

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

UNIVERSITÉ FRERES MENTOURI CONSTANTINE-1  
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

**THESE**

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

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Option : Analyses physicochimiques, contrôle qualité et synthèse de substances bioactives

**Intitulé**

**Investigation phytochimique et biologique des espèces *Centaurea involucreta*,  
*Senecio massaicus*, *Thymus algeriensis* et *Marrubium vulgare***

**Par :**

**Mme. KEBBI Sara épouse CHEBLI**

**Devant le jury :**

<b>Pr. R. SEGHIRI</b>	<b>Université frères Mentouri, Constantine 1</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. R. MEKKIOU</b>	<b>Université frères Mentouri, Constantine 1</b>	<b>Présidente</b>
<b>Pr. S. AKKAL</b>	<b>Université frères Mentouri, Constantine 1</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. O. BOUMAZA</b>	<b>Université frères Mentouri, Constantine 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. S. BICHA</b>	<b>Université frères Mentouri, Constantine 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>MCA.T. CHERIET</b>	<b>Université Mohammed Boudiaf, M'Sila</b>	<b>Examineur</b>

**06 juin 2021**

# *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,*

*A mon cher mari pour sa présence, son soutien moral et son encouragement le long de mon parcours d'étude et que le bon dieu le garde pour moi.*

*A mes chers frères Lamine, Rabah, Mehdi et Ramzi pour leur appui et leur encouragement.*

*A toute ma famille et mes amies.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Je dédie ce modeste travail*

***SARA***

## *Remerciements*

Avant tout, je remercie **Dieu** tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la persistance de réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Valorisation Des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives Et Analyses Physico-Chimiques Et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes, Université des frères Mentouri Constantine, sous la direction du Professeur **Ramdane Seghiri** et aussi directeur de cette thèse. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements, pour m'avoir guidé pendant toutes ces années ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

Je remercie sincèrement madame le professeur **Margherita Gavagnin**, professeur à «Istituto di chimica Biomolecolari» au CNR (Napolie-Italie) pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire en m'offrant les moyens et les conditions pour réaliser mon travail ainsi son équipe, particulièrement **Maria Letizia Ciavatta** que je tiens à remercier pour m'avoir constamment guidée et aidée et pour sa gentillesse et ses qualités humaines.

J'exprime ma sincère reconnaissance au professeur **Ibrahim Demirtas** de l'université de codirecteur de cette thèse, université de Salerno Çankiri Karatekin, Türkiye qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pour un stage où j'ai effectué une partie de mes travaux.

Je remercie sincèrement Madame le Professeur **Ratiba Mekkiou**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide et ses conseils aussi et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury cette thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Saleh Akkal**, professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

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

Mes remerciements s'adressent également, à Madame le Professeur **Sabrina Bicha**, professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour ses conseils et pour avoir accepté de juger ce travail.

*Je remercie également Monsieur **Thamere Cheriet**, maître de conférences à l'université Mohammed Boudiaf Département de chimie, Faculté des sciences M'sila, pour son aide et avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à saisir cette occasion pour adresser mes remerciements aux professeurs **Fadila Benayache** et **Samir Benayache** pour leur conseils et leurs encouragements.*

*Mes remerciements vont au Docteur **Labib Noman** pour ses efforts, son soutien, sa disponibilité, sa compétence et ses conseils.*

*Un remerciement particulier à monsieur **Hamza Fadel** pour le soutien qu'il m'a apporté. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude pour vos qualités scientifiques et humaines.*

*Je tiens à remercier Monsieur le professeur **Noureddine Kacem Chaouche** de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (*LaMyBAM*), professeur à l'université des frères Mentouri, pour son aide précieuse dans la partie de l'activité antimicrobienne.*

*Mes remerciements vont également au docteur **Chawki Bensouici**, directeur de recherche au Centre de Recherche en biotechnologie CRBt, Constantine, pour son accueil et son aide afin de réaliser les essais biologiques.*

*Je suis aussi très reconnaissante envers le monsieur le docteur **Djamel SARRI** du Département de biologie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, pour l'espèce étudiée (*Centaurea*) qu'il m'a apportée et identifiée.*

*J'adresse également mes remerciements à mon amie **Ouissem Bensaïd** qui a partagé le bien et le mal avec moi à l'étranger et je lui souhaite une bonne continuité dans ses études.*

*Je remercie également tous mes collègues, Sara, hanane wafa, rania, selma et chema pour leur soutien, leur encouragement et leur bonne humeur, qui m'ont apporté tout au long de ma thèse. Je remercie l'ingénieur **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 frères et notamment mon mari pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles.*

# *Liste des abréviations*

## **Solvants et réactifs**

<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Diméthylsulfoxyde deutéré
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Chlorure d'aluminium
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Acide borique
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>NaOAc</b>	Acétate de sodium
<b>NaOH</b>	Hydroxyle de sodium

## **Techniques chromatographiques**

<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CC</b>	Chromatographie sur Colonne ouverte
<b>LC-MS</b>	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
<b>GC/MS</b>	Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

## **Détermination structurale**

<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
<b>DEPT</b>	Distortionless-Enhancement by- Polarization-Transfer.
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>COSY</b>	Correlated Spectroscopy
<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple bonding connectivity
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Bonding Connectivity
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>δ<sub>C</sub></b>	Déplacement chimique du carbone en ppm
<b>δ<sub>H</sub></b>	Déplacement chimique du proton en ppm
<b>λ<sub>max</sub></b>	Longueur d'onde maximale
<b>J</b>	Constante de couplage
<b>Hz</b>	Hertz
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>s</b>	Singulet
<b>d</b>	Doublet
<b>dd</b>	Doublet de doublet
<b>dl</b>	Doublet large
<b>Glc</b>	Glucose
<b>UV</b>	Ultra-Violet

## Activités biologiques

<b>µg</b>	Micro-gramme
<b>mg</b>	Milligramme
<b>mL</b>	Millilitre
<b>mM</b>	Millimolarité
<b>R%</b>	Rendement
<b>I%</b>	Pourcentage d'inhibiton
<b>°C</b>	Température en degrés Celsius
<b>DPPH</b>	1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl
<b>BHA</b>	ButylHydroxyAnisole
<b>BHT</b>	ButylHydroxyToluene
<b>CUPRAC</b>	Cupric reducing antioxidant capacity
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice à 50%
<b>IC<sub>75</sub></b>	Concentration inhibitrice à 75%
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>AChE</b>	Acetylcholinesterase
<b>BChE</b>	Butyrylcholinesterase
<b>DTNB</b>	5,50-dithio bis (2-nitrobenzoic) acid
<b>COVID-19</b>	Coronavirus 2019
<b>SARS-COV</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
<b>4EY7</b>	Crystal structure of recombinant human acetylcholinesterase
<b>4BDS</b>	Human butyrylcholinesterase in complex with tacrine
<b>NIST</b>	National institute of standards and technology
<b>6LU7</b>	Crystal structure of COVID-19 main protease in complex with inhibitorN3
<b>6VWW</b>	Crystal Structure of NSP15 Endoribonuclease from SARS CoV-2.

## *Liste des tableaux*

N°	Titre	page
	<b>Partie I : Etude phytochimique et biologique de <i>Centaurea involucreta</i> Desf.</b>	
	<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1	Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre <i>Centaurea</i>	5
I.2	Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	15
I.3	Quelques lignanes isolés du genre <i>Centaurea</i>	25
I.4	Quelques alcaloïdes isolés des espèces de ce genre	28
I.5	Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	29
I.6	Quelques coumarines isolées des espèces de ce genre	31
	<b>Chapitre II : Travaux personnels : Etude phytochimique</b>	
II.1	Rendements de l'extraction des différents extraits de <i>C. involucreta</i> Desf.	38
II.2	Résultats de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice	43
	<b>Chapitre III : Etude phytochimique : résultats et discussion</b>	
III.1	Résultats du screening phytochimique de <i>C. involucreta</i> .	50
III.2	Phytocomposants de l'extrait éther de pétrole de <i>C. involucreta</i> identifié par l'analyse GC-MS	52
III.3	Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits chloroforme et <i>n</i> -butanol de l'espèce <i>C. involucreta</i> par HPLC /DAD	53
III.4	Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>C. involucreta</i> par LC-MS/MS	54
III.5	Résultats de l'analyse de la fraction F <sub>4</sub> par GC/MS	57
III.6	Données de la spectroscopie RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-1	67
III.7	Données de la série spectrale UV du composé CEIN-2	69
III.8	Données de la spectroscopie RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-2	76
III.9	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-3	86
III.10	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-4	96
III.11	Données de la spectroscopie RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-5	100
III.12	Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé CEIN-6	101
III.13	Données de la spectroscopie RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-6	108
III.14	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-7	123
III.15	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-8	133
III.16	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-9	141
III.17	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-10	150
III.18	Les données spectrales RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé CEIN-11	160
	<b>Chapitre IV : Activités biologiques, dosage des polyphénols et flavonoïdes</b>	
IV.1	Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de <i>C. involucreta</i>	168
IV.2	Pouvoir d'inhibition IC <sub>50</sub> des extraits et du standard utilisant le test du DPPH	170
IV.3	Pouvoir d'inhibition IC <sub>50</sub> des extraits et du standard utilisant le test d'ABTS	171
IV.4	Les différentes valeurs des IC <sub>50</sub> de l'activité DMSO alcalin	172
IV.5	Les différentes valeurs des A <sub>0.50</sub> de l'activité CUPRAC	173
IV.6	Zone d'inhibition de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>C. involucreta</i>	175
IV.7	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	177
IV.8	les valeurs d'IC <sub>50</sub> et IC <sub>75</sub> des différents extraits et standard	178

	<b>Partie II : Etude de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. &amp; Reut, <i>Marrubium vulgare</i> L. et la composition chimique et les activités biologiques de <i>Senecio massaicus</i></b>	
	<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b>	
I.1	Composés majoritaires ( $\geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre <i>Senecio</i>	196
I.2	Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles du genre <i>Marrubium</i>	199
I.3	Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i>	202
I.4	Composés majoritaires ( $\geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre <i>Thymus</i>	204
I.5	Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	206
	<b>Chapitre II : description des travaux et discussion des résultats</b>	
II.1	Composition chimique de l'huile essentielle des de <i>M. Vulgare</i>	213
II.2	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T. algeriensis</i>	216
II.3	Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>S.massaicus</i>	219
II.4	Les valeurs $IC_{50}$ et $A_{0,50}$ de l'activité antioxydant d'HE de <i>S.massaicus</i>	221
II.5	les valeurs $IC_{50}$ de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase de l'huile essentielle de <i>S. massaicus</i>	221
II.6	Résultats de docking des composés d'huile essentielle sur la structure cristalline de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase	223
II.7	Résultats de docking des composés d'huile essentielle sur la structure cristalline de la protéase principale Covid-19 et de l'endoribonucléase Nsp15	224

## *Liste des figures*

N°	Titre	page
<b>Partie I : Etude phytochimique et biologique de <i>Centaurea involucrata</i> Desf.</b>		
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>		
I.1	Quelques espèces du genre <i>Centaurea</i>	5
I.2	Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i>	10
I.3	Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i>	20
I.4	Structures chimiques de quelques lignanes isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i>	26
I.5	Structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i>	28
I.6	Structures chimiques de quelques triterpènes et stéroïdes isolés des espèces du genre <i>Centaurea</i>	29
I.7	Structures chimiques de quelques coumarines des espèces du genre <i>Centaurea</i>	31
<b>Chapitre II : Travaux personnels : Etude phytochimique</b>		
II.1	l'espèce <i>Centaurea involucrata</i> Desf.	35
II.2	Protocole de l'extraction de <i>C. involucrata</i> Desf.	39
II.3	Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>C. involucrata</i>	42
II.4	Le composé CEIN-2 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation	44
II.5	Le composé CEIN-5 sous lampe UV (254nm) et après révélation	45
II.6	Représentation de la fraction F <sub>13</sub> sous UV et après révélation	46
II.7	Le composé CEIN-6 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation	46
II.8	Le précipité CEIN-9 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation	47
II.9	Le composé CEIN-11 sous lampe UV (365nm) et après révélation	48
II.10	Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait AcOEt de <i>C. involucrata</i>	49
<b>Chapitre III : Etude phytochimique : résultats et discussion</b>		
III.1	Spectres de masse des composés 1 et 2 selon la banque de données Wiley	57
III.2	la couleur du produit CEIN-1 après Le teste de LIEBERMANN & BUCHARD	58
III.3	La structure du composé acide 3-oxo oléanolique	67
III.4	Série spectrale UV du Composé CEIN-2	70
III.5	La structure du composé Hispiduline	75
III.6	structure partielle du Composé CEIN-3	81
III.7	Configuration de la double liaison C(4)-C(5) du composé CEIN-3	84
III.8	Configurations des doubles liaisons C(4)-C(5) et C(1)-C(10) du composé CEIN-3	85
III.9	Structure du composé CEIN-3, l'onopordopicrine	85
III.10	Structure plane du composé CEIN-4	94
III.11	Structure finale du composé CEIN-4, la mélitensine	95
III.12	la structure du composé CEIN-5, acide para-hydroxy benzoïque	99
III.13	La série spectrale UV-Visible du composé CEIN-6	101
III.14	Structure partielle du composé CEIN-6 selon les données UV-Vis	102
III.15	La structure du composé CEIN-6, la jacéosidine	107
III.16	squelette d'un lignane de type 8-hydroxydibenzylbutyrolactone	112

III.17	Structure plane du composé CEIN-7	121
III.18	Structure finale du composé CEIN-7, trachéloside	122
III.19	squelette d'un lignane de type dibenzylbutyrolactone	124
III.20	Structure plane du composé CEIN-8	131
III.21	Structure finale du composé CEIN-8, l'arctiine	132
III.22	Structure plane du composé CEIN-9	139
III.23	Structure finale du composé CEIN-9, la prunasine	140
III.24	Structure partielle du composé CEIN-10	148
III.25	Structure final du composé CEIN-10, 8 $\alpha$ hydroxy-11 $\beta$ -13H dehydrocostus lactone	150
III.26	La structure du composé CEIN2-22, isovitexine	159
<b>Chapitre IV : Activités biologiques, dosage des polyphénols et flavonoïdes</b>		
IV.1	Réduction du complexe chromogène de Cu+2-Nc	165
IV.2	Représentation du taux des polyphénols par la courbe linéaire de standard d'acide gallique.	168
IV.3	Représentation du taux de flavonoïdes par la courbe linéaire de standard	168
IV.4	Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents échantillons	170
IV.5	courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons	171
IV.6	Courbe de pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin par différents échantillons	172
IV.7	Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons	173
IV.8	Les zones d'inhibition des extraits sur les souches bactériennes	174
IV.9	L'activité antiprolifératif des extraits de <i>C. involucrata</i> et de témoin positif vis-vis la lignée cellulaire HeLa	178
<b>Partie II : Etude de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. &amp; Reut, <i>Marrubium vulgare</i> L. et la composition chimique et les activités biologiques de <i>Senecio massaicus</i></b>		
<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b>		
I.1	<i>Marrubium vulgare</i>	201
I.2	<i>Thymus algeriensis</i>	205
<b>Chapitre II : description des travaux et discussion des résultats</b>		
II.1	Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>M. vulgare</i>	212
II.2	Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>T. algeriensis</i>	216
II.3	Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>S. massaicus</i>	220
II.4	Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide <i>n</i> -hexadécanoïque et 15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane avec les résidus d'acides aminés du AChE	225
II.5	Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide <i>n</i> -hexadécanoïque et 15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane avec les résidus d'acides aminés du BChE	225
II.6	Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide <i>n</i> -hexadécanoïque et 15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane avec les résidus d'acides aminés du M <sup>pro</sup> Covid-19	226

II.7	Interaction du docosane-11-décy, l'éther monododécylique d'octaéthylèneglycol, l'acide <i>n</i> -hexadécanoïque et 15,15'-Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane avec les résidus d'acides aminés du Nsp15 endoribonuclease.	226
II.8	Animation 2D des interactions d'octaéthylèneglycol monododécyl éther et docosane-11-décy avec les résidus d'acides aminés du AChE et BChE	227
II.9	Animation 2D des interactions d'octaéthylèneglycol monododécyl éther et docosane-11-décy avec les résidus d'acides aminés du Covid-19 M <sup>pro</sup> et Nsp15 endoribonuclease.	227

## *Liste des spectres*

N°	Titre	page
<b>Partie I : Etude phytochimique et biologique de <i>Centaurea involucrata</i> Desf.</b>		
<b>Chapitre III : Etude phytochimique : résultats et discussion</b>		
III.1	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) du composé CEIN-1	59
III.1a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (0,6 à 2,2 ppm) du composé CEIN-1	59
III.2	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du composé CEIN-1	67
III.2a	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz) étalé (13 à 31ppm) du composé CEIN-1	61
III.2b	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz) étalé (32 à 48ppm) du composé CEIN-1	61
III.3	Spectre HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (1 à 6 ppm) du composé CEIN-1	62
III.4	Spectre COSY (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (0,6 à 5,4 ppm) du composé CEIN-1	63
III.5	Spectre HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (0,1 à 3,1 ppm) du composé CEIN-1	64
III.6a	Spectre HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (0,8 à 2,9 ppm) du composé CEIN-1	65
III.6b	Spectre HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (0,8 à 1,2 ppm) du composé CEIN-1	65
III.7	Spectre COSY (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (1 à 1,85 ppm) du composé CEIN-1	66
III.8	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit CEIN-2	71
III.8a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (6 à 8 ppm) du produit CEIN-2	71
III.9	Spectre COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit CEIN-2	72
III.10	Spectre HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit CEIN-2	73
III.11	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du produit CEIN-2	73
III.12	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) du composé CEIN-2	75
III.13	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) du composé CEIN-3	77
III.13a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) étalé (4,8 à 6,4 ppm) du composé CEIN-3	78
III.13b	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) étalé (1,4 à 4,6 ppm) du composé CEIN-3	78
III.14	Spectre HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) du composé CEIN-3	80
III.15	Spectre COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) du composé CEIN-3	81
III.16	Spectre HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) étalé (0 à 7,5 ppm) du composé CEIN-3	83
III.16a	Spectre HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) étalé (2,4 à 7,2 ppm) du composé CEIN-3	83
III.17	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150MHz, δppm) du produit CEIN-4	87
III.18	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) du composé CEIN-4	88
III.18a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (4,9 à 6,0 ppm) du composé CEIN-4	89
III.18b	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (1,2 à 4,2 ppm) du composé CEIN-4	89
III.19	Spectre COSY (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (3,5 à 5,9 ppm) du composé CEIN-4	90
III.20	Spectre HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (3,7 à 6,3 ppm) du composé CEIN-4	91
III.21	Spectre HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (0,8 à 2,7 ppm) du composé CEIN-4	92
III.22	Spectre COSY (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (0,6 à 4,2 ppm) du composé CEIN-4	92
III.23	Spectre HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (3,6 à 5,9 ppm) du composé CEIN-4	93
III.23a	HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) étalé (0,8 à 2,8 ppm) du composé CEIN-4	94
III.24	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-5	97
III.25	Spectre COSY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit CEIN-5	97
III.26	Spectre HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-5	98
III.27	Spectre HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) du composé CEIN-5	99

III.28	Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-6	103
III.28a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (6 à 7,7 ppm) du produit CEIN-6	103
III.29	Spectre HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-6	104
III.30	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé (3,0 à 4,3 ppm) du composé CEIN-6	105
III.30a	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé (5,1 à 7,9 ppm) du composé CEIN-6	106
III.31	Spectre RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du composé CEIN-7	110
III.31a	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du composé CEIN-7	110
III.31b	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm), étalé (100 à 180 ppm) du composé CEIN-7	111
III.32	Expérience DEPT 135 (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du composé CEIN-7	111
III.33	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-7	113
III.33a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé (2,2 à 5,4 ppm) du composé CEIN-7	114
III.33b	RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), du composé CEIN-7 étalement de la zone aromatique.	114
III.34	Expérience HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (1,6 à 5,6 ppm) du composé CEIN-7	115
III.34a	Expérience HSQC (600 MHz, MeOD) étalement de la zone aromatique du composé CEIN-7	116
III.35	Spectre COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,3 à 4,9 ppm) du composé CEIN-7	117
III.35a	Spectre COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), du composé CEIN-7 étalement de la zone aromatique	117
III.36	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,2 à 5,0 ppm) du composé CEIN-7	119
III.36a	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,2 à 5,0 ppm) du composé CEIN-7	119
III.37	Spectre ROESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé du composé CEIN-7	121
III.38	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé (2,3 à 5,3 ppm) du composé CEIN-8	125
III.38a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), du composé CEIN-8 étalement de la zone aromatique.	126
III.39	Spectre COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), du composé CEIN-8 étalement de la zone aromatique	126
III.40	Expérience HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,2 à 5,4 ppm) du composé CEIN-8	127
III.41	Spectre COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,3 à 5,1 ppm) du composé CEIN-8	127
III.42	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (1,5 à 7,0 ppm) du composé CEIN-8	129
III.43	Spectre HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), du composé CEIN-8 étalement de la zone aromatique	130
III.44	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (2,0 à 7,5 ppm) du composé CEIN-8	131
III.45	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9	134
III.45a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H étalé (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9	135
III.45b	Spectre RMN- <sup>1</sup> H étalé (600MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9	135
III.46	Spectre HSQC étalé (600MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9	136
III.47	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150MHz, δppm) du composé CEIN-9	137
III.48	Spectre RMN COSY étalé (600MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9	138
III.49	Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δppm) du composé CEIN-9	138
III.49a	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé CEIN-9, étalement	139
III.50	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) du composé CEIN-10	142

III.50a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (3,2 à 5,3 ppm) du composé CEIN-10	143
III.50b	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) étalé (1,0 à 3,1 ppm) du composé CEIN-10	143
III.51	Spectre HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) du composé CEIN-10	144
III.52	Spectre COSY (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) du composé CEIN-10	146
III.53	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (0,0 à 5,0 ppm) du composé CEIN-10	147
III.53a	Spectre HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) étalé (0,5 à 5,5 ppm) du composé CEIN-10	148
III.54	Spectre NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD), étalé du composé CEIN-10	149
III.55	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) du composé CEIN-11	151
III.55a	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> ) étalé (6,0 à 14 ppm) du composé CEIN-11	152
III.55b	Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (3,0 à 4,6 ppm) du composé CEIN-11	153
III.56	Spectre RMN HSQC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (3,1 à 4,7 ppm) du composé CEIN-11	153
III.57	Spectre RMN COSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (2,4 à 5,2 ppm) du composé CEIN-11	154
III.58	Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150MHz, δppm) étalé (60 à 83 ppm) du composé CEIN-11	155
III.59	Spectre COSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé du composé CEIN-11	155
III.60	Spectre HSQC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (4,5 à 9,0 ppm) du composé CEIN-11	156
III.61	Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (5,0 à 13,5 ppm) du composé CEIN-11	157
III.62	Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) étalé (4,1 à 5,0 ppm) du composé CEIN-11	158
III.63	Spectre RMN- <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150MHz, δppm) du composé CEIN-11	158

# SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

## **Partie I : Etude phytochimique et biologique de *Centaurea involucrata* Desf.**

### **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

I.La famille Asteraceae. ....	3
I.1. Généralités .....	3
I.2. Caractéristiques botaniques de la famille Asteraceae .....	3
I.3. Utilisation.....	3
I.4. Le genre <i>Centaurea</i> .....	4
I.4.1. Description botanique du genre <i>Centaurea</i> .....	4
I.4.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés .....	5
I.4.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle .....	31
I.4.4. Intérêts biologiques du genre et de ses principaux métabolites secondaires .....	32
Conclusion.....	33

### **Chapitre II : Travaux personnels : Etude phytochimique**

II.1. Introduction .....	34
II.2. Les critères de choix de notre matériel végétal .....	34
II.3. Place dans la systématique botanique .....	34
II.4. Description botanique.....	34
II.5. Protocole expérimental .....	35
II.5.1. Récolte du matériel végétal .....	35
II.5.2. Screening phytochimique .....	35
II.5.2.1. Mise en évidence des saponines .....	35
II.5.2.2. Mise en évidence des anthocyanes .....	36
II.5.2.3. Mise en évidence des alcaloïdes .....	36
II.5.2.4. Mise en évidence des triterpènes, stérols et terpènes.....	36
II.5.2.5. Mise en évidence des flavonoïdes et des leuco anthocyanes.....	37

II.5.2.6. Mise en évidence des tanins.....	37
II.5.3. Extraction.....	38
II.5.4. Analyse de l'extrait d'éther de pétrole par GC/MS.....	40
II.5.5. Analyse quantitative des extraits.....	40
II.5.5.1. Préparation des échantillons et mode opératoire de HPLC/DAD.....	40
II.5.5.2. Préparation des échantillons et mode opératoire de LC-MS/MS.....	41
II.5.6. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle.....	41
II.5.6.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	42
II.5.6.2. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle.....	44
Conclusion.....	48

### **Chapitre III : Etude phytochimique : Résultats et discussion**

III.1. Introduction.....	50
III.2. Le screening phytochimique.....	50
III.3. Résultat de l'analyse par GC/MS.....	51
III.4. Résultat de l'analyse quantitative.....	53
III.4.1. L'analyse par HPLC/DAD.....	53
III.4.2. L'analyse par LC-MS/MS.....	54
III.5. Identification du contenu en métabolites secondaires par GC/MS de la fraction F <sub>4</sub> .....	56
III.6. Elucidation structurale des composés isolés.....	58
III.6.1. Détermination structurale du composé CEIN-1.....	58
III.6.2. Détermination structurale du composé CEIN-2.....	68
III.6.3. Détermination structurale du composé CEIN-3.....	76
III.6.4. Détermination structurale du composé CEIN-4.....	86
III.6.5. Détermination structurale du composé CEIN-5.....	96
III.6.6. Détermination structurale du composé CEIN-6.....	100
III.6.7. Détermination structurale du composé CEIN-7.....	108
III.6.8. Détermination structurale du composé CEIN-8.....	123
III.6.9. Détermination structurale du composé CEIN-9.....	133
III.6.10. Détermination structurale du composé CEIN-10.....	141

III.6.11. Détermination structurale du composé CEIN-11 .....	151
Conclusion.....	161

## **Chapitre IV : Activités biologiques, dosage des polyphénols et flavonoïdes**

IV.1. Introduction .....	162
IV. 2.Analyses quantitatives des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	162
IV.2.1.Dosage des polyphénols totaux.....	162
IV.2.2.Dosage des flavonoïdes.....	162
IV.3.Evaluation de l'activité antioxydante.....	163
IV.3.1. Activité anti-radicalaire DPPH .....	163
IV.3.2. Activité anti radicalaire par piégeage de l'ABTS .....	163
IV.3.3. Le piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin .....	164
IV.3.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	164
IV.4.Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	165
IV.4.1.Souches microbiennes testées .....	165
IV.4.2. Test antimicrobien .....	165
IV.4.3. Préparation des disques .....	165
IV.4.4. Préparation de l'inoculum.....	166
IV.4.5.Test d'efficacité.....	166
IV.4.6. Lecture .....	166
IV.4.7. Détermination de la CMI .....	166
IV.5.Activité antiproliférative.....	166
IV.5.1.Préparation des solutions mères .....	166
IV.5.2.Culture des lignées cellulaires.....	167
IV.5.3.Test de prolifération cellulaire .....	167
IV.6. Résultats et discussion .....	167
IV.6.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	167
IV.6.2. Résultat de l'activité antioxydante.....	169
IV.6.2.1.Activité anti-radicalaire DPPH .....	169
IV.6.2.2.Activité anti radicalaire par piégeage de l'ABTS .....	171

IV.6.2.3. Le Test d'effet scavenger du superoxyde produit par DMSO alcalin.....	172
IV.6.2.4. La réduction cuprique (CUPRAC) .....	173
IV.6.3. l'activité antimicrobienne.....	174
IV.6.4. l'activité antiproléfirative.....	177
Références bibliographiques .....	180

**Partie II : Etude de la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut, *Marrubium vulgare* L. et la composition chimique et les activités biologiques de *Senecio massaicus***

**Chapitre I : Revue bibliographique**

I.1. Introduction.....	194
I.2. Généralités sur les huiles essentielles .....	194
I.2.1. Définition et localisation .....	194
I.2.1. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	194
I.3. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Senecio</i> .....	195
I.3.1. Présentation du genre <i>Senecio</i> .....	195
I.3.2. composition chimique des huiles essentielle du genre <i>Senecio</i> .....	195
I.3.3. Activité biologique des huiles essentielle du genre <i>Senecio</i> .....	197
I.3.4. <i>Senecio massaicus</i> .....	198
I.3.4.1. Description botanique .....	198
I.3.4.2. Place dans la systématique .....	198
I.4. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Marrubium</i> .....	199
I.4.1. Présentation du genre <i>Marrubium</i> .....	199
I.4.2. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielle du genre <i>Marrubium</i> .....	199
I.4.3. <i>Marrubium vulgare</i> L. ....	200
I.4.3.1. Description botanique .....	200
I.4.3.2. Place dans la systématique .....	201
I.4.3.3. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielle du <i>Marrubium vulgare</i> .....	201
I.5. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Thymus</i> .....	203
I.5.1. Présentation du genre <i>Thymus</i> .....	203

I.5.2. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielle du genre <i>Thymus</i> .....	203
I.5.3. <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. & Reut .....	205
I.5.3.1. Description botanique .....	205
I.5.3.2. Place dans la systématique .....	206
I.5.3.3. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielle du <i>Thymus algeriensis</i> .....	206
Conclusion.....	207

## **Chapitre II : Description des travaux et discussion des résultats**

II.1. Matériel et méthodes .....	208
II.1.1. Récolte des plantes .....	208
II.1.2. Extraction des huiles essentielles .....	208
II.1.3. Identification et analyse chromatographique des huiles essentielles .....	208
II.1.3.1. Identification et analyse des huiles essentielles de <i>T.algeriensi et M. vulgare</i> ..	208
II.1.3.2. Identification et analyse de l’huile essentielle de <i>S.massaicus</i> .....	209
II.2. Les activités biologiques de huile essentielle de <i>S.massaicus</i> .....	209
II.2.1. L’évaluation de l’activité antioxydante .....	209
II.2.1.1. Pouvoir réducteur .....	209
II.2.2. L’évaluation de l’activité anticholinestérase .....	210
II.2.3. L’étude de docking moléculaire .....	211
II.3. Résultats et discussion .....	212
II.3.1. Analyse comparative de la composition d’huile essentielle de <i>M. vulgare</i> .....	212
II.3.2. Analyse comparative de la composition d’huile essentielle de <i>T. algeriensis</i> .....	215
II.3.3. Analyse comparative de la composition d’huile essentielle de <i>S.massaicus</i> .....	218
II.3.4. Activité antioxydante de l’huile essentielle de <i>S. massaicus</i> .....	220
II.3.5. l’activité anticholinestérase .....	221
II.3.6. L’étude docking moléculaire du COVID-19 et de l'anticholinestérase .....	221
Conclusion.....	228
Références bibliographiques.....	229
Conclusion générale .....	235
Résumé	



# ***Introduction générale***

## *Introduction générale*

Depuis des milliers d'années, l'Homme a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. (Lee, 2004).

L'Algérie, en raison de son climat diversifié (méditerranéen, semi-aride et saharien) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires, dont la plupart existe à l'état spontané. Cette flore compte environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques parmi lesquelles 15 % sont endémiques (Quezel et Santa, 1963). Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés) (Radford *et al.*, 2011).

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives d'origine végétale qui peuvent intervenir dans des applications thérapeutiques notre laboratoire a entamé depuis plusieurs années un programme de recherche destiné à l'exploitation des ressources naturelles d'origine végétale des plantes algériennes.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'investigation phytochimique et biologique de quatre espèces nommées *Centaurea involucrata*, *Senecio massaicus*, *Thymus algeriensis* et *Marrubium vulgare*.

Cette thèse de doctorat, contenant une introduction et une conclusion générale, est subdivisée en deux parties :

◆ La première partie consacrée à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Centaurea involucrata* Desf. qui est composée en quatre chapitres :

- Le premier chapitre a été consacré à une recherche bibliographique, comportant une présentation botanique de la famille Asteraceae et du genre *Centaurea*, les différentes classes de métabolites secondaires antérieurement isolés, ainsi que les utilisations thérapeutiques de cette famille et de ce genre.
- Le deuxième chapitre renferme tous les travaux phytochimiques effectués sur l'espèce étudiée, en débutant par un screening phytochimique, suivi par la détermination de la

composition chimique de l'extrait d'éther de pétrole par GC/MS, la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes des extraits chloroforme et *n*-butanol par HPLC/DAD et de l'acétate d'éthyle par LC/MS et en fin, la séparation et la purification de la composante de la phase acétate d'éthyle.

- Le troisième chapitre renferme l'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés par la combinaison des méthodes spectroscopiques modernes (UV-Visible, RMN mono et bidimensionnelle (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY) et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles reportées dans la littérature.
- Le quatrième chapitre comprend toute l'étude biologique y compris les méthodes utilisées dans l'évaluation des activités antioxydante, antimicrobienne et antiproliférative des extraits suivi par la discussion des résultats obtenus.

◆ La deuxième partie est consacrée à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut., *Marrubium vulgare*. et *Senecio massaicus*, ainsi que l'évaluation *in vitro* et *in silico* de quelques activités biologiques d'HE de cette dernière espèce.

Cette partie est divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre reporte les données bibliographiques sur les plantes étudiées.
- Le deuxième chapitre comprend la description des travaux et la discussion des résultats de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *T. algeriensis*, *M. vulgare*. et *S. massaicus*. Ainsi que, l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et anticholinestérase de l'huile essentielle de cette dernière espèce et aussi l'étude de l'interaction d'amarrage moléculaire entre les composants volatiles de cette huile avec la protéase principale du Covid-19 et l'endoribonucléase Nsp15, qui sont efficaces dans la réplication virale et l'infection dans la cellule, et avec les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer, l'acétylcholinestérase (4EY7), la butyrylcholinestérase (4BDS).

# ***Partie I***

**Etude phytochimique et  
biologique  
de *Centaurea involucrata* Desf.**

# *Chapitre I*

## **Synthèse bibliographique**

## I. La famille des Asteraceae

### I.1. Généralités

La famille des Asteraceae, aussi appelée Compositae, est la plus vaste famille de plantes à fleurs, suivie des Orchidaceae. Il s'agit d'une famille cosmopolite. Elle est principalement distribuée en région tempérée, subtropicale, ou tropicale, souvent en région montagneuse (Singh, 2004). Parmi les plantes vasculaires, il s'agit de la famille la plus diversifiée. Elle comprend en effet entre 1 600 et 1 700 genres et 24 000 à 30000 espèces (Funk *et al.*, 2005). Si on considère le nombre total estimé d'espèces végétales dans le monde, d'environ 298 000 espèces (Mora *et al.*, 2011), la famille des Asteraceae regrouperait donc à elle seule entre 8% à 10% des espèces.

### I.2. Caractéristiques botaniques de la famille Asteraceae

Les Asteraceae présentent des caractères morphologiques divers, ils sont principalement des herbes vivaces ou annuelles, des arbustes ou sous-arbrisseaux, rarement des plantes aquatiques ou grimpantes ou encore des épiphytes. L'aspect de l'appareil végétatif est très variable pour caractériser les Asteraceae sur un seul critère. En revanche, La famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule (Gaussen *et al.*, 1982 ; Funk *et al.*, 2009).

Les feuilles sont le plus souvent alternes, opposées ou verticillées, simples, parfois profondément lobées ou découpées, à nervation généralement pennée ou palmé (Gaussen *et al.*, 1982 ; Funk *et al.*, 2009).

Les fleurs sont agglomérées en capitules, terminales ou axillaires. L'organisation florale des capitules est très importante à connaître en systématique. Cependant, en certains cas, le nombre de fleurs est assez restreint, on dit qu'ils sont pauciflores quand il y a 8-15 fleurs (ou moins) (genre *Achillea*). Dans le cas extrême on trouve même des capitules uniflores (*Xanthium*, *Echinops*) mais c'est l'exception (Bonnier, 1934 ; Funk *et al.*, 2009).

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus qui favorise la dispersion des grains par le vent (Spichiger *et al.*, 2004).

### I.3. Utilisation

La famille des Asteraceae fournit des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique, ce qui n'est pas surprenant étant donné le nombre de genres qu'elle contient. De

nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont associées à un panel d'activités thérapeutiques aussi large que la diversité de cette famille.

Certaines espèces d'Asteraceae sont des plantes ornementales, comme les asters, les dahlias, les chrysanthèmes, les gerberas, les zinnias et les genres *Helichrysum* et *Tagetes* (Singh, 2004). De nombreuses espèces d'Asteraceae sont également à la base de l'alimentation. *Helianthus annuus*, le tournesol, cultivé pour ses graines oléagineuses est certainement le meilleur exemple de l'importance économique de cette famille

#### **I.4. Le genre *Centaurea***

Le genre *Centaurea* compte environ 700 espèces (Quezel et Santa, 1963). Il appartient à la tribu Cyanareae et à la famille des Astéraceae. Ce genre est très répandu aussi bien sur le territoire Algérien qu'en Europe méridionale, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent Américain (Mabberley, 1987). En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 d'entre eux sont localisés au sud «Sahara» (Ozenda, 1977).

##### **I.4.1. Description botanique du genre *Centaurea***

Les centaurees 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 (Figure I.1).

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 (Quezel, 1963).



**Figure I.1:** Quelques espèces du genre *Centaurea*

#### I.4.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre

De nombreuses études phytochimiques sur des espèces du genre *Centaurea* ont révélé la richesse de ces dernières en métabolites secondaires tels que les stéroïdes (Mouffok *et al.*, 2012 ; Baatouche *et al.*, 2018), les composés phénoliques, quelques alcaloïdes (Shoeb *et al.*, 2006) et les lactones sesquiterpéniques ainsi que les flavonoïdes qui sont les principaux métabolites secondaires de ces espèces (Seghiri *et al.*, 2006 ; Labeled *et al.*, 2019).

##### I.4.2.1. Les sesquiterpènes lactones

Les investigations phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont révélé que les sesquiterpènes lactone de type guaianolides, germacranolides, élémanolides et eudesmanolides sont les composés les plus rencontrés dans ce genre contrairement à d'autres types. Le tableau I.1 représente quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea*.

**Tableau I.1 :** Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea*

Espèce	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. hololeuca</i>	Répine	1	guaianolides	<b>Rosselli <i>et al.</i>, 2006</b>
	Cynaropicrine	2		
	Janerine	3		
	Cebelline G	4		
	Babyline B	5		
	Cébelline J	6		
	Hydroxyjanérine	7		
<i>C. helenioide</i>	Grosheimine	8	guaianolides	<b>Yayli <i>et al.</i>, 2006</b>
	8 $\alpha$ -Acétyl Grosheimine	9		

Tableau I.1 : Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèce	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. ptosimopappa</i>	Zaluzanine D	10	guaianolides	<b>Çelik et al., 2006</b>
	Zaluzanine C	11		
	Chlorojanerine	12		
	Deacylcynaropicrine	13		
	11 $\alpha$ ,13-dihydro-déacylcynaropicrine	14		
	11 $\beta$ ,13-dihydro déacylcynaropicrine	15		
<i>C. moesiaca</i>	Cnicine	16	germacranolides	<b>Trendafilova et al., 2007</b>
	4'-Acétylcnicine	17		
	3'-Acétylcnicine	18		
	Salonitenolide-8-O-(4'-acétoxy-5'-hydroxyangelate)	19		
	8 $\alpha$ -(5-hydroxy)-angeloylsalonitenolide	20		
	Onopordopicrine	21	élémanolide	
	8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2-méthyl énebutanoyloxy) déhydromelitensine	22		
	Malacitanolide	23	eudesmanolides	
	8 $\alpha$ -(3-hydroxy-4-acétoxy-2-méthylènebutanoyloxy)-4-epi-sonchucarpolide	24		
8 $\alpha$ -acyloxy-1,15-dihydroxy-4E,10(14),11(13)-germacratrien-12,6 $\alpha$ -Olide	25	germacranolide		
<i>C. hierapolitana</i>	Hierapolitanine A	26	élémanolides	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
	Hierapolitanine B	27		
	Hierapolitanine C	28	eudesmanolides	
	Hierapolitanine D	29		
<i>C. gigantea</i>	8-O-(3-hydroxy-2-méthylpropanoyl)-salonitenolide	30	germacranolides	<b>Shoeb et al., 2007</b>
	8-O-(4-hydroxy-3-méthylbutanoyl)-salonitenolide	31		
<i>C. cadmea</i>	Ivaline	32	eudesmanolide	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
<i>C. maroccana</i>	8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2 méthyl-énebutanoyloxy) déhydromelitensine	22	élémanolide	<b>Bentaman et al., 2007</b>
	8 $\alpha$ -[2'-hydroxyméthyl-2'-buténoyloxy]-déhydromelitensine	33	élémanolides	<b>Bicha et al., 2013</b>
	11,13-déhydromelitensine	34		
	8 $\alpha$ -[2'-hydroxyméthyl-2'-buténoyloxy]-sonchucarpolide	35	eudesmanolide	
	8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2 méthyl-énebutanoyloxy) déhydromelitensine	22	élémanolide	

Tableau I.1 : Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèce	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. pamphylica</i>	Pterodontriol	36	eudesmanolide	<b>Shoeb et al., 2007</b>
<i>C. pullata</i>	11,13-Dihydrocnicine	37	germacranolides	<b>Djeddi et al., 2008</b>
	11,13-Dihydro-19-Desoxycnicin	38		
	8 $\alpha$ -O-(4-Acetoxy-5-Hydroxyangeloyl)-11 $\beta$ , 13-Dihydrocnicine	39		
	8 $\alpha$ -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-11 $\beta$ , 13-dihydrosonchucarpolide	40	eudesmanolide	
	8 $\alpha$ -O-(4-hydroxy-2-méthylène -butanoyloxy)-11 $\beta$ ,13-dihydro-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	41		
	8 $\alpha$ -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) melitensine	42	élémanolides	
	Melitensine	43		
	11 $\beta$ ,13-dihydrosalonitenolide	44	germacranolide	
	8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	45	élémanolides	
8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro onopordaldehyde	46			
<i>C. grisebachii</i>	Salonitenolide	47	germaranolide	<b>Djeddi et al., 2008</b>
	8 $\alpha$ -[2'-hydroxyméthyl-2'-buténoyloxy]-déhydromelitensine	33	élémanolide	
	8 $\alpha$ -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)- 4- <i>épi</i> -sonchucarpolide	24		
	8 $\alpha$ -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-sonchucarpolide (4- <i>épi</i> -malacitanolide)	48		
<i>C. musimomum</i>	Cynaratriol	49	guaianolide	<b>Rodriguez et al., 2009</b>
<i>C. lippii</i>	Cnicine	16	germacranolide	<b>Mezache et al., 2010</b>
<i>C. sulphurea</i>	(6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,3' <i>R</i> )-8 $\alpha$ -(3',4'-dihydroxyméthylène-2'-butanoyloxy)-15-oxo hélianga-1(10),4(5),11(13)-trien-6,12-Olide	50	héliangolides	<b>Lakhal et al., 2010</b>
	(6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,3' <i>R</i> )-8 $\alpha$ -(3',4'-dihydroxyméthylène-2'-butanoyloxy)-15-acétoxy-hélianga-1(10),4(5),11(13)-trien-6,12-Olide	51		

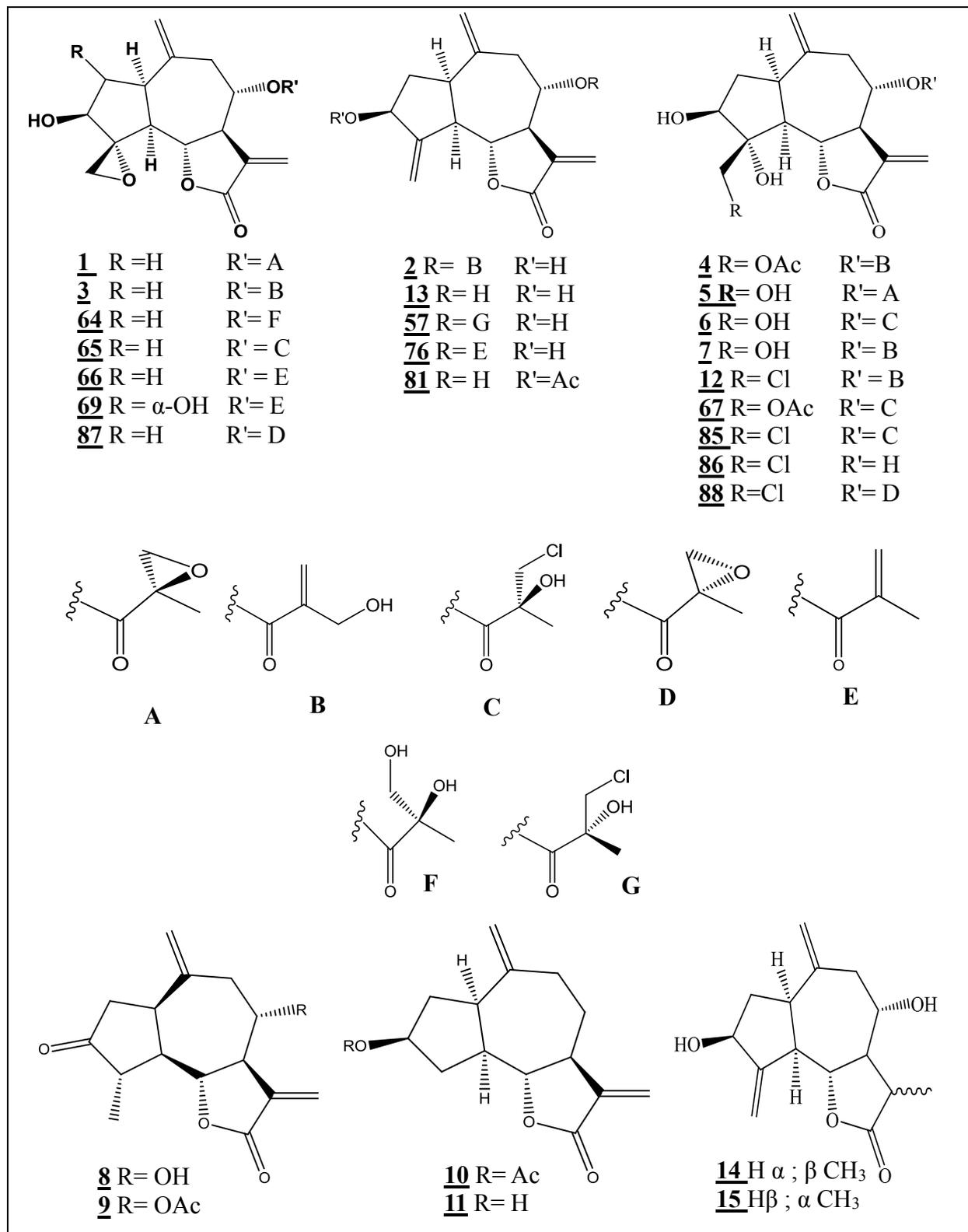
Tableau I.1 : Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèce	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. tougourensis</i>	Cnicine	16	germacranolide	<b>Nacer et al., 2012</b>
	(6R, 7R, 8S, 30R) 8 A -(3, 4-Dihydroxy-2-Méthylène-Butanoyloxy)-15-Acetoxy-Hélianga 1(10), 4(5), 11(13) Trien-6-Olide	52	héliangolides	
	(6R, 7R, 8S, 3'R) 8 $\alpha$ -(3, 4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-15-oxo-hélianga 1(10), 4(5), 11(13)-trien-6-olide	53		
<i>C. omphalotricha</i>	Désacylcynaropicrine	13	guaianolides	<b>Kolli et al., 2012</b>
	11 $\beta$ ,13-dihydro déacylcynaropicrine	15		
	4'-acétyl cynaropicrine	54		
	4'-acétyl cebelline F	55		
	15-acétyl déhydromelitensine	56	élémanolide	
	Linichlorine B	57	guaianolides	
	3-acétyl cynaropicrine	58	élémanolides	
	8-(4-hydroxyméthacrylate) déhydromelitensine	59		
	15-acétyl melitensine	60		
<i>C. nicaeensis</i>	Melitensine	43	élémanolide	<b>Hammoud et al., 2012</b>
<i>C. zuccariniana</i>	4'-Acétylcnicine	17	germacranolides	<b>Ciric et al., 2012</b>
	Cnicine	16	élémanolides	
	11 $\beta$ , 13-déhydromelitensine	34		
	8 $\alpha$ -O-[(4-acetoxy-3-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy]-6 $\alpha$ , 15-dihydroxelema-1,3,11(13)-trien-12-Oate	61		
	8 $\alpha$ -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)- 4-épi-sonchucarpolide	24	eudesmanolide	
	Malacitenolide	23	eudesmanolides	
	8 $\alpha$ -O-(4,5-diacétoxyangeloyl) sonchucarpolide	62		
	Zuccarinine	63		
<i>C. pannonica</i>	Babyline A	64	guaianolides	<b>Milošević Ifantis et al., 2013</b>
	Chlorohyssopifoline C	65		
	Repine	1		
	Janerine	3		
	19-Déoxyjanerine	66		
	Babyline B	5		
	Cebelline J	6		
	Rhaposerine	67		
	Chlororepdiolide	68		
Epoxyrepdiolide	69			

