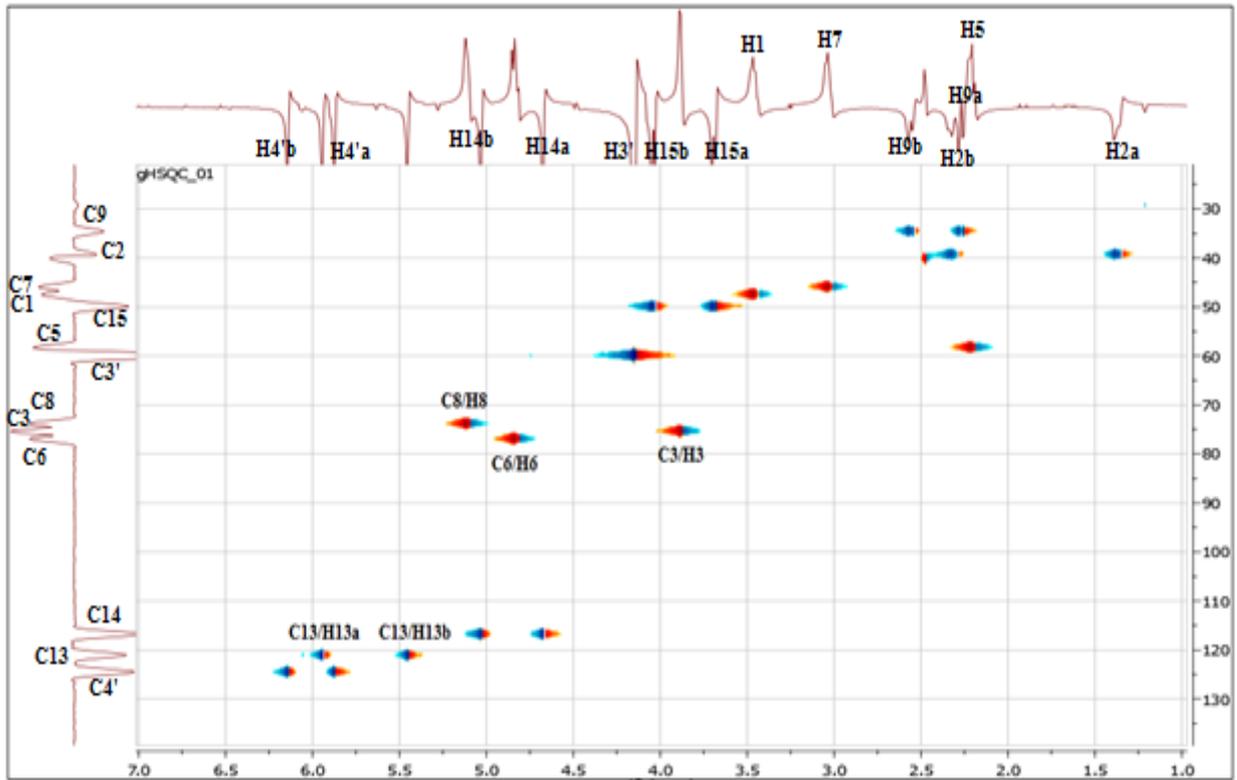


Figure IV.12: Spectre de HSQC du composé CP6.

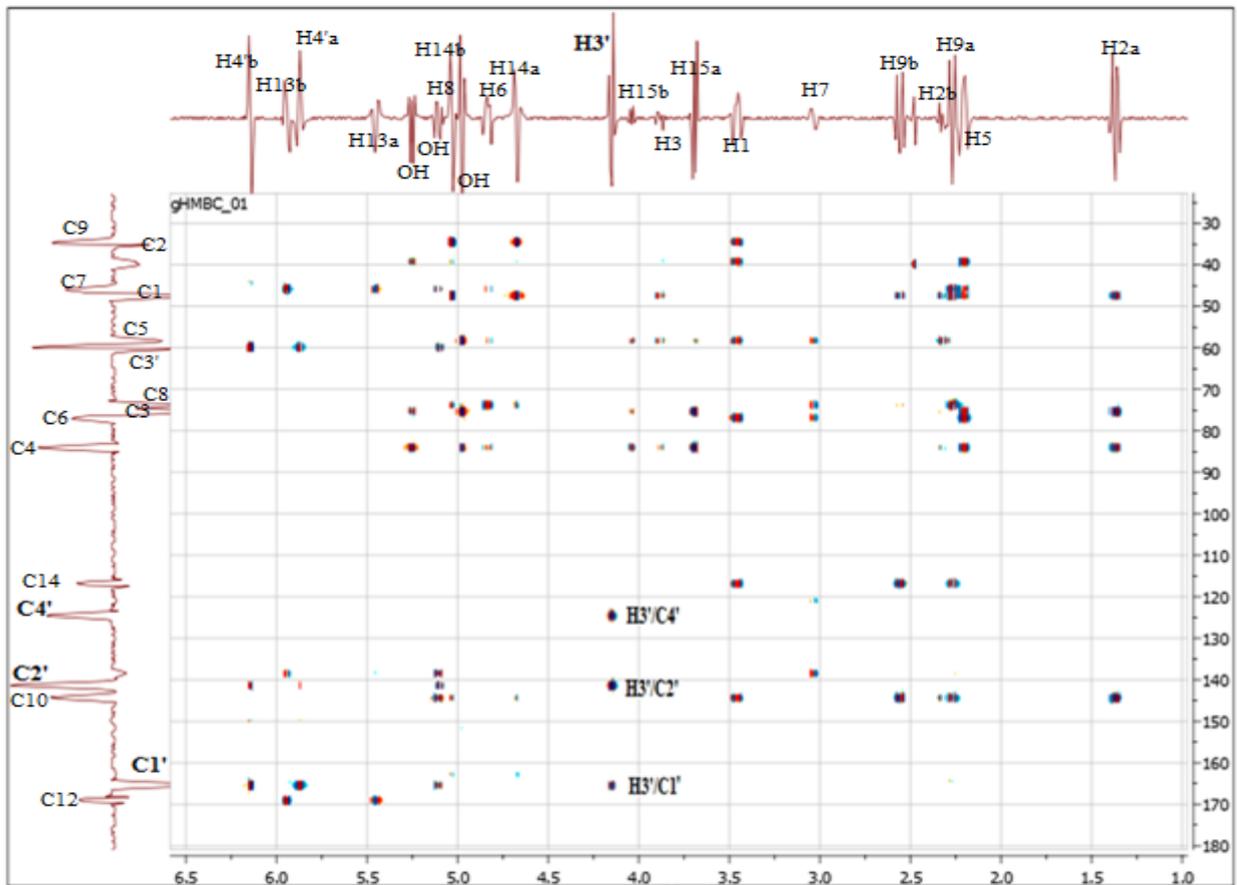


Figure IV.13: Spectre de HMBC du composé CP6

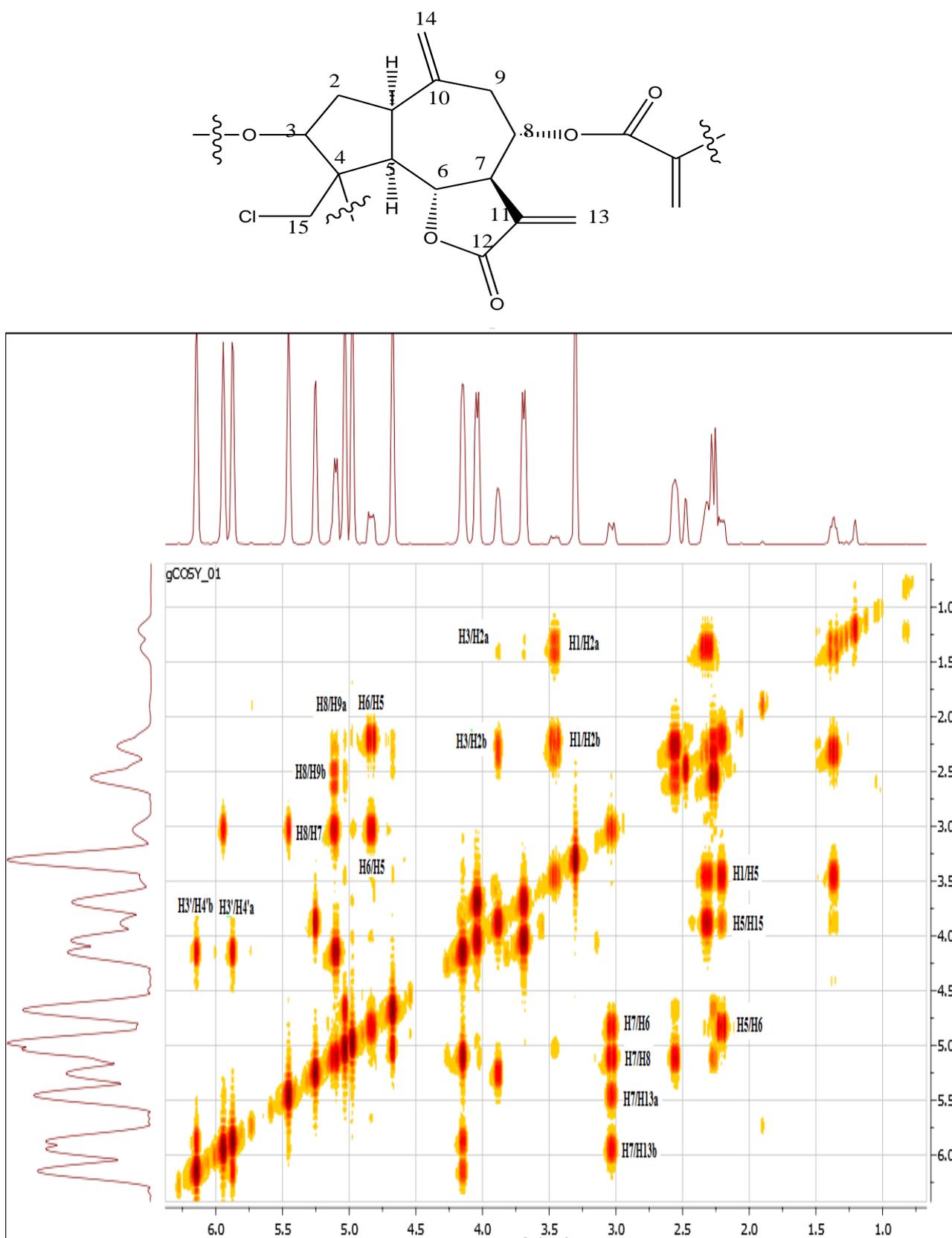
L'étude du spectre COSY (Figure IV.14) permet de faire les corrélations suivantes partant des deux protons H13b et H13a:

- ✓ les deux protons éthyléniques à  $\delta_{\text{H}}=5,46\text{ppm}$  (H13b) et  $5,95\text{ppm}$  (H13a) corrélient avec le proton à  $\delta_{\text{H}}= 3,04$  ppm qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un *td* ( $J=9,1$  ;  $3$  Hz) attribuable à H7 et montre une tache de corrélation, sur le spectre HSQC, avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}= 46,0$  ppm (C7). La grande valeur de la constante de couplage ( $J=9,1\text{Hz}$ ) indique des interactions *trans*-diaxiales entre H6/H7 et H7/H8.
- ✓ Ce H7 ( $\delta_{\text{H}}= 3,04$  ppm) montre deux taches de corrélation sur le spectre COSY, la première avec le proton à  $\delta_{\text{H}}=4,84\text{ppm}$  attribuable à H6 qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un *tl* ( $J=9,1$  Hz, confirmant son interaction avec H7) et corréliant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}=77,09$  ppm caractéristique de la fermeture du cycle lactonique [6], La valeur de la constante de couplage oriente vers une interaction 1, 2 diaxiales de ce noyau avec les protons voisins dont le H7, ceci permet de déduire une orientation  $\beta$  de H6 et  $\alpha$  de H7.
- ✓ Le proton H6 ( $\delta_{\text{H}}= 4,84\text{ppm}$ ), permet l'observation d'une tache de corrélation avec le signal à  $\delta_{\text{H}}=2,23$  ppm qui ne peut être que le H5 apparaît sur le spectre proton sous forme d'un *dd* ( $J=9,6$  ;  $8,4$  Hz) et corréliant sur le spectre HSQC avec le carbone C5 à  $\delta_{\text{C}}= 58,4$  ppm. Cette valeur de la constante de couplage montre une interaction 1,2 diaxiales indiquant une orientation  $\alpha$  de H5.
- ✓ Un retour au proton H7 on observe une deuxième tache apparaît avec le proton à  $\delta_{\text{H}}= 5,12$  ppm (multiplet) permet la localisation de H8 ( $\delta_{\text{C}}= 73,9$  ppm déduite du spectre HSQC). La valeur du déplacement chimique indique que ce carbone est estérifié. Vu la valeur de la constante de couplage du H7 ( $9,1$  Hz) prévoyant également un couplage 1,2 diaxiales entre H-7 et H-8 et menant par conséquent à une orientation  $\beta$  du H8.
- ✓ L'attribution de H8 ( $\delta_{\text{H}}= 5,12\text{ppm}$ ) est confirmée grâce aux deux taches de corrélation, la première avec le proton à  $\delta_{\text{H}}=2,29$  ppm qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un *d* ( $J=15$  Hz) et la seconde avec le proton à  $\delta_{\text{H}}= 2,58$  ppm, celui-ci apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet de doublet ( $J=15$  ;  $3$  Hz) attribuable à H9b et H9a respectivement et corréliant sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_{\text{C}}= 34,7$  ppm (C9).
- ✓ Ces mêmes protons (H9b et H9a) montrent deux petites taches de corrélation indiquant un couplage allylique avec les signaux à  $\delta_{\text{H}}=4,68$  ppm et  $\delta_{\text{H}}=5,04$  ppm qui ne peuvent

être que les deux protons (H14b et H14a) confirmant la présence de la deuxième double liaison exocyclique.

- ✓ Les protons (H14b et H14a) corrélient sur le spectre COSY avec le proton à  $\delta_{\text{H}}= 3,49$  ppm qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un *dd* ( $J=9,6 ; 8,4$  Hz) attribuable à H1 et montre une tache de corrélation, sur le spectre HSQC, avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}= 47,5$  ppm (C1).
- ✓ Le H1 montre une tache de corrélation avec le proton à  $\delta_{\text{H}}= 2,23$  ppm (*t*,  $J=9,7$  Hz) attribuable à H5. La valeur de la constante de couplage de H1 ( $J = 8,4$  Hz) caractéristique d'un couplage vicinal impose une orientation  $\alpha$  de H1. Cette situation est proposée au squelette de type guaianolide.
- ✓ En effet, ce H1 ( $\delta_{\text{H}}=3,49$  ppm) corrélie sur le spectre COSY avec deux protons, le premier à  $\delta_{\text{H}}=1,39$  ppm sous forme d'un *dd* ( $J= 14 ; 6,5$  Hz) attribuable à H2-b et le second à  $\delta_{\text{H}}=2,35$  ppm sous forme d'un multiplet attribuable à H2-a et corréliant sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_{\text{H}}=39,43$  ppm (C2).
- ✓ Ces deux protons mènent à leur tour à la présence d'un seul proton en C-3 résonnant à  $\delta_{\text{H}}= 3,89$  ppm sous forme d'un multiplet ( $J=10$  Hz). Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone ( $\delta_{\text{C}}= 75,4$ ) indiquent que cette position est oxygénée.
- ✓ Le H3 montre une tache de corrélation sur le spectre HMBC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}= 50$  ppm, et ce dernier corrélie sur le spectre HSQC avec deux protons à  $\delta_{\text{H}}= 4,06$  ppm (*dl*,  $J=11,2$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}= 3,71$  ppm (*dl*,  $J=11,2$  Hz) indiquant qu'il est sous forme d'un méthylène donc ne peut être que le C15 et ces deux protons ne peuvent être attribués qu'à H-15b et H-15a respectivement. Vu que le C4 ne peut être sous forme d'un méthylène car on est en présence d'un squelette guaianolide.
- ✓ Les protons H-15b et H-15a corrélient sur le spectre HMBC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}= 84,1$  ppm attribuable à C4.
- ✓ La valeur de la constante de couplage de ces deux protons H-15b et H-15a ( $J=11,2$  Hz) indique qu'ils sont geminés. Leur inéquivalence magnétique et leur multiplicité indiquent qu'ils sont portés par un carbone quaternaire asymétrique. Quant à leur déplacement chimique, il est en faveur de leur jonction à l'atome de chlore, d'où la présence du groupement Cl-CH<sub>2</sub>-\*Cq dans la molécule.

Toutes ces constatations mènent à la structure partielle suivante :



**Figure IV.14:** COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$  ; 600 MHz) du composé CP6

Un retour vers la formule brute impose une substitution du C quaternaire porteur du groupement  $\text{CH}_2\text{Cl}$  par un groupement hydroxyle, il en est de même pour la position C3 vu la

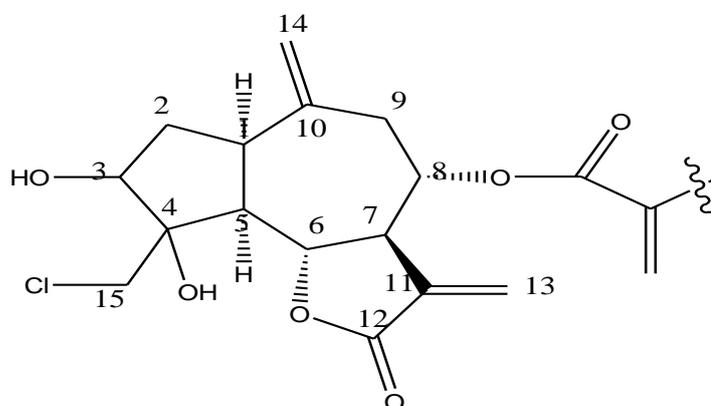
valeur du déplacement chimique du proton ( $\delta_{\text{H}} = 3,89$  ppm) et de son carbone (75,45 ppm) ce dernier ne peut être que oxygéné.

En effet, sur le spectre proton, on dénombre trois groupements OH à  $\delta_{\text{H}} = 4,99$ ,  $\delta_{\text{H}} = 5,11$  et  $\delta_{\text{H}} = 5,26$  ppm.

Une lecture attentive du spectre HMBC permet de localiser ces groupements grâce à leurs taches de corrélation:

- Le groupement OH à  $\delta_{\text{H}} = 4,99$  ppm avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 84,11$  ppm qui ne peut être que le carbone quaternaire C4.
- Le groupement OH à  $\delta_{\text{H}} = 5,26$  ppm avec son carbone C3 à  $\delta_{\text{C}} = 75,45$  ppm.

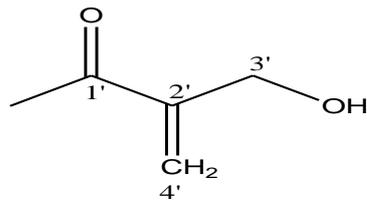
Ceci mène à la structure partielle plane suivante



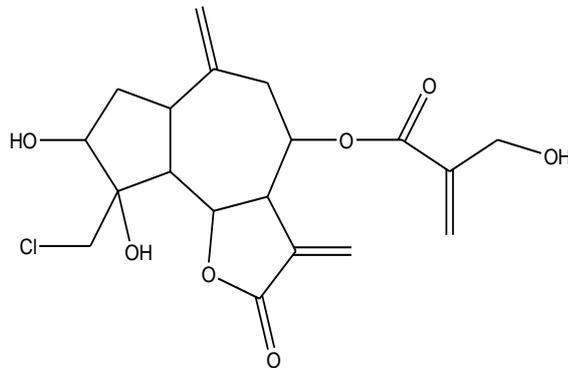
On observant la structure proposée, on remarque le manque de la troisième double liaison signalée au début de cette discussion. En effet, les deux signaux à  $\delta_{\text{H}} = 5,88$  et  $6,15$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 124,55$  ppm) corrélient sur le spectre HMBC avec deux carbones, le premier à  $\delta_{\text{C}} = 165,4$  ppm caractéristique du carbonyle de l'ester  $\alpha, \beta$ -insaturé et le deuxième à  $\delta_{\text{C}} = 141,4$  ppm qui ne peut être que le Cq porteur de la double liaison.

Un retour au spectre HMBC (Figure IV.13) permet de localiser le troisième groupement OH à  $\delta_{\text{H}} = 5,11$  ppm avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 141,4$  ppm qui n'est autre que le carbone quaternaire porteur de la double liaison d'une part et d'autre part avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 60,02$  ppm.

Ce dernier carbone ( $\delta_{\text{C}} = 60,02$  ppm) corréle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{\text{H}} = 4,16$  ppm, qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet ( $J = 4,1$  Hz) d'intégration 2H. Ceci indique clairement que ce CH<sub>2</sub> est lié d'une part au groupement OH et de l'autre part au Cq lié à son tour au carbone du carbonyle d'où l'entité suivante.

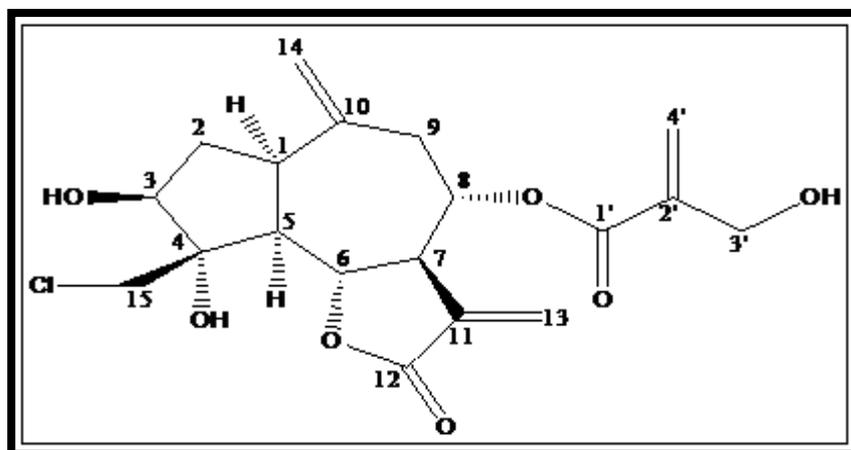


Cette entité est attachée au carbone C8 par un oxygène d'où la structure suivante.



Comme signalé précédemment, les protons H-8, H-6, H-7 montrent des interactions *trans* di-axiales, vu les valeurs des constantes de couplage. Comme H-6 admet une configuration  $\beta$ , le H-5 et le H-7 admettent une configuration  $\alpha$  et le H8 admet une configuration  $\beta$ .

L'ensemble de ces constatations nous mène à la structure du guaianolide chlorojanérine [4].



**Chlorojanérine**

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

A titre d'exemple, les guaianolides : chlorojanérine et 13-acétyl solstitialine A ont été identifiés comme des composants anti-ulcérogènes de l'extrait chloroformique des parties aériennes de *Centaurea solstitialis ssp. solstitialis* [5].

**Tableau IV.1:** Données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  du produit CP6.

Carbone	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Multiplicité	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplicité, $J$ (Hz)
1	47,59	CH	3,49	<i>dd</i> (9,6 ; 8,4 Hz)
2	39,43	CH <sub>2</sub>	2a: 1,39	<i>dd</i> (14 ; 6,5 Hz)
			2b: 2,35	<i>m</i>
3	75,45	CH	3,89	<i>t</i> (10 Hz)
4	84,11	C	-	-
5	58,40	CH	2,23	<i>t</i> (9,7 Hz)
6	77,09	CH	4,84	<i>tl</i> (9,1 ; 3 Hz)
7	46,03	CH	3,06	<i>td</i> (9,1 ; 3 Hz)
8	73,90	CH	5,12	<i>m</i>
9	34,73	CH <sub>2</sub>	9a: 2,29	<i>dd</i> (15 Hz)
			9b: 2,58	<i>d</i> (15 ; 3 Hz)
10	144,34	C	-	-
11	138,46	C	-	-
12	168,98	C	-	-
13	121,00	CH <sub>2</sub>	13a: 5,46	<i>sl</i>
			13b: 5,95	<i>sl</i>
14	116,84	CH <sub>2</sub>	14a: 4,68	<i>sl</i>
			14b: 5,04	<i>sl</i>
15	50,02	CH <sub>2</sub>	15a: 3,71	<i>d</i> (11,2 Hz)
			15b: 4,06	<i>d</i> (11,2 Hz)
1'	165,36	C	-	-
2'	141,36	C	-	-
3'	60,02	CH <sub>2</sub>	4,16	<i>d</i> (4,1 Hz)
4'	124,55	CH <sub>2</sub>	4'a: 5,88	<i>sl</i>
			4'b: 6,15	<i>sl</i>
OH	-	-	4,99	<i>sl</i>
OH	-	-	5,11	<i>sl</i>
OH	-	-	5,26	<i>sl</i>

#### IV.1.1.3 Détermination de la structure du composé CP7

Ce composé se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le mélange chloroforme/méthanol.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure IV.15) montre la présence de 35 atomes de carbone dans cette molécule et le spectre DEPT (Figure IV.16) permet de les répartir comme suit :

- 6 groupements CH<sub>3</sub>
- 12 groupements CH<sub>2</sub> dont un oxygéné à  $\delta$  61,5 ppm.
- 14 groupements CH dont un éthylénique à  $\delta$  121,6 ppm
- 3 carbones quaternaires dont un éthylénique à  $\delta$  140,89 ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des deux carbones éthyléniques, le premier correspondant à un CH à  $\delta_c=121,64$  ppm et le second à un atome de carbone quaternaire à  $\delta_c=140,89$  ppm sont caractéristiques des positions C-5 et C-6 d'un stérol et vu l'absence d'autres carbone éthylénique sur le spectre, cela suppose que ces deux atomes de carbone délimitent la même double liaison.

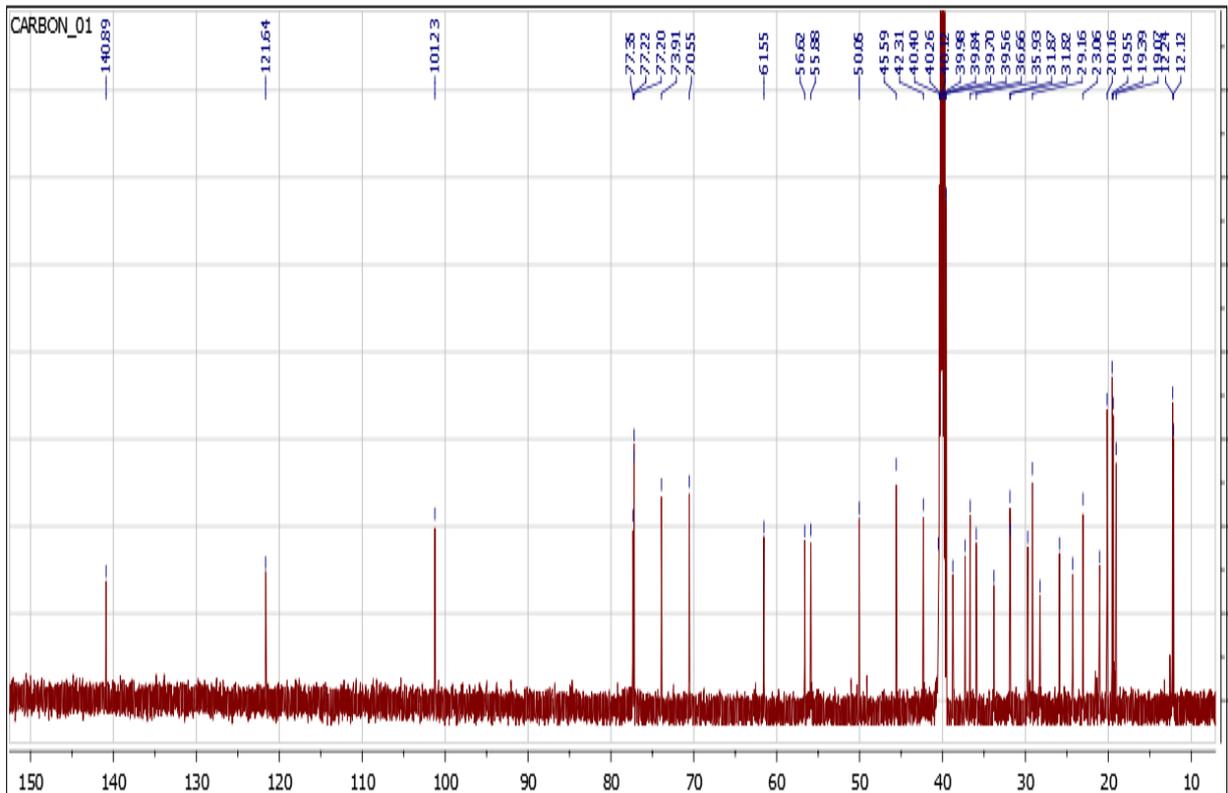


Figure IV.15: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP7

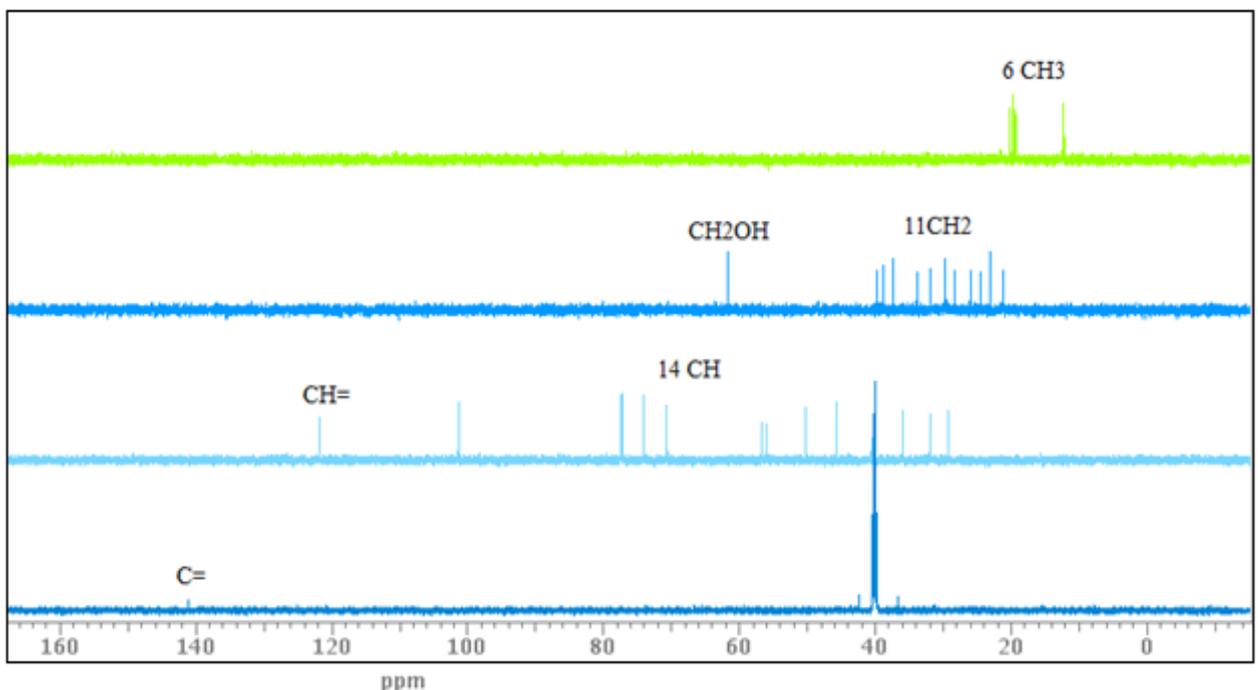


Figure IV.16: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP7

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.17) et les spectres étalés (Figure IV.18) enregistrés dans le DMSO montre :

- Des signaux résonant à champ fort entre  $\delta_{\text{H}} = 0,63\text{-}0,99$  ppm, confirmant la présence des groupements méthyles.
- Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5,31$  ppm indiquant la présence d'un proton éthylénique. Celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta$  121,64 ppm caractéristique du carbone C6 d'un stérol.
- Un signal sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,44$  ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxygéné typique du proton H3 d'un stérol. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta$  77,22 ppm sur le spectre HSQC.

Ces observations confirment la nature stéroïdienne de ce composé.

- En outre, l'observation d'un ensemble de signaux entre  $\delta_{\text{H}} = 2,87$  et 4 ppm et d'un signal sous forme d'un doublet ( $J = 7,6\text{Hz}$ ) d'intégration 1H localisé à  $\delta_{\text{H}} = 4,20$  ppm suggère l'existence d'une unité osidique dans la molécule.

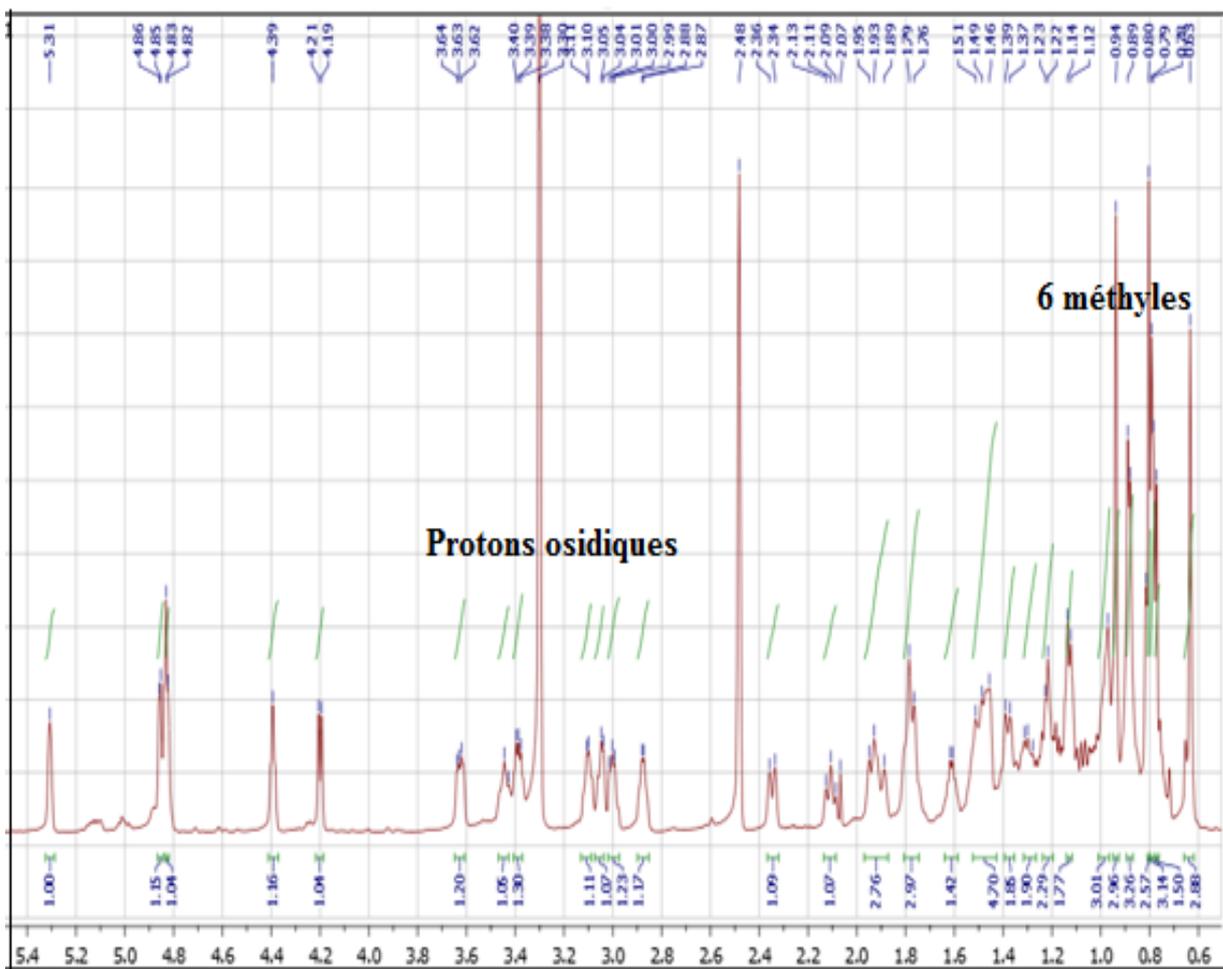
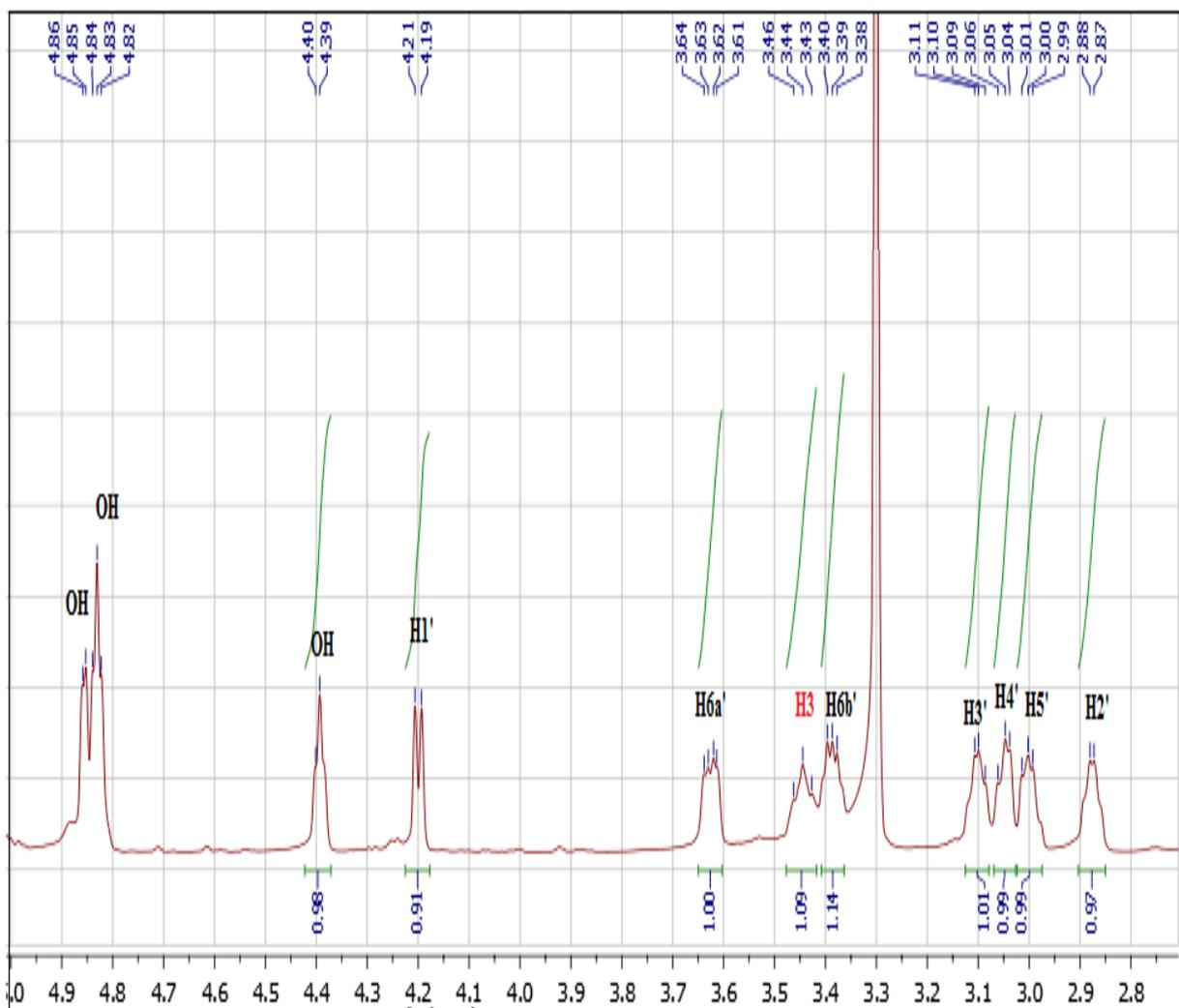


Figure IV.17: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP7



**Figure IV.18:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP7 étalé de la partie du sucre

Le spectre de l'expérience COSY H-H (Figure IV.19) permet l'identification de l'unité osidique.

A partir du proton anomère repéré à  $\delta_{\text{H}}=4,20$  ppm, on relie sept protons d'un hexose H-2' (2,87 ppm, *dd* (7; 4,2 Hz)), H-3' (3,11 ppm, *dl* (7 Hz)), H-4' (3,05 ppm, *m*), H-5' (3,00 ppm, *m*) et H-6' ((3,63 H-6'a et 3,39 H-6'b), *dd* (5,4 ; 10,8 Hz)).

Les grandes valeurs des constantes de couplage ( $J > 7$ ) montrent que ces protons sont axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  comme l'indique la valeur de la constante de couplage  $J_{1'-2'} = 7,6$  Hz.

L'expérience HSQC (Figure IV.20 et IV.21) permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose à  $\delta_c=101,23$  (C-1'), 73,91(C-2'), 77,36(C-3'), 70,55 (C-4'), 77,20 (C-5'), 61,55(C-6').

En plus sur les mêmes spectres de RMN de  $^1\text{H}$  et COSY H-H, on peut identifier les OH de l'unité osidique.

OH-3' (4,85ppm *d* (3,4 Hz)), OH-4' (4,82ppm *d* (5,4 Hz)), OH-5' (4,83ppm *d* (4,8 Hz)) et OH-2' (4,4ppm, *d* (4,8 Hz))

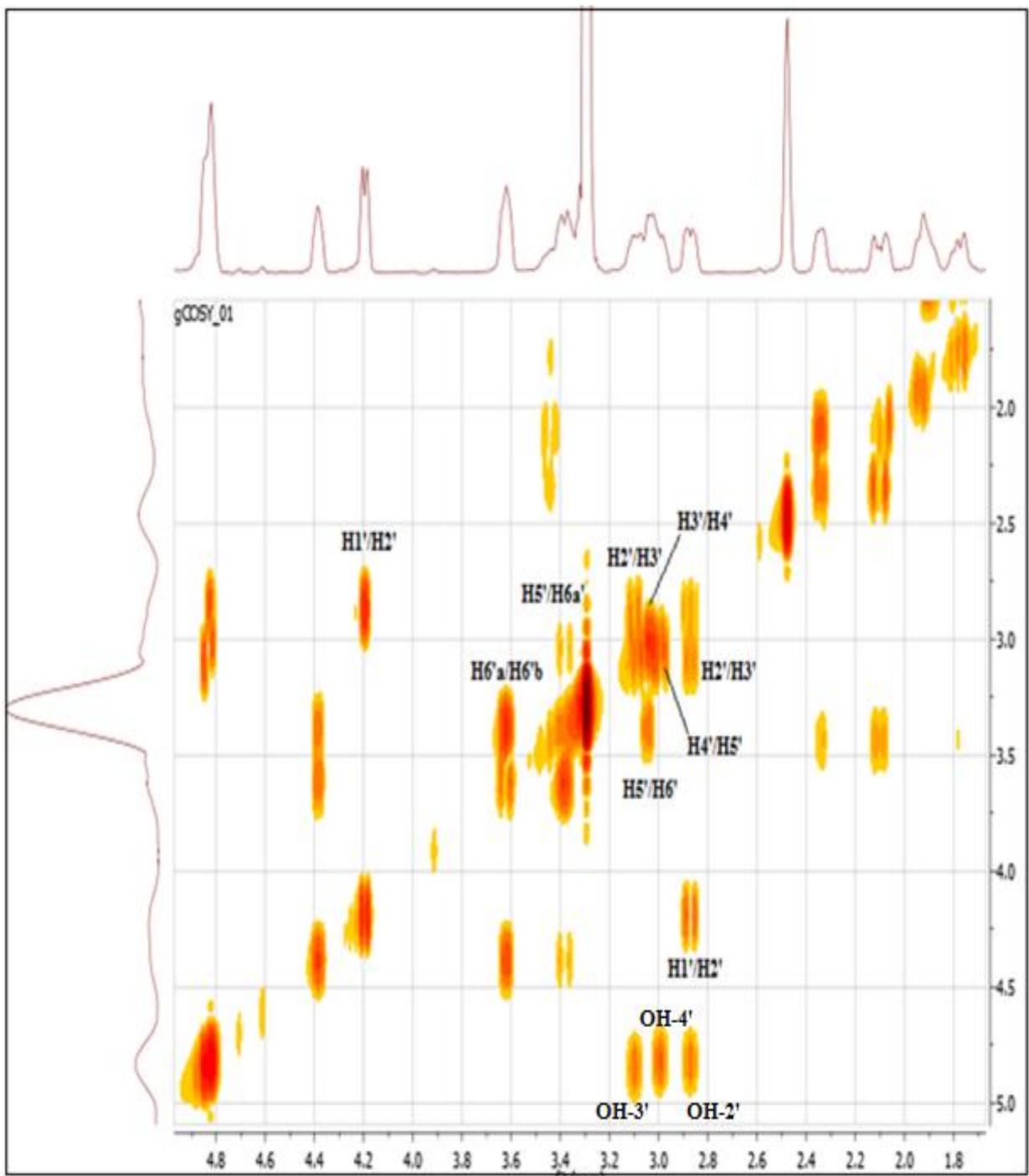


Figure IV.19: Spectre COSY de la partie glucose du composé CP7

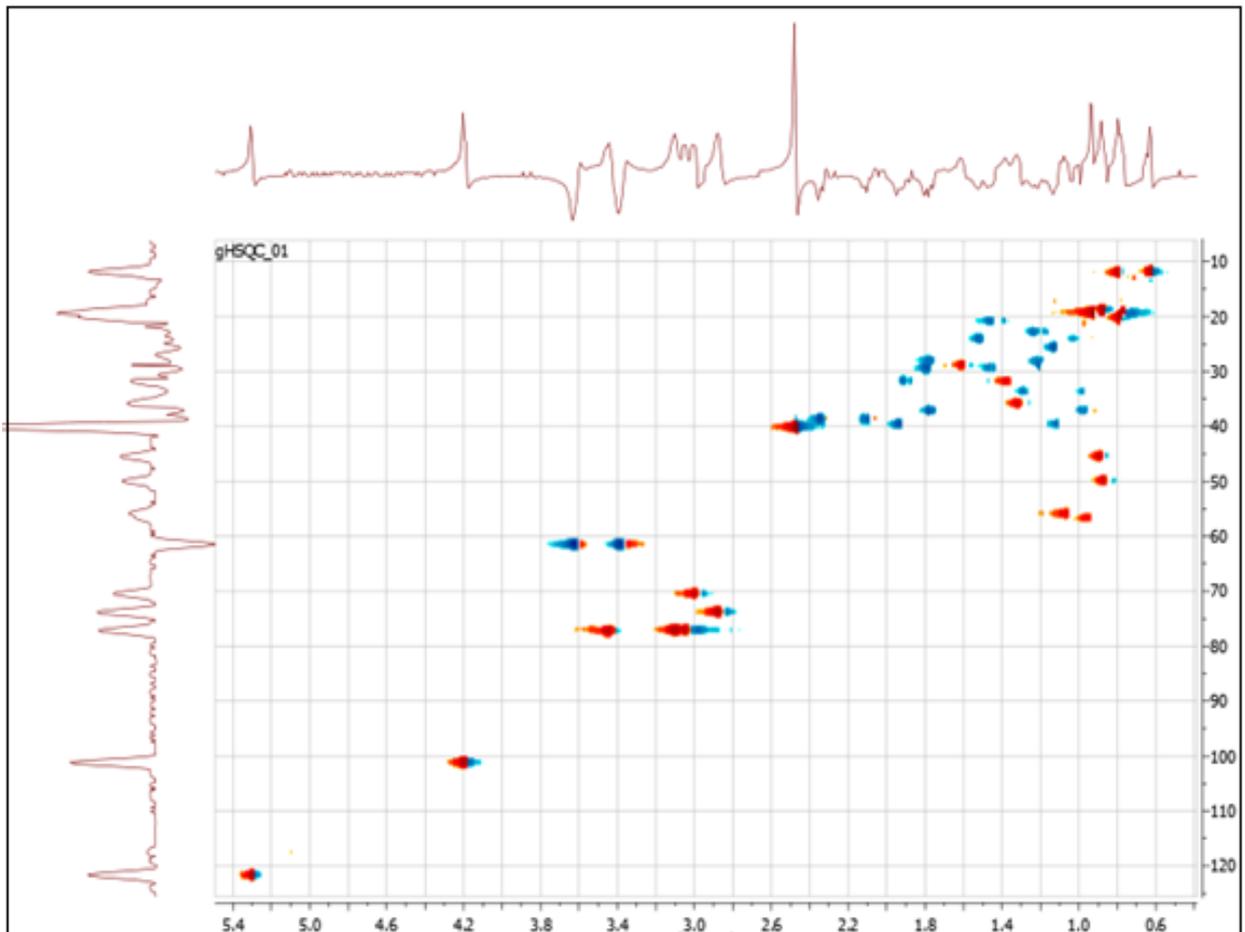


Figure IV.20: Spectre HSQC du composé CP7

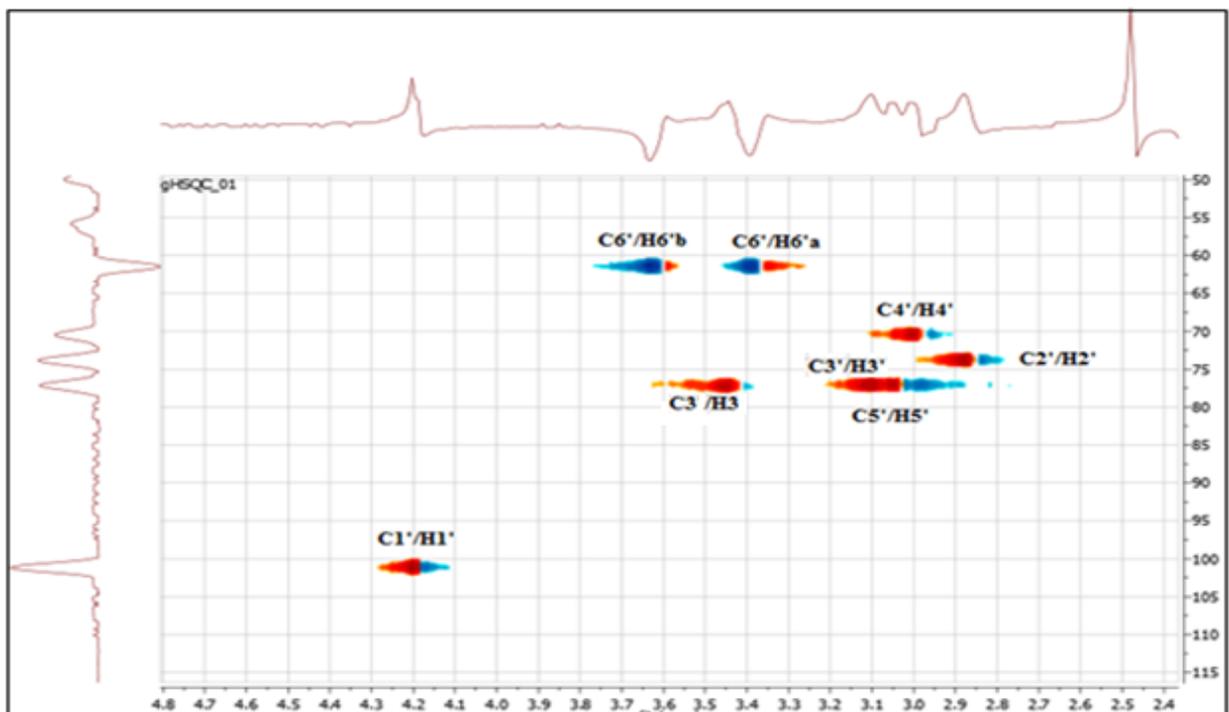


Figure IV.21: Spectre HSQC du composé CP7 de la partie du sucre.

La corrélation  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (figure IV.22) entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3, montre que ce sucre est attaché en position C-3.

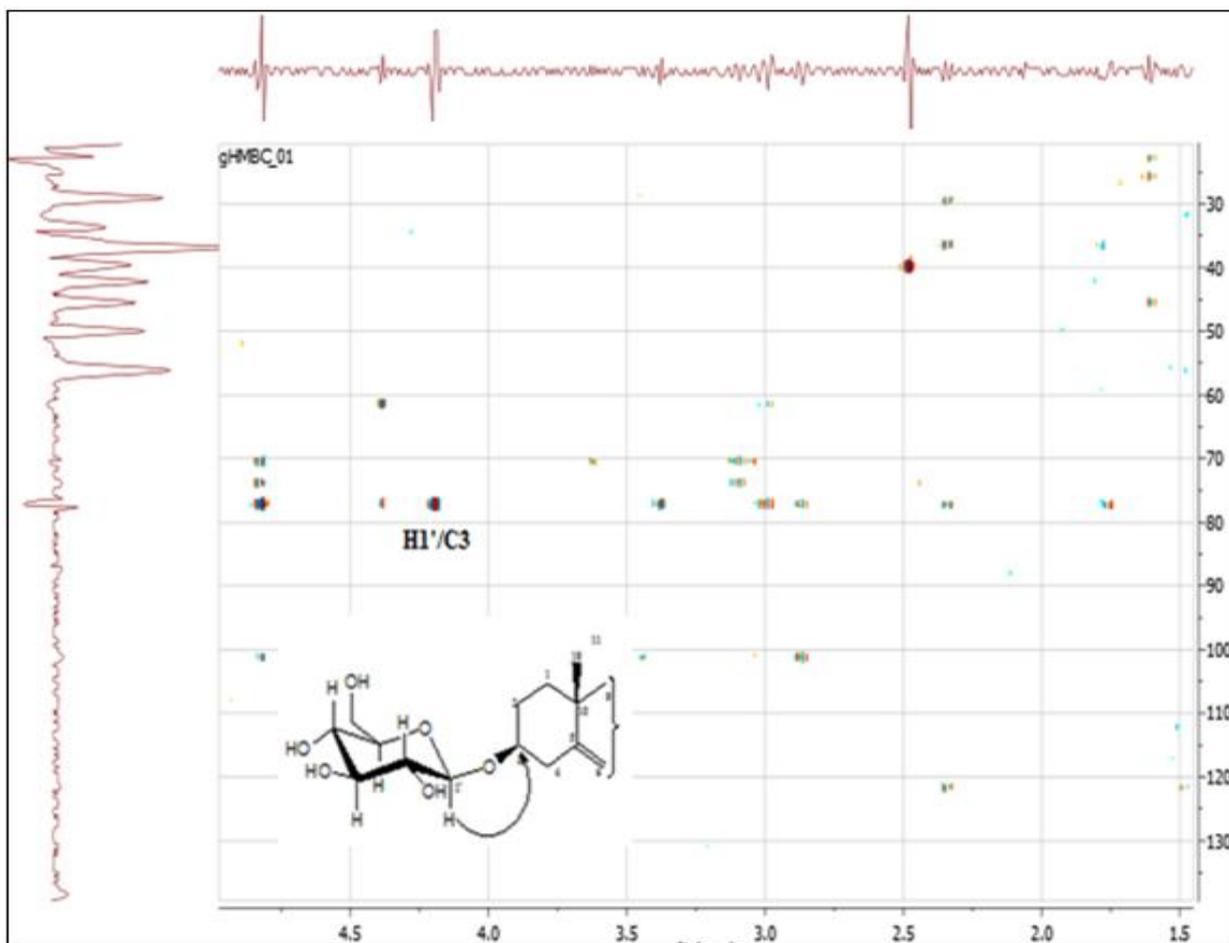
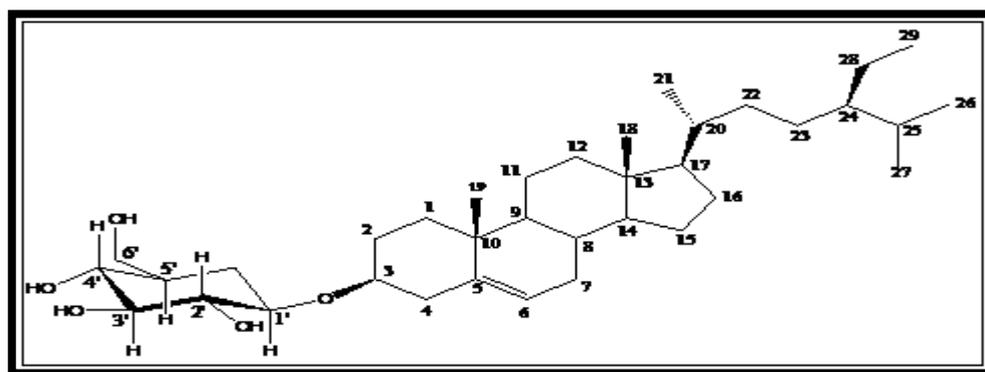


Figure IV.22: Spectre HMBC du composé CP7

Tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (Tableau IV. 2) déterminés conjointement par les expériences COSY H-H, HSQC (Figure IV.20 et IV.21), HMBC (figure IV.23) et par comparaison avec les données de la littérature [6], ont permis d'identifier le composé CP7 comme étant le **3-O-β-glucopyranosyl β-Sitostérol**, connu sous le nom **Daucostérol** représenté ci-dessous.



3-O-β-glucopyranosyl β-Sitostérol (Daucostérol)

Le **daucostérol** est commun à toutes les plantes. Il a été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Centaurea*. On citera à titre d'exemple *Centaurea africana* [7] et *Centaurea omphalotricha* [8]. Ce composé possède des activités biologiques intéressantes : anti-inflammatoire, anti-pyrétique, anti-néoplasique [9] et anti-mutagénique [10].

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé CP7 sont représentées dans le tableau IV.2

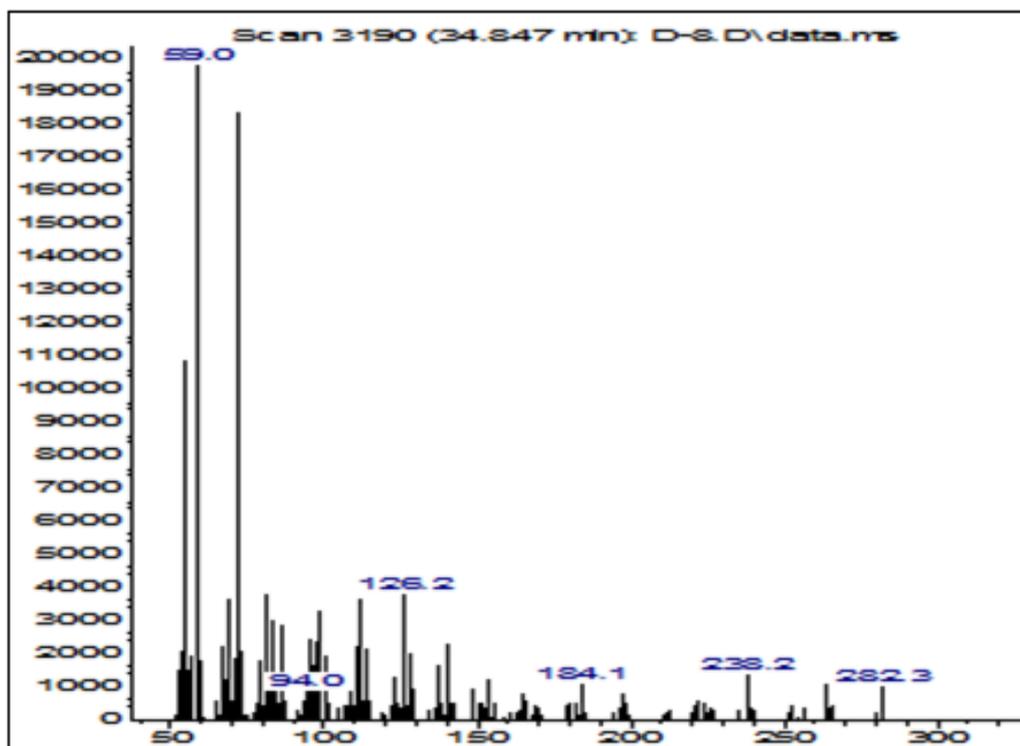
**Tableau IV.2:** Données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  du produit CP7.

Position	DEPT	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm)
1	CH <sub>2</sub>	37,28	1,76
2	CH <sub>2</sub>	31,82	1,88
3	CH	77,22	3,43
4	CH <sub>2</sub>	38,76	2,35
5	C	140,89	-
6	CH	121,64	5,31
7	CH <sub>2</sub>	28,24	1,19
8	CH	31,87	1,39
9	CH	50,05	0,85
10	C	36,66	-
11	CH <sub>2</sub>	21,05	1,45
12	CH <sub>2</sub>	40,05	1,93
13	C	42,30	-
14	CH	56,62	0,96
15	CH <sub>2</sub>	24,31	1,07
16	CH <sub>2</sub>	29,72	1,44
17	CH	55,88	1,05
18	CH <sub>3</sub>	12,24	0,80
19	CH <sub>3</sub>	19,55	0,94
20	CH	35,93	1,30
21	CH <sub>3</sub>	19,39	0,88
22	CH <sub>2</sub>	33,80	1,24
23	CH <sub>2</sub>	25,89	1,17
24	CH	45,49	0,80
25	CH	29,16	1,22
26	CH <sub>3</sub>	20,17	0,79
27	CH <sub>3</sub>	19,07	0,89
28	CH <sub>2</sub>	23,06	1,23
29	CH <sub>3</sub>	12,13	0,63
<b>Glucose</b>			
1'	CH	101,23	4,20
2'	CH	73,91	2,87
3'	CH	77,36	3,11
4'	CH	70,55	3,05
5'	CH	77,20	3,00
6'	CH <sub>2</sub>	61,55	3,63 - 3,39
OH-2'	-	-	4,4
OH-3'	-	-	4,85
OH-4'	-	-	4,82
OH-5'	-	-	4,84

#### IV.1.1.4 Détermination de la structure du composé CP8

Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV, sa couleur après révélation avec l'anisaldéhyde est violette.

Le spectre de masse obtenu par GC/MS (figure IV.23) de ce composé, enregistré en mode impact électronique (IE) présente un pic de l'ion moléculaire à  $m/z=282,3$  suggérant la formule brute  $C_{18}H_{34}O_2$  et indiquant la présence de deux insaturations, ce qui pourrait présager une longue chaîne avec une fonction acide ou ester.



**Figure 23:** Spectre de masse du composé CP8

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  (Figure IV.24) et les séquences DEPT (Figure IV.25) montre la présence d'un groupement  $CH_3$  à 13.44ppm qui a été attribué au méthyle qui représente le carbone C-18 grâce à la corrélation observée sur le spectre de l'expérience HSQC. Un autre carbone quaternaire résonant à  $\delta_c = 173,76$  ppm a été attribué au carbonyle de la fonction acide.

Les séquences DEPT montre la présence d'un groupement CH éthylénique à 129,67 ppm.

Les signaux apparaissant entre  $\delta_c = 29,48$  et 26,88 ppm ont été attribués aux carbones secondaires ( $CH_2$ ) de la chaîne carbonée saturée.

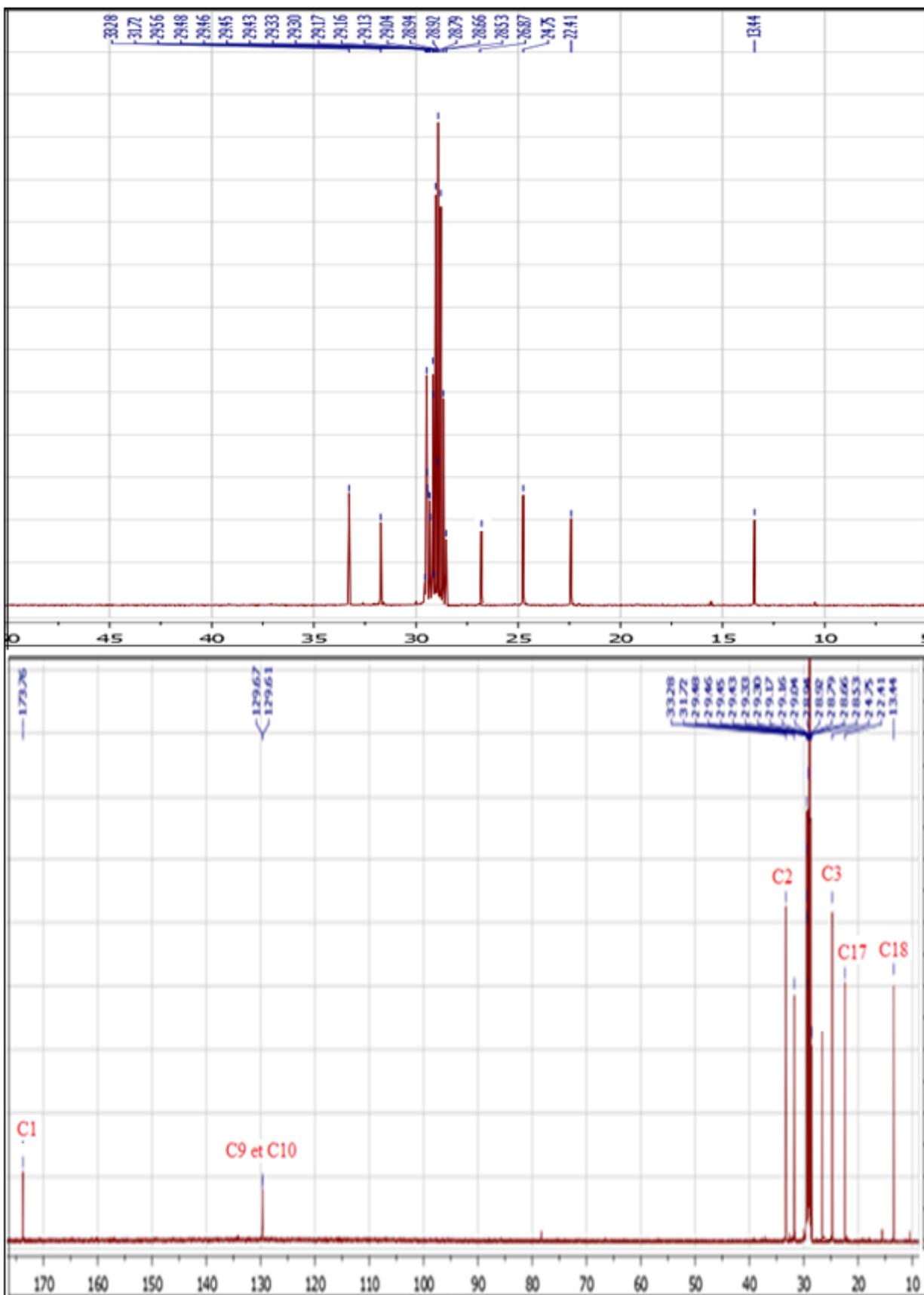
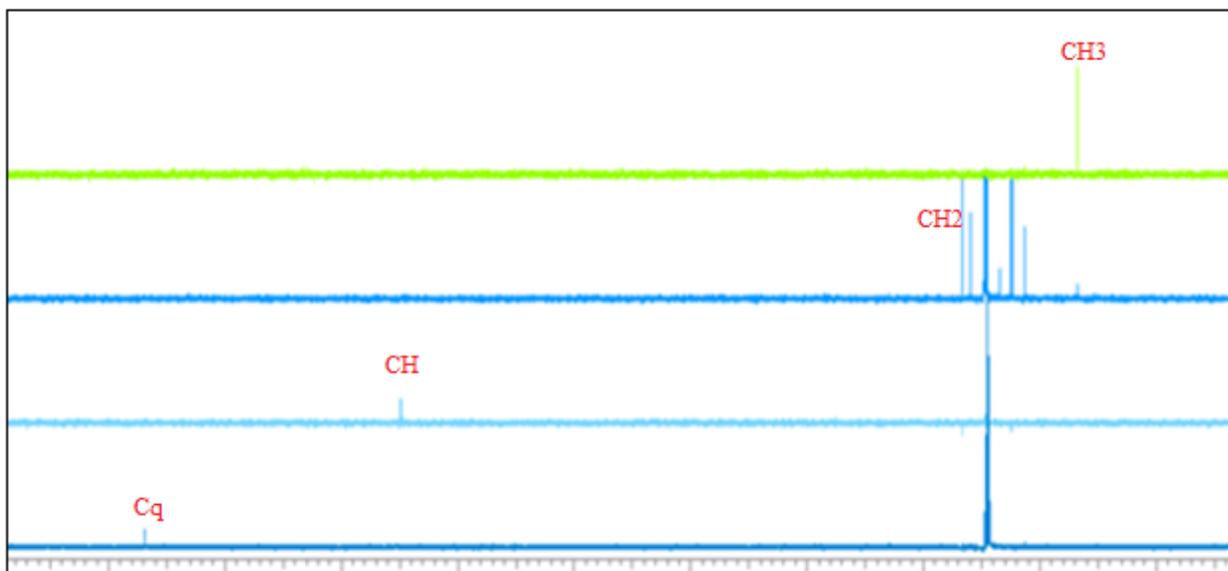


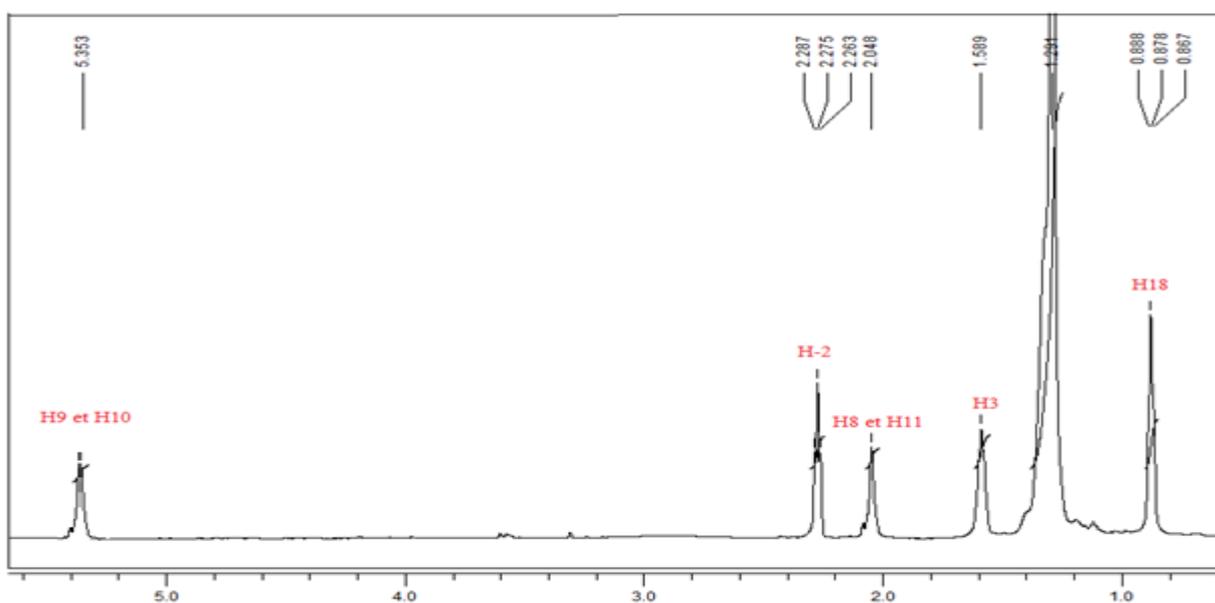
Figure IV.24: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone  $d_6$ ) du produit CP8



**Figure IV.25:** Spectre de DEPT (150 MHz, acétone  $d_6$ ) du produit CP8

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.26) et le spectre HSQC (Figure IV.27) du composé CP8 permet d'observer

- ✓ Le groupe méthyle de la fin de la chaîne est observé sous forme de triplet ( $J = 6,5$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 0,87$  ppm (H-18).
- ✓ Un triplet ( $J = 7$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 2,27$  ppm d'intégration 2H correspondant aux deux protons du groupement  $\text{CH}_2$  en position alpha de la fonction acide (H-2).
- ✓ Un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 1,59$  ppm d'intégration 2H correspondant aux protons du groupement  $\text{CH}_2$  en position bêta de la fonction acide (H-3).
- ✓ Un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 2,04$  ppm correspondant aux protons (H-8 et H11).
- ✓ Un signal à 5,35 ppm caractéristique d'un proton H-9 et H-10.



**Figure IV.26:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (150 MHz, acétone  $d_6$ ) du produit CP8

L'expérience HSQC (Figure IV.27) montre clairement les corrélations attendues entre:

- Le proton méthylique H-18 et son carbone C-18 à  $\delta_C = 13,44$  ppm
- Le proton H-17 et son carbone à  $\delta_C = 22,41$  ppm
- Le proton oléfinique H-9 et H-10 leur carbone à  $\delta_C = 129,67$  ppm
- Le proton H-8 et son carbone à  $\delta_C = 26,87$  ppm
- Le proton H-7 et son carbone à  $\delta_C = 28,53$  ppm
- Le proton H-4 et son carbone à  $\delta_C = 28,53$  ppm
- Le proton H-3 et son carbone à  $\delta_C = 24,75$  ppm
- Le proton H-2 et son carbone à  $\delta_C = 33,28$  ppm

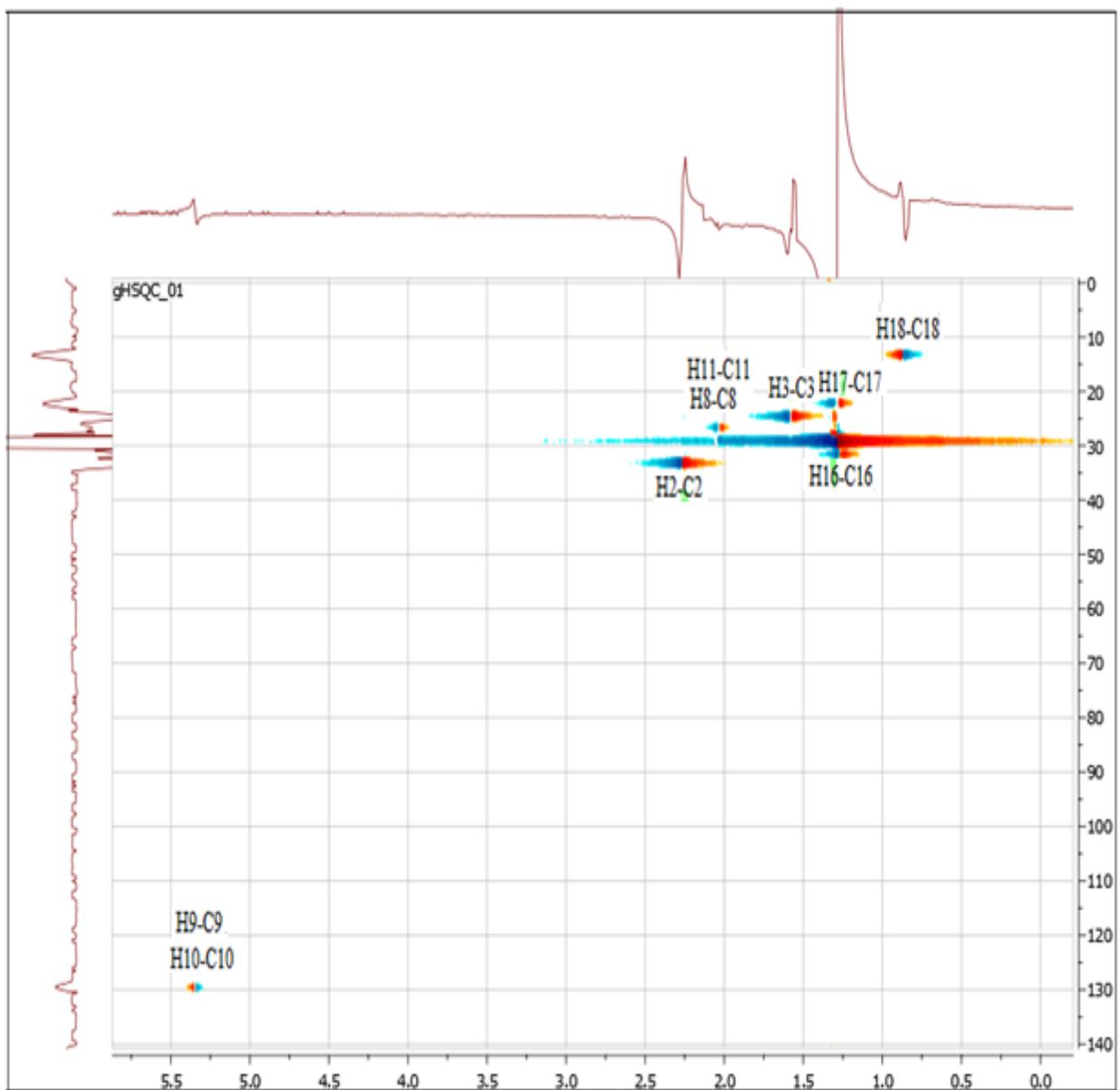


Figure IV.27: Spectre de HSQC du produit CP8

**Tableau IV.3.** Données du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit CP8

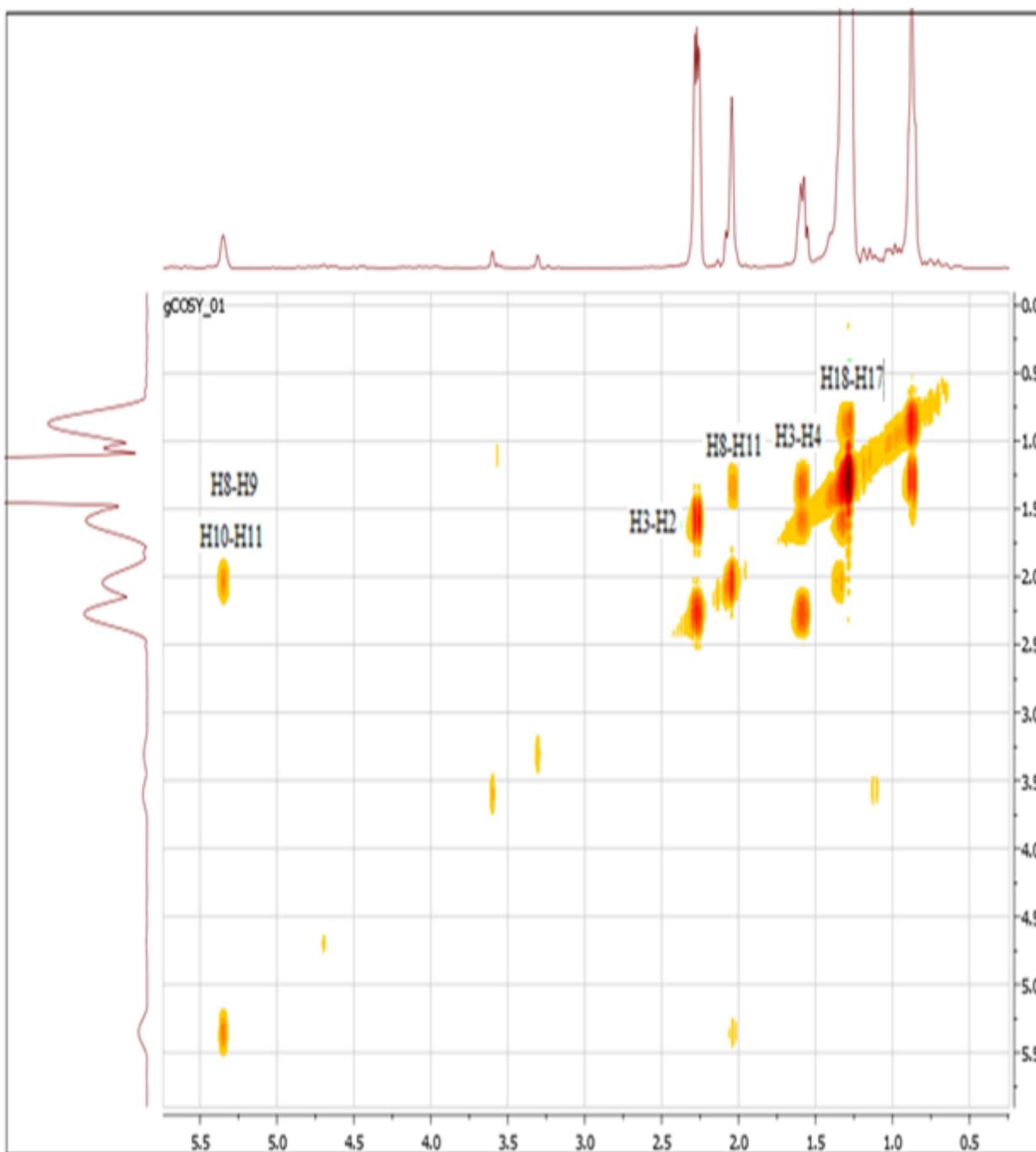
$\delta$ (ppm), m, J (Hz)	Intégration	Attribution
2,27; t; 7,3	2H	H-2
1,59; m	2H	H-3
5,35; m	2H	H-9 et H-10
1,30-1,33; m	20H	H-4 à H7 et H-12 à H-17
2,06	4H	H-8 à H11
0,87; t; 6,5	3H	H-18

**Tableau IV.4:** Données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP8

$\delta$ (ppm)	interprétation
C-1	173,76
C-2	33,28
C-3	24,75
C-8 et C-11	26,87
C-9 et C-10	129,67
C-4 au C-7	28,53
C-12 au C-15	29,04
C-16	31,72
C-17	22,41
C-18	13,44

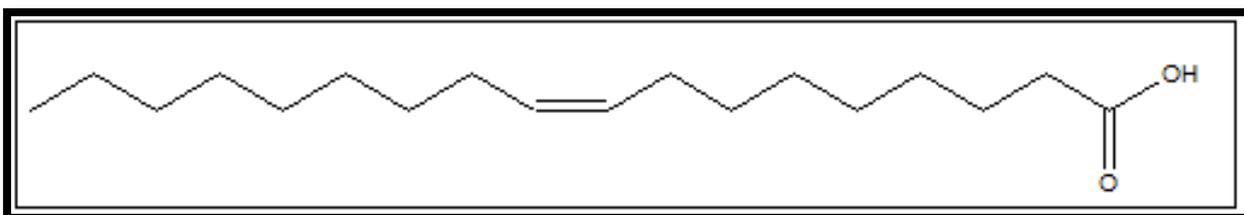
L'expérience COSY H-H (figure IV.28) montre clairement les corrélations attendues entre:

- Le proton H-3 à  $\delta_{\text{H}} = 1,59\text{ppm}$  et le proton H-2 résonnant  $\delta_{\text{H}} = 2,27\text{ ppm}$ .
- Le proton H-3 à  $\delta_{\text{H}} = 1,59\text{ppm}$  et le proton H-4 résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 1,30\text{ ppm}$
- Le proton H-8 à  $\delta_{\text{H}} = 2,06\text{ppm}$  et le proton H-7 résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 1,25\text{ ppm}$
- Le proton H-8 à  $\delta_{\text{H}} = 2,06\text{ppm}$  et le proton H-9 résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 5,35\text{ ppm}$
- Le proton H-18  $\delta_{\text{H}} = 0,88\text{ppm}$  et le proton H-17 résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 1,33\text{ ppm}$



**Figure IV.28:** Spectre de COSY du produit CP8

Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé CP8: Acide (9Z) octadec-9-énoïque [11].

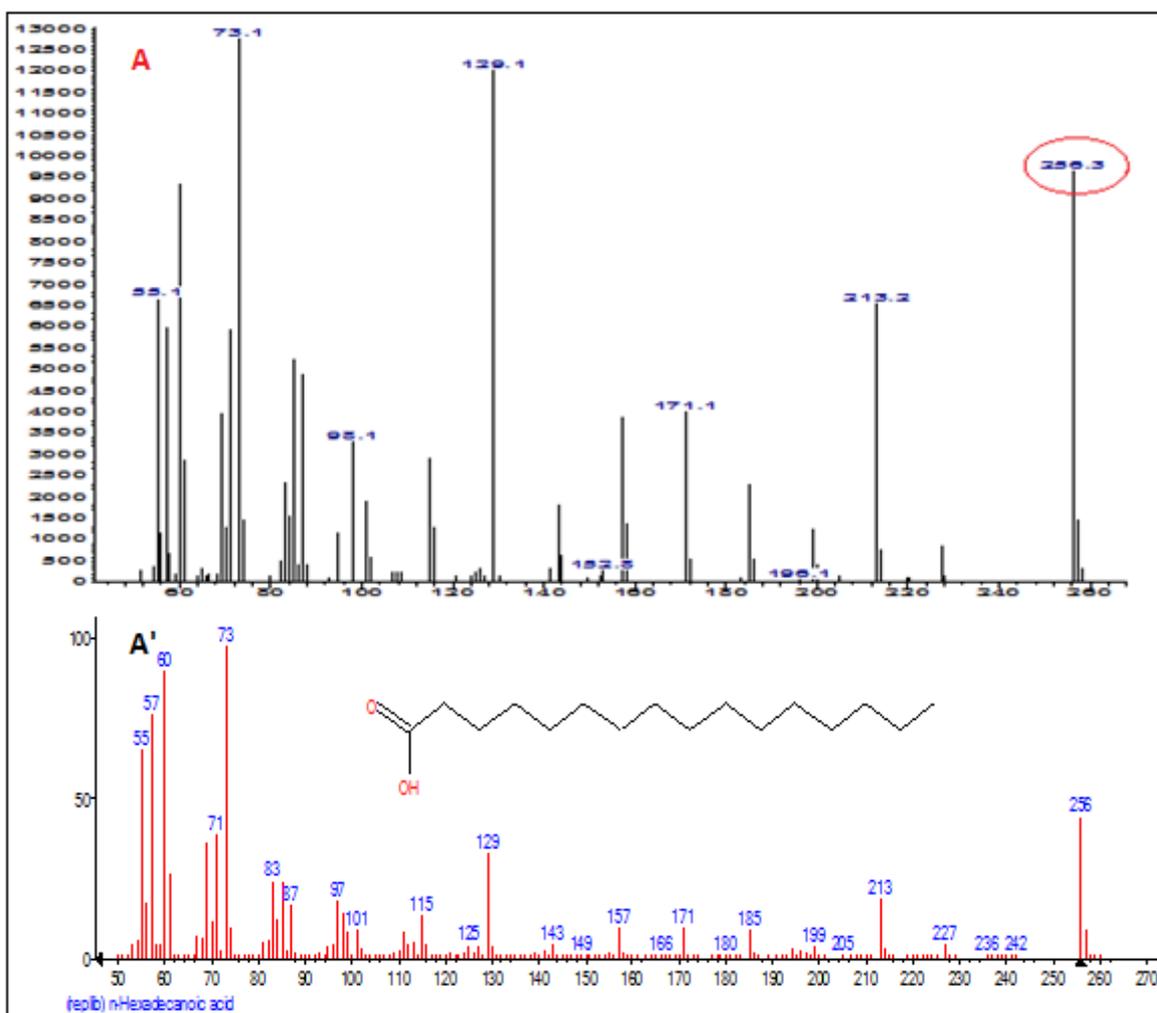


**Acide (9Z) octadec-9-énoïque**

#### IV.1.1.5. Détermination de la structure du composé CP9

Le composé CP9 se présente sous forme de poudre blanche, soluble dans le chloroforme, et a été identifié par GC/MS. La GC/MS de ce composé (Figure IV.29) a permis d'observer un pic moléculaire à  $m/z = 256,3$  suggérant la formule brute  $C_{16}H_{32}O_2$ , indiquant la présence d'une insaturation, ce qui pourrait présager une longue chaîne avec une fonction acide ou ester.

Le composé a été identifié par GC/MS comme étant **l'acide hexadécanoïque**.



**Figure IV.29. A.** Fragmentation GC/MS du composé CP9.

**A'.** Fragmentation GC/MS du témoin acide hexadécanoïque.

Le spectre RMN  $^{13}C$  (Figure IV.30) et les séquences DEPT (Figure IV.31) permettent de recenser: un groupement  $CH_3$ , 14 groupements  $CH_2$  et un groupement  $Cq$  confirmant ainsi la présence de 16 atomes de carbone.

Le spectre HSQC (Figure IV.32) a permis de corréler les protons aux carbones correspondants. L'analyse approfondie du spectre RMN  $^{13}C$  montre la présence d'un groupement  $CH_3$  à 14.11 ppm qui a été attribué au méthyle qui représente le carbone C-16 grâce au corrélation observée sur le spectre de l'expérience HSQC. Un autre carbone quaternaire résonant à  $\delta_c = 180,04$  ppm a

été attribué au carbonyle de la fonction acide. Les signaux apparaissant entre  $\delta_c = 29,67$  et  $29,04$  ppm ont été attribués aux carbones secondaires ( $\text{CH}_2$ ) de la chaîne carbonée saturée.

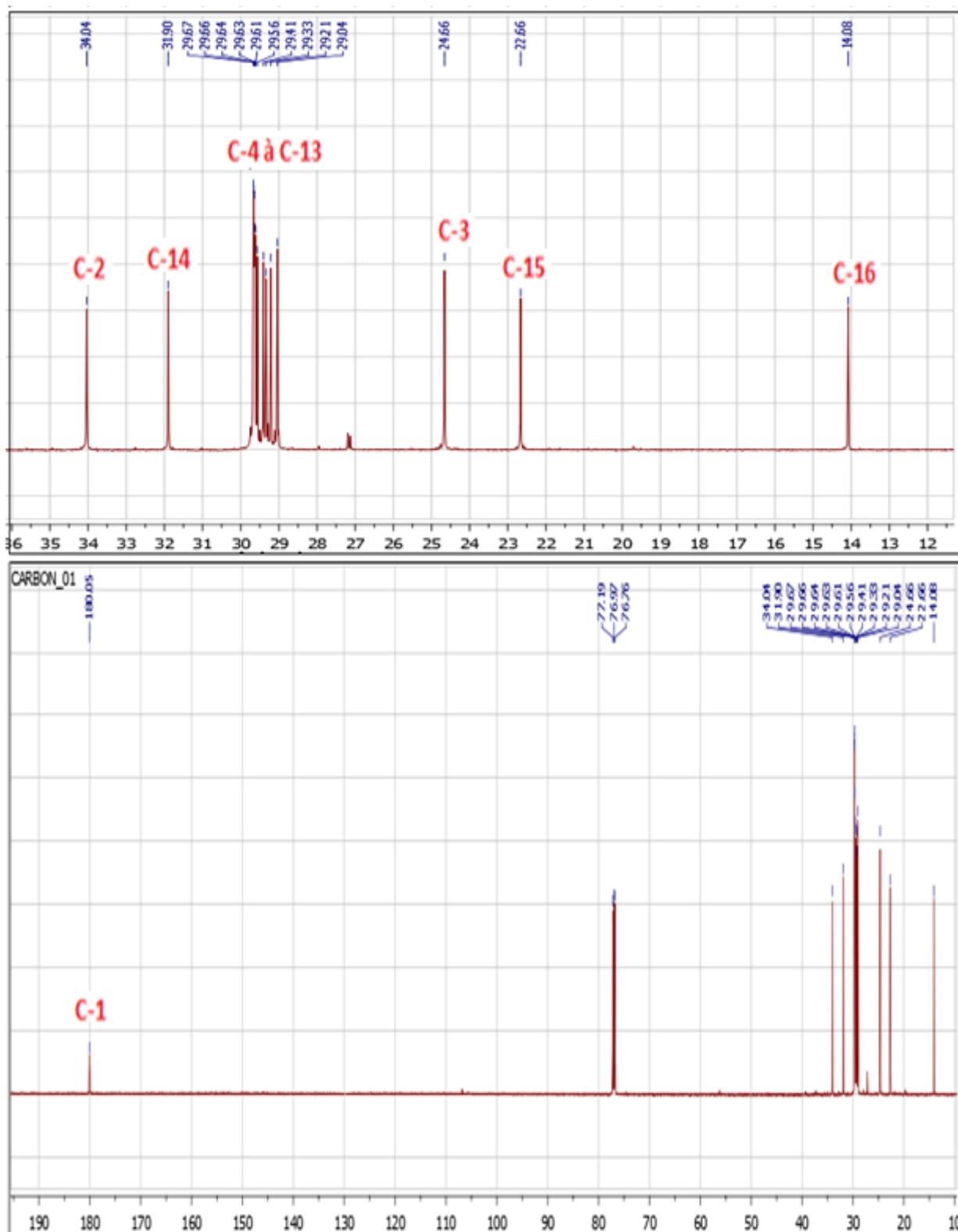
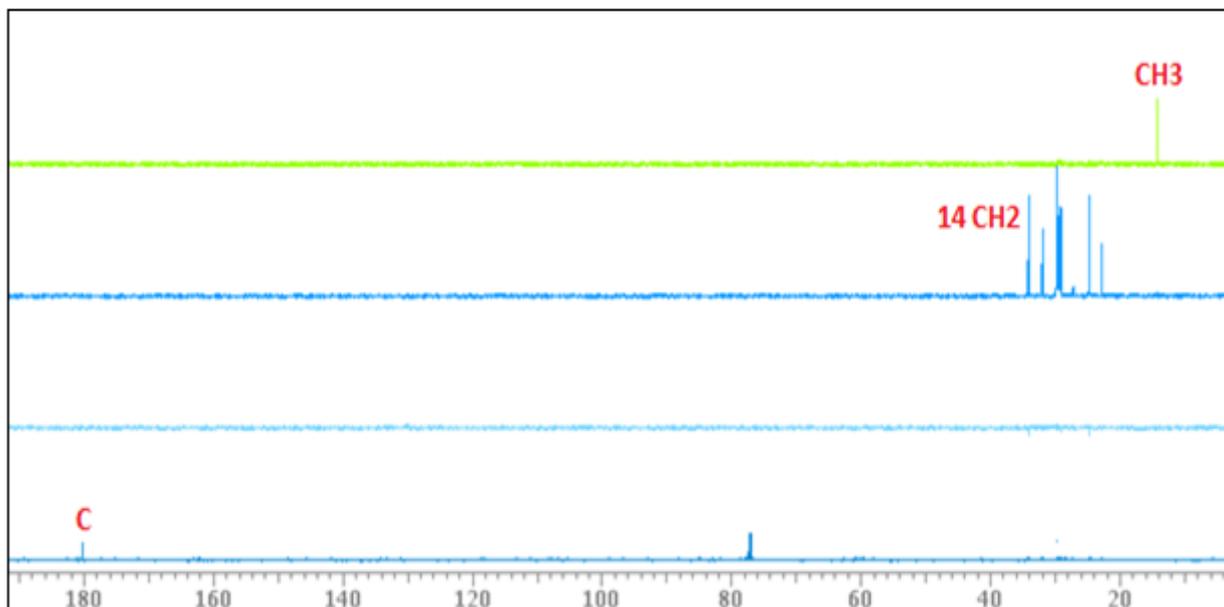
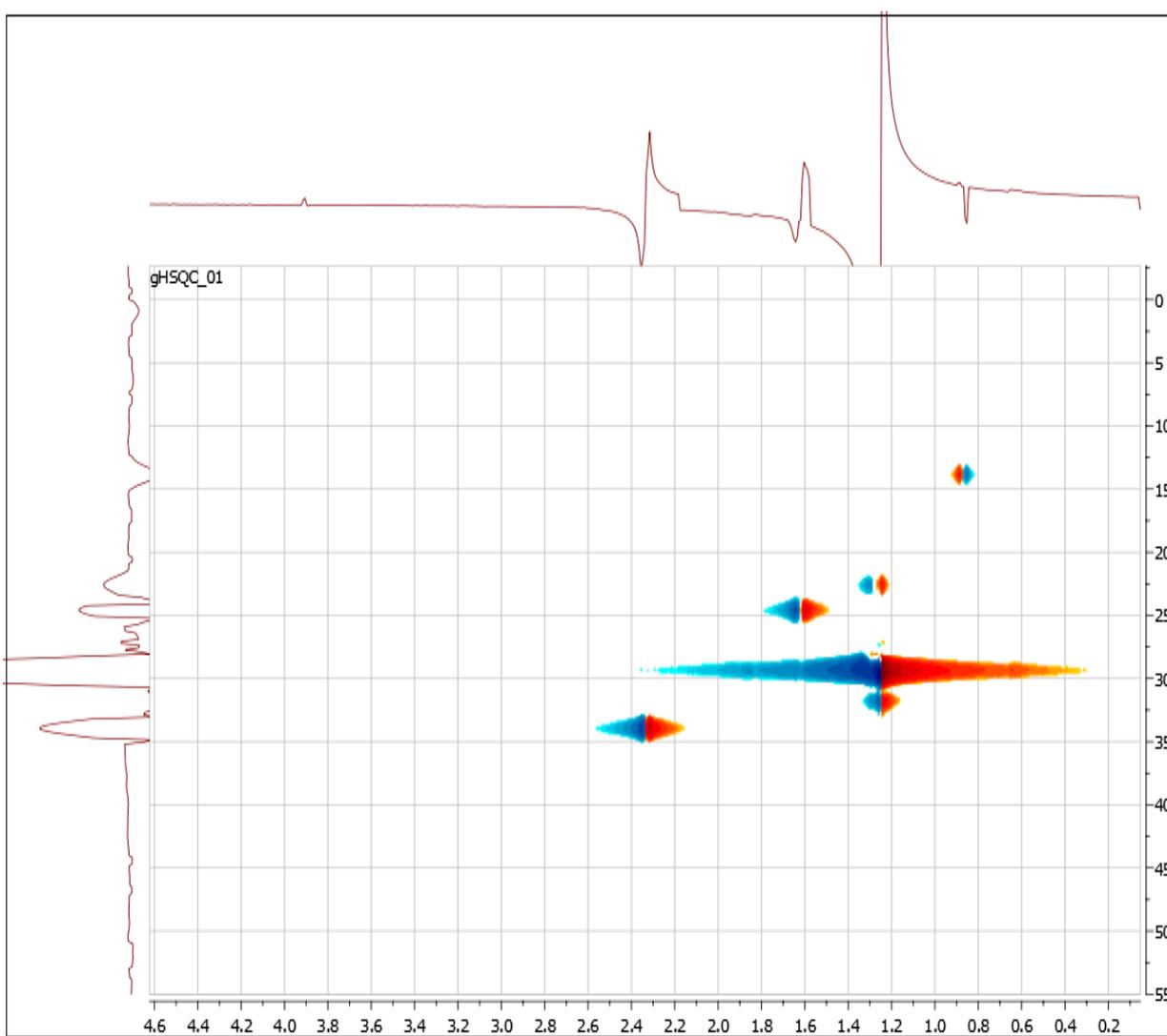


Figure IV.30: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du produit CP9



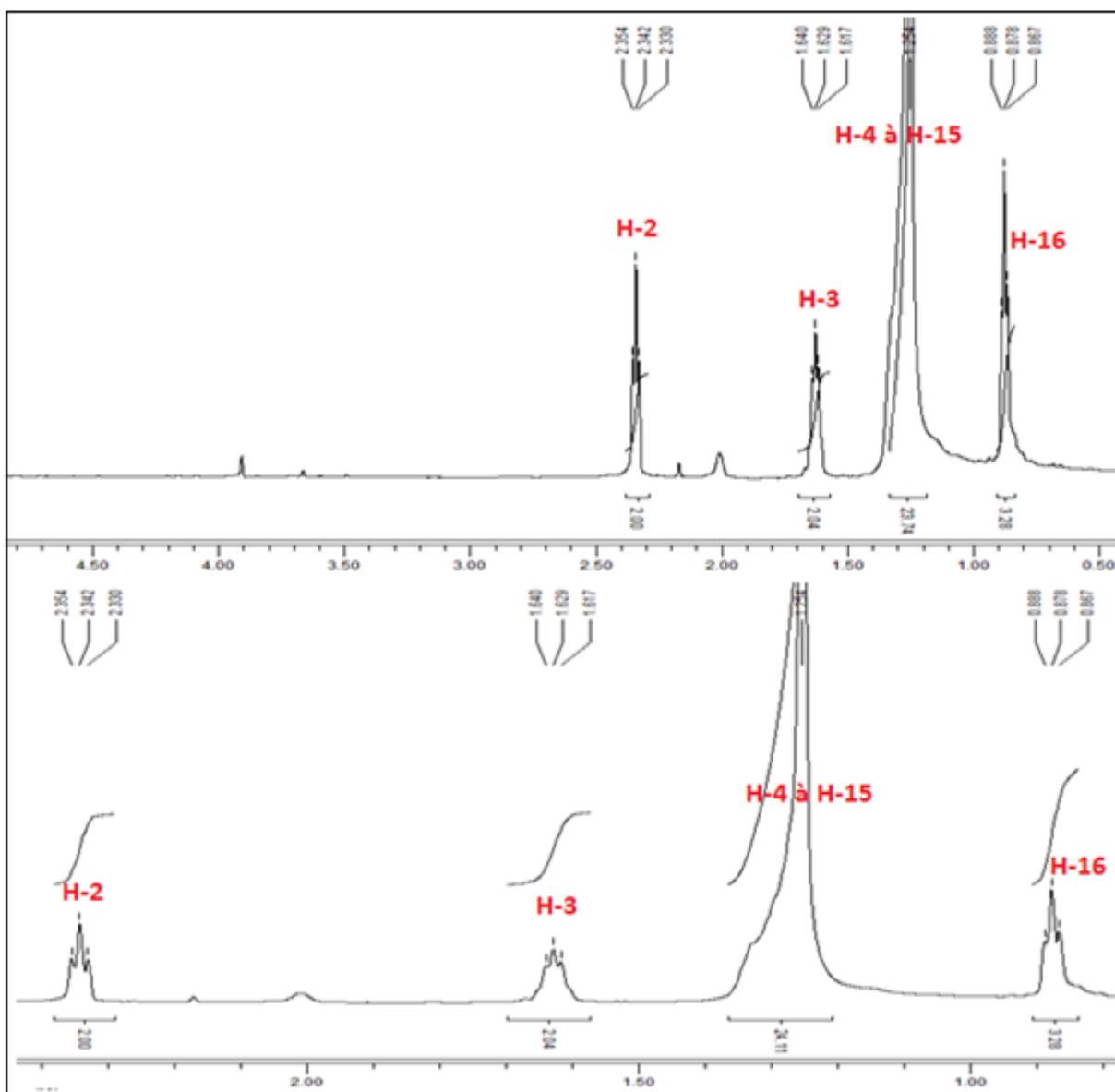
**Figure IV.31:** Spectre de DEPT (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du produit CP9



**Figure IV.32:** spectre de HSQC du produit CP9

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.33) du composé CP9 montre:

- ✓ Un triplet ( $J = 7,3$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 2,34$  ppm d'intégration 2H correspondant aux deux protons du groupement  $\text{CH}_2$  en position alpha de la fonction acide (H-2).
- ✓ Un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 1,63$  ppm d'intégration 2H correspondant aux protons du groupement  $\text{CH}_2$  en position bêta de la fonction acide (H-3). Ces quatre protons sont bien distincts des autres protons des groupements  $\text{CH}_2$  observés entre  $\delta_{\text{H}} = 1,30$  et 1,26 ppm (H-4 à H-15), qui intègre pour 24H.
- ✓ Le groupe méthyle de la fin de la chaîne est observé sous forme de triplet ( $J = 6,5$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 0,88$  ppm (H-16).



**Figure IV.33:** spectre de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du produit CP9

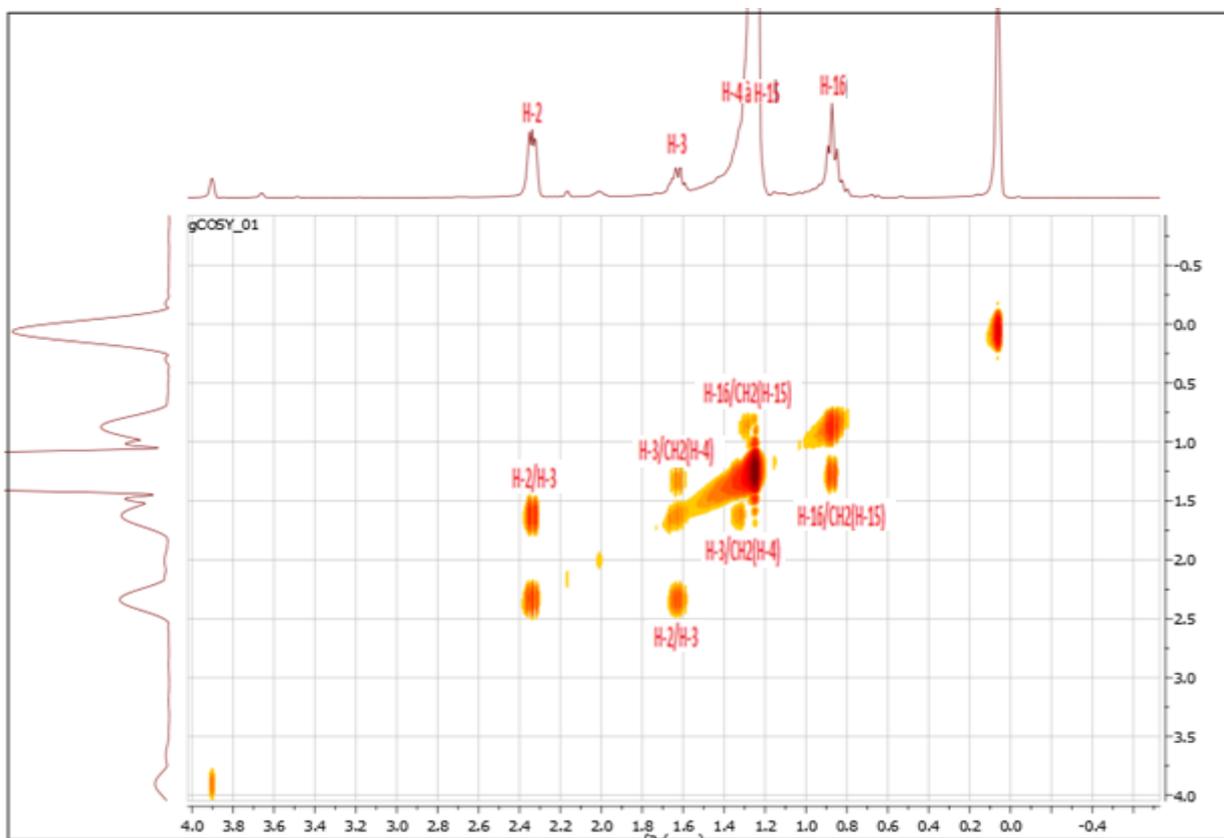
Les déplacements chimiques du spectre RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et les attributions des signaux observés peuvent être résumé dans les tableaux IV.5 et IV.6 suivants:

**Tableau IV.5.** Données du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit CP9

$\delta$ (ppm), m, J (Hz)	Intégration	Attribution
2,34; t; 7,3	2H	H-2
1,63; m	2H	H-3
1,30-1,26; m	24H	H-4 à H-15
0,88; t; 6,5	3H	H-16

L'analyse du spectre COSY homonucléaire (Figure IV.34) de ce composé montre les couplages H-H entre:

- ✓ H-16 résonant à  $\delta_{\text{H}} = 0,88$  ppm et les protons des groupements  $\text{CH}_2$  résonant entre  $\delta_{\text{H}} = 1,30$  et  $1,26$  ppm, ce qui nous permet la localisation de ces protons à la fin de la chaîne aliphatique.
- ✓ H-2 résonant à  $\delta_{\text{H}} = 2,34$  ppm et les protons H-3 résonant  $\delta_{\text{H}} = 1,63$  ppm.
- ✓ H-3 résonant à  $\delta_{\text{H}} = 1,63$  ppm et les protons des groupements  $\text{CH}_2$  résonant dans la zone  $1,30$ - $1,26$  ppm.



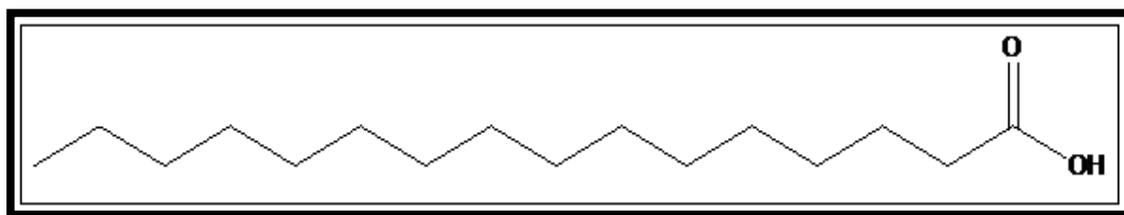
**Figure IV.34:** spectre de COSY du produit CP9

**Tableau IV.6:** Données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP9

$\delta$ (ppm)	attribution
C-1	180,04
C-2	34,04
C-3	24,66
C-4 au C-13	29,67 à 29,04
C-14	31,90
C-15	22,66
C-16	14,08

Un décompte du nombre total des atomes mène à la formule  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}$  soit le manque d'un groupement hydroxyle et qui ne peut être placé qu'en position  $\text{C}_1$  de la fonction acide.

Ces résultats nous permettent d'identifier le composé CP9 comme étant l'**acide hexadécanoïque** connu sous le nom d'**acide palmitique** et dont la formule est représentée ci-dessous [12].

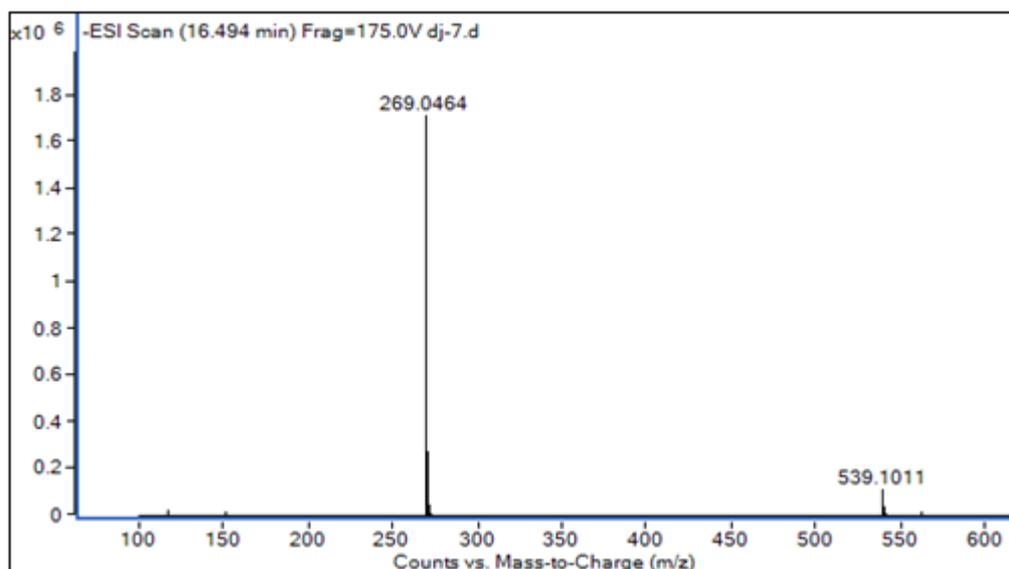


**Acide hexadécanoïque** ou **Acide palmitique**

L'acide palmitique est le constituant saturé prépondérant des huiles essentielles [13].

#### IV.1.1.6 Détermination de la structure du composé CP10

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation négatif (TOF-HRESI-MS négative), (Figure IV.35) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire  $[\text{M-H}]^-$  à  $m/z = 269,0464$  et un autre à  $m/z = 539,101$  correspondant à l'ion  $[2\text{M-H}]^-$ . Ces données permettent de déduire la formule brute  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  pour cette molécule soit une structure comportant 11 insaturations.



**Figure IV.35:** Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP10.

**a) Fluorescence sous lumière de Wood:**

La fluorescence sous la lumière de Wood (365nm) de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

**b) Résultats de l'analyse par spectrophotométrie UV:**

Le spectre enregistré dans le méthanol de ce composé (figure IV.36) montre les deux bandes caractéristiques des flavonoïdes. La bande II à  $\lambda_{\max} = 268$  nm et la bande I à  $\lambda_{\max} = 334$  nm.

La valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I oriente vers une structure de type flavone de cette molécule.

L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome (+58nm) de la bande I avec un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité), indiquant que la position 4' est occupée par un OH libre. De plus la présence d'une nouvelle bande à 325 nm oriente vers la présence d'un OH libre en position 7. Le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc montre la présence de déplacement bathochrome (+8) de la bande II confirmant ainsi la présence du OH en position 7.

Le spectre réenregistré dans le NaOH après 5 minutes reste stable, ce qui indique vu la présence du OH en position 4', que la position 3 comporte soit un H, soit un OR.

La comparaison des spectres enregistrés dans le méthanol en présence de  $\text{AlCl}_3$  et en présence de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ , montre l'absence de déplacement (très faible) de la bande I indiquant l'absence du système ortho dihydroxyle sur le noyau B.

Le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> conduit à un déplacement bathochrome (+4nm) confirme l'absence de système ortho dihydroxyle sur le noyau B.

Comparé au spectre enregistré dans le méthanol, le spectre enregistré en présence de AlCl<sub>3</sub> + HCl montre un déplacement bathochrome de (+49 nm) de la bande I. Cette observation oriente vers un OH libre en position 5.