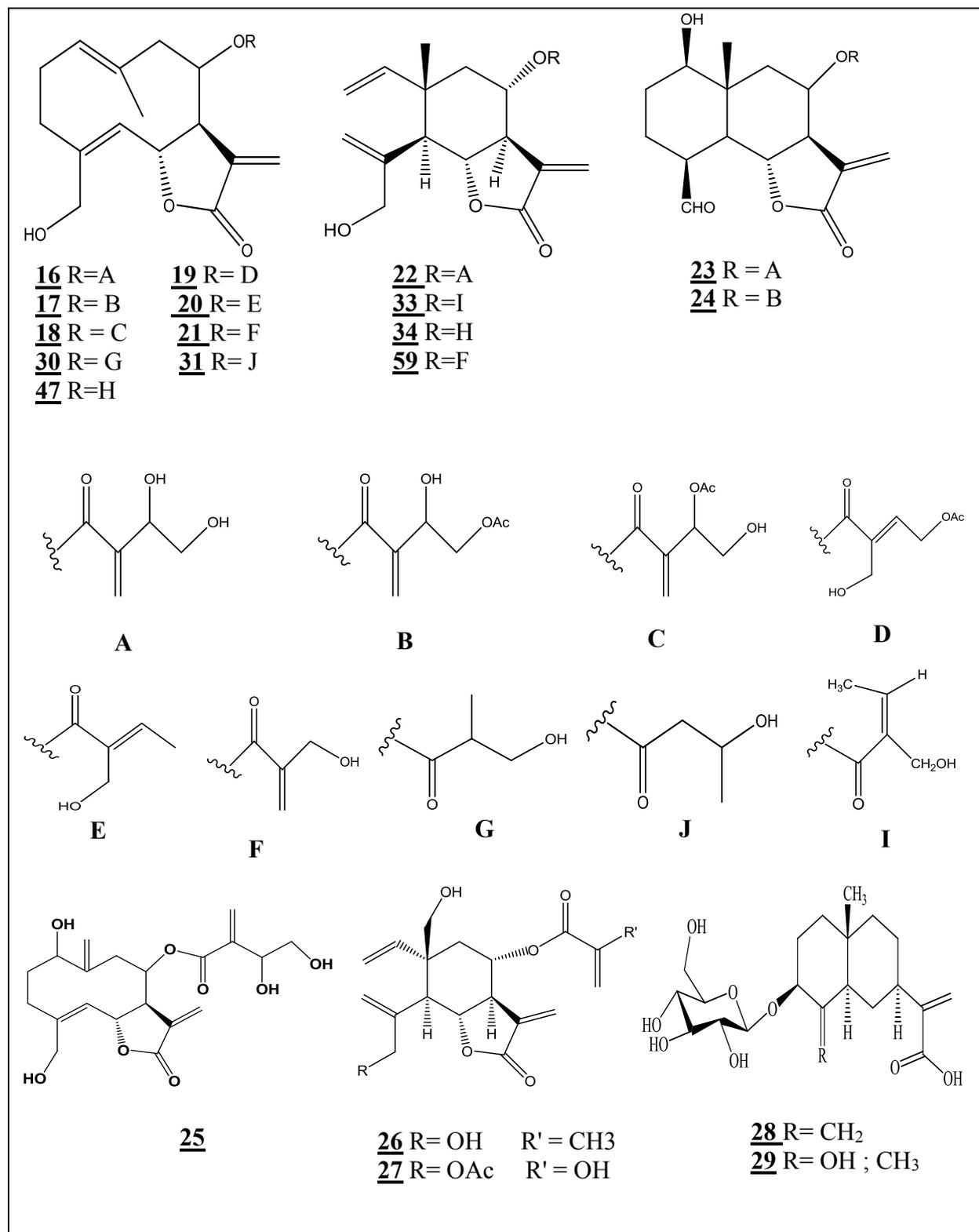
Tableau I.1 : Quelques lactones sesquiterpéniques isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèce	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. parviflora</i>	Cnicine	16	germacranolide	<b>Belkacem et al., 2014</b>
	8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2-méthyl énebutanoyloxy) déhydromelitensine	22	élémanolide	
<i>C. kilaea</i>	11,13-déhydromelitensine	34	élémanolide	<b>Sen et al., 2016</b>
	Cnicine	16	germacranolide	
<i>C. athoa</i>	Athoine	70	élémanolides	<b>Demir et al., 2016</b>
	14-O-acétylathoine	71		
	Méthyl 14-O-acétylathoin-12-oate	72		
	4'-Hydroxypécterolide-14-O-acétate	73	germacranolide	
<i>C. solstitialis</i>	Hydroxyjanérine	7	guaianolides	<b>Erenler et al., 2016</b>
<i>C. virgata</i>	8 $\alpha$ -[2'-hydroxyméthyl-2'-buténoyloxy]-déhydromelitensine	33	élémanolides	<b>Tuzun et al., 2017</b>
	Cnicine	16	germacranolide	
	8 $\alpha$ -Hydroxysonchucarpolide	74	eudesmanolide	
<i>C. behen</i>	4 $\beta$ ,15-déhydro-3-déhydrosolstitialine A	75	guaianolides	<b>Shakeri et al., 2018a</b>
	Aguerine B	76		
	Cebelline E	68		
<i>C. papposa</i>	8 $\alpha$ -[2'-hydroxyméthyl-2'-buténoyloxy]-déhydromelitensine	33	élémanolides	<b>Grafakou et al., 2018</b>
	8 $\alpha$ -O-(3,4-dihydroxy méthylénebutanoyloxy)-déhydromelitensine, méthyl ester	77		
	8 $\alpha$ -O-(3,4-Dihydroxy-2-méthylénebutanoyloxy)-15-oxo-5,7RH, 6 $\alpha$ H-éléman-1, 3,11(13)-trien-6,12-Olide	78		
<i>C. rhizantha</i>	Rhizantholide A	79	guaianolides	<b>Shakeri et al., 2018b</b>
	Rhizantholide B	80		
	Kandavanolide	81		
	Salograviolide A	82		
	Deacylcynaropicrin 8-O-[3'-hydroxy-2'-méthylpropionate]	83		
	Cynarinine A	84		
<i>C. Aegyptiaca</i>	Chlorohyssopifoline A	85	guaianolides	<b>Orabi et al., 2018</b>
	Chlorohyssopifoline B	86	guaianolides	
	Chlorohyssopifoline C	65		
	Subluteolide	87		
	Solstitiolide	88		
<i>C. pungens</i>	Centaureolides A	89	germacranolides	<b>Labed et al., 2019</b>
	Centaureolides B	90		
	11 $\beta$ ,13-Dihydrosalonitenolide 15-O- $\beta$ -Glucopyranoside	91		

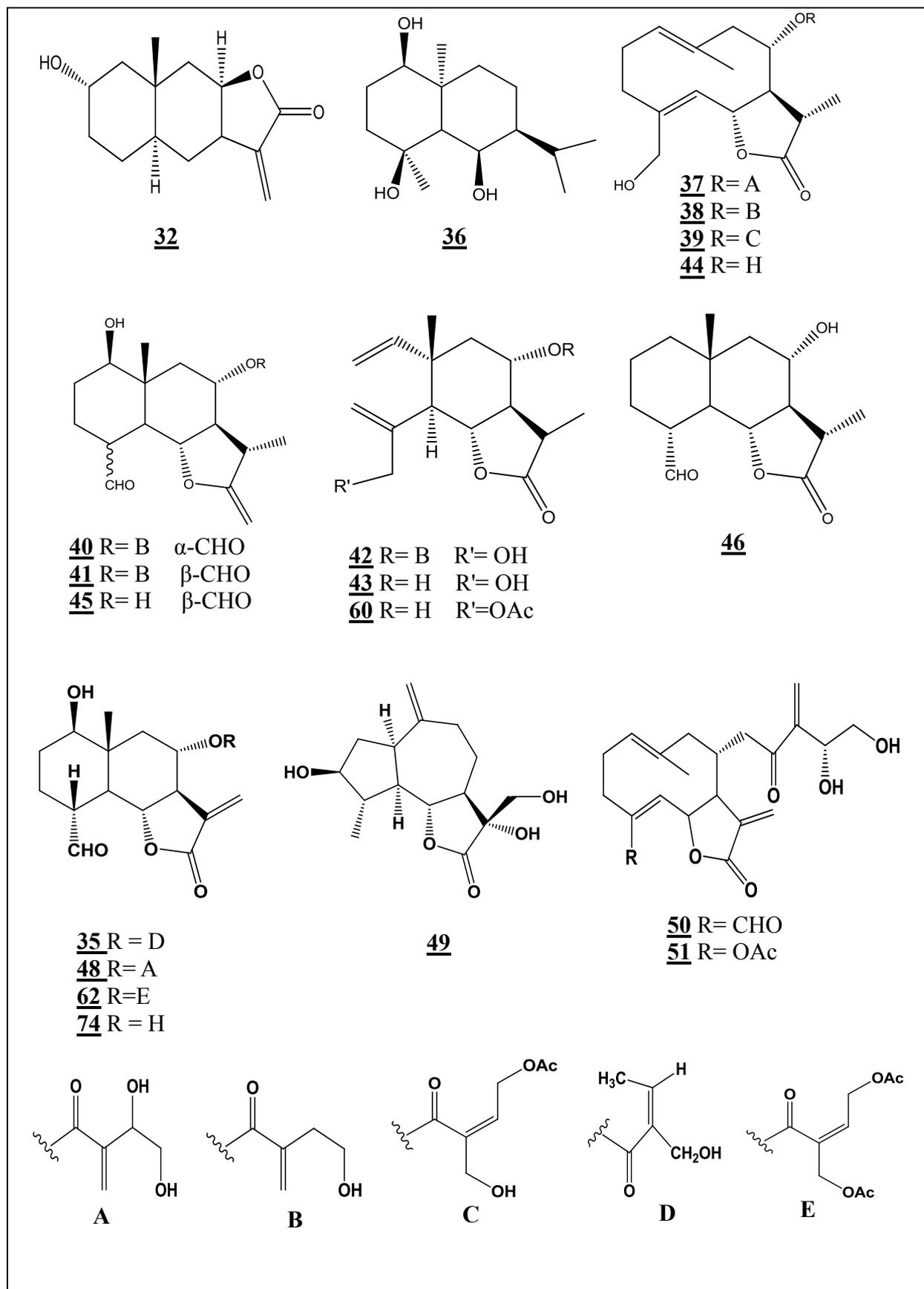
Les structures des différents sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.1 sont présentées dans la figure II.2.



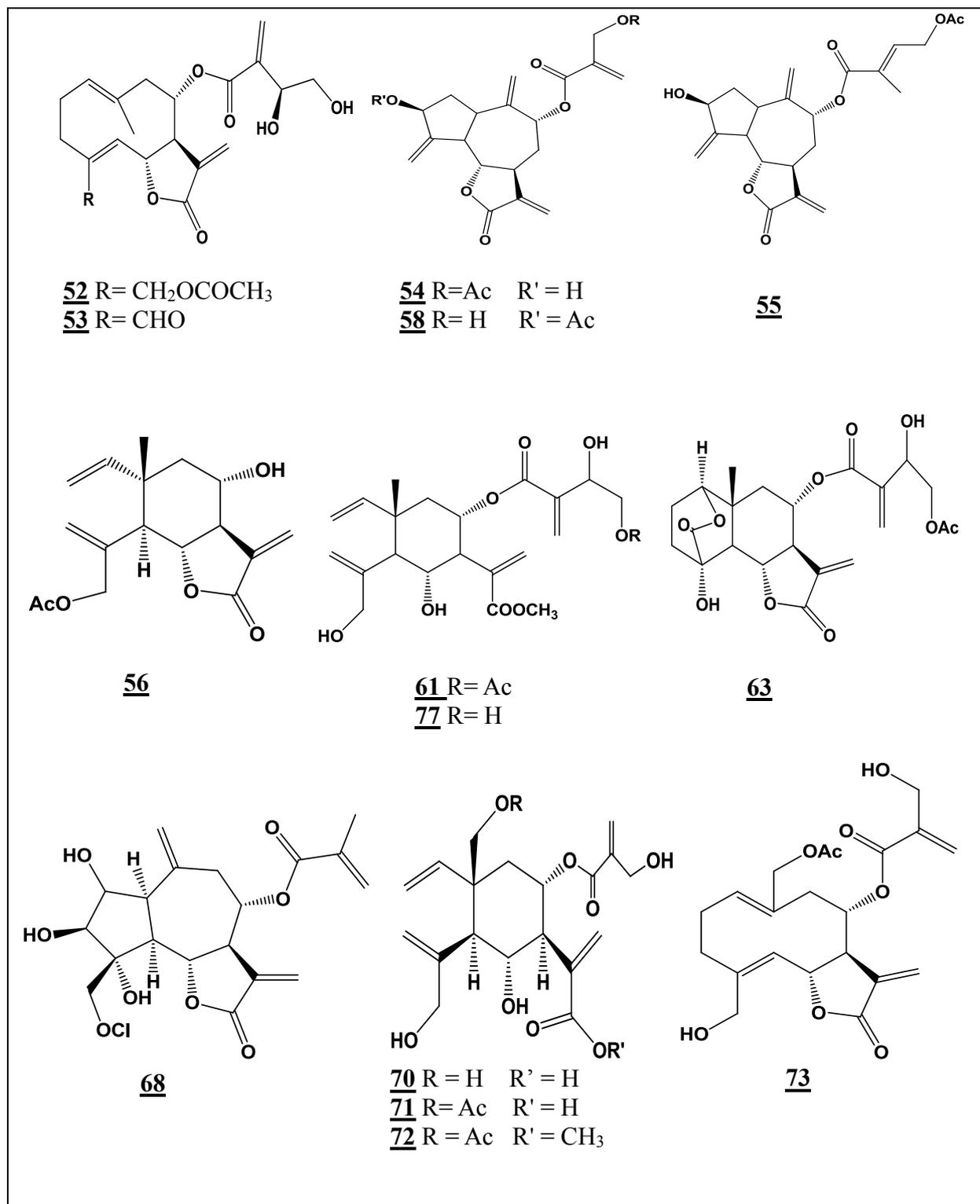
**Figure I.2 :** Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea*



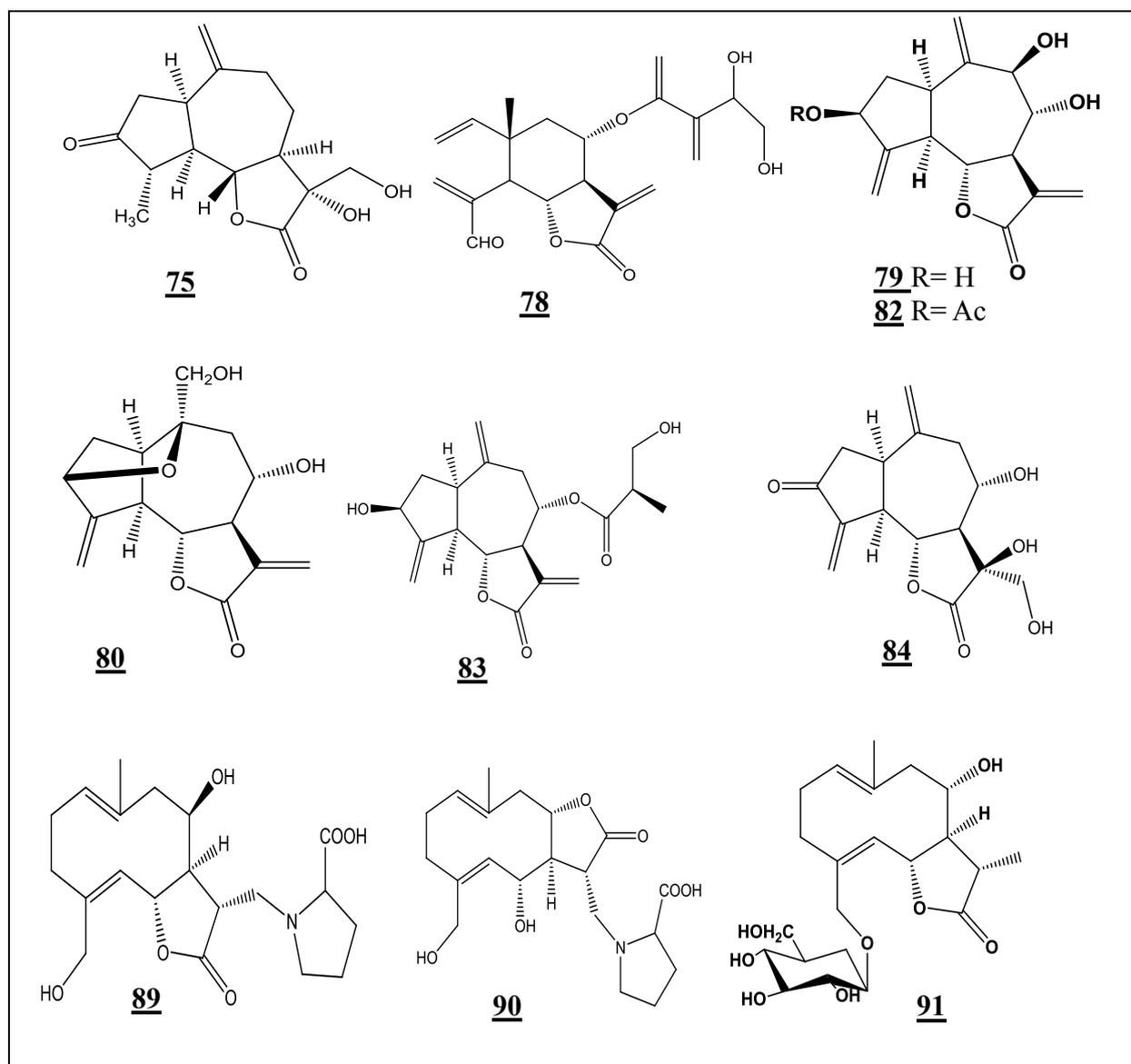
**Figure I.2** : Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.2** : Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.2 :** Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.2 :** Structures chimiques de quelques sesquiterpènes lactones isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)

#### I.4.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement distribués dans les espèces du genre *Centaurea* :

- l'apigénine, l'hispiduline et la jaceosidine sont les flavones les plus répandues dans ce genre.
- La quercétine, kaempférol et centaureidine sont les flavonols les plus rencontrés dans ce genre.
- Notons que les flavonoïdes *O*-glucosylés sont les plus abondants par rapport aux *C*-glucosylés.

Le tableau I.2 représente quelques composés flavoniques isolés des espèces du genre *Centaurea*.

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

Espèces	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. africana</i>	Hispiduline	92	flavones	<b>Seghiri et al., 2006</b>
	Centaureidine	93		
	Népétine	94		
	Algérianine	95	flavonols	<b>Seghiri et al., 2009</b>
	4'-méthyl gossypetine	96		
<i>C. tougourensis</i>	Jacéosidine	97	flavones	<b>Nacer et al., 2006</b>
	Eupatiline	98		
	3'- <i>O</i> -methyl eupatorin	99		
	Népétine	94		
	Apigénine	100		
	Kaempférol	101		
<i>C. ruthenica</i>	Patulétine	102	flavonols	<b>Mishio et al., 2006</b>
	Patulétine-7- <i>O</i> -glucoside	103		
	Patulétine-3,7-di- <i>O</i> -glucoside	104		
	Quercétagétine	105		
	Quercétagétine-7- <i>O</i> -glucoside	106		
	6-méthoxy kaempférol	107		
	6-méthoxykaempférol-7- <i>O</i> -glucoside	108		
	Axillarine	109		
	Axillarine-7- <i>O</i> -galactoside	110		
	Axillarine-7- <i>O</i> -glucoside	111		
	Jacéosidine	97	flavones	
	Jacéosidine-7- <i>O</i> -glucoside	112		
	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	113	flavonol	
<i>C. moesiaca</i>	Péctolinarigenine	114	flavones	<b>Trendafilova et al., 2007</b>
	Hispiduline	92		
	Désméthoxycentaureidine	115		
	Apigénine	100		
	Axillarine	109		
	isokaempferide	116	flavonols	
	kaempférol-3,6-diméthyl ether	117		
	centaureidine	93		
	Jacéidine	118		
<i>C. cadmea</i>	Eupatorine	119	flavones	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
	3'- <i>O</i> -méthyl eupatorine	99		
	Scutellarine	120		<b>Astari et al., 2013</b>
<i>C. hierapolitana</i>	Hispiduline	92	flavones	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
	Shaftoside	121		
	Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside	122	flavonol	
<i>C. maroccana</i>	Hispiduline	92	flavones	<b>Bentamane et al., 2007</b>
	Apigénine	100		
<i>C. grisebachii</i>	Jacéosidine	97	flavones	<b>Djeddi et al., 2008</b>
	Salvigénine	123		
	3'- <i>O</i> -methyl eupatorin	99		

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

Espèces	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. sphaerocephala</i>	Chrysoeriol	124	flavones	<b>Bentamene et al., 2008</b>
	Apigénine	100		
	Lutéoline	125		
	Chrysoeriol-7-O- $\beta$ -glucoside	126	flavones	<b>Bentamene et al., 2010</b>
	Apigénine 7-O- $\beta$ -glucoside	127		
<i>C. lippii</i>	Isovitexine	128	flavone	<b>Mezache et al., 2010</b>
	Isoquercitrine	129	flavonols	
	Kaempférol-3-O-rutinoside	122		
<i>C. sulphurea</i>	Cirsilineol	130	flavones	<b>Lakhal et al., 2010</b>
	Jacéosidine	97		
	3'-O-méthyl eupatorine	99		
	Népétine	94		
	Eupatiline	98		
<i>C. ensiformis</i>	Chrysoeriol-7-O-rutinoside	131	flavones	<b>Erel et al., 2010</b>
	Vicenine-2	132		
<i>C. urvillei</i>	Naringénine-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside	133	flavone	<b>Gulcemal et al., 2010</b>
	6-Hydroxy kaempférol-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside	134	flavonol	
	Hispiduline-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside	135	flavones	
	Apigénine-7-O- $\beta$ -D-méthyl glucuronopyranoside	136		
	Hispiduline-7-O- $\beta$ -D-méthyl glucuronopyranoside	137		
	Hispiduline-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	138		
	Apigénine-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	127		
	Kaempférol	101	flavonol	
	Apigénine	100	flavones	
	Lutéoline	125		
	Eriodictyol-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside	139	flavonol	
<i>C. microcarpa</i>	6-méthoxykaempférol	107	flavonols	<b>Louaar et al., 2011</b>
	6-méthoxy luteoline	94	flavone	
	6-méthoxykaempférol-7-O-glucoside	108	flavonols	
	Kaempférol 7-O-glucoside	140		
	Patulétine-7-O-glucoside	103		
	Hispiduline-7-O-glucoside	138	flavone	
<i>C. sulphurea</i>	Cirsilineol	130	flavones	<b>Kabouche et al., 2011</b>
	3'-O-méthyl eupatorine	99		
	Eupatiline	98		

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

Espèces	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. calolepis</i>	Lucenine-2	141	flavones	<b>Erel et al., 2011</b>
	Schaftoside	121		
	Vicenine-2	132		
	Vitexine	142		
	Isovitexine	128	flavones	
	Homoorientine	143		
	Rutine	144	flavonol	
	Orientine	145	flavones	
	Luteoline-7- <i>O</i> -glycoside	146		
<i>C. spruneri</i>	Eriodictyol	147	flavone	<b>Ciric et al., 2011</b>
<i>C. maroccana</i>	Cirsimaritine	148	flavones	<b>Bicha et al., 2011</b>
	Apigénine	100		
	Isokaempferide	116		
<i>C. omphalotricha</i>	Circimaritine	148	flavones	<b>Kolli et al., 2012</b>
	Apigénine	100		
	Lutéoline	125		
	Oroxiline A	149	flavones	<b>Mouffok et al., 2012</b>
	Chrysine	150		
	Tenaxine II	151		
	5,7,2'-trihydroxyflavone	152		
Quercétine	153	flavonol		
<i>C. omphalodes</i>	Chrysine	150	flavones	<b>Khalfallah et al., 2012</b>
	Cirsimaritine	148		
	Salvigenine	123		
	Chrysoeriol	124		
	Chrysin 8- <i>C</i> -glucoside	154		
<i>C. nicaeensis</i>	Apigénine 4'-(6"-méthyl glucuronide)	155	flavones	<b>Hammoud et al., 2012</b>
	Cisilineol	130		
	Apigénine	100		
	Apigénine-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-méthyl glucuronopyranoside	136		
<i>C. jacea</i>	Apigénine	100	flavones	<b>Forgo et al., 2012</b>
	Cirsiliol	156		
	Eupatorine	119		
	Isokaempferide	116	flavonol	
	Axillarine	109	flavonols	
	kaempférol-3,6-diméthyl ether	117	flavonol	
<i>C. alexanderina</i>	Rutine	144	flavonol	<b>Kubacey et al., 2012</b>
	Hespéridine	157	flavone	
	Apigénine- 7- <i>O</i> -D-galactouronic acid méthyl ester	158		
	Astragaline	159		
	Centaureine	160		

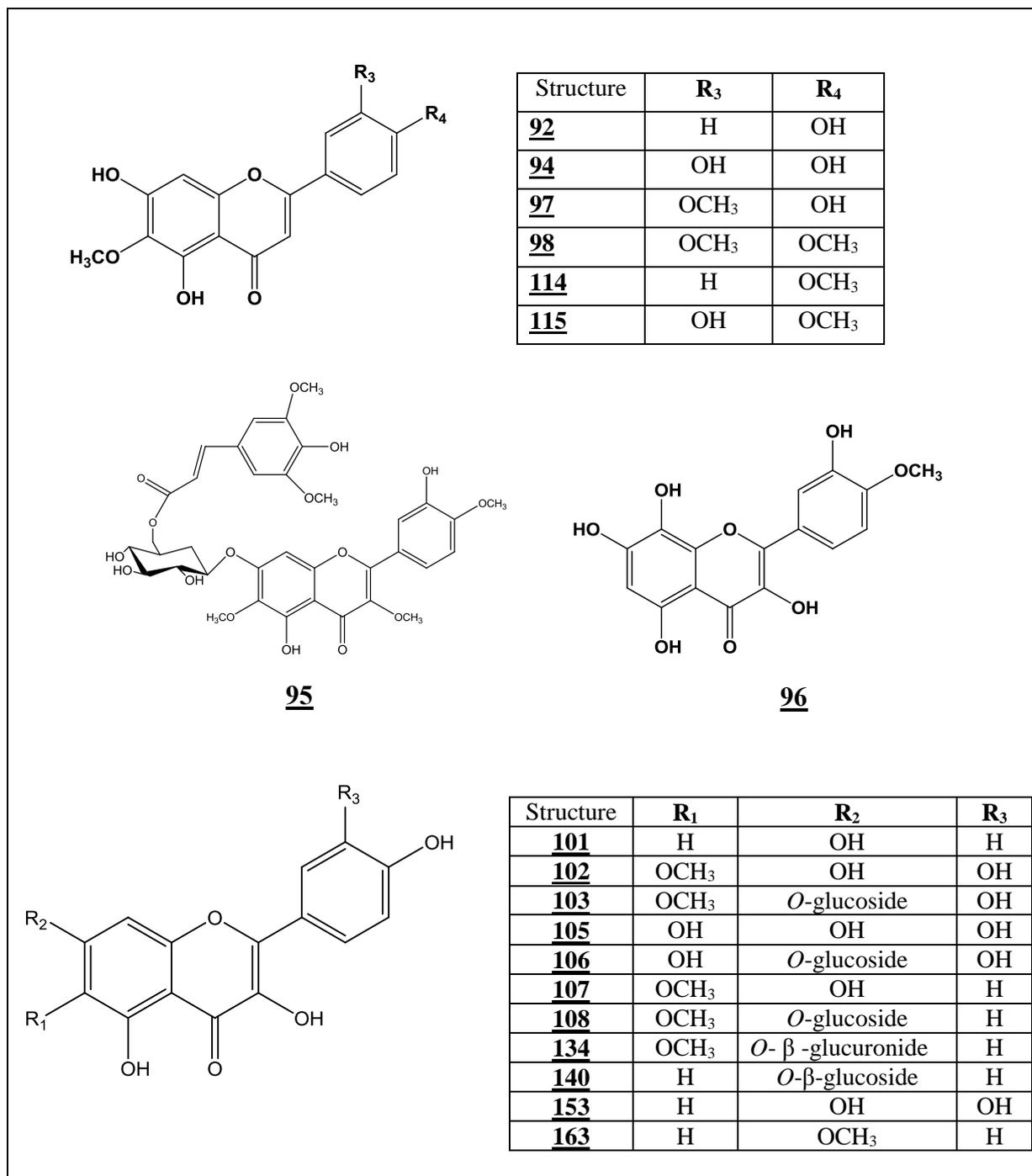
Tableau I.2 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèces	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. alexanderina</i>	Apigénine	100	flavones	<b>Kubacey et al., 2012</b>
	Vicenine-2	132		
	kaempférol-3,6-diméthyl ether	117	flavonols	
	Quercétine	153		
	Naringénine	161	flavones	
	Jacéosidine	97		
<i>C. zuccariniana</i>	Genkwanine	162	flavones	<b>Ćiric et al., 2012</b>
	Isovitexine	148		
	Salvigénine	123		
	7-Méthylkaempférol	163	flavonol	
	Lutéoline-7-O-β-D-glucoside	146	flavone	
<i>C. acaulis</i>	Patulétine 7-O-glucoside	103	flavonol	<b>Bicha et al., 2013</b>
	Hispiduline 7-O-β-glucopyranoside	135	flavones	
	Hispiduline	92		
<i>C. pannonica</i>	Apigénine	100	flavones	<b>Milošević Ifantis et al., 2013</b>
	Hispiduline	92		
	Hispiduline-7-O-β-D-glucopyranoside	135	flavones	
	Népétine-7-O-β-D-glucopyranoside	164		
	6-Méthoxy kaempférol	107	flavonol	
<i>C. tomorosii</i>	Santoflavone	99	flavone	<b>Tesevic et al., 2014</b>
<i>C. stenolepis</i>	Jaceidine	118	flavonols	<b>Sen et al., 2014</b>
	Jaceine	165		
<i>C. carduiiformis</i>	7-O-β-D-6"-O-glucopyranosyl-6"-O-β-D-furanosylpinocembrine	166	flavones	<b>Yaglioglu et al., 2014</b>
	Wogonine	167		
	N-(pentyloxy(M-Tolyl) méthyl) acetamideiso-Wogonin	168		
<i>C. parviflora</i>	3-O-méthyl eupatorine	99	flavones	<b>Belkacem et al., 2014</b>
	Eupatorine	119		
	Cirsilineol	130		
	Genkwanine	162		
	Nicotiflorine	122		
<i>C. rupestris</i>	Lutéoline	125	flavone	<b>Curkovic-Perica et al., 2014</b>
	Quercétine	153	flavonols	
	Galangine	169		
	Naringénine	161	flavone	
	Myricétine	170	flavonol	
<i>C. microcarpa</i>	5,4'-Trihydroxy-3,6-diméthoxyflavone 7-O-β-glucoside	171	flavone	<b>Louaar et al., 2014</b>
	6-Méthoxykaempférol	107	flavonol	

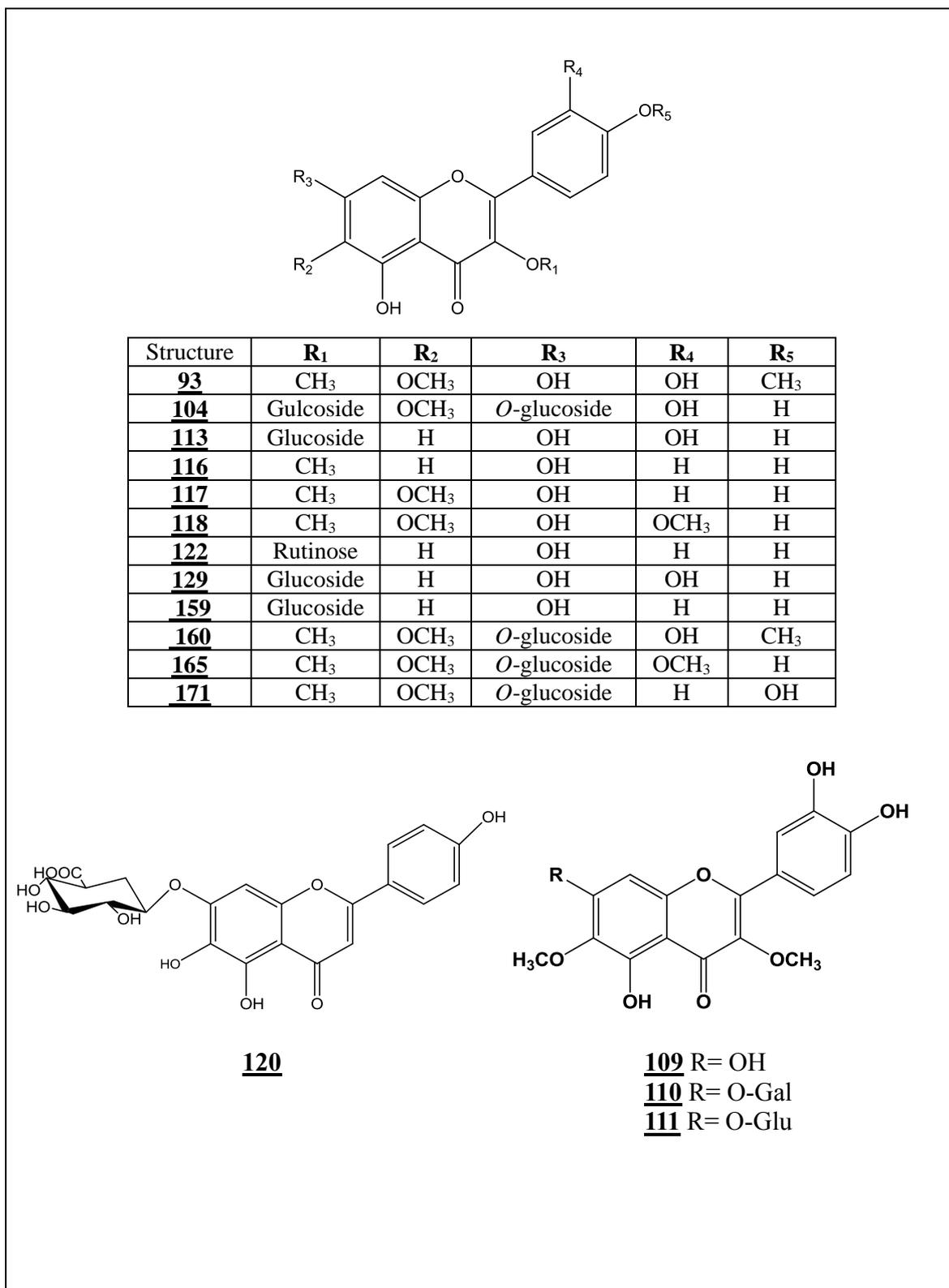
Tableau I.2 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèces	Nom du composé	Structure	Type de composé	Référence
<i>C. scoparia</i>	Cynaroside	146	flavones	<b>Ahmed et Kamel, 2014</b>
	Apigétrine	127		
	Oroxyline A	149		
	5,7-Dihydroxy-3',4',5'-triméthoxyflavone	172		
	3',4'-Dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acétoxy)-2'',2''-diméthylpyrano-(5'',6'';7,8)-flavone-3-O-β-D-glucopyranoside	173		
	Atalantoflavone	174		
	5-Hydroxy-3',4',8-triméthoxy-2'',2''-diméthylpyrano (5'',6''; 6,7) flavone	175		
	3',4',5,8-Tetraméthoxy-2'',2''-diméthylpyrano (5'',6'' :6,7)-flavone.	176		
<i>C. diluta</i>	Eupatiline	98	flavones	<b>Zater et al., 2016</b>
	Jacéosidine	97		
<i>C. kilaea</i>	Jacéosidine	97	flavones	<b>Sen et al., 2016</b>
	3'-O-méthyl eupatorine	99		
	Péctolinarigénine	114		
	Salvigénine	123		
	Eupatorine	119		
	Cirsimaritine	148		
<i>C. virgata</i>	Apigénine	100	flavones	<b>Tuzun et al., 2017</b>
	Hispiduline	92		
	Salvigénine	123		
	Eupatorine	119		
	3'-O-méthyl eupatorine	99		
	Isokaempferide	116	flavonol	
<i>C. behen</i>	Péctolinarigénine	114	flavones	<b>Mosaddegh et al., 2018</b>
<i>C. albonitens</i>	Apigénine-4'-O-rhamnoside	177	flavone	<b>Hamedeyazdan et al., 2017</b>
<i>C. microcarpa</i>	Népétine	94	flavonol	<b>Baatouche et al., 2018</b>
	Astragaline	161	flavonol	
<i>C. pyrrhoblephara</i>	Apigénine	100	flavones	<b>Tastan et al., 2019</b>
	Néptine	94		
	Jacéosidine	97		
<i>C. pungens</i>	Apigénine-7-O-β-D-méthyl glucuronopyranoside	136	flavones	<b>Labeled et al., 2019</b>
	Hispiduline	92		
	Hispiduline- 7-O-β-D-glucuronopyranoside	135		

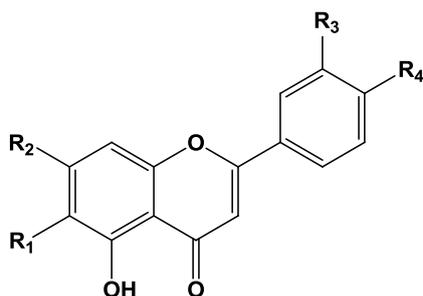
Les structures des différents flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.2 sont présentées dans la figure II.3.



**Figure I.3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea*

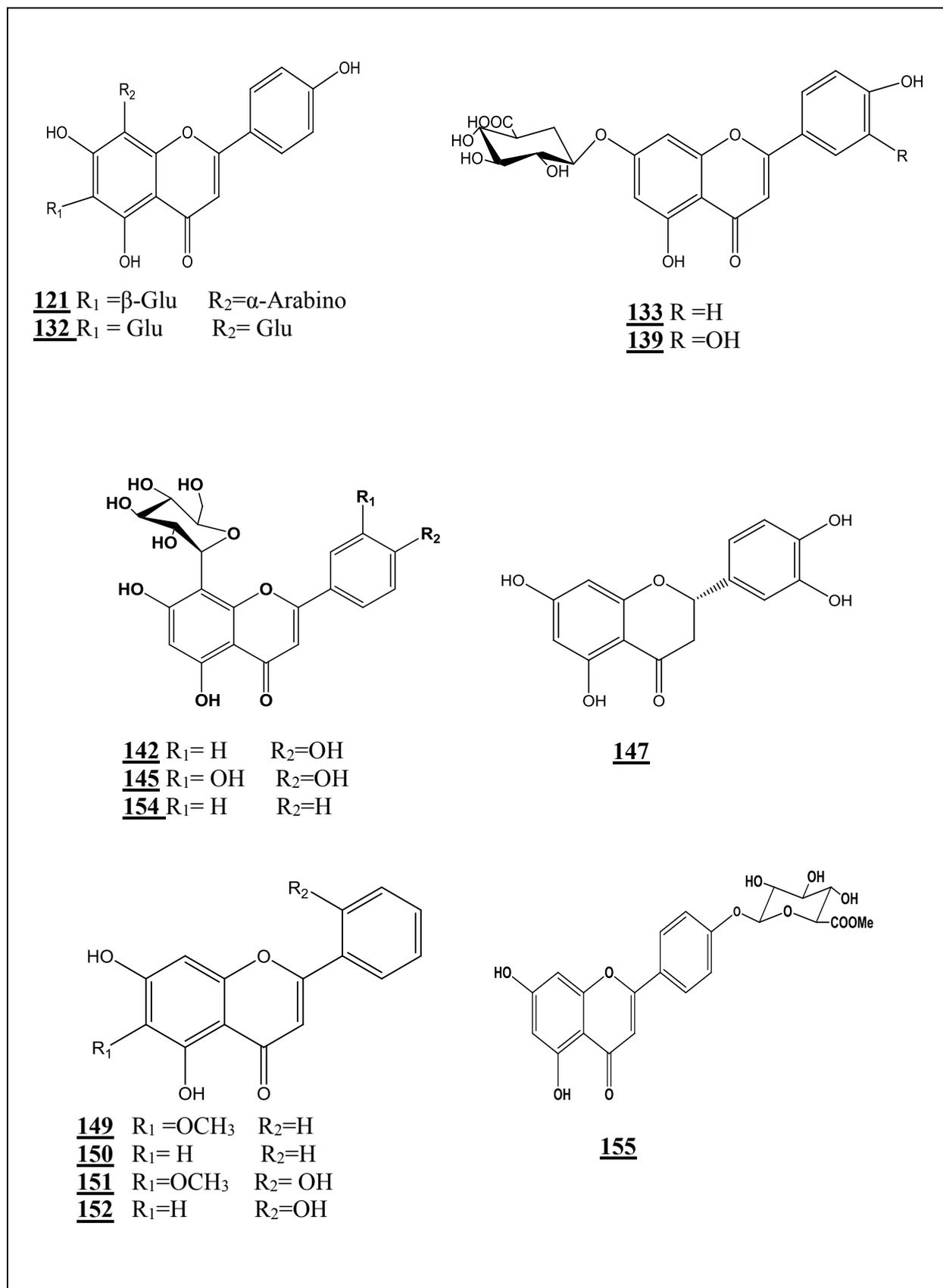


**Figure I.3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)

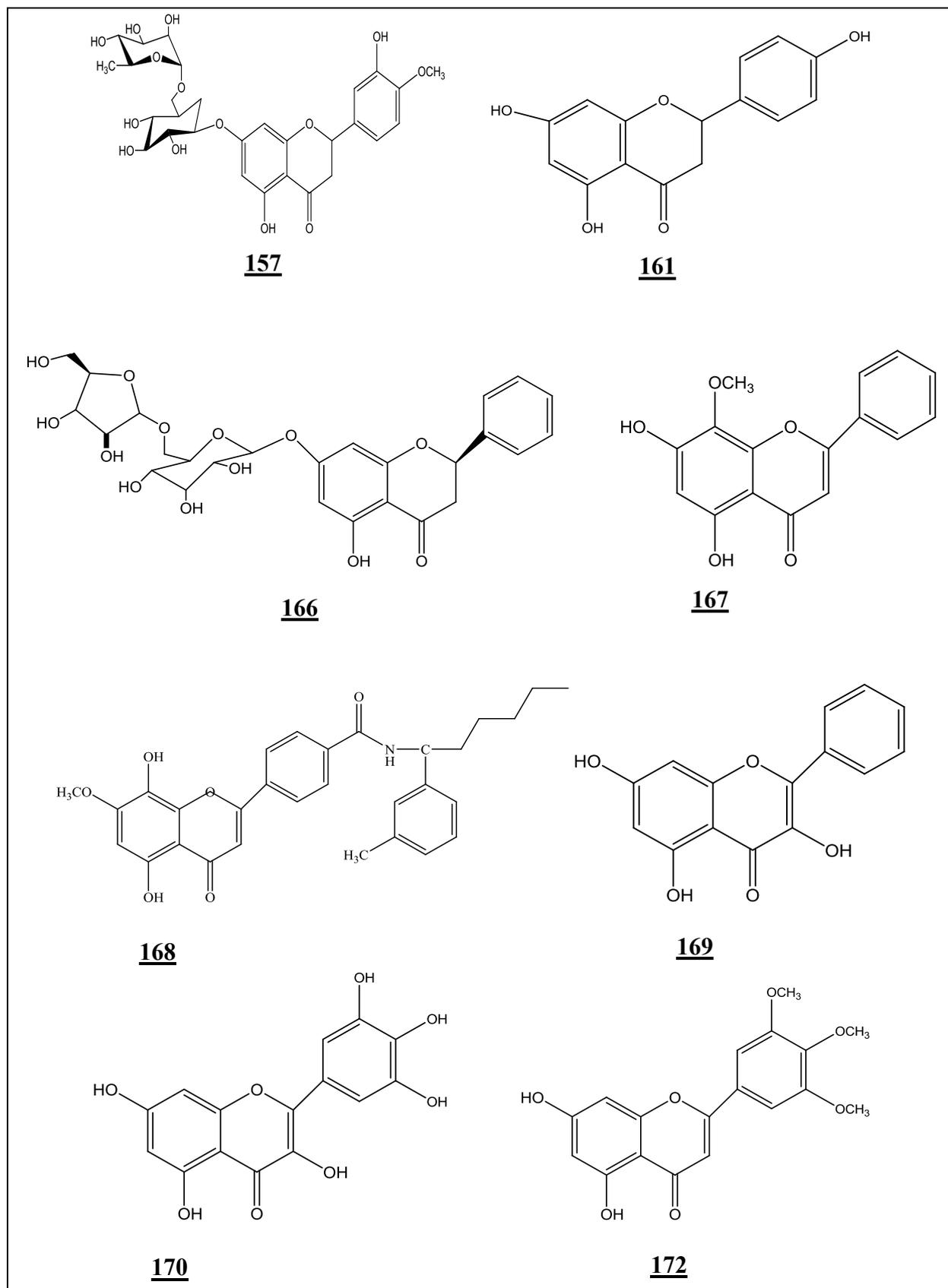


Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<u>99</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<u>100</u>	H	OH	H	OH
<u>112</u>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -glucoside	OCH <sub>3</sub>	OH
<u>119</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
<u>123</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<u>124</u>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
<u>125</u>	H	OH	OH	OH
<u>126</u>	H	<i>O</i> -glucoside	OCH <sub>3</sub>	OH
<u>127</u>	H	<i>O</i> -glucoside	H	OH
<u>128</u>	<i>C</i> -glucoside	OH	H	OH
<u>130</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
<u>131</u>	H	<i>O</i> -Rutinoside	OCH <sub>3</sub>	H
<u>135</u>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-glucuronide	H	OH
<u>136</u>	H	<i>O</i> -β-methylglucuronide	H	OH
<u>137</u>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-methylglucuronide	H	OH
<u>138</u>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-glucoside	H	OH
<u>143</u>	glucoside	OH	OH	OH
<u>146</u>	H	<i>O</i> -glucoside	OH	OH
<u>148</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH
<u>156</u>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
<u>158</u>	H	<i>O</i> -méthyl galactouronique	OH	H
<u>162</u>	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH
<u>164</u>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -glucoside	OH	OH

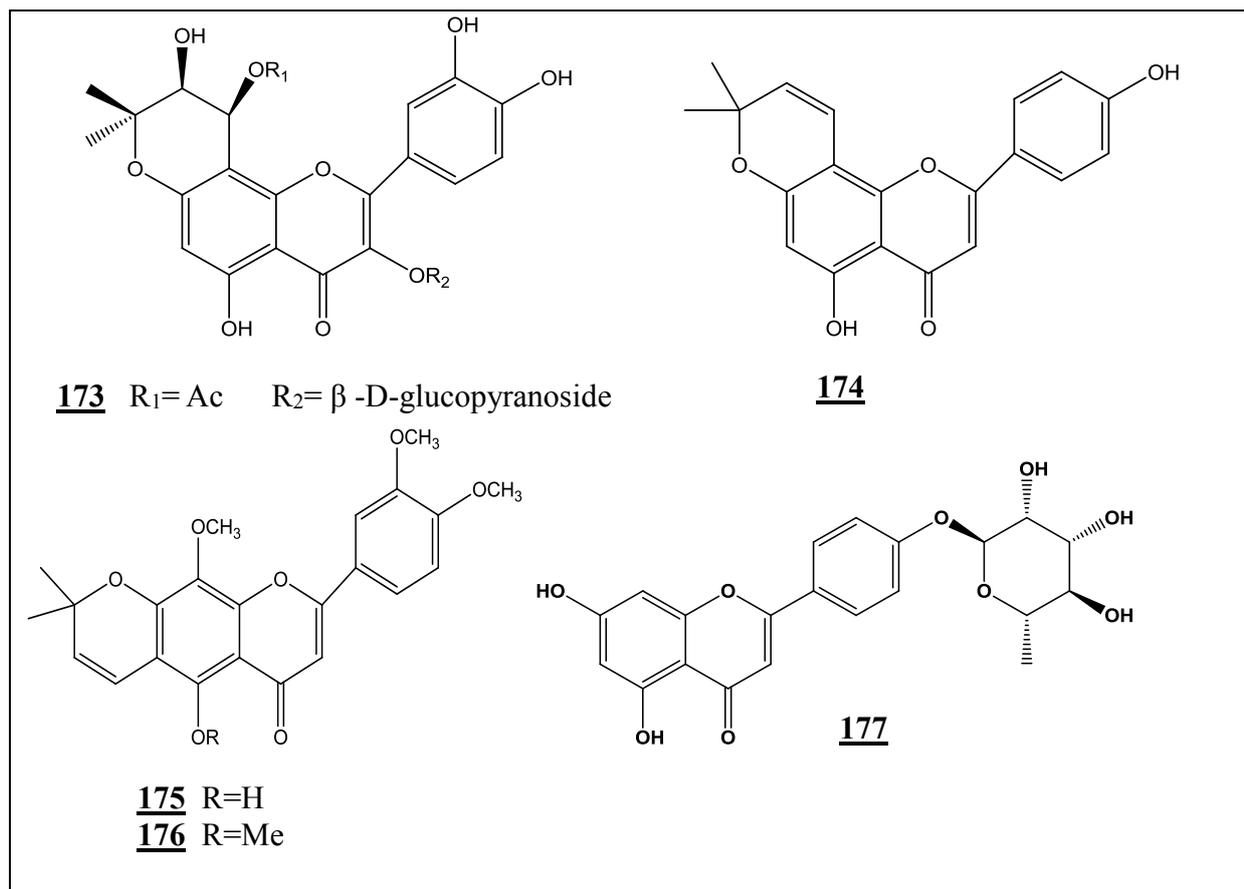
**Figure I.3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.3** : Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)



**Figure I.3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)

#### I.4.2.3. Les lignanes

Les lignanes sont des substances naturelles végétales constituées principalement par deux unités de phenylpropane. On les trouve dans les graines de céréales, les fruits et les végétaux (Pengelly, 2004).

Les études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont montré la présence de ces substances dans de nombreuses espèces. Le tableau I.3 représente quelques lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea*.

**Tableau I.3 :** Quelques lignanes isolés du genre *Centaurea*

Espèces	Nom du composé	Structure	Référence
<i>C. americana</i>	Arctiine	178	Shoeb <i>et al.</i> , 2006a
	Matairesinoside	179	
	Américanine	180	
	Arctigénine	181	
	Matairésinol	182	
	lappaol A	183	
<i>C. ptosimopappa</i>	Arctigénine	181	Çelik <i>et al.</i> , 2006
	Matairésinol	182	
<i>C. moesiaca</i>	Trachelogénine	184	Trendafilova <i>et al.</i> , 2007

Tableau I.3 : Quelques lignanes isolés du genre *Centaurea* (suite)

Espèces	Nom du composé	Structure	Référence
<i>C. hierapolitana</i>	Dehydrodiconiferyl alcohol	185	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
<i>C. pamphylica</i>	Matairesinoside	179	<b>Shoeb et al., 2007</b>
	Arctiine	178	
	Matairesinol	182	
<i>C. grisebachii</i>	Arctigénine	181	<b>Djeddi et al., 2008</b>
<i>C. ensiformis</i>	Dihydrodéhydrodiconiferylalcohol-4-O-β-D-glucopyranoside	186	<b>Erel et al., 2010</b>
<i>C. jacea</i>	Trachelogénine	184	<b>Forgo et al., 2012</b>
<i>C. zuccariniana</i>	Arctigénine	181	<b>Ciric et al., 2012</b>
	Arctiine	178	
<i>C. pannonica</i>	Matairésinol	182	<b>Milošević Ifantis et al., 2013</b>
	Arctigénine	181	
	Arctiine	178	
<i>C. diluta</i>	Arctigénine	181	<b>Zater et al., 2016</b>
<i>C. vlachorum</i> <i>Hartvig</i>	Matairésinol	182	<b>Hodaj et al., 2017</b>
	Arctiine	178	
<i>C. albonitens</i>	Arctiine	178	<b>Hamedeyazdan et al., 2017</b>
<i>C. rhizantha</i>	Arctigénine	181	<b>Shakeri et al. 2018</b>

Les structures des différents lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.3 sont présentées dans la figure I.4

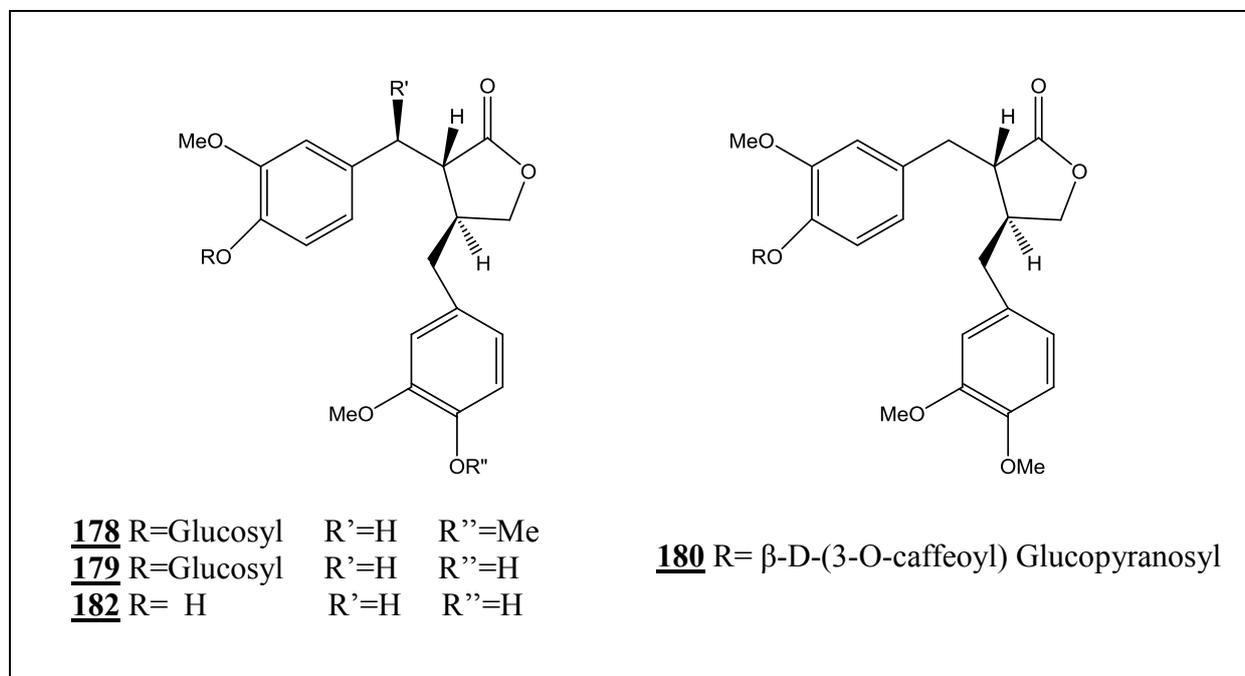
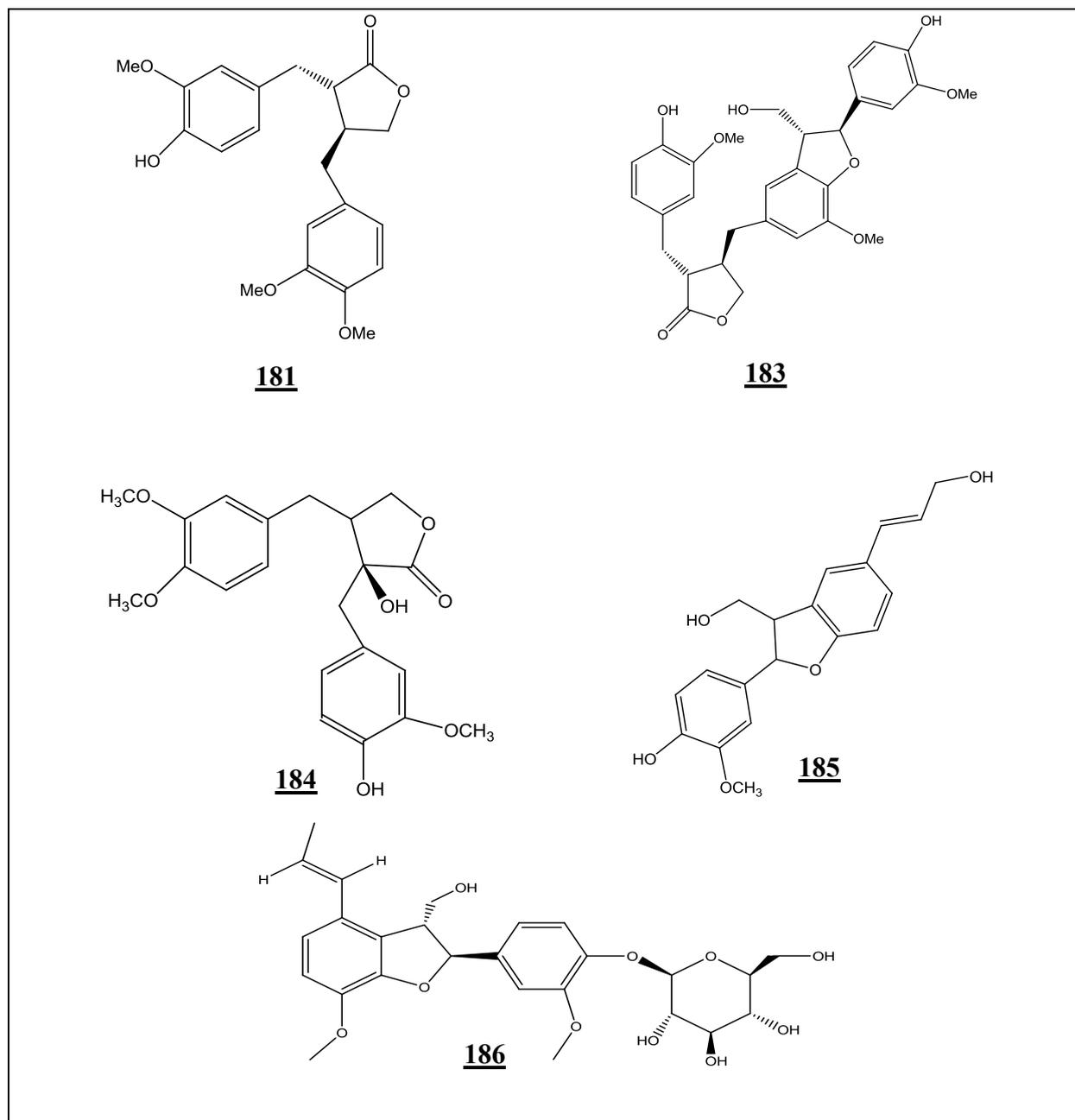


Figure I.4 : Structures chimiques de quelques lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea*



**Figure I.4** : Structures chimiques de quelques lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)

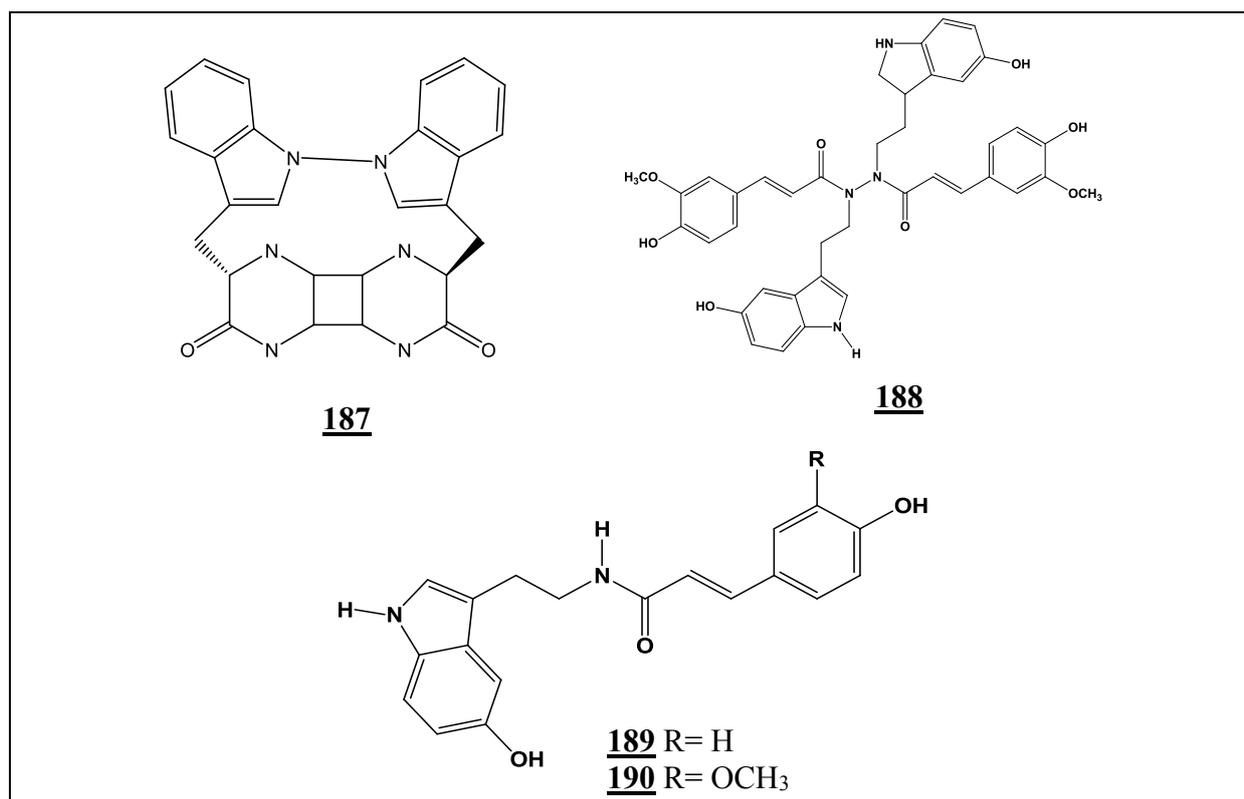
#### I.4.2.4. Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés hétérocycliques comportant un ou plusieurs atomes d'azote et présents dans les plantes. Plusieurs composés de ce type ont été isolés de nombreuses espèces du genre *Centaurea*, le tableau I.4 représente quelques alcaloïdes isolés des espèces de ce genre.

Tableau I.4 : Quelques alcaloïdes isolés des espèces de ce genre.

Espèce	Nom du composé	Structure	Référence
<i>C. schischkini</i>	schischkiniin	187	<b>Shoeb et al., 2005</b>
<i>C. monatna</i>	montanoside	188	<b>Shoeb et al., 2006</b>
<i>C. vlachorum</i>	N-(p-coumaroyl) serotonin	189	<b>Hodaj et al., 2017</b>
	moschamine	190	

Les structures des différents alcaloïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.4 sont présentées dans la figure I.5.



**Figure I.5** : Structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Centaurea*

#### I.4.2.5. Triterpènes et stéroïdes

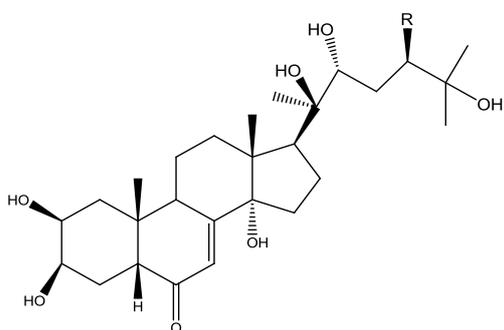
Les triterpènes sont des composés qui renferment dans leur squelette 30 carbones issus de la cyclisation de l'époxysqualène. Ils sont très abondants dans le règne végétal et animal sous forme libre ou étherifié. La cyclisation du cation formé par l'époxysqualène peut conduire à la formation de plusieurs formes triterpéniques : acyclique, tétracyclique ou pentacyclique. Le carbone en position 3 est presque toujours hydroxylé à cause de l'ouverture de l'époxyde (**Raphel, 1969**) et (**Dey et al., 1991**).

Les stéroïdes ne sont pas de vrais terpènes mais des composés de biodégradation de triterpènes qui dérivent du noyau perhydrocyclopenténophénanthréne. En général, le squelette de base des stéroïdes en forme tétracyclique renferment 17 atomes de carbones (**Bruneton, 1993**).

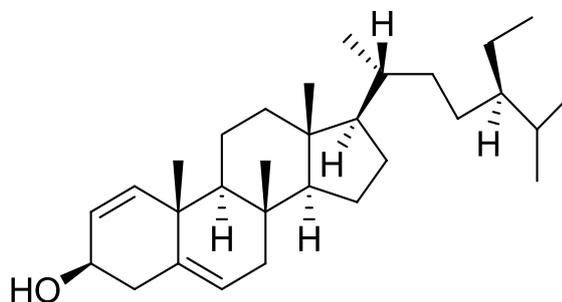
Ces deux composés sont largement répandus dans de nombreuses plantes appartenant au genre des Centaurées. Le tableau I-5 représente quelques composés de type triterpènes et stéroïdes isolés des espèces de ce genre, et la figure I.6 reporte les structures de ces composés.

**Tableau I.5 :** Quelques triterpènes et stéroïdes isolés du genre *Centaurea*

Espèce	Nom du composé	Structure	Types de composé	Référence
<i>C. americana</i>	20-hydroxyecdysone	191	stéroïdes	<b>Shoeb et al., 2006</b>
	Makistéron	192		
<i>C. iberica</i>	stigmast-1,5-dien-3-ol	193	stéroïde	<b>Dumlu et al., 2006</b>
<i>C. cadmea</i>	$\beta$ -sitostérol	194	stéroïdes	<b>Karamenderes et al., 2007</b>
	Daucostérol	195		
<i>C. omphalotricha</i>	Lupeol	196	triterpènes	<b>Mouffok et al., 2012</b>
	Taraxastérol	197		
	Daucostérol	195	Stéroïdes	
	$\beta$ -sitostérol	194		
<i>C. kilaea</i>	Taraxastérol	197	triterpènes	<b>Sen et al., 2016</b>
	Acide oléanolique	198		
<i>C. athoa</i>	Daucostérol	195	stéroïde	<b>Demir et al., 2016</b>
<i>C. microcarpa</i>	$\beta$ -sitostérol	194	triterpènes	<b>Baatouche et al., 2018</b>
	daucostérol	195		
<i>C. behen</i>	$\beta$ -Sitostérol	194	stéroïdes	<b>Mosaddegh et al., 2018</b>
	Daucosterol,	195		
	Acide oléanolique	198	triterpènes	
	Taraxastérol	197		
<i>C. derderiifolia</i>	Daucostérol	195	stéroïde	<b>Bulut et al., 2019</b>

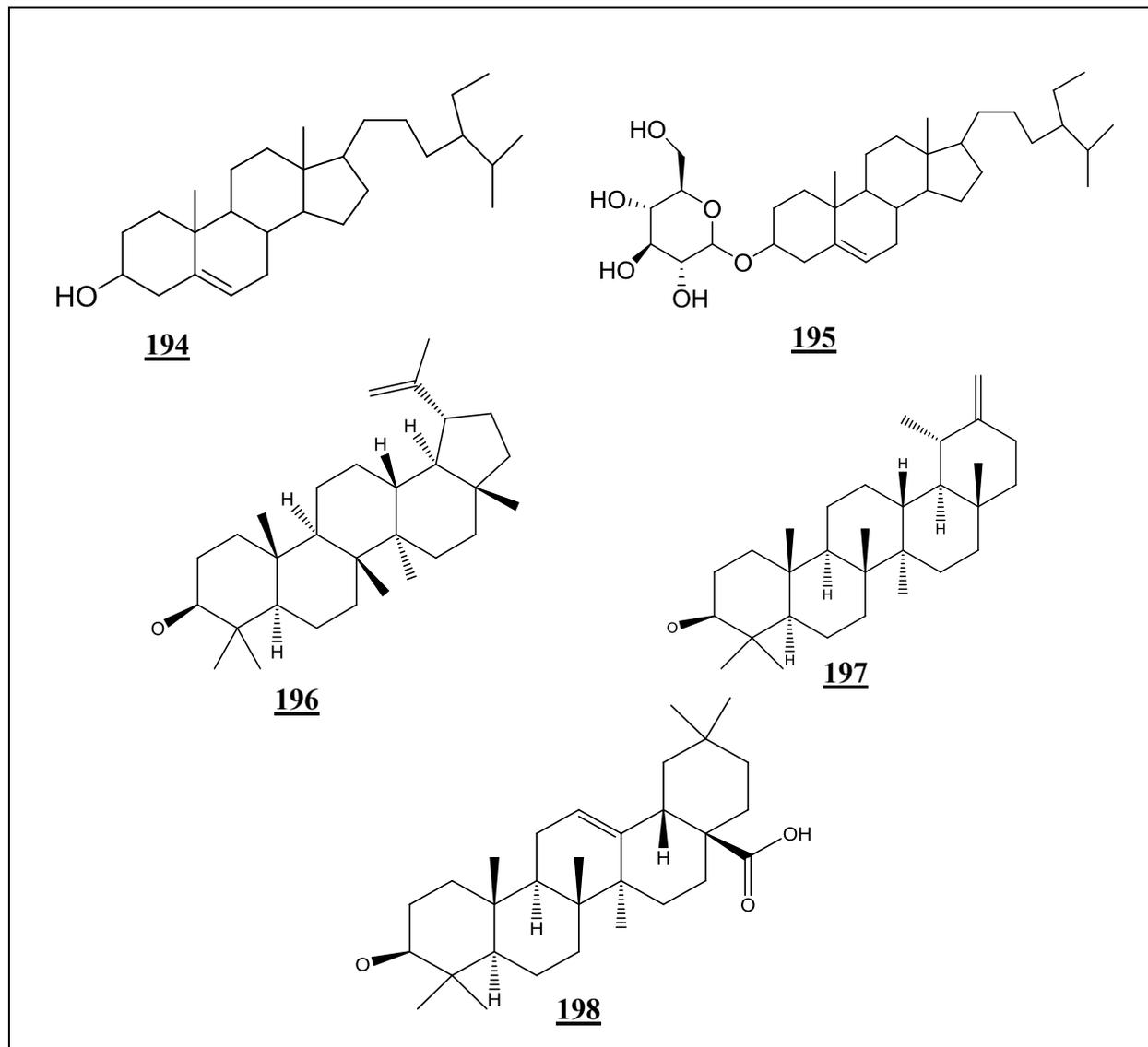


**191** R=H  
**192** R=CH<sub>3</sub>



**193**

**Figure I.6 :** Structures chimiques de quelques triterpènes et stéroïdes isolés des espèces du genre *Centaurea*



**Figure I.6 :** Structures chimiques de quelques triterpènes et stéroïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* (suite)

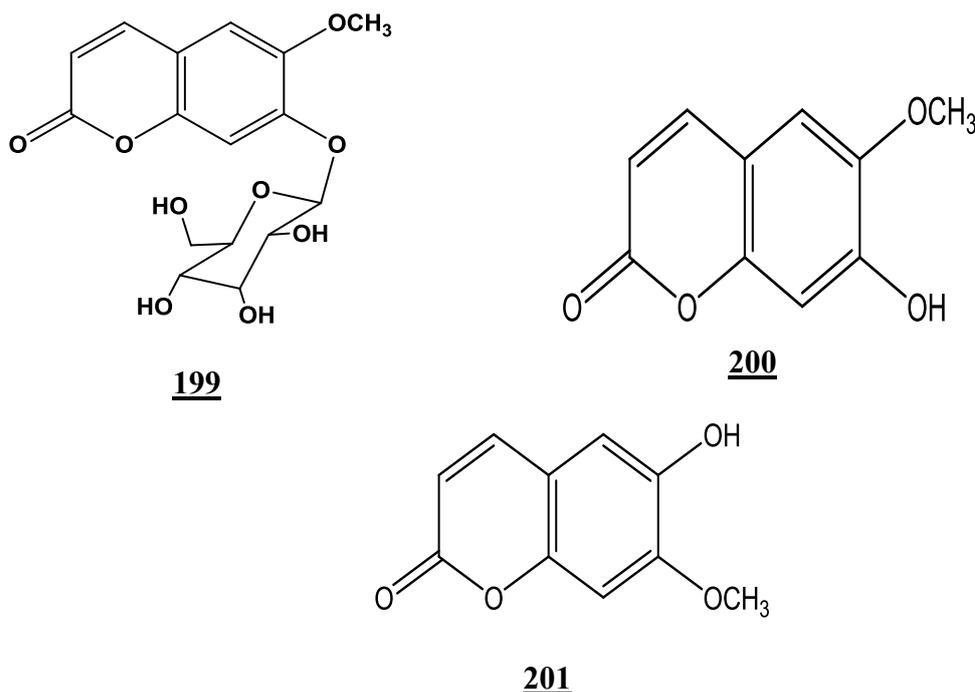
#### I.4.2.6. Les coumarines

Les coumarines, composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces. Ce sont des dérivés du phénylpropane dont les précurseurs sont des acides hydroxycinnamiques (**Garabeth et al., 2007**).

Les hydroxy-coumarines simples, et spécialement la scopolétine et ses dérivés sont détectés chez quelques espèces du genre *Centaurea* sont cités dans le Tableau I.6, et la figure I.7 reporte les structures de ces composés.

Tableau I.6 : Quelques coumarines isolées des espèces de ce genre.

Espèce	Nom du composé	Structure	Référence
<i>C.ensifformis</i>	Scopoline	199	<b>Erel et al., 2010</b>
<i>C. spruneri</i>	Scopolétine	200	<b>Ciric et al., 2011</b>
	Isoscopolétine	201	
<i>C. maroccana</i>	Scopolétine	200	<b>Bicha et al., 2013</b>
<i>C. pyrrhoblephara</i>	Scopolétine	200	<b>Tastan et al., 2019</b>

Figure I.7 : Structures chimiques de quelques coumarines des espèces du genre *Centaurea*

#### I.4.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir un certain nombre de maladie, on peut citer comme exemple :

- *C. calcitrapa* L., *C. jacea* L. et *C. sinaica* sont utilisées dans le traitement de la fièvre (**Yesilada et al., 2002**).
- *C. behen* L. est utilisée dans le traitement des troubles d'estomac (**Tuzlaci et al., 1999**).
- *C. scabiosa* est utilisée contre la toux, les démangeaisons et en tant que remèdes ophtalmiques (**Kumarasamy et al., 2003**).
- les espèces *C. Calcitrapa*, *C. Melitensis* et *C. Solstitialis* sont utilisées pour leurs effets hypoglycémiant (**Masso et al., 1979**).
- En médecine traditionnelle populaire turque :

- ✓ Les fleurs séchées de *C. cyanus* sont utilisées sous forme d'infusion pour calmer la diarrhée (**Baytob, 1999**).
- ✓ Les fleurs du genre *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* sont utilisées pour traiter les ulcères peptiques, l'ulcère gastro-duodéal, le paludisme, les rhumes, les maux d'estomac, les douleurs abdominales et les infections herpétiques autour des lèvres (**Yesilada et al., 2004**).
- ✓ les parties aériennes de la *C. virgata* Lam, sont utilisées contre les maux d'estomac (**Akkol et al., 2009**).
- En Egypte, *C. pallscens* est utilisée comme stomachique, digestive et diurétique (**Ali et al., 1987**).
- *C. pullata* est utilisé en Algérie dans la préparation avec d'autres plantes d'un plat traditionnel local appelé «El Hammama» (**Djeddi et al., 2007**).

#### **I.4.4. Intérêts biologiques des principaux métabolites secondaires du genre *Centaurea***

De nombreux métabolites secondaires sont décrits dans différentes espèces du genre *Centaurea* et la plupart de ces composés possèdent des propriétés pharmacologiques remarquables.

Les sesquiterpènes lactones sont des composés qui caractérisent la famille des Astéracées et notamment le genre *Centaurea*. Ces composés sont connus par leurs activités biologiques et pharmacologiques diverses. A titre d'exemple, 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 (**Erel et al., 2011**).

Les guianolides : chlorojanérine, 13-acétyl solstitialine A et solstitialine A ont été identifiés comme des composants anti-ulcérogènes de l'extrait chloroformique des parties aériennes de *Centaurea solstitialis* ssp. *Solstitialis* (**Gürbüz et al., 2007**).

D'autres études dans le domaine microbiologique ont montrés que le composé 13-acétyl solstitialine A a une activité antibactérienne importante contre les souches isolées de *Enterococcus faecalis* à concentration de 1 mg / mL. Cette valeur est proche des concentrations efficaces de l'ampicilline (**Ozcelik et al., 2009**).

L'onopordopicrine une sesquiterpène lactone isolée de *C. sonchifolia* a montrée une activité positive contre *Staphylococcus* sp. (**Loneragan et al., 1992**). Les composés : cnicine, 4'-acétylcnicine,  $8\alpha$ -[(4-acétoxy-5-hydroxy)-angelate]-salonitenolide,  $8\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-dehydro mélitensine et méthyl  $8\alpha$ -(3,4-dihydroxy -2-méthylène-

butanoyloxy)-6 $\alpha$ ,15-dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-olat séparés de *C. thessala* ssp. *drakiensis* et *C. attica* ssp. *attica* ont montré des activités antifongiques remarquables (Skaltsa et al., 2000).

Les flavonoïdes hispiduline, kaempférol, quercétine et taxifoline isolé de *C. floccosa* ont été testés contre les microorganismes suivants *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* (Negrete et al., 1987).

## 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 l'espèce *Centaurea involucrata* qui n'a jamais fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant.

# *Chapitre II*

**Travaux personnels**

**Etude phytochimique**

## II.1. Introduction

La phytochimie a pour but principal de trouver de nouvelles voies d'applications dans les domaines de la pharmacie, de la cosmétologie et autres, en se basant sur la recherche et l'isolement de nouvelles molécules naturelles pouvant servir de modèles pour la synthèse de médicaments et produits cosmétique. Cependant il est important de sélectionner les plantes à étudiées soigneusement. Pour cela, et à cause de la richesse et la diversité du genre *Centaurea* en matière de métabolites secondaires et d'activité biologique, la plante *Centaurea involucrata* Desf. à fait l'objet de notre travail.

## II.2. Les critères de choix de notre matériel végétal

Les critères de choix de *Centaurea involucrata* Desf., reposent essentiellement sur :

- Les espèces de ce genre sont connues par leur richesse et leur diversité en métabolites secondaires de types flavoniques et lactones sesquiterpéniques, elles sont réputées par plusieurs activités biologiques (Negrete et al., 1987 ; Erel et al., 2011 ; Kolli et al., 2012).
- L'endémisme de cette espèce pour l'Algérie et le Maroc.
- Que la plante n'a fait objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant.

## II.3. Place dans la systématique botanique

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Ordre :** Astérales

**Famille :** Asteraceae

**Sous-famille :** Tubiflores

**Tribus :** Cynarées

**Genre :** *Centaurea*

**Espèce :** *Centaurea involucrata* Desf.

## II.4. Description botanique

C'est une plante annuelle, grêle, souvent étalée sur le sol. Corolles jaune d'or. Capitules assez petits (2-3 cm de diam.). Bractées à appendice comportant 5-7 lanières très longues. Akènes à

hile lobé à lobes égaux (cruciforme) et à aigrette égalant environ le tiers du corps de l'akène. (Quezel. P and Santa. S, 1963).



**Figure II.1** : l'espèce *Centaurea involucrata* Desf. (CIN/05/2015)

## **II.5. Protocole expérimental**

### **II.5.1. Récolte du matériel végétal**

Le matériel végétal a été récoltés dans sa période de la floraison durant le mois de mai 2015 de la région de M'Sila. La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par le Dr. Sarri Djamel du Département de biologie, Université de M'Sila. Un spécimen CIN/05/2015 a été déposé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université des Frères Mentouri, Constantine dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires.

### **II.5.2. Screening phytochimique**

C'est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et / ou de colorations. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de métabolites secondaires tels que les saponines, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les anthocyanes et les tannins dans les différents organes (feuilles, fleurs, tiges et racines) de la plante.

#### **II.5.2.1. Mise en évidence des saponines**

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été infusée dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, la solution obtenue après filtration est agitée pendant quelques minutes (Lokadi, 2008).

➤ **Caractérisation** : L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines

### II.5.2.2. Mise en évidence des anthocyanes

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été macérée dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 mn. Après Filtration, le filtrat est complété avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml puis additionné avec de 5 ml d'acide sulfurique dilué à 10 % et 5 ml d'ammoniaque à 10 % (**Dohou et al., 2003**).

➤ **Caractérisation** : La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

### II.5.2.3. Mise en évidence des alcaloïdes

Une quantité de 5 g de la poudre végétale a été dissous dans 25 ml d'acide sulfurique dilué à 10 % dans un Erlen Meyer, laisser macérer pendant 24 heures puis filtrer et laver à l'eau distillée de manière à obtenir 25 ml du filtrat (**Hladik et al., 2000**). Le test est réalisé par l'introduction de 1ml du filtrat dans un tube à essai et l'ajout de 3 gouttes du réactif de Dragendorff.

#### ➤ **Caractérisation**

Réaction de précipitation : la présence d'alcaloïdes est caractérisée par l'apparition d'un précipité.

### II.5.2.4. Mise en évidence des triterpènes, stérols et terpènes

La matière végétale (5g) a été macérée dans 50 ml de solution d'un mélange méthanol/eau distillée (v/v ; 80:20) pendant 24 heures puis filtrée et évaporée à sec. L'ajout de 20 ml de l'éther diéthylique après refroidissement est nécessaire pour dissoudre les composés apolaires.

#### ❖ **Identification des terpènes et stérols**

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

- La première partie : utiliser comme témoin
- La deuxième partie : à cette solution on a rajouté 3 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré (**Bekro et al., 2007**).

➤ **Caractérisation** : un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés. Si la couleur devenaient vert foncé ceci indique la présence des terpènes.

- La troisième partie : à cette partie on rajoute quelques gouttes d'acide sulfurique

➤ **Caractérisation** : L'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des stérols insaturés.

### ❖ Identification des triterpènes

Un volume de 10 ml d'extrait hydro-alcoolique est évaporé à sec, le résidu obtenu est dissous dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme. La solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec avec une pipette pasteur, on rajoute (1 à 2 ml) d'acide sulfurique concentré au fond du tube (Mibindzou, 2004).

➤ **Caractérisation** : Au contact des deux phases organiques la formation d'un anneau marron montre la présence des triterpènes.

#### II.5.2.5. Mise en évidence des flavonoïdes et des leuco anthocyanes

Infuser 5g de matière végétale dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, après filtration, prendre 3 tubes et introduire dans chaque tube 2ml du filtrat, puis on ajout dans chaque tube le suivant :

**1<sup>er</sup> tube** : 1ml de NaOH.

**2<sup>ème</sup> tube** : 1ml d'eau distillée.

**3<sup>ème</sup> tube** : 1ml de HCl concentré et des copeaux de magnésium (Bouquet, 1992).

➤ **Caractérisation** : En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune rougeâtre, rouge à rouge violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.

La coloration rouge au 3<sup>ème</sup> tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

#### II.5.2.6. Mise en évidence des tanins

Une masse de 5 g de matière végétale a été infusée dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes.

##### ❖ Tanins catéchiques

Un volume de 2 ml de l'infusé a été placé dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 % (Kongo-Nzuzi, 2009).

➤ **Caractérisation** : L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques.

##### ❖ Tanins galliques

Prélever 2 ml de l'infusé précédent et le mettre dans un tube à essai, saturé en acétate de sodium, puis rajouter quelques gouttes de chlorure ferrique à 1% (Mibindzou, 2004).

➤ **Caractérisation** : La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

**II.5.3. Extraction**

Après séchages dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes de la plante sont pesées (882g) et mises à macérer séparément pendant 3 jours à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/ eau) avec les proportions (80/20: V/V). La macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après concentration à une température n'excédant pas 38°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier a été dilué avec l'eau distillée (400 mL d'eau distillée pour 1kg de matière végétale). La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par l'éther de pétrole, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle, et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées sont séchées par le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre pour éliminer toute trace d'eau, ensuite filtrées, et enfin concentrées sous pression réduite à sec et pesées.

Le processus de l'extraction est résumé dans la figure II.2. et Le tableau II.1 reporte les rendements de la macération de la plante.

**Tableau II.1** : Rendements de l'extraction des différents extraits de *C. involucrata* Desf.

<b>Matériel végétal</b>	<b>Extraits</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>882g</b>	Ether de pétrole	0,5	0,0 57
	Chloroforme	3	0 ,340
	Acétate d'éthyle	8,17	0,926
	<i>n</i> -butanol	21,4	2,426

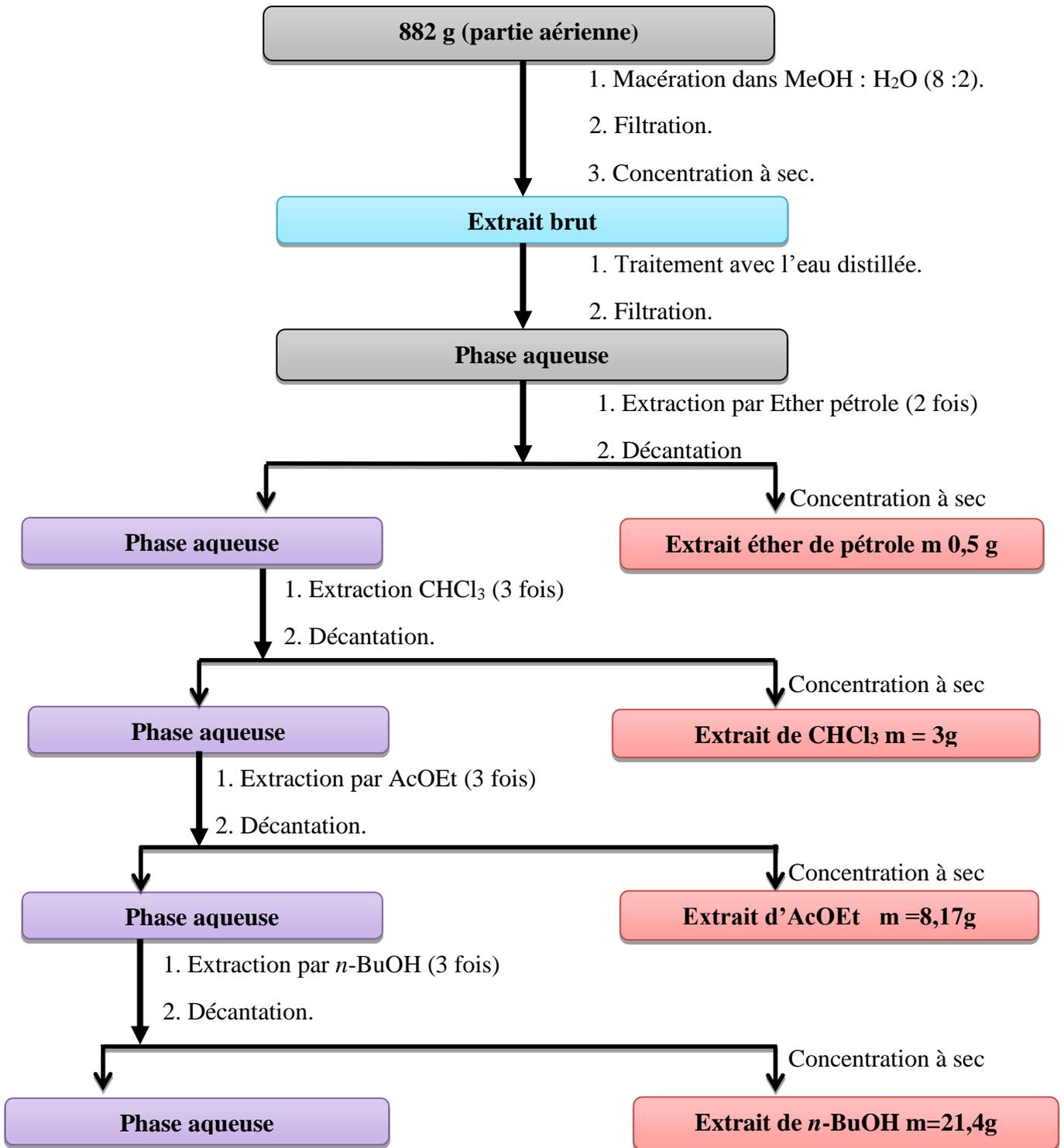


Figure II.2 : Protocole de l'extraction de *C. involucrata* Desf.

#### II.5.4. Analyse de l'extrait d'éther de pétrole par GC/MS

L'extrait éther de pétrole de *C. involucrata* a subi une analyse par GC/MS dans le but de déterminer sa composition chimique. L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace 1310 équipé d'un spectromètre de masse à un seul quadripôle ISQ (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX). La programmation de la température consiste en une élévation de 60 °C (6 min) à 230 °C à 4°C/min, puis en palier de 15 min à 230 °C. La température de la source d'ions et du détecteur était de 250 °C et 260 °C, respectivement.

1 mL d'échantillon a été dissous dans 5 mL de CHCl<sub>3</sub> à 100% et filtré à travers un filtre seringue jetable de 0,22 µm. Un volume de 1 µL a été injecté en mode split. La séparation de l'échantillon a été réalisée sur une colonne GC Thermo TG-WAXMS (60 mx 0,25 mm DI x 0,25 µm) en utilisant de l'hélium comme gaz porteur à 1,2 mL / min. La plage de balayage du spectre de masse a été fixée à un taux de 55–550 (uma). L'identification des pics a été réalisée par comparaison des composants connus stockés dans le NIST Demo, Wiley7, Wiley9, redlip, mainlip, WinRI.

#### II.5.5. Analyse quantitative des extraits

L'identification ainsi que la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans les extraits : chloroforme et *n*-butanol ont été réalisées grâce à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC/DAD), alors que l'extrait acétate d'éthyle a été analysé par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en mode tandem.

##### II.1.5.1. Préparation des échantillons et mode opératoire de l'HPLC/DAD

10 mg de chaque extrait (chloroforme et *n*-butanol) ont été dissous dans le méthanol puis filtrés à travers un filtre seringue à membrane en nylon de 0,45 µm et placés dans les flacons de 2 mL.

L'analyse a été réalisée par une chromatographie liquide haute performance Infinity (Agilent 1260 Infinity II LC) couplée à un détecteur DAD. La HPLC en phase inversée était équipée d'un four à colonne (1260 TCC), de pompes binaires (1260 Bin Pump) et d'un dégazeur (1260 dégazeur). Les conditions chromatographiques ont été optimisées afin d'obtenir une séparation optimale du composé et de surmonter les effets de suppression. Ainsi, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique Agilent Poroshell 120 EC-C18 à phase inversée (150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). La température de la colonne a été réglée à 25 °C. Le gradient d'élution était composé d'éluant : A (acide phosphorique 0,1% dans l'eau) et éluant

B acétonitrile), le débit de solvant et le volume d'injection ajustés à 0,8 mL / min et 20 µL. Le profil d'élution de gradient suivant a été utilisé: 17% B (0 à 2 min), 30% B (2 à 4 min), 40% B (4 à 10 min) et 17% B (10 à 15 min). La détection par barrette de diodes a été réglée pour collecter des données dans la plage de 300/200 nm (Turkan *et al.*, 2020).