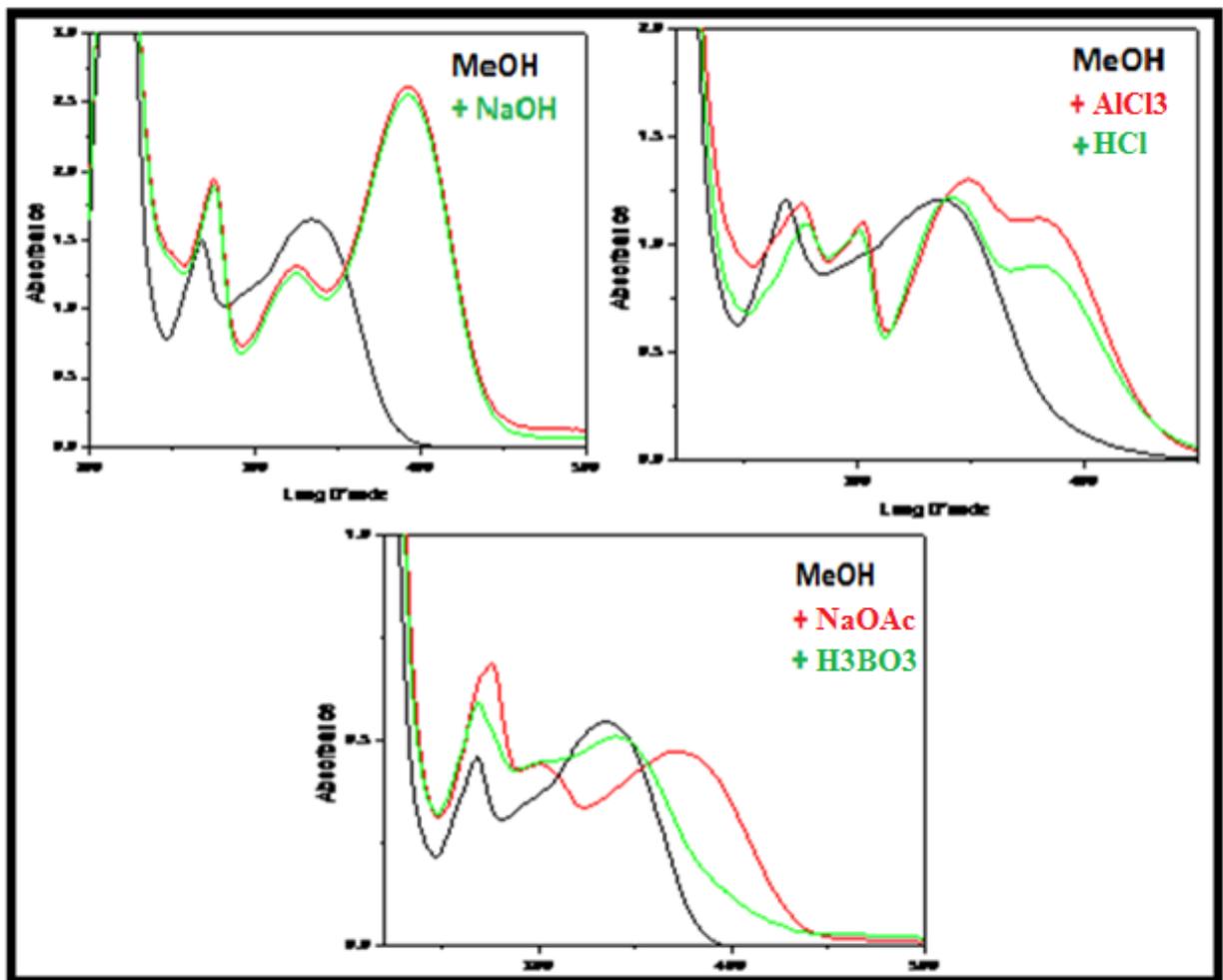


Figure IV.36: Série spectrale UV du Composé CP10

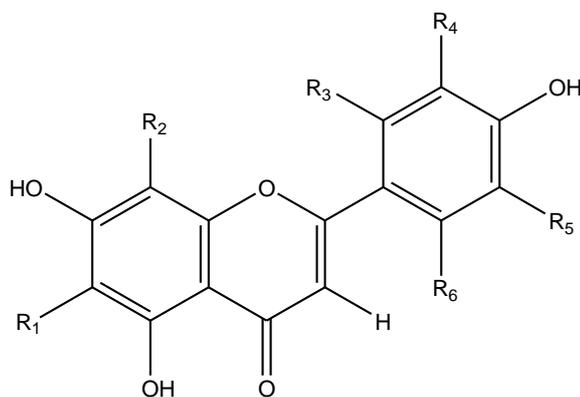


Figure IV.37: Structure partielle du composé CP10

**Tableau IV.7:** Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\max}$  nm) du composé CP10

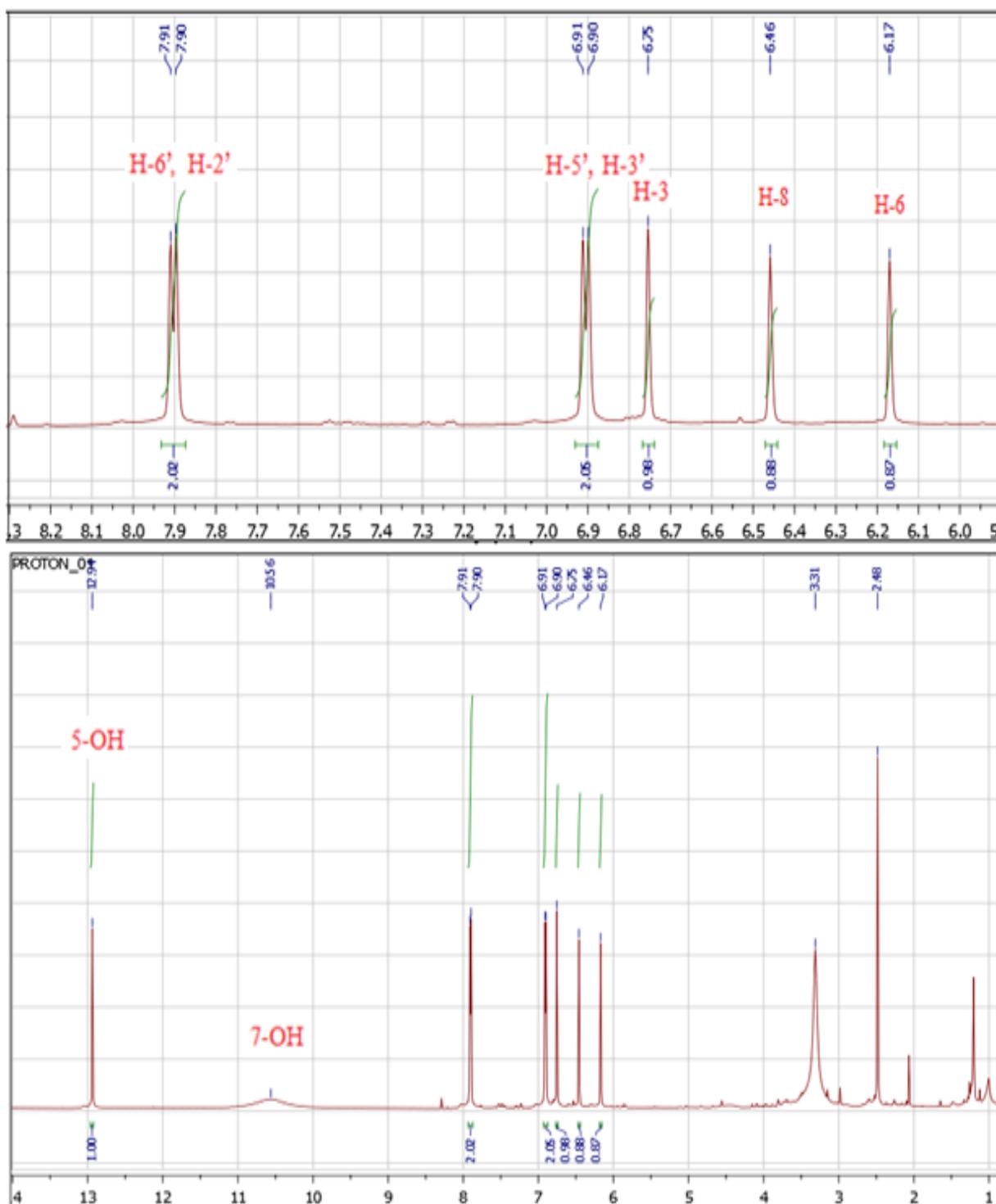
réactifs	bande I (nm)	bande II (nm)	autres bandes		observations
MeOH	334	268			Flavone
NaOH	392	275	325		4'-OH, 7-OH
NaOH après 5 mn	392	275	325		Pas de OH en C-3
NaOAc	371	276	300		7-OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340	268	300		Absence de système ortho di-OH.
AlCl <sub>3</sub>	383	275	349	302	5-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl	383	277	342	300	Absence de système ortho di OH.

L'examen du spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure IV.38) enregistré dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, montre la présence de:

- ✓ Deux doublets ( $J = 7,6$  Hz) d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 7,91$  et  $\delta_{\text{H}} = 6,91$  ppm, caractéristiques des protons H-6', H-2' et H-5', H-3' respectivement, du noyau B parasubstitué d'un flavonoïde.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,75$  ppm attribuable à H<sub>3</sub> confirmant le squelette d'une flavone.
- ✓ Deux singulet large d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 6,46$  et  $\delta_{\text{H}} = 6,17$  ppm, caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement du noyau A d'un flavonoïde.
- ✓ un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 12,94$  ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5.
- ✓ un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 10,58$  ppm confirme l'hydroxylation de la position 7.

**Tableau IV.8:** Données du spectre RMN <sup>1</sup>H du produit CP10

DÉPLACEMENT CHIMIQUE (PPM)	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ	ATTRIBUTION DES PROTONS
7,91	2H	<i>d</i> (7,6)	H-6', H-2'
6,91	2H	<i>d</i> (7,6)	H-5', H-3'
6,75	H	<i>s</i>	H-3
6,46	H	<i>s</i> large	H-8
6,17	H	<i>s</i> large	H-6
12,93	H	<i>s</i>	OH-5



**Figure IV.38:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) du composé CP10

La confrontation des valeurs des déplacements chimiques du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure IV.39) du composé CP10 avec les valeurs de la littérature (tableau IV.9) confirme la structure de l'apigénine.

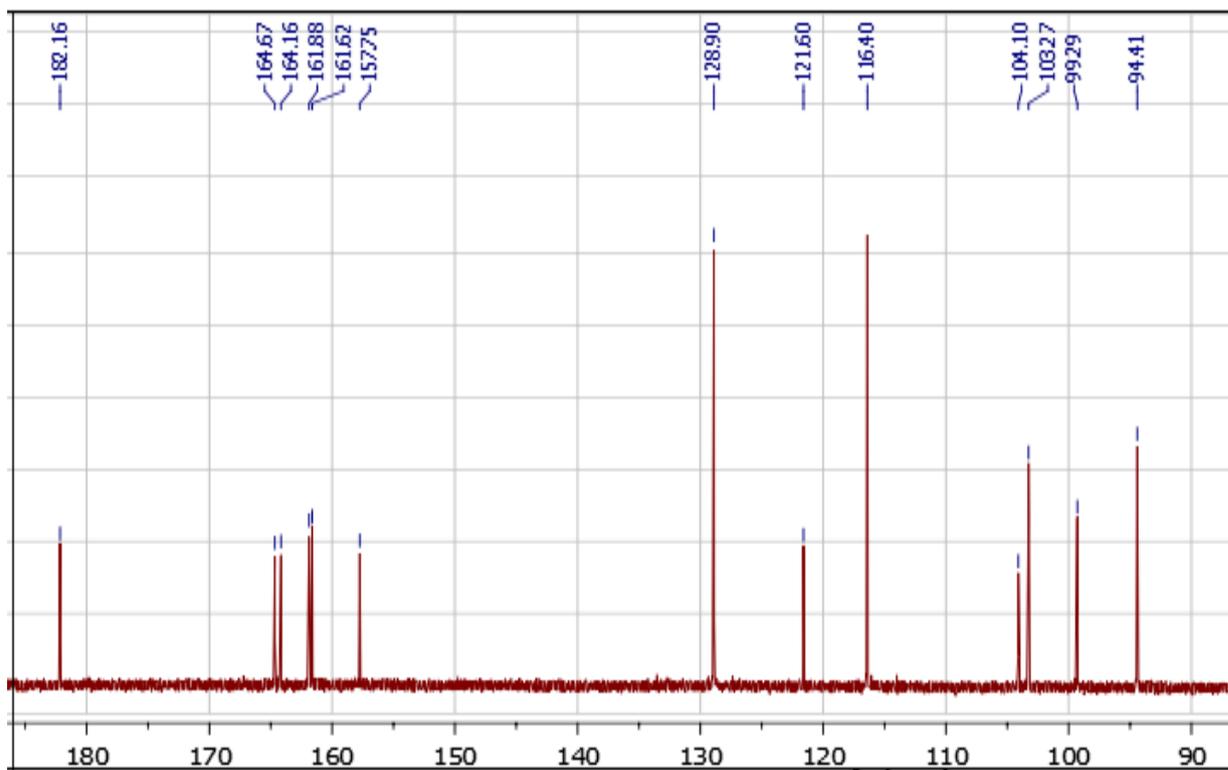
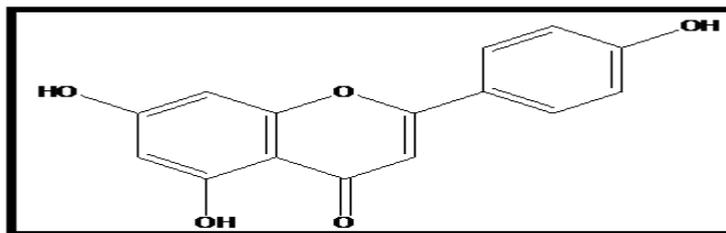


Figure IV.39: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) du composé CP10

Tableau IV.9: Données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP10

N° C	$\delta_c$ du composé CP10
2	161,88
3	103,26
4	182,16
5	164,16
6	99,29
7	164,16
8	94,41
9	161,62
10	104,09
1'	121,6
2', 6'	128,9
3', 5'	116,40
4'	157,74

La combinaison de l'ensemble de ces données mène à la structure de la 4', 5,7-trihydroxy flavone connue sous le nom d'**apigénine**.



4', 5, 7-trihydroxyflavone (apigénine)

L'apigénine est une flavone qui a des propriétés anti inflammatoires [14]. Elle est très répandue chez le genre *Centaurea*. (*C. alexandrina* [15], *C. aspera*[16], *C. calcitrapa* [15], *C. depressa* [17], *C. furfuracea* [18], *C. glomerata* [15], *C. inermis*, *C. kilea*, *C. kotschy* et *C. virgata* [19] , *C. pallescens* [20], *C. urivillei* [21]).

#### IV.1.1.7 Détermination de la structure du composé CP11

Le composé **CP11** se présente sous forme d'une poudre jaune, soluble dans le MeOH. Ce composé donne une couleur violette après une semaine de révélation.

L'analyse par HPLC du composé CP11 (Figure IV.40) a montré que sa pureté est de 88 % et son temps de rétention est  $t_R = 12,43$  min, alors que son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation négatif (SMHR ESI (-)) montre un pic quasimoléculaire à  $m/z$  144,0491 Da correspondant à  $[M-H]^-$ . Ceci permet de déduire une masse de 145 Da correspondant à la formule brute  $C_9H_7NO$  indiquant une structure avec 7 insaturations.

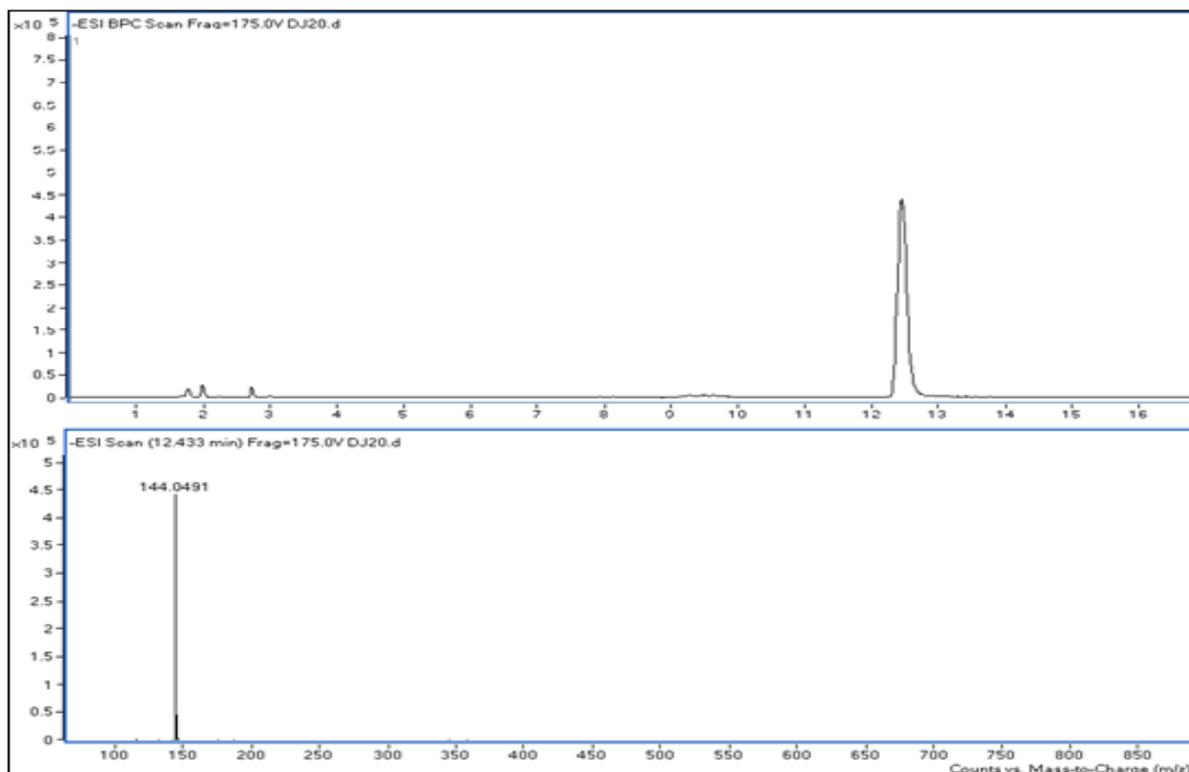
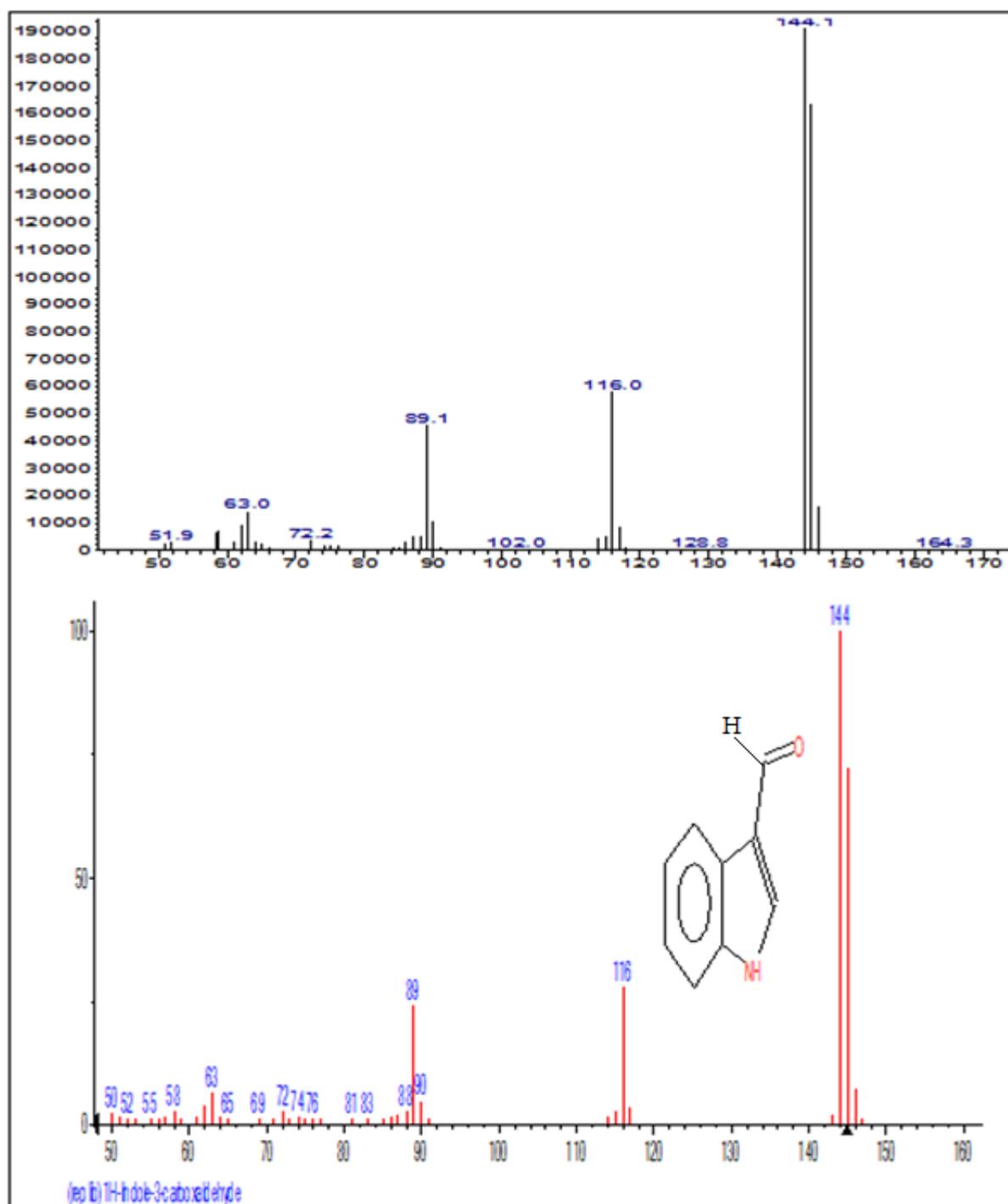


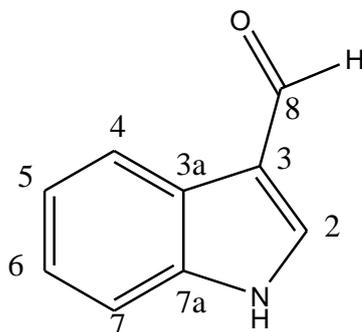
Figure IV.40: Spectre et chromatogramme de HPLC-TOF/MS du composé CP11

Ce composé a été identifié par GC/MS et sa formule brute  $C_9H_7NO$  a été confirmée par l'analyse de son spectre de masse enregistré en mode Impact Electronique (IE). En effet, les données de ce dernier se trouvent en bon accord avec celles de la banque de données NIST correspondant au composé **1H-Indole-3-carboxaldehyde**, on y retrouve les fragments caractéristiques de 1H-Indole-3-carboxaldehyde à : ( $m/z$ ) 145 ( $M^+$ ), 144 ( $M-1$ ), 116 ( $M^+-29$ ) et 89.



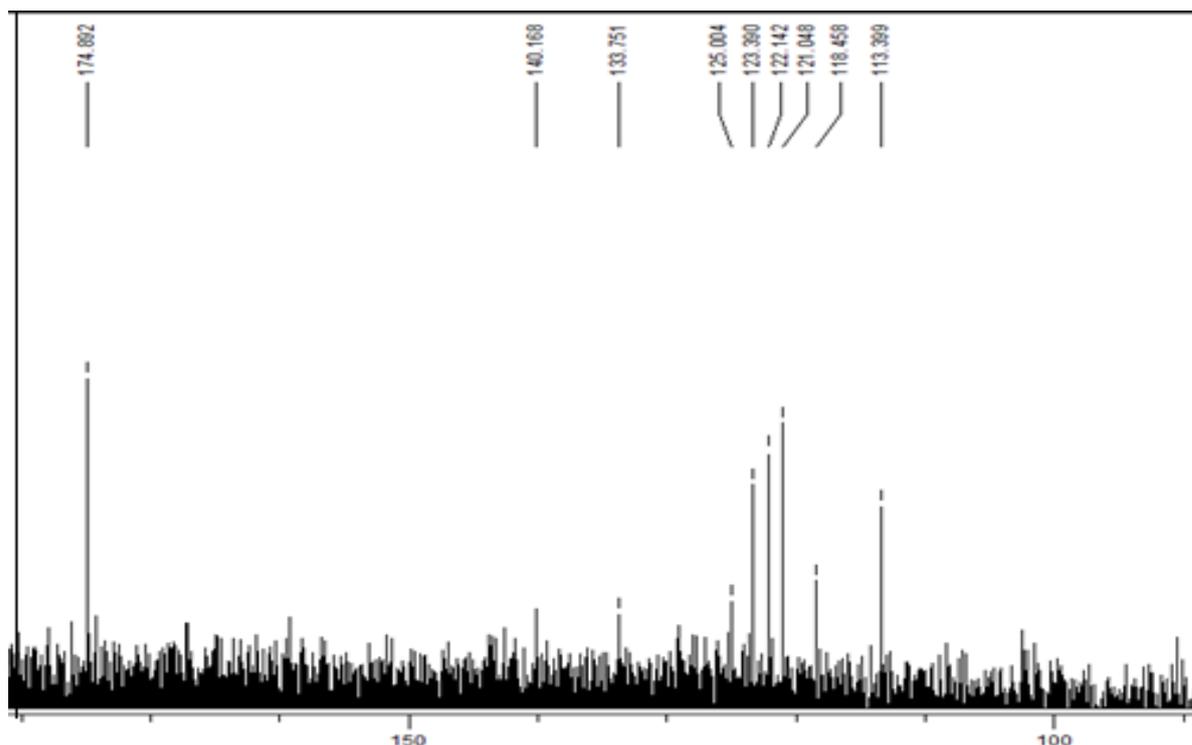
**Figure IV.41:** A. Fragmentation GC/MS du composé CP11.  
B. Fragmentation GC/MS du témoin 1H-Indole-3- carboxaldehyde

En se référant à la bibliographie de ce type d'alcaloïde, nous proposons la numérotation reportée dans la figure IV.42.



**Figure IV.42:** Structure partielle du Composé CP11.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de ce même composé (Figure IV.43) confirme la présence de 9 atomes de carbone, dont un carbone quaternaire caractéristique du groupement carbonyle de l'aldéhyde à  $\delta_{\text{C}}=174,89$  ppm.



**Figure IV.43:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) du composé CP11

Par ailleurs, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure IV.44) confirme le squelette du 1H-Indole-3-carboxaldehyde reconnaissable par les signaux :

- ✓ Deux doublets larges ( $J=7,2$  Hz) d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}= 8,04$  et  $\delta= 7,49$  ppm, caractéristiques des protons H-4 et H-7 du cycle benzénique respectivement.

- ✓ Deux triplets larges ( $J=7,2$  Hz) d'intégration 1H chacun observés à  $\delta_{\text{H}}= 7,15$  et 7,19 ppm caractéristiques des protons H-5 et H-6 du cycle benzénique respectivement.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta=8,20$  ppm attribuable à H-2 du cycle pyrrole.
- ✓ un singulet d'intégration 1H à  $\delta= 9,87$  ppm confirme la présence de la fonction aldéhyde en position 3.
- ✓ un singulet large d'intégration 1H à  $\delta= 8,29$  ppm confirme la présence d'un NH en position 1.

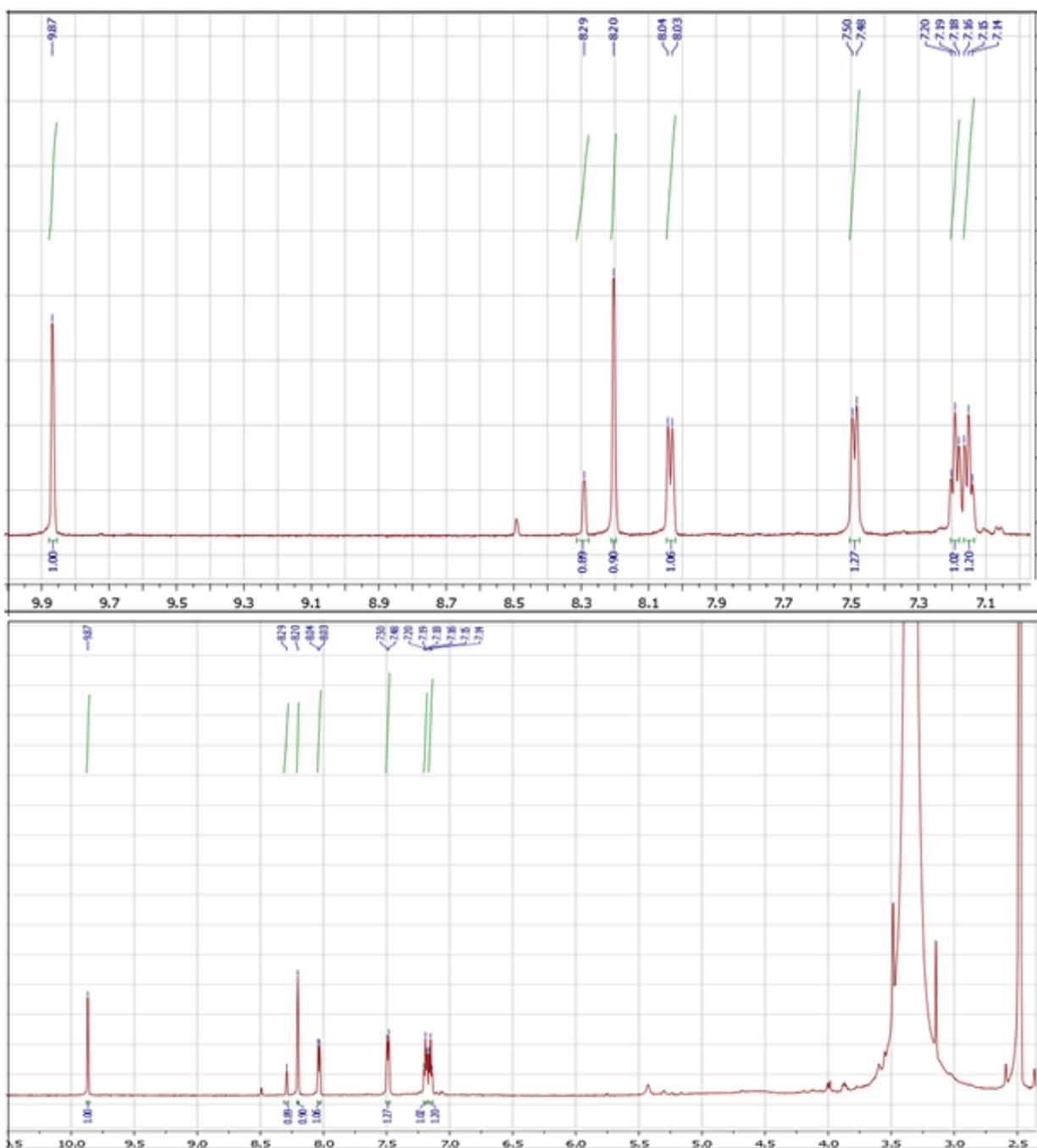


Figure IV.44: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) du composé CP11

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure IV.45) de ce composé montre les corrélations suivantes:

- ✓ H-4 résonant à  $\delta_H = 8,04$  ppm et le proton résonant à  $\delta_H = 7,15$  ppm attribuable à H-5.
- ✓ H-5 ( $\delta_H = 7,15$  ppm) et le proton résonant à  $\delta_H = 7,19$  ppm qui ne peut être que le H-6.
- ✓ H-6 ( $\delta_H = 7,19$  ppm) et le proton H-7 résonant à  $\delta_H = 7,49$  ppm.

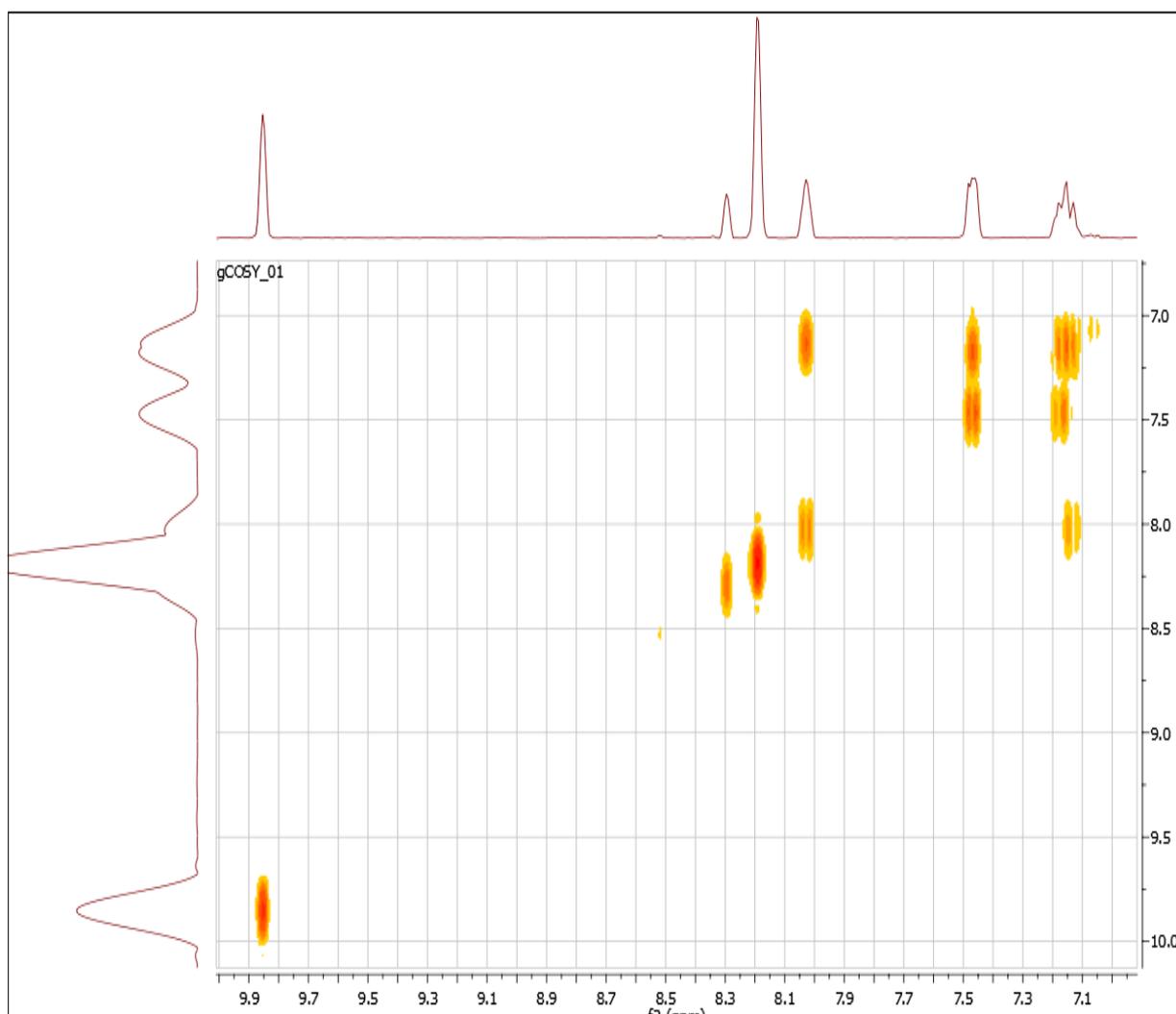
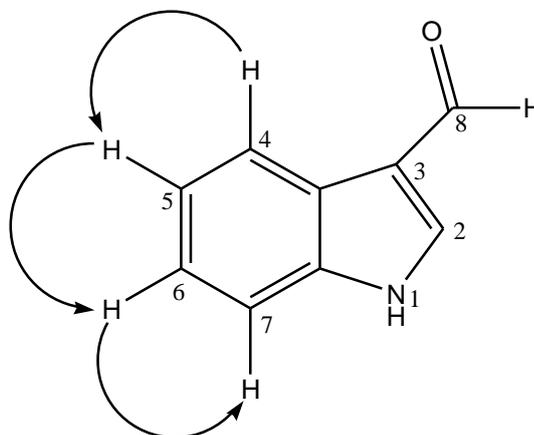
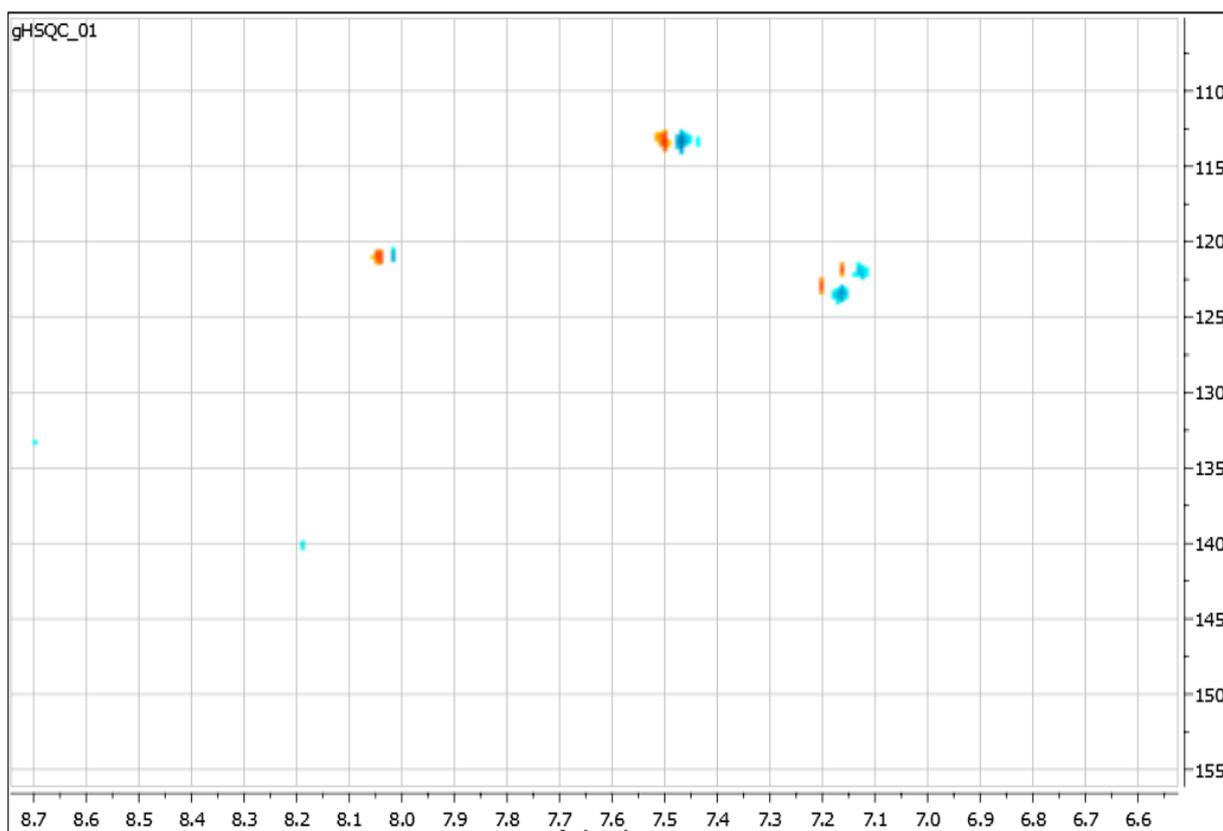


Figure IV.45: Spectre COSY du composé CP11

Le spectre HSQC (Figure IV.46) a permis de corréler les protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- ✓ Le proton H2 corrèle avec le carbone C2 à  $\delta = 140,17$  ppm.
- ✓ Le proton H4 corrèle avec le carbone C4 à  $\delta = 121,04$  ppm
- ✓ Le proton H5 corrèle avec le carbone C5 à  $\delta = 122,14$  ppm
- ✓ Le proton H6 corrèle avec le carbone C6 à  $\delta = 123,4$  ppm
- ✓ Le proton H7 corrèle avec le carbone C7 à  $\delta = 113,4$  ppm.

Les déplacements chimiques des carbones quaternaires ont été déduits par comparaison avec les données de la littérature [22].



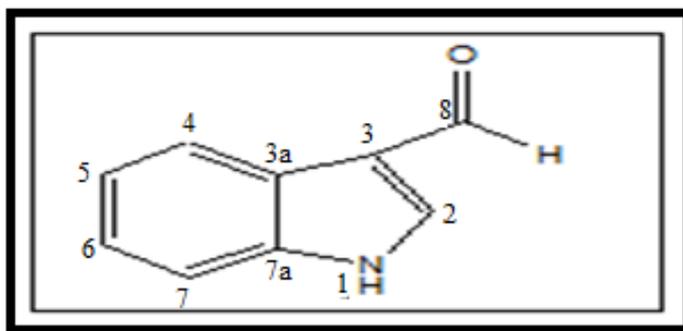
**Figure IV.46:** Spectre HSQC du composé CP11

Les résultats de la RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé CP11 sont rassemblés dans le tableau IV.10.

**Tableau IV.10:** Données du spectre RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP11

position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (intégration, m, $J$ en Hz)	Données de la littérature [22]	
			$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (intégration, m, $J$ en Hz)
1	-	8,29, H, <i>s</i> large	-	12,13 (1H, <i>s</i> )
2	140,17	8,20, H, <i>s</i>	138,5	8,30 (1H, <i>s</i> )
3	118,45	-	118,1	-
3a	125,00	-	124,1	-
4	121,04	8,04, 1H <i>d</i> large (7,8)	120,8	8,07, 1H <i>dl</i> (7,4)
5	122,14	7,15, 1H <i>t</i> large (7,2)	122,1	7,10, 1H <i>dt</i> (1,2 ; 7,4)
6	123,4	7,19, 1H <i>t</i> large (7,2)	123,4	7,30, 1H <i>dt</i> (1,3 ; 7,4)
7	113,4	7,48, 1H <i>d</i> large (7,8)	112,4	7,60, 1H <i>dl</i> (7,4)
7a	133,75	-	137,1	-
8	174,89	9,87, H, <i>s</i>	185	9,95 (1H, <i>s</i> )

Toutes ces données comparées à celles de la littérature mènent à la structure du composé CP11 indiqué ci-dessus et connu sous le nom de **1H-Indole-3-carboxaldehyde**.

**1H-Indole-3-carboxaldehyde**

Une recherche bibliographique a montré que ce produit n'a jamais été isolé du genre *Centaurea*

L'alcaloïde indole-3-carboxaldéhyde a été utilisé pour préparer des analogues de l'indole phytoalexine cyclobassinine avec un groupe NR1R2 [23]. Il a également été utilisé comme matériau de départ pour la synthèse d'indoles d'ordre supérieur [24].

#### IV.1.1.8 Détermination de la structure du composé CP12

Ce produit est un mélange de deux composés se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.47) de ce composé enregistré dans le DMSO permet l'observation d'un ensemble de signaux très similaire à celui du composé CP7. En effet, on observe :

- Une série très dense dans la zone 0,66-2,50 ppm indiquant la présence d'un nombre important de groupements méthyles, méthylènes et méthynes.
- Un multiplet à  $\delta = 3,44$  ppm caractéristique du proton H-3 des stérols.
- Un singulet large à  $\delta = 5,31$  ppm caractéristique du proton oléfinique H-6 des stérols.
- Un doublet ( $J = 7,8$  Hz) à  $\delta = 4,20$  ppm caractéristique du proton anomérique H-1' d'un sucre. L'entité sucre est confirmée par la présence de plusieurs signaux dans la zone 2,8-3,7 ppm.
- On note également la présence de deux signaux résonant à 5,01 et 5,14 ppm sous forme de doublet de doublet ( $J = 14,7$  et  $8,8$  Hz) et ( $J = 14,7$  et  $8,8$  Hz) caractéristiques des deux protons oléfiniques des positions C-22 et C-23 du stigmastérol respectivement.

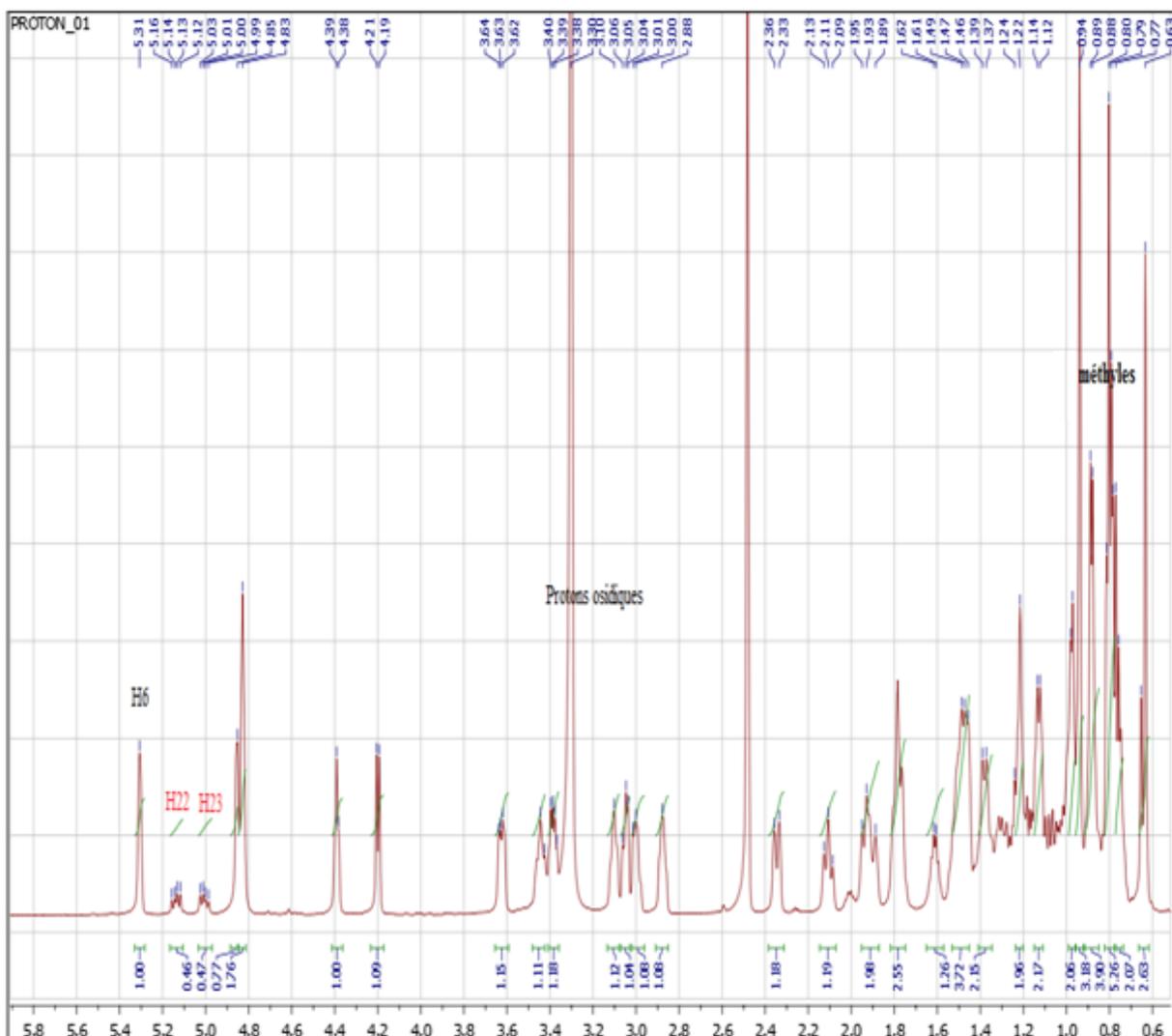
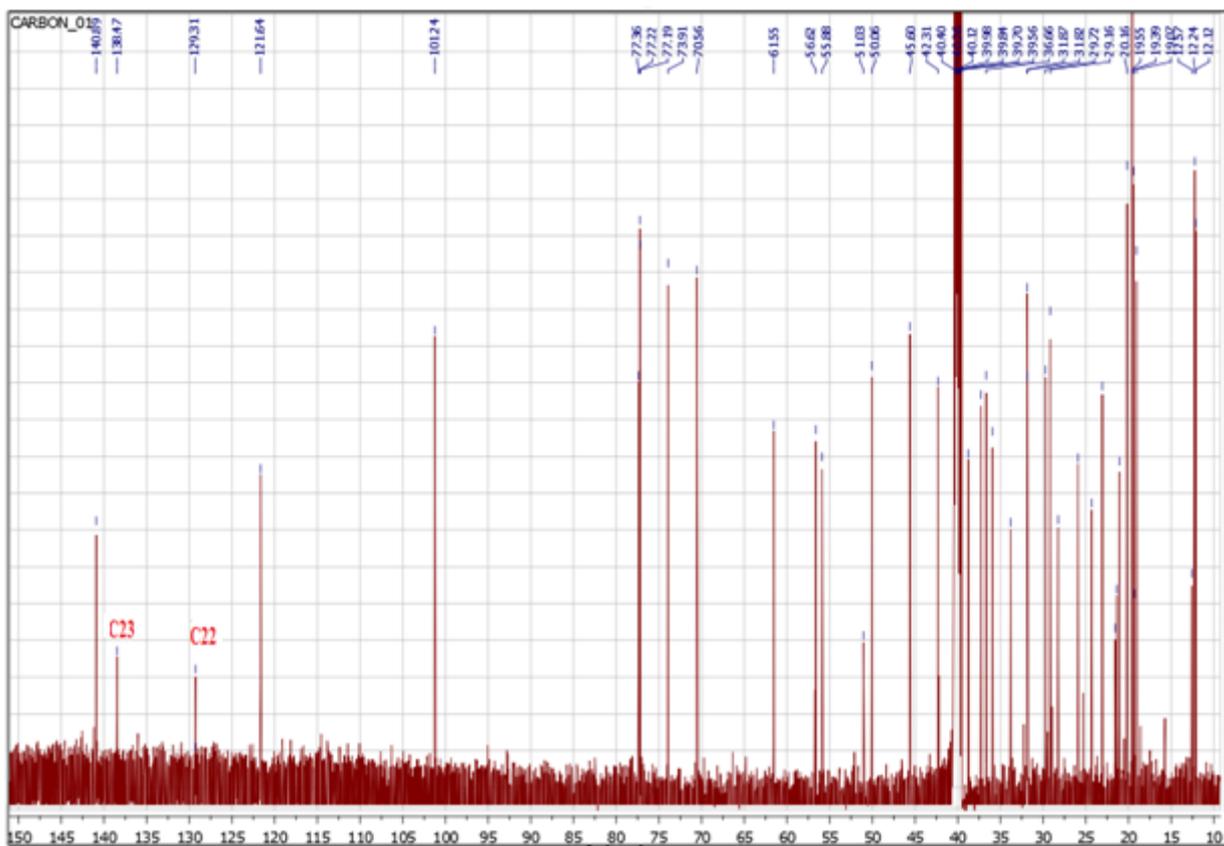


Figure IV.47: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP12

Une deuxième lecture attentive du spectre proton (Figure IV.47) montre une intégration d'environ l'unité pour chacun des signaux relatifs à H-6 et H-3, alors que cette intégration est d'environ 0,47 pour chacun des signaux relatifs à H-22 et H-23. Cette observation permet de déduire qu'on est en présence d'un mélange de stigmastérol glucosylé (CP12-1) et le  $\beta$ -Sitostérol glucosylé (CP12-2).

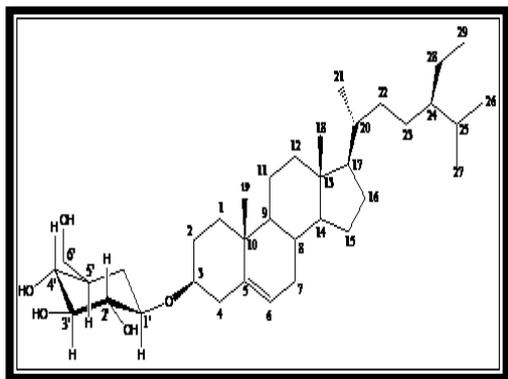
Un simple calcul mené sur les intégrales des signaux des protons montre qu'il s'agit d'un mélange d'environ 54-46% en faveur du  $\beta$ -Sitostérol glucosylé (CP12-2). La nature glucosidique des deux composés du mélange est confirmée par la valeur de l'intégrale du proton anomérique H-1'. En effet, cette intégrale ainsi que l'intégrale des autres protons du sucre sont pratiquement égale à celle des protons H-6 et H-3. De même, l'entité sucre est déduite comme étant du glucose par comparaison des valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage avec celles du composé CP7.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure IV.48) montre clairement tous les signaux des carbones du **3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -Sitostérol** discuté précédemment (**composé CP7**), et confirme la présence du stigmastérol par la présence des signaux de deux atomes de carbone éthyléniques résonnant à  $\delta_{\text{C}} = 129,31$  et  $138,47$  ppm attribuable à C-22 et C-23 respectivement.

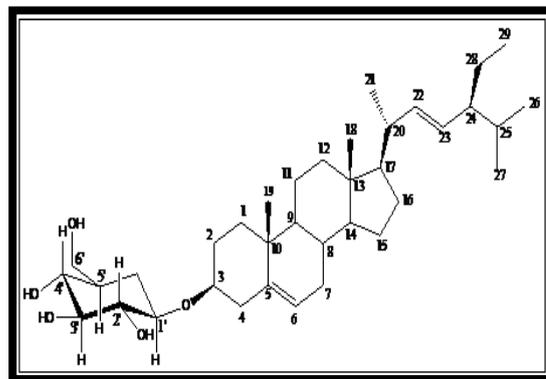


**Figure IV.48:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP12

L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec la littérature [25] indique clairement que le composé **CP12** est un mélange de deux composés, le daucostérol (**CP12-1**) et le 3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl Stigmastérol (**CP12-2**) comme reporté ci-dessous.



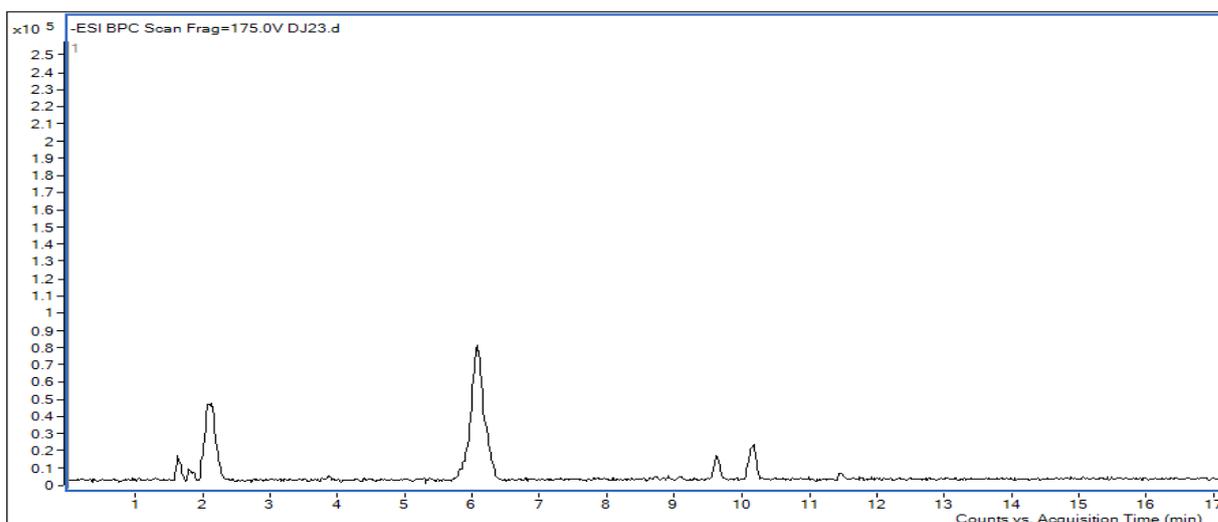
**3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -Sitostérol  
(Daucostérol)**



**3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl Stigmastérol**

#### IV.1.1.9 Détermination de la structure du composé CP13

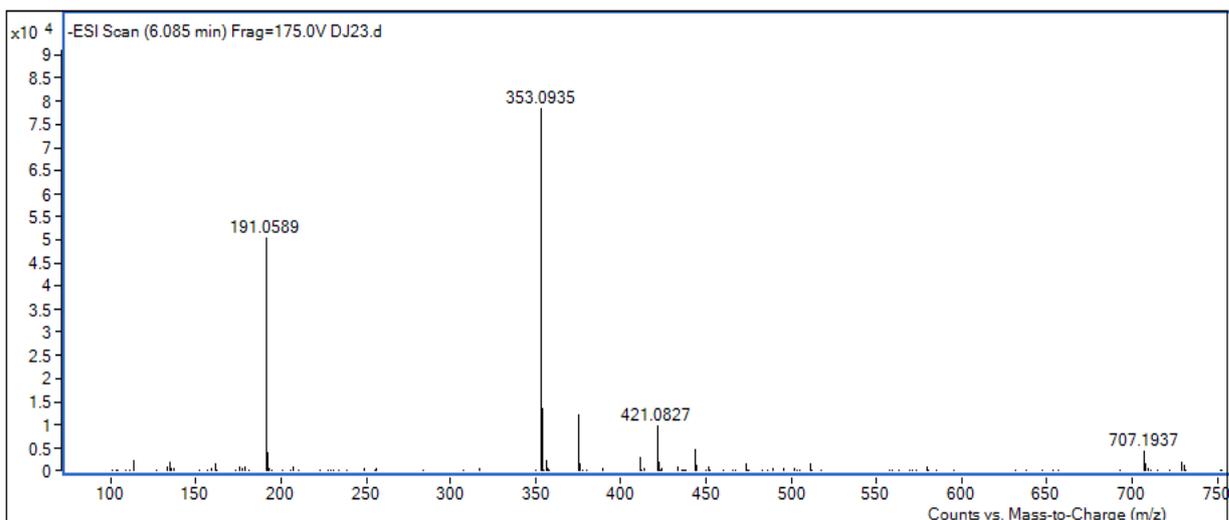
Le composé CP13 se présente sous forme poudre jaune. L'analyse HPLC-TOF de ce composé (Figure IV.49) a montré que son temps de rétention est  $t_R = 6,085$  min.



**Figure IV.49:** Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé CP13

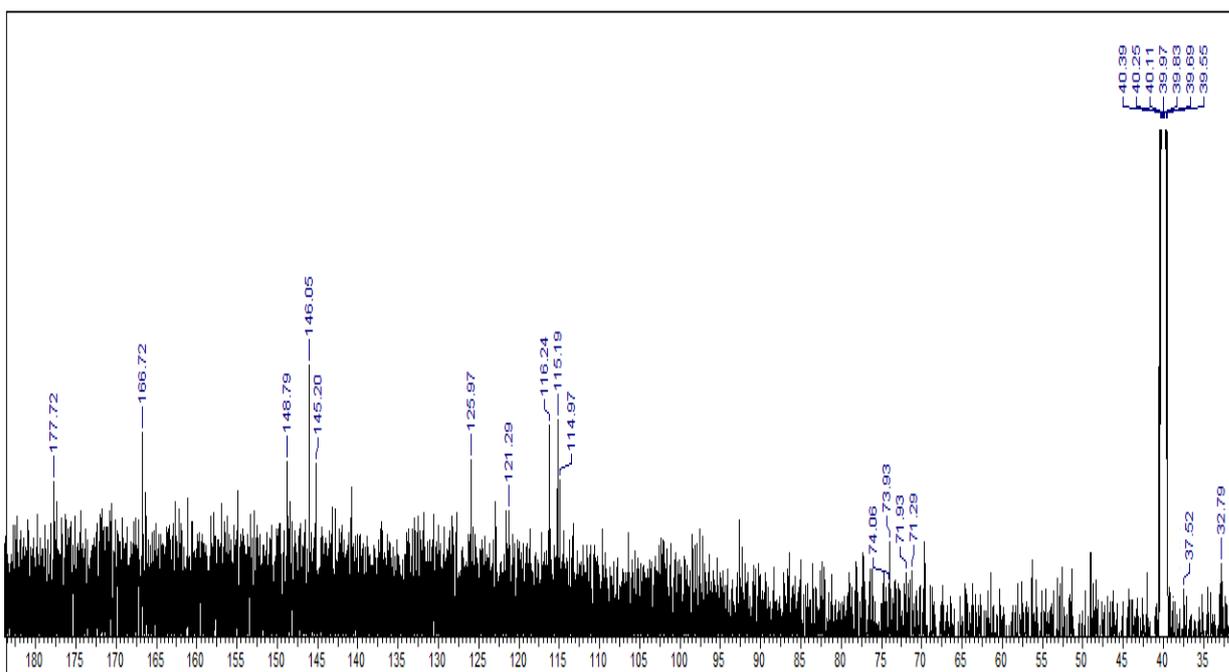
Ce composé a été identifié par comparaison à un standard disponible au laboratoire et avec les données de la bibliothèque NIST. Il s'agit de l'acide chlorogénique.