### **II.1.5.2. Préparation de l'échantillon et mode opératoire de LC-MS/MS**

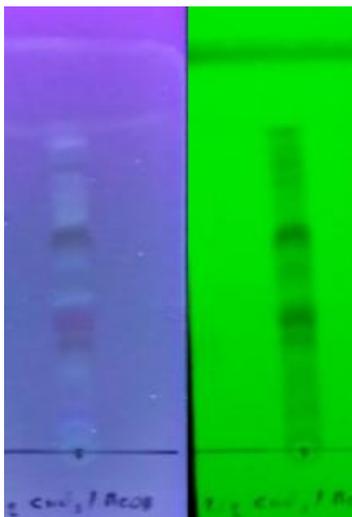
L'extrait acétate d'éthyle a été dissous dans le méthanol à une concentration de 1 g / L et filtré par un microfiltre (0,2 µm) spécial pour l'analyse LC-MS / MS dans un flacon de 2 mL de volume.

La chromatographie liquide ultra-haute performance (HPLC) modèle Shimadzu-Nexera couplée à un spectromètre de masse en tandem a été utilisée pour effectuer une évaluation quantitative de 53 composés phytochimiques. En effet, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique modèle Agilent Poroshell 120 RP-C18 en phase inversée (150 mm x 2,1 mm, 2,7 µm). La température de la colonne a été réglée à 40 ° C. Le gradient d'élution était composé d'éluant A (eau + formate d'ammonium 5 mM + acide formique 0,1%) et d'éluant B (méthanol + formiate d'ammonium 5 mM + acide formique 0,1%). Le profil d'élution du gradient suivant a été utilisé : 20 à 100% de B (0 à 25 min), 100% de B (25 à 35 min), 20% de B (35 à 45 min). De plus, le débit de solvant et le volume d'injection ont été réglés à 0,5 mL / min et 5 µL, respectivement.

La détection par spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem modèle Shimadzu LCMS-8040 équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) fonctionnant en modes d'ionisation négative et positive. Les conditions de fonctionnement MS ont été appliquées comme suit : débit de gaz de séchage (N<sub>2</sub>), 15 L / min ; débit de gaz de nébulisation (N<sub>2</sub>), 3 L / min ; Température DL, 250 ° C ; température du bloc chauffant, 400 ° C, et température de l'interface, 350 ° C (Yilmaz, 2020).

### **II.5.6. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle**

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH dans les proportions (4:1).



**Figure II.3** : Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. involucrata*

#### II.5.6.1. Séparation chromatographique sur colonne

Une masse d'environ 7 g d'extrait d'acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisée par du  $\text{CHCl}_3$  avec un gradient de  $\text{CH}_3\text{OH}$  en commençant par le chloroforme pur et avec un fractionnement tous les 100 mL. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière de (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant trois minutes à  $100^\circ\text{C}$ . Les pots présentant le même profil chromatographique sont réunis donnant ainsi 34 fractions. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II.2 suivant :

**Tableau II.2.** Résultats de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice

Nom de la fraction	Regroupement	système		Masse (mg)	Observation
		CHCl <sub>3</sub>	MeOH		
F1	1-5	100	0	4,3	Ss forme des traces
F2	6-7	100	0	5,8	Ss forme des traces
F3	8-11	100	0	10,4	Mélange + précipité
F4	12-15	100	0	5,2	Ss forme huileux
F5	16-20	100	0	23,3	Mélange complexe
F6	21-25	100	0	20,9	Mélange séparable
F7	26-30	100	0	21,3	Mélange complexe
F8	31-37	99	1	15,6	Mélange séparable
F9	38-57	99	1	139,2	Mélange séparable
F10	58-66	97	3	114,3	Mélange séparable
F11	67-72	97	3	113,8	Mélange séparable
F12	73-84	95	5	108,8	Mélange séparable
F13	85-92	95	5	192,6	Mélange séparable
F14	93-100	95	5	255,6	Mélange + précipité
F15	101-108	92	8	107,8	Mélange + précipité
F16	109-116	92	8	904,5	Mélange + précipité
F17	117-121	92	8	271,9	Mélange complexe
F18	122-131	90	10	224,1	Mélange complexe
F19	132-140	90	10	194,4	Mélange complexe
F20	141-150	90	10	186,8	Mélange séparable
F21	151-156	85	15	145	Mélange séparable
F22	157-160	85	15	100,3	Mélange séparable
F23	161-171	85	15	205,8	Mélange complexe
F24	172-177	85	15	75,9	Mélange complexe
F25	178-183	85	15	58,7	Mélange complexe
F26	184-190	80	20	88,2	Mélange complexe
F27	191-208	80	20	294,1	Mélange complexe
F28	209-224	80	20	126,1	Mélange complexe
F29	225-236	75	25	78,4	Mélange complexe
F30	237-252	70	30	148,2	Mélange complexe
F31	253-264	60	40	113,7	Mélange complexe
F32	265-272	50	50	43,9	Mélange complexe
F33	273-280	40	60	45,1	Mélange complexe
F34	281-297	0	100	126	Mélange complexe

**II.5.6.2. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle**

Parmi les 34 fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des fractions F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>9</sub>, F<sub>10</sub>, F<sub>11</sub>, F<sub>12</sub>, F<sub>13</sub>, F<sub>14</sub>, F<sub>15</sub>, F<sub>16</sub>, F<sub>20</sub> et F<sub>22</sub> à de leur poids relativement important, en addition leur profile chromatographique a montré la simplicité de leur composition et la présence de composés majoritaires.

**➤ Etude de la fraction F<sub>3</sub>**

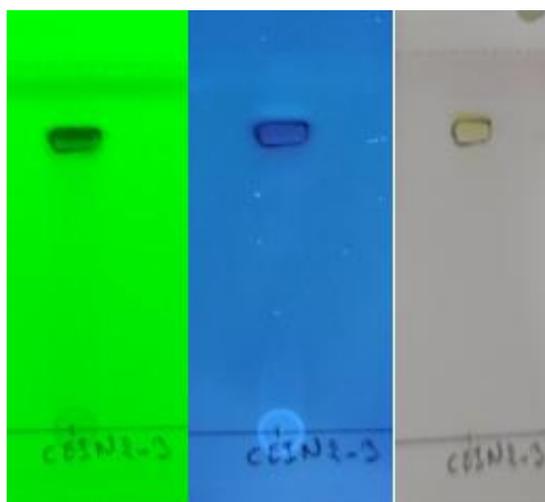
La fraction F<sub>3</sub> renferme un précipité blanc soluble dans le méthanol. Sa purification a été faite par un lavage avec un mélange des solvants dichlorométhane- acétone pour donner le produit CEIN-1 de masse 1,0 mg.

**➤ Etude de la fraction F<sub>4</sub>**

La fraction F<sub>4</sub> de masse 5,2 mg a été obtenue sous forme d'une phase huileuse et a subi une analyse par GC/MS selon la méthode décrite précédemment et qui a été utilisée pour l'analyse de la phase éther de pétrole.

**➤ Etude de la fraction F<sub>9</sub>**

La fraction F<sub>9</sub> a été traitée sur des plaques préparatives de gel de silice HF254 éluée avec le système ether diéthylique 100%, qui après une purification sur une colonne de séphadex LH20 nous a conduit au produit nommé CEIN-2 (1,2 mg) de coloration noir violet sous la lampe UV ( $\lambda = 365$  et 254 nm) et jaune après révélation par l'anisaldéhyde.



**Figure II.4 :** Le composé CEIN-2 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation

➤ **Etude de la fraction F<sub>10</sub>**

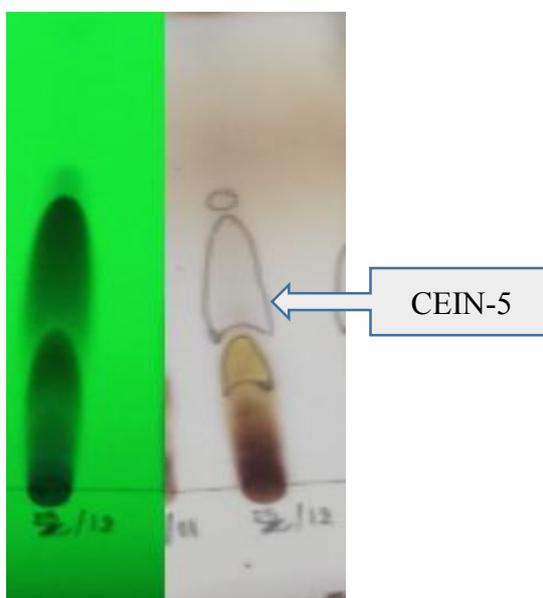
Une partie de la fraction F<sub>10</sub> (20mg) a été purifiée sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) dans le système de solvant CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9/1), pour donner le composé CEIN-3 (0,8mg).

➤ **Etude de la fraction F<sub>11</sub>**

Une quantité de 25 mg de la fraction F<sub>11</sub> a été séparé sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) avec le même système d'élution que la fraction F<sub>10</sub> CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9/1) Cette séparation a permis d'isoler un produit à l'état pur, de masse 0,5 mg que nous noterons CEIN-4.

➤ **Etude de la fraction F<sub>12</sub>**

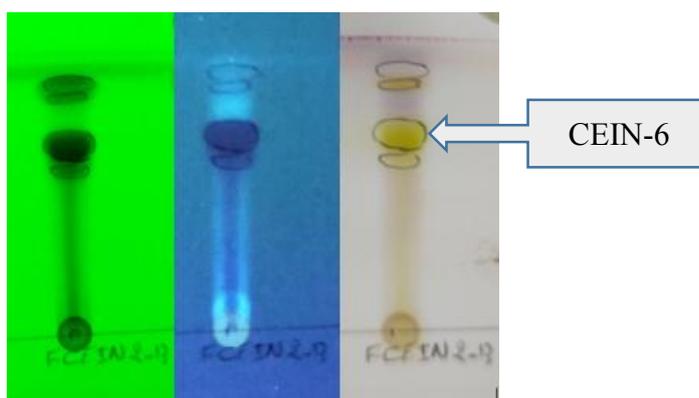
L'analyse de cette fraction sur plaque analytique de gel de silice, montre deux taches intenses et majoritaires après élution. Une partie de la fraction (20mg) a été séparé sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) de format 20 cm x 20 cm éluee dans le système hexane/AcOEt (1/1) cette opération a permis l'obtention d'un produit pur CEIN-5 (2,9mg).



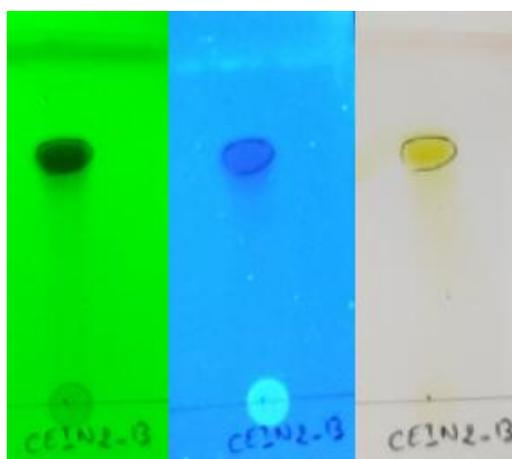
**Figure II.5** : Le composé CEIN-5 sous lampe UV (254nm) et après révélation

➤ **Etude de la fraction F<sub>13</sub>**

Une partie de la fraction F<sub>13</sub> (22mg) a été traitée par une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0,2 mm). Eluées avec le système éther diéthylique 100%) et visionnées par la lumière de Wood, ces plaques montrent des tâches. Nous nous sommes intéressées à la tâche la plus intense qui admettent une fluorescence noire-violette (UV  $\lambda = 365$  nm et  $\lambda = 254$ nm) et jaune après révélation. Cette bande représente le produit CEIN-6 (3 mg).



**Figure II.6 :** Représentation de la fraction F<sub>13</sub> sous UV et après révélation



**Figure II.7 :** Le composé CEIN-6 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation

➤ **Etude de la fraction F<sub>14</sub>**

Nous avons observé la formation d'un précipité dans la fraction F<sub>14</sub>. Après filtration de cette fraction, le précipité obtenu est dissous dans le MeOH, puis testé sur une plaque analytique de gel de silice, éluée par le système : chloroforme : méthanol (3: 1). Le test donne une seule tache noire sous lumière UV à 254 nm et après révélation avec l'acide sulfurique qui est nommé

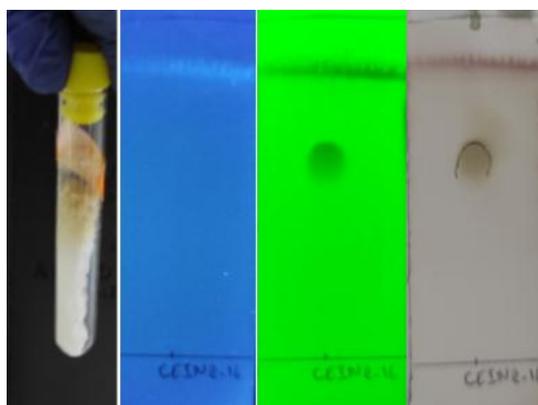
CEIN-7 (1,7mg). Le filtrat de cette fraction a été chromatographié sur des plaques préparatives de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0,2 mm) éluées avec le mélange AcOEt/ 2-propanol/ H<sub>2</sub>O (10 :1.7 :1.3) pour donner deux produits purs, dont un est identique au CEIN-7 (1 mg), le second est nommé CEIN-8 (1,2 mg).

➤ **Etude de la fraction F<sub>15</sub>**

Cette fraction contient un produit majoritaire sous forme de précipité. Après lavage plusieurs fois avec le méthanol et chloroforme, le précipité blanc ainsi obtenu (qui est soluble dans le MeOH) a été testé sur plaque analytique de gel de silice éluée par le système (CH<sub>3</sub>Cl , MeOH) dans les proportions (4:1), ce précipité donne un spot unique de fluorescence noir sous la lampe UV à  $\lambda = 254$  nm et après révélation avec l'anisaldéhyde . Ce produit est identique au précédent CEIN-7 et a une masse de 1,1 mg.

➤ **Etude de la fraction F<sub>16</sub>**

La recristallisation de la fraction F<sub>16</sub> (904 mg) dans un mélange dichlorométhane/acétone, permis d'isoler un produit sous forme de cristaux (aiguilles blanches). Après plusieurs lavages avec le dichlorométhane, un produit pur (400 mg) a été obtenu, on le notera CEIN-9.



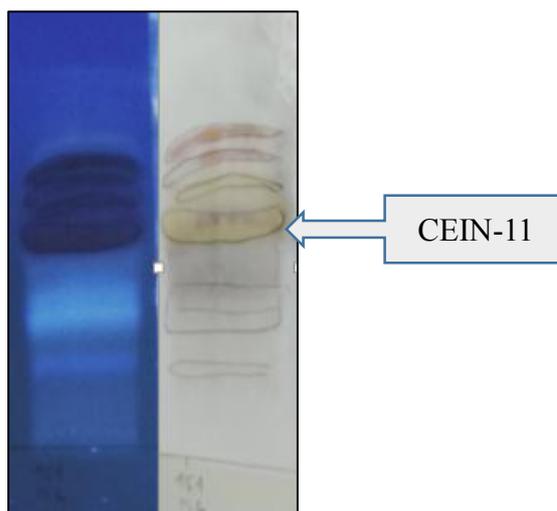
**Figure II.8 :** Le précipité CEIN-9 sous lampe UV (365 et 254nm) et après révélation

➤ **Etude de la fraction F<sub>20</sub>**

Une masse de 20 mg de la fraction F<sub>20</sub> a subi une séparation par chromatographie sur couche mince en utilisant comme système d'éluion CHCl<sub>3</sub>/MeOH/eau (4/0,5/0,5) pour donner un produit contient des impuretés. Ce dernier a été purifié sur colonne de Sephadex LH-20 élué par le méthanol distillé pour donner le composé CEIN-10 (0,5 mg) à l'état pur.

➤ **Etude de la fraction F<sub>22</sub>**

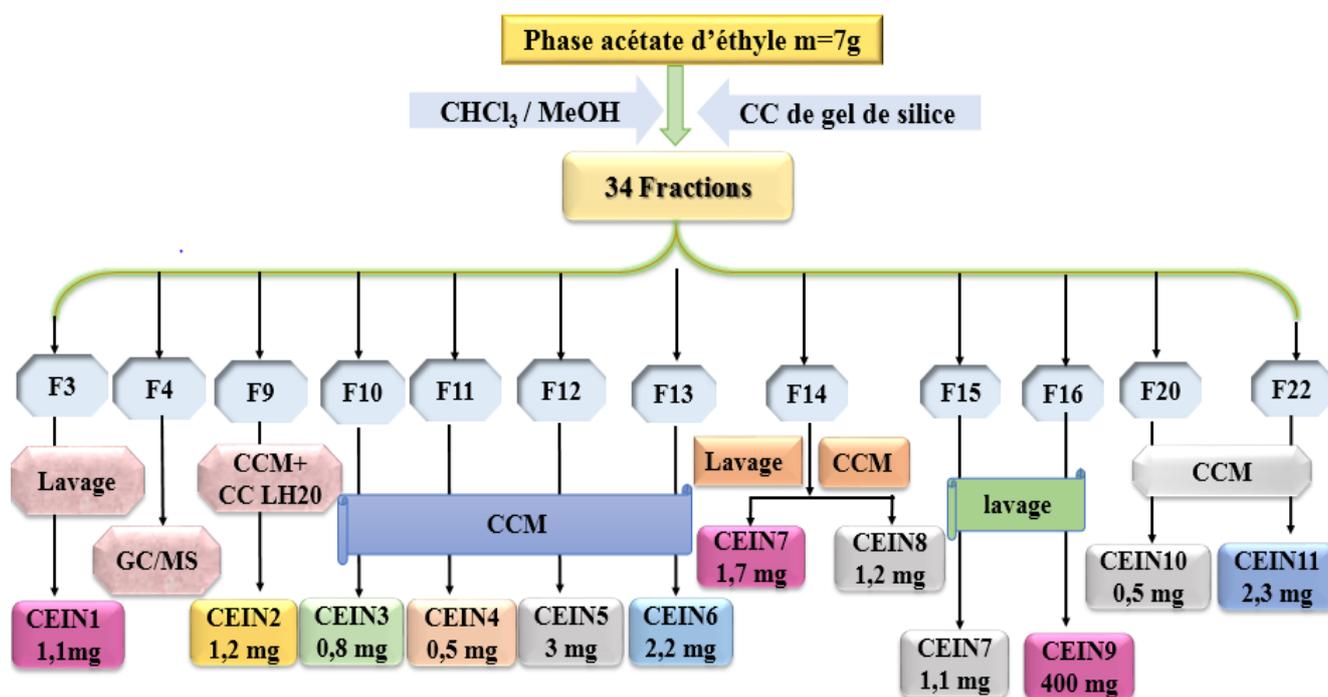
Une partie de la fraction F<sub>22</sub> (30 mg) a été traitée par une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0,2 mm). Eluées avec le système AcOEt/MeOH/eau (8/1,5/0,5) et visionnées par la lumière de Wood, ces plaques montrent des taches. Nous nous sommes intéressées à la bande la plus intense qui a une fluorescence noire-violette (UV  $\lambda = 365$  nm et  $\lambda = 254$  nm) et jaune après révélation. Cette bande représente le produit CEIN-11 (2,3 mg).



**Figure II.9 :** Le composé CEIN-11 sous lampe UV (365nm) et après révélation

## Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *C. involucrata* a mené à la séparation et la purification de 11 produits à l'état natif. La figure II.10 récapitule les étapes de séparation. 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 III.



**Figure II.10 :** Récapitulatif des étapes de séparation et des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle de *C. involucrata*

# *Chapitre III*

**Etude phytochimique**

**Résultats et discussions**

### III.1. Introduction

Ce chapitre renferme la discussion des résultats des travaux phytochimiques effectués sur l'espèce : *Centaurea involucrata* Desf.

### III.2. Le screening phytochimique

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

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

Le tableau III.1 rassemble les résultats du screening sur les différents organes de *Centaurea involucrata*.

**Tableau III.1.** Résultats du screening phytochimique de *C. involucrata*

Groupe chimique	feuilles	fleurs	tiges	racines
Saponines	+	+	+	+
Anthocyanes	-	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-
terpènes	+	+	+	+
Stérols insaturés	+	+	-	-
Triterpènes	+	+	-	-
Flavonoïdes	++	++	++	++
leuco anthocyanes	++	++	++	++
Tanins				
➤ Catéchiques	+	+	+	+
➤ Galliques	-	-	-	-

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des quatre organes végétaux (feuilles, fleurs, tiges et racines) a permis de tirer les conclusions suivantes :

- ❖ la présence importante des flavonoïdes et leuco anthocyanes
- ❖ Une présence modérée des terpènes, tanins catéchiques et saponines.
- ❖ Les stérols insaturés et les triterpènes sont présentes en quantité modérée dans les feuilles et les fleurs alors que dans les tiges et les racines sont totalement absents.
- ❖ L'absence totale des alcaloïdes, tanins galliques et des anthocyanes.

Ces résultats restent très préliminaires et nécessitent d'autres travaux afin d'isoler et d'identifier des molécules bioactives.

### III.3. Résultat de l'analyse par GC/MS

L'analyse GC-MS de l'extrait d'éther de pétrole a montré la présence d'une riche variété de composés phytochimiques. Les principes actifs avec leurs temps de rétention (Tr), formule moléculaire, concentration (% de la surface du pic) sont présentés dans le tableau III.2.

Parmi les 13 phytoconstituants identifiés, le hentriacontane et l'acide hexadécanoïque, méthylester sont les composés majoritaires avec une concentration de 64,67% et 8,84% respectivement. De nombreux constituants mineurs ont également été identifiés tels que : acide décanedioïque, dibutylester (2,75%), méthyl-9,9,10,10-d4-octadécanoate (2,33%), 4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone (2,12%), glucosamine, N-acétyl-N-benzoyl (1,69%), 15,15' Bi-(1,4,7,10,13)-pentaocyclohexadecane (1,66%), 6,10,14-Triméthyl pentadécane-2-one (1,47%), L'éther monododécylique d'octaéthylène glycol (1,37%), acide nonanedioïque, diméthylester (1,20%), 2,2,3,3,4,4-hexadéutéro octadécanal (1,17%).

La plupart des composés identifiés possèdent des activités biologiques intéressantes (tableau III.2). Le 6,10,14-Triméthyl pentadécane-2-one, l'acide nonanedioïque, le diméthylester et l'acide hexadécanoïque ont des propriétés antibactériennes (**Nurettin *et al.*, 2006 ; Charnock *et al.*, 2004 et Mujeeb *et al.*, 2014**). Tandis que l'acide-12-méthyl tridécanoïque, méthylester a à la fois des propriétés antibactériennes et antifongiques (**Chandrasekaran *et al.*, 2011**). Le composé 2,2,3,3,4,4 hexadéutéro octadécanal a une activité anticancéreuse (**Gomathi *et al.*, 2015**). L'acide hexadécanoïque, méthylester possède plusieurs activités biologiques (antifongique, antioxydant, nématocide hypocholestérolémique, pesticide, arôme anti-androgène, hémolytique, inhibiteur de la 5-alpha réductase, activité antimicrobienne puissante (**Hema *et al.*, 2011**)). Le composé majoritaire Hentriacontane a le rôle d'antifongique contre la germination des spores fongiques, antioxydant, activité antitumorale et antibactérien (**Atolani *et al.*, 2009**). En fin, le produit acide décanedioïque, dibutylester révèle des effets antimicrobiens, antispasmodiques et anti inflammatoires. Le résultat de cette étude montre que cette plante peut être utilisée comme une nouvelle source potentielle en médecine traditionnelle

**Tableau III.2** : Phytocomposants de l'extrait éther de pétrole de *C. involucrata* identifié par l'analyse GC-MS

N°	Tr	Nom de composé	Prob	Formule	%	Bioactivité signalée
1	22,96	4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone	83,46	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2,12	Aucune activité signalée.
2	40,72	2,2,3,3,4,4-hexadeutéro octadécanal	20,23	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> D <sub>6</sub> O	1,17	activité anticancéreuse ( <b>Gomathi et al., 2015</b> )
3	41,91	Acide-12-méthyl tridécanoïque, méthyl ester	17,74	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0,64	antibactériennes et antifongiques ( <b>Chandrasekaran et al., 2011</b> )
4	44,78	6,10,14-Triméthyl pentadécan-2-one (CAS)	34,82	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	1,47	Activité antibactérienne contre les bactéries Gram + ve et Gram-ve ( <b>Nurettin et al., 2006</b> )
5	45,15	Acide nonanedioïque, diméthyl ester	45,55	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	1,20	Activité antibactérienne ( <b>Charnock et al., 2004</b> )
6	45,73	Acide pentadécanoïque (CAS)	18,16	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0,82	Activité antibactérienne ( <b>Mujeeb et al., 2014</b> )
7	46,87	Acide hexadécanoïque, méthyl ester	29,70	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	8,84	Antifongique, antioxydant, nématocide hypocholestérolémique, pesticide, arôme anti-androgène, hémolytique, inhibiteur de la 5-alpha réductase, activité antimicrobienne puissante ( <b>Hema et al., 2011</b> )
8	50,41	Hentriacontane (CAS)	7,24	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	64,67	Antifongique contre la germination des spores fongiques, antioxydant, activité antitumorale et antibactérien ( <b>Atolani et al., 2009</b> )
9	51,74	Méthyl-9,9,10,10-d4-octadécanoate	36,35	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> D <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2,33	Aucune activité signalée.
10	52,68	Glucosamine, N-acetyl-N-benzoyl-	43,16	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>7</sub>	1,69	Aucune activité signalée.
11	53,41	L'éther monododécylique d'octaéthylène glycol	39,43	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>	1,37	Aucune activité signalée.
12	55,46	15,15'-Bi-1,4,7,10,13-pentaoxa cyclohexadécane	29,27	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	1,66	Aucune activité signalée.
13	60,51	Acide décanedioïque, dibutyl ester (CAS)	58,40	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	2,75	effets antimicrobiens, antispasmodiques et anti-inflammatoires ( <b>Nebras et al., 2016</b> )

### III.4. Résultat de l'analyse quantitative des différents extraits

#### III.4.1. L'analyse par HPLC/DAD

Les deux extraits chloroforme et *n*-butanol ont été analysés par la chromatographie liquide à haute performance couplé à un détecteur à barrette de diode (HPLC/DAD).

Le tableau III.3 montre les quantités d'acides phénoliques et de flavonoïdes présents dans les extraits. Leur identification a été effectuée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des différents standards. Cette analyse a permis la détection et la quantification de huit (8) composés phénoliques pour l'extrait *n*-butanol et cinq (5) pour l'extrait chloroforme.

**Tableau III.3 :** Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits chloroforme et *n*-Butanol de l'espèce *C. involucrata* par HPLC /DAD

Les composés phénoliques	Tr (min)	Contents (mg/g extrait)	
		chloroforme	<i>n</i> -butanol
Acide gallique	2,41	4,797	66,068
Acide chlorogénique	3,873	-	0,385
Catéchine	4,273	-	0,224
Acide caféique	5,462	-	-
Acide vanillique	5,926	0,190	6,567
Rutine	9,907	1,179	24,412
Acide para-coumarique	10,380	0,247	0,929
Trans- acide férulique	11,842	-	-
Acide- <i>O</i> - coumarique	21,149	-	0,999
Quercétine	35,960	1,416	0,142

Les acides phénoliques ont été identifiés comme étant l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique, l'acide trans-férulique et l'acide *O*-coumarique. Alors que, les flavonoïdes sont la catéchine, la rutine et la quercétine (tableau 3) Les résultats reportés dans le tableau III.3, permettent de tirer les constatations suivantes :

- l'extrait *n*-BuOH est caractérisé par la présence de l'acide gallique, la rutine et l'acide vanillique avec des concentrations plus élevées (66,068 ; 24,012 et 6,567 mg/g extrait), respectivement.

- l'acide gallique, la quercétine et la rutine sont les plus présents dans l'extrait chloroforme avec des concentrations respectives de 4,797 ; 1,416 et 1,179 mg/g extrait.
- L'absence totale de l'acide caféique et l'acide trans-férulique dans les deux extraits, et la présence des acides *O*-coumarique et chlorogénique et le flavonoïde catéchine uniquement dans l'extrait *n*-butanol en faibles quantités.

### III.4.2. L'analyse par LC-MS/MS

Le criblage phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle par LC-MS / MS a révélé la présence de 26 composés phénoliques (tableau III.4), dont les acides protocatéchique, 4-hydroxybenzoïque, gentisique et chlorogénique sont les plus présents avec des concentrations (6,435 ; 4,181 ; 1,927 et 1,021 mg/g extrait respectivement), les autres acides phénoliques et les flavonoïdes ont été identifiés en faibles quantités.

**Tableau III.4 :** Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. involucrata* par LC-MS/MS

N°	Les composés phénoliques	Tr (min)	I.M. (m/z)	F.I. (m/z)	Mode d'ionisation	Contents (mg/g extrait)
1	Acide quinique	3,0	190,8	93,0	Nef	0,311
2	Acide fumarique	3,9	115,2	40,9	Neg	N.D
3	Acide aconitique	4,0	172,8	129,0	Neg	N.D
4	Acide gallique	4,4	168,8	79,0	Neg	0,069
5	Epigallocatechine	6,7	304,8	219,0	Neg	N.D
6	Acide protocatéchique	6,8	152,8	108,0	Neg	6,435
7	Catéchine	7,4	288,8	203,1	Neg	N.D
8	Acide gentisique	8,1	152,8	109,0	Neg	1,927
9	Acide chlorogénique	8,4	353,0	85,0	Neg	1,021
10	Aldéhyde protocatéchique	8,5	137,2	92,0	Neg	N.D
11	Acide tannique	9,2	182,8	78,0	Neg	0,661
12	Epigallocatechine gallate	9,4	457,0	305,1	Neg	N.D
13	1,5-dicaffeoylquinic acid	9,8	515,0	191,0	Neg	N.D
14	Acide-4-hydroxybenzoïque	10,5	137,2	65,0	Neg	4,181
15	Epicatéchine	11,6	289,0	203,0	Neg	N.D
16	Acide vanillique	11,8	166,8	108,0	Neg	N.D
17	Acide caféique	12,1	179,0	134,0	Neg	0,860
18	Acide syringique	12,6	196,8	166,9	Neg	N.D
19	Vanilline	13,9	153,1	125,0	Pos	0,038

**Tableau III.4 :** Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans l'extrait AcOEt de l'espèce *C. involucrata* par LC-MS/MS (suite)

N°	Les composés phénoliques	TR (min)	I.M (m/z)	F.I. (m/z)	Mode d'ionisation	Contents (mg/g extrait)
20	Syringaldéhyde	14,6	181,0	151,1	Neg	N.D
21	Daidzine	15,2	417,1	199,0	Pos	N.D
22	Gallate d'épicatéchine	15,5	441,0	289,0	Neg	N.D
23	Piceid	17,2	391,0	135/106,9	Pos	N.D
24	Acide paracoumarique	17,8	163,0	93,0	Neg	0,765
25	Acide férulique	18,8	192,8	149,0	Neg	0,168
26	Acide sinapique	18,9	222,8	193,0	Neg	N.D
27	Coumarine	29,9	146,9	103,1	Pos	N.D.
28	Acide salicylique	21,8	137,2	65,0	Neg	0,359
29	Cynaroside	23,7	447,0	284,0	Neg	0,424
30	Miquélianine	24,1	477,0	150,9	Neg	N.D
31	Rutine	25,5	608,9	301,0	Neg	N.D
32	Isoquercitrine	25,6	463,0	271,0	Neg	0,193
33	Hespéridine	25,8	611,2	449,0	Pos	N.D
34	Acide orthocoumarique	26,1	162,8	93,0	Neg	N.D
35	Génistine	26,3	431,0	239,0	Neg	N.D
36	Acide rosmarinique	26,6	359,0	197,0	Neg	N.D
37	Acide ellagique	27,6	301,0	284,0	Neg	N.D
38	Cosmosiine	28,2	431,0	269,0	Neg	0,511
39	Quercitrine	29,8	447,0	301,0	Neg	0,037
40	Astragaline	30,4	447,0	255,0	Neg	0,084
41	Nicotiflorine	30,6	592,9	255,0/284,0	Neg	0,015
42	Fiséatine	30,6	285,0	163,0	Neg	N.D
43	Daidzéine	34,0	253,0	223,0	Neg	0,025
44	Quercétine	35,7	301,0	272,9	Neg	0,103
45	Naringinine	35,9	270,9	119,0	Neg	0,009
46	Hespéretine	36,7	301,0	136,0/286,0	Neg	N.D
47	Lutéoline	36,7	284,8	151,0/175,0	Neg	0,581
48	Génistéine	36,9	269,0	135,0	Neg	0,028
49	Kaempféro	37,9	285,0	239,0	Neg	0,009
50	Apigénine	38,2	268,8	151,0/149,0	Neg	0,302
51	Amentoflavone	39,7	537,0	417,0	Neg	N.D
52	Chryisine	40,5	252,8	145,0/119,0	Neg	0,002
53	Acacétine	40,7	283,0	239,0	Neg	N.D

N.D : non détecté ; I.M (m/z) : Ions moléculaires des standards ; F.I. (m/z) : fragments d'ions

Neg : mode d'ionisation négatif ; Pos : mode d'ionisation positif

Par ailleurs, tous ces composés soit en faible ou en grande quantité possèdent des propriétés biologiques intéressantes. Par exemple, l'acide 4-hydroxy benzoïque a des activités antibactériennes, antifongiques, antialgales, antimutagènes, antisickling et œstrogéniques (Iswandana *et al.*, 2016), l'acide chlorogénique possède des propriétés anti-mutagènes et cancérigènes (Mennen *et al.*, 2005), l'acide protocatéchique qui est bien connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-hyperglycémiant, antibactériennes, anticancéreuses, anti-âge, anti-athrogéniques, anti-tumorales, anti-asthme, anti-ulcéreuses, antispasmodiques et neurologiques (Khan *et al.*, 2015). L'acide gentsique possède des activités anti-inflammatoires, antigénotoxiques, hépatoprotectrices, neuroprotectrices, antimicrobiennes et surtout antioxydantes (Abedi *et al.*, 2019). Tandis que les flavonoïdes tels que lutéoline et d'autres sont bien connus pour avoir des activités spéciales telles que l'antioxydant (Yamada *et al.*, 1996), la protection cardiovasculaire et les effets antitumoraux (Chiang *et al.*, 2003).

Ces résultats peuvent également être considérés comme un soutien scientifique pour fournir des opportunités d'explorer cette plante en tant que source de composés bioactifs pour les industries biochimiques et pharmaceutiques.

### **III.5. Identification du contenu en métabolites secondaires par GC/MS de la fraction F<sub>4</sub>**

La fraction F<sub>4</sub> a été également analysée par GC/MS. Son chromatogramme montre la présence de deux composés dont le temps de rétention, la masse, la formule brute, le nom et le pourcentage sont reportés dans le tableau III.5.

Le 2,2,3,3,4,4-hexadeutéro octadécanal et l'acide hexadecanoïque-2,3-dihydroxypropyl sont les deux produits bioactifs de cette fraction.

Tableau III.5 : Résultats de l'analyse de la fraction F<sub>4</sub> par GC/MS.

N°	Tr	Nom de composé	Formule	%	Bioactivité signalée
1	48,23	2,2,3,3,4,4-hexadeutéro octadécanal	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> D <sub>6</sub> O	43,56	activité anticancéreuse (Gomathi <i>et al.</i> , 2015)
2	51,44	l'acide hexadecanoïque-2,3-dihydroxypropyl	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	56,44	Antioxydant, Hypocholesterolemique Nematicide, Pesticide, Lubrifiant, Antiandrogenique, Flavor, Hemolytique, 5-Alpha reductase inhibitor (Rajendra <i>et al.</i> , 2014)

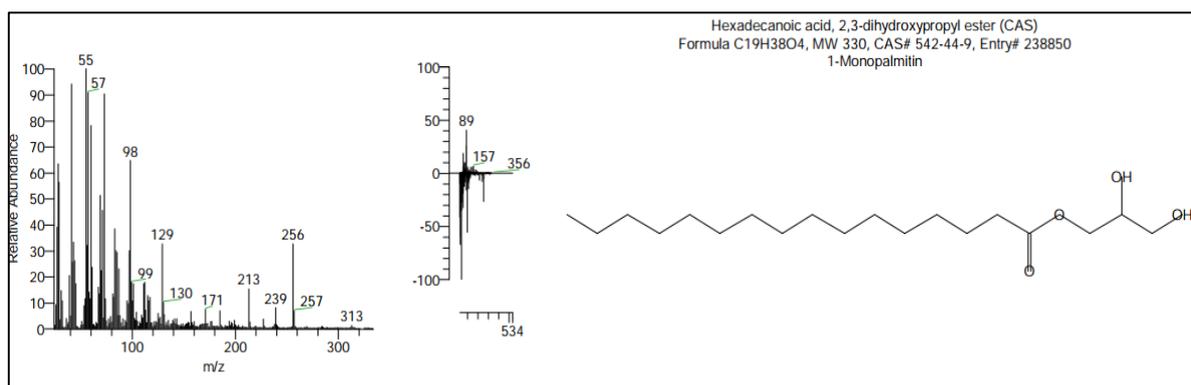
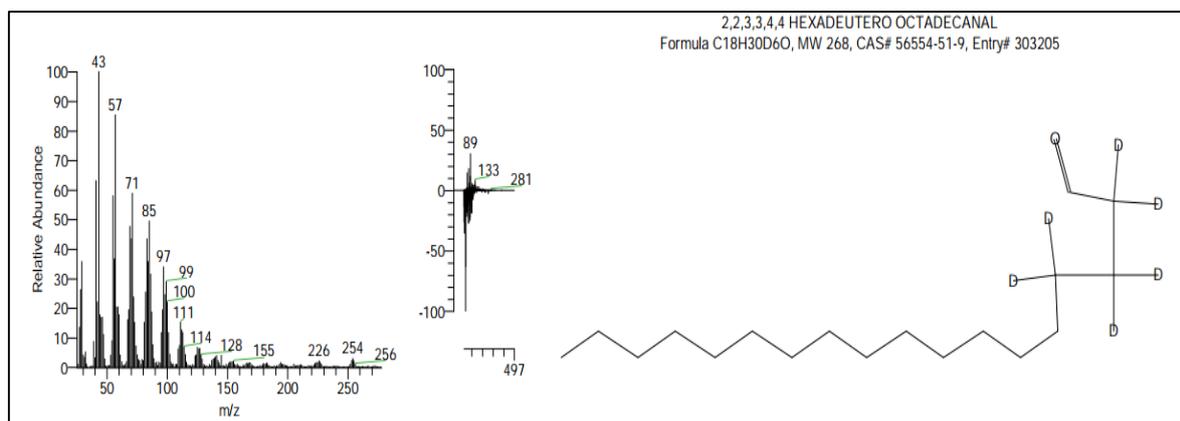


Figure III.1 : Spectres de masse des composés 1et 2 selon la banque de données Willey

### III.6. Elucidation structurale des composés isolés

Les structures des produits isolés de l'espèce *Centaurea involucrata* ont été établies par la combinaison des différentes méthodes d'analyses spectroscopiques telles que la RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), RMN 2D (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC), l'UV et par comparaison avec les données de la littérature.

#### III.6.1. Détermination structurale du composé CEIN-1

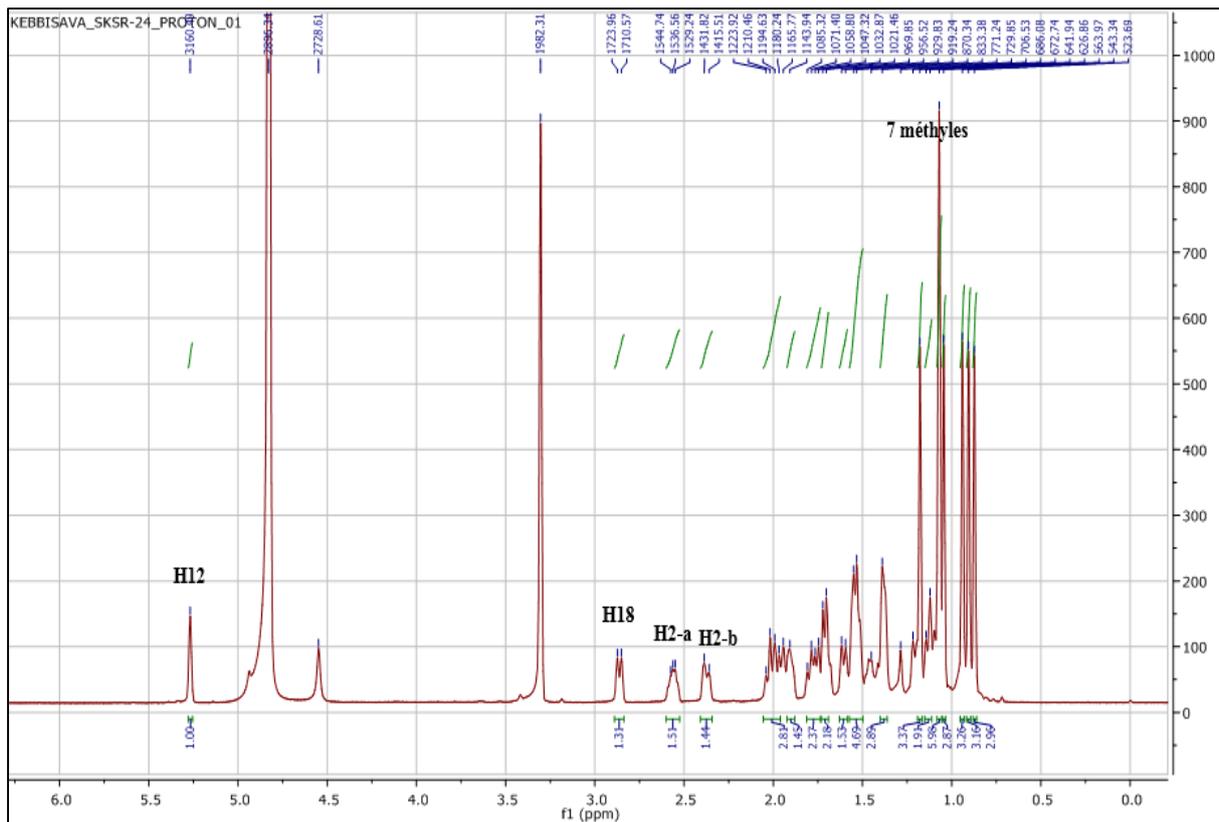
Le composé CEIN-1 est obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol. Il est invisible sous la lumière UV (254 et 366 nm).

Le test de LIEBERMANN & BURCHARD relatif à la mise en évidence des triterpènes, s'avère positif pour cette molécule (figure III.2). En effet, après addition de  $\text{CHCl}_3$  et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore a viré brutalement au rose cerise (Jagessar , 2017).

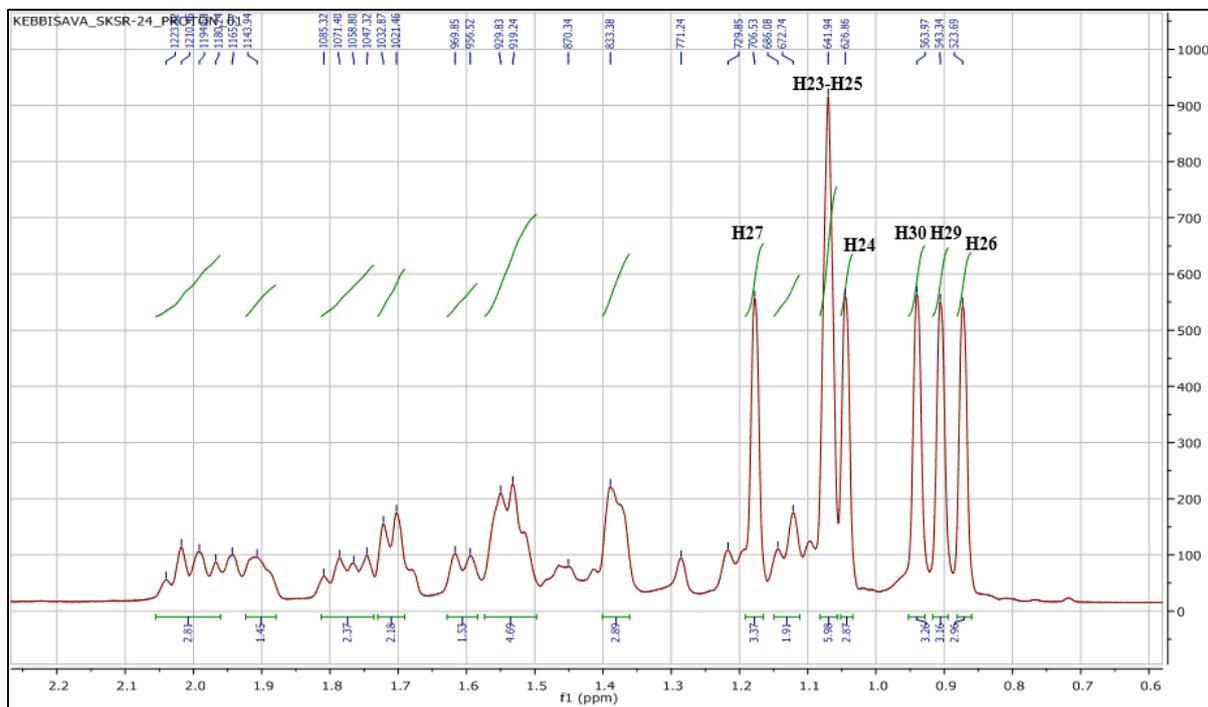


**Figure III.2 :** la couleur du produit CEIN-1 après Le teste de LIEBERMANN & BUCHARD

L'analyse du spectre RMN- $^1\text{H}$  (Spectre III.1) et son étalement (spectre III.1a) de ce composé, enregistré dans le méthanol, montrent dans la région blindée sept singulets, s'intégrant pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}} = 1,07$  (Me-23), 1,04 (Me-24), 1,06 (Me-25), 0,87 (Me-26), 1,17 (Me-27), 0,90 (Me-29) et 0,94 (Me-30) correspondant aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

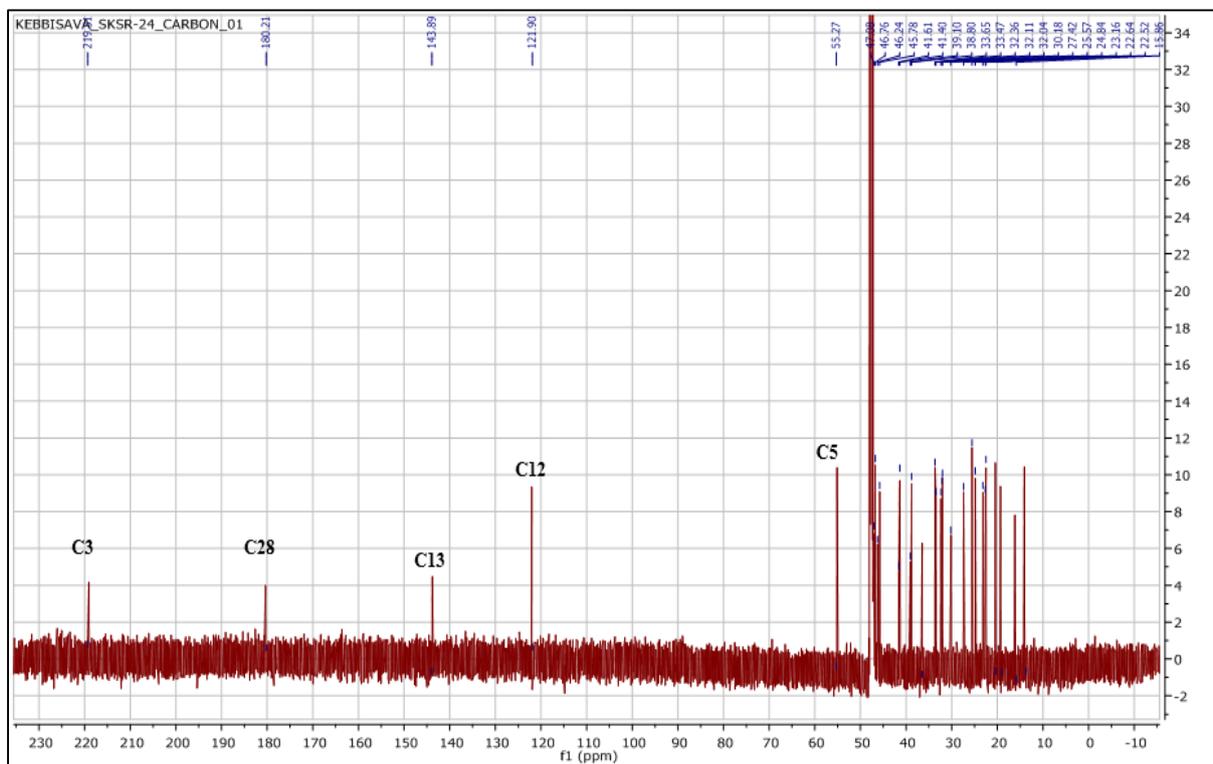


Spectre III.1 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé CEIN-1

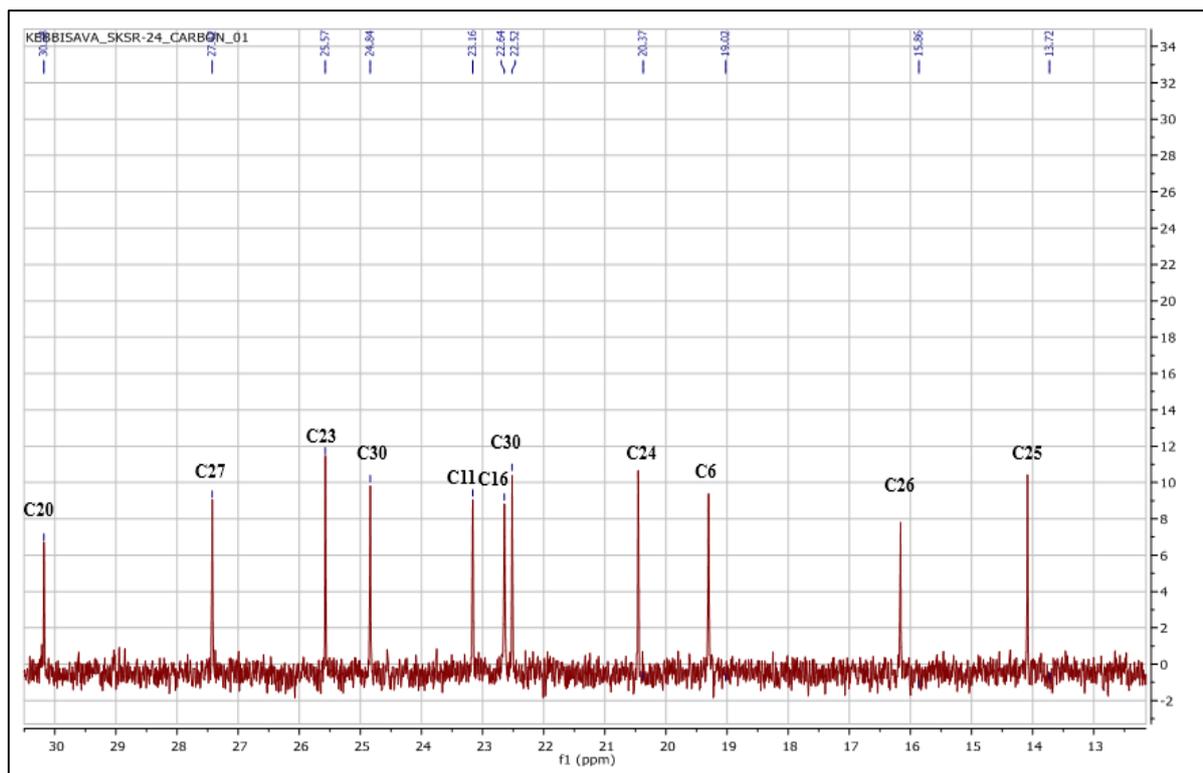


Spectre III.1a : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) étalé (0,6 à 2,2ppm) du composé CEIN-1

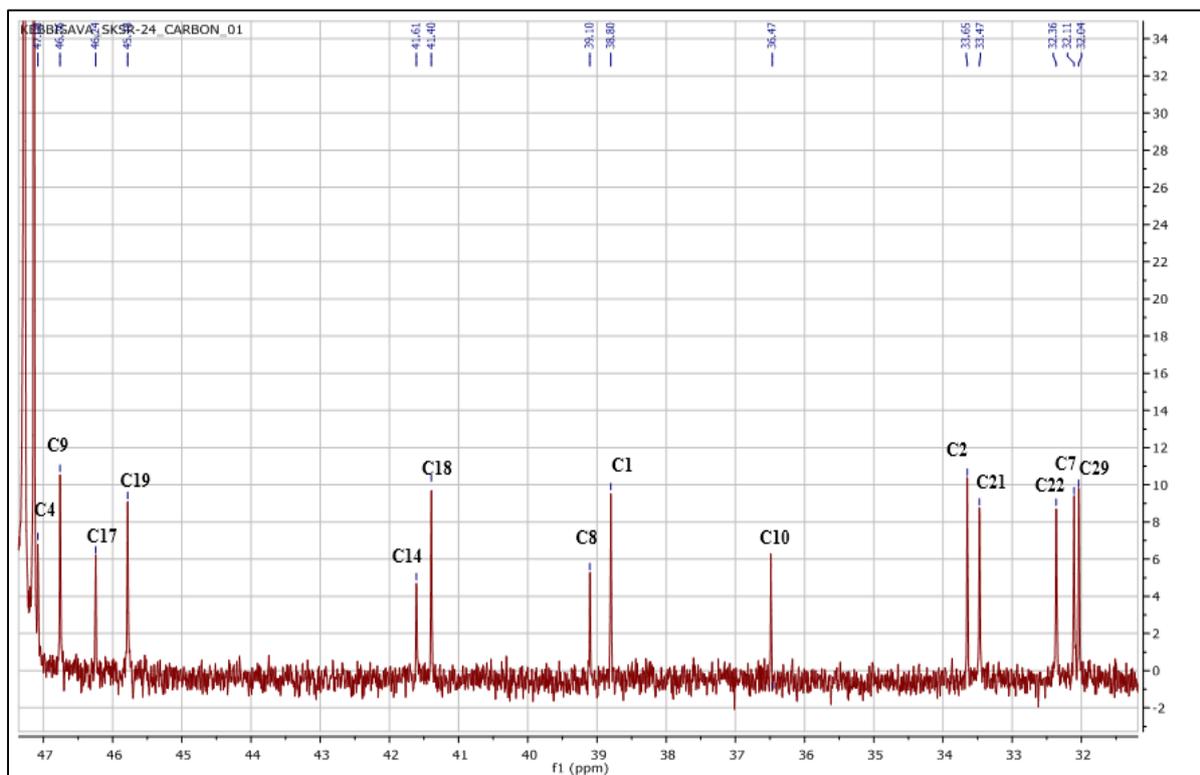
Le squelette de base de type triterpène pentacyclique renferme 8 méthyles angulaires mais l'observation uniquement de sept groupements méthyles indique que l'un d'entre eux a été oxydé. Ceci est supporté par la présence sur le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  (spectre III.2) d'un carbonyle acide à  $\delta_{\text{C}} = 180,2$  ppm.



Spectre III.2 : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé CEIN-1



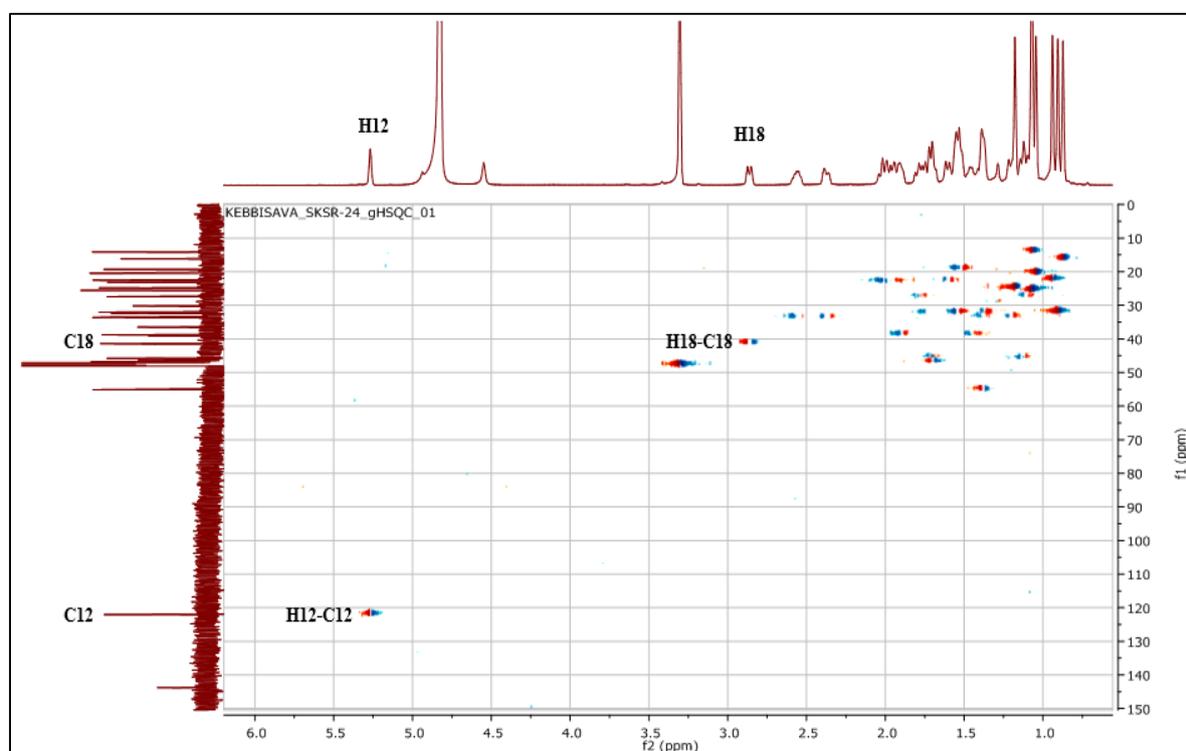
Spectre III.2a : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz) étalé (13 à 31ppm) du composé CEIN-1



Spectre III.2b : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz) étalé (32 à 48 ppm) du composé CEIN-1

Toujours sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.1), on observe des signaux de protons résonant entre 1,12 à 2,58 ppm correspondant aux CH et CH<sub>2</sub>, et deux signaux déblindés à  $\delta_H = 5,22$  ppm sous forme d'un singulet large et à  $\delta_H = 2,88$  ppm sous forme d'un doublet ( $J = 13,4$  Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et au proton méthine H-18, des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène. La valeur du déplacement chimique du proton H-18 à ( $\delta_H = 2,88$  ppm) est significatif de la présence d'une double liaison entre C-12-C13 et aussi une fonction acide en C-28 (COOH).

L'analyse des couplages hétéronucléaires visualisés sur le spectre HSQC (spectre III.3) permet d'identifier les carbones C-12 à  $\delta_C = 121,9$  ppm et C-18 à  $\delta_C = 41,4$  ppm.



**Spectre III.3 :** Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) étalé (1 à 6ppm) du composé CEIN-1

De plus, le spectre RMN-<sup>13</sup>C (spectre III.2) et ces étalements (spectre III.2a et spectre III.2b) révèlent la présence de 30 atomes de carbone, confirmant ainsi la nature triterpénique de ce composé. Ces carbones sont repartis comme suit :

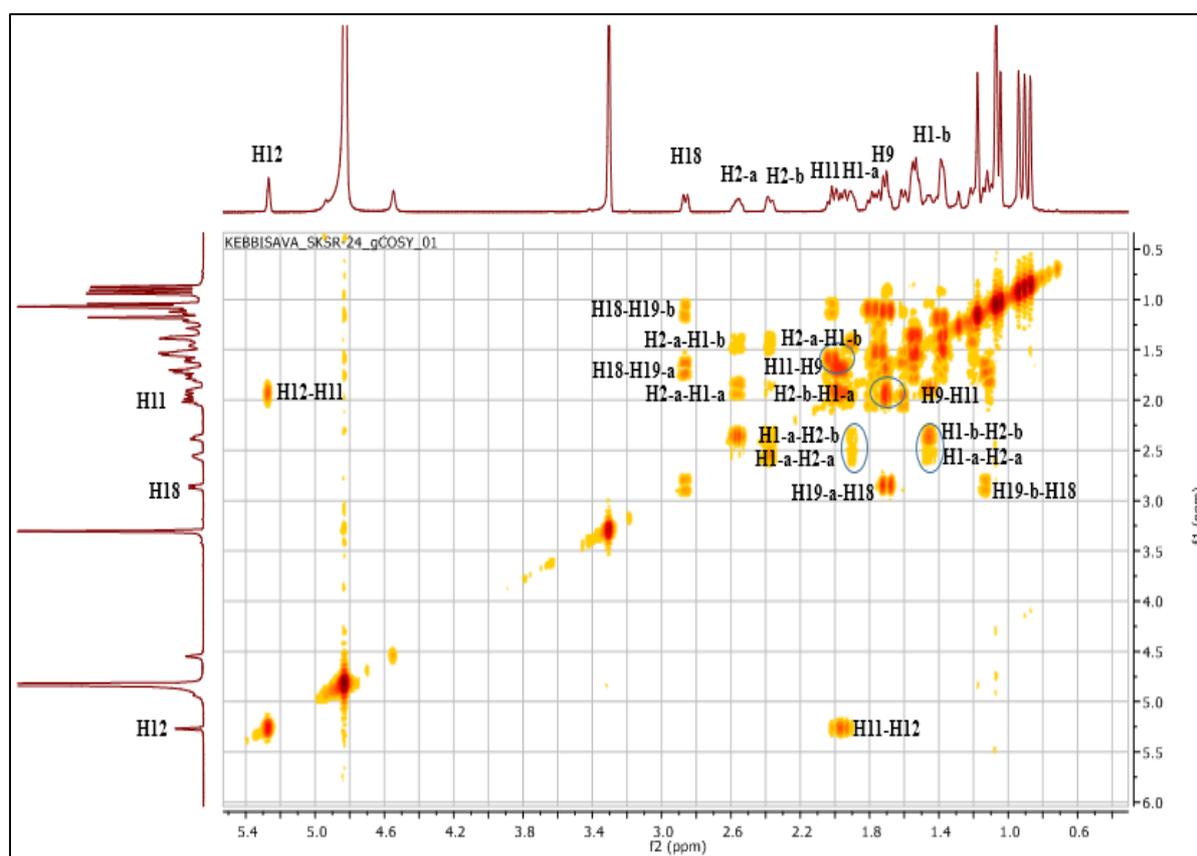
- Sept méthyles résonant à  $\delta_C = 14,1$  ;  $16,2$  ;  $20,5$  ;  $22,5$  ;  $24,8$  ;  $25,6$  et  $32,0$  ppm.
- Un ensemble de carbones résonant entre 19 et 56 ppm, attribuables aux CH<sub>2</sub>, CH et C quaternaires.

Deux signaux apparaissant à  $\delta_C = 121,9$  et  $143,9$  ppm correspondent aux carbones éthyléniques C-12 et C-13 respectivement.

- Un signal d'un carbone correspondant au groupement acide à  $\delta_C = 180,2$  ppm attribuable à C-28
- Un carbone repéré à  $\delta_C = 219,1$  ppm caractéristique d'une fonction carbonyle.

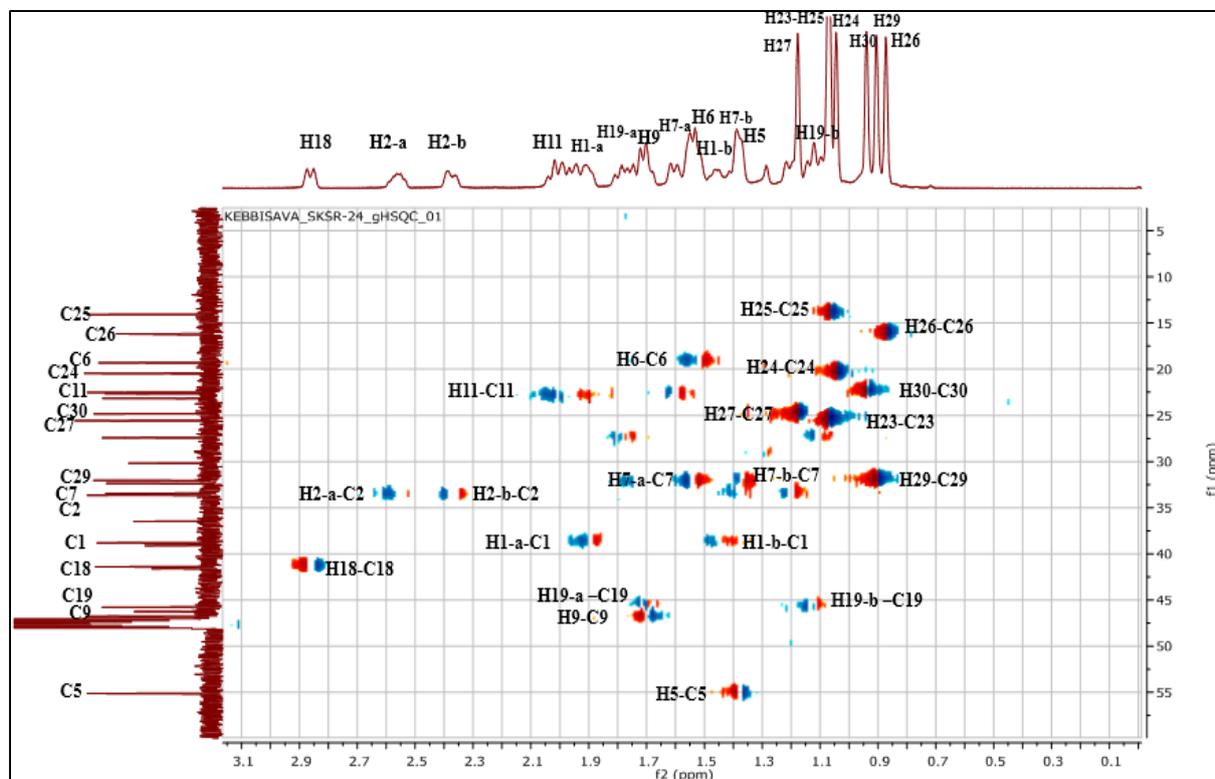
A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.4) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons du squelette triterpénique pentacyclique. On reconnaît entre autres :

- Les deux protons H-11 ( $\delta_H = 1,96$  ppm) à partir de leurs couplages avec le proton éthylénique H-12.
- Le proton H-9 à  $\delta_H = 1,67$  ppm corrélant avec les protons H-11.
- Les protons H-18 ( $\delta_H = 2,88$  ppm) couplant avec les deux protons H-19-a ( $\delta_H = 1,69$  ppm) et H19-b ( $\delta_H = 1,12$  ppm).
- Les protons H-2-a à  $\delta_H = 2,58$  ppm et H2-b ( $\delta_H = 2,39$  ppm) sous forme des multiplets avec les deux protons résonant à  $\delta_H = 1,42$  ppm et  $\delta_H = 1,89$  ppm attribuable au proton H-1b et H-1a respectivement.



Spectre III.4 : Spectre COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) étalé (0,6 à 5,4 ppm) du composé CEIN-1

L'expérience HSQC (spectre III.5) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-1, C-2, C-9, C-11 et C-19 aux  $\delta_C = 38,8$  ;  $33,7$  ;  $46,8$  ;  $23,2$  et  $45,8$  ppm respectivement.

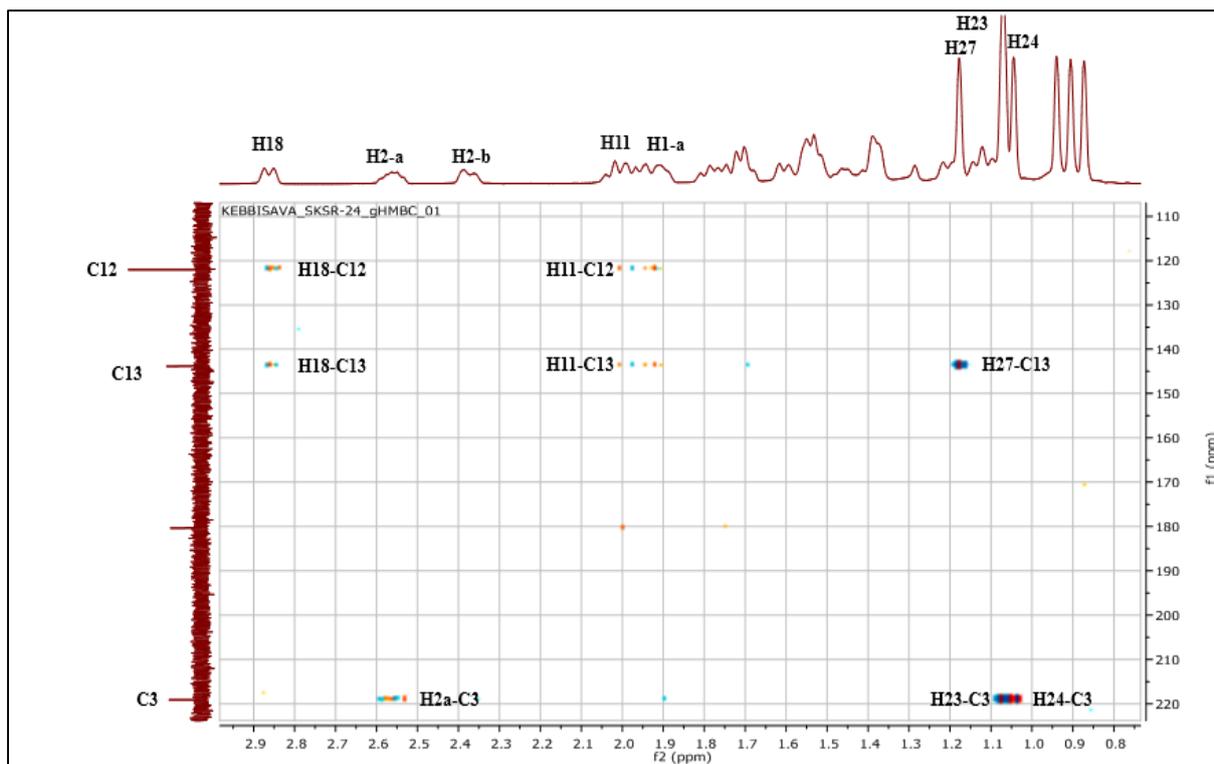


**Spectre III.5 :** Spectre HSQC ( $CD_3OD$ , 600 MHz) étalé (0,1 à 3,1 ppm) du composé CEIN-1

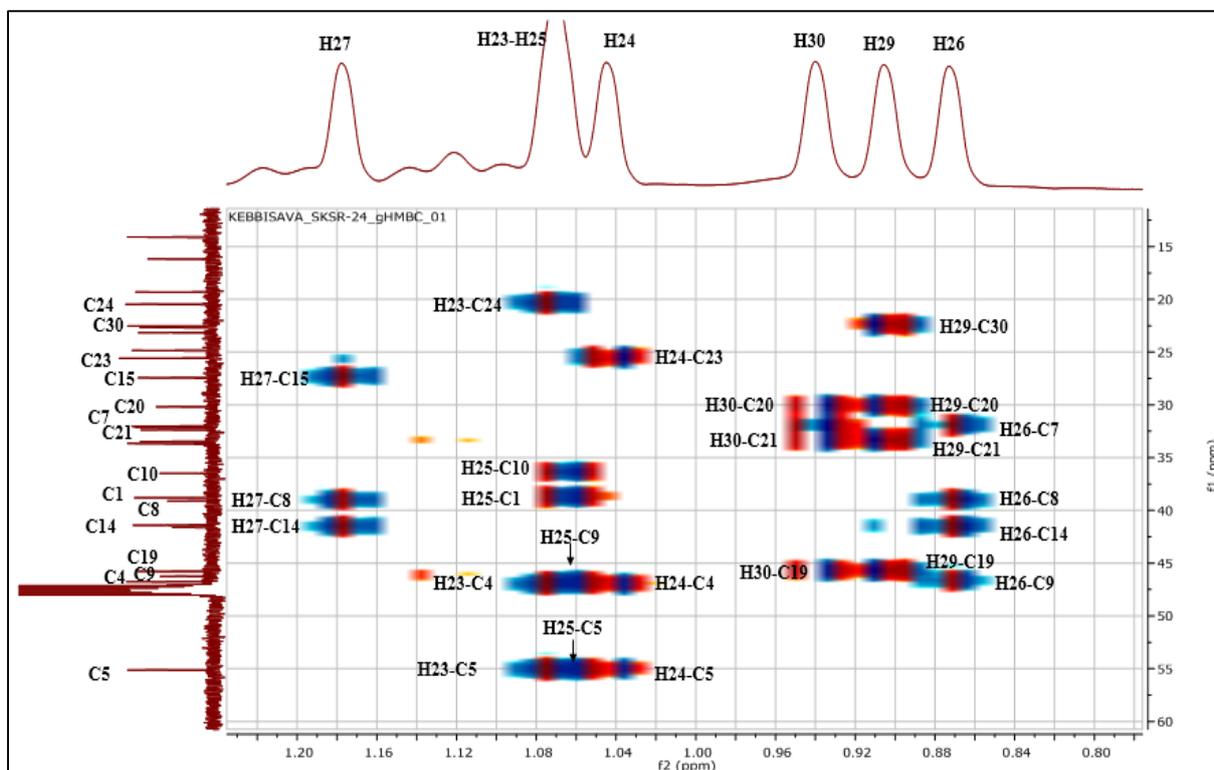
L'élucidation structurale d'un triterpène est initiée à partir du carbone C-3 connu. D'après le spectre RMN- $^1H$  on observe l'absence du signal correspond au proton oxyméthine H-3 ce qui permet de déduire que ce carbone est porté par la fonction carbonyle, on peut confirmer cette hypothèse par les corrélations à longue distance hétéronucléaires sur le spectre HMBC (spectre III.6a). En effet, le proton H2-a corrèle avec le carbone à  $\delta_C = 219,1$  ppm, ainsi que les protons méthyliques  $CH_3-23$  ( $\delta_H = 1,07$ ) et  $CH_3-24$  ( $\delta_H = 1,04$ ) corrèlent aussi avec ce carbone qui ne peut être que le carbone C-3.

Les protons méthyliques  $CH_3-23$  et  $CH_3-24$  corrèlent à leurs tours avec 2 carbones détectés à  $\delta_C = 55,3$  et  $47,4$  ppm correspondant aux carbones C-5 et C-4 respectivement (spectre III.6b).

Les protons méthyliques  $CH_3-25$  ( $\delta_H = 0,88$ ) couplent avec les carbones C-1, C-5 déjà assignés et avec deux autres carbones un C-9 connu et un quaternaire C-10 ( $\delta_C = 37,2$ ), supportant ainsi l'attribution aux protons  $CH_3-25$ . Le spectre HSQC (spectre III.5) permet d'attribuer le proton H-5 à  $\delta_H = 1,36$  ppm sous forme d'un multiplet.

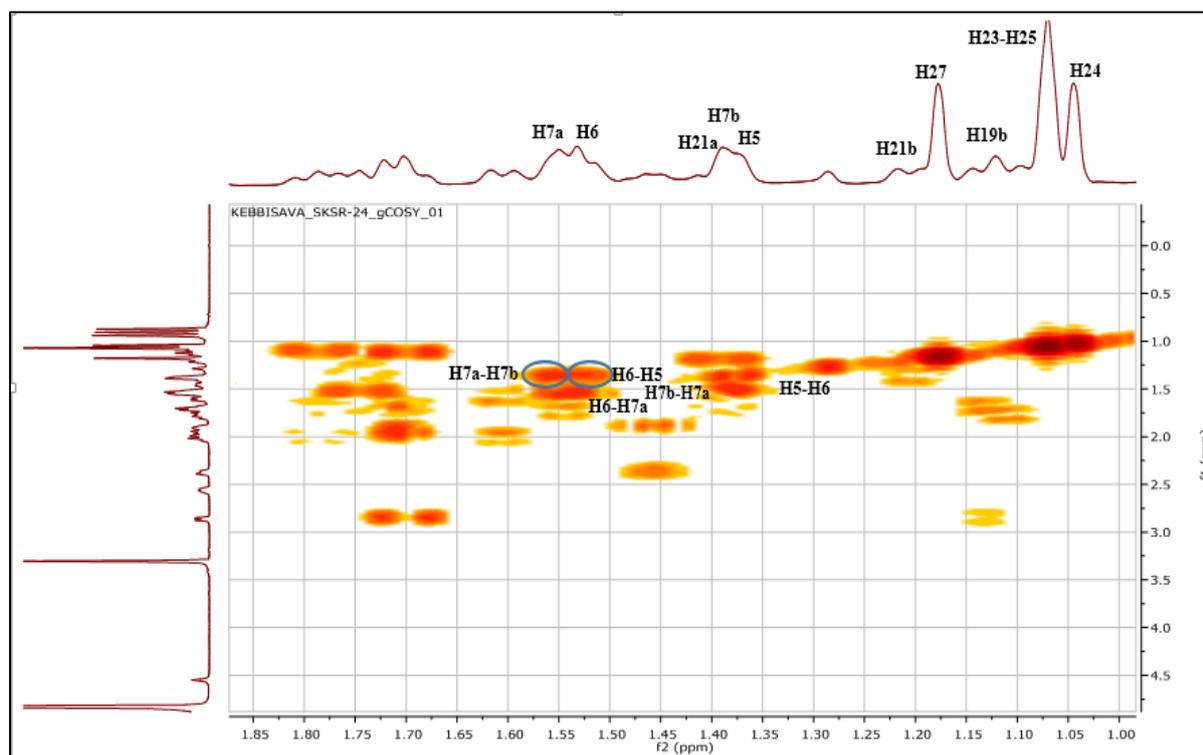


Spectre III.6a : Spectre HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) étalé (0,8 à 2,9 ppm) du composé CEIN-1



Spectre III.6b : Spectre HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) étalé (0,8 à 1,2ppm) du composé CEIN-1

A partir du proton H-5, le spectre COSY (spectre III.7) montre les corrélations entre ce proton et les deux protons H-6 ( $\delta_H = 1,52$  ppm). Ces derniers corréleront avec le proton voisin résonnant à  $\delta_H = 1,55$  ppm qui ne peut être que le proton H-7a. Ce proton corréle à son tour avec leur proton géminé à  $\delta_H = 1,35$  ppm, dont les carbones sont assignés à  $\delta_C = 19,3$  (C-6) et  $32,1$  (C-7) selon le spectre HSQC.

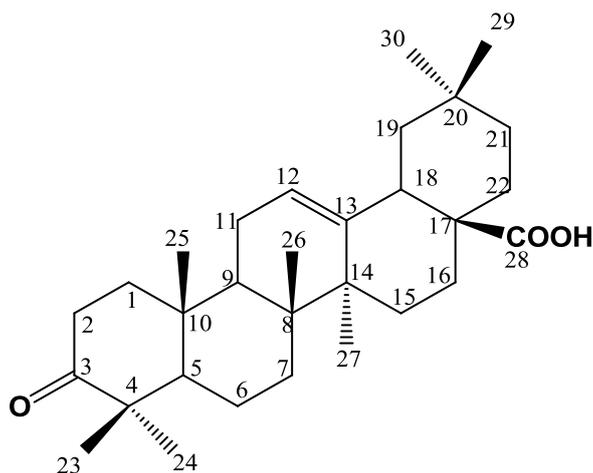


**Spectre III.7** : Spectre COSY ( $CD_3OD$ , 600 MHz) étalé (1 à 1,85 ppm) du composé CEIN-1

Le Me-26 ( $\delta_H = 1,05$ ) est identifié suite aux corrélations de ses protons sur le spectre HMBC (spectre III.6) avec les carbones C-7 et C-9 déjà attribués, et un autre carbone quaternaire C-14 ( $\delta_C = 41,5$  ppm). Le carbone C-14 identifié suite à sa corrélation sur le spectre HMBC avec le proton H-12, corréle avec les protons d'un autre groupement méthyle correspondant au méthyle Me-27 ( $\delta_H = 1,17$  ppm). Les protons de ce dernier corréleront avec les carbones aliphatiques C-8, C-15 ainsi qu'avec le carbone éthylénique C-13. Ces carbones résonnent à  $\delta_C = 39,0$  ppm (C-8),  $\delta_C = 27,4$  ppm (C-15) et  $143,9$  ppm (C-13).

A partir du carbone C-19, on peut caractériser les deux méthyles Me-29 ( $\delta_H = 0,90$  ppm) et Me-30 ( $\delta_H = 0,94$  ppm). Ces méthyles corréleront aussi avec le carbone C-20 à ( $\delta_C = 30,1$  ppm) et avec le carbone à ( $\delta_C = 33,5$  ppm) attribuable au carbone C-21.

Considérant l'ensemble des informations recueillies et analysées avec comparaison de la littérature (Kwon *et al.*, 2011 ; Shirane *et al.*, 1996), conduisent à l'identification du composé CEIN-1 comme étant l'acide 3-oxo oléanolique (figure III.2). Ce composé a été antérieurement isolé (une seule fois par voie naturelle de l'espèce *Euclea crispa* subsp. *crispa* (Kwon *et al.*, 2011). Ce produit est un agent anticancéreux utile pour le mélanome (Huang *et al.*, 2006). Ce produit est nouveau pour la famille Asteraceae et le genre *Centaurea*.



**Figure III.3** : La structure du composé **acide 3-oxo oléanolique**

Les données relatives à la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C de ce composé sont rassemblées dans le Tableau III.6.

**Tableau III.6** : Données de la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-1

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1a	1,89 (1H, m)	38,8
1b	1,42 (1H, m)	
2a	2,58 (1H, m)	33,7
2b	2,39 (1H, m)	
3	-	219,1
4	-	47,4
5	1,36 (1H, m)	55,3
6	1,52 (2H, m)	19,3
7a	1,55 (1H, m)	32,1
7b	1,35 (1H, m)	
8	-	39,0
9	1,67 (1H, m)	46,8
10	-	36,4
11	1,96 (2H, m)	23,2
12	5,22 (1H, sl)	121,9
13	-	143,9

**Tableau III.6 :** Données de la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-1 (suite)

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
14	-	41,5
15a	1,76 (1H, m)	27,4
15b	1,10 (1H, m)	
16	1,59 (2H, m)	22,6
17	-	46,2
18	2,88 (1H, d ; $J=13,4$ )	41,4
19a	1,69 (1H, m)	45,8
19b	1,12 (1H, m)	
20	-	30,1
21a	1,39 (1H, m)	33,5
21b	1,22 (1H, m)	
22	1,77 (2H, m)	32,4
23	1,07 (3H, s)	25,6
24	1,04 (3H, s)	20,5
25	1,06 (3H, s)	14,1
26	0,87 (3H, s)	16,2
27	1,17 (3H, s)	24,8
28	-	180,2
29	0,90 (3H, s)	32,0
30	0,94 (3H, s)	22,5

### III.6.2. Détermination structurale du composé CEIN-2

a) Fluorescence sous lumière de Wood :

La fluorescence sous la lumière de Wood 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 III.3) montre les deux bandes caractéristiques des flavonoïdes. La bande II à  $\lambda_{max} = 274$  nm et la bande I à  $\lambda_{max} = 335$  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 ( $\Delta\lambda_I = + 60$ nm) de la bande I avec augmentation de l'intensité, indiquant que la position 4' est occupée par un OH libre. De plus la présence d'une nouvelle bande à 327 nm oriente vers la présence d'un OH libre en position 7. Cela est confirmé par le déplacement bathochrome ( $\Delta\lambda_{II} = +4$ ) de la bande II dans le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc.

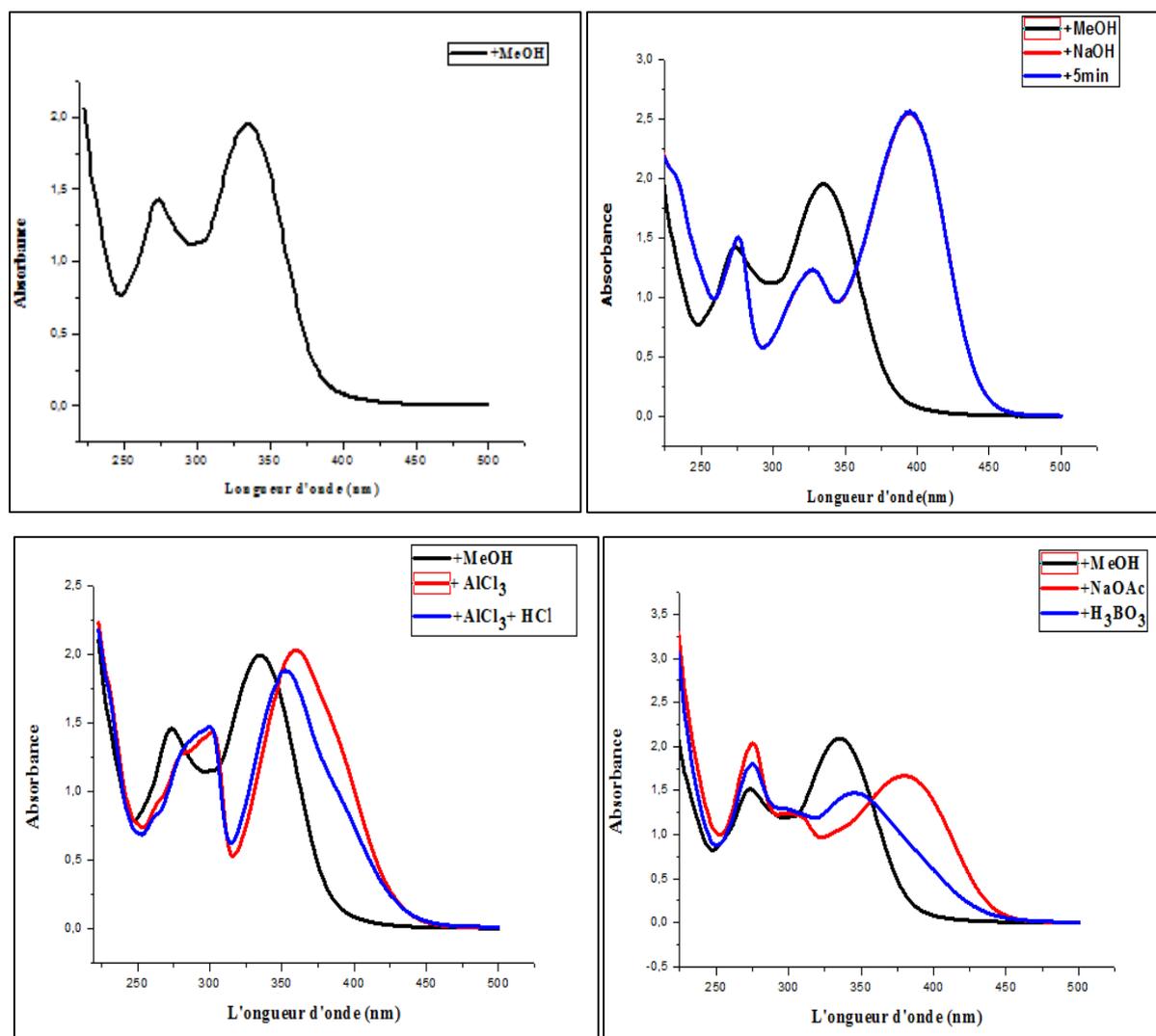
L'addition du réactif ( $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ), conduit à un déplacement bathochrome de +17 nm de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en position C-6.

Un effet bathochrome faible de la bande I ( $\Delta\lambda = +10\text{nm}$ ) dans le spectre NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  par rapport au spectre dans le MeOH, exclue la présence d'un système ortho di-hydroxylé sur le noyau B.

Les données relatives à la série spectrale UV de ce composé sont rassemblées dans le tableau III.7.

**Tableau III.7 :** Données de la série spectrale UV du composé CEIN-2

Réactifs	Bande I	Bande II	Autre Bande	Interprétation
MeOH	335	274	/	Flavone
NaOH	395	276	327	4'-OH et 7-OH
NaOH+5min	395	276	327	Spectre stable
$\text{AlCl}_3$	360	302	/	/
$\text{AlCl}_3+\text{HCl}$	352	300	/	5-OH+OR en C-6
NaOAc	381	278	306	7-OH
NaOAc+ $\text{H}_3\text{BO}_3$	345	275	/	/

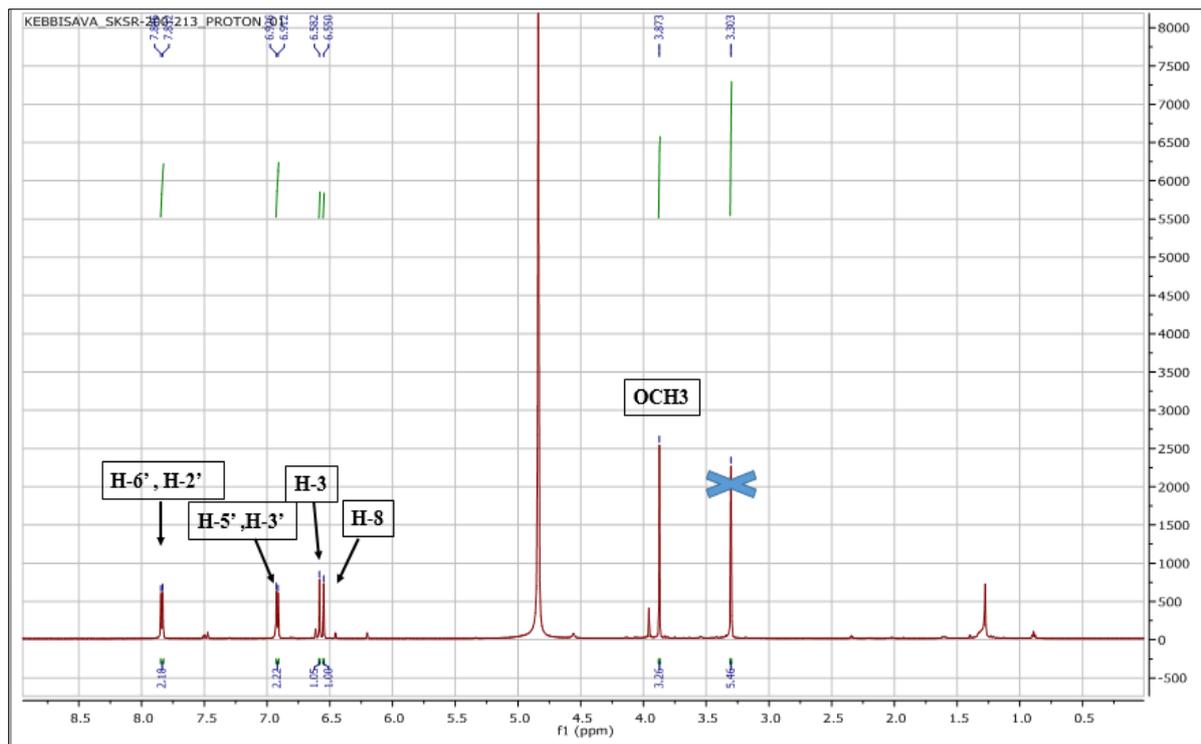


**Figure III.4** : Série spectrale UV du Composé CEIN-2

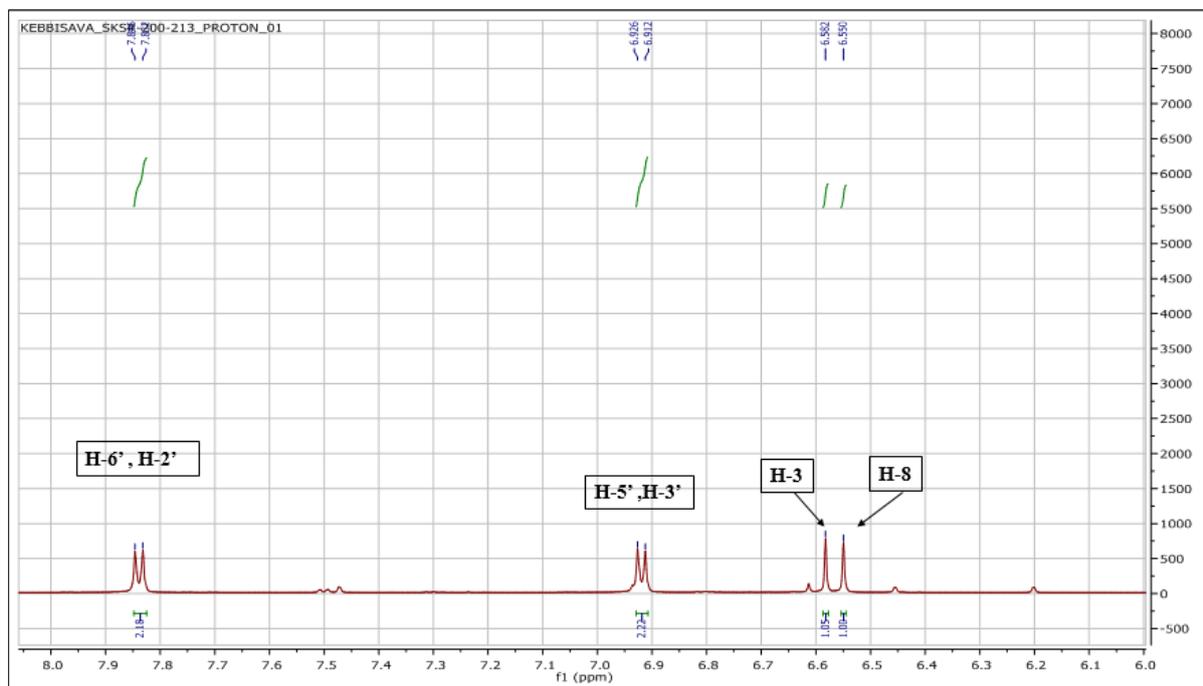
L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H enregistré dans le méthanol (spectre III.8) et son étalement (spectre III.8a) montrent :

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,58$  ppm attribuable à H-3.
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,55$  ppm attribuable à H-8.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à  $\delta_H = 6,92$  ppm ( $J = 8,6$  Hz) et  $\delta_H = 7,84$  ppm ( $J = 8,6$  Hz), attribuable à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement, montrant ainsi une para substitution du noyau B.