L'examen de son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électrobulbion négatif (TOF-HRESI-MS (-)), (Figure IV.50) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z = 353,0935$  correspondant à la formule moléculaire  $C_{16}H_{18}O_9$ .



**Figure IV.50:** Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP13.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure IV.51) confirme la présence de 16 atomes de carbone, dont deux carbones quaternaire, le premier est un carbone d'un carbonyle acide à  $\delta_{\text{C}} = 177,7$  ppm et le second est un carbone d'un carbonyle d'ester conjugué à  $\delta_{\text{C}} = 168,7$  ppm.



**Figure IV.51:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé CP13.

L'examen simultané du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure IV.52), spectre COSY (figure IV.53) et spectre HSQC (figure IV.54) montre des signaux dans la zone 7,5-6,5 ppm qui peuvent être répartis comme suit:

- Un premier doublet ( $J = 16\text{Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,44$  ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 145,2$  ppm

- Un deuxième doublet ( $J = 16\text{Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,21\text{ ppm}$ . Celui-ci montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 114,9\text{ ppm}$ .

Les valeurs des déplacements chimiques montrent clairement que ces deux protons sont éthyléniques, alors que la valeur de la constante de couplage indique que ces deux protons se trouvent en configuration *trans*. Ceci est confirmé par les taches de corrélations se trouvant sur le spectre COSY.

D'autres signaux caractérisent les protons d'un cycle aromatique trisubstitué qui apparaissent comme suit :

- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,03\text{ ppm}$  corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}=115,2\text{ ppm}$ .
- Un doublet large ( $J = 7,2\text{ Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,95\text{ ppm}$  corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}=121,3\text{ ppm}$ .
- Un doublet ( $J = 7,2\text{ Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,74\text{ ppm}$  montre sur le spectre HSQC une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 116,2\text{ ppm}$ .

Les valeurs des déplacements chimiques de ces 3 protons ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un cycle aromatique trisubstitué en méta et en para. En effet, le premier signal (*s*) présente un couplage méta non observé, le deuxième signal (*dl*,  $J=7,2\text{ Hz}$ ) montre un couplage ortho et un couplage méta non observé et le troisième signal (*d*,  $J=7,2\text{ Hz}$ ) montre un couplage ortho. Ces constatations permettent de confirmer la présence d'un cycle aromatique trisubstitué en positions 1, 3 et 4.

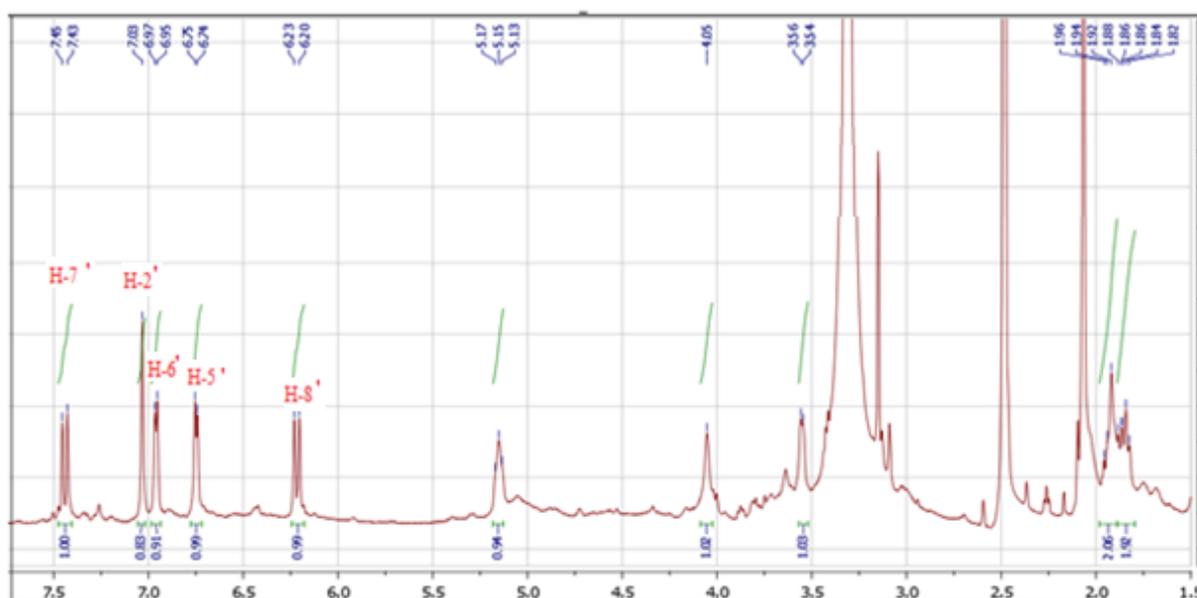


Figure IV.52: Spectre RMN <sup>1</sup>H (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) du composé CP13.

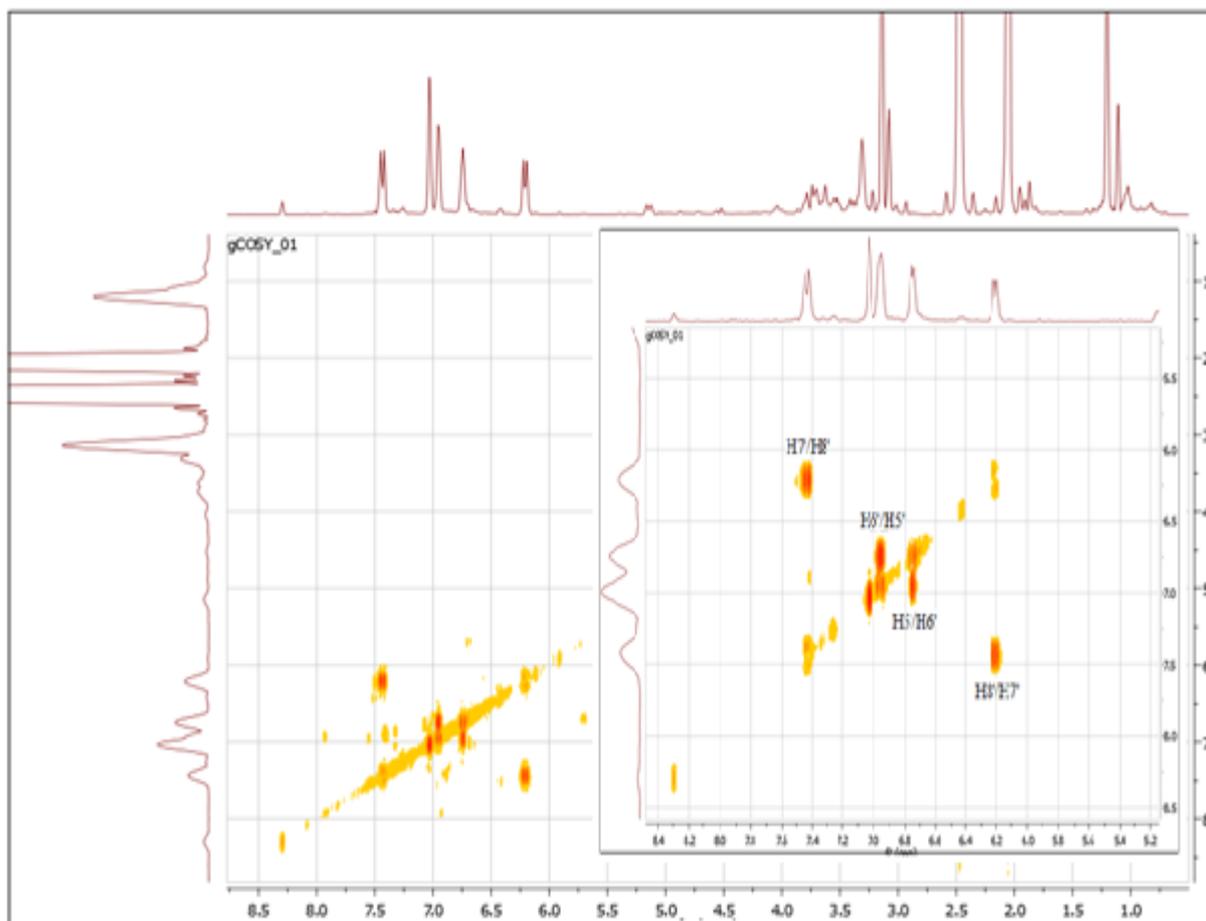


Figure III. 53: Spectre de COSY du composé CP13

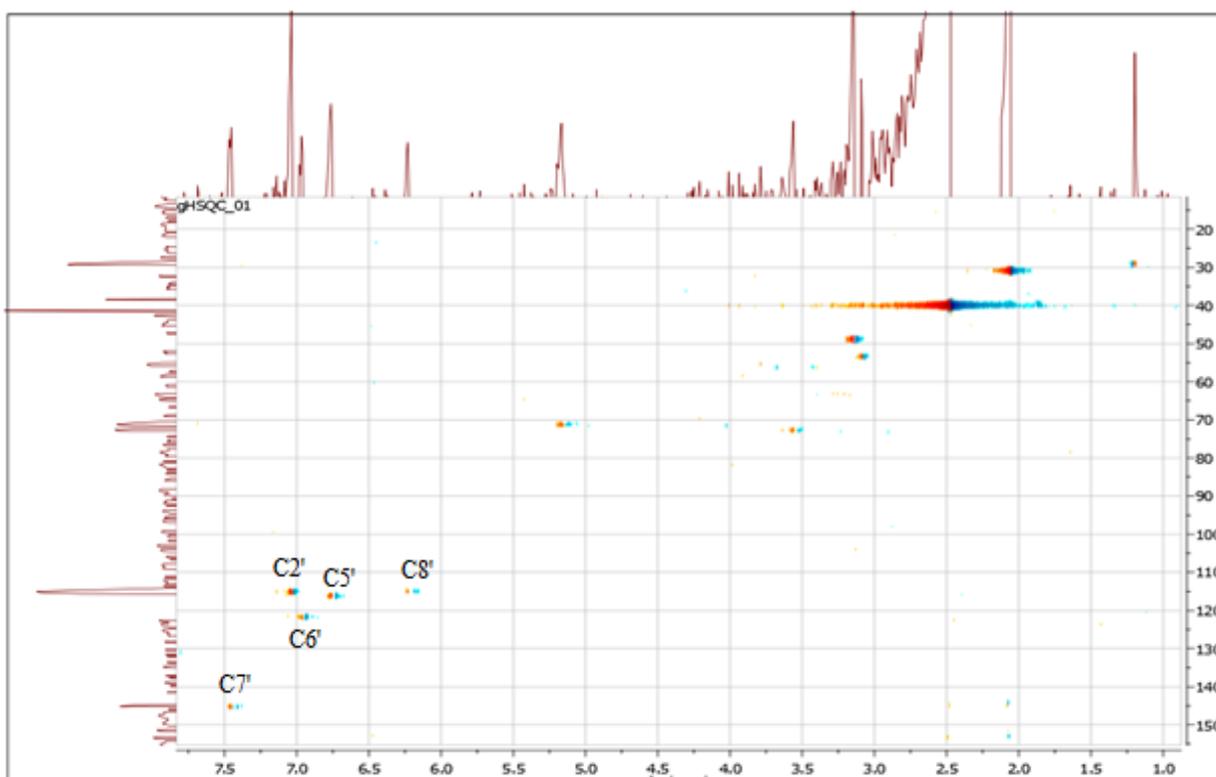
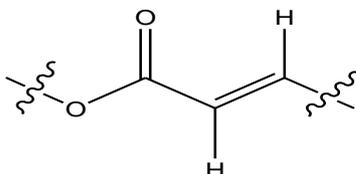


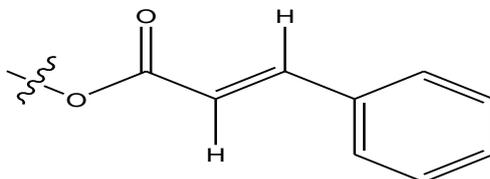
Figure IV.54: Spectre HSQC du composé CP13.

Une analyse du spectre HMBC (figure IV.57) permet de relier les deux entités. En effet, on observe une tache de corrélation entre le signal du proton à  $\delta_{\text{H}} = 7,44$  ppm et le signal du carbonyle d'ester à  $\delta_{\text{C}} = 166,7$  ppm permettant de relier la double liaison de configuration *trans* avec le carbonyle de l'ester d'où l'entité.



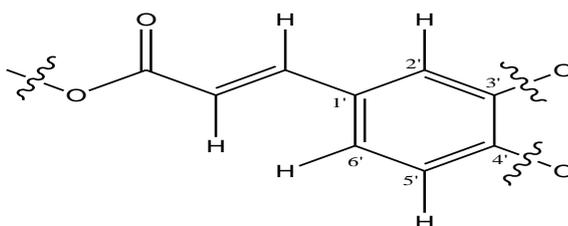
De même, ce proton à  $\delta_{\text{H}} = 7,44$  ppm montre deux taches de corrélations avec les signaux des carbones à  $\delta_{\text{H}} = 121,3$  et  $115,2$  ppm attribuables à H-6' et H-2' respectivement, et une autre tache de corrélation avec le signal du carbone à  $\delta_{\text{H}} = 114,9$  ppm attribuable à H-8'.

Toujours sur le spectre HMBC, on observe une tache de corrélation entre le proton à  $\delta_{\text{H}} = 6,21$  ppm et le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 125,9$  ppm attribuable au carbone quaternaire du cycle aromatique numéroté C1' d'où l'entité reportée sur la figure IV.55. Cette structure permet de déduire qu'on est en présence d'un dérivé de l'acide cinnamique.



**Figure IV.55:** Structure partielle du Composé CP13

Un retour au spectre RMN  $^{13}\text{C}$  permet l'observation de deux signaux le premier à  $\delta_{\text{C}} = 148,8$  ppm et le second à  $\delta_{\text{C}} = 146,1$  ppm. Les valeurs du déplacement chimiques des deux carbones indiquent clairement qu'ils sont aromatiques et oxygénés et ne peuvent être attribués qu'aux carbones C3' et C4' du cycle aromatique d'où l'entité.



**Figure IV.56:** Structure partielle du Composé CP13

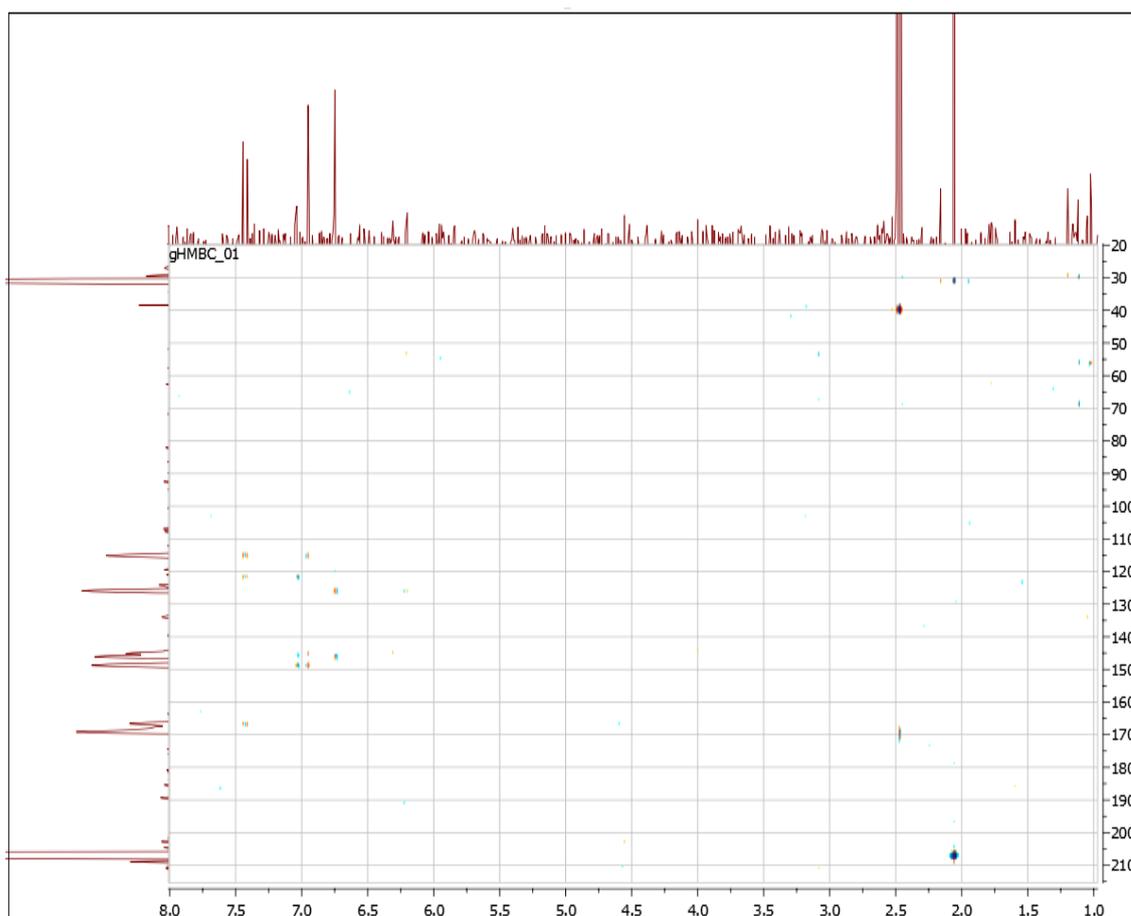


Figure III. 57: Spectre de HMBC du composé CP13

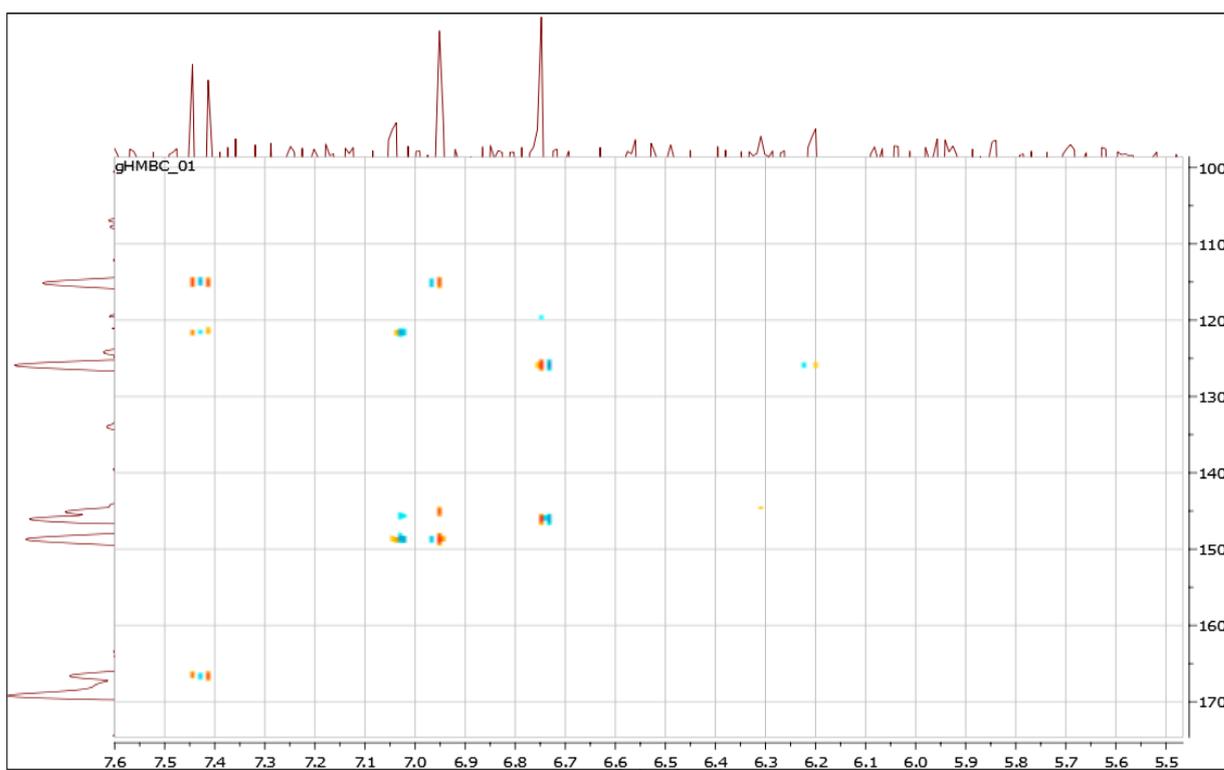


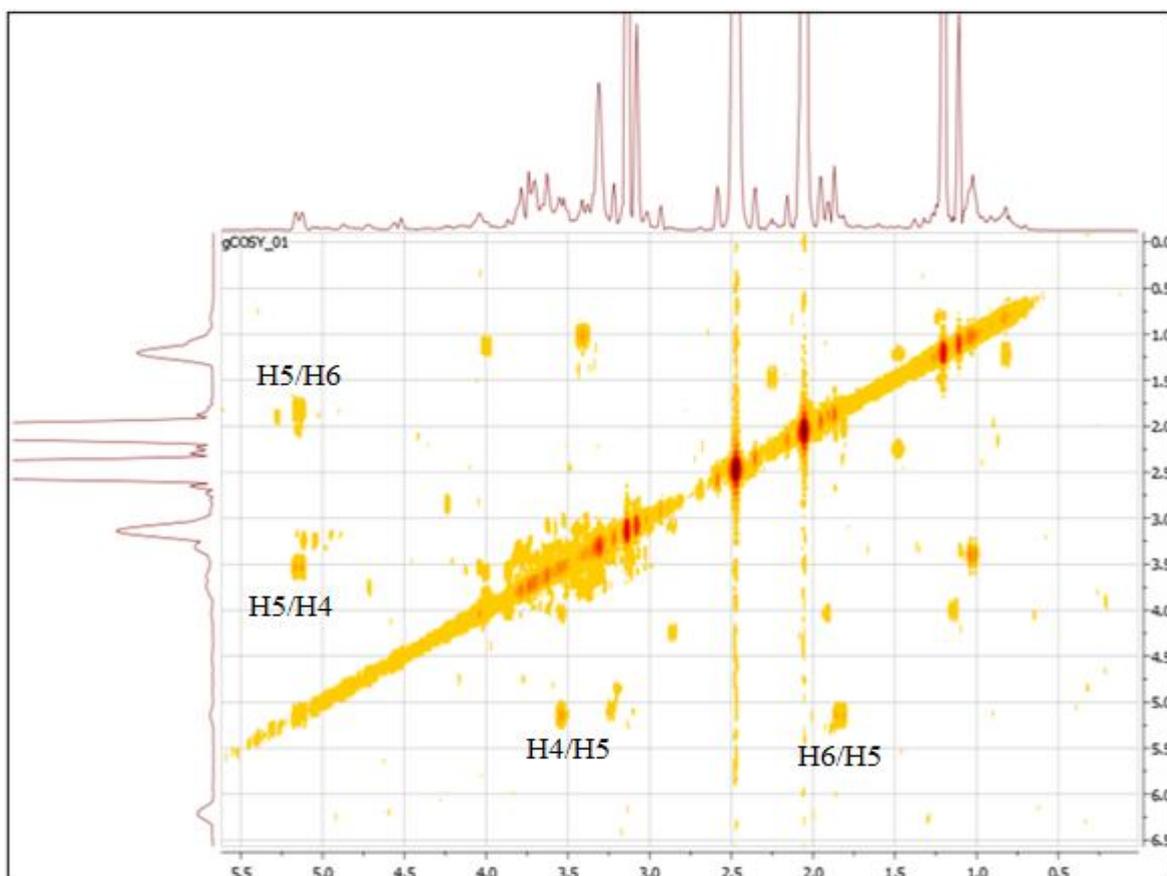
Figure III. 58: Spectre de HMBC du composé CP13 étalé de 5,5 à 7,6 ppm.

Une lecture attentive du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure IV.52) permet l'observation d'autres signaux dans la zone des champs forts caractéristiques d'un acide quinique reconnaissable par [26]:

- Un triplet large ( $J=10$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5,15$  ppm attribuable à H-5 corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone C-5 à  $\delta_{\text{C}} = 71,3$  ppm.
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 4,05$  ppm et montre une tache de corrélation avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 71,9$  ppm.
- Un doublet large ( $J=7,8\text{Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 3,55$  ppm corrèle avec son carbone à  $\delta_{\text{C}} = 73,9$  ppm.
- Un massif d'intégration 4H se trouvant dans l'intervalle 1,92-1,84 ppm attribuables à H<sub>2</sub>-6 et H<sub>2</sub>-2.

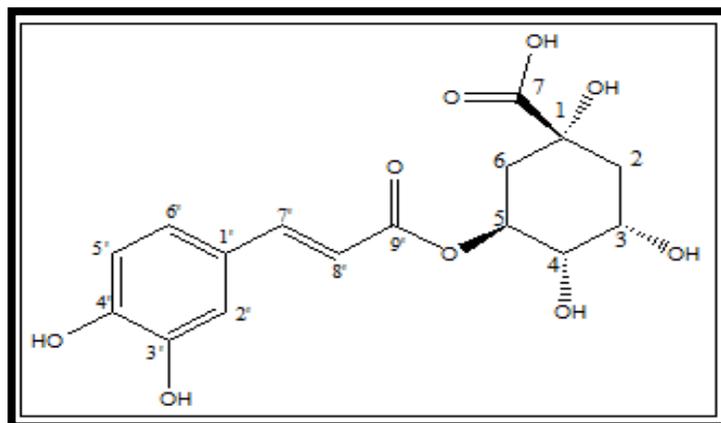
L'analyse du spectre COSY permet de localiser les protons du cycle quinique partant de H5 à  $\delta_{\text{H}} = 5,15$  ppm. En effet, le H5 montre deux taches de corrélation, la première avec le signal à  $\delta_{\text{H}} = 3,55$  ppm permet son attribution à H-4 (C4 à  $\delta_{\text{C}} = 73,9\text{ppm}$ ) et la deuxième avec deux signaux à  $\delta_{\text{H}} = 1,93$  ppm et l'autre recouvert par le signal du solvant qui ne peuvent être que H6-a et H6-b. Le H4 permet la localisation de H3 à  $\delta_{\text{H}} = 4,05$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 71,9$  ppm).

La valeur du déplacement chimique de H-5 suffit pour placer le groupement caféoyle en C-5 [26].



**Figure III. 59:** Spectre de COSY du composé CP13 étalement de l'unité acide quinique

Par ailleurs, ces données complétées par celles de la littérature permettent de confirmer la structure de l'acide chlorogénique [26].



**Acide 5-*O*-cafféoylquinique** ou **Acide chlorogénique**

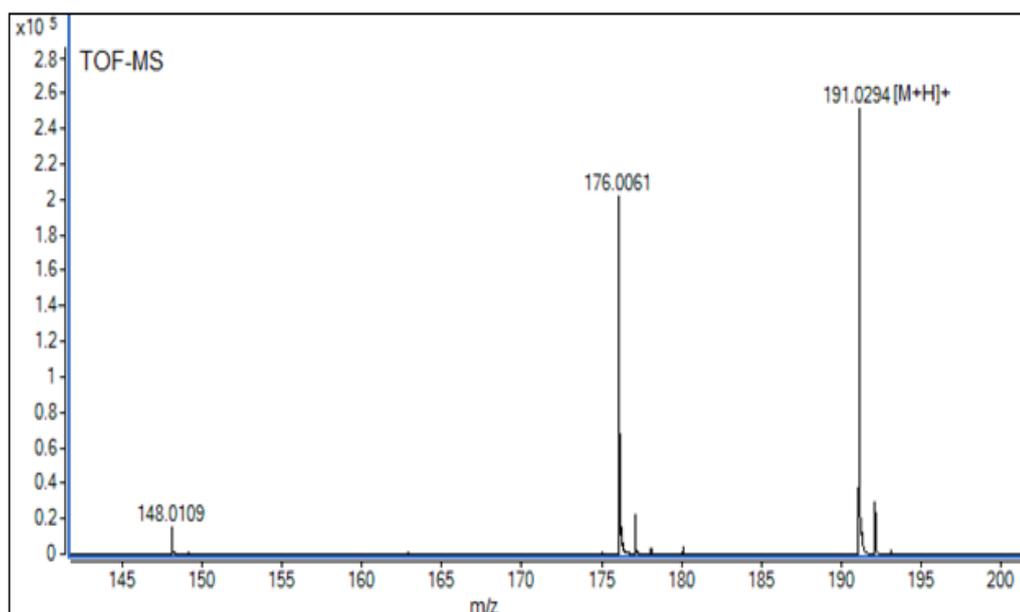
Les données spectrales du composé CP13 comparées avec celles de la littérature sont rassemblées dans le tableau IV.11

**Tableau IV.11:** Données des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP13

Position	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (int., m., $J$ Hz)	$\delta_c$ ppm Ref 26	$\delta_H$ ppm (int., m., $J$ Hz) Ref 26
1	74,1	-	76,1	
2	37,3	1,84-1,92 (2H, <i>m</i> )	38.2	1.92–1.98 (2H, <i>m</i> )
3	71,9	4,04 (1H, <i>m</i> )	71.3	4.10 (1H, <i>m</i> )
4	73,9	3,55 (1H, <i>m</i> )	72.0	3.67 ( <i>m</i> )
5	71,3	5,15 <i>t</i> large (10,2)	73.5	5.36 (1H, <i>m</i> )
6	39,1	1,84-1,92 (2H, <i>m</i> )	38.8	2.11 (2H, <i>m</i> )
7	177,7	-	177.0	-
1'	125,9	-	127.8	-
2'	115,2	7,03 (1H, <i>s</i> large)	115.2	7.04 (1H, <i>d</i> , 1.81)
3'	146,0	-	147.1	-
4'	148,8	-	149.6	-
5'	116,2	6,74 (1H, <i>d</i> , $J = 7,2$ )	116.5	6.76 (1H, <i>d</i> , 8.16)
6'	121,3	6,95 (1H, <i>d</i> large, $J = 7,2$ )	123.0	6.94 (1H, <i>dd</i> , 1.82, 8.12)
7'	145,2	7,44 (1H, <i>d</i> , $J = 16$ )	146.8	7.56 (1H, <i>d</i> , 15.9)
8'	114,9	6,21 (1H, <i>d</i> , $J = 16$ )	115.1	6.28 (1H, <i>d</i> , 15.9)
9'	166,7	-	168.7	-

#### IV.1.1.10 Détermination de la structure du composé CP14

Le composé CP14 se présente sous forme d'aiguilles incolores soluble dans le DMSO. Ce composé est de couleur bleue fluorescente sous UV à 365 nm, qui devient bleu-verdâtre après révélation. Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation négatif (TOF-HRESI-MS négative), présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z = 191,0294$   $[M-H]^-$ , correspondant à la formule moléculaire  $C_{10}H_8O_4$  soit un composé à sept insaturations. (Figure IV.60).



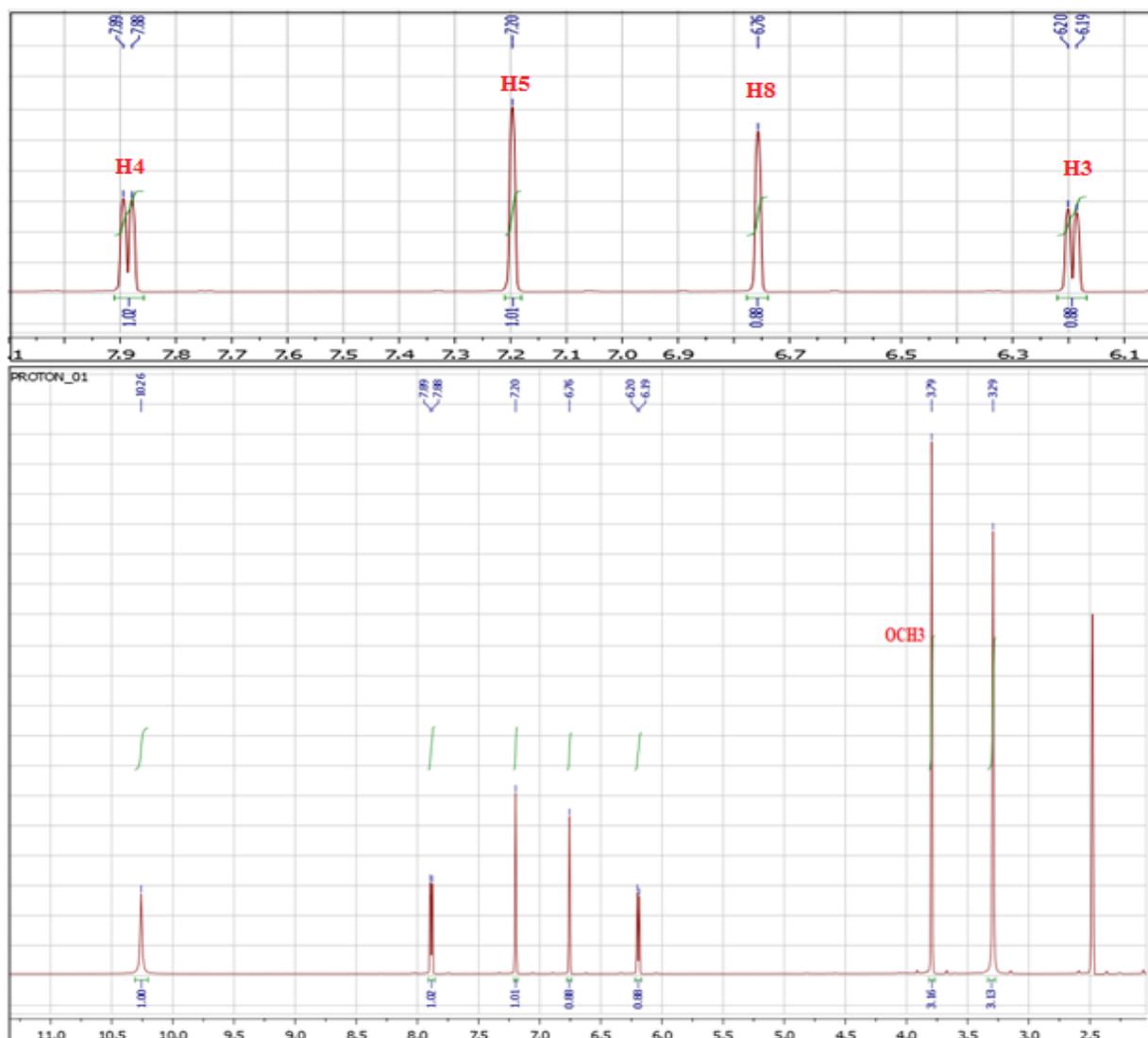
**Figure IV.60:** Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP14.

Le spectre de masse montre un pic à  $m/z = 176,0061$  correspondant à  $[M-CH_4]^-$  et un autre pic à  $m/z = 148,0109$  correspondant à  $[M-CH_4-CO]^-$ . Ceci indique clairement la présence d'un  $CH_3$  et d'un groupement carbonyle dans la molécule.

L'analyse du spectre RMN  $^1H$  (Figure IV.61) montre la présence d'un ensemble de signaux caractéristiques d'un squelette de type coumarine simple reconnaissable par:

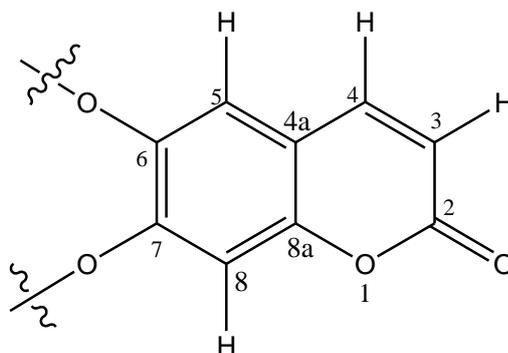
- Deux doublets ( $J=9\text{Hz}$ ) d'intégration 1H chacun, le premier  $\delta_H=7,88$  ppm et le second à  $\delta_H=6,19$  ppm correspondants aux deux protons oléfiniques H-4 et H-3 respectivement indiquant la non substitution du cycle pyrone.
- Dans la région des protons aromatiques apparaissent deux singulets attribués aux protons H-5 et H-8 à  $\delta_H = 7.20$  et  $6.76$ , respectivement. La multiplicité de ces deux signaux indique clairement la substitution des positions 6 et 7.
- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta_H = 3,79$  ppm confirmant la présence du groupement méthoxyle dans la molécule.

- On observe également sur ce même spectre un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 10,2$  ppm indiquant la présence d'un groupement hydroxyle OH.



**Figure IV.61:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) du composé CP14.

Ces données permettent de déduire qu'il s'agit d'une coumarine simple substituée en position C6 et C7 dont le squelette est présenté dans la figure IV.62



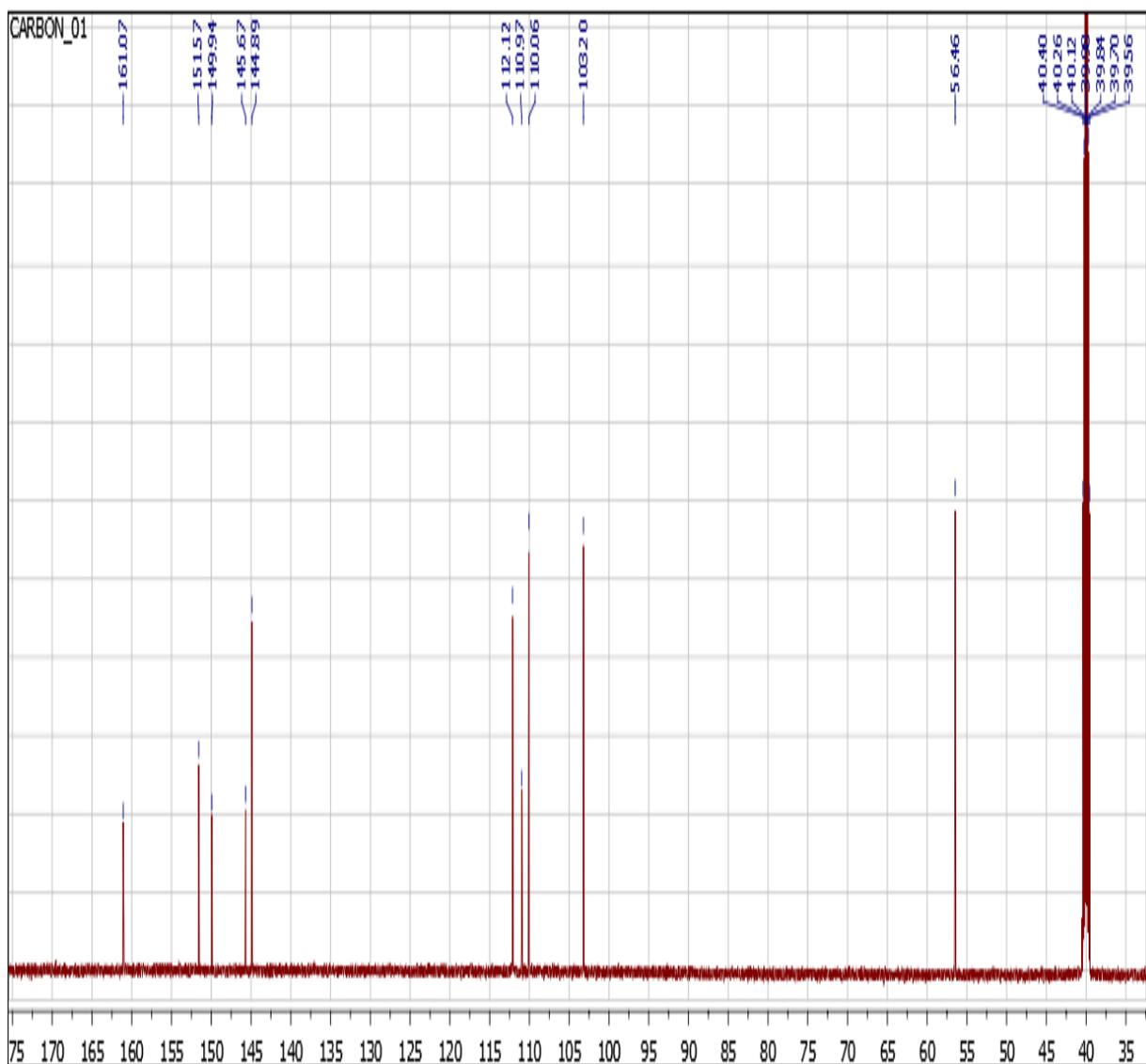
**Figure IV.62:** Structure partielle du Composé CP14

L'analyse simultanée des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure IV.63) et ses séquences DEPT (Figure IV.64) ainsi que le spectre HSQC (Figure IV.65) confirme le squelette de la coumarine et permet d'établir les attributions des protons à leurs carbones respectifs.

Le signal relatif au groupement  $\text{CH}_3$  à  $\delta_{\text{H}}=3,79$  ppm attribuable au carbone à  $\delta_{\text{C}}=56,5$ ppm.

Les deux protons oléfiniques H-4 ( $\delta_{\text{H}}=7,88$  ppm) et H-3 ( $\delta_{\text{H}}=6,19$ ppm) corrélient aux deux carbones à  $\delta_{\text{C}}=144,9$  ppm et à  $\delta_{\text{C}}=112,1$ ppm respectivement.

De même, les protons H-5 ( $\delta_{\text{H}}=7,20$  ppm) et H-8 ( $\delta_{\text{H}}=6,75$  ppm) montrent une tache de corrélation avec leurs carbone à  $\delta_{\text{C}}=110,1$ ppm et  $\delta_{\text{C}}=103,2$ ppm respectivement.



**Figure IV.63:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé CP14 (150 MHz, DMSO- $d_6$ ).

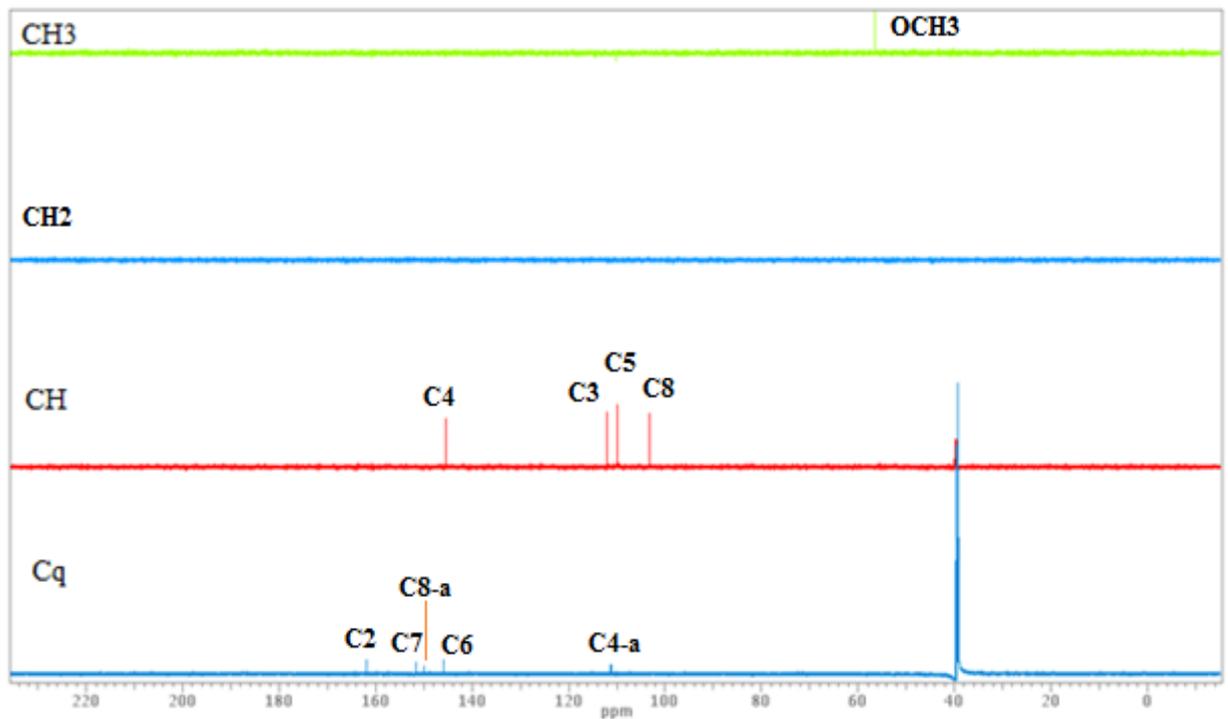


Figure IV.64: Spectre RMN de DEPT du composé CP14

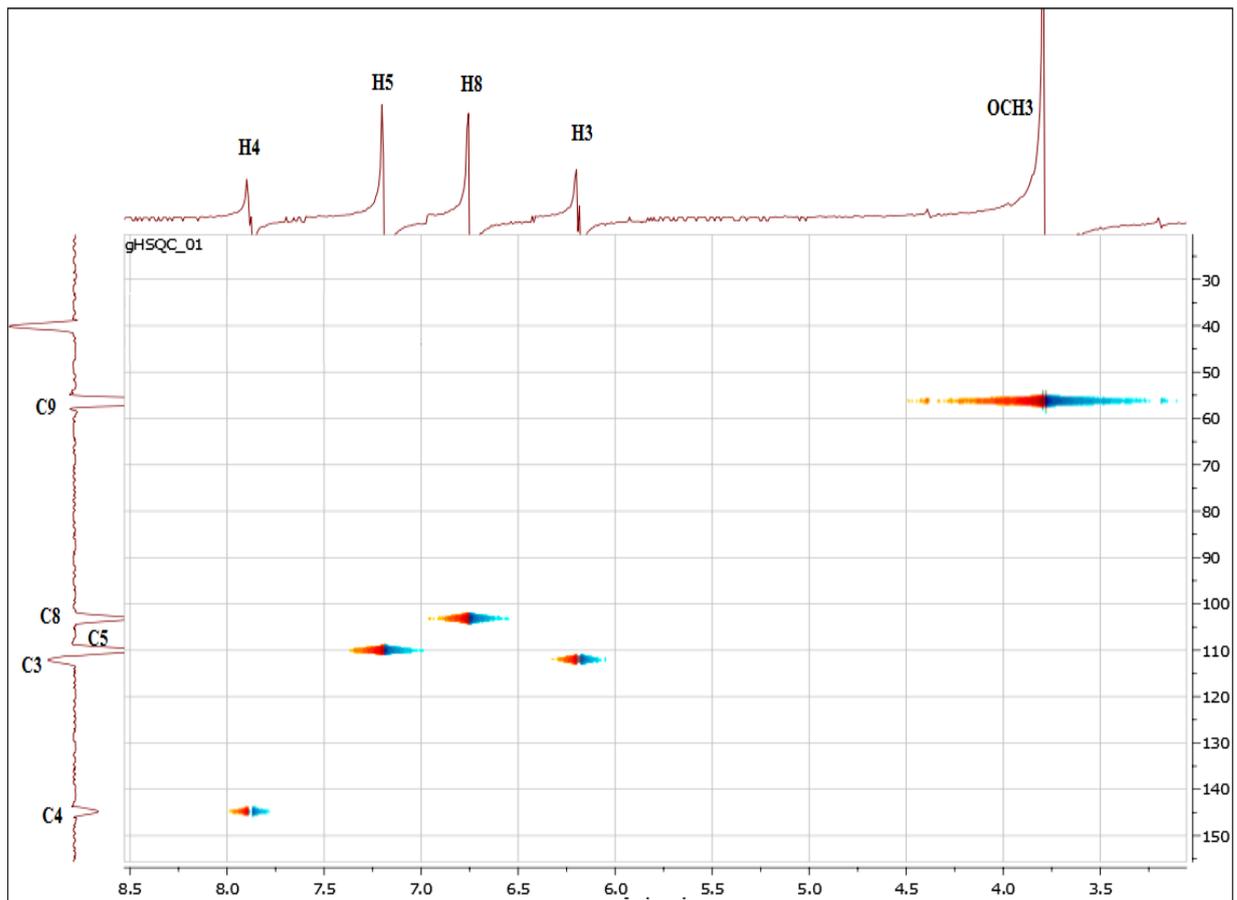


Figure IV.65: Spectre HSQC du composé CP14

Pour placer les deux groupements méthoxyle et hydroxyle sur le squelette de la coumarine, nous avons examiné le spectre HMBC (Figure IV.66). Celui-ci montre les corrélations suivantes :

Le proton H-3 montre les taches de corrélation avec :

- le signal à  $\delta_C = 161,1$  ppm qui ne peut être que le carbone du carbonyle de la coumarine.
- le carbone à  $\delta_C = 111,0$  ppm attribuable à C-4a.

Le proton H-4 montre trois taches de corrélation avec :

- le signal à  $\delta_C = 110,1$  ppm attribuable au carbone C-5 déjà établi à partir du spectre HSQC.
- le carbone à  $\delta_C = 149,9$  ppm qui ne peut être que le carbone aromatique oxygéné C-8a.
- le carbone à  $\delta_C = 161,1$  ppm attribuable au carbone du carbonyle.

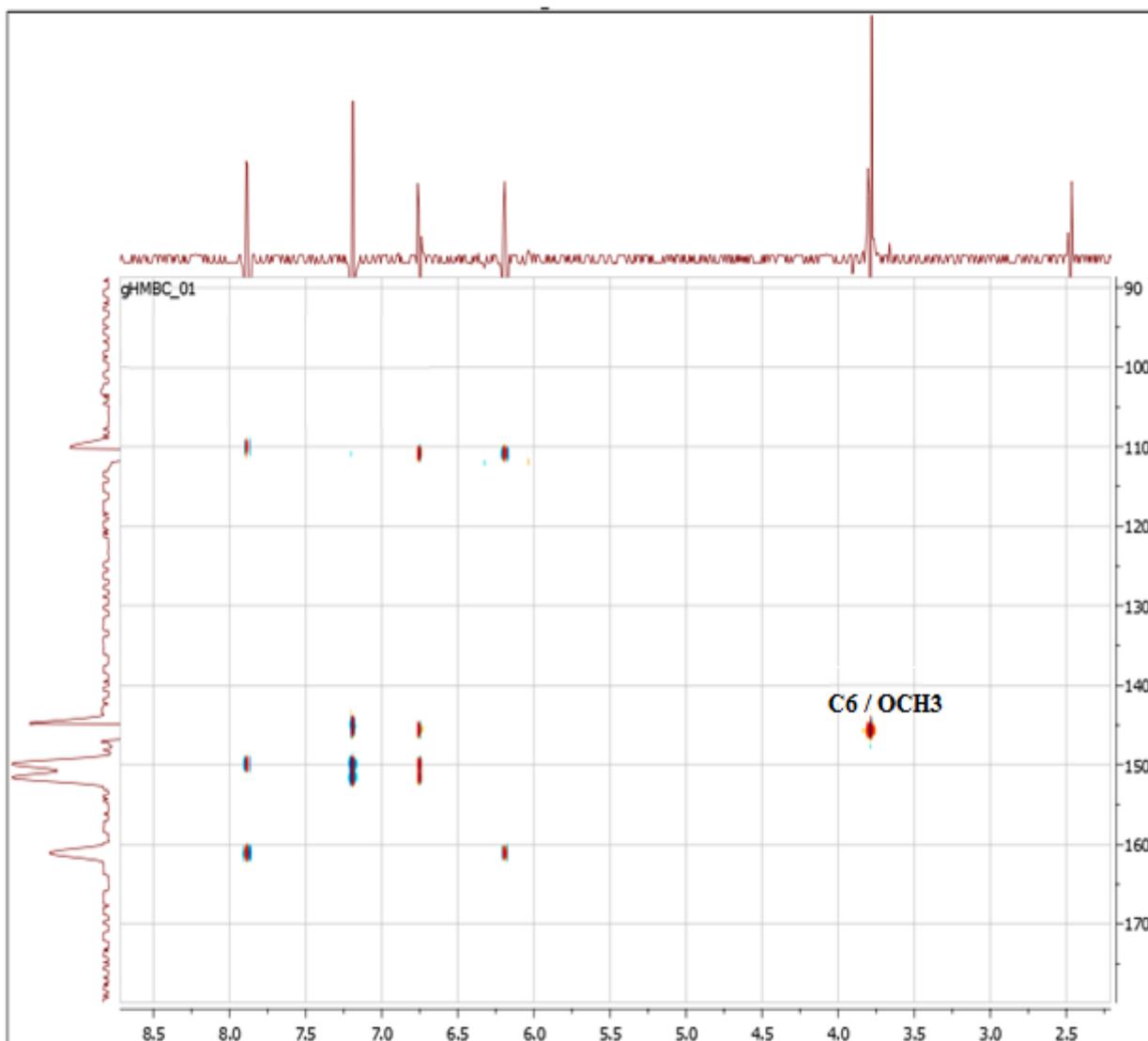
Le proton H-5 montre les taches de corrélation avec :

- le signal à  $\delta_C = 144,9$  attribuable au C-4 (déjà établi par HSQC).
- le signal à  $\delta_C = 149,9$  attribuable au C-8a.
- le signal à  $\delta_C = 151,6$  ppm attribuable au carbone aromatique oxygéné C7.

Le proton H-8 montre les corrélations avec :

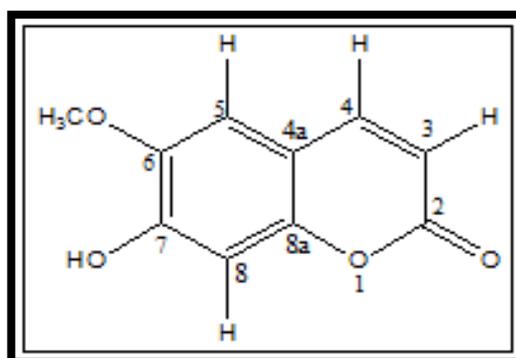
- le carbone à  $\delta_C = 111,0$  ppm attribuable à C-4a.
- les deux carbones à  $\delta_C = 149,9$  et  $151,6$  ppm attribuable aux carbones C8a et C7 respectivement.
- Le signal à  $\delta_C = 145,7$  ppm qui ne peut être attribué qu'au deuxième carbone aromatique oxygéné C6.

Toujours le spectre HMBC montre une tache de corrélation nette entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone à  $\delta_C = 145,7$  ppm, cette constatation permet l'emplacement de ce groupement sur le carbone C6 et de ce fait le groupement hydroxyle ne peut être porté que par le carbone C-7.



**Figure IV.66:** Spectre RMN de HMBC du composé CP14

Toutes ces données comparées avec celles de la littérature [27] mènent à la 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine connu sous le non de scopolétine reportée ci-dessous.



**Scopolétine: 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine**

La **scopolétine** est une coumarine rencontrée chez plusieurs espèces appartenant à plusieurs genres de différentes familles. Du genre *Centaurea* (Asteraceae), elle a été isolée de *C. acaulis* [27].

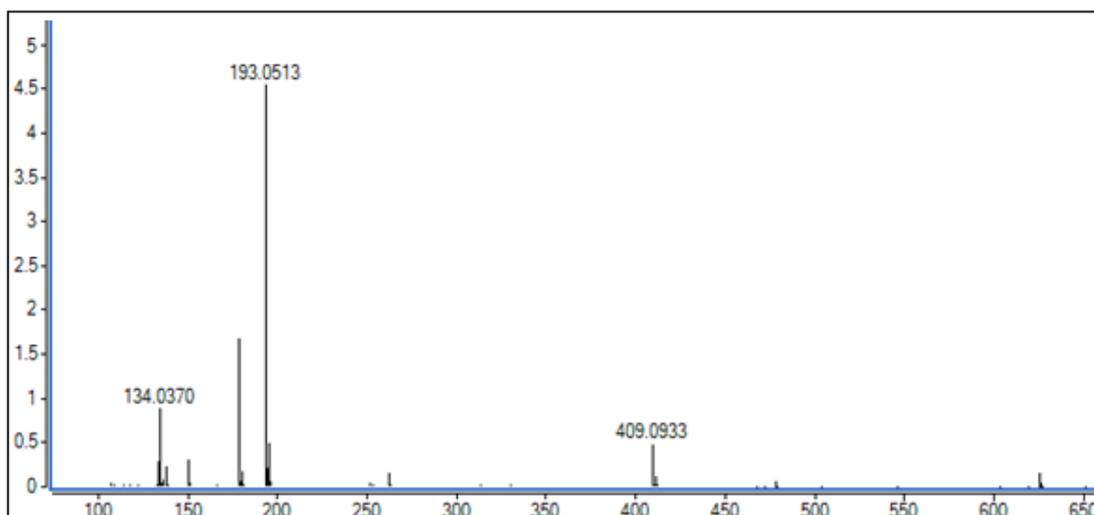
Les données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont reportées dans le tableau IV.12.