Un dernier signal apparaît à  $\delta_H = 3,87$  ppm sous forme d'un singulet d'intégration 3H, celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 59,45$  ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule en position C-6 (oxygénation en C-6).

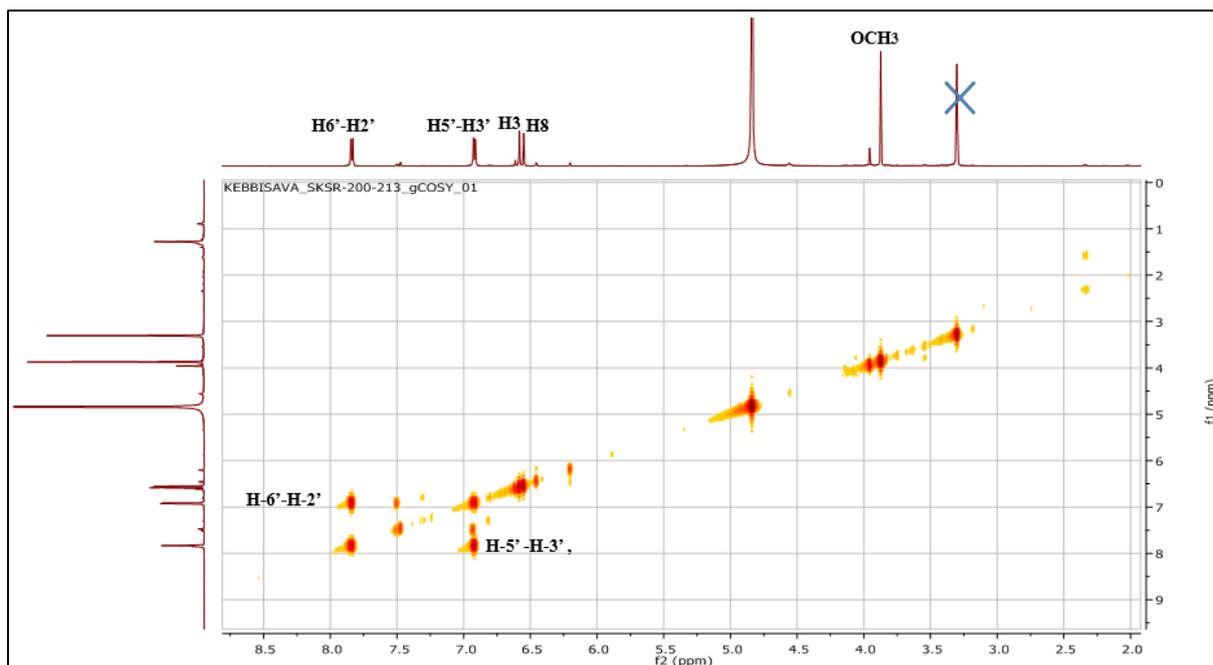


**Spectre III.8** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du produit CEIN-2



**Spectre III.8a** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) étalé du produit CEIN-2

Le spectre COSY (spectre III.9) montre une tache de corrélation entre H-5', H-3' et H-6', H-2' confirme la substitution de la position 4'.

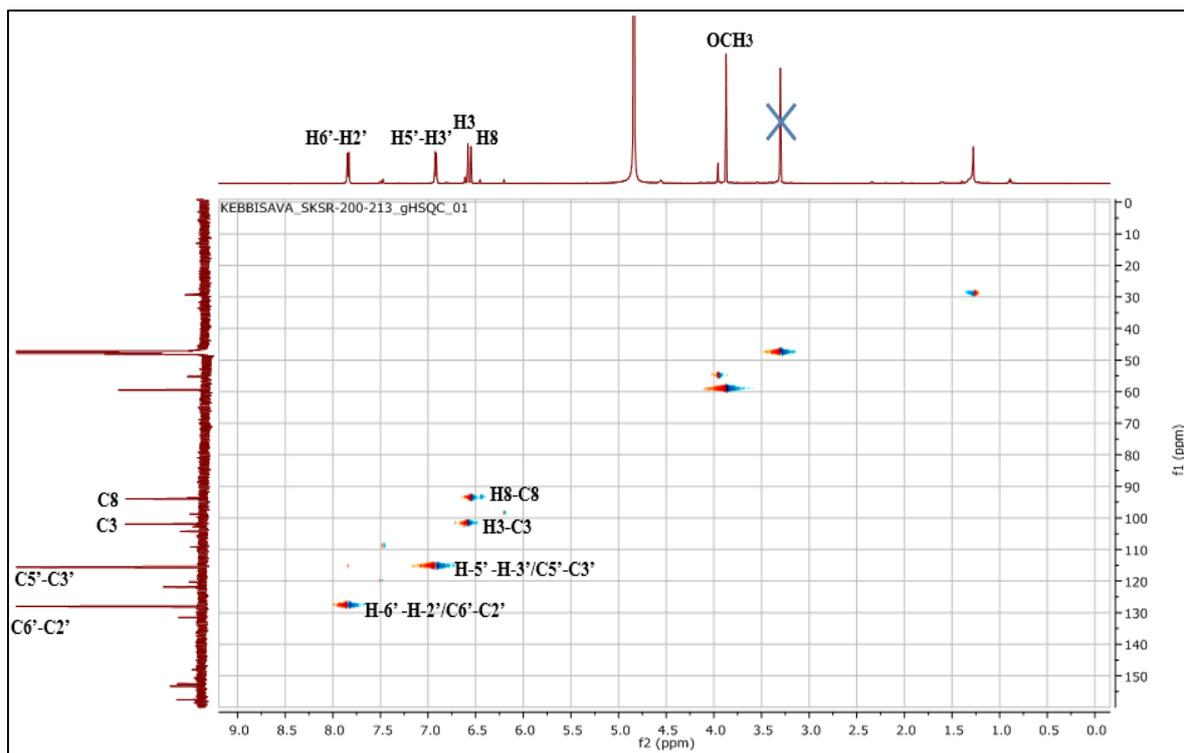


**Spectre III.9** : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du produit CEIN-2

Et pour confirmer les positions des deux protons (H-3 et H-8) on a utilisé la technique de la RMN bidimensionnelle HSQC.

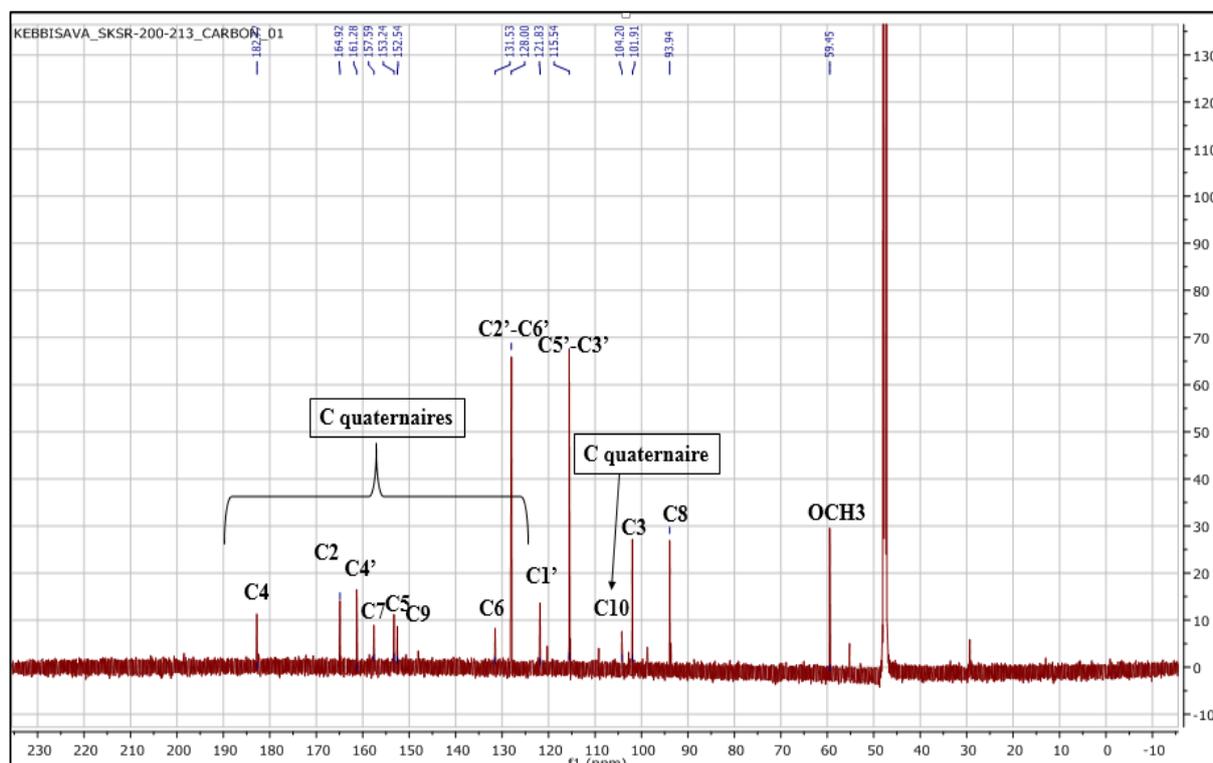
Le spectre HSQC (spectre III.10) montre que l'atome de carbone C-8 qui a un déplacement chimique caractéristique ( $\delta_C = 93,9$  ppm), est relié directement au proton H-8 lequel son déplacement chimique est de  $\delta_H = 6,55$  ppm, et que l'atome de carbone C-3 qui a un déplacement chimique caractéristique ( $\delta_C = 101,9$  ppm), est relié directement au proton H-3 qui a comme déplacement chimique est de  $\delta_H = 6,58$  ppm. Les autres corrélations obtenues dans le spectre HSQC sont identifiées comme suit :

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent une corrélation avec les carbones C-2' et C-6' à  $\delta_C = 128,0$  ppm.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' montrent une corrélation avec les carbones C-3' et C-5' à  $\delta_C = 115,5$  ppm.



**Spectre III.10 :** Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du produit CEIN-2

L'étude du spectre RMN-<sup>13</sup>C (spectre III.11) montre la présence de 14 atomes de carbone. Par abstraction des CH et du groupement OCH<sub>3</sub> indiqué précédemment, il reste 9 carbones quaternaires.



**Spectre III.11 :** Spectre RMN-<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 150MHz, δppm) du produit CEIN-2

En effet, l'analyse du spectre HMBC (spectre III.12) permet l'attribution des carbones quaternaires et en même temps de confirmer la position du groupement méthoxyle à l'aide des taches de corrélation comme suit :

1-Le proton H-3 à  $\delta_H = 6,58$  ppm corrèle avec :

- ✓ le carbone à  $\delta_C = 121,8$  ppm, celui-ci ne peut être que le carbone C-1'.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 182,8$  ppm caractéristique d'un carbonyle attribuable à C-4.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 104,2$  ppm attribuable à C-10.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 164,9$  ppm attribuable à C-2.

2-Le proton H-8 à  $\delta_H = 6,55$  ppm corrèle avec :

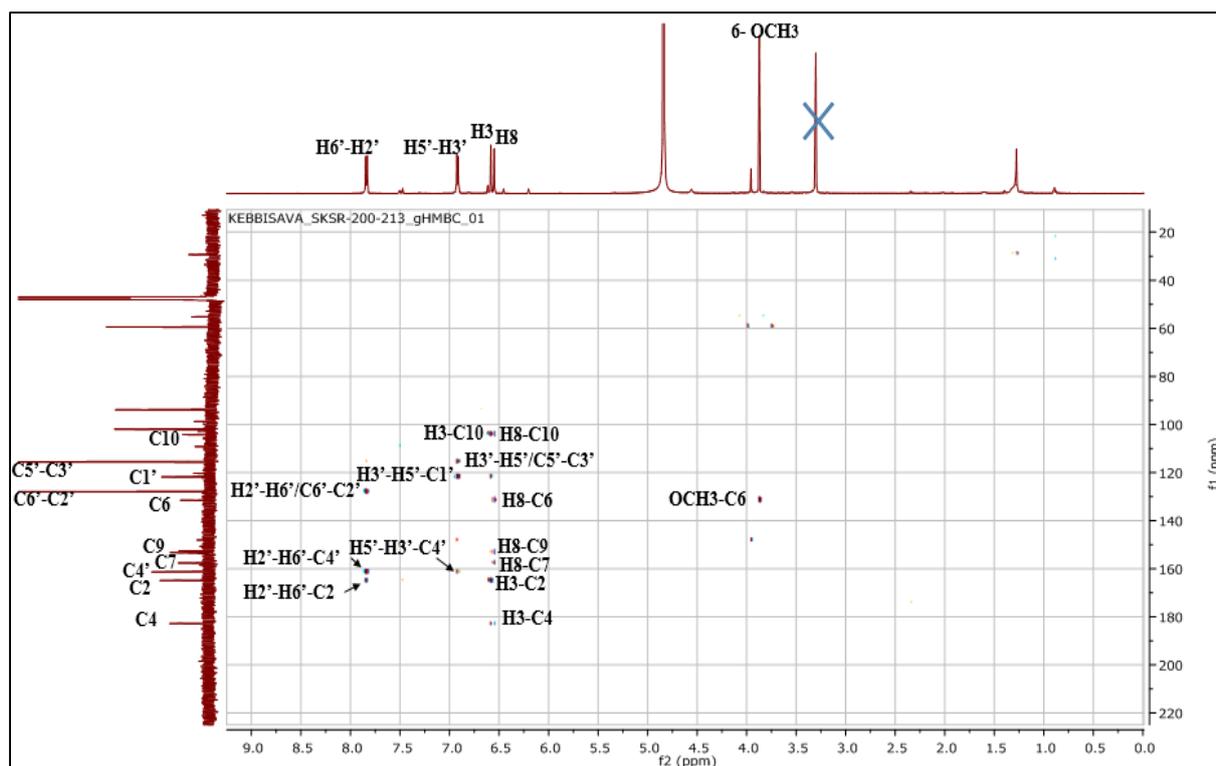
- ✓ le carbone à  $\delta_C = 104,2$  ppm attribuable à C-10.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 153,2$  ppm attribuable à C-9.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 157,6$  ppm attribuable à C-7, la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné.
- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 131,5$  ppm attribuable à C-6 également oxygéné vu la valeur de son déplacement chimique.

3- Le proton H-5' et H-3' à  $\delta_H = 6,92$  ppm corrèle avec :

- ✓ Le carbone à  $\delta_C = 121,8$  ppm, qui est attribué précédemment à C-1'.
- ✓ Le carbone quaternaire oxygéné C-4' à  $\delta_C = 161,8$  ppm.

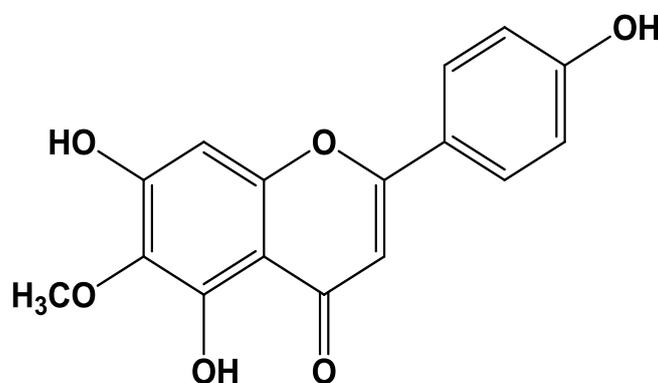
4- Le proton H-6' et H-2' à  $\delta_H = 7,84$  ppm corrèle avec les carbones à  $\delta_C = 161,8$  ppm (C-4') et  $\delta_C = 164,9$  ppm (C-2)

5-La tâche de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone à  $\delta_C = 131,5$  ppm attribué précédemment à C-6 permet de positionner ce groupement sur le carbone C-6.



**Spectre III.12 :** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé CEIN-2

Toutes ces données spectrales mènent à la structure finale du composé CEIN-2 qui est le : **5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone** connu sous le nom de **Hispiduline** (figure III.5).



**Figure III.5 :** La structure du composé **Hispiduline**

Ce composé est un flavonoïde qui a été isolé pour la première fois chez *Ambrosia hispidula* (Asteraceae) (**Herz et Sumi, 1964**), par la suite il a été isolé dans plusieurs espèces appartenant à cette famille : *Iva hayesiana* (**Herz et Sudarsanam, 1970**), *Brickellia californica* (**Mues et al., 1979**). Dans le genre *Centaurea*, il est présent chez plusieurs espèces telles que : *C. africana* (**Seghiri et al. 2006**), *C. maroccana* (**Bentamane et al., 2007**), *C. jacea* (**Forgo et al., 2012**), *C. acaulis* (**Bicha et al., 2013**), *C. virgata* (**Tuzun et al., 2017**) et *C. pungens* (**Labeled et al., 2019**).

Selon (Lin *et al.*, 2010 et Kavvadias *et al.*, 2004), cette flavone possède des propriétés antioxydantes, antifongiques, anti-inflammatoires, antimutagènes et antinéoplasiques très intéressantes.

Les données relatives à la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C de ce composé sont reportées dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 :** Données de la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-2

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
2	/	164,9
3	6,58 (1H, s)	101,9
4	/	182,8
5	/	152,5
6	/	131,5
7	/	157,6
8	6,55 (1H, s)	93,9
9	/	153,2
10	/	104,2
1'	/	121,8
2'	7,84 (1H, d ; $J = 8,6$ )	128,0
3'	6,92 (1H, d ; $J = 8,6$ )	115,5
4'	/	161,8
5'	6,92 (1H, d ; $J = 8,6$ )	115,5
6'	7,84 (1H, d ; $J = 8,6$ )	128,0
6-OCH <sub>3</sub>	3,87 (3H, s)	59,5

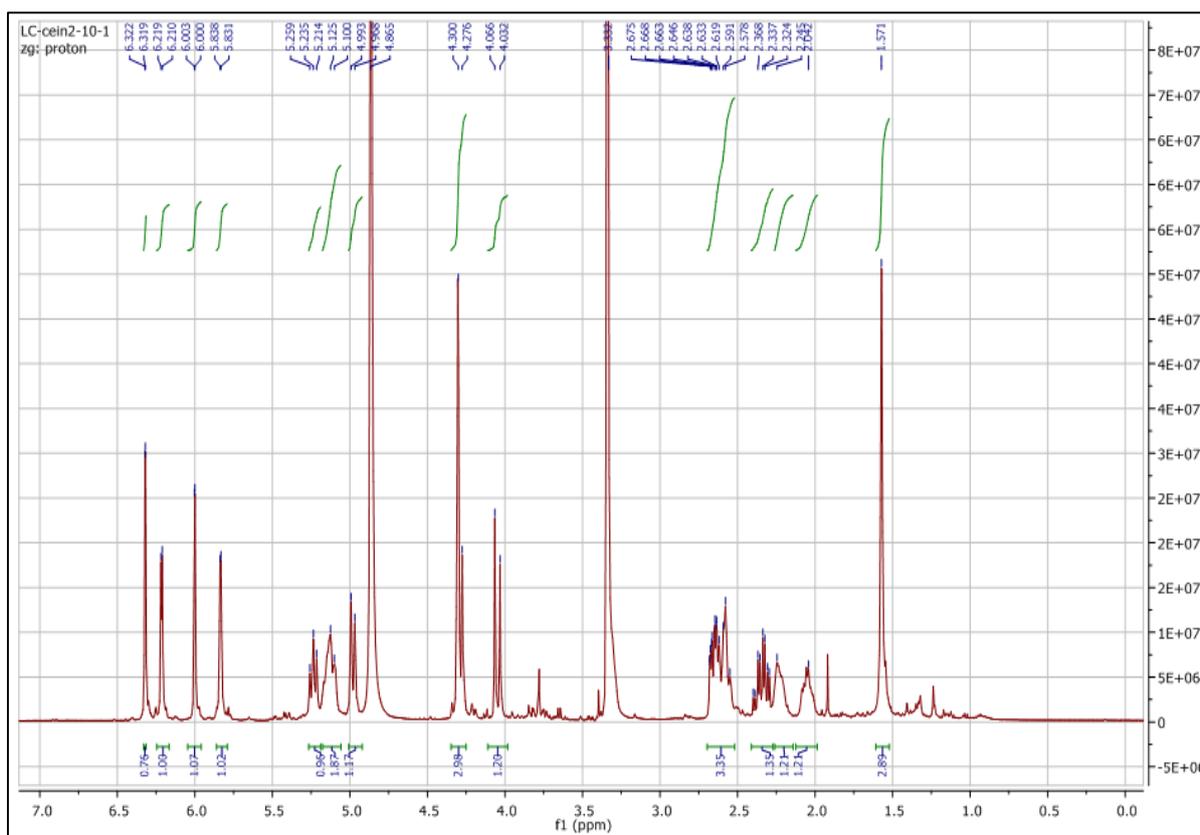
### III.6.3. Détermination structurale du composé CEIN-3

Le composé CEIN-3 est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et une couleur rose après révélation par l'acide sulfurique.

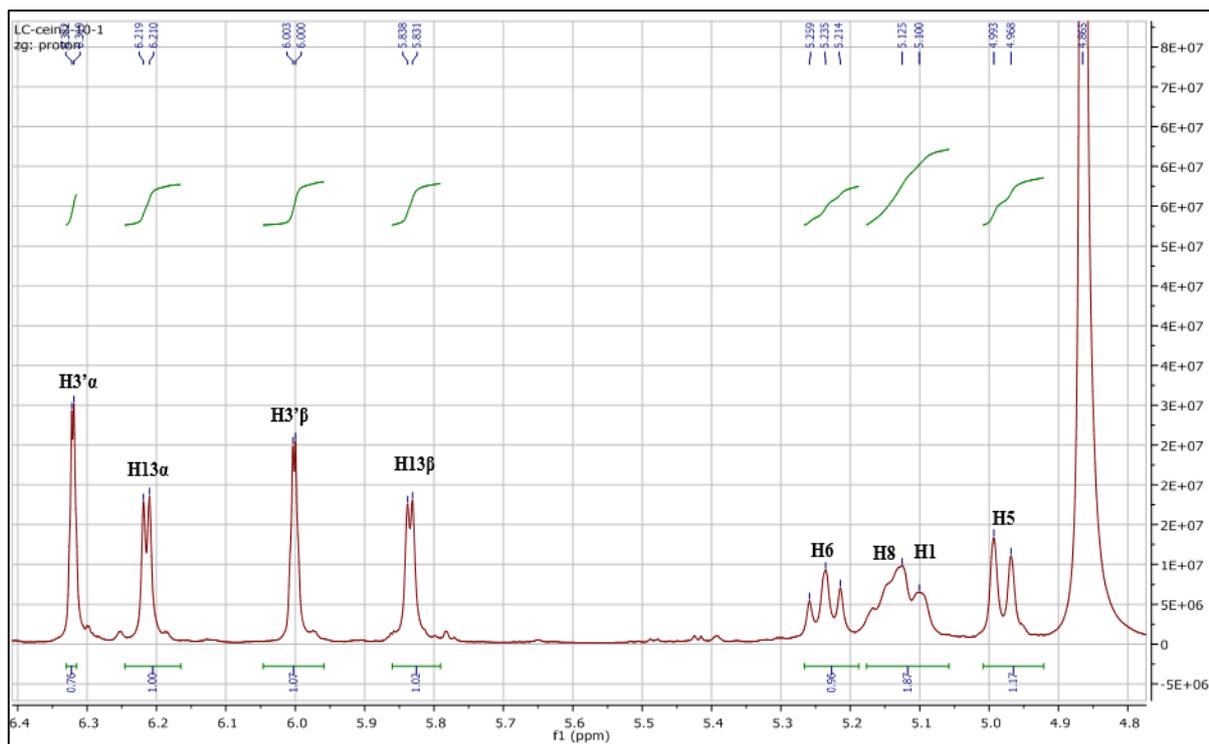
L'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.13 ; spectre III.13a ; spectre III.13b), HSQC (spectre III.14) et HMBC (spectre III.15) permet de relever la présence dans ce composé des groupements suivants :

- un CH<sub>3</sub> à  $\delta_H = 1,56$  ppm (s), corrèle sur le spectre HSQC (spectre III.14) avec le carbone à  $\delta_C = 16,6$  ppm.
- Sept groupements CH<sub>2</sub> dont deux éthyléniques, deux oxygénés et trois aliphatiques.
- cinq groupements CH dont deux aliphatiques oxygénés, un aliphatique non oxygéné et deux éthyléniques.

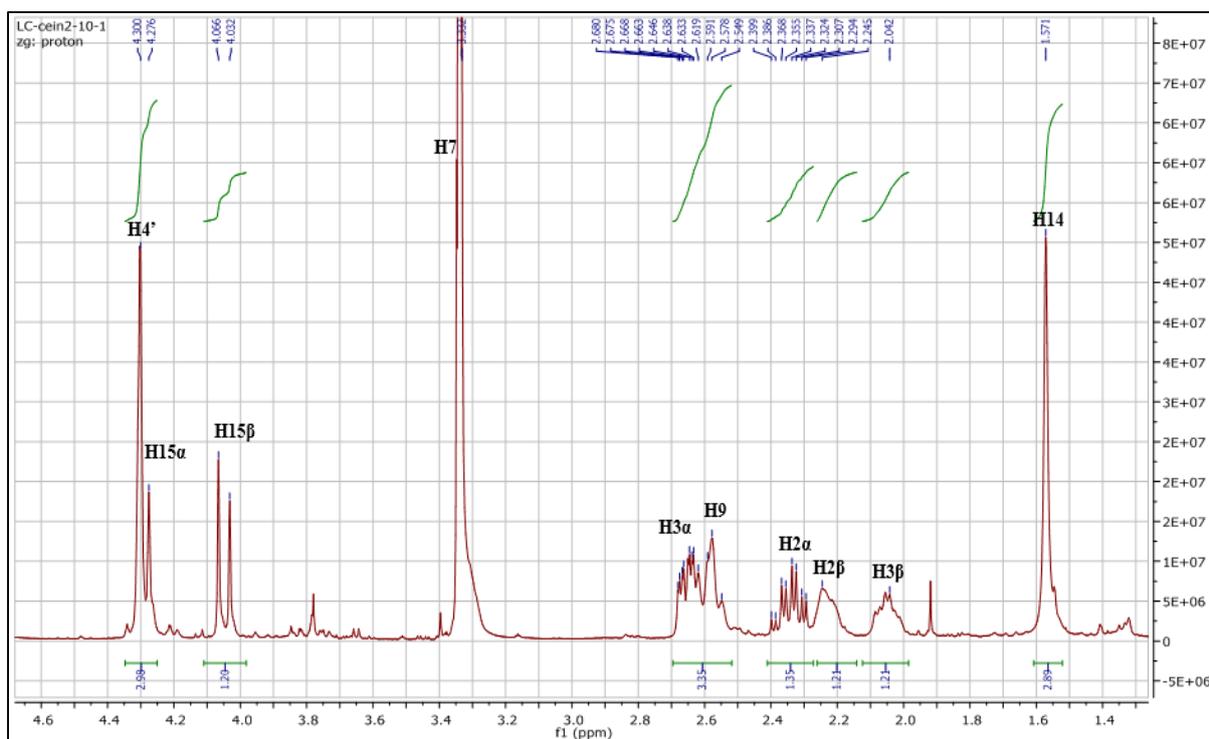
Le spectre HMBC (spectre III.16) montre six carbones quaternaires dont deux carbonyles l'un à  $\delta_C = 166,2$  ppm (ester) et l'autre à  $\delta_C = 171,6$  ppm (lactone  $\alpha, \beta$  insaturé).



Spectre III.13 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CEIN-3



**Spectre III.13a** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) étalé (4,8 à 6,4 ppm) du composé CEIN-3



**Spectre III.13b** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) étalé (1,4 à 4,6 ppm) du composé CEIN-3

Toutes ces informations mènent à une formule brute partielle  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$ , En plus les groupements  $\text{CH}_2$  oxygénés signalés plus haut ne peuvent être qu'hydroxylé, Cette observation

en faveur de la présence de deux hydroxyles dans cette molécule, permet donc d'arriver à la formule brute  $C_{19}H_{24}O_6$  pour ce composé. Cette formule brute indique alors la présence de huit degrés d'insaturations dans cette molécule dont cinq engagées dans les groupements cités précédemment (quatre doubles liaisons éthyléniques, deux doubles liaisons du carbonyle et le cycle de la  $\gamma$ -lactone). Nous pouvons alors déduire que cette lactone sesquiterpénique admet un squelette monocyclique.

Pour essayer de trancher en matière de type de squelette sesquiterpénique et le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique (en C-6 ou en C-8), nous sommes retournés au spectre proton (spectre III.13a) qui montre deux doublets d'intégration un proton pour chacun à  $\delta_H = 6,21$  ppm ( $J = 3,4$  Hz) et  $\delta_H = 5,83$  ppm ( $J = 2,8$  Hz). Ces signaux montrant un couplage allylique qui est attribué aux interactions H-13a/H-7 et H-13b/H-7.

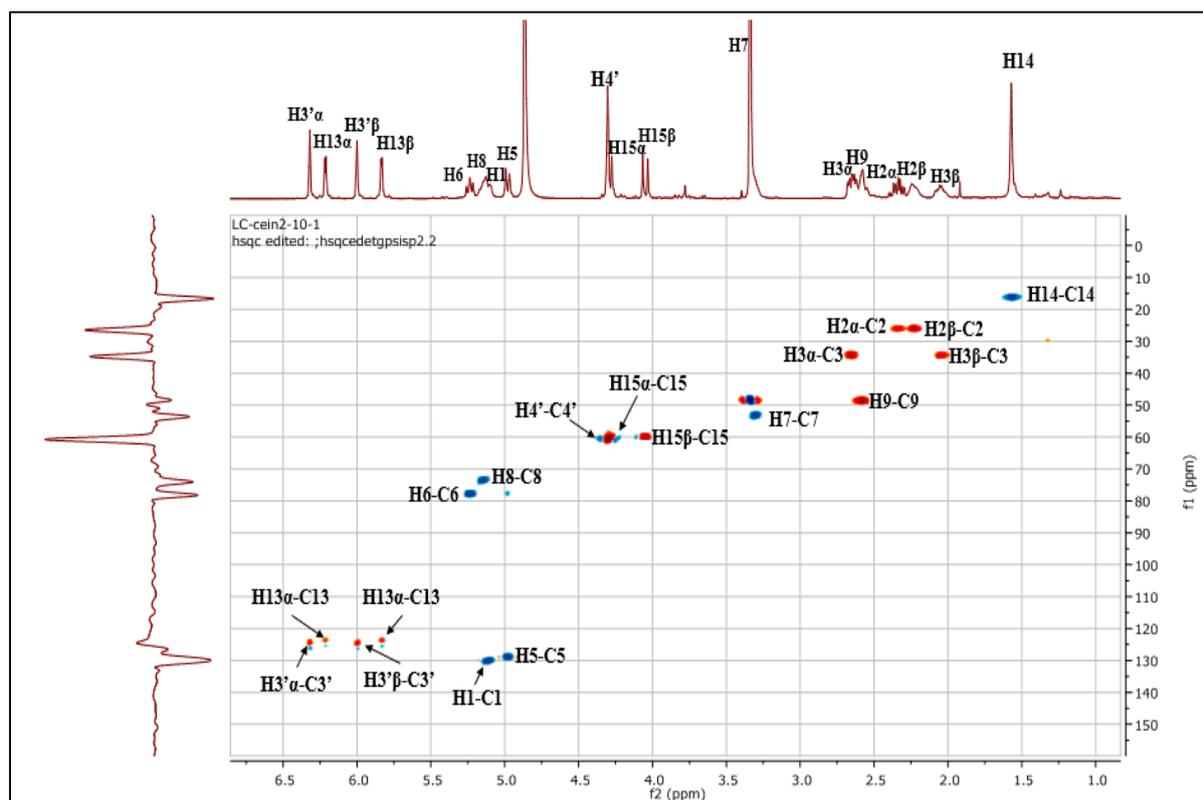
La localisation de H-13a et H-13b permet grâce au spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  (spectre III.15) l'attribution de H-7 à  $\delta_H = 3,30$  ppm sous forme de multiplet recouvert par le signal du solvant. Ce dernier montre des taches de corrélations avec les protons apparaissant à  $\delta_H = 5,23$  ppm (t,  $J = 8,4$  Hz) et  $\delta_H = 5,15$  ppm (multiplet), ces deux protons ne peuvent être attribués qu'à H-6 et H-8. La multiplicité du signal à  $\delta_H = 5,23$  ppm permet son attribution à H-6. Sur le spectre HSQC (spectre III.14), H-6 corrèle avec le carbone à  $\delta_C = 78,2$  ppm (C-6), le déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du carbone de fermeture d'une lactone sesquiterpénique. Cette donnée oriente vers un 6-12 olide. Par ailleurs, les déplacements chimiques de H-8 ( $\delta_H = 5,15$  ppm) et de son carbone (74,0 ppm) sont en faveur d'une estérification en C-8.

Toujours sur le spectre COSY (spectre III.15), le proton de fermeture montre une tache de corrélation avec le proton éthylénique résonant à  $\delta_H = 4,98$  (d,  $J = 9,9$  Hz ;  $\delta_C = 129,4$  ppm) orientant vers la présence d'une double liaison en  $\alpha$  de ce CH. Cette situation n'est possible que pour un squelette de type germacranolide par la présence de cette double liaison entre C-4 et C-5. De ce fait, cette molécule est donc un germacranolide lactonisé en C-6. Ainsi, le CH éthylénique est attribué à la position C-5 (H-5 et C-5).

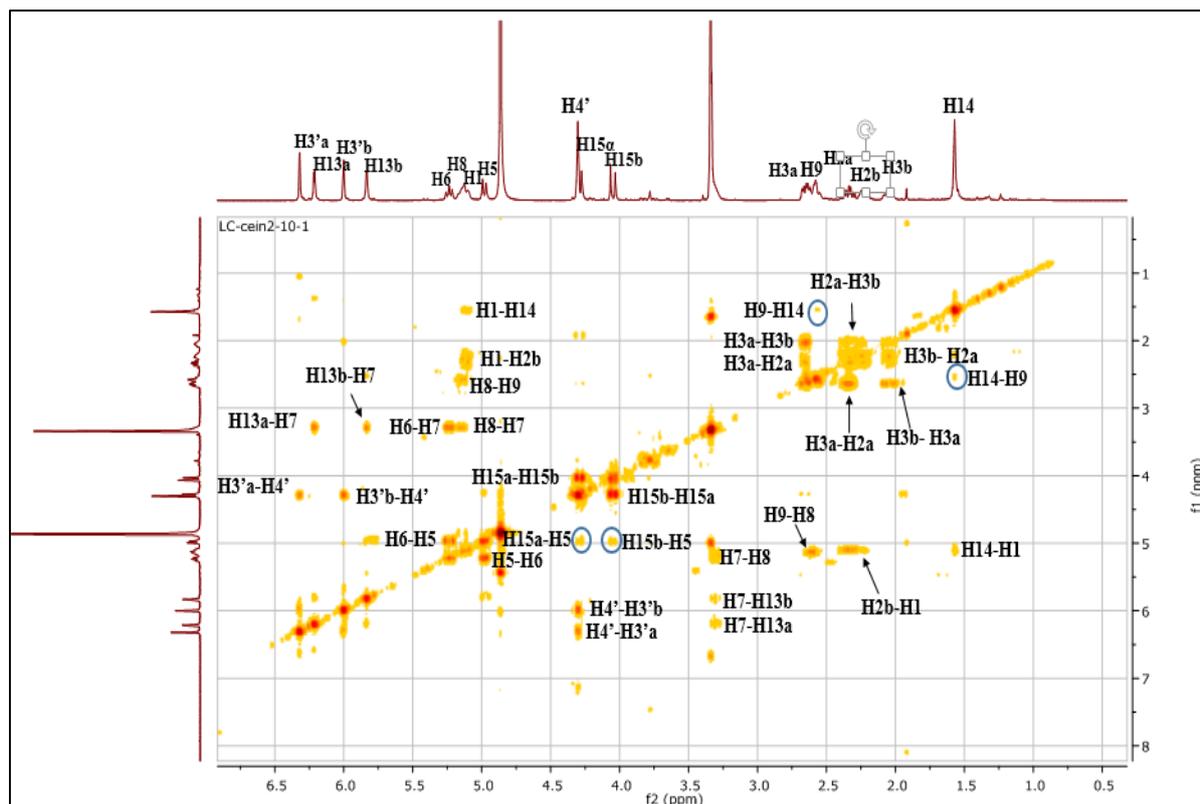
Par ailleurs, H-5 montre une tache de corrélation avec les protons résonnant à  $\delta_H = 4,29$  ppm (d,  $J = 11,3$  Hz) et  $\delta_H = 4,04$  (d,  $J = 13,6$  Hz) attribuables aux protons H-15a et H-15b, vu la corrélation de ces derniers avec le carbone oxygéné à  $\delta_C = 60,4$  ppm dans le spectre HSQC (spectre III.14), il en découle qu'un groupement hydroxyle OH serait porté par le même carbone, que l'on placerait en C-4.

De même, l'attribution de H-8 permet grâce toujours à l'analyse du spectre COSY (spectre III.15) de localiser les signaux des protons H-9 à  $\delta_H = 2,58$  ppm qui sont sous forme de multiplet et corrélent selon le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 49,0$  ppm. Dans le même spectre COSY on remarque une corrélation entre le groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) résonant sous forme d'un singulet large à  $\delta_H = 1,56$  ppm et les protons H-9, cela indique que ce méthyle est porté par le carbone voisin qui ne peut être que C-10 qui, de plus doit être quaternaire et éthylénique vu la multiplicité du signal des protons de ce méthyle et la valeur de leur déplacement chimique.

D'après la numérotation adoptée pour le squelette sesquiterpénique le carbone de ce groupement méthyle est numéroté C-14 et ses protons H-14. Toujours sur le même spectre, les protons H-14 corrélent avec le proton du groupement CH éthylénique résonant à  $\delta_H = 5,10$  ppm attribuable de ce fait à H-1 qui corréle avec le carbone à  $\delta_C = 130,6$  ppm. La présence de cette double liaison entre C-1 et C-10 en plus de celle entre C-4 et C-5 signalée précédemment conforte et confirme bien la nature germacranolide de cette lactone sesquiterpénique.



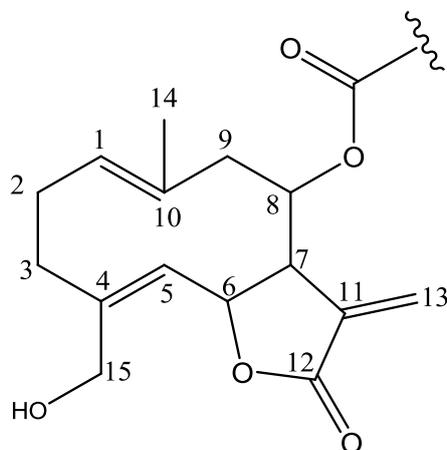
Spectre III.14 : Spectre HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) du composé CEIN-3



**Spectre III.15 :** Spectre COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CEIN-3

La localisation de H-1 permet d'attribuer les deux protons H-2a et H-2b qui sont sous forme de multiplet aux signaux à  $\delta_H = 2,33$  ppm et à  $\delta_H = 2,23$  ppm ( $\delta_C = 26,4$  ppm), respectivement, suite à leurs corrélations avec H-1 (spectre III.15). Toujours sur le spectre COSY les deux protons H-2a et H-2b corrélient avec les protons du groupement méthylène résonant à  $\delta_H = 2,63$  ppm (m ;  $\delta_C = 34,8$  ppm) et  $\delta_H = 2,04$  ppm (m ;  $\delta_C = 34,8$  ppm) qui ne peuvent être que le proton H-3a et le proton H-3b respectivement.

Toutes ces constatations mènent à la structure partielle suivante (figure III.6) :



**Figure III.6 :** structure partielle du Composé CEIN-3

A ce stade de notre étude structurale, il nous reste que de déterminer la nature de substituent en C-8.

Le spectre proton montre deux signaux de deux protons éthyléniques ayant la même constante de couplage  $J = 1,4$  Hz sous forme de doublet, l'un à  $\delta_H = 6,31$  et l'autre à  $\delta_H = 6,00$  ppm, ces derniers corrélient avec le même atome de carbone dans le spectre HSQC à  $\delta_C = 125,8$  ppm et aussi un signal correspondant à un groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_H = 4,29$  ppm.

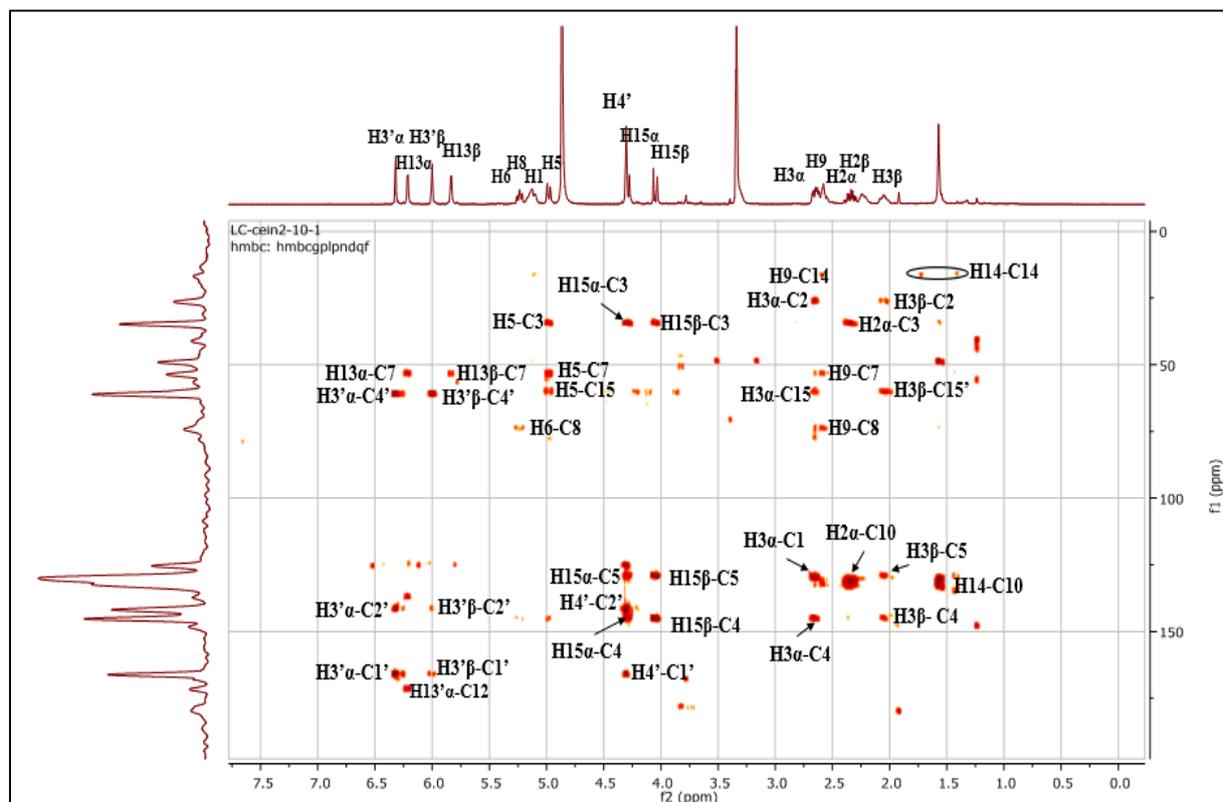
Par ailleurs comme nous avons mentionné précédemment que le déplacement chimique du proton H-8 à  $\delta_H = 5,15$  ppm indique que cette position est estérifiée. Ceci est confirmé par la présence d'un signal à  $\delta_C = 166,2$  ppm correspondant à un groupement carbonyle d'un groupement ester. La chaîne latérale placée en C-8 comporte donc un groupement ester, une double liaison ainsi qu'un groupement  $\text{CH}_2$  oxygéné, ces caractéristiques sont en complet accord avec la chaîne latérale 4'-hydroxyméthacrylate.

L'examen approfondi des données du spectre HMBC (spectre III.16) assure le séquençage des carbones de la chaîne 4'-hydroxyméthacrylate, et montre :

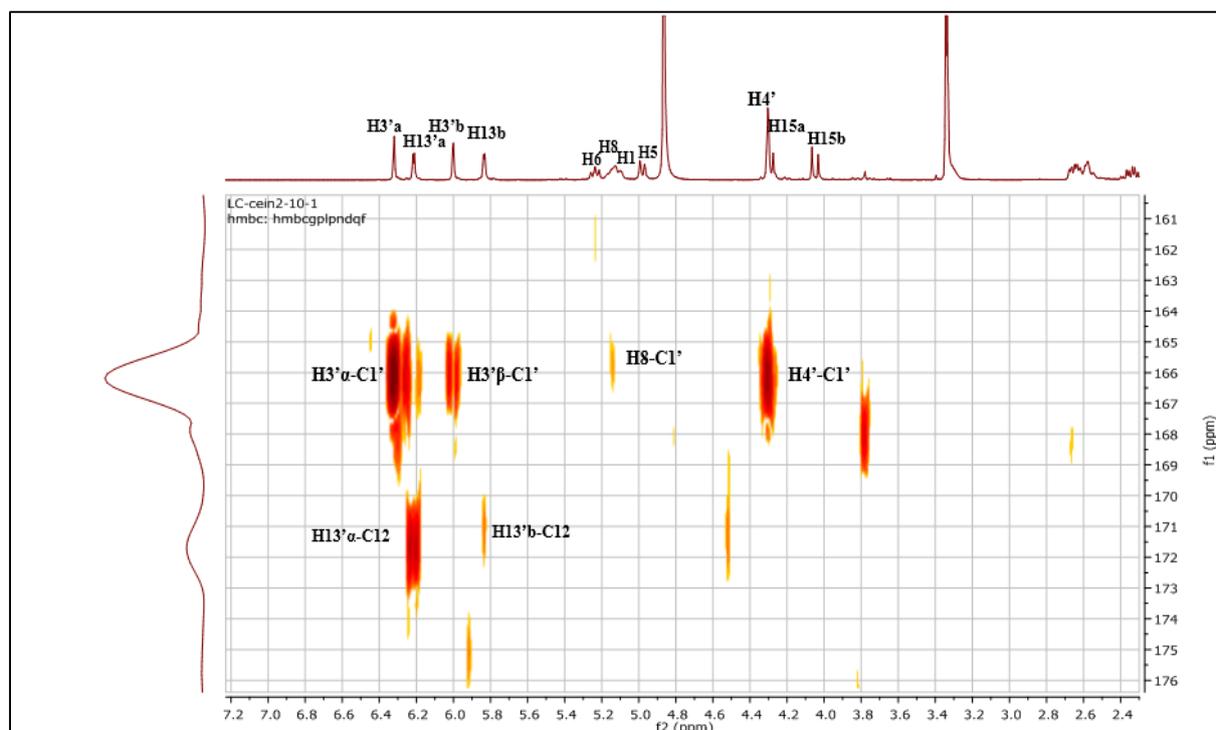
- Deux taches de corrélations nettes, la première entre le proton H-4' à  $\delta_H = 4,29$  ppm et celle du carbone C-3' à  $\delta_C = 125,8$  ppm, et la seconde avec le carbone C-2' dont le déplacement chimique apparaît à  $\delta_C = 141,4$  ppm. En plus de ces observations, on note également une corrélation entre le proton H-4' et le groupement carbonyle C-1' situé à  $\delta_C = 166,2$  ppm.
- Notons aussi une tache de corrélation entre le proton H-8 ( $\delta_H = 5,10$  ppm) et le groupement carbonyle C-1', montrant ainsi la localisation du groupement 4'-hydroxyméthacrylate en C-8 ( $\delta_C = 74,0$  ppm) (spectre III.16a).

Le même spectre (spectre III.16) présente également : une corrélation entre les protons H-15a et H-15b du système AB et le carbone C-4 à  $\delta_C = 145,3$  ppm, cela confirmera que ce groupement hydroxylé est porté par ce dernier carbone.

La localisation du groupement méthyle en C-10 est consolidée par la corrélation observée entre les protons du méthyle H-14 vers  $\delta_H = 1,56$  ppm et le carbone C-10 à  $\delta_C = 131,8$  ppm.



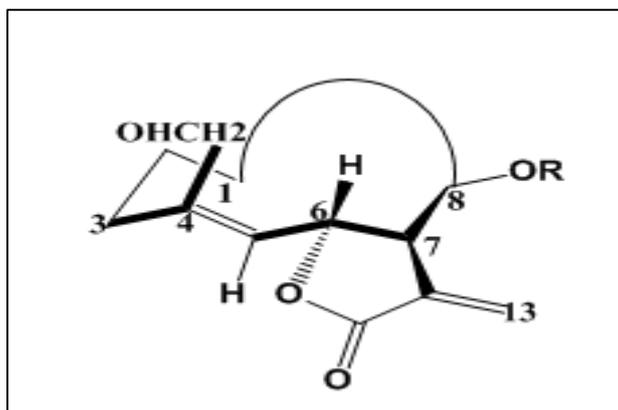
Spectre III.16 : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) étalé (0 à 7,5 ppm) du composé CEIN-3



Spectre III.16a : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) étalé (2,4 à 7,2 ppm) du composé CEIN-3

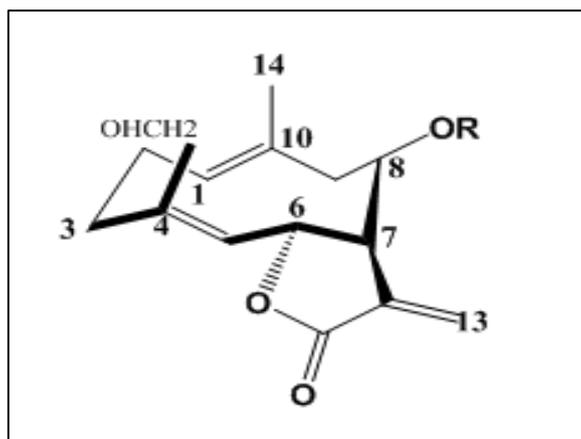
A l'issue de cette analyse, Il reste à préciser les configurations des deux doubles liaisons du macrocycle pour trancher entre un *cis, cis*-germacranolide ou un *trans, trans*-germacranolide.

Pour établir la configuration de la double liaison entre C-4 et C-5, nous nous sommes basés sur la valeur du déplacement chimique de H-6 qui est à  $\delta_H = 5,23$  ppm (t,  $J = 8,4$  Hz). Cette valeur montrant un bon déblindage de ce proton indique que le groupement hydroxyméthylène en C-4 et ce proton H-6 sont en positions 1,3-diaxiales (Figure III.7), ce qui impose une configuration *trans* à cette double liaison (**Olivier, 1980**). Cette hypothèse est confortée par la valeur de la constante de couplage du proton H-6 ( $J = 8,4$  Hz), qui indique que ce proton se trouve à une position *trans*-diaxiale par rapport à ses protons voisins H-5, H-7 permettant de déduire des orientations  $\beta$ (axiale) pour H-6 et  $\alpha$  (axiales) pour H-5 et H-7.



**Figure III.7** : Configuration de la double liaison C(4)-C(5) du composé CEIN-3

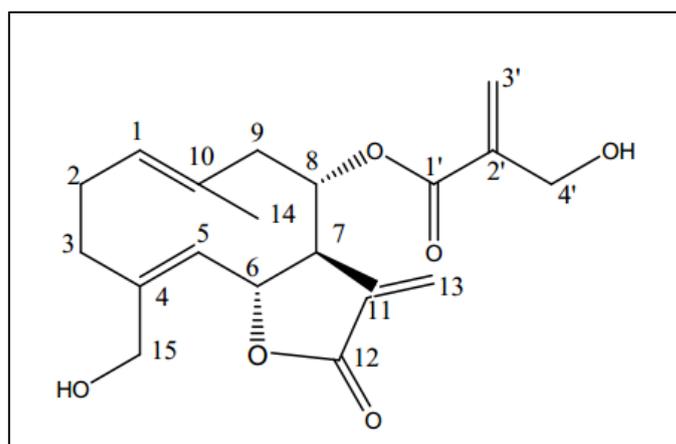
En ce qui concerne la configuration de la double liaison entre C-1 et C-10, elle est déduite *trans*, vu la valeur inférieure à 20 ppm du déplacement chimique du carbone du CH<sub>3</sub>-14 (Figure III.8) (**Buděšínský et Šaman, 1995**).



**Figure III.8 :** Configurations des doubles liaisons C(4)-C(5) et C(1)-C(10) du composé CEIN-3

A ce stade de notre discussion, le composé CEIN-3 est donc un *trans-trans* germacranolide.

Toutes ces données convergent vers la structure reportée dans la figure III.9. Il s'agit du Onopordopicrine Comme produit naturel, il a été isolé pour la première fois de *Onopordon acanthium* L. (Drozd *et al.*, 1968). Pour le genre *Centaurea* il a été isolé de plusieurs espèces : *C. melitensis* (Barerro *et al.*, 1989), *C. sonchifolia* (Lonergan *et al.*, 1992), *C. aspera* (Marco *et al.*, 2005) et *C. tweediei* (Fortuna *et al.*, 2001 ; Bach *et al.*, 2011). Ce composé a montré une forte activité cytotoxique contre la lignée cellulaire KB (Lonergan *et al.*, 1992) et une activité antiproliférative contre Caco-2 cells (Mashado *et al.*, 2012).



**Figure III.9 :** Structure du composé CEIN-3, l'onopordopicrine

Les données relatives à l'analyse de différentes séquences de RMN sont reportées dans le tableau III.9.

Tableau III.9 : Les données spectrales RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-3

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	5,10 (1H, m)	130,6
2a	2,33 (1H, m)	26,4
2b	2,23 (1H, m)	26,4
3a	2,63 (1H, m)	34,8
3b	2,04 (1H, m)	34,8
4	-	145,3
5	4,98 (1H, d ; $J = 9,9$ )	129,4
6	5,23 (1H, t ; $J = 8,4$ )	78,2
7	3,30 (1H, m)	53,6
8	5,15 (1H, m)	74,0
9	2,58 (2H, m)	49,0
10	-	131,8
11	-	137,1
12	-	171,6
13a	6,21 (1H, d ; $J = 3,4$ )	124,1
13b	5,83 (1H, d ; $J = 2,8$ )	124,1
14	1,56 (3H, s)	16,6
15a	4,29 (1H, d ; $J = 11,3$ )	60,4
15b	4,04 (1H, d ; $J = 13,6$ )	60,4
1'	-	166,2
2'	-	141,4
3'a	6,31 (1H, d ; $J = 1,4$ )	125,8
3'b	6,00 (1H, d ; $J = 1,4$ )	125,8
4'	4,29 (2H, s)	61,2

#### III.6.4. Détermination structurale du composé CEIN-4

Le composé CEIN-4 est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et couleur rose après révélation par l'acide sulfurique.

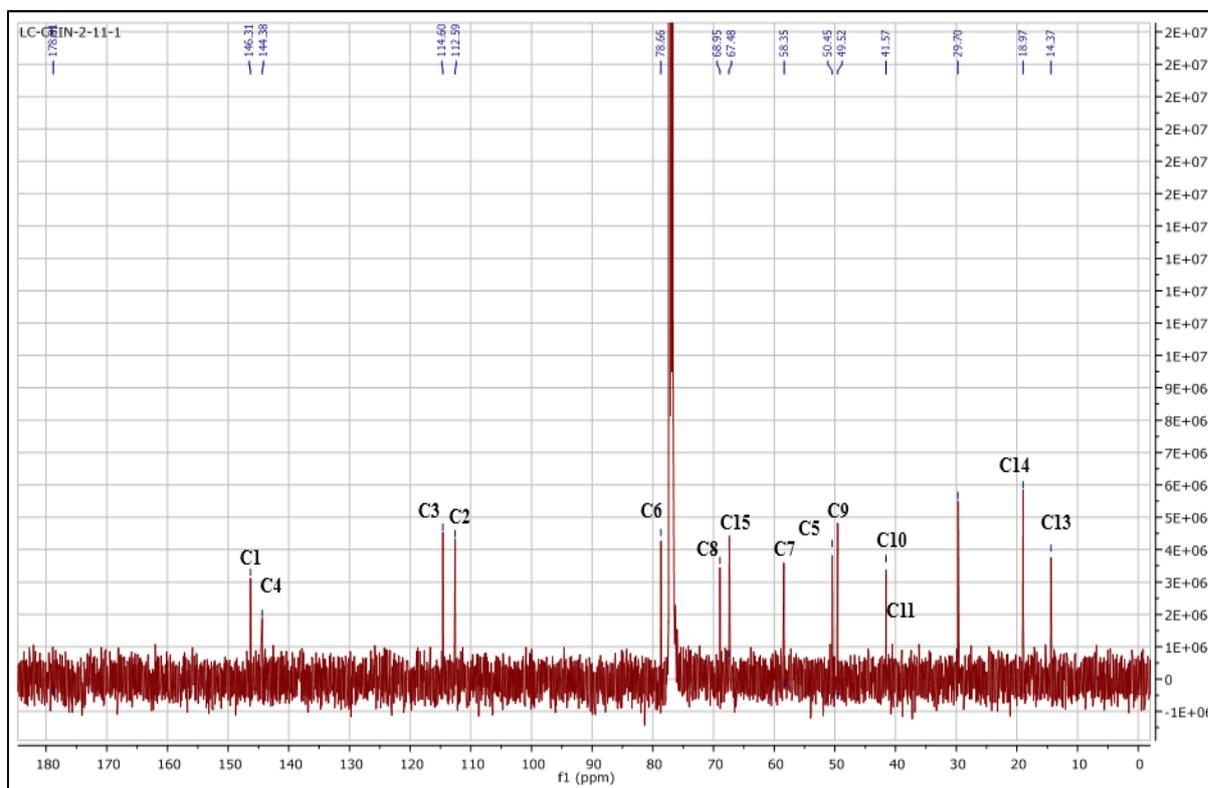
L'étude simultanée des spectres de RMN <sup>13</sup>C (spectre III.17) et HMBC (spectre III.23) du composé CEIN-4 montrent la présence de 15 atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- 3 carbones quaternaires dont :

- 1 à  $\delta_C = 178,2$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone sesquiterpénique  $\alpha$ ,  $\beta$ -saturée.
- 1 à  $\delta_C = 144,4$  ppm attribuable à un carbone éthylénique.
- 1 à  $\delta_C = 41,6$  ppm attribuable à un carbone hybridé  $sp^3$  et non oxygéné.

- 6 groupements CH dont :

- 1 éthylénique à  $\delta_C = 146,3$  ppm.
  - 1 à  $\delta_C = 78,7$  ppm (oxygéné) caractéristique d'un CH de fermeture d'une  $\gamma$ -lactone.
  - 1 oxygéné à  $\delta_C = 69,0$  ppm.
  - 3 non oxygénés à  $\delta_C = 58,4$  ; 50,5 et 41,4 ppm.
- 4 groupements  $\text{CH}_2$  dont :
- 2 éthyléniques à  $\delta_C = 112,5$  et 114,6 ppm.
  - 1 oxygéné à  $\delta_C = 67,4$  ppm.
  - 1 non oxygéné à  $\delta_C = 49,5$  ppm.
- 2 groupements  $\text{CH}_3$  à  $\delta_C = 18,9$  et 14,3 ppm.



**Spectre III.17** : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ) du produit CEIN-4

Un décompte de l'ensemble des noyaux formant ces groupements mène à une formule brute partielle de  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ . Comme cette molécule ne comporte que 15 atomes de carbone, cela suppose qu'ils sont tous engagés dans le squelette sesquiterpénique, par conséquent, les deux groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}$  oxygénés précédemment signalés, sont porteurs de groupements hydroxyles. Cette observation mène à une molécule de formule brute totale  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$  comportant 5 insaturations. Comme elle comporte une fonction lactone et deux doubles liaisons, il en résulte que cette lactone sesquiterpénique admet un squelette monocyclique.

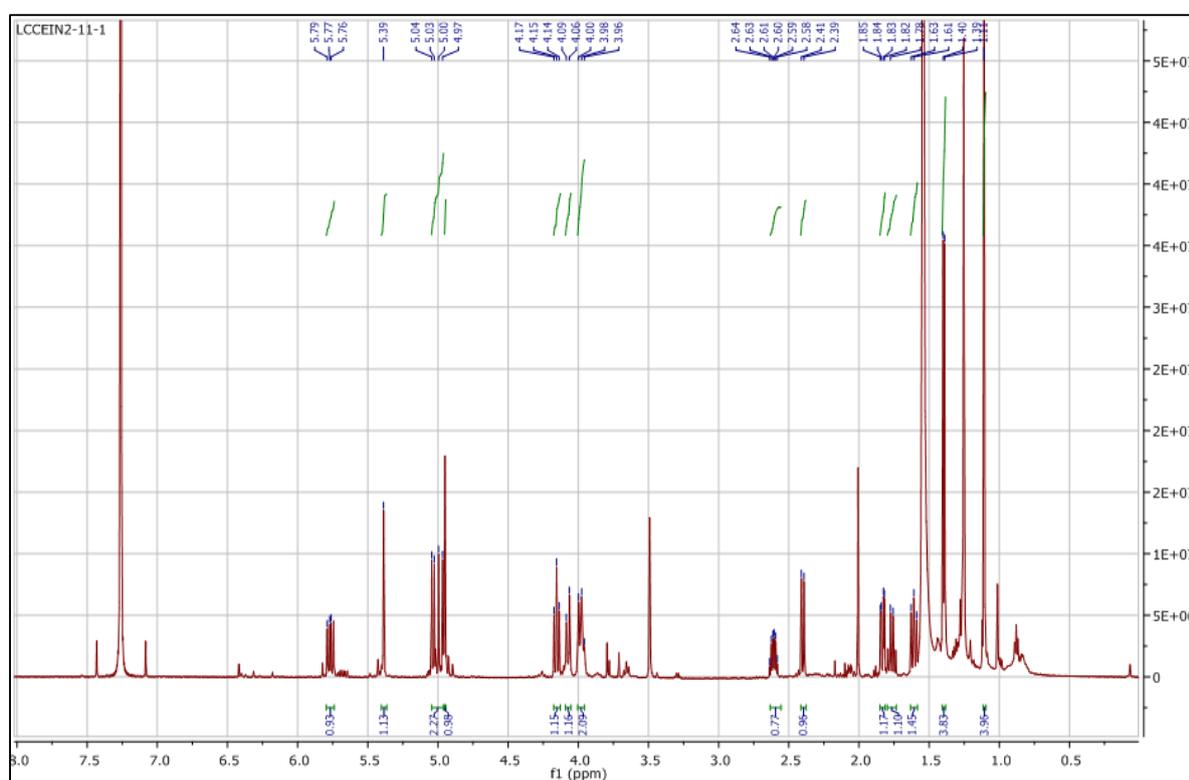
L'examen du spectre RMN- $^1\text{H}$  (spectre III.18) et ces étalements (spectre III.18a ; spectre III.18b) montre un singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}=1,10$  ppm, cette donnée ajoutée à la présence du carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}= 41,6$  ppm, oriente vers une structure portant un méthyle angulaire. Comme il s'agit d'un squelette sesquiterpénique monocyclique, il ne peut être que de type élémanolide. Cette hypothèse est confortée par :

- La présence d'un CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 17,4 ; 10,7$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 5,76$  ppm attribuable à H-1 qui corrèle sur le spectre HSQC au carbone résonant à  $\delta_{\text{C}} = 146,3$ .

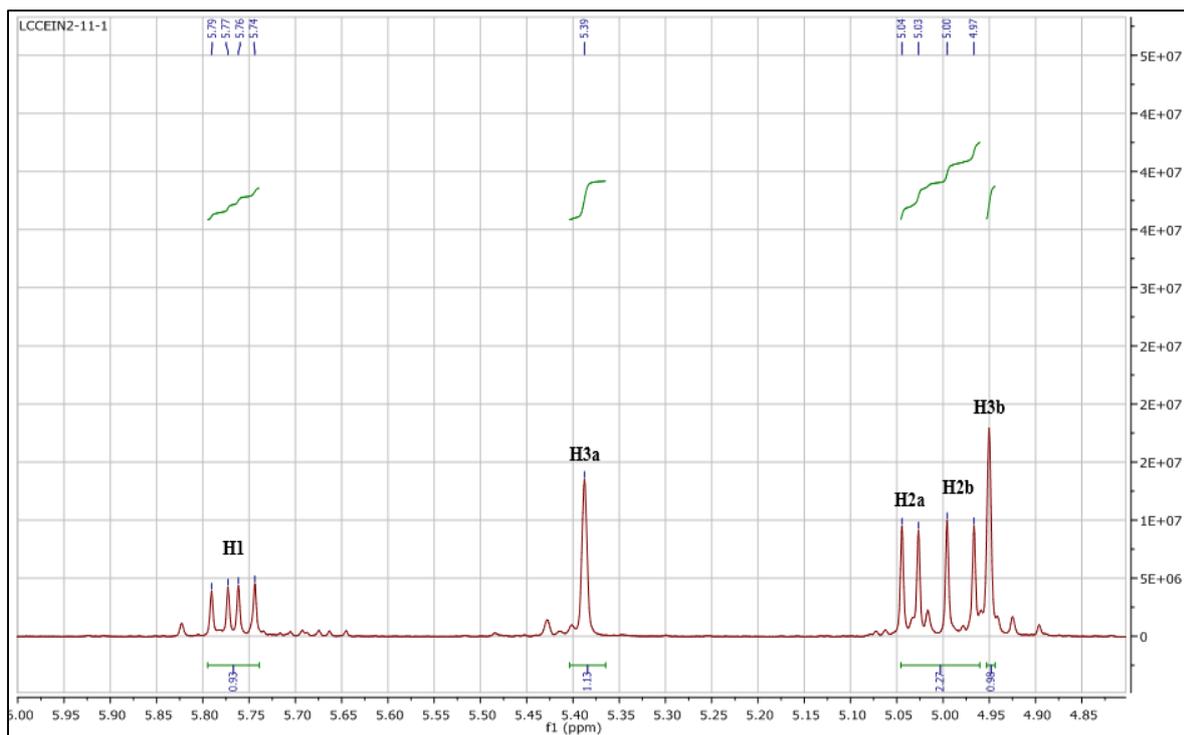
- La présence d'un  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}} = 112,50$  ppm) éthylénique résonant sous forme de deux doublets larges, le premier à  $\delta_{\text{H}} = 5,00$  ppm ( $J = 10,7$  Hz) ; le second à  $\delta_{\text{H}} = 4,97$  ppm ( $J = 17,4$  Hz).

Ces deux protons couplent dans le spectre COSY (spectre III.19) avec le proton du CH éthylénique précédent, ils sont attribuables à H-2a et H-2b respectivement.

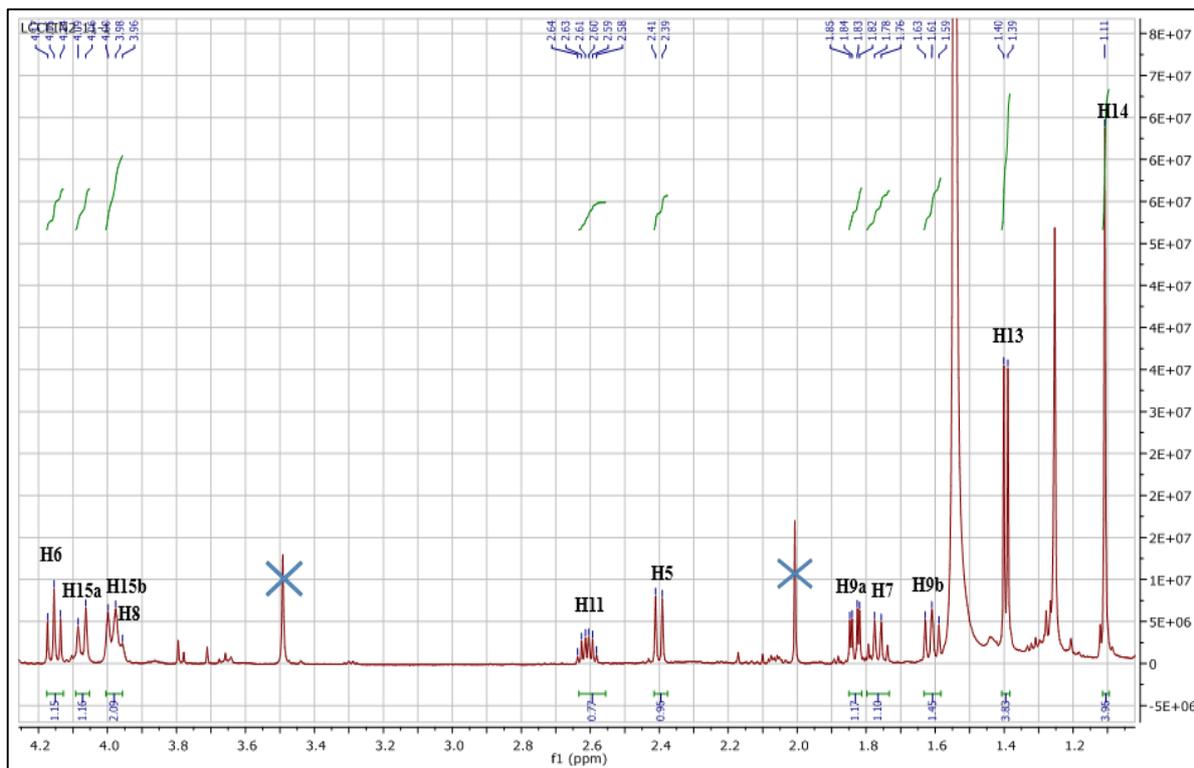
Le squelette élémene est également appuyé par la présence du groupement  $\text{CH}_2$  résonant sous forme de deux singulets larges à  $\delta_{\text{H}} = 5,37$  et 4,93 ppm attribuables à H-3a et H-3b, respectivement. Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC (spectre III.20a) au carbone résonant à  $\delta_{\text{C}} = 114,6$  ppm.



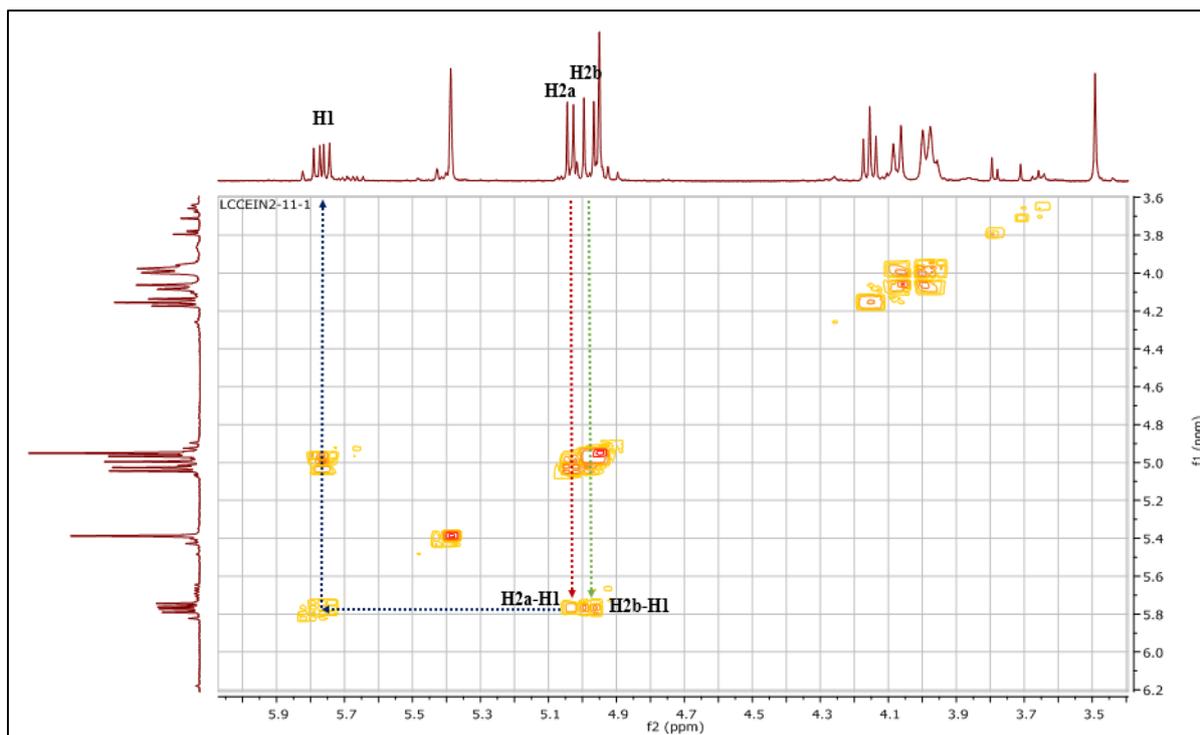
**Spectre III.18** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé CEIN-4



**Spectre III.18a :** Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) étalé (4,9 à 6,0 ppm) du composé CEIN-4



**Spectre III.18b :** Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) étalé (1,2 à 4,2 ppm) du composé CEIN-4

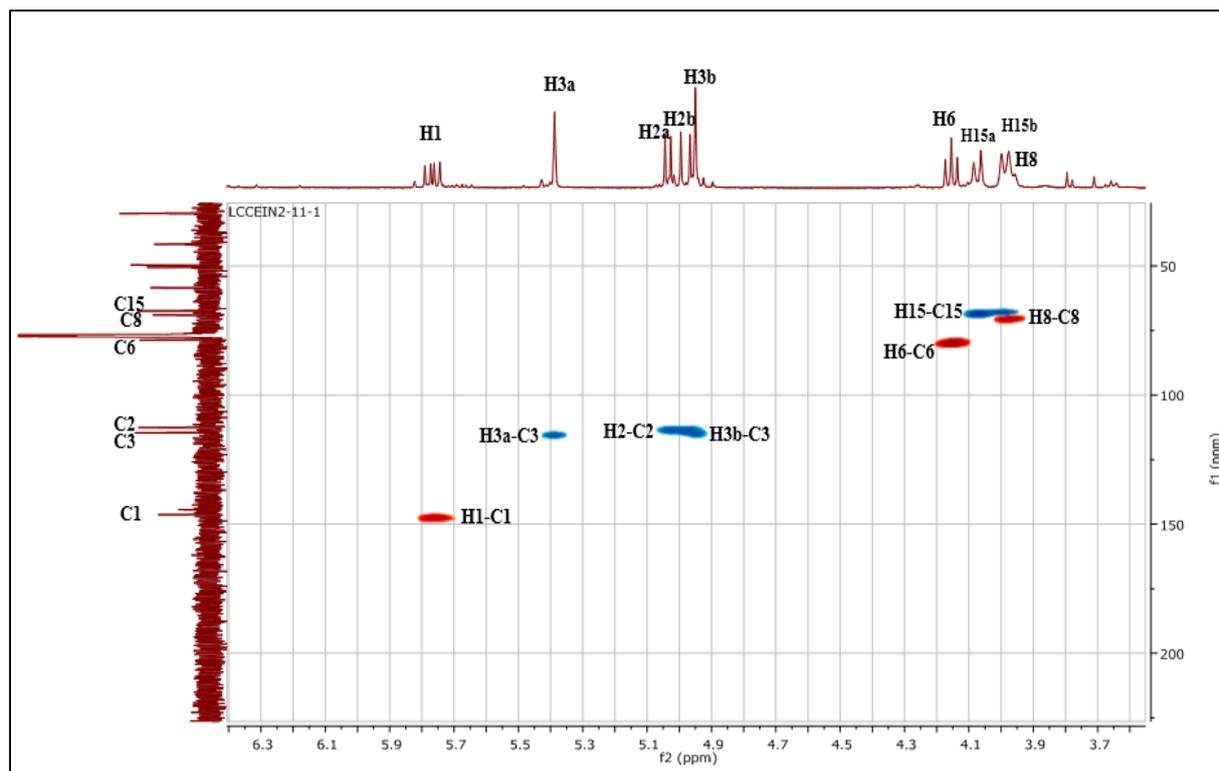


**Spectre III.19** : Spectre COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) étalé (3,5 à 5,9 ppm) du composé CEIN-4

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  (spectre III.18b) montre également un triplet à  $\delta_{\text{H}} = 4,15$  ppm ( $J = 11,8$  Hz), d'après sa multiplicité et son déplacement chimique ce noyau ne peut être que H-6. Sur le spectre HSQC (spectre III.20), H-6 corrèle avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 78,7$  ppm (C-6), le déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du carbone de fermeture d'une lactone sesquiterpénique. Cette donnée oriente vers un 6-12 élémanolide.

Selon le spectre HSQC (spectre III.20) le proton H-8 qui est sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,97$  ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 69,0$  ppm (C-8) le déplacement chimique de ce carbone indique la présence d'un groupement hydroxyle.

En effet, toujours sur le spectre de RMN- $^1\text{H}$  qui montre un système AB à  $\delta_{\text{H}} = 4,06$  ppm (d,  $J = 13,6$  Hz) et 3,99 ppm (d,  $J = 13,3$  Hz) ppm attribuable, vu la multiplicité, à H-15a et H-15b respectivement. Selon le spectre HSQC (spectre III.21) ces noyaux corrélaient avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 67,4$  ppm la valeur de déplacement chimiques confirme bien la présence d'un groupement hydroxyle.



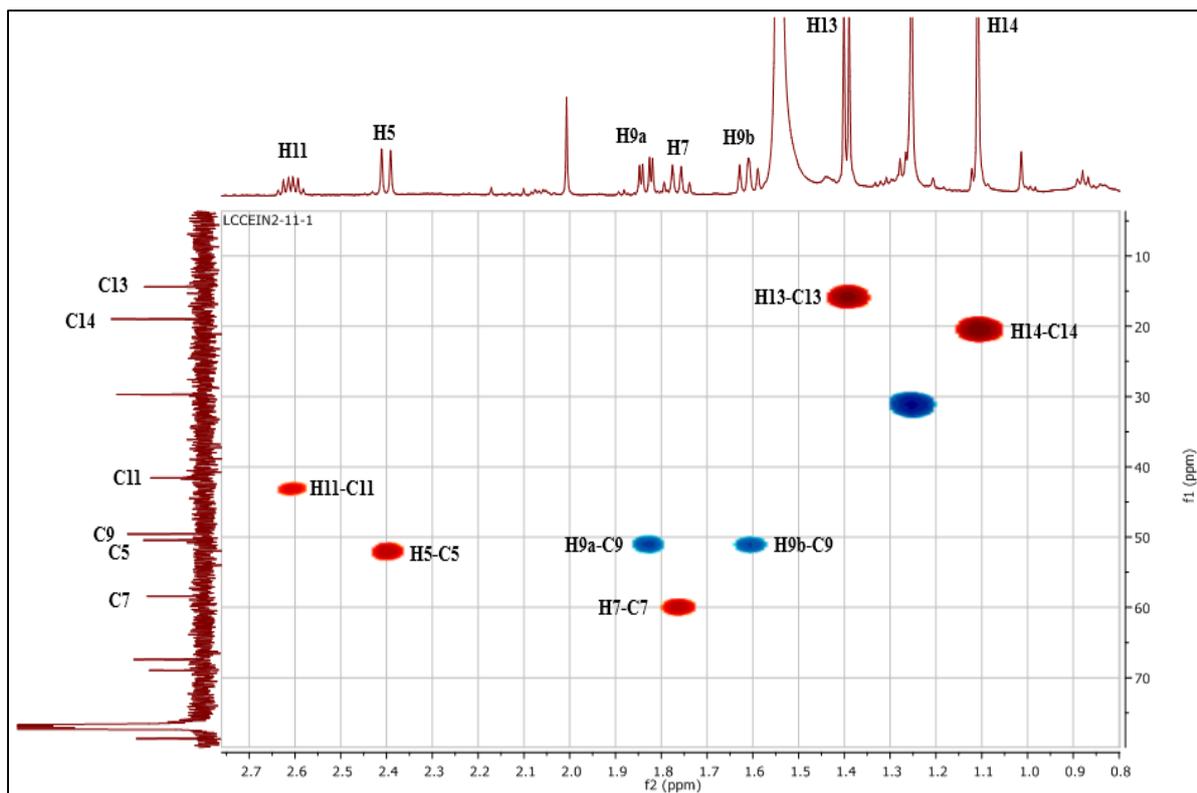
**Spectre III.20** : Spectre HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) étalé (3,7 à 6,3 ppm) du composé CEIN-4

Le spectre relatif à l'expérience COSY (spectre III.22) montre en effet, des taches de corrélation nettes entre le proton de fermeture de la lactone et le proton dont le signal est situé à  $\delta_{\text{H}} = 1,77$  ppm (q,  $J = 10,74$  Hz) ce dernier proton est attribuable au H-7 qui corrèle avec le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 58,4$  ppm selon le spectre HSQC (spectre III.21).

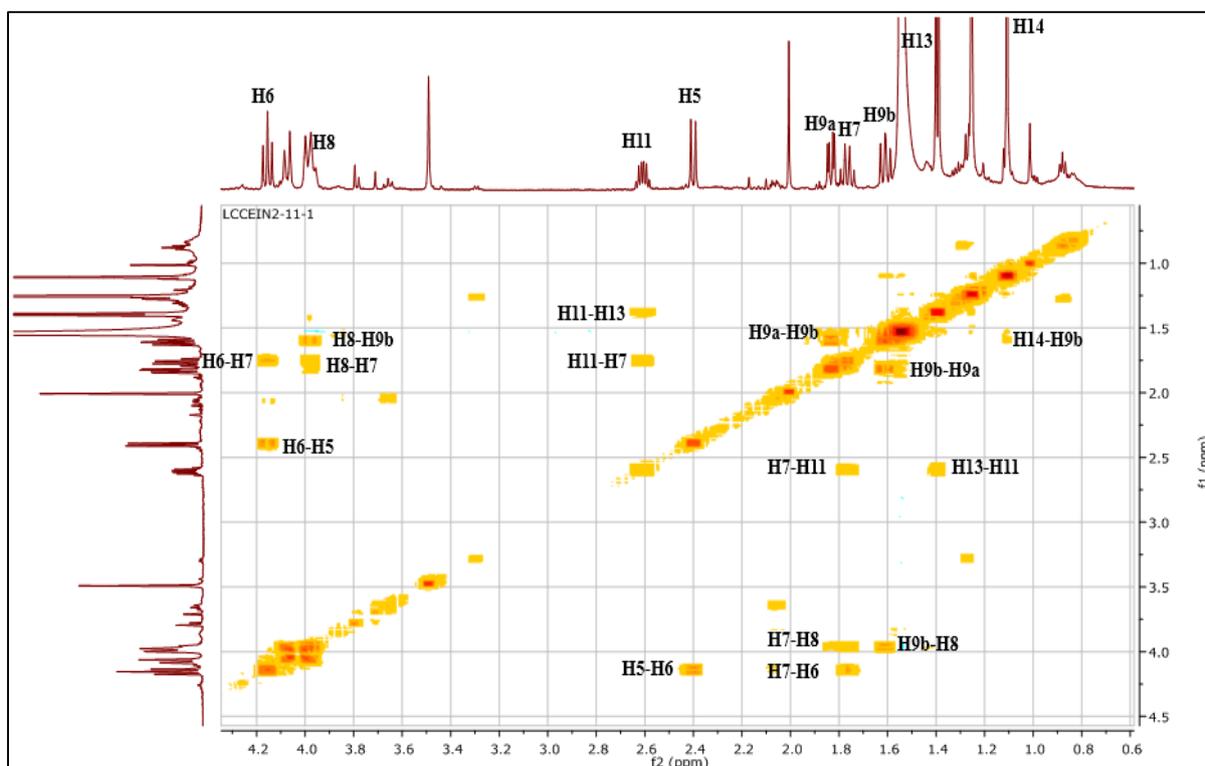
L'attribution de H-7 mène à celle de H-11 du cycle  $\gamma$ -lactonique à  $\delta_{\text{H}} = 2,60$  ppm (dq,  $J = 15,0$  ;  $6,0$  Hz ;  $\delta_{\text{C}} = 41,3$  ppm). Ce proton (H-11) corrèle avec les protons du  $\text{CH}_3$  résonant à  $\delta_{\text{H}} = 1,39$  (d,  $J = 6,9$  Hz ;  $\delta_{\text{C}} = 14,3$  ppm), permettant alors l'attribution de ce méthyle au carbone et protons de la position 13.

Par ailleurs et toujours grâce au spectre COSY (spectre III.22), l'attribution de H-8 permet de localiser les signaux des protons (H-9 $\beta$ ) à  $\delta_{\text{H}} = 1,82$  ppm (dd,  $J = 11,1$  ;  $2,1$  Hz) et (H-9 $\alpha$ ) à  $\delta_{\text{H}} = 1,60$  ppm (dl,  $J = 11,4$  Hz) Ces deux protons sont portés par le carbone  $\delta_{\text{C}} = 49,5$  ppm.

Dans le même spectre COSY on remarque une corrélation entre le groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 1,10$  ppm et le proton H-9 $\beta$ , cela indique que ce méthyle est porté par le carbone voisin C-10.



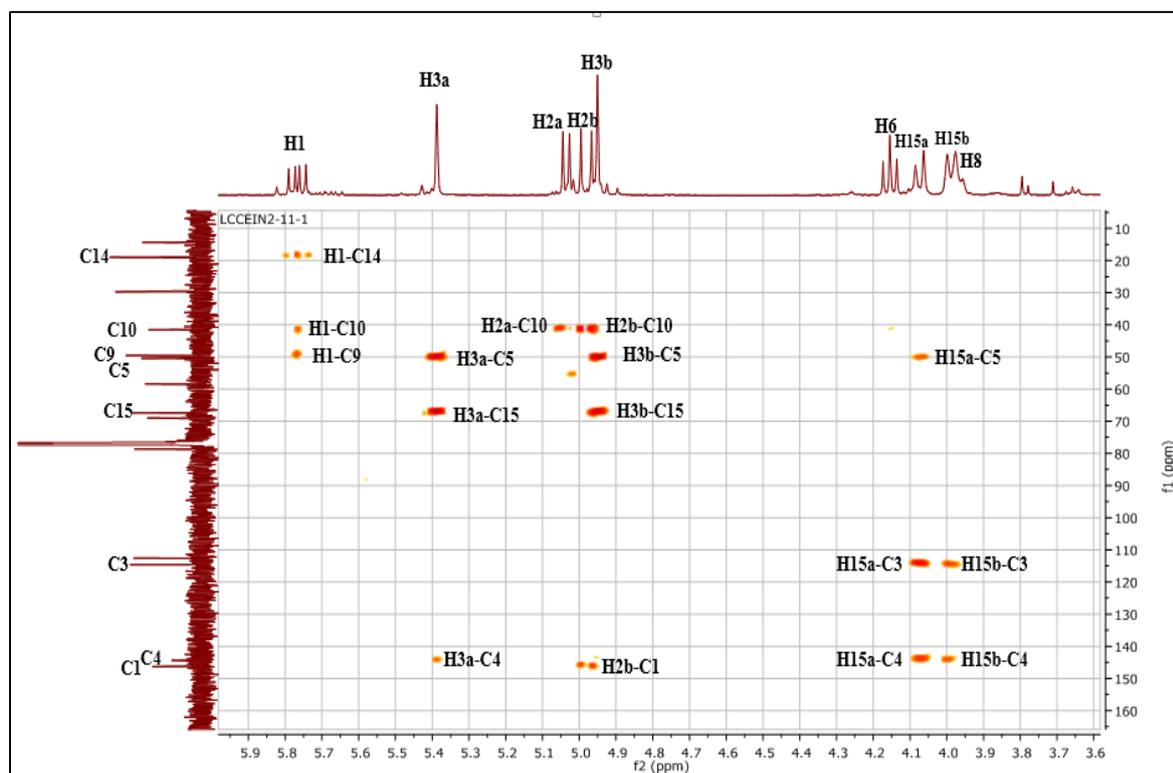
Spectre III.21 : Spectre HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) étalé (0,8 à 2,7 ppm) du composé CEIN-4



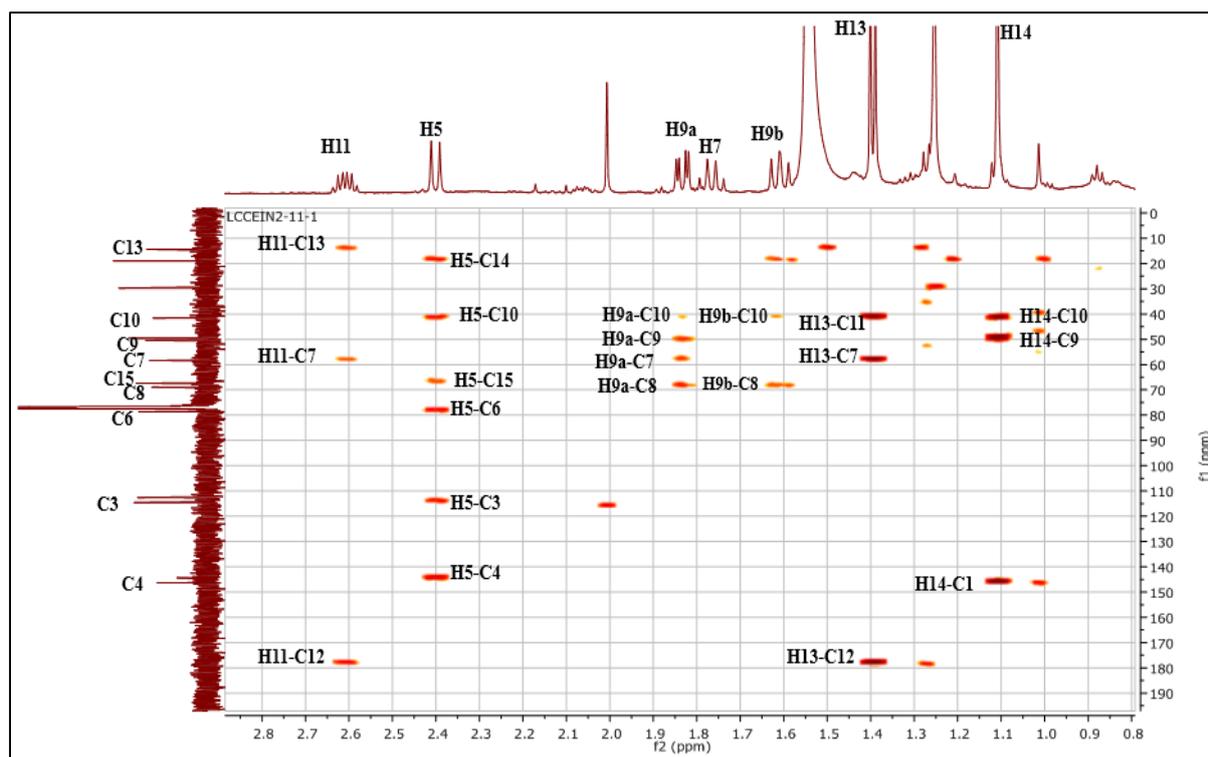
Spectre III.22 : Spectre COSY (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) étalé (0,6 à 4,2 ppm) du composé CEIN-4

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.23) et leur étalement (spectre III.23a) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- ✓ Le proton H-13 montre une corrélation avec :
  - le carbone à  $\delta_c = 178,2$  ppm attribuable au carbone C-12.
  - le carbone à  $\delta_c = 58,4$  ppm attribuable C-7.
  - le carbone à  $\delta_c = 41,4$  ppm attribuable au carbone C-11.
- ✓ le proton H-5 montre une corrélation avec :
  - le carbone du groupement CH<sub>2</sub> éthylénique à  $\delta_c = 114,6$  ppm attribuable au carbone C3.
  - le carbone à  $\delta_c = 41,6$  ppm attribuable au carbone C-10.
  - le carbone éthylénique à  $\delta_c = 144,4$  ppm attribuable au C-4.
  - le carbone oxygéné à  $\delta_c = 67,2$  ppm attribuable au carbone C-15.
  - le carbone de fermeture d'elemanolide  $\delta_c = 78,7$  ppm attribuable au C-6.
- ✓ Le proton H-1 montre une corrélation avec :
  - le carbone à  $\delta_c = 41,6$  ppm attribuable au carbone C-10.
  - le carbone à  $\delta_c = 18,9$  ppm attribuable au carbone de methyl en position 14.
  - le carbone à  $\delta_c = 49,5$  ppm attribuable au carbone C-9.

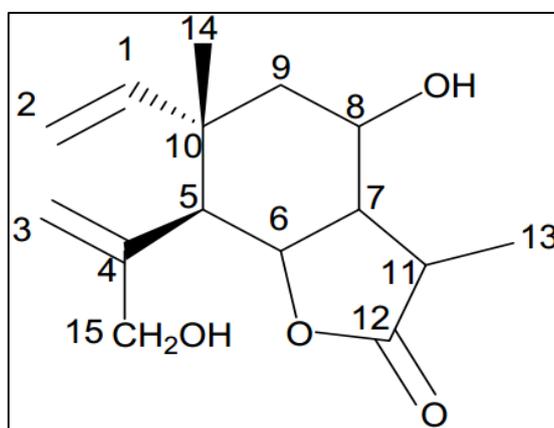


**Spectre III.23** : Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) étalé (3,6 à 5,9 ppm) du composé CEIN-4



**Spectre III.23a** : Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) étalé (0,8 à 2,8 ppm) du composé CEIN-4

L'ensemble de ces données mène à la formule partielle plane reportée dans la figure III.10.