**Tableau IV.12:** Données du spectre de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT de CP14

Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) [28]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) [28]
C2	-	161,1	-	161,5
C3	6,19 ; d (9)	112,1	6,25; d (9)	107,6
C4	7,88 ; d (9)	144,9	7,84 ; d (9)	143,7
C4-a	-	111,0	-	111,5
C5	7,20, s	110,0	7,19 ; s	113,4
C6	-	145,7	-	144,1
C7	-	151,6	-	150,3
C8	6,75, s	103,2	6,78 ; s	103,2
C8-a	-	149,9	-	149,8
C9	3,79, s	56,5	3,87 ; (s, 3H)	56,5

#### IV.1.1.11 Détermination structurale du composé CP15

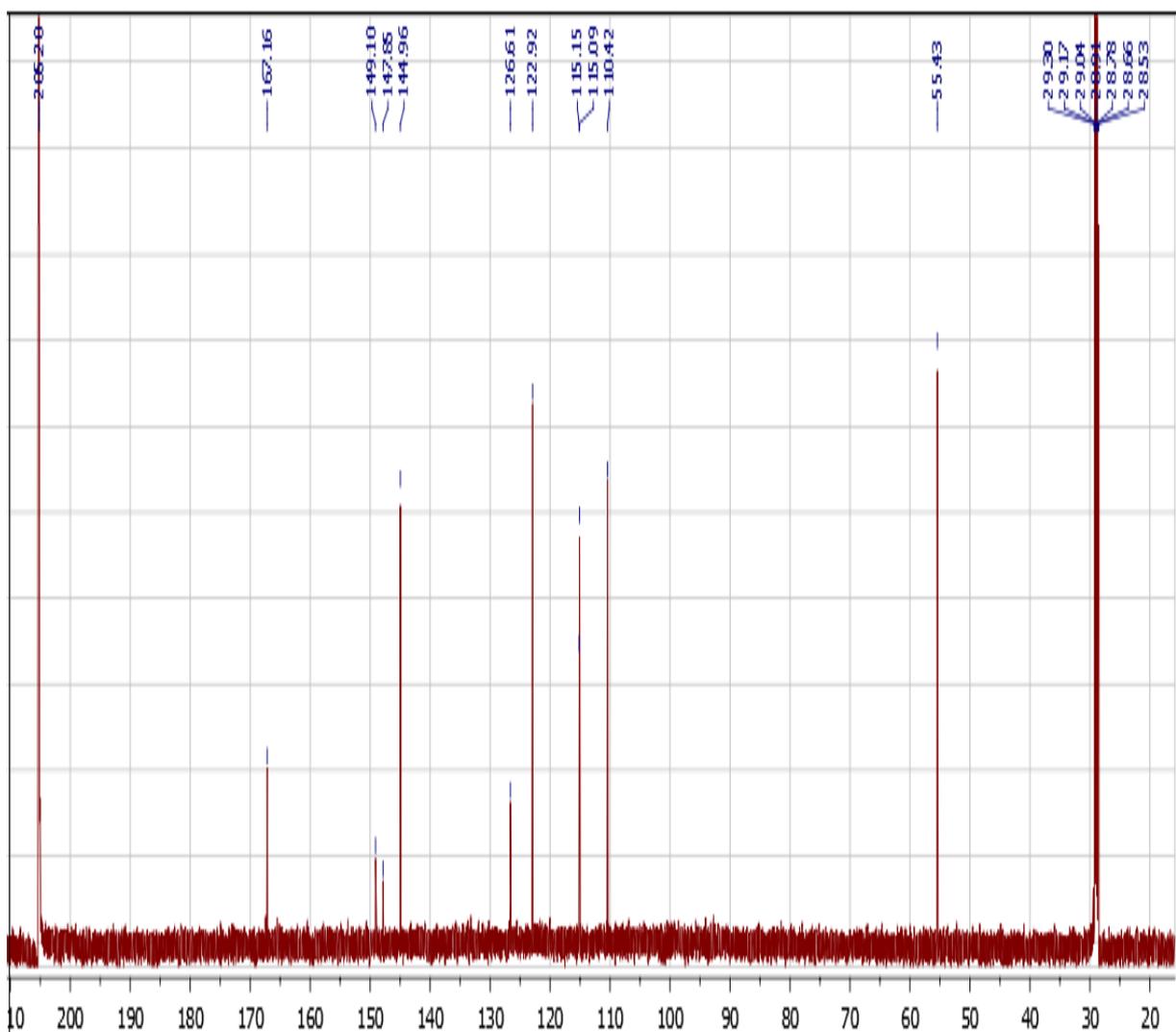
Le composé **CP15** se présente sous forme de cristaux blancs, soluble dans l'acétone et le DMSO. Sa couleur sous UV 320 nm est jaune claire. L'examen de son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronebulisation négatif (TOF-HRESI-MS (-)), (Figure IV.67) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^-$  à  $m/z=193,0513$  correspondant à la formule moléculaire  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$  et indiquant un nombre d'insaturation de six et un autre ion à  $m/z=409,0933$  correspondant à  $[\text{2M}+\text{Na}-\text{2H}]^-$ .

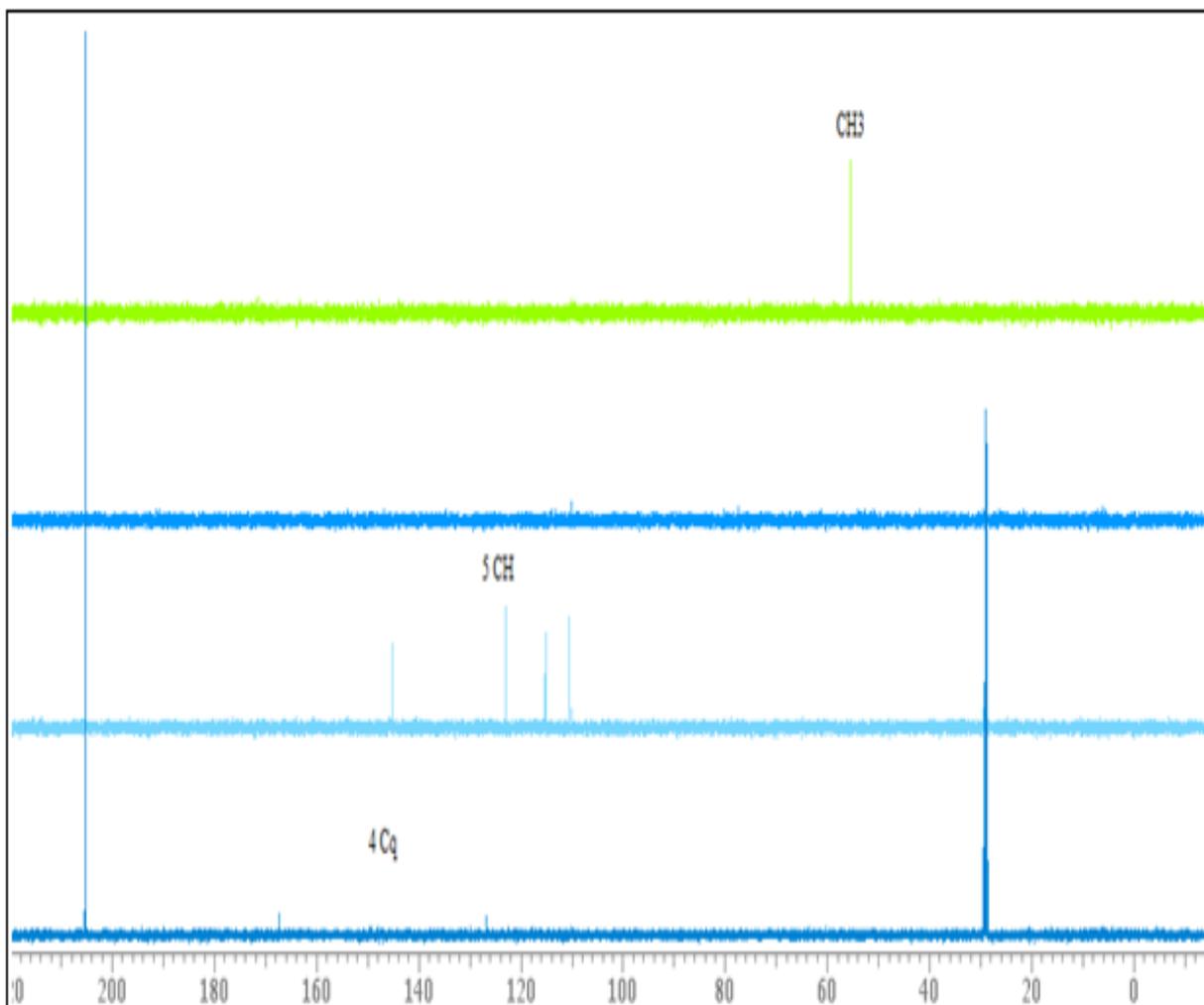


**Figure IV.67:** Spectre de masse TOF-MS en mode négatif du composé CP15.

L'analyse simultanée des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (figure IV.68) et DEPT (figure IV.69) confirme la présence de 10 atomes de carbone dans cette molécule et permet de les répartir comme suit:

- ✓ 1CH<sub>3</sub> dont le déplacement chimique est à  $\delta_{\text{C}}=55,4$  ppm indique la présence d'un groupement méthoxyle.
- ✓ 5CH dont 2CH éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}=144,9$  et 115,1 ppm et 3CH aromatiques à  $\delta_{\text{C}}=110,4$  ; 115,2 et 122,9 ppm.
- ✓ 4 Cq dont un Cq à  $\delta_{\text{C}}=167,16$  ppm caractéristique d'un groupement carbonyle, 2 Cq aromatique oxygénés à  $\delta_{\text{C}}=149,1$  et 147,9 ppm et en dernier 1 Cq aromatique non oxygéné  $\delta_{\text{C}}=126,6$  ppm.

**Figure IV.68:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé CP15 (150 MHz, acétone- $d_6$ ).



**Figure IV.69:** Spectre RMN DEPT du composé CP15 (150 MHz, acétone- $d_6$ ).

L'analyse des spectres RMN<sup>1</sup>H (figure IV.70) et HSQC (figure IV.71) permet de faire les attributions suivantes:

- ✓ Le carbone du groupement méthoxyle à  $\delta_c = 55,4$  ppm à son proton à  $\delta_H = 3,92$  ppm.
- ✓ Les CH à  $\delta_c = 144,9$  ppm et  $\delta_c = 115,1$  ppm à leurs protons respectifs: le premier à  $\delta_H = 7,59$  ppm qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet ( $J = 16,2$  Hz) d'intégration 1H. Le second à  $\delta_H = 6,37$  ppm, apparaît aussi sous forme d'un doublet ( $J = 16,2$  Hz) d'intégration 1H. la valeur de la constante de couplage de ces deux protons ainsi que les valeurs de leurs déplacements chimiques indiquent clairement la présence d'une double liaison éthylénique de configuration *trans* dans la molécule.
- ✓ Les CH à  $\delta_c = 110,4$  ;  $115,2$  et  $122,9$  ppm à leurs protons respectifs: le premier à  $\delta_H = 7,33$  ppm, celui-ci apparaît sous forme d'un singulet large d'intégration 1H. le second à  $\delta_H = 6,87$  ppm, apparaît sous forme d'un doublet large ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H et

le dernier à  $\delta_{\text{H}} = 7,14$  ppm apparait aussi sous forme d'un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H.

Les valeurs des déplacements chimiques de ces 3 protons ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un cycle aromatique trisubstitué en méta et en para.

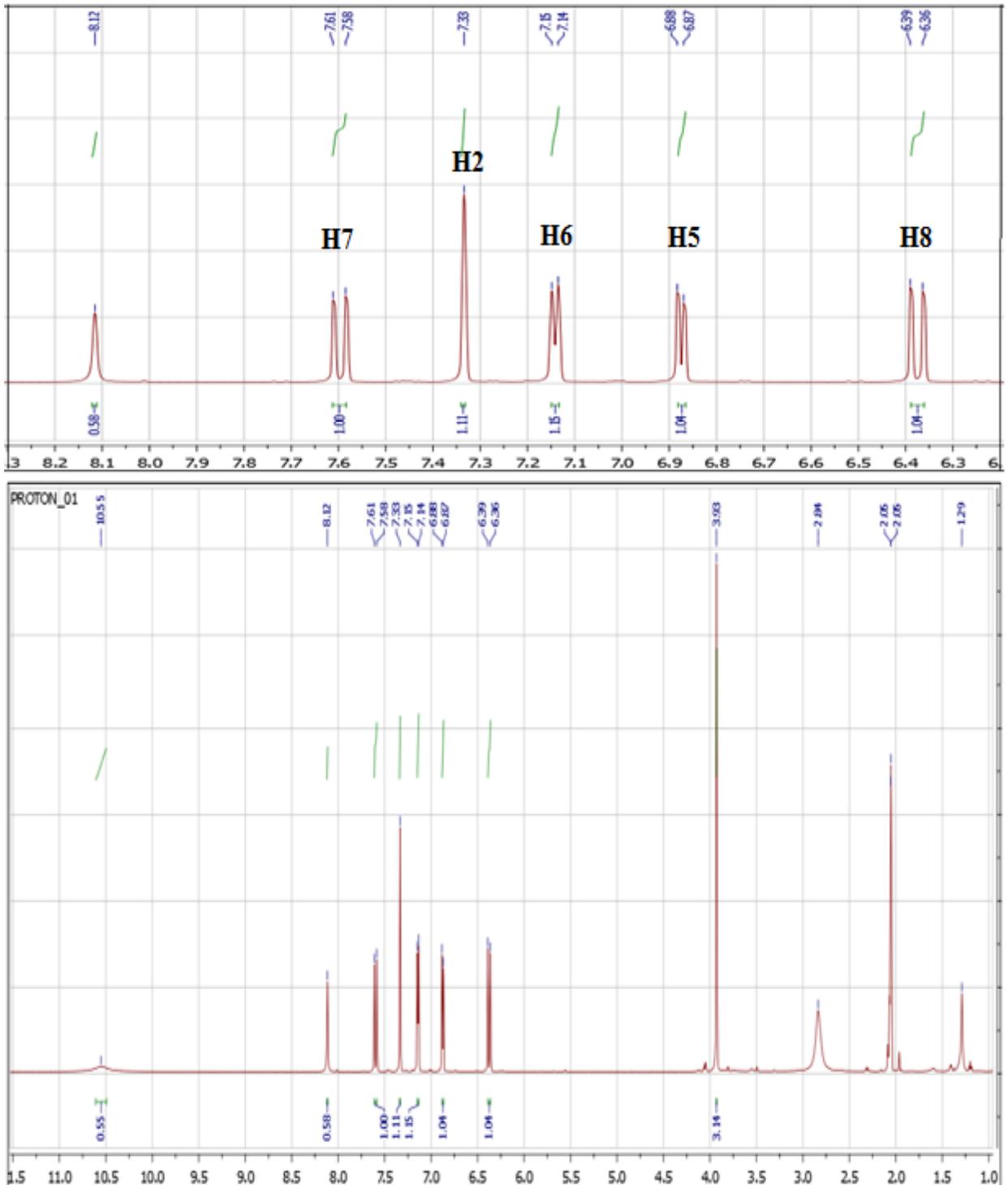
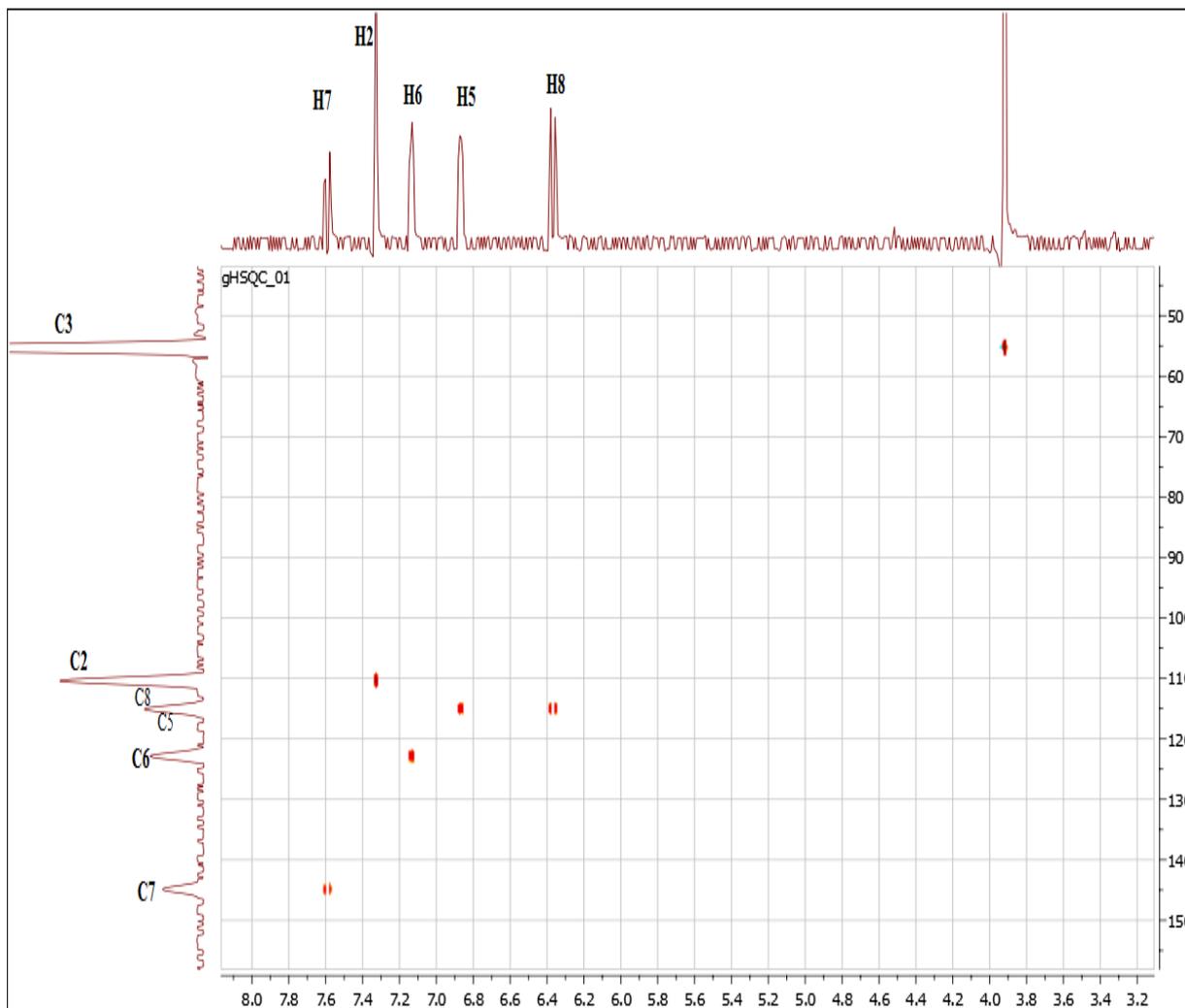


Figure IV.70: Spectre RMN de <sup>1</sup>H du composé CP15 (600 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>)



**Figure IV.71:** Spectre HSQC du composé CP15

L'ensemble de ces données nous oriente vers la présence des entités suivantes dans la molécule, à savoir :

- ✓ Un cycle aromatique trisubstitué portant 2Cq oxygénés et 1Cq non oxygéné
- ✓ Une double liaison éthylénique de configuration *trans*
- ✓ Un groupement carbonyle
- ✓ Un groupement méthoxyle

L'analyse du spectre HMBC (figure IV.72 et IV.73) montre une tache de corrélation nette entre le premier proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}=7,59$  ppm ( $\delta_{\text{C}}=144,9$ ) et le carbone du carbonyle à  $\delta_{\text{C}}=167,2$  ppm et une autre tache entre le deuxième proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}=6,37$  ppm ( $\delta_{\text{C}}=115,1$ ) et le carbone aromatique quaternaire non oxygéné à  $\delta_{\text{C}}=126,6$ .

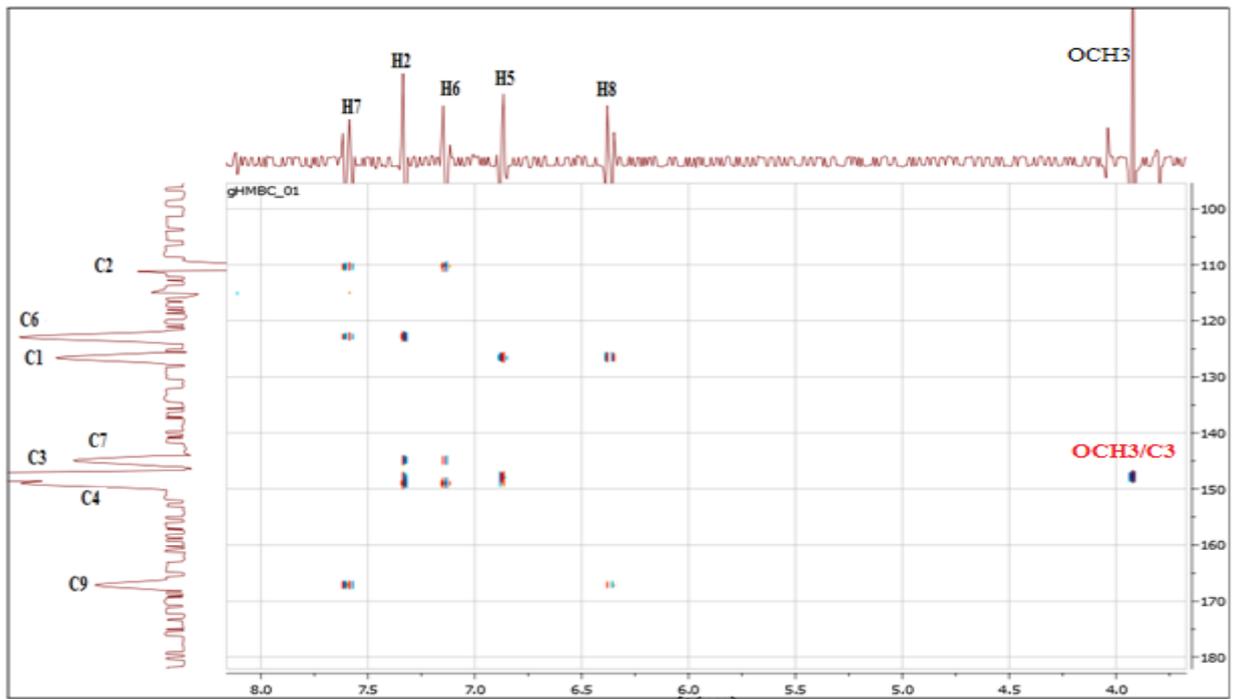


Figure IV.72: Spectre HMBC du composé CP15

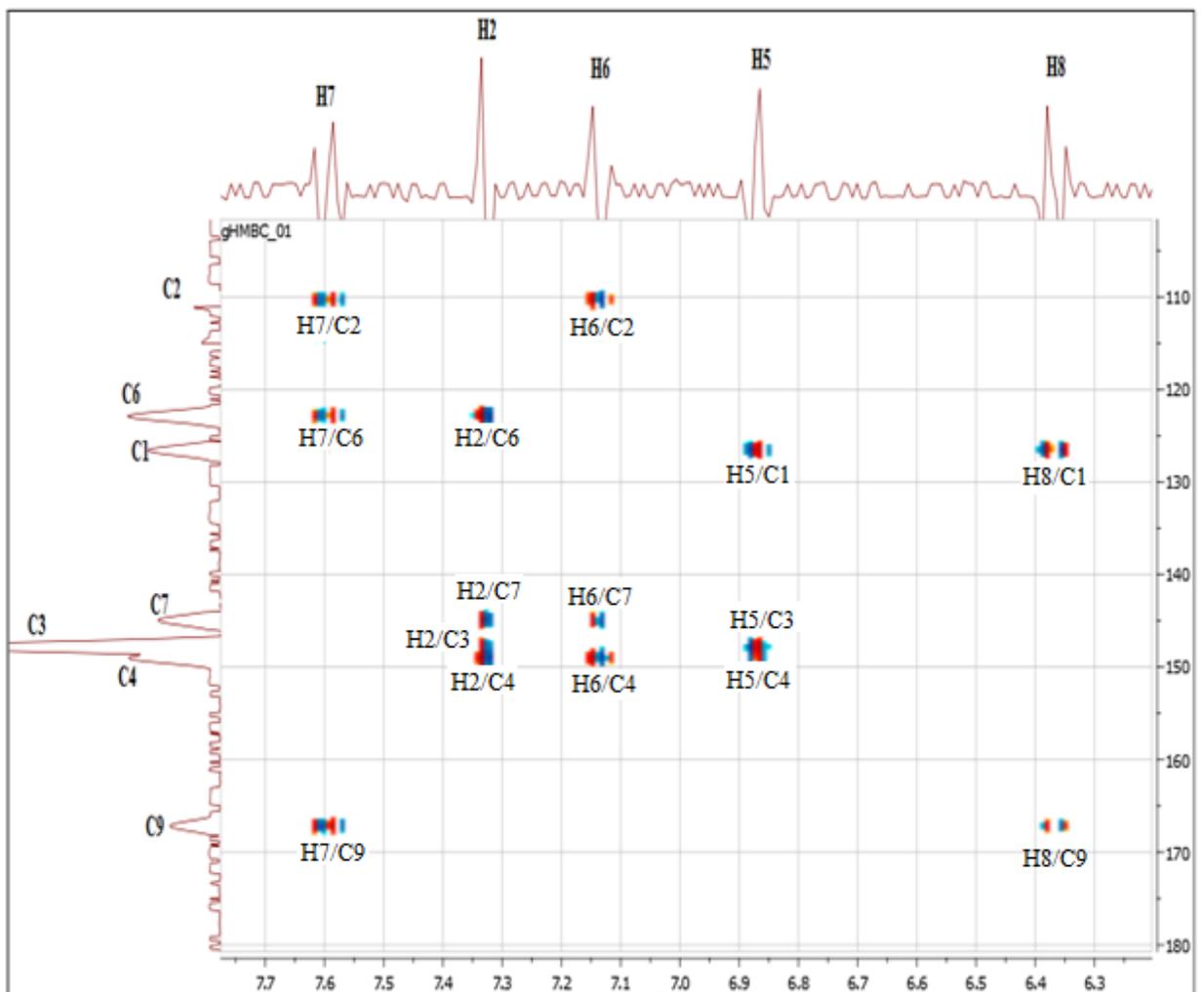
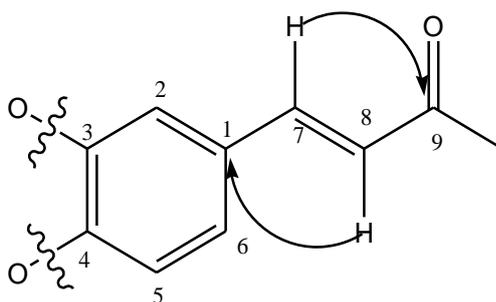


Figure IV.73: l'étalement de Spectre HMBC du composé CP15

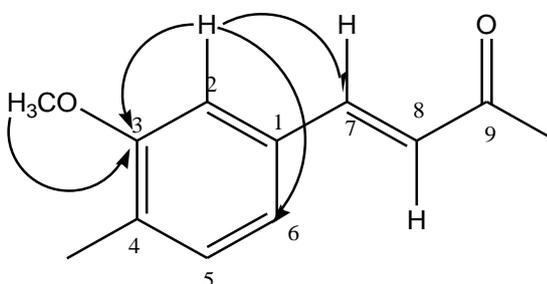
Ces deux corrélations indiquent clairement que la double liaison de configuration *trans* est liée d'une part au groupement carbonyle et d'autre part au cycle aromatique, ce qui oriente vers la présence d'un dérivé de l'acide cinnamique. La numérotation du cycle aromatique se fera à partir de ce carbone quaternaire porteur de la double liaison C1, nous pouvons donc numéroté le CH lié au cycle aromatique par C7 et le deuxième CH par C8, alors que le carbone du carbonyle sera numéroté C9. Les carbones du cycle aromatique seront numérotés grâce à la multiplicité de leurs protons. Ces données permettent de proposer la structure partielle reportée dans la figure IV.74.



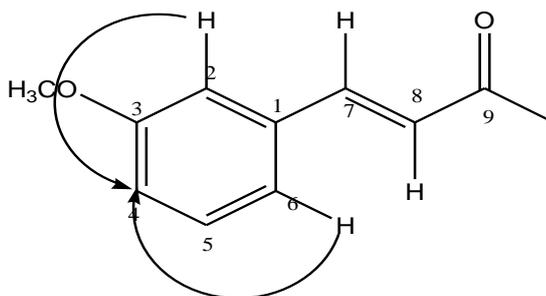
**Figure IV.74:** structure partielle du composé CP15

Un réexamen du spectre HMBC (figure IV.72 et IV.73) permet d'attribuer le reste des carbones aromatiques grâce aux taches de corrélations. En effet, le H2 ( $\delta_H = 7,33\text{ppm}$ ,  $\delta_C = 110,4\text{ppm}$ ) montre deux taches de corrélation, une première avec le carbone à  $\delta_C = 144,9$  confirmant l'attribution de C-7 et la deuxième avec le carbone à  $\delta_C = 122,9$  ppm attribuable à C6.

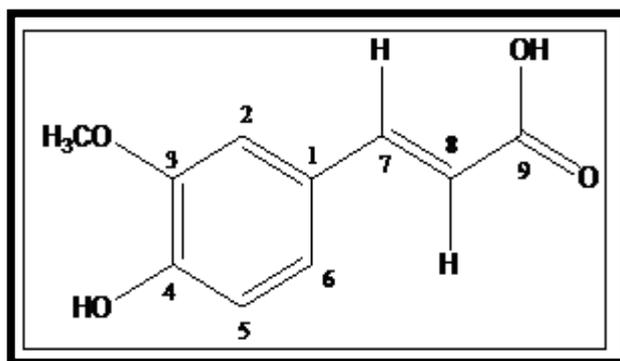
De même, ce H2 montre une tache de corrélation avec le carbone aromatique oxygéné à  $\delta_C = 147,9$  ppm attribuable à C3. Ce même carbone ( $\delta_C = 147,9$  ppm) montre à son tour une tache de corrélation avec les 3H du groupement méthoxyle permettant l'emplacement de ce dernier sur ce carbone.



Le deuxième Cq aromatique oxygéné  $\delta_C = 149,1$  ppm ne peut être attribué qu'au carbone C4 grâce aux taches de corrélation d'une part avec le H2 ( $\delta_H = 7,33\text{ppm}$ ,  $\delta_C = 110,4\text{ppm}$ ) et d'autre part avec le H6 ( $\delta_C = 7,14$  ppm;  $\delta_C = 122,9$ ).



Un décompte du nombre total des atomes mène à la formule  $C_{10}H_8O_2$  soit le manque de deux groupements hydroxyles et qui ne peuvent être placés que sur le groupement  $C=O$  (fonction acide carboxylique) pour le premier et qu'en position  $C_4$  du cycle aromatique pour le second. Ceci mène au composé acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique connu sous le nom d'acide férulique reporté ci-dessous.



Acide férulique

L'acide férulique est un acide phénolique qui possède des propriétés antioxydantes [28].

Tableau IV.13: Données du spectre RMN  $^1H$  et RMN  $^{13}C$  du produit CP15

Position	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (integration, m., J en Hz)
1	126,6	-
2	110,4	7,33 (1H, s large)
3	149,1	-
4	147,9	-
5	115,2	6,87 (1H, d 8,4 Hz)
6	122,9	7,14 (1H, d 8,4 Hz)
7	144,9	7,59 (1H, d 16 Hz)
8	115,1	6,37 (1H, d 16 Hz)
9	167,2	-
10	55,4	3,92 (3H, s)

#### IV.1.4.4 Interprétation des résultats des HE des fleurs de *C. choulettiana*

L'étude bibliographique menée sur cette espèce, révèle que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude comportant la composition chimique de l'huile essentielle, ceci nous a encouragés à entreprendre cette étude.

L'huile essentielle obtenue des fleurs avait un rendement de 0.02%. Elle était de couleur jaune et possédait une odeur spécifique.

Cette huile a été analysée par GC-FiD et GC/MS en utilisant une colonne capillaire de type HP-5. Les composés identifiés ont été cités par ordre d'élution dans la colonne HP-5, leurs indices de rétention et leurs pourcentages sont présentés dans le Tableau IV.13. Les composés sont classés par ordre de leur indice de rétention (IR).

L'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* est constituée d'un mélange de cinq groupes chimiques. L'analyse de cette l'huile a permis l'identification de 40 composés avec un pourcentage de 75,49 % dominée par les sesquiterpènes avec un pourcentage de 32.62%.

Les principaux constituants de cette huile sont les phtalates (18,38%), les sesquiterpènes comme constituants majoritaires avec un pourcentage de 32,62% dont les sesquiterpènes oxygénés constituent le groupe le plus abondant (29,21%), alors que les hydrocarbures saturés ne sont présents qu'avec un pourcentage de 14,85%. Le groupe des composés carbonylés est présent avec un pourcentage faible (6,22%), tandis que les monoterpènes oxygénés sont présents seulement avec un taux de 3,42%.

Cependant, les sesquiterpènes oxygénés les plus abondants dans cette huile essentielle sont : le  $\beta$ -eudesmol (6,8%), le 1,5-epoxysalvial-4 (14)-ène (6,6%), l'oxyde de caryophyllène (4,28%) et l'epi- $\alpha$ -eudesmol (3,08%) respectivement. De même, les hydrocarbures les plus abondants sont : le tricosane (3,31%), l'heptacosane (3,06%) et le pentacosane (2,57%). Alors que les monoterpènes hydrocarbonés et les acides gras sont totalement absents de cette huile.

**Tableau IV.14:** Composition d'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana*

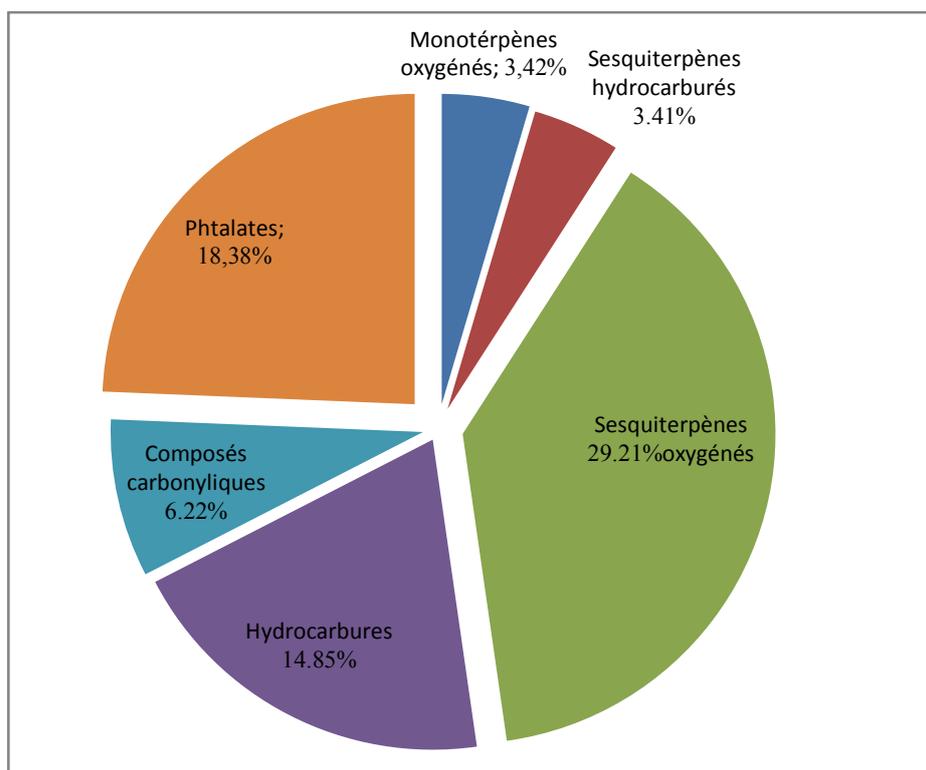
N°	Composés	<sup>a</sup> T <sub>R</sub>	<sup>b</sup> I <sub>R</sub>	%
1	Linalool	8.72	1097	0.43
2	Nonanal	8.76	1099	0.46
3	verbénol trans	9.65	1147	0.68
4	Safranal	10.49	1192	1.11
5	Decanal	10.60	1198	1.14
6	Verbénone	10.67	1202	0.75
7	4-méthylène isophorone	10.95	1217	0.46
8	tridécane-1-ène	12.16	1287	1.63
9	alpha copaène	13.69	1380	1.85
10	bétab caryophyllène	14.23	1414	0.51
11	10-epi-bétab-acoradiene	15.12	1472	0.58
12	Ar-curcumène	15.18	1476	0.47
13	pentadécane-1-ène	15.27	1482	0.78
14	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	16.62	1574	<b>6.60</b>
15	Spathulenol	16.66	1577	1.78
16	caryophyllène oxide	16.76	1584	<b>4.28</b>
17	salvial-4(14)-èn-1-one	16.90	1594	1.18
18	bétab oplopénone	17.06	1605	0.56
19	nor-copaanone	17.10	1609	0.91
20	humulène époxyde II	17.14	1611	0.88
21	epi-alpha muurolol	17.49	1638	0.87
22	bétab eudesmol	17.68	1652	<b>6.77</b>
23	7-epi- $\alpha$ -eudesmol	17.79	1661	<b>3.08</b>
24	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alpha-ol	18.17	1689	2.29
25	Pentadécane	18.44	1710	0.83
26	Hexadécane	19.76	1808	0.51
27	6,10,14-triméthyl-pentadécane-2-one	20.13	1838	2.87
28	Phthalate	20.43	1862	1.07
29	heptadécane + hexadécanoate de méthyle	21.01	1909	0.39
30	Phthalate	21.71	1968	<b>17.31</b>
31	Nonadécane	23.27	2104	0.41
32	Docosane	24.14	2184	0.24
33	tricosane-1-ène	24.91	2258	0.72
34	Tricosane	25.19	2284	<b>3.31</b>
35	Tétracosane	26.19	2383	0.61
36	Pentacosane	27.16	2483	2.57
37	Hexacosane	28.08	2581	0.22
38	Heptacosane	28.99	2672	<b>3.06</b>
39	Octacosane	29.85	2698	0.24
40	Nonacosane	30.69	2695	1.47

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres travaux portant sur les huiles essentielles provenant d'autres espèces du genre *Centaurea*. En effet, le  $\beta$ -eudesmol et l'oxyde de caryophyllène étaient les principaux constituants dans l'huile essentielle de plusieurs espèces du genre *Centaurea* telles que *C. mucronifera* (17,4% et 5,2%), respectivement [29], *C. aladaghensis* (11,8% et 7,5%), respectivement [30], *C. gracilenta* (12,8% et 6,7%), respectivement [31] et *C. ensiformis* (29,8 % et 7,6%), respectivement [32].

En outre, l'oxyde de caryophyllène a été rapporté comme composé principal (38,5%) de l'huile essentielle de *C. pullata* de l'Algérie [33]. D'autre part, il est intéressant de souligner que les monoterpènes hydrocarbonés étaient totalement absents de cette huile, ainsi que des huiles de *C. pullata* et *C. grisebachii subsp. grisebachii* [33].

Les acides gras étaient également absents de cette huile, tandis qu'ils étaient présents, en quantités considérables, dans d'autres espèces du genre *Centaurea* [34-35].

Le diagramme ci-dessous reporte les pourcentages des différents groupes chimiques présents dans l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana*.



**Figure IV.75:** Diagramme représentatif des pourcentages de différents groupes chimiques d'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana*

## Partie 2

### Résultats de l'étude phytochimique de *Centaurea fragilis* Dur.

#### IV.2.1 Détermination structurale du composé CP19

Le composé CP19 se présente sous forme de poudre jaune. La fluorescence sous la lumière UV (365nm) de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

Le spectre UV (figure IV.76) enregistré dans le méthanol donne deux bandes d'absorption dont la bande I se trouve à 349 nm indiquant un squelette de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

L'effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +50$  nm) observé sur le spectre après addition du réactif NaOH avec augmentation de son intensité comparativement à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en position 4'.

L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm suggère l'absence d'un OH libre en position 7. Cette hypothèse est confirmée en observant le faible déplacement de la bande II ( $\Delta\lambda = +2$  nm) enregistré sur le spectre en présence de NaOAc comparativement à celui du spectre MeOH.

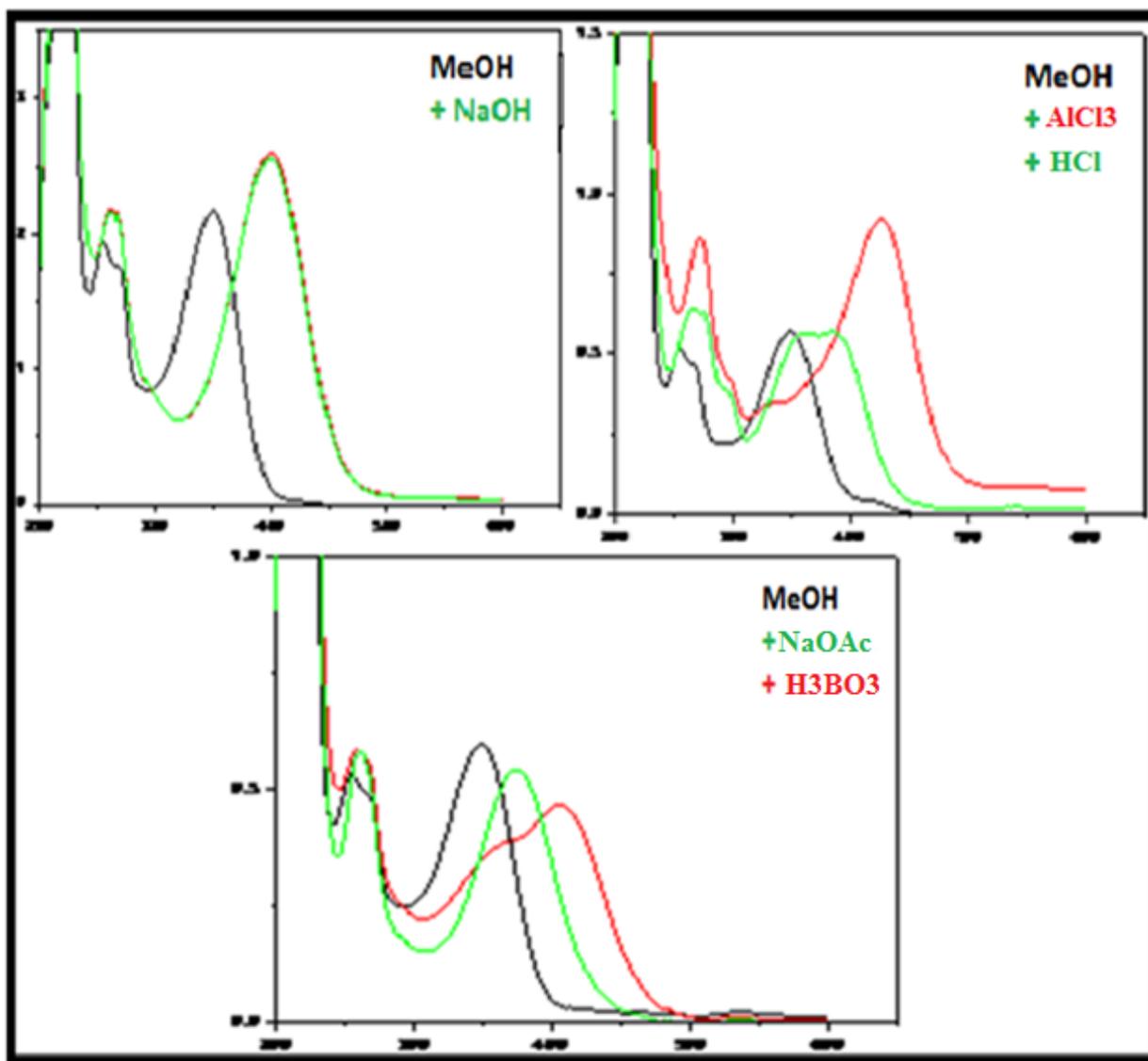
L'addition de  $H_3BO_3$  à la solution MeOH+NaOAc provoque un effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +25$  nm) indiquant la présence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B, ceci est confirmé par le déplacement hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = -39$  nm), observé sur le spectre enregistré en présence de  $AlCl_3+HCl$  comparativement à celui enregistré en présence de  $AlCl_3$ .

Le déplacement bathochromique de la bande I, ( $\Delta\lambda = +39$  nm), enregistré en présence de  $AlCl_3+HCl$  par rapport à celui observé sur le spectre enregistré dans le MeOH, indique la présence d'un groupement OH libre en position 5.

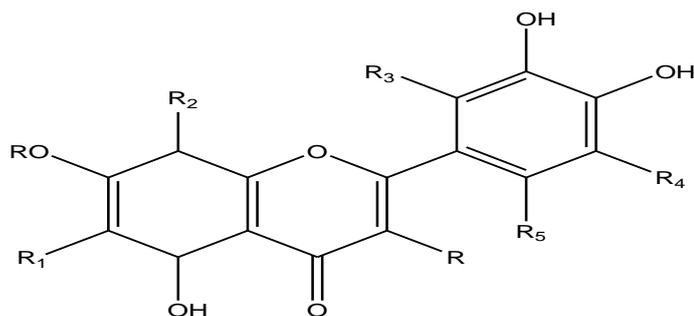
Toutes les données de la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV.15 et permettent de proposer la structure partielle reportée dans la Figure IV.75.

**Tableau IV.15:** Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\text{max}}$  nm) du composé CP19

réactifs	bande I (nm)	bande II (nm)	autres bandes	observations
MeOH	349	263		Flavone ou flavonol-3-OR
NaOH	399	261		4'-OH, 7-OR
NaOAc	405	261	303	7-OR
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	374	262		Présence de système ortho di-OH.
AlCl <sub>3</sub>	426	270	335	5-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl	388	269	356	Présence de système ortho di-OH.

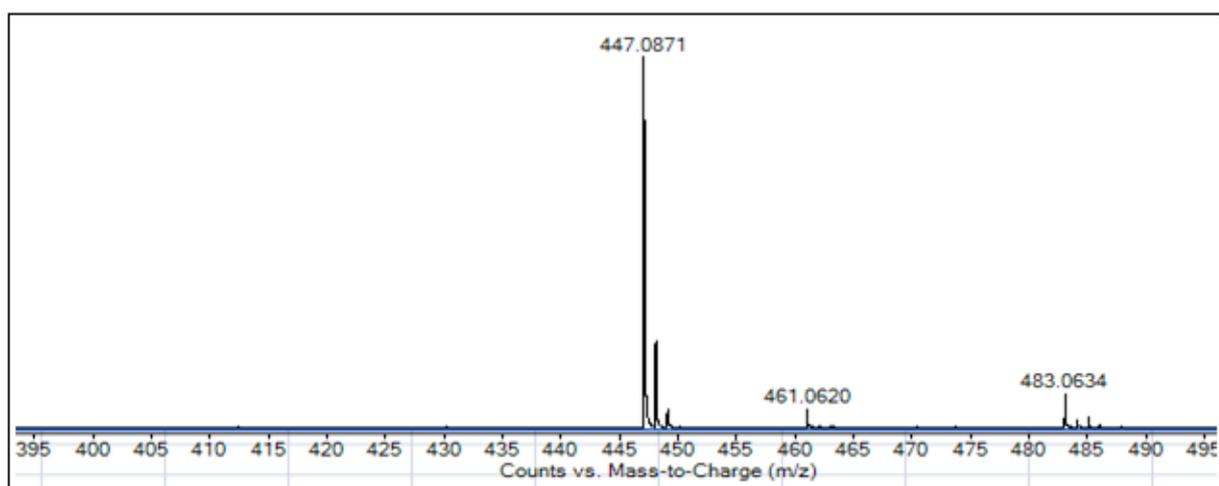


**Figure IV.76:** Série spectrale UV du composé CP19



**Figure IV.77:** Structure partielle du composé CP19

L'examen de son spectre de masse à haute résolution (Figure IV.78) enregistré en mode électro-nébulisation négatif (TOF-HRESI-MS (-)), montre la présence d'un ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z=447,0871$ , correspondant à la formule moléculaire  $C_{21}H_{20}O_{11}$  présentant 12 insaturations et un autre ion à  $m/z=483,0634$  correspondant à  $[M+Cl]^-$ .



**Figure IV.78:** Spectre de masse TOF-MS en mode négatif du composé CP19

L'examen du spectre RMN- $^1H$  enregistré dans le DMSO (figure IV.79, tableau IV.16) montre:

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H=6,72$  ppm attribuable à H-3 indiquant ainsi la structure d'une flavone.
- Deux singulets larges d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_H=6,42$  ppm et le second à  $\delta_H=6,76$  ppm attribuables à H-6 et H-8 du cycle A respectivement.
- Le signal d'intégration 1H à  $\delta_H=7,43$  ppm sous forme d'un doublet large ( $J = 8$  Hz) attribuable au proton H-6' révélant un couplage ortho avec le proton H-5' et un couplage méta non observé avec le H-2'. Le H-5' à  $\delta_H=6,89$  ppm, dont le signal est un doublet ( $J = 8$  Hz) d'intégration 1H confirme le couplage ortho avec le H-6'. Alors que le signal d'intégration 1H à  $\delta_H=7,40$  ppm sous forme d'un singulet large présentant le couplage méta avec le H-6' ne peut être que le proton H-2'.

Ces trois signaux confirment la disubstitution du cycle B en 3' et 4'.

- Un singlet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=12.96$  ppm confirmant l'hydroxylation de la position 5 du cycle A. Deux autres signaux sous forme de singlet large chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}}=9.36$  ppm et le second à  $\delta_{\text{H}}=9.96$  ppm qui ne peuvent être attribués qu'aux groupements hydroxyles des positions 3' et 4'.

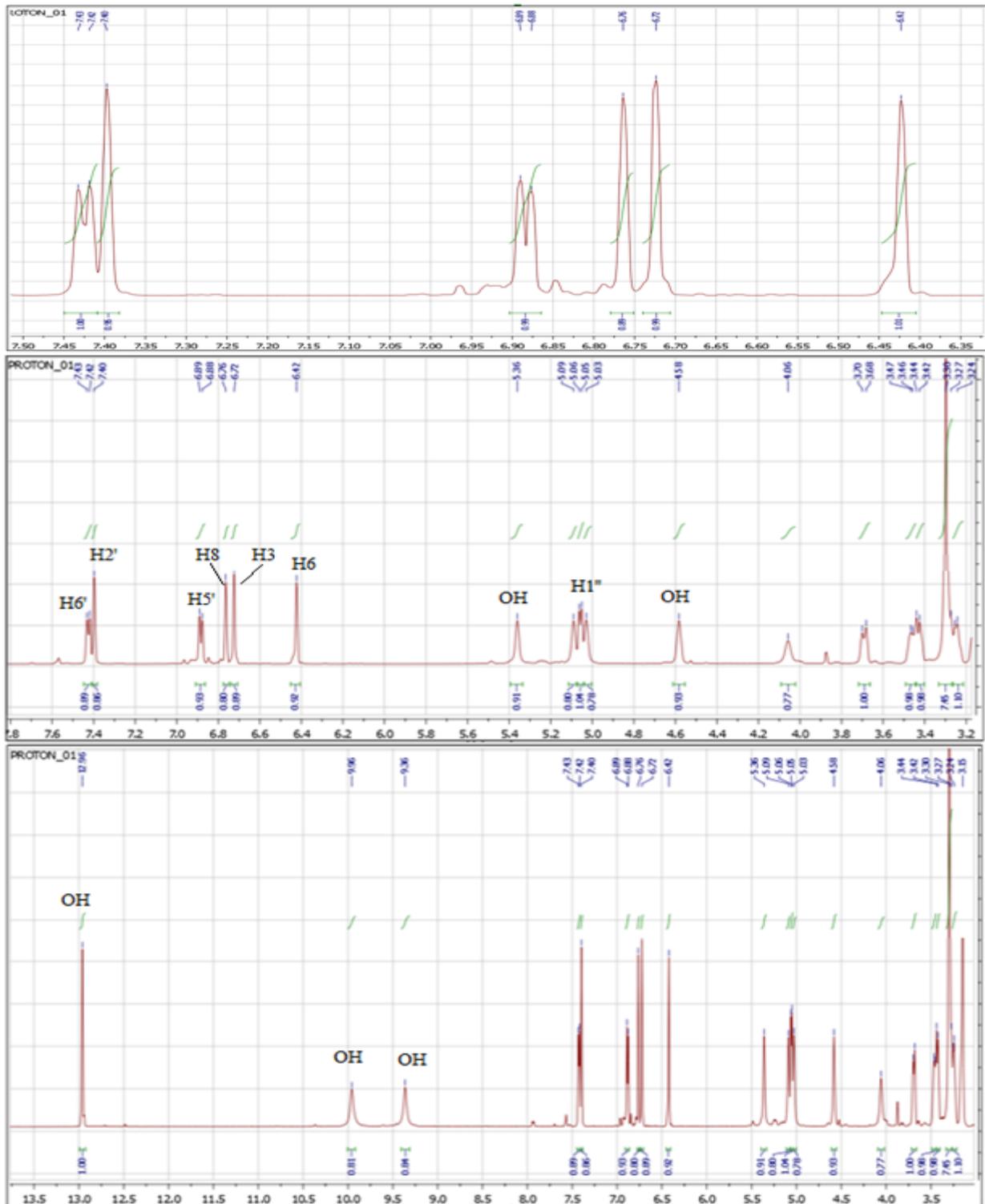


Figure IV.79: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) du composé CP19

Le spectre de l'expérience HSQC permet de relier tous les protons du squelette flavonique à leurs carbones grâce aux taches de corrélation comme suit :

- Le H-3 à  $\delta_{\text{H}} = 6,72$  ppm avec son carbone C3 à  $\delta_{\text{C}} = 103,6$  ppm
- Le H-6 à  $\delta_{\text{H}} = 6,42$  ppm avec son carbone C6 à  $\delta_{\text{C}} = 99,97$  ppm.
- Le H-8 à  $\delta_{\text{H}} = 6,76$  ppm avec son carbone C8 à  $\delta_{\text{C}} = 95,2$  ppm.
- Le H-2' à  $\delta_{\text{H}} = 7,40$  ppm avec son carbone C2' à  $\delta_{\text{C}} = 114,0$  ppm.
- Le H-6' à  $\delta_{\text{H}} = 7,43$  ppm avec son carbone C6' à  $\delta_{\text{C}} = 119,6$  ppm
- Le H-5' à  $\delta_{\text{H}} = 6,89$  ppm avec son carbone C5' à  $\delta_{\text{C}} = 116,4$  ppm.

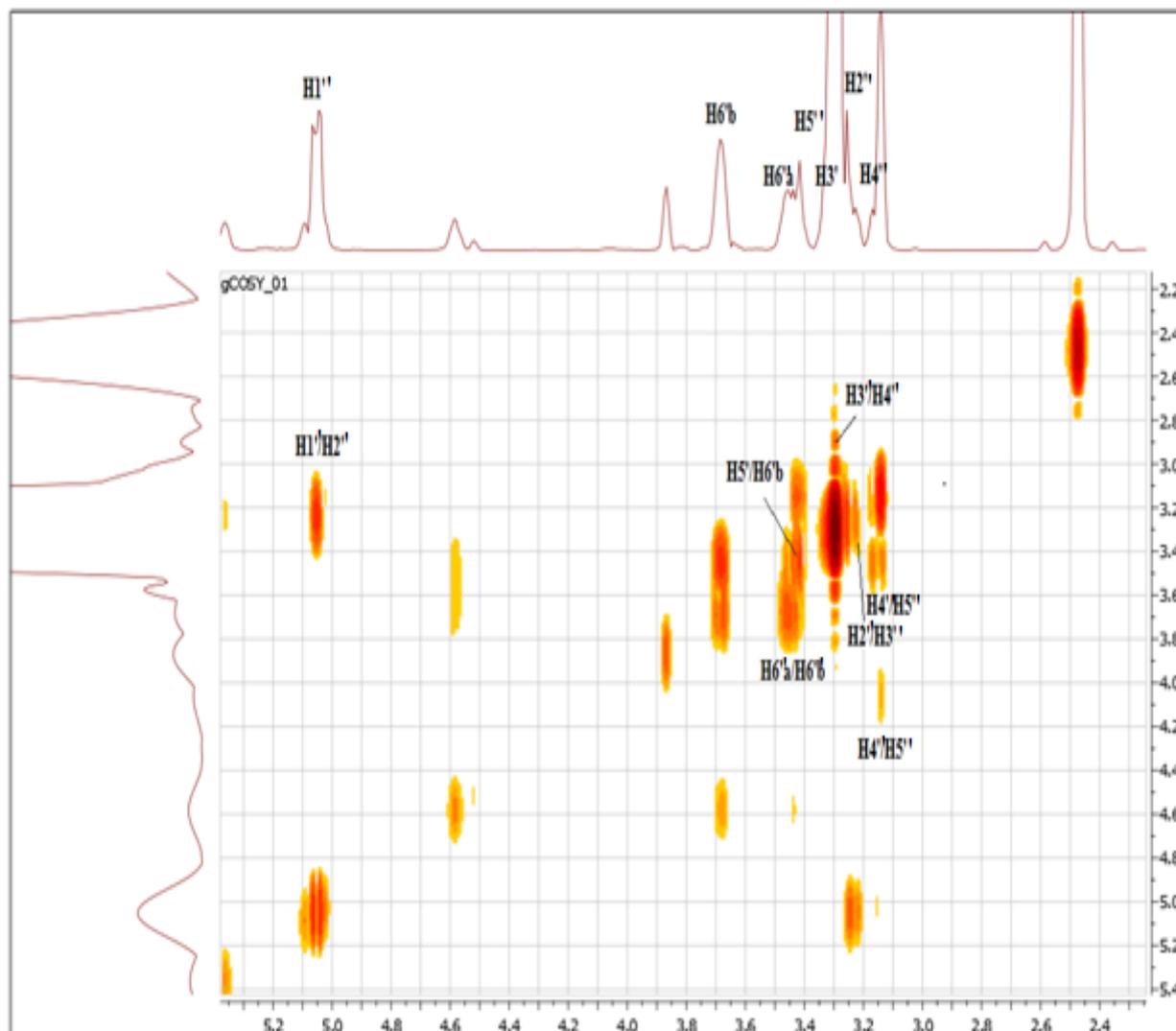
La combinaison des données de la série spectrale UV et de la RMN  $^1\text{H}$  indique clairement que le composé CP19 possède une structure flavonique de type luéoline substitué en position 7.

- Un retour au spectre proton montre la présence d'un doublet ( $J = 7,6$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5,06$  ppm, (ce signal se trouve chevaucher avec deux autres signaux qui ne peuvent être attribués qu'aux protons des groupements OH vu leur valeur d'intégration), caractéristique d'un proton anomérique d'un sucre, celui-ci est confirmé par un ensemble de signaux entre  $\delta_{\text{H}} = 3,24$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 4$  ppm.

L'expérience COSY H-H (figure IV.80) permet l'identification de l'unité osidique. A partir du proton anomère repéré à 5,06 ppm, on relie sept protons d'un hexose comme suit :

- Une tache de corrélation entre le H-1'' à  $\delta_{\text{H}} = 5,06$  ppm et le signal à  $\delta_{\text{H}} = 3,25$  ppm sous forme d'un doublet large ( $J = 7$  Hz) qui ne peut être que le H-2''.
- Une tache de corrélation entre H-2'' et un proton résonant à  $\delta_{\text{H}} = 3,30$  ppm attribuable à H-3'' (recouvert par le signal de l'eau de contamination du DMSO).
- Une tache de corrélation entre H-3'' et un proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,16$  ppm attribuable à H-4'' (partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du DMSO).
- Une tache de corrélation entre H-4'' et un proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,42$  ppm sous forme d'un doublet large ( $J = 9,6$  Hz) attribuable à H-5''.
- Le H-5'' corrèle avec deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 3,68$  ppm ( $J = 10,8$ ) et  $\delta_{\text{H}} = 3,47$  ppm ( $J = 6$ ). Ils sont attribuables aux deux protons H-6'' a et H-6'' b du sucre.

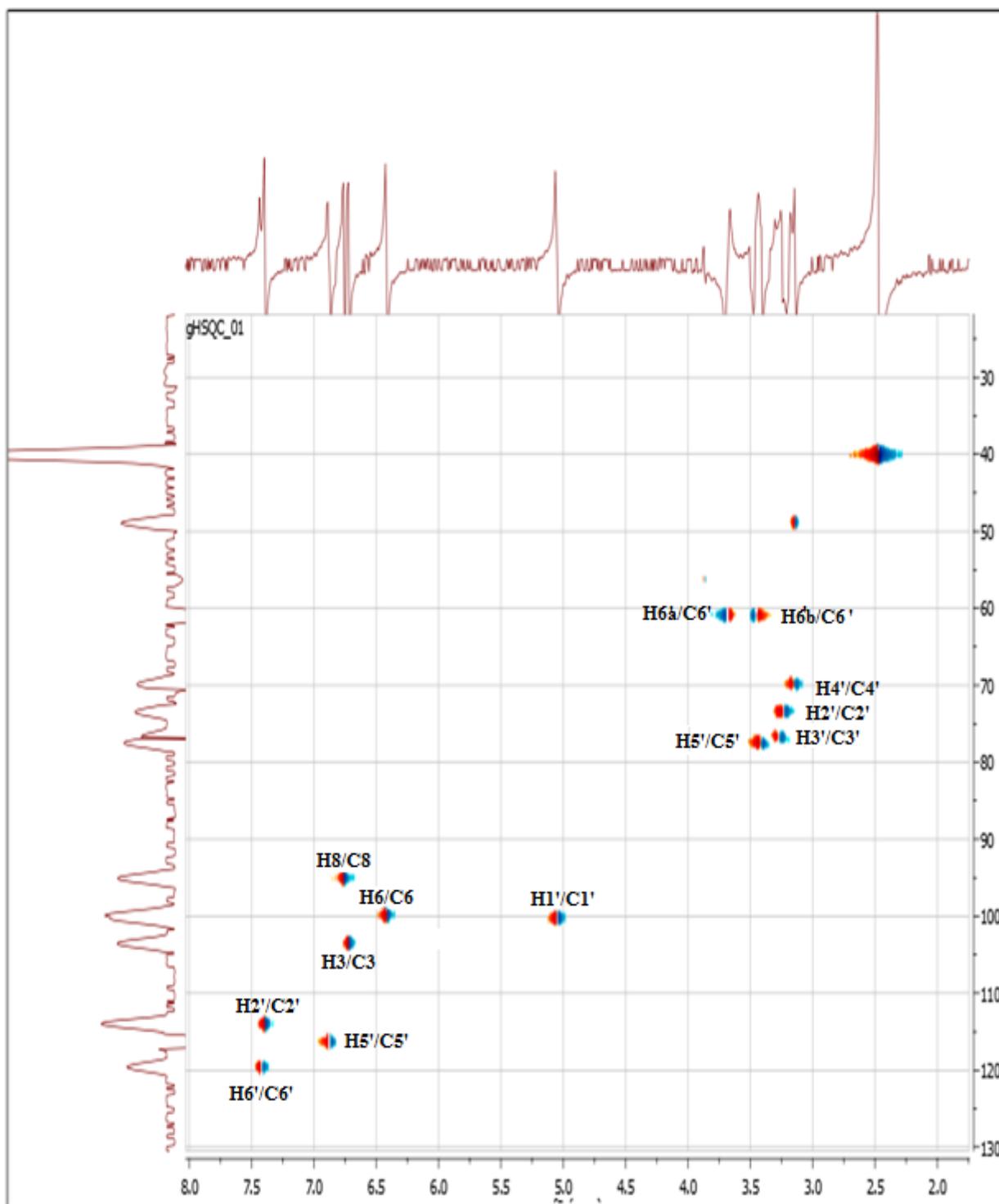
Leurs déplacements chimiques ainsi que les déplacements de leurs carbones (figure IV.82) sont caractéristiques d'un glucose [36].



**Figure IV.80:** Spectre COSY du composé CP19

La constante de couplage ( $J = 7,6$  Hz) observée pour le proton anomérique suggère une liaison de configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine.

Les grandes valeurs des constantes de couplage ( $J > 7$ ) montrent que ces protons sont axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  comme l'indique la valeur de la constante de couplage  $J_{1'-2'} = 7,6$  Hz.



**Figure IV.81:** Spectre HSQC du composé CP19

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure IV.82) confirme la présence de 21 atomes de carbone dont 6 signaux résonants à 100,3ppm, 73,6 ppm, 76,8 ppm, 69,9 ppm, 77,6 ppm et 61,1 ppm, relatifs aux déplacements chimiques des carbones osidiques [36].

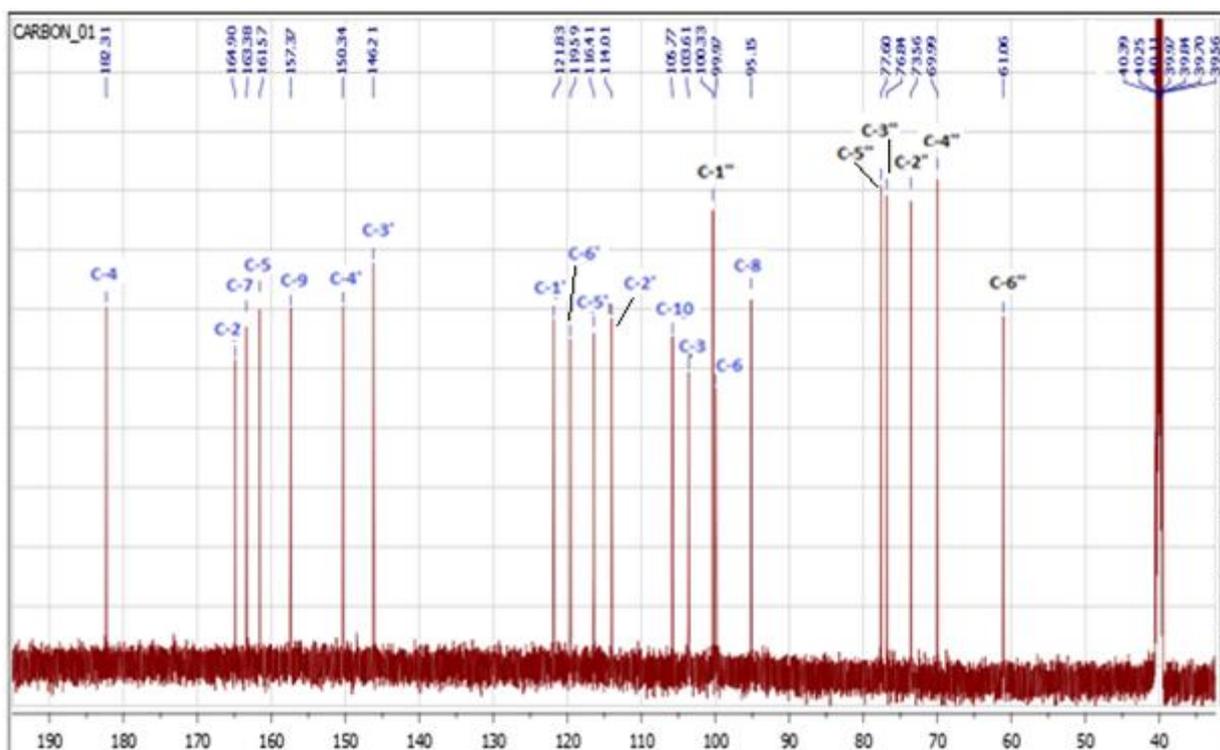


Figure IV.82: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) du composé CP19

L'étude du spectre HMBC (figure IV.83) permet d'attribuer les carbones quaternaires à leurs signaux respectifs et positionner le glucose sur le squelette lutéoline grâce aux taches de corrélations. En effet, ce spectre permet l'observation d'une tache de corrélation nette entre le proton anomérique H-1'' à  $\delta_{\text{H}} = 5,06$  ppm et le carbone C-7 confirmant ainsi son substitution.

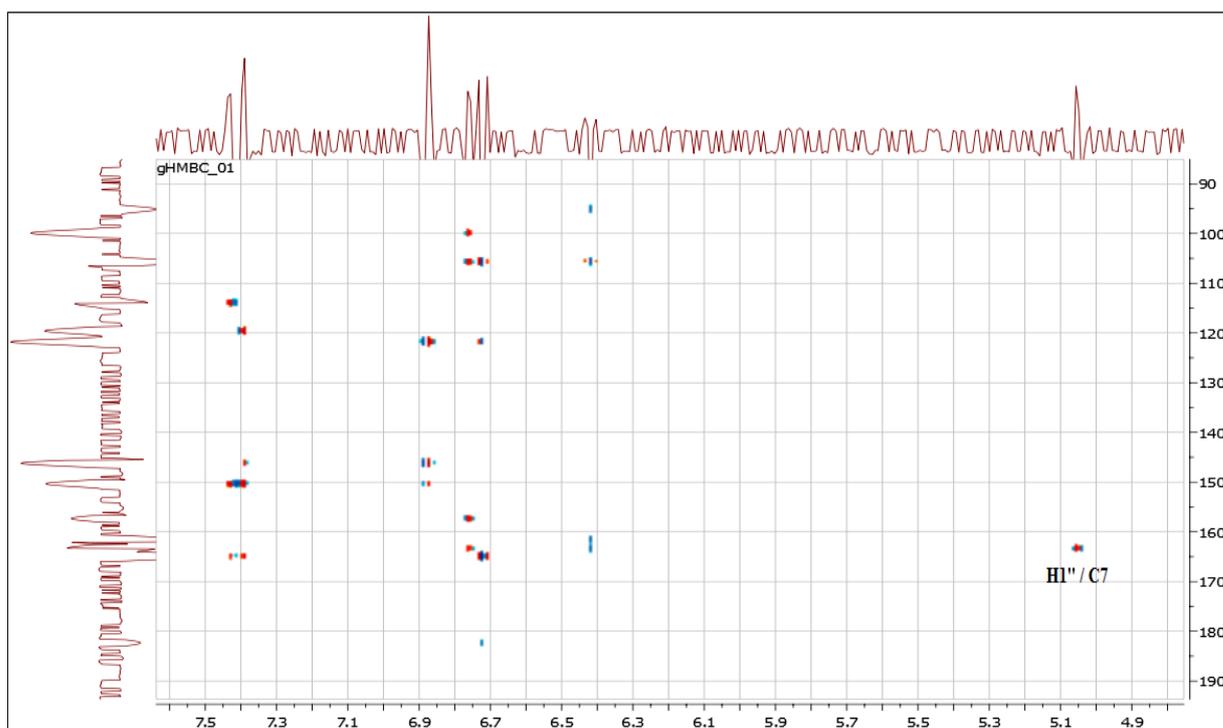


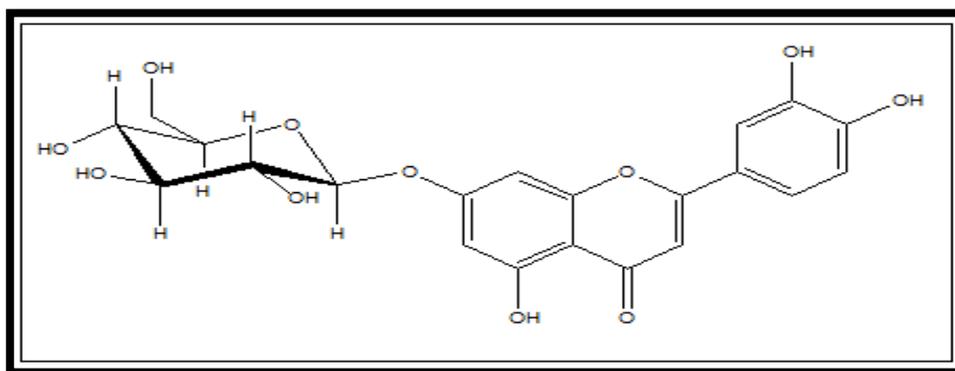
Figure IV.83: Spectre HMBC du composé CP19.

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont dressés dans le tableau IV.16.

**Tableau IV.16:** Données du spectre RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du produit CP19.

N°	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	Données de la littérature [37]	
			$\delta\text{c}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm) (intégration, m, J en Hz)
2	164,9	-	164,91	-
3	103,6	6,72, <i>s</i>	103,36	6,66 ( <i>s</i> )
4	182,3	-	182,20	-
5	161,6	-	161,47	-
6	99,9	6,42, <i>sl</i>	99,88	6,41 ( <i>d</i> , J 2,0 Hz)
7	163,4	-	163,27	-
8	95,2	6,76, <i>sl</i>	95,09	6,76 ( <i>d</i> , J 2,2 Hz)
9	157,4	-	157,29	-
10	106,8	-	105,69	-
1'	121,9	-	121,37	-
2'	114,0	7,39, <i>sl</i>	113,77	7,34 ( <i>d</i> , J 2,0 Hz)
3'	146,2	-	146,29	-
4'	150,3	-	150,81	-
5'	116,4	6,88, <i>d</i> (8 Hz)	116,37	6,74 ( <i>d</i> , J 8,0 Hz)
6'	119,6	7,42, <i>dl</i> (8 Hz)	119,55	7,35 ( <i>dd</i> , J 2,0; 8,0 Hz).
1''	100,3	5,05, <i>d</i> (7,6 Hz)	100,28	5,07 ( <i>d</i> , J 7,2 Hz)
2''	73,6	3,25, <i>dl</i> (7 Hz)	73,48	3,17-3,41 <i>m</i>
3''	76,8	3,30, <i>m</i>	76,75	
4''	69,9	3,16, <i>m</i>	69,93	
5''	77,6	3,42, <i>dl</i> (9,6 Hz)	77,51	
6''	61,1	3,68 Ha <i>d</i> large (10,8) 3,47 Hb <i>d</i> large (6)	60,99	

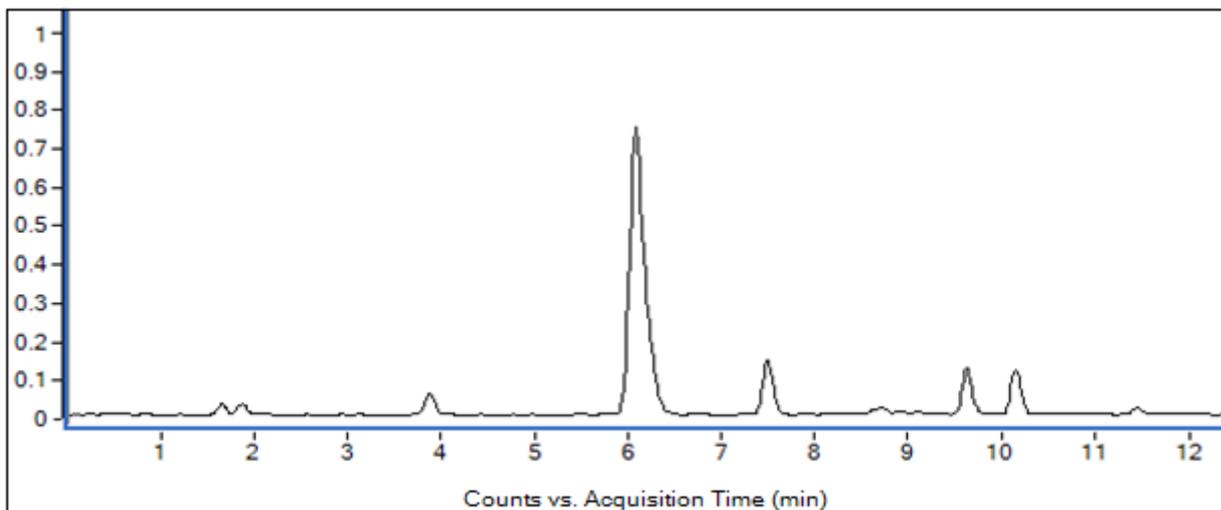
Toutes ces données combinées permettent d'attribuer sans ambiguïté la structure de **lutéoline 7-O- $\beta$ -glucoside** [37] au composé CP19.



Structure du composé CP19 : **Lutéoline 7-O- $\beta$ -D-glucoside**

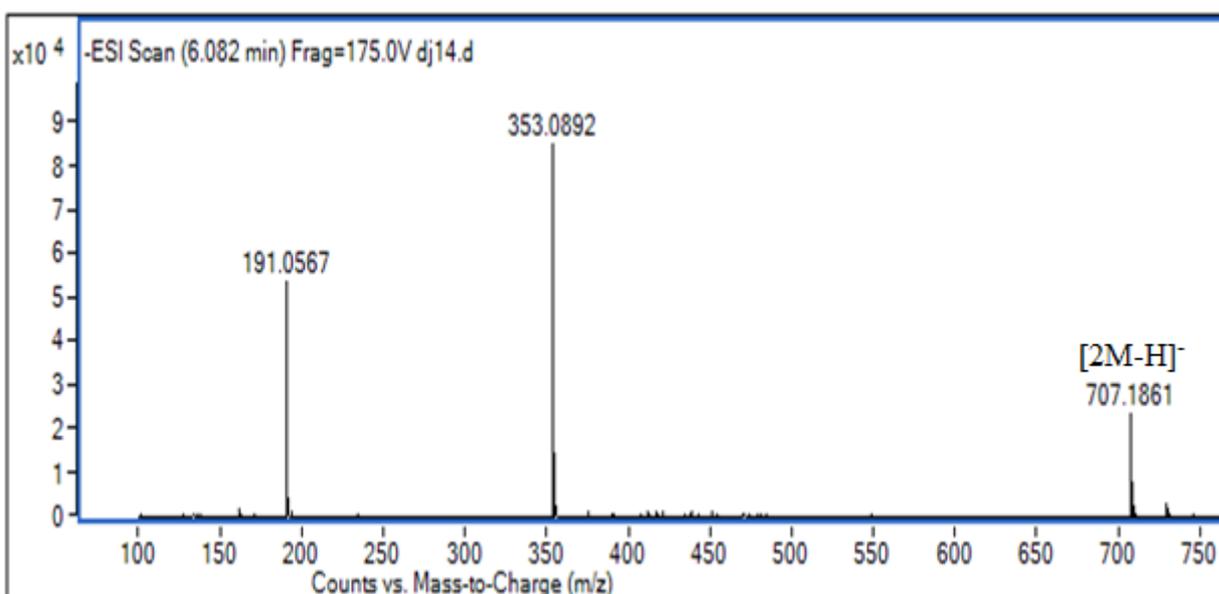
### IV.2. 2 Détermination structurale du composé CP20

Le composé CP20 se présente sous forme de poudre jaune. L'analyse HPLC-TOF/MS de ce composé (Figure IV.84) a montré qu'il n'est pas pur et que son temps de rétention  $t_R$  est de 6,082 min identique à celui du composé CP13.



**Figure IV.84:** Chromatogramme HPLC du composé CP20

Son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation négatif (TOF-HRESI-MS (-)) (Figure IV.85), identique à celui du composé CP13, montre la présence d'un ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z = 353,0892$  correspondant à la formule moléculaire  $C_{16}H_{18}O_9$  indiquant un nombre d'insaturation de 8.



**Figure IV.85:** Spectres TOF-MS en mode négatif du composé CP20.

Ces constatations nous ont incités à réaliser une Co-chromatographie des deux composés CP13 et CP20. Cette étape a confirmée qu'il s'agit du même produit qui n'est autre que l'acide chlorogénique.

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure IV.84) présente une allure très semblable à celle du produit CP13 et montre des signaux dans la zone 7,5-6,5 ppm qui peuvent être répartis comme suit:

- Un premier doublet ( $J = 16\text{Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,46$  ppm.
- Un deuxième doublet ( $J = 16\text{Hz}$ ) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,23$  ppm

Les valeurs des déplacements chimiques montrent clairement que ces deux protons sont éthyléniques, alors que la grande valeur de la constante de couplage indique que ces deux protons se trouvent en configuration *trans*.

D'autres signaux caractérisent les protons d'un cycle aromatique trisubstitué qui apparaissent comme suit:

- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=7,03$  ppm.
- Un doublet large ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=6,97$  ppm.
- Un doublet ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=6,75$  ppm.

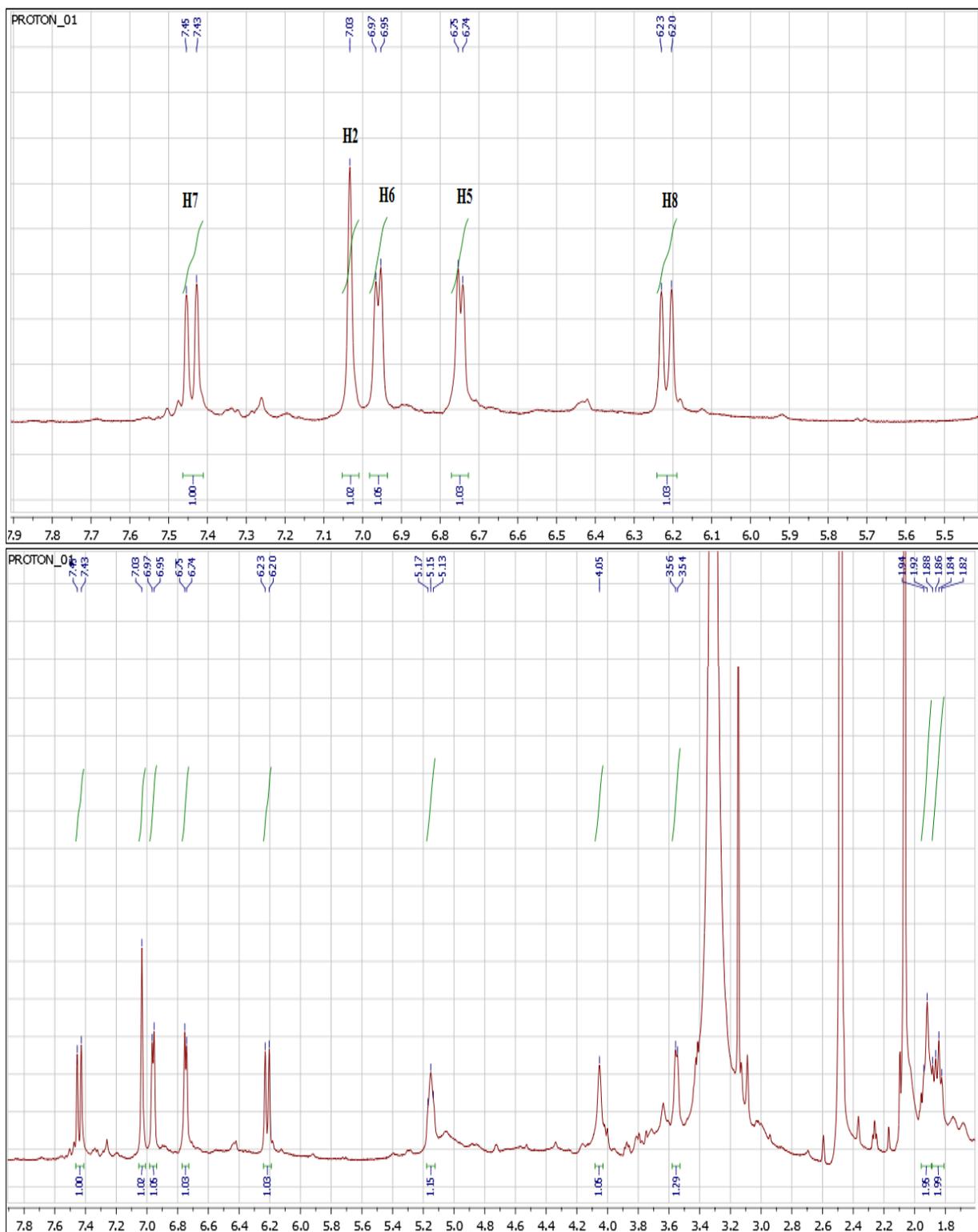
Vu la multiplicité de ces signaux (couplage méta pour le premier signal, couplage ortho et méta pour le deuxième signal et en dernier un couplage ortho pour le troisième signal), on peut dire que le cycle aromatique est substitué dans les positions 1, 3 et 4. Vu l'absence d'autres substituants sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , les positions 3 et 4 ne peuvent être qu'hydroxylés.

Toutes ces données sont en faveur de la présence du groupement caféoyle dans la molécule.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure IV.86) montre également des signaux caractéristiques des protons de l'acide quinique [26]:

- Un multiplet d'intégration 4H s'étalant de  $\delta_{\text{H}}=1,93$  jusqu'à 1,85 ppm ne peut être attribué qu'aux protons H-2 (H-2a et H-2b) et H-6 (H-6a et H-6b).
- Un doublet large ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=3,55$  ppm attribuable à H-4.
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=4,04$  ppm attribuable à H-3.
- Un triplet large ( $J = 10$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=5,15$  ppm caractéristique du proton H-5.

La grande valeur du déplacement chimique de ce proton indique qu'il est porté par un carbone acylé et de ce fait le groupement caféoyle ne peut être placé qu'en cette position.



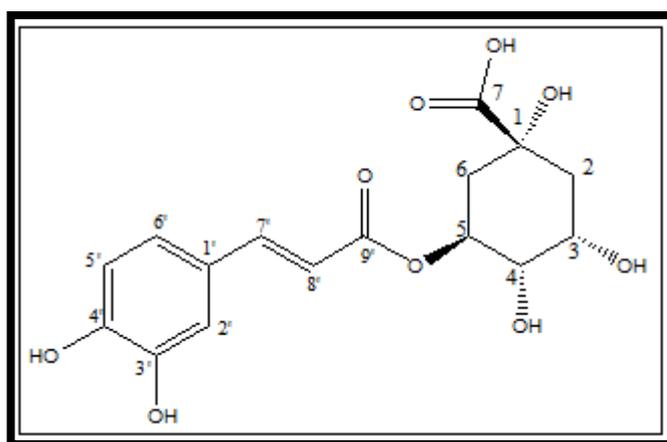
**Figure IV.86:** Spectre RMN <sup>1</sup>H (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé CP20.

Les données de la RMN <sup>1</sup>H sont rassemblées dans le tableau IV.17

Tableau IV.17: Données du spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé CP20

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité $J$ (Hz)	Attribution des protons
1,85-1,93	2H	$m$	H-2
4,04	H	$br(s)$	H-3
3,55	H	$m$	H-4
5,15	H	$t$ large (10,2)	H-5
1,85-1,93	2H	$m$	H-6
7,03	H	$s$ large	H-2'
6,75	H	$d$ (7,2)	H-5'
6,97	H	$d$ large (7,8)	H-6'
6,23	H	$d$ (16)	H-7'
7,46	H	$d$ (16)	H-8'

La combinaison de l'ensemble de ces données nous a permis de déduire la structure du composé **CP20**. Il s'agit de : l'**acide 5-O-caféoylquinique** connu sous le nom d'**acide chlorogénique** [26].



Acide 5-O-caféoylquinique ou Acide chlorogénique

### ➤ Conclusion

La mise à profit des techniques d'analyses sur les produits séparés nous a permis d'identifier 12 produits de *C. choulettiana*, ces produits sont: (CP4: (CP4-1 et CP4-2), CP6, CP7, CP8, CP9, CP10, CP11, CP12: (CP12-1 et CP12-2), CP13, CP14 et CP15 et 2 produits de *C. fragilis*, ces produits sont: CP19 et CP20.

**Références bibliographiques**

- [1] De-Eknamkul, W., Potduang, B., (2003), Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units, *Phytochemistry*, 62, 389-398.
- [2] Kaur, K., Chaudhary, J., Jain, A., Kishore, L., (2011), Stigmasterol: A comprehensive review, *international journal of pharmaceutical sciences and research*, 630 (2) : 2259-2265.
- [3] Nadaf, M., Nasrabadi, M., Halimi, M., Yazdani, Z., Javanshir, A., Ramazani, S., Mohaddesi, B., (2013), Identification of Non-Polar Chemical Compounds *Acroptilon repens* Growing in Iran by GC-MS, *Middle East Journal*, 17 (5): 590-592.
- [4] Fernandez, I., Pedro, J.R., Polo, E., (1995), Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifer*, *Phytochemistry*, 38(3), 655-657.
- [5] Ilhan. G., Erdem. Y., (2007), Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques, *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 284-291.
- [6] Khatun, M., Billah, M., Quader, M.A., (2012), Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species, *J. Sci.*, 60(1): 5-10.
- [7] Ramdan, S., Ouahiba, B., Ratiba, M., Samir, B., Paul, M., Jose, Q., Francisco, E., Francisco, L., Jaime, B., Fadila, B., (2009), A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*, *Phytochemistry*, 2, 112-118.
- [8] Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., (2012), Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab, *Rec. Nat. Prod*, 6(3): 292-295.
- [9] Kun-Young, P., Jung, K.O., Rhee, S.H., Yung, H.C., (2003), Antimutagenic effects of Doenjang (Korean fermented soypaste) and its active compounds, *Mutation research*, 523-524.
- [10] Klippel, K.F., Hiltl, D.M., Schipp, B., (1997), A multicentric placebocontrolled, double-blind clinical trial of sitosterol for the treatment of benign prostate hyperplasia, *British journal of urology*, 80, 427-432.
- [11] Pinheiro, M.R.B., Xavier, C.M., De souza, A.D.L., Robelo, D.M., Batista, R.L., Costa, E. V., Campos, F. R., Barison, A., Valdez, R. H., Heda-Nakanuwa, T., nakamura, C. V., (2009), Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica*, 20 (6).
- [12] Yff, B.T.S, Lindsey, K. L., Taylor, M.B., Erasmus, D.G., Jäger, A.K., (2002), The pharmacological screening of *Pentanisia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid, *Journal of Ethnopharmacology* 79 (1), 101-107.
- [13] Senatore, F., Rigano, D., De Fusco, R., Bruno, M., (2003), Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (Asteraceae), two species growing wild in Sicily, *Flavour Fragr. J*, 18: 248-251.

- [14] Tago, M. F., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., Kasahara, T., (2011), Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin, *International Immunopharmacology*, 11, (9), 1150-1159.
- [15] Ahmed, Z.F., Rimpler, H., Hamouda, F.M., Rizk A.M., the flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt (1970), *Phytochemistry*: 9(7); 1595-1601.
- [16] Bandyukova, V.A, Khalmatov, Kh.Kh, Alimov, Kh.I., Khim. Prir. Soedin, (1969), Flavonoids of *Centaurea depressa*, *Chem Nat Compd* 5 (4), 324-325.
- [17] Oksuz. S, Ayyilidiz, and Johansson.C, ( 1984) 6-Methoxylated and C-glycosyl flavonoids from *Centaurea* species *J.Nat.Prod*, 47(5); 902.
- [18] Picher.M.T, Seon.E, and Tortadjada.A, (1984), Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *stenophylla* *Phytochemistry*, 23 (9); 1995-1998.
- [19] Ali, Y.E, Omar.A.A, Sarg.T.M, and Slatkin.D.J, (1987), Chemical constituents of *Centaurea pallescens*, *Planta Med.*, 53(5); 503.
- [20] Akkal, S, Benayache, F, Benayache, S, Medjroubi, K. and Jay, M, 2<sup>ème</sup> Symposium National sur la chimie organique industriel et pharmaceutique Biskra, 03-05 Mai, Biskra-Algérie.
- [21] Ferreres. F., Tomas. F., Bull., (1980), Liaison-Groupe Polyphenol, *Pub Med*, (9); 294.
- [22] Ashour, M. A., Elkhayat, E. S., Ebel, R., Edrada, R.A., Proksch, P., (2007), Indole alkaloid from the Red Sea sponge *Hyrtios erectus*, *General Papers*, (17), 225-231.
- [23] M. Budovská., M. Pilátová., L. Varinská., J. Mojžiš., R. Mezencev.,( 2013), The synthesis and anticancer activity of analogs of the indole phytoalexins brassinin, 1-methoxyspirobrassinol methyl ether and cyclobraassinin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11-01.
- [24] G.A. Kraus., H. Kim., (1993), Palladium in Heterocyclic Chemistry: A Guide for the Synthetic Chemist, *Synth. Commun*, 23, 55-64.
- [25] Khatun, M., Billah, M., Quader, M.A., (2012), Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species, *J. Sci.*, 60(1): 5-10.
- [26] Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Ling, S.K., Tan, S.P., Lim, K.K., Khoo, M.G.H., (2009), Caffeoylquinic acids from leaves of *Etilingera species* (Zingiberaceae), *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1026-1030.
- [27] Bicha, S., (2010), Thèse de Doctorat, Université de Constantine1, P 115.
- [28] Pulido, R., Bravo, L., Calixto, F.S., (2000), Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J. Agric. Food Chem.*, 48(8), 3396-3402.

- [29] Dural, H., Bağci, Y., Demirelma, E.H., Flamini, G., Cioni, P.R., Morelli, I., (2003), Essential oil composition of two endemic *Centaurea species* from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat, *Biochem. Syst. Ecol*, 31: 1417-1425.
- [30] Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Bağci, Y., Dural, H., Ertuğrul, K., Uysal, T., Savran, A.A., (2006), multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey, *Plant Syst. Evol*, 261: 217-228.
- [31] Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., Maggio, A., (2011), Rosselli, S., Volatile components from aerial parts of *Centaurea gracilentia* and *C. ovina ssp. besserana* growing wild in Bulgaria, *Nat. Prod. Commun*, 6: 1339-1342.
- [32] Kose, Y.B., Altintas, A., Tugay, O., Uysal, T., Demirci, B., Ertuğrul, K., Başer, K.H.C., (2010), Composition of the essential oils of *Centaurea sericeae* Wagenitz and *Centaurea ensiformis* P.H. Davis from Turkey, *Asian J. Chem*, 22: 7159-7163.
- [33] Djeddi, S., Sokovic, M., Skaltsa, H., (2011), Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species (Asteraceae) Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of their Antimicrobial Activities, *Jeobp*, 14(6): 658 – 666.
- [34] Senatore, F., Formisano, C., Raio, A., Bellone, G., Bruno, M., (2008), Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp. *Schowwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity, *Natural Product Research*, 22(10): 825–832.
- [35] Senatore, F., Arnold, N.A., Bruno, M., (2005), Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon, *Natural Product Research*, 19(8) 749–754.
- [36] Agrawal, P.K., (1989), Carbon-13 NMR of flavonoids, *Central Institute of Medical and Aromatic Plants*, India. Édition Elsevier, New York.
- [37] Lu, L., Foo, L.Y., (2000), Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*, *Phytochemistry* 55 , 263-267.

# *CHAPITRE V*

## *Activités biologiques*

## V Introduction

Les plantes constituent une source précieuse des composés biologiquement actifs. Les criblages biologique et chimique sont des approches complémentaires pour la détection rapide des constituants végétaux. Les composés phénoliques comportent un large groupe de métabolites secondaires qui peuvent être trouvés dans les plantes, comme les phénols simples, acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tanins, etc [1].

Les polyphénols qui sont considérés comme l'un des plus importants phytoconstituants ayant des propriétés antioxydantes et plusieurs applications industrielles ont gagné un intérêt particulier dans les dernières décennies. Ce chapitre comporte deux parties, une première première renferme un criblage chimique afin d'identifier et de quantifier les acides phénoliques présents dans les extraits AcOEt et *n*-BuOH des feuilles et des fleurs de *C. choulettiana* par la technique HPLC/TOF-MS, suivi de l'évaluation des activités antioxydante et antiproliférative des ces extraits. La deuxième renferme le criblage chimique par HPLC/TOF-MS de l'extrait *n*-butanol de *C. fragilis* et l'évaluation de son activité antiproliférative.

### Partie 1: *Centaurea choulettiana* Pomel

#### V.1 Activité antioxydante

##### V.1.a Introduction

L'oxygène (O<sub>2</sub>) est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie [2]. En même temps l'O<sub>2</sub> est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (oxydant) [3-4].

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels [5] et à des dégâts cellulaires irréversibles [6] ».

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires [7-9].

Un antioxydant est une molécule qui possède une capacité à capter ou à piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant [10].

### **V.1.b Qu'est-ce qu'un radical libre ?**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne.

Ils sont produits dans notre organisme sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, ou au cours des réactions enzymatiques. Ce mécanisme peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaire avant d'être neutralisés [10].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à neutraliser l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^\bullet$ ) [11-14].

### **V.1.c Les polyphénols comme antioxydants**

Les phénols simples, les acides phénoliques et les flavonoïdes jouent un rôle capital dans l'élimination et la détoxification des radicaux libres et permettent d'augmenter la résistance des LDL (Lipoprotéine de faible densité) à l'oxydation et d'inhiber la peroxydation des lipides.

Par ailleurs, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antihémorragiques, des propriétés antibactériennes et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Les flavonoïdes tant que des polyphénols présentent de nombreuses activités: anti oxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes et prévention des maladies cardiovasculaires.

Pharmacologiquement, les aglycones sont particulièrement efficaces. Certains ont des activités hépatoprotectrices, diurétiques, vasodilatatrices, antibactériennes, inhibitrices de l'aldolase réductase et antiallergiques [15-17].

### V.1.d Activité des flavonoïdes vis-à-vis des espèces radicalaires

Les flavonoïdes possèdent une structure aromatique permettant une stabilisation électronique importante et donc une bonne stabilisation de leurs formes radicalaires. Ainsi, les résultats obtenus *in vitro* pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont montré que cette activité est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxydes, hydroxyles et alkoxydes [18-21].

### V.1.1 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

#### V.1.1.a Dosage des polyphénols totaux

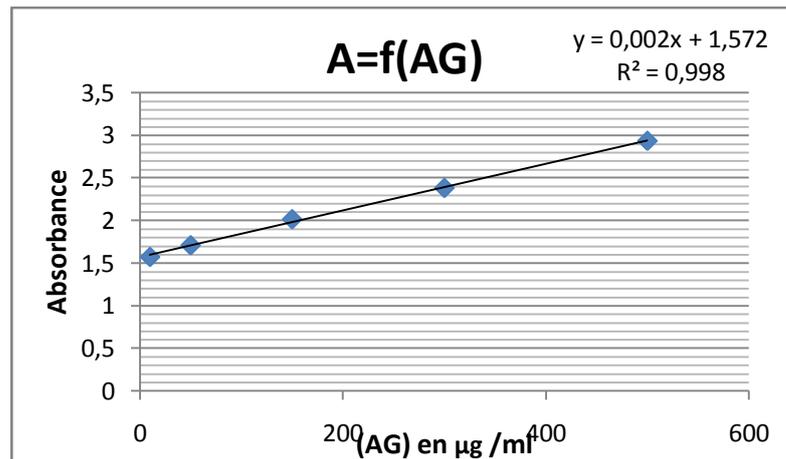
Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux contenu dans l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu, ce réactif est formé d'acide phosphomolibdique  $H_3PMo_{12}O_{40}$  et d'acide phosphotungstique  $H_3PW_{12}O_{40}$  qui est réduit par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène  $W_8O_{23}$  et de molybdène  $Mo_8O_{23}$  [22].

Les phénols sont estimés par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde  $\lambda = 765$  nm en utilisant l'acide gallique comme référence.

#### ✓ Le protocole [23]

- Une solution mère d'acide gallique a été préparé avec une concentration de 1mg/ml (1000  $\mu$ g /ml) à partir de laquelle on a préparé une série de solutions filles de 10 ml de concentrations (50, 75, 150, 300  $\mu$ g/ml). Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir de ces solutions filles d'acide gallique.
- 1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 7,5 ml d'eau distillée.
- Après agitation puis repos pendant 10 minutes, un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 10% a été ajouté.
- Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les absorbances obtenues avec les solutions filles d'acide gallique ont permis d'établir la courbe d'étalonnage correspondante présentée ci-dessous figure V.1.



**Figure V.1:** courbe d'étalonnages de l'acide gallique.

- Les extraits à doser ont été préparé de la même manière et dans les mêmes conditions que la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, chaque concentration est répétée trois fois et l'absorbance est lue à 765 nm.

Les concentrations de ces extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

#### V.1.1.b Dosage des flavonoïdes totaux

Dans cette méthode on utilise le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), ce réactif forme avec les groupements hydroxyles du flavonoïde un complexe très stable, de couleur jaune et absorbe à une longueur d'onde de 430 nm.

Les flavonoïdes sont estimés par spectrophotométrie UV, dont la quercétine est utilisée comme un standard à une longueur d'onde  $\lambda = 430 \text{ nm}$  [23].

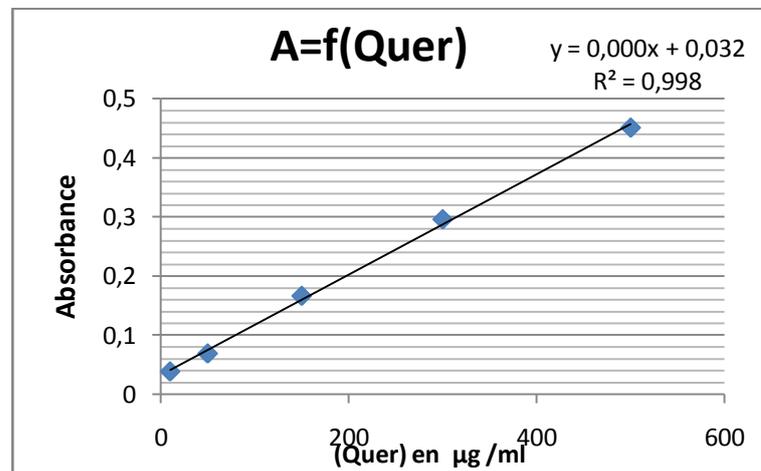
##### ✓ Le protocole [23]

A partir de la solution mère de la quercétine (utilisée comme étalon) préparée dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml, des solutions filles de différentes concentrations (50, 150, 300, 500 µg/ml) ont été préparées.

- 1ml de chaque solution de quercétine ou de l'extrait est introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 5 ml d'eau distillée et 0,3 ml de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 5%.
- Après repos de 5 minutes, 0,6ml d' $\text{AlCl}_3$  sont ajoutés.
- Après repos de 5 minutes encore une fois, un volume de 2ml de NaOH (1N) est additionné et la solution est complétée jusqu'à 10ml avec de l'eau distillée.

- Après agitation, la lecture de l'absorbance a été faite au moyen du spectrophotomètre à 430 nm.

La courbe d'étalonnage établie avec les solutions filles de quercétine est présentée ci-dessous figure V.2.



**Figure V.2:** courbe d'étalonnages de la quercétine.

### V.1.2 Criblage chimique par HPLC-TOF/MS

Les analyses par HPLC-TOF/MS de l'ensemble des extraits de deux espèces ont été effectuées au laboratoire de recherche, du département de chimie de l'université de Çankiri Karatekin, Uluayazi Campus, 18100 Çankiri, Türkiye.

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* ont été analysés par HPLC-TOF/MS, afin de comparer leurs profils chromatographiques avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la quantité et la nature chimique des acides phenoliques présents.

#### ➤ Préparation des échantillons

Pour l'analyse HPLC-TOF/MS, les extraits (200 ppm) ont été dissous dans le méthanol à la température ambiante, puis filtrés à travers un filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène (0,45 µm) [24].

#### ➤ Conditions opératoires

Les conditions opératoires de la HPLC sont comme suit:

Agilent Technologie 1260 Infinity LC, 6210 TOF-MS

Volume d'injection: 10 µl

Température de la colonne: 35 °C

Modèle de la colonne: ZORBAX SB-C18 4,6x100mm, 3,5  $\mu$ m

Débit: 0,6 ml /min

Ionisation: Dual-ESI

La température de l'azote: 325°C

Débit de gaz: 10 ml / min

Tension de Fragmenteur : 175 V

Phase mobile: Cette phase est constituée de deux solvants :

- ✓ **Solvant A** : Eau ultra-pure acidifiée avec de l'acide formique à 0,1%
- ✓ **Solvant B** : Acétonitrile.

Le tableau V.1 résume le programme d'élution de la colonne.

**Tableau V.1:** Programme de la phase mobile A et B.

	temps (min)	H <sub>2</sub> O avec %0,1 d'acide formique	acétonitrile
1	0-1	90%	10%
2	1-20	90%	10%
3	20-23	50%	50%
4	23-25	20%	80%
5	25-30	10%	90%

### V.1.3 Évaluation du potentiel anti-radicalaire

L'évaluation de l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux peut être effectuée par plusieurs méthodes ; on peut citer:

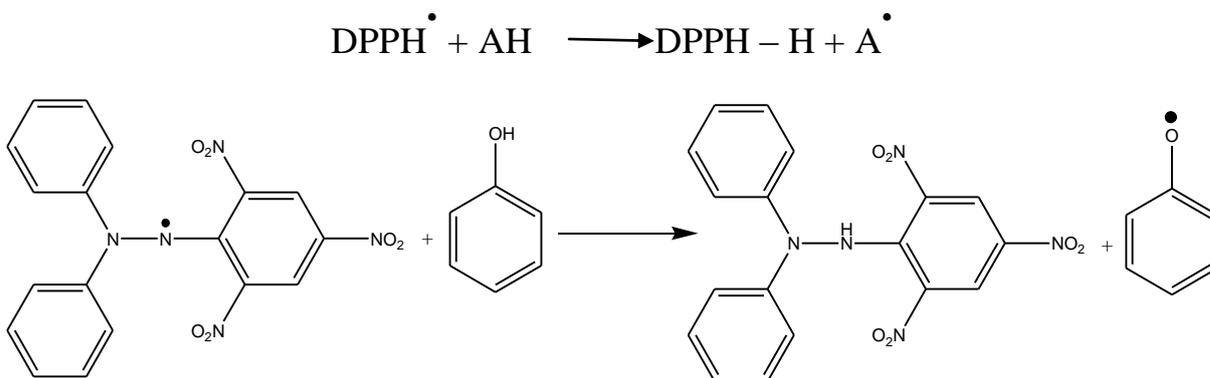
- Les peroxydes ROO<sup>•</sup> par les méthodes ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical – Trapping Antioxidants Parameter) [23].
- Les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Parameter) [25].
- La méthode utilisant le radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [26].
- La méthode de thiocyanate utilisant l'acide linoléique comme source de peroxyde [27].

### V.1.3.a Test au DPPH

- ✓ **But:** Détermination *in vitro* du pouvoir antioxydant des extraits *n*-BuOH (feuilles et fleurs) et AcOEt (feuilles et fleurs) de la plante *C. choulettiana* par la réduction du radical DPPH.

Le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant visualisé également par un changement de coloration de la solution qui vire du violet au jaune [28-29].

La première étape est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH pour donner du diphénylhydrazine et un radical phénoxy (Figure V.3). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions, ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé [30].



**Figure V.3:** réaction du radical DPPH avec un phénol [28].

Les mesures de l'absorbance du DPPH de nos extraits permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant l'équation suivante [29].

$$I(\%) = ((\text{Abs contrôle} - \text{Abs échant}) / \text{Abs contrôle}) * 100$$

- I(%) : Pourcentage d'inhibition.
- Abs contrôle : absorbance de contrôle négatif.
- Abs échant : absorbance de l'échantillon (nos extraits).
- ✓ **Méthode** [30]

La méthode au DPPH est réalisée en suivant les étapes ci-dessous:

- La solution du DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, Mm=394,33) est solubilisée dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,2 mM.
- 1ml de chacun des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) à différentes concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 200 µg/ml) sont ajoutés à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,2 mM).
- Un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 1ml de la solution méthanolique de DPPH (0,2 mM).
- La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3 fois.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%), ce dernier est calculé par l'équation de scavenger.

### V.1.3.b L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

- ✓ **Principe:** La peroxydation lipidique est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène tel que les radicaux hydroxyles ( $\dot{\text{O}}\text{H}$ ) ou peroxydes ( $\text{ROO}\dot{\text{O}}$ ), soit catalysée par des enzymes.
- ✓ **But:** Détermination *in vitro* de l'effet anti-péroxydatif de l'acide linoléique des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de l'espèce *C. choulettiana*.

#### ✓ **Méthode:**

L'effet anti-péroxydatif des extraits *n*-BuOH et AcOEt (feuilles et fleurs) a été estimé par la méthode de thiocyanate ferrique en utilisant l'acide linoléique. Le peroxyde généré réagit avec le chlorure ferreux (Fe<sup>2+</sup>) pour former les ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>) monitoré sous forme d'un complexe de thiocyanate. L'émulsion de l'acide linoléique est préparée par l'homogénéisation de l'acide linoléique avec le Tween-40 émulsifié dans le tampon phosphate (0,2M, pH 7). Les échantillons sont préparés dans un mélange MeOH : eau et les concentrations sélectionnées pour l'étude sont 800 et 1000 µg/ml. Après l'incubation à 37 °C on ajoute le thiocyanate d'ammonium et le chlorure ferreux. Le mélange préparé par la même procédure est utilisé comme contrôle. La référence utilisée pour la comparaison est le trolox. La coloration développée est lue à 500 nm durant 4 jours successifs [31].

L'activité antiperoxydative est calculée selon l'équation suivante:  $I(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$

Où:  $A_0$  est l'absorbance du contrôle

$A_1$  est l'absorbance de l'extrait ou le standard.

#### **V.1.4 Activité antiproliférative**

##### **V.1.4.a Généralités**

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome [32-33]. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses [33].

##### **V.1.4.b Types de cancers**

Les cancers diffèrent selon les caractéristiques des tumeurs: tumeur bénigne, maligne ou métastatique, et aussi selon leurs origines tissulaires. Selon le tissu touché, on peut subdiviser les cancers en 3 groupes [33]: Sarcomes, Carcinomes, Hématosarcomes.

##### **V.1.4.c Activité antiproliférative utilisant le système xCELLigence**

###### **➤ Matériel et méthodes**

Les tests anti-tumoraux ont été menés sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) au laboratoire de recherche de plante, du département de chimie de l'université de Çankiri Karatekin, UluYazi Campus, 18100 Çankiri, Türkiye. Le but consiste à évaluer l'activité antiproliférative des extraits sur les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain).

###### **➤ Conditions de la culture cellulaire**

Les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) ont été cultivées régulièrement dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C et dans un milieu de culture eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma). Ce milieu de culture doit contenir 10 % (v/v) du sérum de veau fœtal (SVF, Sigma, Allemagne) et 2% de pénicilline-streptomycine (Sigma, Allemagne).

Dans le flacon de culture, des cellules HeLa ont été détachées du fond du flacon de 10 ml de solution de trypsine-EDTA. Après le détachement, 10 ml de milieu ont été ajoutés dans le ballon et est homogénéisé délicatement. Cette suspension a été transférée dans des tubes

Falcon. Après la centrifugation (600 rpm, 5 minutes) 5 ml de milieu ont été ajoutés au surnageant. La concentration des cellules du surnageant a été évaluée par le compteur de cellules CEDEX HiRes en utilisant le bleu de Trypan.

### **Préparation de la solution d'extrait**

Les extraits cyclohexanique, AcOEt et *n*-BuOH de *C. choulettiana* et *n*-BuOH de *C. fragilis* ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une concentration de 20 mg/ml. 25µl de ces solutions ont été mélangées avec 475 µl de milieu [24].

#### **➤ Préparation de la plaque à 96-puits**

50µl de milieu ont été ajoutés dans chaque puits d'une plaque de 96 qui a été laissée dans une chambre stérile pendant 15 min, puis dans un incubateur pour 15 minutes. Après cette période, une mesure de fond a été effectuée. 100 µl de la suspension des cellules ( $2,5 \times 10^4$  cellules /100 µl) ont été ajoutés dans les puits et en laissant les trois derniers comme témoins, puis déposés sous la hotte durant 30 min. La mesure a été effectuée pendant 80 min dans le système xCELLigence. Les concentrations 50, 100, 250µg/ml d'échantillons ont été ajoutés et la dernière mesure a duré 70 heures [24].

### **V.1.5 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle**

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* a été réalisée en utilisant la méthode de disques, et ce vis-à-vis de cinq souches bactériennes de référence.

- **Deux bactéries à gram positive:** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis* ATCC 291212.
- **Trois bactéries à gram négative:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603; *Escherichia coli* ATCC 35218.

Ce travail a été effectué au laboratoire de recherche de plante, du département de chimie de l'université de Çankiri Karatekin, Uluyazi Campus, 18100 Çankiri, Türkiye.

### **V.1.5 Résultats et discussion**

#### **V.1.5.1 Dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux**

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mgEAG/g d'extrait) pour

les polyphénols et en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mgEQ/g d'extrait) pour les flavonoïdes sont reportés dans le tableau V. 2.

**Tableau V.2:** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *C. choulettiana*.

Extrait	Polyphénols mgEAG/g d'extrait	Flavonoïdes mgEQ/g d'extrait
AcOEt feuilles	325.81 ± 0.038	263.73 ± 0.004
AcOEt fleurs	248.35 ± 0.005	188.20 ± 0.013
<i>n</i> -BuOH feuilles	176.91 ± 0.003	145.20 ± 0.001
<i>n</i> -BuOH fleurs	133.13 ± 0.002	122.33 ± 0.003

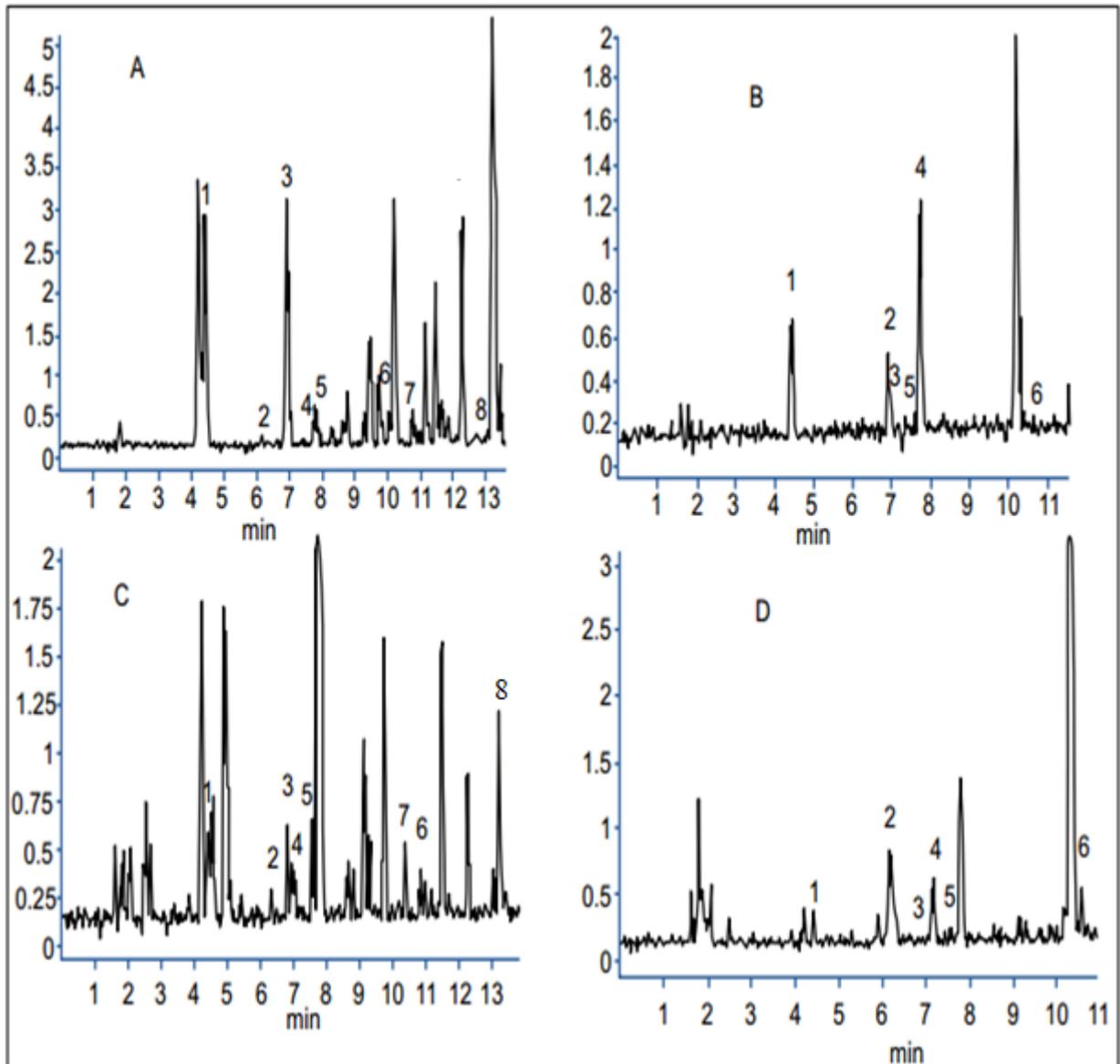
Les résultats présentés précédemment permettent de tirer les constatations suivantes:

- Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes sont plus importantes dans les extraits acétate d'éthyle que dans les extraits *n*-BuOH.
- Les extraits des feuilles contiennent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes plus élevées que les extraits des fleurs.
- Les deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) des feuilles présentent les quantités les élevées en polyphénols (325,81 mg EAG/g d'extrait et 176.91 ± 0.003 mg EAG/g d'extrait) respectivement.
- Ces mêmes extraits (AcOEt et *n*-BuOH) présentent les teneurs les plus élevées en flavonoïdes (263.73 ± 0.004 mg EQ/ g d'extrait et 145.20 ± 0.001 mg EQ/ g d'extrait) respectivement.

Des études récentes ont montrés que plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques, tels que des facteurs géographiques, climatiques, génétiques, ainsi que le degré de maturation de la plante et la durée de stockage [34].

#### V.1.5.2 Identification et quantification des acides phénoliques par HPLC-TOF/MS

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* ont été analysés par HPLC-TOF/MS en mode négatif afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir des informations sur la nature et la quantité des composés phénoliques présents. Les chromatogrammes donnant les profils des extraits sont présentés dans la Figure V.4.



**Figure V.4:** Profil chromatographique des extraits de *C. choulettiana* analysés par HPLC-TOF/MS: 1. acide gentisique, 2. acide Chlorogénique, 3. acide 4-hydroxybenzoïque, 4. acide caféique, 5. acide vanillique, 6. acide *p*-coumarique, 7. acide férulique, 8. acide salicylique. A: Extrait AcOEt (feuilles), B: Extrait AcOEt (fleurs), C: Extrait *n*-BuOH (feuilles), D: Extrait *n*-BuOH (fleurs).

D'après ces chromatogrammes, il apparut clair que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de chaque organe présentent des profils similaires et que les feuilles dévoilent un nombre de pics plus important.

La comparaison des temps de rétention des pics des différents extraits avec ceux des standards a permis la détection et la quantification de neuf (9) composés phénoliques à savoir : l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, l'acide salicylique et l'acide

protocatéchique. Le tableau V.3 rassemble les résultats de l'analyse par HPLC-TOF/MS des extraits de *C. choulettiana*.

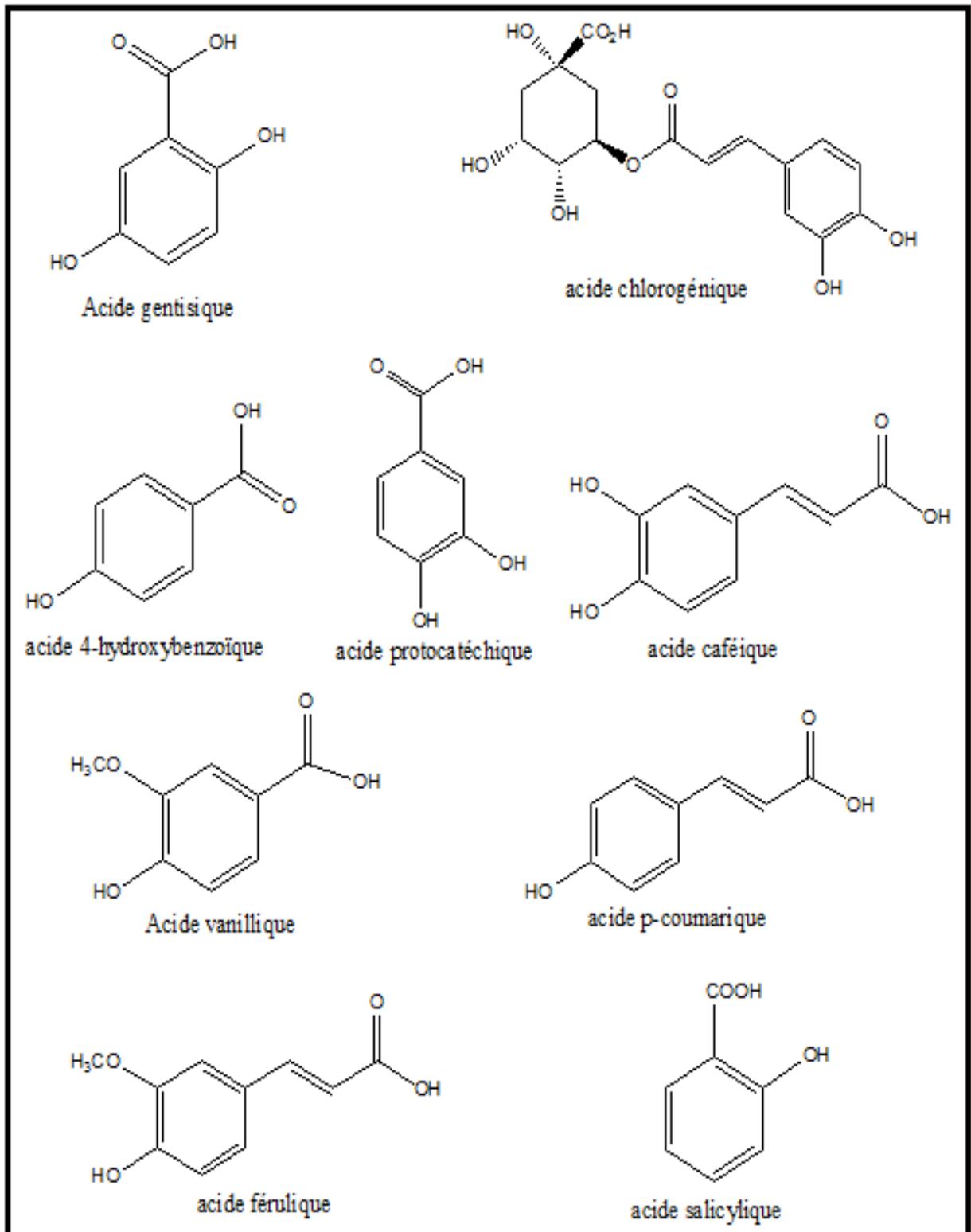
**Tableau V.3:** Composés identifiés dans les extraits de *C. choulettiana* par HPLC-TOF/MS

Acides phénoliques	mg acide phénolique/ kg plante				
	Tr	Extraits AcOEt		Extraits <i>n</i> -BuOH	
		feuilles	fleurs	feuilles	fleurs
acide gentisique	4,40	<b>3,23</b>	0,79	<b>3,01</b>	1,70
acide chlorogénique	6,15	1,13	ND	<b>5,04</b>	<b>17,78</b>
acide 4- hydroxybenzoïque	6,90	<b>5,43</b>	0,82	2,91	0,21
acide protocatéchique	7,00	ND	0,22	2,68	1,25
acide caféique	7,71	0,10	0,49	<b>10,07</b>	0,11
acide vanillique	7,82	0,41	0,12	0	ND
acide <i>p</i> -coumarique	10,01	0,28	0	0	0
acide férulique	10,82	0,50	0,55	<b>4,81</b>	0,04
acide salicylique	13,04	0,09	0	0,14	0

ND: Non détecté

Une lecture étendue des résultats reportés dans le tableau V.3, permet de mettre en évidence d'une part l'existence de deux types d'acides phénoliques présents dans tous les extraits, à savoir, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques dont les structures sont reportées dans la figure V.5 et d'autre part de tirer un certain nombre de constations illustrés dans les points suivants.

- Dans l'extrait AcOEt des feuilles, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide gentisique ont les concentrations les plus élevées (5,43 et 3,24 mg/kg plante) respectivement.
- Dans l'extrait *n*-BuOH des feuilles, les acides caféique, chlorogénique, férulique et gentisique montrent des teneurs importantes (10,07 ; 5,04 ; 4,81 et 3,01 mg/Kg plante).
- Dans l'extrait *n*-BuOH (fleurs), l'acide chlorogénique montre la concentration la plus élevée : 17,78 mg / kg plante.
- L'acide *p*-coumarique a été identifié, en faible quantité, seulement dans l'extrait AcOEt des feuilles.



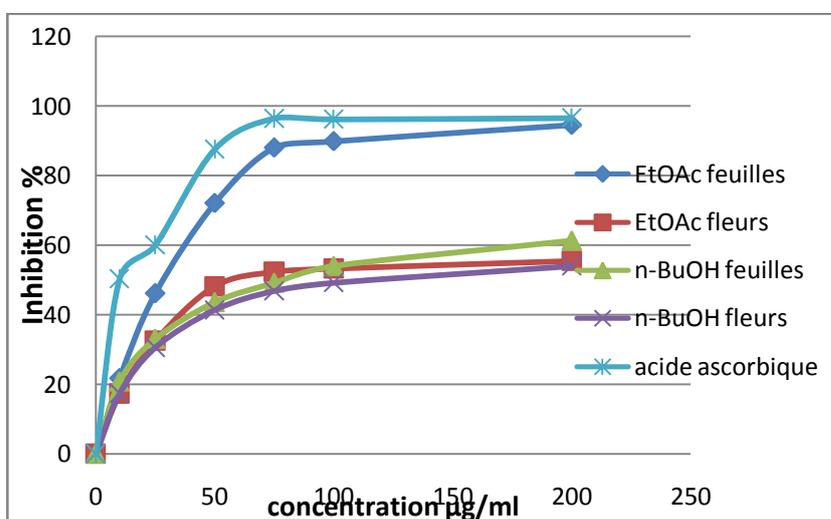
**Figure V.5:** Structures des composés identifiés dans les extraits de *C. choulettiana* par HPLC-TOF/MS.

### V.1.5.3 Evaluation de l'activité antioxydante

#### V.1.5.3.a Le test au DPPH

Les résultats obtenus par ce test permettent de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les différents extraits de *C. choulettiana* (figure V.6).

Ces courbes montrent que tous les extraits ainsi que le standard (acide ascorbique) réduisent de manière dose dépendante le radical DPPH, C'est-à-dire, le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à un seuil ou le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration.

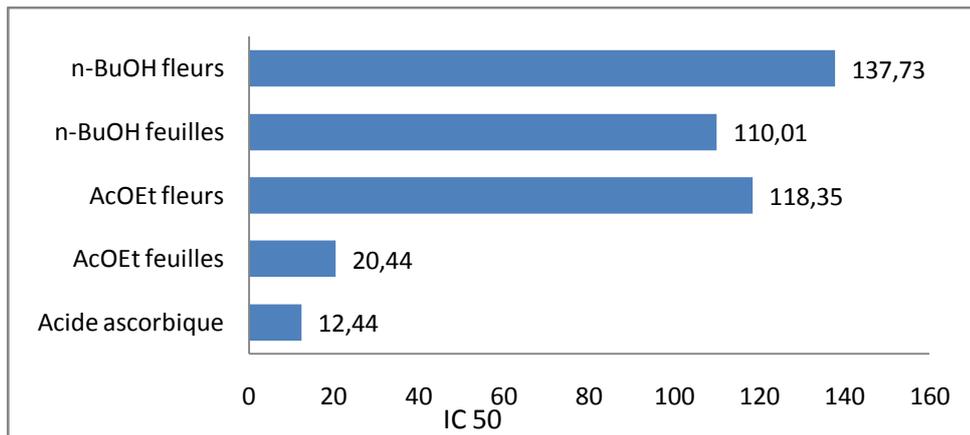


**Figure V.6:** courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de *C. choulettiana* ainsi que l'acide ascorbique (standard) en fonction de la concentration.

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions  $\pm$  SD.

Tous les extraits ont réagi positivement au test anti-radicalaire avec le DPPH mais à différents degrés. La figure ci-dessus, montre que l'extrait AcOEt des feuilles présente un pourcentage d'inhibition important (94,29%) comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard (96,54%) et ce à la même concentration de 100  $\mu$ g/ml. Ceci peut s'expliquer par la richesse de cet extrait en composés phénoliques signalé précédemment.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH ( $IC_{50}$ ) est calculée graphiquement à partir des droites de régression pour chaque extrait et sont illustrées dans la figure V. 7.



**Figure V.7:** Valeurs de l'IC<sub>50</sub> des extraits de *C. choulettiana* et du standard

L'extrait AcOEt feuilles semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH avec une IC<sub>50</sub> de 20.44 µg/ml suivi de l'extrait *n*-BuOH des feuilles avec une IC<sub>50</sub> = 110.01 µg/ml et ensuite les extraits AcOEt et *n*-BuOH des fleurs avec des IC<sub>50</sub> égales à 118,35 et 137,73 µg/ml respectivement, sachant que l'IC<sub>50</sub> de notre solution standard est 12.44 µg/ml.

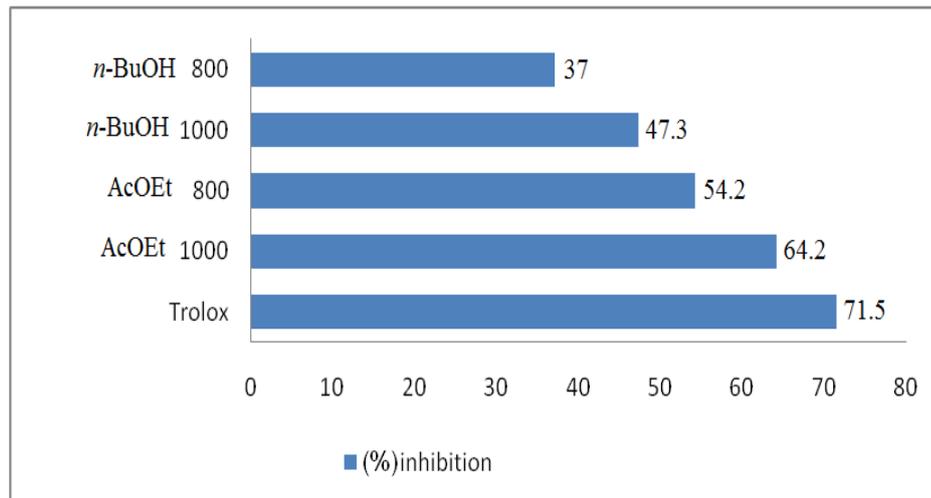
Ce résultat est en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux qui montrent une richesse remarquable de l'extrait AcOEt des feuilles comparativement à l'extrait AcOEt des fleurs et les extraits *n*-BuOH (feuilles et fleurs). Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui ont pu établir une relation étroite entre la structure chimique des composés phénoliques et leur capacité à piéger les radicaux libres [35].

#### V.1.5.3.b Inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique représente le mécanisme moléculaire principal impliqué dans le dommage oxydatif des structures cellulaires conduisant à la mort cellulaire observé dans plusieurs pathologies.

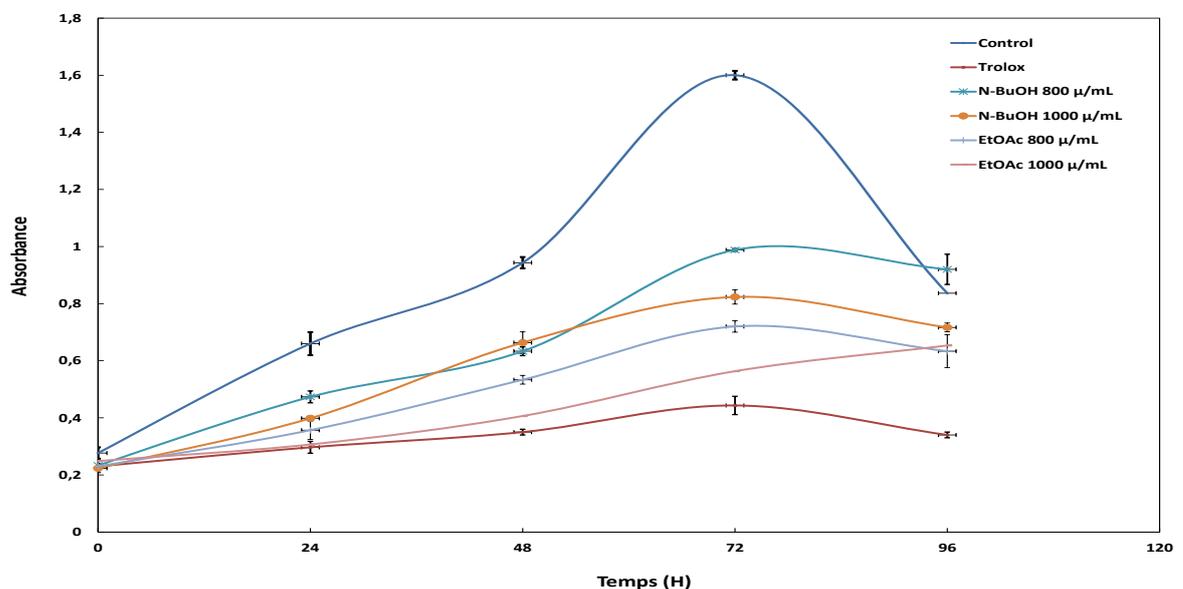
La figure V.8 présente le % d'inhibition de l'acide linoléique des différents extraits pour deux concentrations différentes (800 et 1000 µg/ml), qui était dans l'ordre : Trolox (71,5%), AcOEt (54,2-64,2 %) et *n*-BuOH (37-47,3%).

On comparant les résultats à la concentration de 1000 µg/ml, il est clair que l'extrait acétate d'éthyle (64,2%) possède un effet inhibiteur meilleur que l'extrait *n*-BuOH (47,3%).



**Figure V.8 :** % d'inhibition d'acide linoléique des différents extraits

La figure V.9 montre l'augmentation de l'absorbance du contrôle avec le temps qui atteint le maximum ( $1,6 \pm 0,02$ ) à 72 heures. L'absorbance maximale du contrôle reflétant la formation des LPO n'a pas dépassé  $0,44 \pm 0,03$  à 72 heures. La diminution de l'absorbance de l'extrait AcOEt pourrait être attribuée à la décomposition des hydroperoxydes de l'acide linoléique durant la peroxydation.



**Figure IV.9:** l'inhibition de la peroxydation lipidique de *C. choulettiana*.

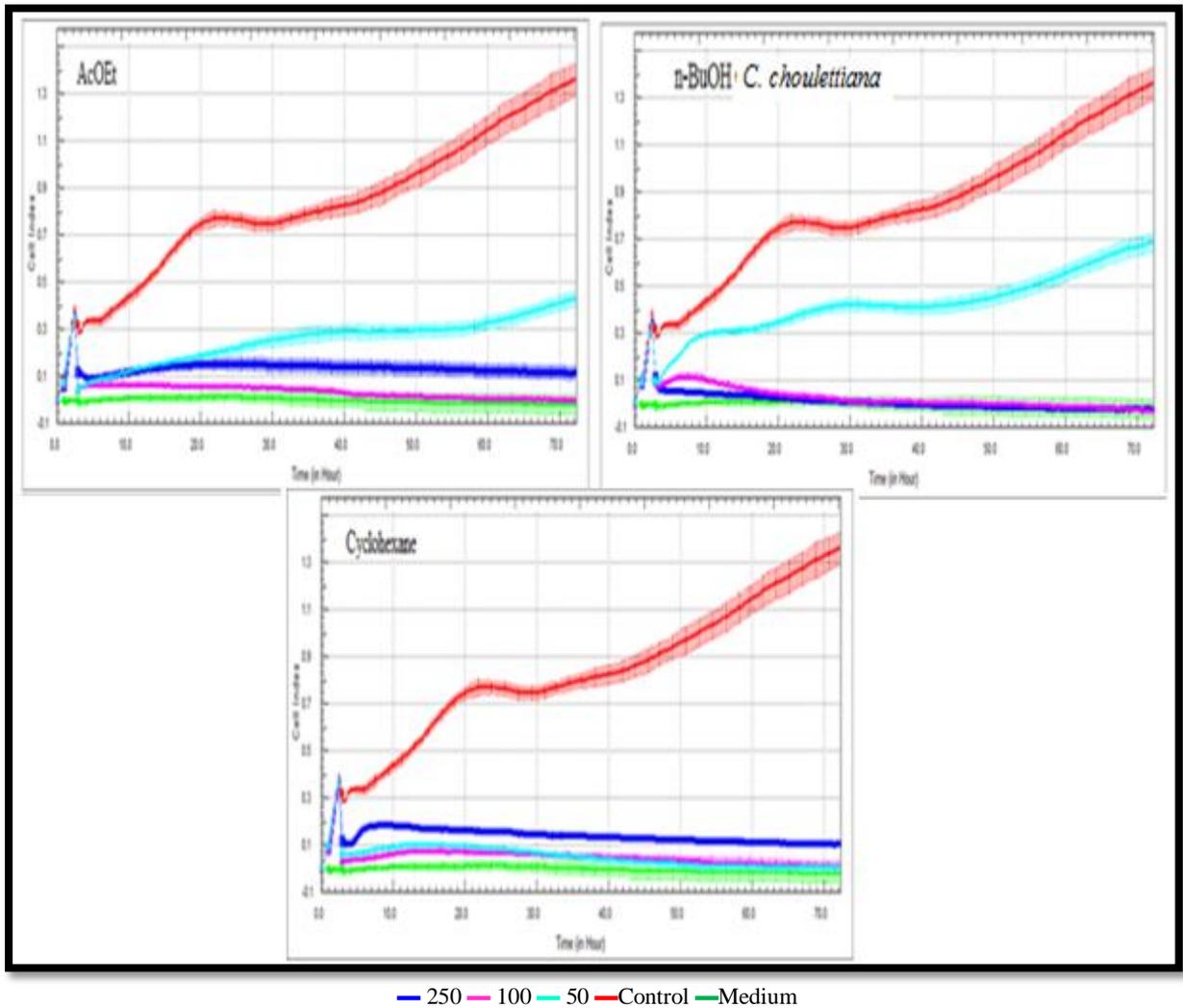
D'après ces résultats, il ressort que l'extrait AcOEt exhibe la meilleure inhibition de l'acide linoléique comparativement aux autres extraits, ceci pourrait être attribué probablement aux teneurs élevées des polyphénols et des flavonoïdes dans cet extrait.

Selon la nature et les concentrations des composés phénoliques obtenus dans cette étude, il est clair que les extraits de *C. choulettiana* présentent des propriétés efficaces à piéger les radicaux libres comme en témoigne la suppression des radicaux libres du DPPH et la peroxydation lipidique initiée par le système d'émulsion de l'acide linoléique par le thiocyanate ferrique. L'acide linoléique, faisant partie des acides gras incorporés dans la membrane cellulaire; était plus sensible aux attaques des radicaux libres qui provoquent la peroxydation des lipides [36]. Il a été suggéré que l'activité antioxydante des plantes peut être due à leurs contenus en composés phénoliques [37-38]. Selon les résultats obtenus, les extraits AcOEt (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* ont montré la plus grande quantité des polyphénols, et étaient plus riches en flavonoïdes, ainsi que les flavonoïdes et les acides phénoliques sont les principaux groupes de composés qui agissent comme antioxydants primaires ou des piègeurs de radicaux libres [39]. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* ont montré presque les mêmes composés polyphénoliques. Dans cette étude, l'activité antioxydante des différents extraits de *C. choulettiana* pourrait être due à un ou plusieurs éléments qui agissent de manière synergique des constituants chimiques mentionnés ci-dessus. La différence entre les extraits peuvent être expliquée par la présence de plusieurs substances actives dans l'extrait AcOEt tel que l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide gentisique, qui étaient plus concentré par rapport à l'extrait *n*-BuOH, caractérisé par la présence des quantités importantes de l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide férulique, sans qu'il est une relation directe avec ses effets antioxydants.

#### **V.1.5.4 L'évaluation de l'activité antiproliférative**

La figure V.10 montre les résultats de l'évaluation de la prolifération des cellules HeLa traitées pendant 70 heures avec les extraits cyclohexane, AcOEt et *n*-BuOH de *C. choulettiana* en utilisant l'instrument xCELLigence.

Nous remarquons d'après ces graphes qu'au cours des cinq premières heures, les cellules non traitées par les extraits ont montré une croissance normale. Ensuite, les échantillons ont été ajoutés dans le milieu de culture cellulaire de chaque puits de la plaque d'E-96.



**Figure V.10:** Une activité anticancéreuse des extraits AcOEt, cyclohexane et *n*-BuOH de *C. choulettiana*, contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain). Plusieurs concentrations de l'extrait ont été appliqués aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

D'après ces graphes on peut noter les points suivants :

- ✓ L'extrait cyclohexane semble avoir la meilleure réponse pour les trois concentrations testées. Cependant cet effet est pratiquement identique aux concentrations de 100 et 50 µg/ml comparativement à la concentration de 250 µg/ml et ce au cours de toute la durée de l'expérimentation.
- ✓ L'extrait AcOEt montre des effets inhibiteurs élevés aux concentrations 100 et 250 µg/ml respectivement et cet effet semble être le même pour la concentration 50 µg/ml juste pour les premières 30 heures.
- ✓ De même l'extrait *n*-BuOH présente un effet inhibiteur prononcé aux concentrations 100 et 250 µg/ml respectivement, alors que cet effet est très faible pour la concentration de 50 µg/ml dès les premières heures de l'expérimentation.

Les différences des activités antiprolifératives entre les extraits dépendent de leur composition phytochimique. Les travaux phytochimiques menés sur ces extraits ont permis l'isolement et l'identification structurale de plusieurs types de métabolites secondaires. Ainsi que l'analyse HPLC a mis en évidence la présence de plusieurs acides phénoliques dans les extraits AcOEt et n-BuOH. Plusieurs études ont montré que certains de ces composés possèdent des propriétés antiprolifératives, l'une menée sur l'activité antiproliférative des composés phénoliques a montré que la viabilité des cellules cancéreuses a diminué en dessous de 25% après incubation d'acides gras et d'hydrocarbures avec des cellules cancéreuses, y compris la lignée cellulaire HeLa [40].

#### V.1.5.5 Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* a été effectuée par la méthode des disques, et ce vis-à-vis de cinq souches bactériennes, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et métabolisme particulier. Les résultats sont représentés dans le tableau V.4.

**Tableau V.4:** Activités antibactériennes des huiles essentielles de *C. choulettiana*

Souches	Témoins				
	fleurs	Chloramphenicol	Erythromicin	Tetracyclin	Contrôle (DMSO)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	9,25	8,25	12,75	26,75	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	8,25	10	14,75	8
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	10,75	23	25	32,5	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	9	8	No data	18,5	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 291212	9	8,75	11,5	19,25	8

D'après le tableau nous constatons facilement que l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* a montré une activité modéré contre toutes les souches testées, les plus grands diamètres enregistrés varient de 9,25 à 10,75 mm comparativement au diamètre du contrôle.

Les huiles essentielles de *C. choulettiana* sont principalement composées de sesquiterpènes. De nombreuses études ont montré que les sesquiterpènes ont diverses activités biologiques, y compris antibactérienne, cytotoxique et antifongique [41]. Des études ont montré que les sesquiterpènes étaient capables d'inhiber la croissance de certaines bactéries et champignons au cours des essais *in vitro* [42-43].

## Partie 2: *Centaurea fragilis* Dur

### V.2 Criblage chimique par HPLC -TOF/MS

Le criblage chimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *C. fragilis* a été effectué par la même méthode HPLC-TOF/MS et dans les mêmes conditions que celles adoptés pour les extraits de *C. choulettiana* [25] dans le but d'identifier et quantifier ses constituants phénoliques.

### V.3 Activité antiproliférative en utilisant le système xCELLigence

Les testes antiprolifératives ont été menés sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type Hela (carcinome du col de l'utérus humain) au laboratoire de recherche de plante, du département de chimie de l'université de Çankiri Karatekin, Uluyazi Campus, 18100 Çankiri, Türkiye.

#### ➤ But

Le but consiste à évaluer l'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* sur les cellules Hela (carcinome du col de l'utérus humain).

#### ➤ Préparation des extraits et méthode d'analyse

La même méthode d'analyse de l'activité anticancéreuse effectuée pour *C. choulettiana* a été utilisée pour *C. fragilis* [24].

### V.4 Résultats et discussion

#### V.4.1 Identification des acides phénoliques et des flavonoïdes par HPLC-TOF/MS.

L'extrait *n*-BuOH (feuilles) de *C. fragilis* a été analysé par HPLC-TOF/MS. L'identification des composés phénoliques a été effectuée par la comparaison de leurs temps de rétention et leurs masses avec des standards. L'analyse HPLC-TOF/MS a clairement montré la richesse de l'extrait étudié et a permis d'identifier 19 composés sans les isoler dont 10 flavonoïdes et 9 acides phénoliques.

Le tableau V.5 illustre les résultats de cette analyse, alors que les figures V.11 et V.12 reportent les structures des composés identifiés.

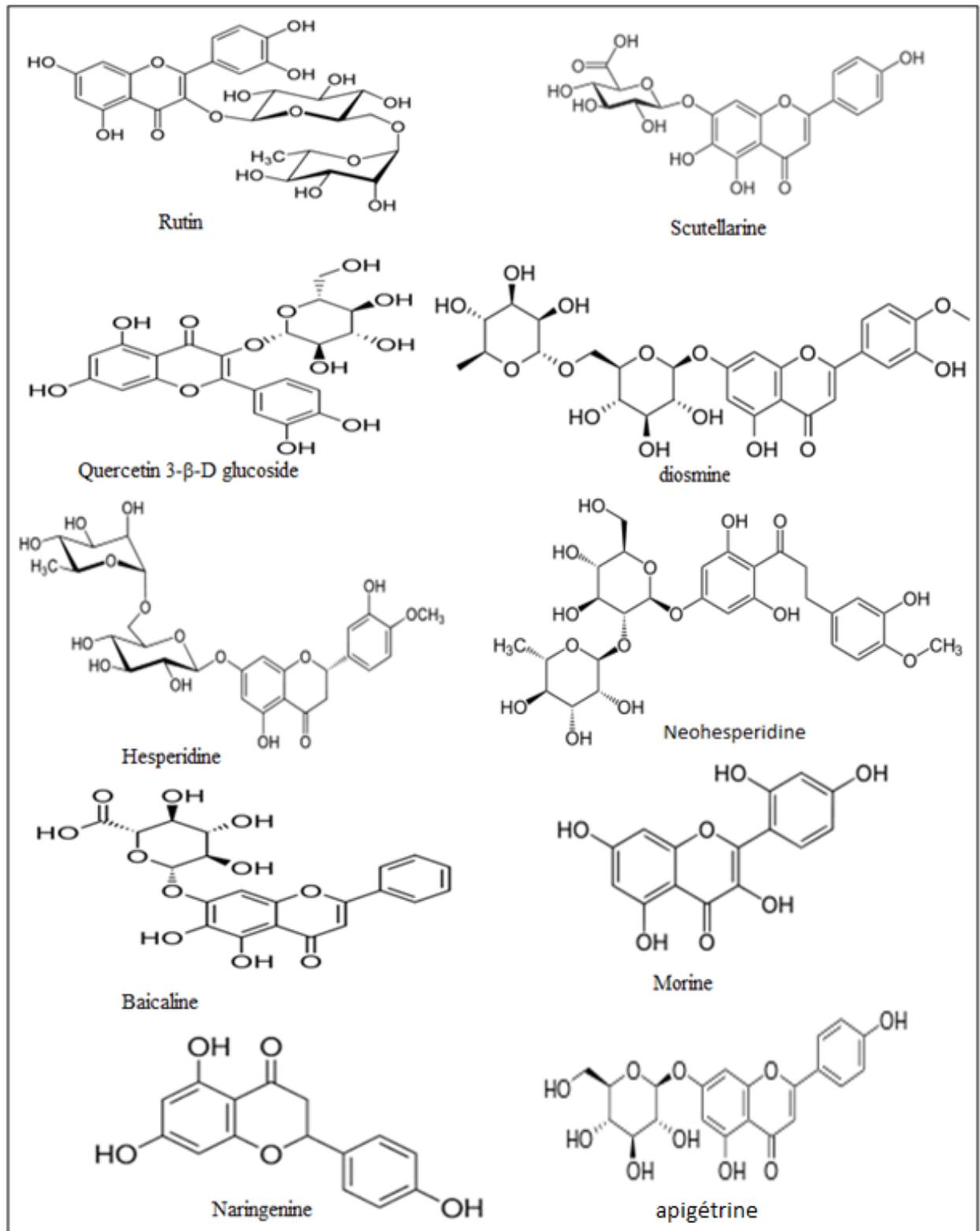
**Tableau V.5:** Composés identifiés dans l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* par HPLC-TOF/MS

N°	Composés identifiés	Tr (min)	<i>m/z</i>	Teneurs (mg/kg)
1	Acide formique	3.19	115.013	<b>114.43</b>
2	Acide gentisique	4.50	153.0297	13.29
3	Acide chlorogénique	5.46	353.1060	<b>2064.50</b>
4	Acide 4-hydroxybenzoïque	6.96	137.0344	12.74
5	Acide protocatéchique	7.08	153.0296	7.95
6	Acide vanillique	7.87	167.0467	4.64
7	Acide syringique	8.08	197.0580	8.79
8	Rutine	9.24	609.1718	<b>96.92</b>
9	Scutellarine	9.73	461.0937	<b>274.92</b>
10	Quercétine 3-β-D glucoside	9.77	463.1092	34.92
11	Acide sinapique	10.51	223.0746	19.86
12	Diosmine	10.62	607.1461	<b>205.09</b>
13	Hesperidine	10.764	609.2079	6.19
14	Apigétrine	10.87	431.1189	1.00
15	Neohesperidine	11.08	609.2083	3.59
16	Baicaline	12.05	445.0982	<b>81.71</b>
17	Morine	13.01	301.0516	5.519
18	Acide cinnamique	15.16	147.0552	4.26
19	Naringénine	15.69	271.0796	5.95

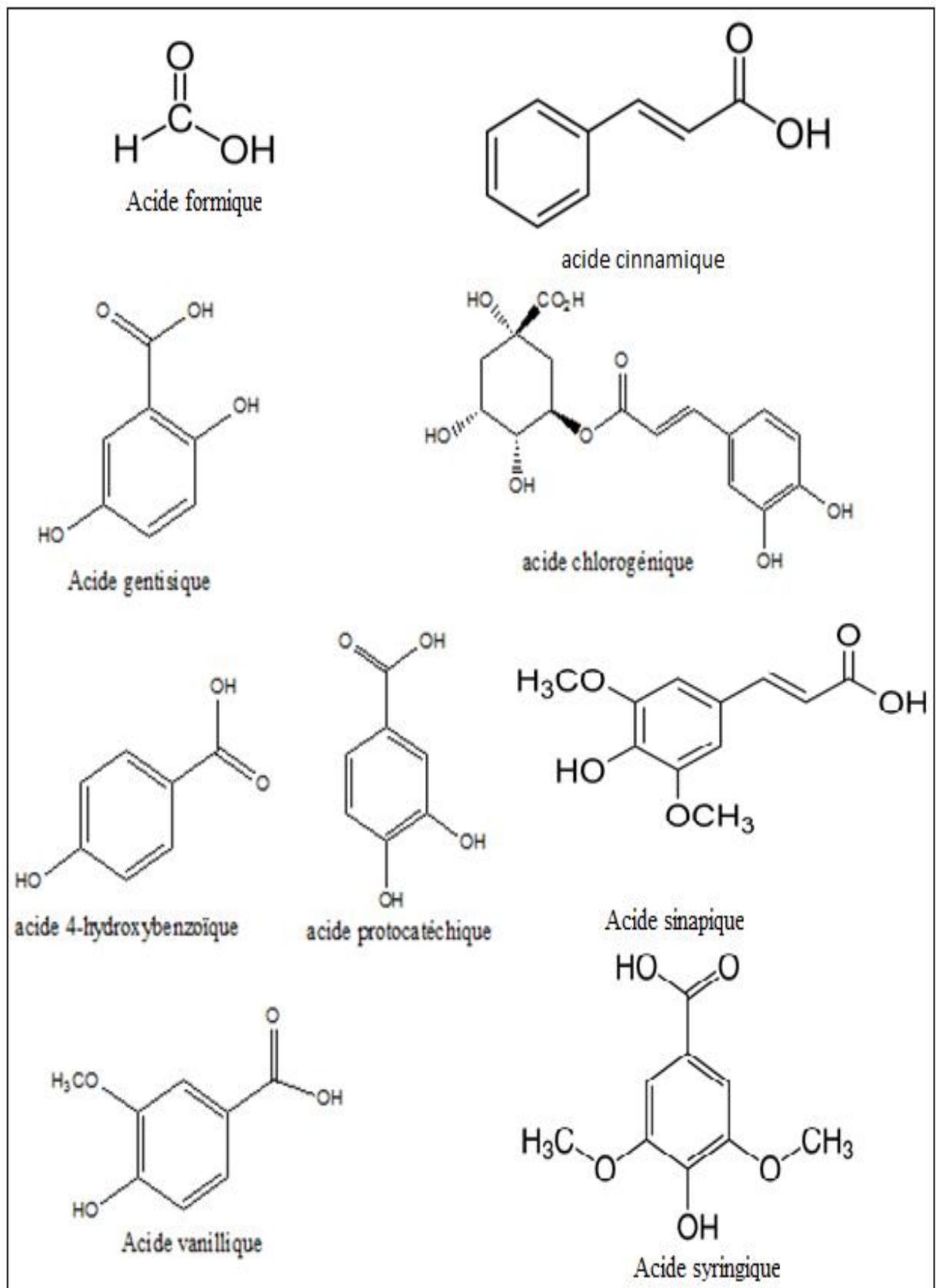
Comme le montre le tableau ci-dessus, l'extrait analysé comporte un mélange complexe des métabolites secondaires. Ces constituants appartiennent à deux groupes chimiques importants, à savoir, les acides phénoliques et les flavonoïdes connus pour leurs multiples activités pharmacologiques.

Les acides phénoliques ont été identifiés comme étant: l'acide formique, l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide sinapique et l'acide cinnamique avec l'acide chlorogénique ayant la concentration la plus élevée (2064.50 mg/kg plante) suivi de l'acide formique 114.43 mg/kg plante. Alors que les flavonoïdes ont été identifiés comme étant la rutine, la scutéllarine, la quercétine-3-*O*-β-glucoside, la diosmine, la hesperidine, l'apigétrine, la neohesperidine, la

baicaline, la morine et la naringénine avec la scutéllarine et la diosmine ayant les taux les plus élevés (274.92 and 205.09 mg/kg plante) suivi de la rutine et la baicaline (96.92 and 81.71 mg/kg plante) respectivement.



**Figure V.11:** Structures des flavonoïdes identifiés dans l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* par HPLC-TOF/MS.

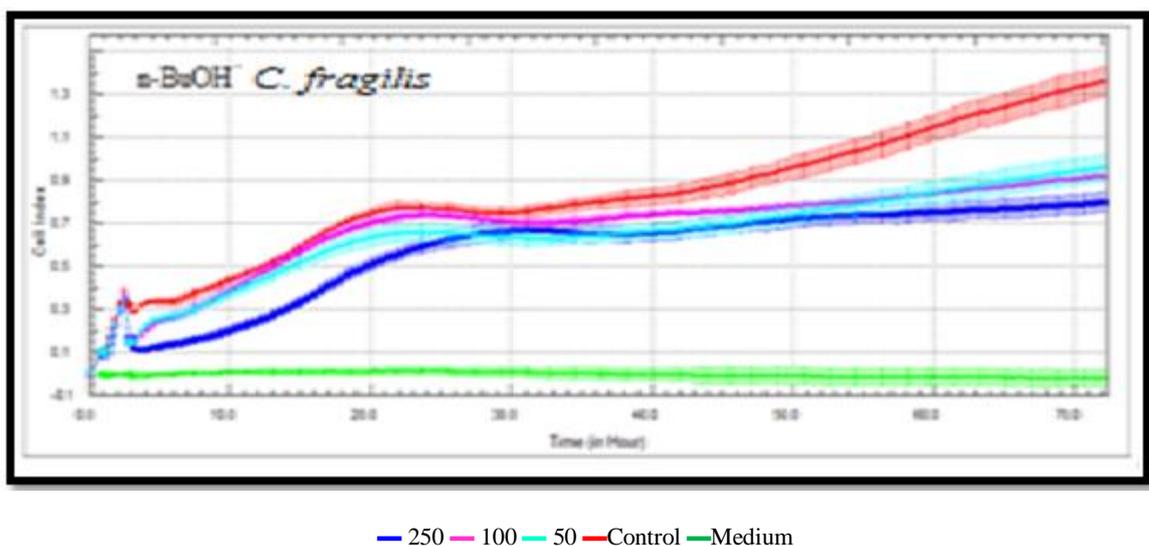


**Figure V.12:** Structures des acides phénoliques identifiés dans l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* par HPLC-TOF/MS.

#### V.4.2 L'évaluation de l'activité antiproliférative

L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* contre les cellules HeLa a été évaluée en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA qui permet de suivre l'effet des échantillons pendant 70 heures. La figure V.13 montre les résultats de l'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis*.

Cette figure montre qu'au cours des cinq premières heures, les cellules non traitées par les extraits ont montré une croissance normale. Au-delà de ce temps, l'extrait *n*-BuOH semble présenter une faible activité à l'exception de la concentration 250 µg/ml où on observe une inhibition remarquable au début de l'expérimentation (5h-70h).



**Figure V.13:** Une activité anticancéreuse de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain). Plusieurs concentrations de l'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

Les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les groupes les plus importants des métabolites secondaires et des composés bioactives se trouvant dans les plantes [44]. Comme exemple, l'acide chlorogénique, qui se trouve comme produit majoritaire dans l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* révèle diverses propriétés biologiques intéressantes, telles que antibactériennes [45], antioxydantes [46], anti-inflammatoires [47], anti carcinogènes et également des effets hypoglycémiant and hypolipidémiques [48]. Cependant, les flavonoïdes comme la scutéllarine, la diosmine, la rutine et autres sont bien connus pour leurs activités antioxydantes [49-51], antimicrobiennes [52] et anti-inflammatoires [53].

La présente étude comportant l'évaluation de l'activité antiproliférative a clairement montré que l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *C. fragilis* n'avait pratiquement aucune activité sur la

prolifération cellulaire des lignées étudiées et ce, bien que contenant des acides phénoliques et des flavonoïdes dont la majorité sont glycosilés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la glycolisation des flavonoïdes bloquerait leur entrée dans les cellules cancéreuses, d'où l'inactivité de cet extrait. En effet les flavonoïdes sont généralement cytotoxiques, mais cette efficacité dépend d'une part de leur glycolisation, leur degré de méthylation et d'autre part de leur concentration et également du type de cellule. La structure des flavonoïdes présents dans cet extrait ne correspondrait vraisemblablement pas à celle des flavonoïdes à activité antiproliférative [54-56].

### Conclusion

Les résultats de cette étude indiquent que l'extrait AcOEt des feuilles de *C. choulettiana* possède des propriétés antioxydantes puissantes *in vitro*. Ils sont confirmés par le contenu élevés des polyphénols et flavonoïdes. L'analyse par HPLC-TOF/MS révèle la présence des acides 4-hydroxybenzoïque, gentisique, chlorogénique, caféique, vanillique, *p*-coumarique, férulique, salicylique et protocatechuique. Les trois extraits de *C. choulettiana* ont été testés vis à vis des cellules HeLa pour évaluer leur activité antiproliférative, seul l'extrait cyclohexane semble avoir une réponse positive à différentes concentrations.

Les travaux menés sur l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *C. fragilis* ont montrés la richesse de ce dernier en acides phénoliques et flavonoïdes. Alors que le test préliminaire entrepris pour l'évaluation de son activité antiproliférative vis-à-vis des cellules HeLa a montré que cet extrait n'avait aucune activité.

**Références bibliographiques**

- [1] Stalikas, C.D., (2007), Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, 30, 3268-3295.
- [2] Namiki, M., (1990), Antioxidants/Antimutagens in Food. *CRC critical reviews in food science and nutrition* 29, 273-300.
- [3] Dalton, D.A., (1995), Antioxidant defences of plants and fungi. *Ed. Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*, 298-355.
- [4] Garcia-Plazaola, J.I., Becerril, J.M., (1999), A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochemical Analysis* 10, 307-313.
- [5] Durackova, Z., Djrolo, F., Hougbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N., Avimadj, M., (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. Gvozdjakova A (ed). P: 19-43.
- [6] Abuja, P.M., and Albertini, R., (2001), Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306, 1-17.
- [7] Sanchez, M.C., (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8 (3), 121-137.
- [8] Marc, Fr., Davin, A., Deglène, B, L., Ferrand C., (2004), Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences* 20(4), 458-463.
- [9] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856.
- [10] Feher, J., Csomos, G., Vereckei, A., (1987) *Free Radical Reactions in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [11] Rice, E.C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., (1995). Pridham, J.B., The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-383.
- [12] Burda, S., Oleszek, W., (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774-2779.
- [13]. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards K., (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127, 183-198.
- [14] Bartosz, G., (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology* 9, 5-21.

- [15] Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R., Roy P., (2008). Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chem.* 110, 697-705.
- [16] Mercader, A.G., Duchowicz, P.R., Frandez, F. M., Castro, E. A., Bennardi, D.O., Autino, J.C., Romanelli, G. P., (2008). QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorgan. Med.Chem.* 16, 7470-7476.
- [17] Cushine, T.T.P., Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. antimicrob. Ag.* 26, 343-356.
- [18] Krishnamachari, V., Levine, L.H., Pare, P.W., (2002). Flavonoid oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4357-4363.
- [19] Mc Phail, D.B., Hartley, R.C., Gardner, P.T., Duthie, G.G., (2003). Kinetic and Stochimetric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1684-1690.
- [20] Nagai, S., Ohara, K., Mukai, K., (2005). Kenetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. *J. Phys. Chem., B.* 109, 4234-4240.
- [21] Rajendran, M., Manisankar, P., Gandhidasan, R., Murugesan, R., (2004). Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturaly Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7389-7394.
- [22] chaovabalikit And Worlstar, R.E., (2004), Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties, *Food Chem. Toxicol.* 69: 67-72.
- [23] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., (1999), Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymol.* 299:152-178.
- [24] Kolda, S., Demirtas, I., Ozen, T., Demircia, M.A., Behçet, L., (2014), Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional Usage, *Journal of the science of food and agriculture*, 10, 6903.
- [25] Benzie, I. F., Strain, J., (1996), The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- [26] Sharma, Om. P., Bhat, T.K., (2009), DPPH antioxidant essay revisited, *Food chemistry*, 113 (4), 1202.
- [27] Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K., (2001), Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro, *Food Chemistry*, 73 (3), 285–290.

- [28] Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y., (1996), Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.* 21(6), 895-902.
- [29] Koleva, V., Beek, T.A., Linssen, J.P.H., (2002), Screening of Plant Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochemical Analysis*, 13(1), 8- 17.
- [30] Magalhães, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., (2006), Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, *Anal.Chim.Acta*, 558, 310-318.
- [31] Yen, G, Hsieh, C.L., (1998), Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommiaulmoides*) toward various peroxidation models *in vitro*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3952-3957.
- [32] Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M., (2006), Cancer Stem Cells— Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells, *Cancer research*, 66(19), 9339-9344.
- [33] Dos Santos Silva, I., Cancer Epidémiologie: Principes et Méthodes, *Centre International de Recherche sur le cancer*, Lyon, France, 1999.
- [34] Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y. S., Duran, A., (2013), Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea*L. species, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290–296.
- [35] Marfak, A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools. Thèse de Doctorat. Université de Limoges, France.
- [36] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., (2004), Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74, 2157–2184.
- [37] Cook, N.C., Samman, S., (1996) Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.
- [38] Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S., Lele, R.D., (2004) Free radicals and antioxidants in human health:current status and future prospects. *J Assoc Physic India*, 52, 794-804.
- [39] Polterait, O., (1997), Antioxidants and free- radical scavengers of Natural Origin. *Current Org.Chem.*, 1, 415-440.
- [40] Demirtas, I., Sahin, A., (2013), Bioactive Volatile Content of the Stem and Root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*. *Journal of Chemistry*, 1-6.

- [41] Seto, M., Miyase, T., Umehara, K., Ueno, A., Hirano, Y., Otani, N., (1988), Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity, *Chem.pharm. Bull.*, 36(7): 2423-2429.
- [42] Machado, R.R.R., Valente Junior, W., Lesche, B., Coimbra, E.S., de Souza, N.B., Abramo, C., Soares, G.L.G., Kaplan, M.A.C., (2012), Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22(5): 1011-1017.
- [43] Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Agar, G., et Ozer, H., (2004), biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, *Food Control*, 15(7): 549-557.
- [44] Kim et al., (2003), "Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums", *Food Chem.*, 81, 321-326.
- [45] Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A.M., Nunan, E.A., Glória, M.B.A., (2006), "Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria", *J Agric Food Chem*, 54, 8738-43.
- [46] Yuki, S., Shirou, I., Toshimitsu, K., Jiro, O., Masaki, K., Takeshi H., Mitsuru, S., Ken, I., (2011), "In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid", *Int. J. Pharm.* 403(1-2):136-8.
- [47] Santos, M.D.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., de Souza, F.E.P., (2006), "Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2236-2240.
- [48] Pilar, N., Lucía, A.S., Eduardo, A., Sharon, O., Manasés, G., (2005), "Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species", *Phytotherapy Research*, 19(8), 661-664.
- [49] Wolf, B., Werner, H., Christa, M., Manfred, S., (1990), "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies", *Methods Enzymol*, 186, 343-55.
- [50] Channy, P., So, H.S., Shin, C.H., Baek, S.H., Moon, B.S., Shin, S.H., Lee, H.S., Lee, D.W., Park R.K., (2003), "Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells", *Biochem Pharmacol* 66(7):1287-95.
- [51] Laughton, M.J., Evans, P. J., Moroney, M.A., Houlst, J.R.S., well, B.H., (1991), "Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability", *Biochem Pharmacol*, 42(9):1673-81.
- [52] Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005), "Antimicrobial activity of flavonoids", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356.

- [53] Eldahshan, O.A., Azab, S.S., (2012), “Anti-inflammatory Effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin Induced Rat Oedema Model”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (08): 74-79.
- [54] Batra, P., Sharma, A.K., (2013), Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives, *Biotech.* 3(6): 439–459.
- [55] Sak, K., Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types, (2014), *Pharmacogn Rev*, 8(16): 122–146.
- [56] Fiot, J., Sanon, S., Azas, N., Mahiou, V., Jansen, O., Angenot, L., Balansard, G., Ollivier, E., (2006), Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera Senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 173-178.

## *Conclusion générale*

La découverte de ressources naturelles provenant du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Ce travail a pour but principal, l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Centaurea* endémiques à l'Algérie et appartenant à la famille des *Asreraceae*: *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur. Il consiste à identifier les métabolites secondaires de leurs extraits afin d'élargir et approfondir la connaissance phytochimique de ces plantes. Les deux plantes n'ont jamais fait objet d'étude auparavant.

L'investigation phytochimique des feuilles de l'espèce *C. choulettiana* a conduit à l'isolement de plusieurs composés, dont 4 isolés de la phase cyclohexanique à savoir :

- ✓ 3 stérols: **Mélange: Stigmastérol et  $\gamma$ -Sitostérol.**  
**3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -Sitostérol (Daucosterol)**
- ✓ 1 sesquiterpène lactone: **Chlorojanérine**

6 composés obtenus de la phase AcOEt:

- ✓ 2 acides gras: **Acide (9Z) octadéc-9-énoïque**  
**Acide hexadécanoïque (acide palmitique)**
- ✓ 1 flavonoïde: **4', 5, 7-trihydroxyflavone (apigénine)**
- ✓ 1 Indole alcaloïde: **1H-Indole-3-carboxaldéhyde**
- ✓ 2 stérols: **Mélange: 3-O-  $\beta$  -D-glucopyranosyl stigmastérol**  
**3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -Sitostérol (Daucosterol)**

3 composés obtenus de la phase *n*-BuOH:

- ✓ 2 acides phénoliques: **Acide 5-O-cafféoylquinique (Acide chlorogénique)**  
**Acide férulique**
- ✓ 1 coumarine: **Scopolétine (7-hydroxy, 6-méthoxy –coumarine)**

D'autre part, l'investigation phytochimique des feuilles de l'espèce *C. fragilis* a conduit à l'isolement de 4 composés de la phase *n*-BuOH dont 2 ont été identifiés:

- ✓ 1 flavonoïde : **Lutéoline-7-O- $\beta$ -D-glucoside**
- ✓ 1 acide phénolique: **Acide chlorogénique**

La composition de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* obtenu par entraînement à la vapeur d'eau, a été analysée par CG et CG/SM. Les composés majoritaires identifiés sont : le  $\beta$ -eudesmol (6,8%), le 1,5-epoxysalvial-4 (14) -ène (6,6%), l'oxyde de caryophyllène (4,28%), epi- $\alpha$ -eudesmol (3,08%), tricosane (3,31%) et heptacosane (3,06%).

L'analyse HPLC-TOF/MS des extraits des deux espèces a révélée la présence de :

- ✓ **9 acides phénoliques** dans les extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana*: l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide caféique, acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, l'acide salicylique.
- ✓ **19 composés phénoliques** dans l'extrait *n*-BuOH (feuilles) de *C. fragilis* dont:
  - **9 acides phénoliques**: l'acide formique, l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide sinapique, l'acide cinnamique.
  - **10 flavonoïdes**: rutine, scutellarine, quercetin-3- $\beta$ -D glucoside, diosmine, hesperidine, apigétrine, neohesperidine, baicaline, morine et naringenine.

La quantification des phénols totaux et des flavonoïdes totaux a été effectuée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* par les méthodes colorimétriques. Les résultats montrent une teneur en phénols totaux et en flavonoïdes beaucoup plus importante dans l'extrait AcOEt des feuilles.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage de radical libre DPPH et celle de l'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* a montré que l'extrait AcOEt des feuilles possède un pouvoir antioxydant plus ou moins important que les autres extraits et ce comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard.

De même, une évaluation préliminaire de l'activité antiproliférative des extraits cyclohexane, AcOEt et *n*-BuOH de *C. choulettiana* et de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* vis-à-vis des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) a montré une bonne activité pour l'extrait cyclohexane aux faibles concentrations comparativement aux autres extraits de la même espèce. Cependant l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* n'a présenté aucune activité.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des fleurs de *C. choulettiana* a été effectuée par la méthode de disques, et ce vis-à-vis de cinq souches bactériennes, les résultats ont montrés une activité modérée contre toutes les souches.

Ces résultats préliminaires pourraient constituer une base pour la recherche de nouveaux composés et des études complémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer et la composition chimique et d'autres activités biologiques de ces deux espèces. Enfin nous espérons que ce travail constitue une modeste contribution dans la mise en valeur de la flore algérienne qui reste à explorer.

**Mots clés :** *Centaurea choulettiana* Pomel, *Centaurea fragilis*, étude phytochimique, HPLC-TOF/MS, composés phénoliques, flavonoïdes, huile essentielle, activité antimicrobienne, pouvoir antioxydant, activité antiproliférative.

## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae), endémiques à l'Algérie et n'ayant jamais fait objet d'étude auparavant. Il s'agit de *Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur.

L'investigation phytochimique des extraits cyclohexane, acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de *C. choulettiana* et l'extrait *n*-butanol de l'espèce *C. fragilis* a permis l'isolement et l'identification de 13 produits. L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques (UV, RMN 1D & 2D, HPLC/TOF-MS et la GC/MS) ainsi que par la comparaison des résultats avec les données de la littérature.

L'analyse des huiles essentielles des fleurs de *C. choulettiana* par la technique GC/MS, effectuée pour la première fois, a montré la présence des produits majoritaires, phtalate (18.38%) suivi du  $\beta$ -eudesmol (6.8%), 1,5-epoxysalvial-4(14)-ène (6.6%), oxyde de caryophyllène (4.28%), tricosane (3.31%), 7-epi- $\alpha$ -eudesmol (3.08%) et heptacosane (3.06%). L'activité antibactérienne de cette même huile essentielle a été déterminée sur cinq souches bactériennes selon la méthode de diffusion de disque, les résultats ont montrés une activité modeste contre toutes les souches.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* a été réalisé par les méthodes colorimétriques. Cette étape a montré un contenu en polyphénols et en flavonoïdes plus important dans l'extrait AcOEt des feuilles. Afin d'identifier et de quantifier les acides phénoliques présents dans ces mêmes extraits, un criblage chimique a été accompli par HPLC/TOF-MS, ceci a révélé la présence de 9 acides phénoliques en quantités variables. En plus l'analyse HPLC-TOF/MS de l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* a révélé la présence de 9 acides phénoliques et 10 flavonoïdes.

L'activité antioxydante des extraits AcOEt et *n*-BuOH (feuilles et fleurs) de *C. choulettiana* a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de l'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO). L'extrait AcOEt (feuilles) présentait l'effet le plus puissant vis-à-vis du radical libre DPPH avec (96,54%) et l'inhibition de la peroxydation lipidique (64,17%).

Concernant l'activité antiproliférative, les résultats ont montré que l'extrait cyclohexane de *C. choulettiana* présente une bonne activité vis-à-vis des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain), alors que l'extrait *n*-BuOH de *C. fragilis* ne montre aucune activité significative aux mêmes concentrations.

**Mots clés:** *Centaurea choulettiana*, *Centaurea fragilis*, HPLC-TOF/MS, GC-MS, acides phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, activité anticancéreuse, huiles essentielles.

# *Abstract*

This work is devoted to the phytochemical and biological study of two species of the genus *Centaurea* (Asteraceae), endemic to Algeria and has never been studied before. They are *Centaurea choulettiana* Pomel and *Centaurea fragilis* Dur.

The phytochemical investigation of cyclohexane, ethyl acetate and *n*-butanol extracts from the aerial parts of *C. choulettiana* and *n*-butanol extract of *C. fragilis* allowed the isolation and identification of 13 products. The structural elucidation of the isolated compounds was carried out by combining the various spectroscopic methods (UV, 1D & 2D NMR, HPLC/TOF-MS and GC/MS) as well as by comparing the results with the data of the literature.

The analysis of essential oil (flowers) of *C. choulettiana* by the GC/MS technique, carried out for the first time, showed the presence of several chemical groups from which, phthalate (18.38%) followed by  $\beta$ -eudesmol (6.8%), 5-epoxysalvial-4(14)-ene (6.6%), caryophyllene oxide (4.28%), tricosane (3.31%), 7-epi- $\alpha$ -eudesmol (3.08%) and heptacosane. The antibacterial activity of this oil was determined against five bacterial strains according to the disk diffusion method, the results showed modest activity against all the strains.

Quantification of the total polyphenols and total flavonoids of the EtOAc and *n*-BuOH (leaves and flowers) extracts of *C. choulettiana* was performed by colorimetric methods. This step showed a content of polyphenols and flavonoids more important in the AcOEt extract of the leaves. In order to identify and quantify the phenolic acids present in these extracts, chemical screening was performed by HPLC-TOF/MS, this revealed the presence of 9 phenolic acids in various amounts. The HPLC-TOF / MS analysis of the *n*-BuOH (leaves) extract of *C. fragilis* revealed the presence of 9 phenolic acids and 10 flavonoïds.

The antioxidant activity of the EtOAc and *n*-BuOH (leaves and flowers) extracts of *C. choulettiana* was evaluated by the free radical scavenging method (DPPH) and the inhibition of lipid peroxidation (LPO). The EtOAc (leaves) extract exhibited the strongest effect with respect to the DPPH free radical (96.54%) and the inhibition of lipid peroxidation (64.17%).

Concerning the antiproliferative activity, the results showed that the cyclohexane extract of *C. choulettiana* was the most active against HeLa cells (carcinoma of the human cervix), while the *n*-BuOH extract of *C. fragilis* was inactive in his unlevel doses.

**Key words:** *Centaurea choulettiana* Pomel, *Centaurea fragilis*, HPLC-TOF / MS, GC-MS, phenolic acids, flavonoïds, antioxidant activity, antiproliferative activity, essential oil.

## الملخص

أنصب اهتمامنا في هذا العمل على ا لدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنوعين من جنس *Centaurea* (Asteraceae)، مستوطنة في الجزائر ولم تدرس من قبل وهما *Centaurea choulettiana* Pomel و *Centaurea fragilis* Dur.

سمحت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصات الهكسان الحلقي، خلاصات الإيثيل والبتانول العادي من الأجزاء الهوائية ل *C. choulettiana* ومستخلص البوتانول العادي لنوع *C. fragilis* بعزل وتحديد 13 مركب. تم التعرف البنيوي للمركبات المعزولة من خلال الجمع بين الطرق الطيفية المختلفة HPLC-,UV, RMN 1D & 2D و TOF/MS و GC/MS وكذلك بمقارنة النتائج مع معطيات المراجع.

تحاليل الزيوت الطيارة لأزهار *C. choulettiana* باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطياف الكتلة لنبته *C. choulettiana* تم إنجازها لأول مرة، بينت وجود المنتجات الأساسية التالية phtalate (18.38%),  $\beta$ -eudesmol (6.8%), 1,5-epoxysalvial-4(14)-ène (6.6%), oxyde de caryophyllène (4.28%), tricosane (3.31%), 7-epi- $\alpha$ -eudesmol (3.08%), heptacosane (3.06%)

الفعل المضاد للميكروبات لنفس الزيت العطري حددت على خمسة سلالات بيكتيرية بطريقة الأقراص، النتائج أظهرت نشاط متقاضع ضد كل السلالات.

تم تحديد إجمالي الفينولات والفلافونويدات في مستخلصات خلاصات الإيثيل والبتانول (أوراق و أزهار) من *C. choulettiana* بواسطة الطرق اللونية. هذه أظهرت النتائج محتوى معتبر من البوليفينول والفلافونويدات في مستخلصات خلاصات الإيثيل للأوراق. لتحديد وتكميم الأحماض الفينولية الموجودة في نفس المستخلصات، تم فحص المواد الكيميائية بواسطة HPLC-TOF/MS، وهذا أظهر وجود 9 أحماض فينولية بكميات متفاوتة. بالإضافة إلى ذلك أظهرت تحاليل HPLC-TOF/MS لمستخلص البوتانول لأوراق *C. fragilis* وجود 9 أحماض فينولية و10 فولافونويدات.

قدرت الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل والبتانول (أوراق و أزهار) ل *C. choulettiana* بطريقة إرجاع الجذر الحر DPPH وتثبيط بيروكسيد الدهون (LPO). أظهر مستخلص خلاصات الإيثيل للأوراق التأثير الأقوى مع الجذور الحرة (96.54%) ومع تثبيط بيروكسيد الدهون (64.17%).

أما فيها يخص النشاط المضاد لتكاثر خلايا HeLa (سرطان عنق الرحم البشري) ، أظهرت نتائج مستخلص الهكسان الحلقي، لأوراق *C. choulettiana* نشاطا جيدا بينما لم يظهر مستخلص البوتانول العادي ل *C. fragilis* أي فعالية ضد نفس الخلايا

**الكلمات الدالة:** *Centaurea choulettiana* pomel, *Centaurea fragilis*، الزيوت الطيارة، النشاطية المضادة للميكروبات ، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للسرطان. HPLC/TOF/MS, GC/MS

# *Articles*

## RESEARCH ARTICLE

# Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts

Djihane Azzouzi<sup>1</sup>, Kenza Bioud<sup>2</sup>, Ibrahim Demirtas<sup>3</sup>, Fatih Gül<sup>3</sup>, Djamel Sarri<sup>4</sup>, Samir Benayache<sup>1</sup>, Fadila Benayache<sup>1</sup> and Ratiba Mekkiou<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie; <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté de Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie; <sup>3</sup>Plant Research Laboratory, Chemistry Department, Çankırı Karatekin University, Uluyazi Campus, 18100 Çankırı, Türkiye; <sup>4</sup>Département de Biologie, Université de M'Sila, 28000 M'Sila, Algérie

## ARTICLE HISTORY

Received: June 18, 2016  
Revised: October 7, 2016  
Accepted: October 13, 2016

DOI: 10.2174/1574888X11666161102092319

**Abstract:** This study aimed to quantify phenolic acids from *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) leaves (CcL) and flowers (CcF); compare the antioxidant activity of their extracts. The identification and quantification of phenolic acids from ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH) extracts of CcL and CcF carried out using HPLC-TOF/MS analysis system which revealed the presence of several phenolic acids. The antioxidant activity of both organs extracts investigated using total phenolics (TP), flavonoids (TF) contents, DPPH radical scavenging and lipid peroxidation inhibition. The amounts of TP, TF were higher in EtOAc CcL extract. Besides, the later extract exhibited the most powerful effect on the DPPH scavenging activity with (96.54%), on lipid peroxidation inhibition (64.17%). Hence, the results reflected the variability in both parameters.

Please provide  
corresponding author(s)  
photograph  
size should be 4" x 4" inches

**Keywords:** *Centaurea choulettiana*, phenolic acids, HPLC-TOF/MS, antioxidant activity, total phenolics, total flavonoids.

## INTRODUCTION

Plants are a precious source of interesting biologically active compounds. Biological and chemical screenings are complementary approaches for the rapid detection of plant constituents. Phenolic compounds are a wide group of secondary metabolites that can be found in plants, such as simple phenols, phenolic acids, flavonoids, coumarins, tannins, etc [1]. Polyphenols which are considered as one of the important phytochemicals having antioxidant properties and several industrial applications gained special interest in the last decades.

The genus *Centaurea* which belonging to the Asteraceae family contains about 700 species essentially centered in the Mediterranean region [2]. In Algeria, it is represented by 45 species including 7 in the Sahara [3-5]. However, many species of this genus have long been used in traditional medicine for cure of various ailments such as antidiabetics [6], diuretic [7] and antirheumatic [8], as well as for the treatment of cancer [9] and microbial infections [10]. A variety of secondary metabolites have been reported from

different species of this genus such as sesquiterpene lactones and flavonoids [11-16] which have been shown to be biologically active [17-19]. *Centaurea choulettiana* Pomel is a perennial herb, from the Asteraceae family. This plant is often synonymous with *Centaurea acaulis* L. ssp. *Balansae* Boiss. et Reut. [3]. As a part of our continuing investigation of Algerian medicinal plants [11-14, 20-23], we report in the present study, the identification and quantification of phenolic acids in EtOAc and *n*-BuOH extracts of CcL and CcF of *C. choulettiana* using HPLC-TOF/MS. The later extracts were subjected to DPPH radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibition tests to evaluate the antioxidant activities. To our knowledge, no report on any phytochemical or pharmacological study on *C. choulettiana* is available up to date.

## MATERIALS AND METHODS

## Plant Material

The plant material was collected from the east of Algeria (M'Sila region) in June 2011 and authenticated by Dr. D. Sarri (University of M'Sila). A voucher specimen (ACC06/11) has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL Unit Research, University Frères Mentouri Constantine, Algeria.

\*Address correspondence to this author at the Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie; Tel: +213550201977; Fax: +21331811177; E-mail: mekkiou\_ratiba@yahoo.fr

## Extraction Procedure

A quantity of 1370 g (leaves) and 840 g (flowers) were dried at room temperature and cut into small pieces then macerated three times (24h for each time) with methanol / H<sub>2</sub>O (70%). After filtration and evaporation, the obtained extract was partitioned with solvents in increasing polarity: chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Each extract was evaporated under reduced pressure. The obtained extracts were (2.37 g leaves and 1 g flowers) of CHCl<sub>3</sub>, (3 g leaves and 2 g flowers) of EtOAc and (14 g leaves and 10 g flowers) of *n*-BuOH respectively.

## Preparation of Calibration Curves

The standard solutions (gallic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxy benzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, *p*-coumaric acid, ferulic acid, rosmarinic acid, salicylic acid) were freshly prepared by dissolving authentic compounds in methanol. The required concentration standard solutions were made by gradual dilution with methanol. The calibration curve was constructed for each standard by plotting the concentration of standard against peak area.

## Chromatographic Conditions

The HPLC analysis was performed with an Agilent Technology of 1260 Infinity HPLC System equipped with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 μm) column. Mobile phases A and B were ultra-pure water with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 ml min<sup>-1</sup> and column temperature was 35 °C. Injection volume was 10 μl. The solvent program was as follow: 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-30 min 10% B. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative and operated with a nitrogen gas temperature of 325 °C, nitrogen gas flow of 10.0 l min<sup>-1</sup>, nebulizer of 40 psi, capillary voltage of 4000 V and finally, fragmentor voltage of 175 V. For sample analysis, standards phenolic acids and dried crude extracts (200 ppm) were dissolved in methanol at room temperature. Samples were filtered passing through a PTFE (0.45 μm) filter by an injector to remove particulates.

## Antioxidant Activity

### Estimation of Total Phenolic Content

The amount of phenolic compounds in both extracts was determined by Folin-Ciocalteu reagent method with some modifications [24]. 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (1N) and 7.5 ml of H<sub>2</sub>O, 1.5 ml of 10% solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were added to 1 ml of plant extract. The resulting mixture was incubated for 90 min. The absorbance of the sample was measured at 765 nm. Gallic acid was used as standard (1 mg/ml). The results were determined from the standard curve and were expressed as Gallic acid equivalent (mg GAE/g of extract).

### Estimation of Total Flavonoid Content

1 ml of sample plant extract was mixed with 1 ml of methanol, 5 ml of H<sub>2</sub>O, 0.3 ml of NaNO<sub>2</sub> (5%), then 0.6 ml

of AlCl<sub>3</sub> (10%) was added and remains at room temperature for 5 min. The absorbance was measured at 510 nm; using quercetin as standard (1 mg ml<sup>-1</sup>). Flavonoid contents were determined from the standard curve and were expressed as quercetin equivalent (mg QE/g of extract) [24].

## DPPH Scavenging Activity

The antioxidant activity was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH [25]. Six different methanol dilutions of each crude extracts were mixed with 1 ml of DPPH 0.2 mM methanol solution. After 30 min, the readings were made at 517 nm. A solution of DPPH (1 ml, 0.2 mM) in methanol (1 ml) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the fractions and the crude extracts provide the positive control. The test was performed in triplicate. The percentage of DPPH scavenging activity (I%) was calculated using the following equation (1):

$$I\% = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100.$$

Where A<sub>0</sub> is the absorbance of the control

A<sub>1</sub> is the absorbance of the extract or standard.

## Inhibition of Lipid Peroxidation

Inhibition of lipid peroxidation activities of EtOAc and *n*-BuOH extracts were estimated by the method of thiocyanate by using linoleic acid as a source of peroxide [26]. The generated peroxide reacted with the ferrous chloride (Fe<sup>2+</sup>) to form the ferric ion (Fe<sup>3+</sup>) monitor form of a thiocyanate complex. The emulsion of linoleic acid was prepared by homogenization of linoleic with Tween-40 emulsified in phosphate buffer (0.2 M, pH 7). The samples were prepared in MeOH/water and the selected concentrations for the study were 800 and 1000 μg ml<sup>-1</sup>. After incubation at 37 °C the ammonium thiocyanate and ferrous chloride were added. The mixture prepared by the same procedure was used as control. Trolox was used as reference. The coloration was measured at 500 nm for 4 successive days; the results were calculated according to (1):

## Statistical Analysis

All assays were carried in triplicates and results expressed as means ± standard deviation. Statistical comparisons were done with the Student's test. Differences were considered to be highly significant at P < 0.01 and significant at P < 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification and Quantification of Phenolic Acids by HPLC-TOF/MS

The EtOAc as well as *n*-BuOH extracts of CcL and CcF of *Centaurea choullettiana* were analyzed by HPLC-TOF/MS. Table 1 presents the amounts of individual phenolic acids, of which the identification has been performed on the basis of their retention times and mass spectrometry by comparison with those of different standards.

**Table 1.** HPLC-TOF/MS analysis of phenolic acids from *Centaurea choulettiana* extracts.

Phenolic acids	Rt	EtOAc leaves	EtOAc flowers	<i>n</i> -BuOH leaves	<i>n</i> -BuOH flowers
gentisic acid	4,40	3.23	0.79	3.01	1.70
chlorogenic acid	6,15	1.13	ND	5.04	17.78
4-hydroxy benzoic acid	6,90	5.43	0.82	2.91	0.21
protocatechuic acid	7,00	ND	0.22	2.68	1.25
caffeic acid	7,71	0.10	0.49	10.07	0.11
vanilic acid	7,82	0.41	0.12	0	ND
<i>p</i> -coumaric acid	10,01	0.28	0	0	0
ferulic acid	10,82	0.50	0.55	4.81	0.04
salisilic acid	13,04	0.09	0	0.14	0

ND: not detected

The separation of phenolic acids in EtOAc and *n*-BuOH extracts of CcL and CcF is shown by chromatograms represented in Fig. 1. These phenolic acids were identified as gentisic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid and protocatechuic acid. On one hand the EtOAc extracts of CcL and CcF were found to contain almost the same phenolic compounds, with the leaves having the highest values. The *n*-BuOH extract of CcL was found to contain all of the previous compounds with caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid having the highest concentrations (10.07, 5.05, 4.81 mg/kg plant) respectively.

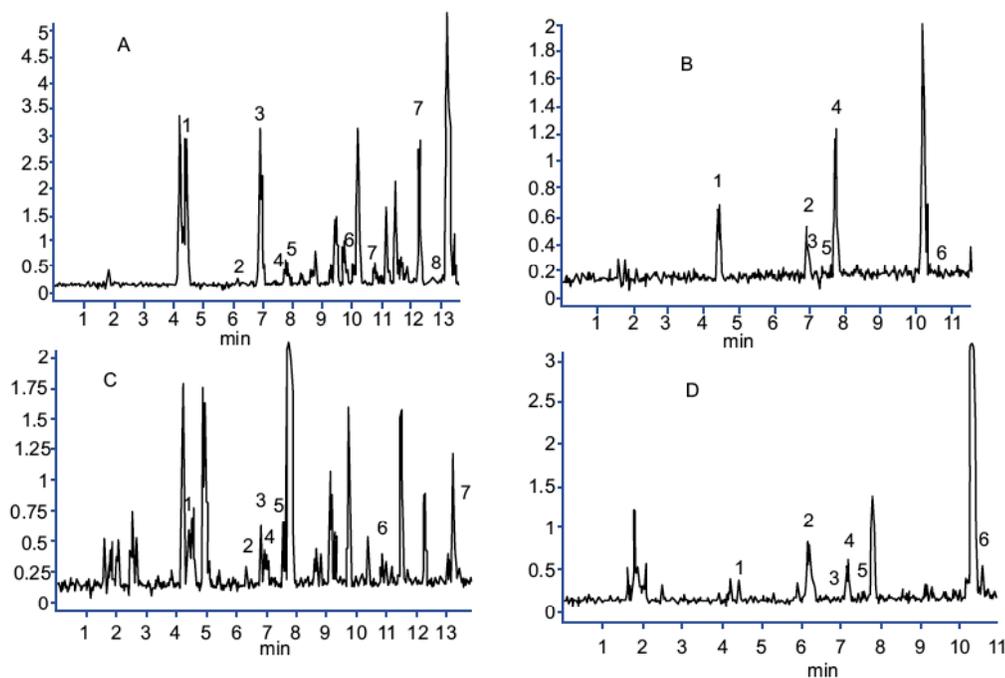
On the other hand, the same previously mentioned phenolic compounds were detected in the EtOAc extract of

CcL with 4-hydroxybenzoic acid and gentisic acid having the highest concentrations (5.43, 3.24 mg/kg plant) respectively. Finally, chlorogenic acid was detected in the *n*-BuOH extract of CcF with the highest concentration 17.78 mg/kg plant.

### Evaluation of the Antioxidant Activity

#### Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents

The EtOAc extracts contain more phenolic and flavonoid compounds than *n*-BuOH extracts. However, the leaves extracts apparently contain more phenolic and flavonoid compounds than the flowers. The results obtained in the present study as shown in Table 2, revealed that the leaves of



**Fig. (1).** HPLC-TOF/MS chromatograms of phenolic acids in extracts of *Centaurea choulettiana* pomel: 1.Gentisic acid, 2.Chlorogenic acid, 3. 4-hydroxybenzoic acid, 4.Caffeic acid, 5.Vanilic acid, 6.*p*-Coumaric acid, 7.Ferulic acid, 8.Salicylic acid.

A: ETOAc (leaves) extract, B: ETOAc (flowers) extract,

C: *n*-BuOH (leaves) extract, D: *n*-BuOH (flowers) extract.

both EtOAc and *n*-BuOH extracts had the highest amount of phenolic content ( $325.81 \pm 0.038$  mg GAE and  $176.91 \pm 0.003$  mg GAE/g of extract) respectively. Among the different extracts tested for total flavonoid content, EtOAc and *n*-BuOH extracts of CcL reflected the highest amount ( $263.73 \pm 0.004$  mg QE and  $145.2 \pm 0.001$  mg QE/g of extract) respectively.

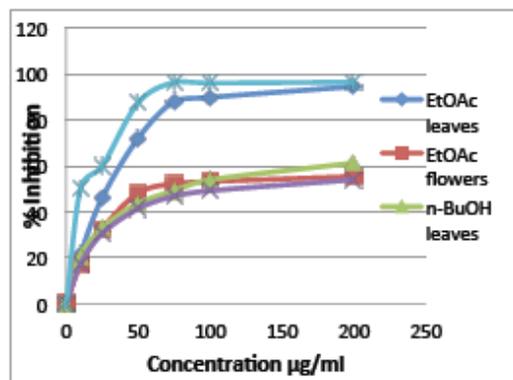
**Table 2.** Total phenolic and flavonoid values of *Centaurea choulettiana* Pomel.

Extracts	polyphenols	flavonoids
EtOAc (leaves)	$325.81 \pm 0.038$	$263.73 \pm 0.004$
EtOAc (flowers)	$248.35 \pm 0.005$	$188.20 \pm 0.013$
<i>n</i> -BuOH (leaves)	$176.91 \pm 0.003$	$145.20 \pm 0.001$
<i>n</i> -BuOH (flowers)	$133.13 \pm 0.002$	$122.33 \pm 0.003$

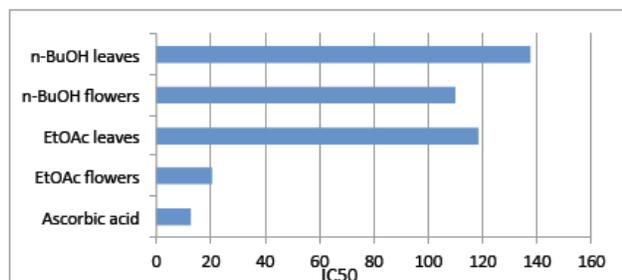
### DPPH Radical-Scavenging Activity Assay

The free radical scavenging activities of the four extracts were evaluated through their ability to quench 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

Comparing the four extracts, the EtOAc of CcL impact was more effective than the others, and its percentage of the inhibition was 94.29% at 200  $\mu$ g/ml. The *n*-BuOH extract of CcF exhibited the weakest effect (55.3%).



**Fig. (2).** DPPH scavenging activities of *Centaurea choulettiana* Pomel extracts.



**Fig. (3).** DPPH IC<sub>50</sub> values of antioxidant activity of *Centaurea choulettiana* Pomel extracts and Ascorbic Acid.

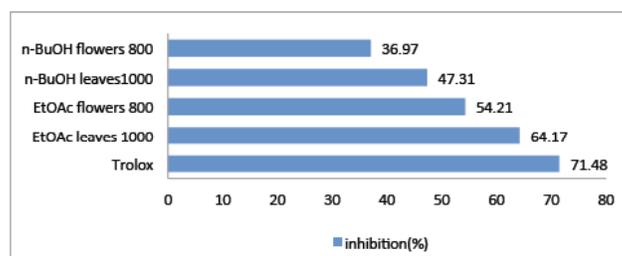
### Inhibition of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation represents the main molecular mechanism involved in the oxidative damage of cell structures leading to cell death observed in several pathologies.

Figure 4 showed the percentage of linoleic acid inhibition of various extracts for two different concentrations (800 and 1000  $\mu$ g/ml), which was in the following order:

Trolox (71.5%), AcOEt (54.2–64.2%) and *n*-BuOH (37–47.3%).

Comparing the results at 1000  $\mu$ g/ml, it is clear that EtOAc (64.2%) possess better inhibitory effect than *n*-BuOH (47.3%).



**Fig. (4).** LPO inhibition (%) *Centaurea choulettiana* Pomel.

Figure 5 showed an increase in absorbance of the control which has reached the maximum ( $1.6 \pm 0.02$ ) at 72 hours. The maximum absorbance of control reflecting the formation of LPO did not exceed ( $0.44 \pm 0.03$ ) at 72 hours. The decrease in absorbance of EtOAc extract could be attributed to the decomposition of linoleic acid hydroperoxide during peroxidation.

According to the nature and total phenolic concentrations obtained in this investigation, it is clear that *Centaurea choulettiana* extracts displayed effective free radical scavenging properties as reflected by the suppression of DPPH radical and lipid peroxidation initiated by linoleic acid emulsion system by ferric thiocyanate. Linoleic acid, as part of fatty acids embedded in cell membrane; was more sensitive towards attack by free radicals that cause lipid peroxidation [27]. It has been suggested that the antioxidant activity of plants might be due to their phenolic compounds [28-29]. According to the obtained results, both CcL and CcF EtOAc extracts of *C. choulettiana* showed the highest amount of TPC and were richer in flavonoids (TFC) as well. Flavonoids and phenolic acids are major groups of compounds that act as primary antioxidants or free radical scavengers [30]. Both EtOAc and *n*-BuOH extracts (CcL and CcF) of *C. choulettiana* were found to contain mostly the same polyphenolic compounds. In this investigation, the antioxidant activity of different extracts of *C. choulettiana* could be due to one or more components acting in synergetic manner of the above mentioned chemical constituents. The differences between the extracts can be probably explained by the presence of more active substances in the EtOAc such as 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, which were the

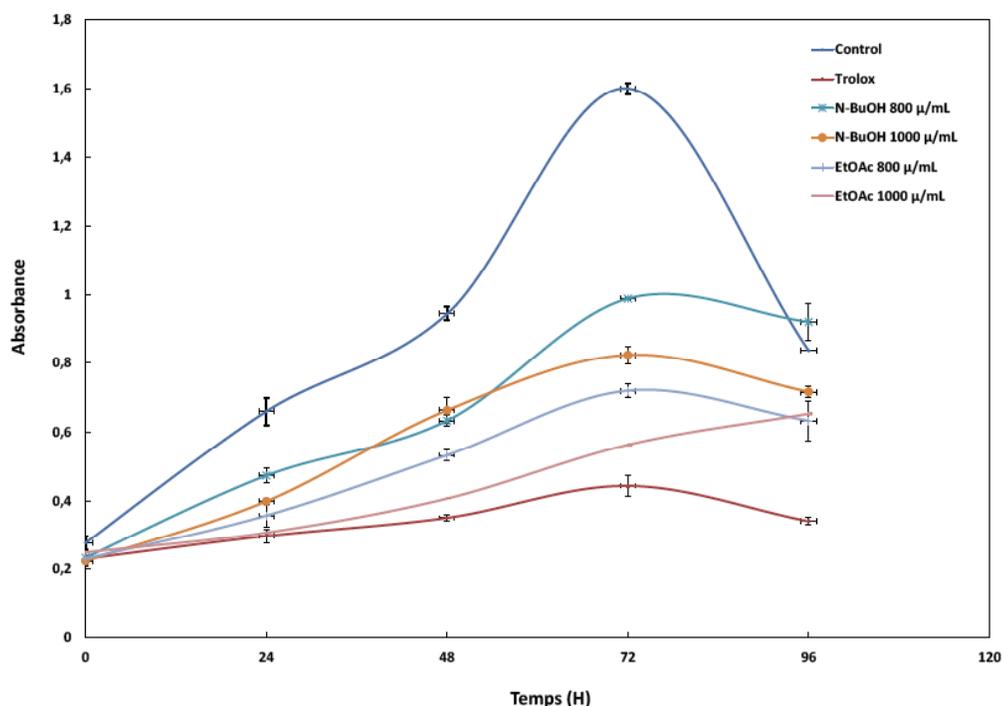


Fig. (5). LPO absorbance of *Centaurea choulettiana* Pomel.

highly concentrated in comparison to *n*-BuOH extract characterized by the presence of important amounts of caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid with no direct relation to its antioxidant effects.

## CONCLUSION

The results indicate that the EtOAc extract (leaves) of *Centaurea choulettiana* possesses strong antioxidative properties *in vitro*. They are confirmed by high polyphenols and flavonoid contents. And the HPLC-TOF/MS analysis reveals the presence of 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-Coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, protocatechuic acid.

## ABBREVIATIONS

EtOAc	=	Ethyl acetate extract
CcL	=	<i>Centaurea choulettiana</i> of leaves
CcF	=	<i>Centaurea choulettiana</i> of flowers
<i>n</i> -BuOH	=	<i>n</i> -butanol extract
HPLC-TOF/MS	=	High Performance Liquid Chromatography-Time of Flight/Mass Spectrometry

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

## REFERENCES

- [1] Stalikas, C.D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, **2007**, *30*, 3268-3295.
- [2] Susanna, A.; Garcia-Jacas, N. In Systematics. Evolution and Biogeography of Compositae. *International Association for Plant Taxonomy.*, **2009**, 293-313.
- [3] Mabberley, D.J. *The Plant Book*. Cambridge University Press., **1987**.
- [4] Quezel, P.; and Santa, S. *Nouvelle Flore de l'Algerie et des Regions Desertiques et Meridionales*, Tome II, edition CNRS, Paris., **1963**, p. 1016.
- [5] Ozenda, P. *Flore du Sahara Septentrional et Central*, CNRS, **1958**, p. 450.
- [6] Kaij-A-Kamb, M.; Amoros, M.; Girrel, L. Chemistry and biological activity of the genus *Centaurea*. *Pharma. Acta Helv.*, **1992**, *67*, 178-188.
- [7] Masso, J.L.; Bertran, M.N.; Adzet, T. Contribution to the chemical and pharmacologic study of some species of *Centaurea* (Compositae). *Plant Med. Phytother.*, **1979**, *13*, 41-45.
- [8] Gonzalez, A.G.; Bermejo, J.; Caberar, I.; Galido, A.; Masenet, G.M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. confifera*. *Ann. Quim.*, **1977**, *73*, 86.
- [9] Grieve, M.A. *Modern Herbal*. Dover Publications. Inc.: New York, NY, USA, **1971**.
- [10] Kumarasamy, Y.; Nahar, L.; Cox, P.J.; Dinan, L.N.; Ferguson, F.R.; Finnie, D.A.; Jaspars, M.; Sarker, S.D. Biological activities of lignans from *Centaurea scabiosa*. *Pharm. Biol.*, **2003**, *41*, 203-206.
- [11] Bicha, S.; Bentamene, A.; Benaissa, O.; Benayache, S.; Garcia, V.P.; Leon, F.; Brouard, I.; Bermejo, J.; Benayache, F. Flavonoids aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem. Natr. Comp.*, **2011**, *47* (1), 105-106.
- [12] Mezache, N.; Bendjeddou, D.; Satta, D.; Mekkiou, R.; Benayache, S.; Benayache, F. Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chem. Natr. Comp.*, **2010**, *46* (5), 801-802.
- [13] Seghiri, R.; Mekkiou, R.; Boumaza, O.; Benayache, S.; Bermijo, J.; Benayache, F. Pheolic compounds from *Centaurea africana*. *Chem. Natr. Comp.*, **2006**, *42* (5), 610-611.
- [14] Medjroubi, K.; Benayache, F.; Bermejo, J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia.*, **2005**, *76*, 744-746.

- [15] Akkol, E.K.; Arif, R.; Ergun, F.; Yesilada, E. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *122* (2), 210-215.
- [16] Gürbüz, I.; Yesilada, E. Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *112*, 284-291.
- [17] Koukoulitsa, E.; Skaltsa, H.; Karioti, A.; Demetzos, C.; Dimas, K. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines *in vitro*. *Planta Med.*, **2002**, *68* (7), 649-652.
- [18] Yesilada, E.; Gürbüz, I.; Bedir, E.; Tatli, I.; Khan, I.A. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *95* (2-3), 213-219.
- [19] Shoeb, M.; Jaspars, M.; Stephen, M.; Manus, M.; Celik, S.; Nahar, L.; Kong-Thoo-Lin, P.; Sarker S.D. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *J. Nat. Med.*, **2007**, *61*, 164-169.
- [20] Seghiri, R.; Boumaza, O.; Mekkiou, R.; Benayache, S.; Mosset, P.; Quintana, J.; Estévez, F.; León, F.; Bermejo, J.; Benayache, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem. Lett.*, **2009**, *2*, 114-118.
- [21] Kolli, E.H.; León, F.; Benayache, F.; Estévez, S.; Quintana, J.; Estévez, F.; Brouard, I.; Bermejo, J.; Benayache, S. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, *23*, 977-983.
- [22] Hammoud, L.; Seghiri, R.; Benayache, S.; Mosset, P.; Lobstein, A.; Chaabi, M.; León, F.; Brouard, I.; Jaime Bermejo, J.; Benayache, F. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26* (3), 203-208.
- [23] Belkacem, S.; Belbache, H.; Boubekri, C.; Mosset, P.; Mosbah, O.R.; Marchioni, E.; Benayache, S.; Benayache, F. Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Res. J. Pharmaceut., Biological. Chem. Sci.*, **2014**, *5* (3), 1275-1279.
- [24] Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, **1999**, *299*, 152-178.
- [25] Magalhães, L.M.; Santos, M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal. Chim. Acta.*, **2006**, *558*, 310-318.
- [26] Yen, G.; Hsieh, C.L. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various peroxidation models in vitro. *J. Agri. Food Chem.*, **1998**, *46*, 3952-3957.
- [27] Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, **2004**, *74*, 2157-2184.
- [28] Cook, N.C.; Samman, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, **1996**, *7*, 66-76.
- [29] Devasagayam, T.P.A.; Tilak, J.C.; Boloor, K.K.; Sane, K.S.; Ghaskadbi, S.; Lele, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physic. India*, **2004**, *52*, 794-804.
- [30] Polterait, O. Antioxidants and free-radical scavengers of Natural Origin. *Curr. Org. Chem.*, **1997**, *1*, 415-440.

## Qualitative and Quantitative Analysis of Polar Extract from *Centaurea fragilis* Dur. Using HPLC-TOF/MS

D Azzouzi<sup>1</sup>, R Mekkiou<sup>1\*</sup>, I Demirtas<sup>2</sup>, F Gül<sup>2</sup>, R Seghiri<sup>1</sup>, O Boumaza<sup>1</sup>, S Benayache<sup>1</sup>, F Benayache<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie.

<sup>2</sup>Plant Research Laboratory, Chemistry Department, Çankırı Karatekin University, Uluçay Campus, 18100 Çankırı, Türkiye.

Available online: 10<sup>th</sup> September, 2016

### ABSTRACT

In recent decade, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) has become the most selective techniques for rapid screening and characterization of known and unknown constituents from the extracts of medicinal plants. *Centaurea* species are known for their multiple biological activities. With the aim of estimating the chemical composition of *n*-BuOH extract of the aerial parts of *Centaurea fragilis*, a rapid qualitative and quantitative screening was carried out using HPLC-TOF/MS. The use of HPLC-TOF/MS technique resulted in the qualitative and quantitative determination of nineteen (19) compounds from which 9 phenolic acids and 10 flavonoids knowing for their pharmacological properties.

**Keywords:** *Centaurea Fragilis*, Phenolic Acids, Flavonoids, Chlorogenic Acid, Hplc-Tof/Ms.

### INTRODUCTION

The genus *Centaurea* which belonging to the Asteraceae family contains about 700 species essentially centered in the Mediterranean region<sup>1</sup>. In Algeria, the genus *Centaurea*, is represented by 45 species, including 7 in the Sahara<sup>2,3</sup>. Moreover, many species of this genus are used as medicinal herbs<sup>4,6</sup>. Previous phytochemical studies on this genus showed the variety of their chemical composition and their richness, especially, in flavonoids and sesquiterpene lactones<sup>7-12</sup> which are considered as chemotaxonomic markers of the genus *Centaurea*. *Centaurea fragilis* Dur. is an endemic species and in the best of our knowledge, no phytochemical or pharmacological studies are reported for this species. As a part of our continuing investigation of Algerian *Centaurea* species<sup>13-20</sup>, the present study was aimed to screen and identify the main components of *n*-BuOH extract of *Centaurea fragilis* using HPLC-TOF/MS.

### EXPERIMENTAL

#### Plant Material

The plant was collected from El kala region, Algeria, in May 2014. The plant was identified by Dr. D. Sarri. (Biology Department, University of M'Sila). A voucher specimen (CFA 05/14) has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL Unit Research, Frères Mentouri University, Constantine, Algeria.

#### Extraction Procedure

A quantity (482 g) of leaves aerial parts of *Centaurea fragilis* was dried at room temperature and cut into small pieces then macerated three times (24h for each time) with methanol/H<sub>2</sub>O (80 %). After filtration and evaporation, the obtained extract was partitioned with solvents in increasing polarity: chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Each extract was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then filtered and evaporated under reduced pressure to give CHCl<sub>3</sub> extract (7g), EtOAc extract (7.5g) and *n*-BuOH extract (29g). The present study focuses on qualitative and quantitative determination of components of the *n*-BuOH extract.

#### HPLC-TOF/MS Analysis

The HPLC analysis was performed with an Agilent Technology of 1260 Infinity HPLC System equipped with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4.6 x100mm, 3.5µm) column. Mobile phases A and B were ultra-pure water with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup> and column temperature was 35°C. Injection volume was 10 µL. The solvent program was as follow: 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-30 min 10% B. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative and operated with a nitrogen gas temperature of 325 °C, nitrogen gas flow of 10.0 L min<sup>-1</sup>, nebulizer of 40 psi, capillary voltage of 4000 V and finally, fragmentor voltage of 175 V. For sample analysis, dried crude extracts (200 ppm) were dissolved in methanol at room temperature. Samples were filtered

Table 1: HPLC-TOF/MS analysis of *n*-BuOH extract of *Centaurea fragilis*.

S. No	Compound identified	Rt (min)	<i>m/z</i>	Molecular formula	Contents (mg/kg plant)
1.	Formic acid	3.19	115.013	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.43
2.	Gentisic acid	4.51	153.0297	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	13.29
3.	Chlorogenic acid	5.47	353.1060	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	2064.50
4.	4-hydroxybenzoic acid	6.96	137.0344	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	12.74
5.	Protocatechuic acid	7.09	153.0296	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	7.95
6.	Vanillic acid	7.88	167.0467	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4.64
7.	Syringic acid	8.08	197.0580	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	8.79
8.	Rutin	9.24	609.1718	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	96.92
9.	Scutellarin	9.74	461.0937	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	274.92
10.	Quercetin 3- <i>O</i> -β-glucoside	9.77	463.1092	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	34.92
11.	Sinapic acid	10.51	223.0746	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	19.86
12.	Diosmin	10.62	607.1461	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	205.09
13.	Hesperidin	10.76	609.2079	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	6.19
14.	Apigetrin	10.88	431.1189	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	1.00
15.	Neohesperidin	11.09	609.2083	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	3.59
16.	Baicalin	12.05	445.0982	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	81.71
17.	Morin	13.01	301.0516	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	5.52
18.	Cinnamic acid	15.16	147.0552	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4.26
19.	Naringenin	15.69	271.0796	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	5.95

passing through a PTFE (0.45μm) filter by an injector to remove particulates.

## RESULTS AND DISCUSSION

*Identification and quantification of compounds by HPLC-TOF/MS analysis.*

The *n*-BuOH extract was obtained from the aerial parts of *C. fragilis* and analyzed by HPLC-TOF/MS. The identification of individual compounds were performed on the basis of their retention times and mass spectrometry by comparison with those of different standards. Nineteen compounds were identified and listed in table 1. As it can be seen, the analyzed extract comprises a complex mixture of plant secondary metabolites. These constituents belong to two important chemical classes, phenolic acids and flavonoids, knowing for their pharmacological activities. These phenolic acids were identified as formic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, sinapic acid and cinnamic acid with chlorogenic acid having the highest concentration (2064.50 mg/kg plant) followed by formic acid 114.43 mg/kg plant. While, flavonoids were identified as rutin, scutellarin, quercetin-3-*O*-β-glucoside, diosmin, hesperidin, apigetrin, neohesperidin, baicalin, morin and naringenin with scutellarin and diosmin having the highest concentrations (274.92 and 205.09 mg/kg plant) followed by rutin and baicalin (96.92 and 81.71 mg/kg plant) respectively. Flavonoids and phenolics acids are the most important groups of secondary metabolites and bioactive compounds in plants<sup>21</sup>. Chlorogenic acid, which exhibits many biological properties, including antibacterial<sup>22</sup>, antioxidant<sup>23</sup>, anti-inflammatory<sup>24</sup> and anticarcinogenic activities, particularly hypoglycemic and hypolipidemic effects<sup>25</sup>, was found as the major phenolic acid in the *n*-BuOH extract of *C. fragilis*. Whereas flavonoids such as scutellarin, diosmin, rutin and others are well known to have special activities such as

antioxidant<sup>26-28</sup>, antimicrobial<sup>29</sup>, anti-inflammatory<sup>30</sup>, antiviral<sup>31</sup>, cardiovascular protection and antitumor effects<sup>32</sup>.

## CONCLUSION

The present study helps to predict the formula and structure of 19 phenolic acids and flavonoids detected by HPLC/MS analysis from the *n*-butanolic extract of *Centaurea fragilis*. Further investigations may lead to isolation of bio-active compounds and their structural elucidation and screening of pharmacological activity will be helpful for further drug development. From these results, it could be concluded that *C. fragilis* contains various bioactive compounds and could be recommended as a plant of phytopharmaceutical importance.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was financially supported by the Algerian Ministry of Higher education and Scientific Research (MESRS).

## REFERENCES

- Mabberley D.J. The Plant Book. Cambridge University Press. 1987.
- Quezel P, and Santa S. Nouvelle Flore de l'Algerie et des Regions Desertiques et Meridionales, Tome II, edition CNRS, Paris, 1963 ; p. 1016.
- Ozenda P, *Flore du Sahara Septentrional et Central*, CNRS, 1958 ; p. 450.
- Barrero et al., (1997), "Cytotoxic Activity of Flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*", *Fitoterapia*, 68(3): 281-283.
- Farrag et al., (1993), "Phytochemical Investigation of *Centaurea araneosa* Growing in Egypt", *Zag. J. Pharm. Sci.*, 2(1): 29-45.
- Gürkan et al., (1998), "Cytotoxicity Assay of Some Plants From Asteraceae", *Fitoterapia*, 69(1): 81-82.

7. Ribeiro et al., (2002), "Flavonoid C-glucosides and a lignan from *Centaurea macrocephala* (Compositae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 1097–1100.
8. Koukoulitsa et al., (2002), "Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines *in vitro*", *Planta Med*, 68(7): 649-52.
9. Yesilada et al., (2004), "Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats", *J. Ethnopharmacol*, 95(2-3): 213-9.
10. Gürbüz et al., (2007), "Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various *in vivo* and biochemical techniques", *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 284–291.
11. Shoeb et al., (2007), "Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae)", *J Nat Med*, 61, 164–169.
12. Akkol et al., (2009), "Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of ethnopharmacology*", 122(2): 210-215.
13. Seghiri et al., (2006), "Phenolic compounds from *Centaurea africana*", *Chemistry of Natural Compounds*, 42(5): 610-611.
14. Seghiri et al., (2009), "A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*", *Phytochem. Lett.*, 2, 114.
15. Mezache et al., (2010), "Secondary metabolites from *Centaurea lippii*", *Chemistry of Natural Compounds*, 46(5): 801-802.
16. Bicha et al., (2011), "Flavonoids aglycones from *Centaurea maroccana*", *Chemistry of Natural Compounds*, 47(1): 105-106.
17. Kolli et al., (2012), "Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*", *J Braz Chem Soc*, 23, 977-983.
18. Bicha et al., (2013), "Maroccanin: A New  $\gamma$ -lactone and Other Constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae)", *Rec. Nat. Prod.*, 7(2), 114-118.
19. Hammoud et al., (2012), "A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M", *Natural Product Research*, 26(3): 203-208.
20. Belkacem et al., (2014), "Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3): 1275-1279.
21. Kim et al., (2003), "Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums", *Food Chem.*, 81, 321-326.
22. Almeida et al., (2006), "Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria", *J Agric Food Chem*, 54, 8738–43.
23. Sato et al., (2011), "*In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid", *Int. J. Pharm.* 403(1-2):136-8.
24. Dos Santos et al., (2006), "Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2236–2240.
25. Nicasio et al., (2005), "Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species", *Phytotherapy Research*, 19(8), 661–664.
26. Bors et al., (1990), "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies", *Methods Enzymol*, 186, 343-55.
27. Park et al., (2003), "Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells", *Biochem Pharmacol* 66(7):1287-95.
28. Laughton et al., (1991), "Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability", *Biochem Pharmacol*, 42(9):1673-81.
29. Cushnie et al., (2005), "Antimicrobial activity of flavonoids", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356.
30. Omayma et al., (2012), "Anti-inflammatory Effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin Induced Rat Oedema Model", *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (08): 74-79.
31. Chiang et al., (2003), "*In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*", 52(2): 194-198.
32. Remesy et al., (1996), "Intérêt nutritionnel des flavonoïdes = Nutritional interest of flavonoids", *médecine et nutrition*, 32(1): 17-27.

## Essential Oil Composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria

Djihane Azzouzi<sup>1</sup>, Ratiba Mekkiou<sup>1\*</sup>, Pierre Chalard<sup>2</sup>, Jean-Claude Chalchat<sup>2</sup>, Ouahiba Boumaza<sup>1</sup>, Ramdane Seghiri<sup>1</sup>, Fadila Benayache<sup>1</sup>, Samir Benayache<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université des frères Mentouri, Constantine, Route d'Ain El Bey-25000, Constantine, Algérie.

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174.

Available Online : 10<sup>th</sup> September, 2016

### ABSTRACT

The essential oil of air-dried flowers of *Centaurea choulettiana* Pomel was obtained by steam distillation and was analyzed by GC and GC-MS. Forty components were identified in the essential oil with the sesquiterpenes were the most abundant class of compounds (32.61%). Carbonylic compounds were also identified in high quantities (24.6%), while Hydrocarbons were found in low quantities (14.85%). However, oxygenated monoterpenes were present in lower quantities with a percentage of 3.41%.

**Keywords:** Essential oil, sesquiterpenes, monoterpenes, *Centaurea choulettiana*, Asteraceae.

### INTRODUCTION

The genus *Centaurea* belonging to the Asteraceae family, contains more than 700 species distributed all over the world. In Algeria, it is represented by 45 species<sup>1</sup>. Among them, *Centaurea choulettiana* Pomel is an endemic species with a limited geographical area. It is a perennial, flowering plant and often synonymous with *Centaurea acaulis* L. ssp. *Balansae* Boiss. et Reut.<sup>1</sup>. There is no previous report on the volatile constituents of *C. choulettiana*. A literature survey showed that the volatile constituents of many species of the genus *Centaurea* are the main groups of metabolites studied in this genus<sup>2-8</sup>. The composition of essential oils of *Centaurea* species are frequently characterized by components having sesquiterpenes skeleton such as caryophyllene, eudesmol, germacrene and spathulenol<sup>9-11</sup>; hydrocarbons with alkanes skeleton such as tricosane, pentacosane, heptacosane and nonacosane<sup>10-12</sup>; fatty acids such as hexadecanoic acid, tetradecanoic acid, dodecanoic acid<sup>13,14</sup> and monoterpenes aspinene, terpinene, carvacrol<sup>14,15</sup> as the major compounds. To the best of our knowledge, this is the first report on the composition of essential oil extracted from the flowers of *Centaurea choulettiana* from Algeria.

### EXPERIMENTAL

#### Plant material

The flowers of *Centaurea choulettiana* were collected in May 2013 from the M'Sila region and authenticated by Dr. Sarri Djamel, Department of Biology, M'Sila University, Algeria according to Quezel and Santa (Quezel and Santa, 1963). A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit,

University of Frères Mentouri Constantine (CCA/05/2013).

#### Extraction of the essential oil

The flowers (200g) of *Centaurea choulettiana* were subjected to steam distillation in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oil was collected and dried over anhydrous sodium sulfate and kept at 4°C until analysis. The yield of the oil was calculated in relation of the dry weight of the plant.

#### GC and GC-MS analysis

The essential oil was analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5 MS fused silica capillary column having (5%-phenyl) methylpolysiloxane stationary phase (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm), programmed from 50°C (5 min) to 250°C at 3°C/min and held for 10 min. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300°C, respectively. The essential oils were diluted in acetone 3.5% (v/v) and injected in split mode (1/60), hydrogen was used as a carrier gas (1.0 mL/min). Solutions of standard alkanes (C8-C20) were analyzed under the same conditions to calculate retention indices (RI) with Van delDool and Kratz equations. Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GC/MS) Model 7890/5975, equipped with HP-5 capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) programmed with the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) was in electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230°C and 180°C, respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the *m/z* range 33-450. The essential oil

Table 1: Components of the essential oil from the flowers of *Centaurea choulettiana* Pomel.

Peak No	Compounds	<sup>a</sup> RT	<sup>b</sup> RI	%
1.	Linalool	8.72	1097	0.43
2.	Nonanal	8.76	1099	0.46
3.	trans verbenol	9.65	1147	0.68
4.	Safranal	10.49	1192	1.11
5.	Decanal	10.60	1198	1.14
6.	Verbenone	10.67	1202	0.75
7.	4-methylene isophorone	10.95	1217	0.46
8.	tridecan-1-ene	12.16	1287	1.63
9.	alpha copaene	13.69	1380	1.85
10.	beta caryophyllene	14.23	1414	0.51
11.	10-epi-beta-acoradiene	15.12	1472	0.58
12.	Ar-curcumene	15.18	1476	0.47
13.	pentadecan-1-ene	15.27	1482	0.78
14.	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	16.62	1574	6.60
15.	Spathulenol	16.66	1577	1.78
16.	caryophyllene oxide	16.76	1584	4.28
17.	salvial-4(14)-en-1-one	16.90	1594	1.18
18.	beta oploenone	17.06	1605	0.56
19.	nor-copaenone	17.10	1609	0.91
20.	humulene epoxide II	17.14	1611	0.88
21.	epi-alpha muurolol	17.49	1638	0.87
22.	beta eudesmol	17.68	1652	6.77
23.	7-epi- $\alpha$ -eudesmol	17.79	1661	3.08
24.	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alpha-ol	18.17	1689	2.29
25.	Pentadecanal	18.44	1710	0.83
26.	Hexadecanal	19.76	1808	0.51
27.	6,10,14-trimethyl-pentadecane-2-one	20.13	1838	2.87
28.	Phthalate	20.43	1862	1.07
29.	heptadecanal + methyl hexadecanoate	21.01	1909	0.39
30.	Phthalate	21.71	1968	17.31
31.	Nonadecanal	23.27	2104	0.41
32.	Docosane	24.14	2184	0.24
33.	tricosan-1-ene	24.91	2258	0.72
34.	Tricosane	25.19	2284	3.31
35.	Tetracosane	26.19	2383	0.61
36.	Pentacosane	27.16	2483	2.57
37.	Hexacosane	28.08	2581	0.22
38.	Heptacosane	28.99	2672	3.06
39.	Octacosane	29.85	2698	0.24
40.	Nonacosane	30.69	2695	1.47
	Oxygenated monoterpenes			3.42
	Sesquiterpene hydrocarbons			3.41
	Oxygenated sesquiterpenes			29.21
	Hydrocarbons alkanes			14.85
	Carbonylic compounds			6.22
	Phtalate			18.38
	Total			75.49

<sup>a</sup>Compounds listed in order of their RT<sup>b</sup>RI (retention index) measured relative to n-alkanes (C8-C20) using HP-5 ms

constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries such as Adams<sup>16</sup> and McLafferty & Stauffer<sup>17</sup>. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

## RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil of the flowers of *C. choulettiana* was obtained in yield of about 0.02% (v/w) based on dry weight. The chemical composition of the essential oil, the retention time, the retention indices and the percentage content were given in Table 1. A total of forty constituents, representing 75.49 % of the oil were identified and distributed into five chemical classes. The main constituents in this oil were phtalate (18.38%),

sesquiterpenes (32.62%) from which oxygenated sesquiterpenes were the most present with a percentage of 29.21%, hydrocarbons (14.85%) followed by carbonylic compounds with a percentage of 6.22%, while oxygenated monoterpenes were presented only with a total of 3.42%. However,  $\beta$ -eudesmol (6.8%), 1,5-epoxysalvial-4(14)-ene (6.6%), caryophyllene oxide (4.28%) and epi- $\alpha$ -eudesmol (3.08%) were the most oxygenated sesquiterpene present in the essential oil. Tricosane (3.31%), heptacosane (3.06%) and pentacosane were the most hydrocarbons present. In accordance with the results obtained in previous studies on essential oils from other *Centaurea* species, the oil was characterized by a high content of oxygenated sesquiterpenes, as it can be seen that  $\beta$ -eudesmol and caryophyllene oxide were the main constituents in several *Centaurea* species such as *C. mucronifera* (17.4% and 5.2%) respectively<sup>2</sup>, *C. aladaghensis* (11.8% and 7.5%) respectively<sup>18</sup>, *C. gracilentata* (12.8% and 6.7%) respectively<sup>19</sup> and *C. ensiformis* (29.8% and 7.6%) respectively<sup>20</sup>. Furthermore, caryophyllene oxide has been reported as the main compound (38.5%) from *C. pullata* essential oil from Algeria<sup>21</sup>. On the other hand, it is worthy to point out that monoterpene hydrocarbons were totally absent from this oil as well as from *C. pullata* and *C. grisebachii* subsp. *Grisebachii* oils<sup>21</sup>. Fatty acids were also absent from the essential oil of *C. choulettiana* while, they were found in considerable quantities in other *Centaurea* species<sup>22,23</sup>.

## CONCLUSIONS

The essential oil of *C. choulettiana* Pomel, collected from M'Sila region was characterized by the main presence of phtalate (18.38%),  $\beta$ -eudesmol (6.8%), 1,5-epoxysalvial-4(14)-ene (6.6%), caryophyllene oxide (4.28%), tricosane (3.31%), epi- $\alpha$ -eudesmol (3.08%) and heptacosane (3.06%). We also note that the hydrocarbons monoterpenes and fatty acids were totally absent from this oil. Comparative study of the main volatiles identified in *Centaurea* species showed that *C. choulettiana* had a unique oil composition.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was financially supported by the Algerian Ministry of Higher education and Scientific Research (MESRS).

## REFERENCES

1. Quezel P and Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales*. Edition CNRS, Tome II, Paris, 1963, 1016.
2. Dural H, Bagci Y, Ertugrul K, Demirelma H, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha* collected in the same habitat. *Biochemical Systematics and Ecology* 2003; 31: 1417–1425.
3. Ertugrul K, Dural H, Tugay O, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Essential oils from flowers of *Centaurea kotschyi* var. *kotschyi* and *C. kotschyi* var. *decumbens* from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 2003; 18: 95–97.
4. Kose YB, Altintas A, Demirci B, Celik S, Baser KHC. Composition of the essential oil of endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm) Wagenitz from Turkey. *Asian Journal of Chemistry* 2009; 21: 1719–1724.
5. Polatoğlu K, Şen A, Bulut G, Bitiş L, Gören N. Essential Oil Composition of *Centaurea kilaea* Boiss. and *C. Cuneifolia* Sm. from Turkey. *Nat. Vol. & Essent. Oils* 2014; 1(1): 55-59.
6. Kahriman N, Tosun G, İskender NY, Karaoğlu ŞA, Yayli N. Antimicrobial activity and a comparative essential oil analysis of *Centaurea pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima* extracted by hydrodistillation and microwave distillation. *Natural Product Research* 2012; 26(8): 703–712.
7. Zengin G, Aktumse kA, Guler GO, Cakmak YS, Kan Y. Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey. *Natural Product Research* 2012; 26(1): 1–10.
8. Yayli N, Yaşar A, Yayli N, Albay C, Aşamaz Y, Çoşkunlebi K, Karaoğlu A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*. *Pharmaceutical Biology* 2009; 47: 7–12.
9. Dob T, Dahmane D, Desrdy BG, Daligault V. Essential oil composition of *Centaurea pullata* L. *Journal of Essential Oil Research* 2009; 21(5): 417-422.
10. Formisano C, Senatore F, Bancheva S, Bruno M, Maggio A, Rosselli S. Volatile Components of Aerial Parts of *Centaurea nigrescens* and *C. stenolepis* Growing Wild in the Balkans. *Natural Product Communications* 2010; 5(2): 273-278.
11. Senatore F, Rigano D, De Fusco R, Bruno M. Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (Asteraceae), two species growing wild in Sicily. *Flavour & Fragrance Journal* 2003; 18: 248-251.
12. Demirci B, Kose YB, Başer K.H.C, Yuçel E. Composition of the Essential Oil of three endemic *Centaurea* species from Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 2008; 20: 335-338.
13. Formisano C, Mignola E, Senatore F, Bancheva S, Bruno M, Rosselli S. Volatile constituents of aerial parts of *Centaurea sibthorpii* (Sect. *Carduiformes*, Asteraceae) from Greece and their biological activity. *Natural Product Research* 2008; 22(10): 840–845.
14. Karamenderes C, Demirci B, Baser K.H.C. Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 2008; 20: 342–349.

15. Sadeghifar S, Khalilzadeh M, Sadeghifar H. Chemical Composition of the Essential Oils From Leaves, Flowers, Stem and Root of *Centaurea zuvandica* Sosn. *Journal of Essential Oil Research* 2009; 21(4): 357-359.
16. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed, IL, Allured Publishing Co, Carol Stream, 2007.
17. Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York, 1991.
18. Flamini G, Tebano M, Cioni PL, Bağcı Y, Dural H, Ertuğrul K, Uysal T, Savran A. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey, *Plant Syst. Evol* 2006; 261: 217-228.
19. Formisano C, Rigano D, Senatore F, Bancheva S, Bruno M, Maggio A, Rosselli S. Volatile components from aerial parts of *C. gracilentata* and *C. ovina* ssp. *besserana* growing wild in Bulgaria, *Nat. Prod. Commun* 2011; 6: 1339-1342.
20. Kose YB, Altintas A, Tugay O, Uysal T, Demirci B, Ertuğrul K, Başer KHC. Composition of the essential oils of *C. sericeae* Wagenitz and *Centaurea ensiformis* P.H. Davis from Turkey, *Asian J. Chem* 2010; 22: 7159-7163.
21. Djeddi S, Sokovic M, Skaltsa H. Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species (Asteraceae) Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of their Antimicrobial Activities *Jeobp* 2011; 14(6): 658 – 666.
22. Senatore F, Formisano C, Raio A, Bellone G, Bruno M. Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp. *Schouwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity. *Natural Product Research* 2008; 22(10): 825–832.
23. Senatore F, Arnold NA, Bruno M. Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon. *Natural Product Research* 2005; 19(8) 749–754.