**Figure III.10** : Structure plane du composé CEIN-4

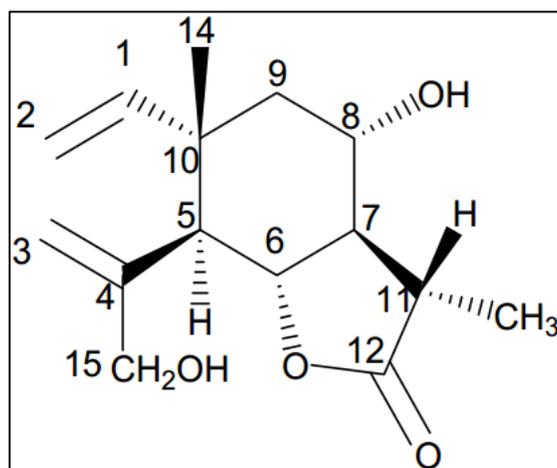
Cette molécule renferme 6 centres asymétriques qui sont : C-10, C-5, C-6, C-7, C-8, et C-11.

- La stéréochimie de C-10 est déduite de la valeur du déplacement chimique du CH<sub>3</sub>-14 qui lui confère une orientation β.
- le signal H-7 est sous forme d'un quadruplet avec une constante de couplage de 10,7 Hz indiquant des couplages vicinaux axial –axial H-7 comme est très probablement en position α,

H-6 et H-8 sont en position  $\beta$ , le proton H-5 montre une constante de couplage de l'ordre de 11 Hz indiquant un couplage axial-axial avec H-6 donc il est en position  $\alpha$

- La stéréochimie de C-11 est déduite du signal de H-11 (dq,  $J=15,0 ; 6,0$  Hz), où il apparaît clairement que H-11 et H-7 admettent une disposition trans, orientant ainsi vers une stéréochimie  $\beta$  pour H-11.

Ces dernières informations mènent à la structure finale du composé CEIN-4 reportée dans la figure III.11, elle est connue sous le nom de **melitensine**.



**Figure III.11** : Structure finale du composé CEIN-4, la **melitensine**

Ce composé a été isolé la première fois chez *Centaurea melitensis* par González (**González et al., 1974**), par la suite il a été isolé de *C. aspera* (**Cardona et al., 1991**), *C. napifolia* (**Bruno et al., 1995**), *C. calcitrapa* (**Marco et al., 1992**), *C. nicaensis* (**Medjroubi et al., 2003**), *C. grisebachii* (**Djeddi et al., 2008**). Selon (**Djeddi et al., 2008**) ce produit se caractérise par son efficacité antifongique et antibactérienne.

Les résultats des études par spectroscopie de RMN- $^1\text{H}$  et RMN- $^{13}\text{C}$  sont résumés dans les tableaux III.10.

Tableau III.10 : Les données spectrales RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-4

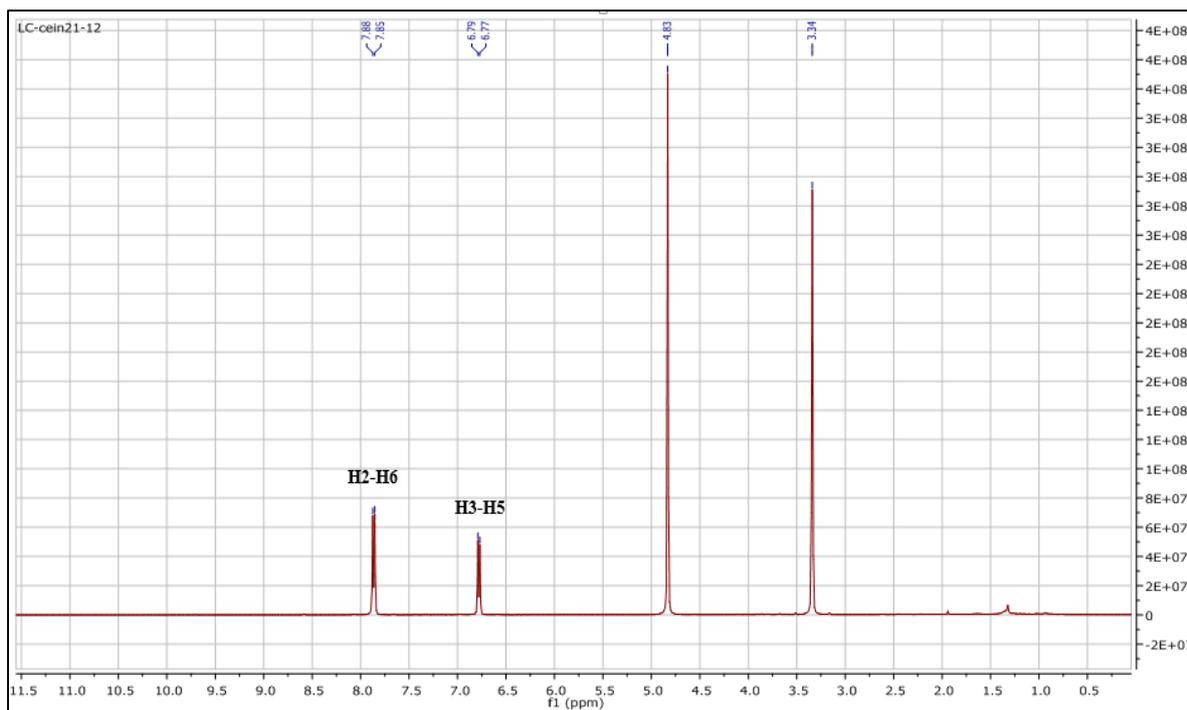
Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	5,76 (1H, dd ; $J = 10,7 ; 17,4$ )	146,3
2a	5,00 (1H, dl ; $J = 10,7$ )	112,5
2b	4,97 (1H, dl ; $J = 17,4$ )	112,5
3a	5,37 (1H, sl)	114,6
3b	4,93 (1H, sl)	114,6
4	-	144,4
5	2,39 (1H, d ; $J = 11,7$ )	50,5
6	4,15 (1H, t ; $J = 11,2$ )	78,7
7	1,77 (1H, q ; $J = 10,7$ )	58,4
8	3,97 (1H, m)	69,0
9a	1,82 (1H, dd ; $J = 11,1 ; 2,1$ )	49,5
9b	1,60 (1H, dl ; $J = 11,4$ )	49,5
10	-	41,6
11	2,61 (1H, dq ; $J = 15,0 ; 6,0$ )	41,35
12	-	178,2
13	1,39 (3H, d ; $J = 6,9$ )	14,3
14	1,10 (3H, s)	18,9
15a	4,06 (1H, d ; $J = 13,6$ Hz)	67,4
15b	3,99 (1H, d ; $J = 13,3$ Hz)	67,4

### III.6.5. Détermination structurale du composé CEIN-5

Le composé CEIN-5 est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et incolore après révélation par l'acide sulfurique.

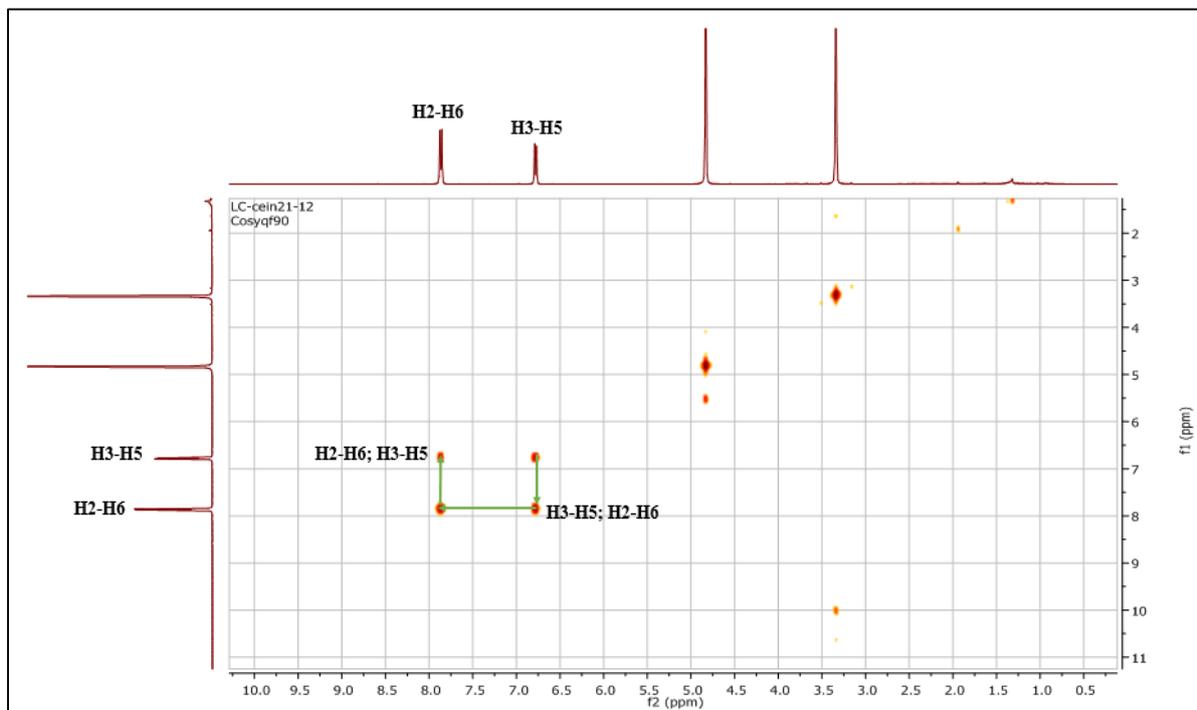
L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.24), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique para substitué est caractérisé par :

- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta_H = 7,86$  ppm ( $J = 8,5$  Hz), attribuable aux positions H-2, H-6 de ce noyau aromatique.
- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta_H = 6,78$  ppm ( $J = 8,5$  Hz), attribuable aux positions H-3, H-5 de ce noyau aromatique.



**Spectre III.24 :** Spectre RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé CEIN-5

Le spectre COSY (spectre III.25) montre en effet les interactions entre les protons aromatiques H-5, H-3 et H-6, H-2 confirmant le couplage ortho et la substitution para du cycle benzénique.

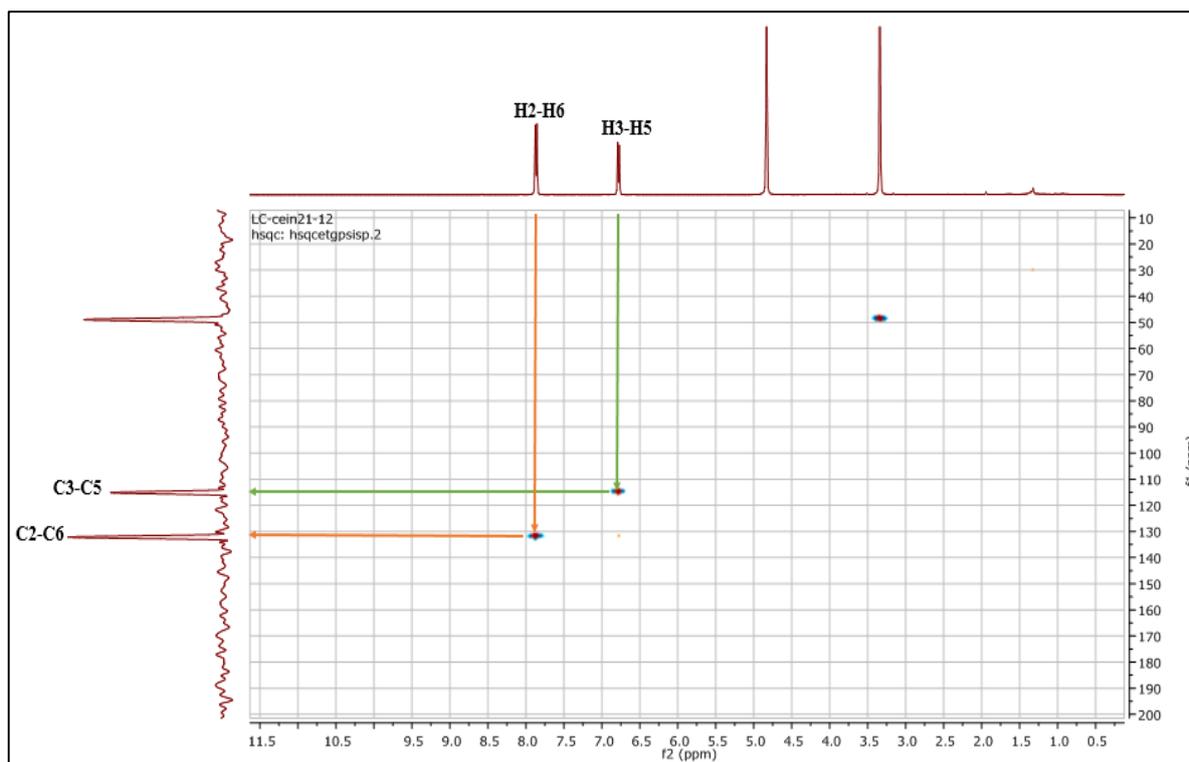


**Spectre III.25 :** Spectre COSY (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du produit CEIN-5

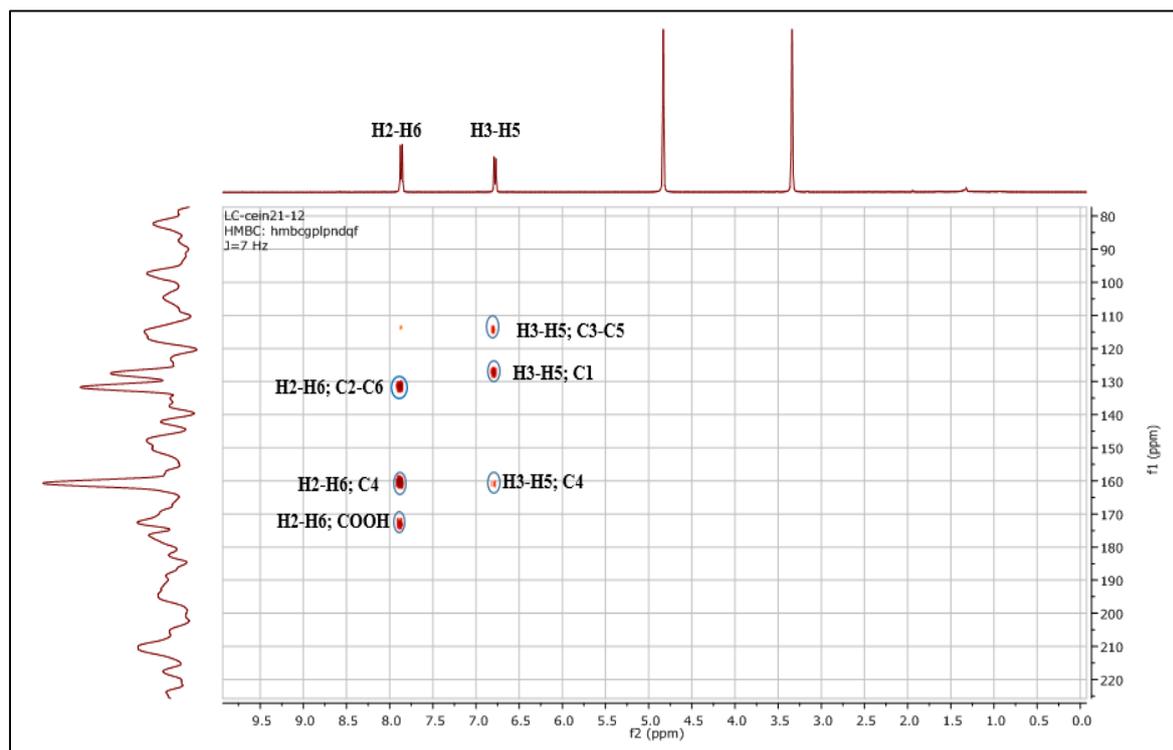
La présence de cycle benzénique para substitué est confirmée aussi par l'analyse du spectre HSQC (spectre III.26) et HMBC (spectre III.27), qui montrent en effet :

- Un signal à  $\delta_c = 132,2$  ppm attribuable aux carbones C-2 et C-6 et le signal à  $\delta_c = 115,2$  ppm aux carbones C-3 et C-5.
- Un carbone quaternaire à  $\delta_c = 173,1$  ppm, dont la valeur du déplacement chimique indique qu'il s'agit d'un carbonyle d'acide.
- Un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_c = 160,7$  ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique, il est clair qu'il est oxygéné. Vu l'attribution de la fonction acide, ce carbone ne peut donc être porteur que d'un groupement hydroxyle, il sera donc numéroté C-4.
- Un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_c = 127,5$  ppm ne pouvant être que le C-1.

Ces observations sont en faveur d'un para substitution du noyau aromatique par un groupement COOH d'une part et un groupement OH d'autre part.

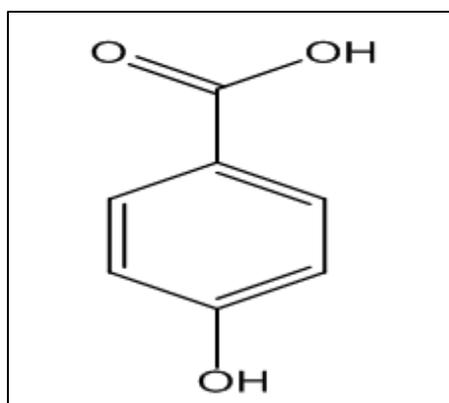


Spectre III.26 : Spectre HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-5



**Spectre III.27** : Spectre HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé CEIN-5

L'ensemble des données de cette analyse permet de décrire le composé CEIN-5 comme étant acide para-hydroxy benzoïque (figure III.12).



**Figure III.12** : la structure du composé CEIN-5, acide para-hydroxy benzoïque.

Ce composé est décrit pour la première fois chez les Zygophyllaceae. Pour le genre *Centaurea* il a été isolé dans les espèces suivantes : *C. regia* (Ulubelen *et al.* 1988) ; *C. aspera subsp* (Picher *et al.* 1984) et *C. athena* DC. (Demir *et al.* 2016). Ce produit possède des activités antibactériennes, antifongiques, antialgales, antimutagènes, antisickling et œstrogéniques (Iswandana *et al.* 2016).

Le tableau III.11 reporte les données relatives aux spectres RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C.

**Tableau III.11** : Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé CEIN-5

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, J(Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	/	127,5
2	7,86 (1H, d ; J = 8,5)	132,2
3	6,78 (1H, d ; J = 8,5)	115,2
4	/	160,7
5	6,78 (1H, d ; J = 8,5)	115,2
6	7 86 (1H, d ; J = 8,5)	132,2
7	/	173,1

### III.6.6. Détermination structurale du composé CEIN-6

b) 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 d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol donnant deux bandes d'absorption maximale, la bande I à  $\lambda_I = 344$  nm maximale et la bande II à  $\lambda_{II} = 274$ nm oriente vers la structure d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

L'addition du réactif NaOH, provoquant un déplacement bathochrome de ( $\Delta\lambda_I = + 62$  nm) de la bande I, avec une augmentation de l'intensité indique la présence d'un OH libre en position 4' (4' - OH). L'apparition d'une nouvelle bande à  $\lambda_{max} = 335$  nm dans ce spectre indique la présence d'un hydroxyle libre (OH) en position C-7 (7-OH).

La comparaison du spectre enregistré en présence de  $AlCl_3+HCl$  et celui enregistré dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +20$  nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en C-6. Le faible déplacement hypsochrome de la bande I après l'ajout de HCl a  $AlCl_3$  par rapport à  $AlCl_3$  ( $\Delta\lambda = -10$  nm), montre l'absence d'un système *ortho*- di-OH au niveau du noyau B.

Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le Tableau III.12 et Figure III.13.

Tableau III.12 : Résultats de la série spectrale UV –Vis du composé CEIN-6

Réactifs	Bande I	Bande II	Autre bande	Interprétation
MeOH	344	274	/	Flavone
NaOH	406	260	335	4'-OH et 7-OH
NaOH+5min	406	260	336	Spectre stable
AlCl <sub>3</sub>	374	281	/	/
AlCl <sub>3</sub> +HCl	364	285	/	5-OH+OR enC-6

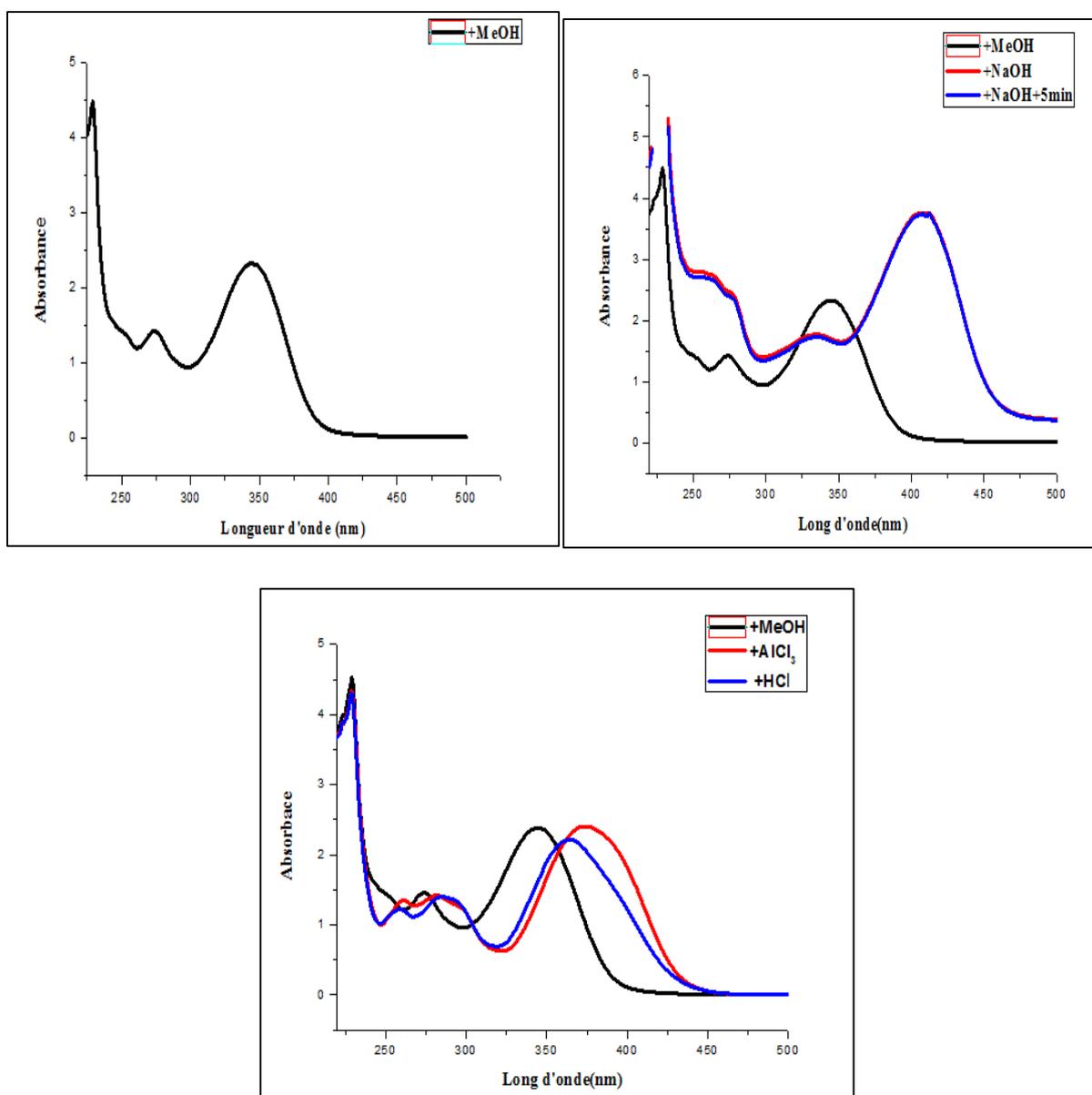
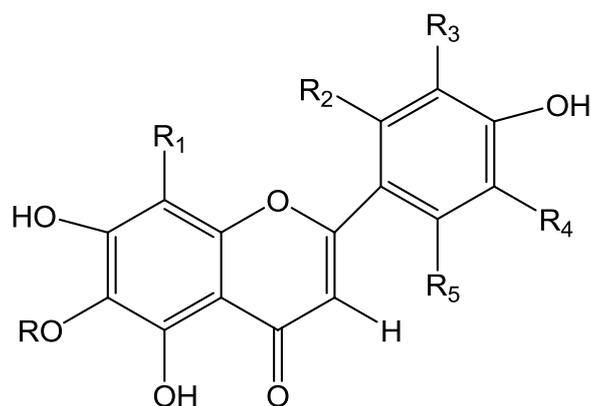


Figure III.13 : La série spectrale UV-Visible du composé CEIN-6

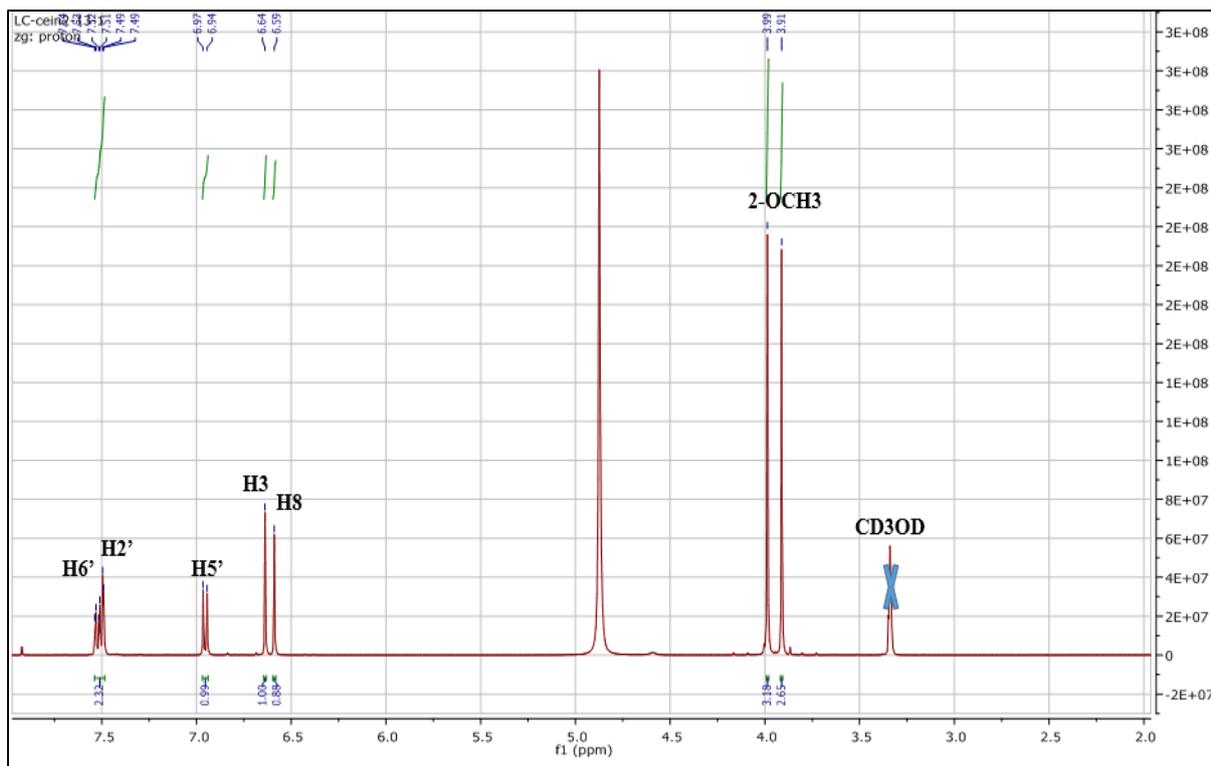
Ces données mènent à la structure partielle suivante :



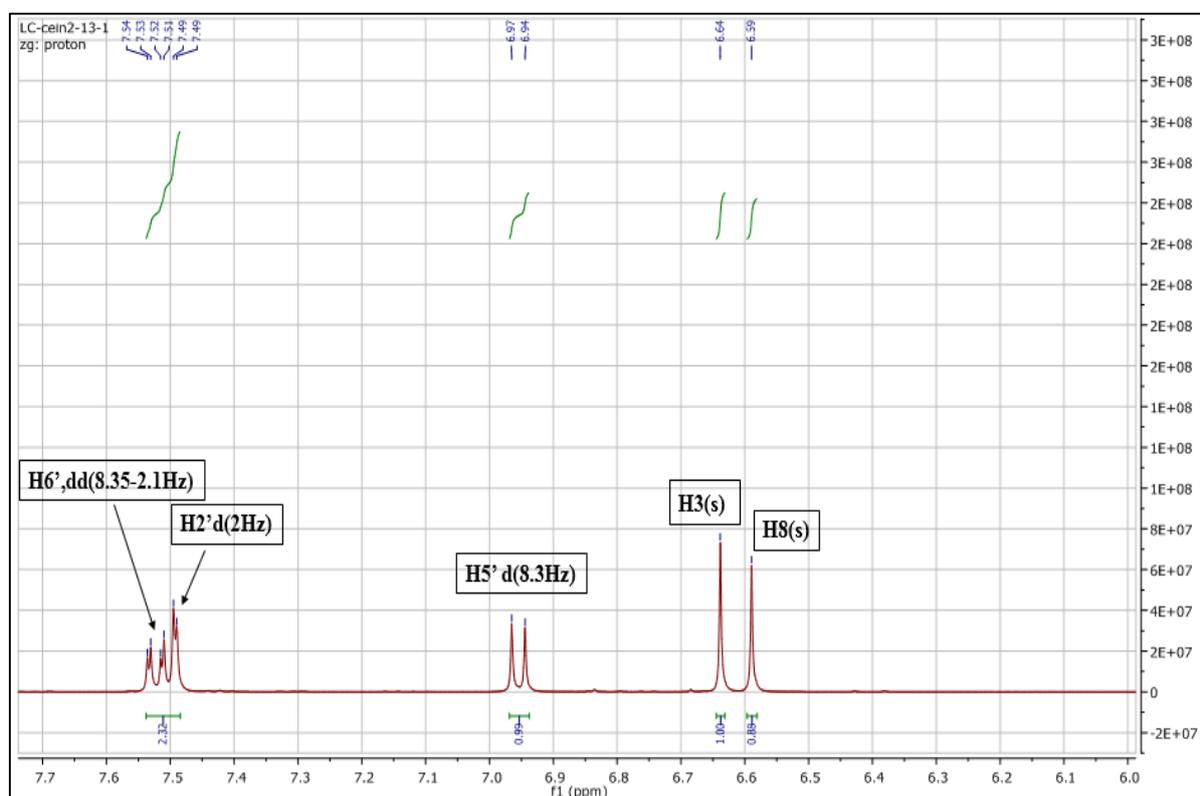
**Figure III.14** : Structure partielle du composé CEIN-6 selon les données UV-Vis

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.28, spectre III.28a) enregistré à 600 MHz dans le méthanol de ce composé, montre qu'il s'agit bien d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par :

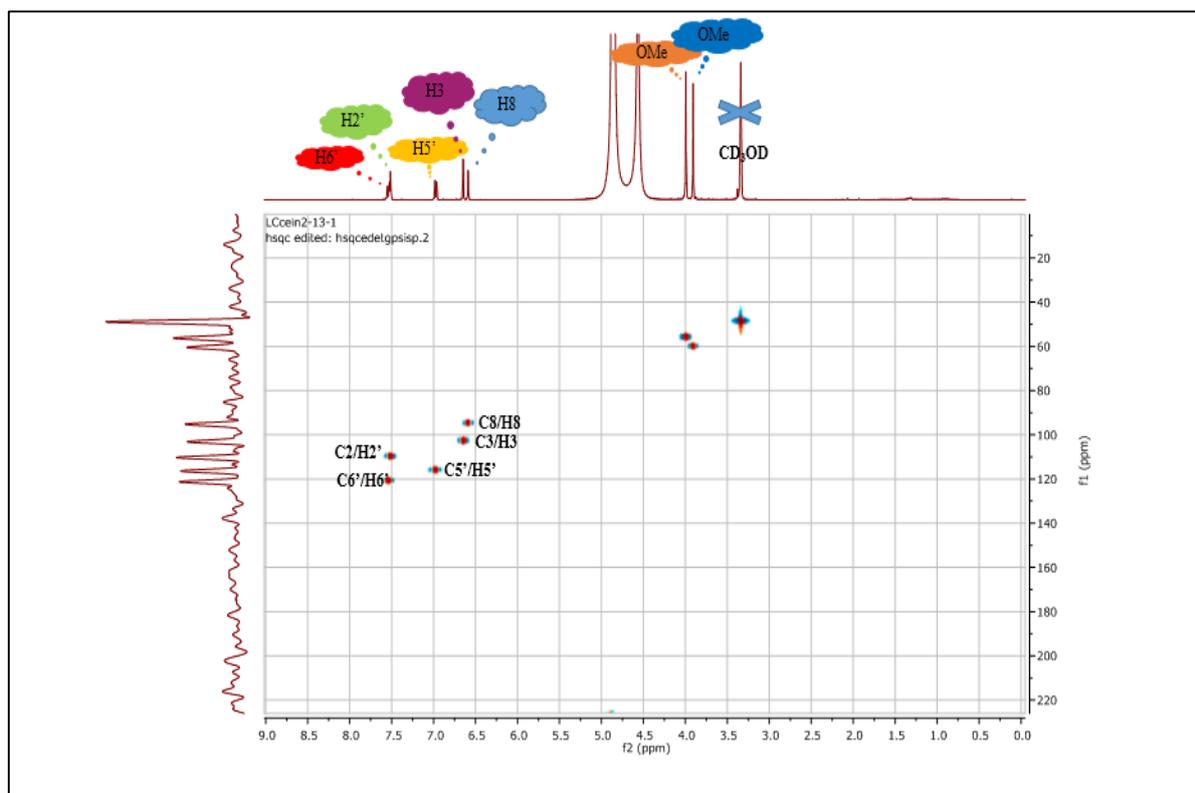
- Un signal d'intégration 2H composé d'un doublet de doublet à  $\delta_H = 7,53$  ppm ( $J = 8,3 ; 2,1$  Hz) partiellement recouvert par un doublet à  $\delta_H = 7,51$  ppm ( $J = 2,0$  Hz). Ces deux noyaux sont attribuables à H-6' et H-2', respectivement, du cycle B.
- Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta_H = 6,97$  ppm ( $J = 8,3$  Hz) attribuable à H-5' du cycle B.
- Deux singulets intégrant chacun pour un proton à  $\delta_H = 6,64$  ppm et  $\delta_H = 6,58$  ppm attribuables à H-3 et à H-8, respectivement. Ces attributions ont été effectuées sur la base de l'analyse du spectre HSQC (spectre III.29) où l'on relève une corrélation entre le proton à  $\delta_H = 6,64$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 103,2$  ppm dont la valeur du déplacement chimique ne peut correspondre qu'au C-3 et une corrélation entre le proton à  $\delta_H = 6,58$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 95,2$  ppm dont la valeur du déplacement chimique est en faveur du C-8.
- Deux singulets à  $\delta_H = 3,98$  ppm et à  $\delta_H = 3,90$  ppm intégrant pour 3 protons chacun confirmant la présence de deux groupements méthoxyles. Sur le spectre HSQC les protons de ces méthyles corrélaient avec les carbones à  $\delta_C = 56,2$  ppm et à  $\delta_C = 60,4$  ppm, respectivement.



Spectre III.28 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-6

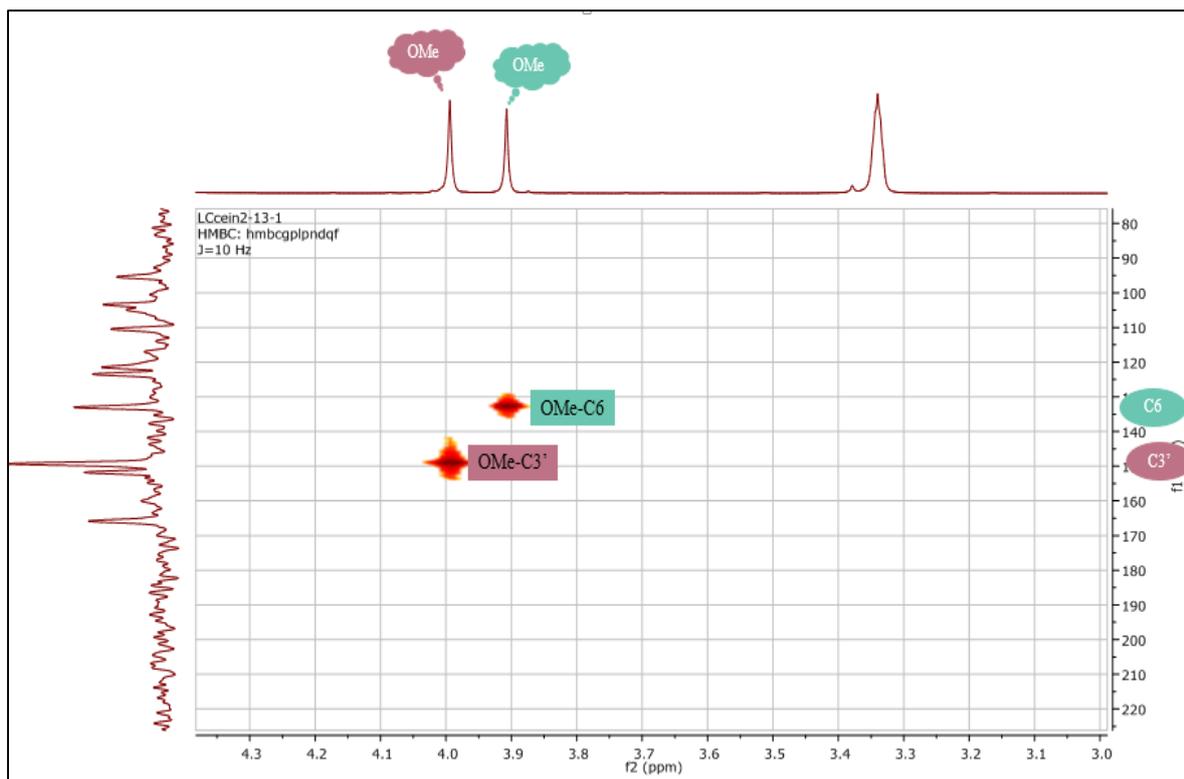


Spectre III.28a : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (6 à 7,7 ppm) du produit CEIN-6



**Spectre III.29** : Spectre HSQC (600 M Hz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-6

Sur le spectre HMBC (spectre III.30) les protons des méthoxyles à  $\delta_H = 3,90$  ppm montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 133,0$  ppm, ce carbone ne peut être attribué qu'au carbone C-6 du cycle A, vu la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation nette avec le proton H-8 ce qui confirme la méthylation de cette molécule en cette position. Quant aux protons du méthyle à  $\delta_H = 3,98$  ppm ils montrent une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 149,3$  ppm, lequel montre une tache de corrélation avec le proton H-5'. Ces observations permettent son attribution à C-3'.



**Spectre III.30** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé (3,0 à 4,3 ppm) du composé CEIN-6

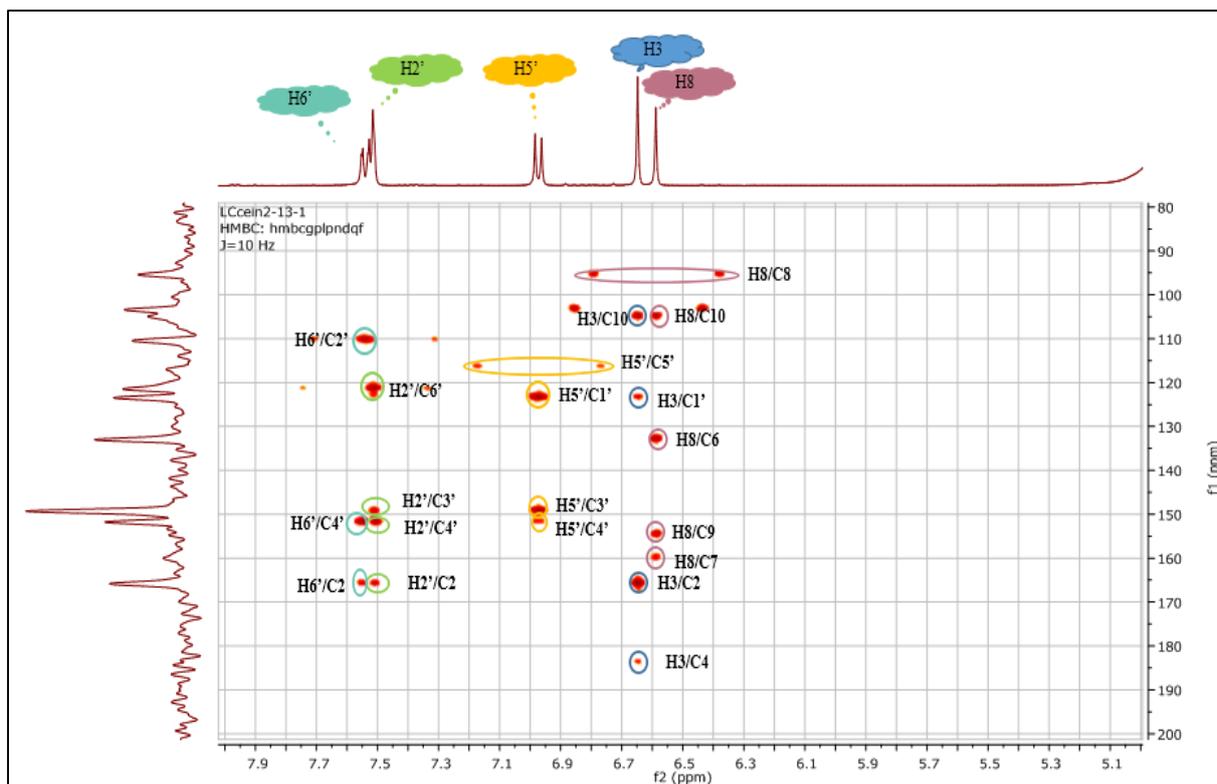
L'analyse combinée des spectres HSQC (spectre III.29) et HMBC (spectre III.30a) permet d'attribuer les autres carbones de la molécule notamment :

- ✓ Le C-2' à  $\delta_C = 110,3$  ppm grâce à la corrélation avec H-2'  $\delta_H$  (7,51 ppm) sur le spectre HSQC.
- ✓ Le C-6' à  $\delta_C = 121,3$  ppm grâce à la corrélation avec H-6'  $\delta_H$  (7,53 ppm) sur le spectre HSQC.
- ✓ Le C-5' à  $\delta_C = 116,5$  ppm grâce à la corrélation avec H-5'  $\delta_H$  (6,97 ppm) sur le spectre HSQC
- ✓ Le carbone C-4' à  $\delta_C = 151,7$  ppm, grâce à ses corrélation avec les trois protons : H-2', H-5' et H-6' sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-1' à  $\delta_C = 123,5$  ppm, grâce à ses corrélation avec les deux protons : H-5' et H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-3' à  $\delta_C = 149,3$  ppm, grâce à ses corrélation avec les deux protons : H-2' et H-5' sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-2 à  $\delta_C = 165,9$  ppm, grâce à ses corrélation avec les trois protons : H-2', H-6' et H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le carbone C-10 à  $\delta_C = 105,1$  ppm, grâce à ses corrélation avec les deux protons : H-8 et

H-3 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.

✓ Le carbone C-7 à  $\delta_C = 159,9$  ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-8 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.

✓ Le carbone C-9 à  $\delta_C = 154,6$  ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-8 sur le spectre HMBC et la valeur de son déplacement chimique.



**Spectre III.30a** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé (5,1 à 7,9 ppm) du composé CEIN-6

La combinaison de l'ensemble de ces données mène à la structure de la 5, 7, 4'-trihydroxy-3', 6-diméthoxyflavone connue sous le nom jacéosidine (figure III.15).

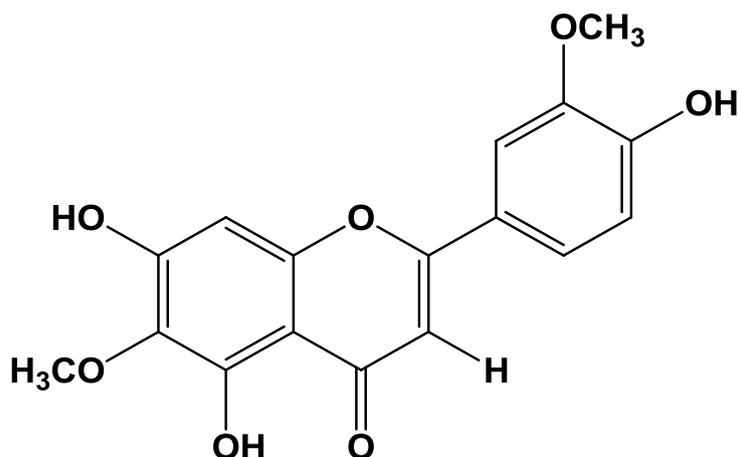


Figure III.15 : La structure du composé CEIN-6, la jacéosidine

La littérature reporte la présence de ce flavonoïde dans le genre *Centaurea* (Asteraceae). Elle a été isolée de : *C. pallescens* (Ehsan *et al.*, 1987), *C. alexandrina* (Ismail *et al.*, 1986 ; Kubacey *et al.*, 2012) , *C. cineraria* ssp. *Umbrosa* (Bruno *et al.*, 1988), *C. aspera* var. *subinermis* (Cardona *et al.*, 1991), des racines de *C. jacea* (Harborne *et al.*, 1999), *C. arguta* ( Gadeschi *et al.*, 1989), des fleurs de *C. ruthenica* une espèce chinoise (Mishio *et al.*, 2006) de *C. pullata* (Medjroubi *et al.*, 2005), *C. parviflora* Desf (Belkacem *et al.*, 2014), *C. diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire (Zater *et al.*, 2016) et *C. pungens* (Labeled *et al.* , 2019).

Des propriétés antibactérienne, anti-tumoral, anti-rhumatismales et anti-inflammatoires ont été attribuées à cette flavone par son utilisation dans la médecine chinoise (Li *et al.*, 1979 ; Zhao *et al.*, 2001).

Les données relatives à la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C de ce composé sont rassemblées dans le Tableau III.13.

**Tableau III.13 :** Données de la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-6.

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, J(Hz))	$\delta_C$ (ppm)
2	/	165,9
3	6,64 (1H, s)	103,2
4	/	183,8
5	/	154,2
6	/	133,0
7	/	159,9
8	6,58 (1H, s)	95,2
9	/	154,6
10	/	105,1
1'	/	123,5
2'	7.51 (1H, d ; J = 2.0)	110,3
3'	/	149,3
4'	/	151,7
5'	6.97 (1H, d ; 8,3)	116,5
6'	7,53 (1H, dd ; J = 8,3 ; 2.1)	121,3
6-OCH <sub>3</sub>	3,98 (3H, s)	60,4
3'-OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	56,2

### III.6.7. Détermination structurale du composé CEIN-7

Le composé CEIN-7 se présente sous forme des aiguilles incolores, soluble dans le méthanol ou le DMSO. Il est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et après révélation par l'acide sulfurique.

L'examen des spectres de RMN-<sup>13</sup>C (spectre III.31, spectre III.31a et spectre III.31b) et DEPT-135 (spectre III.32) indiquent la présence de 27 atomes de carbone dont 6 sont attribués au sucre et 21 à la génine que nous pouvons répartir comme suit :

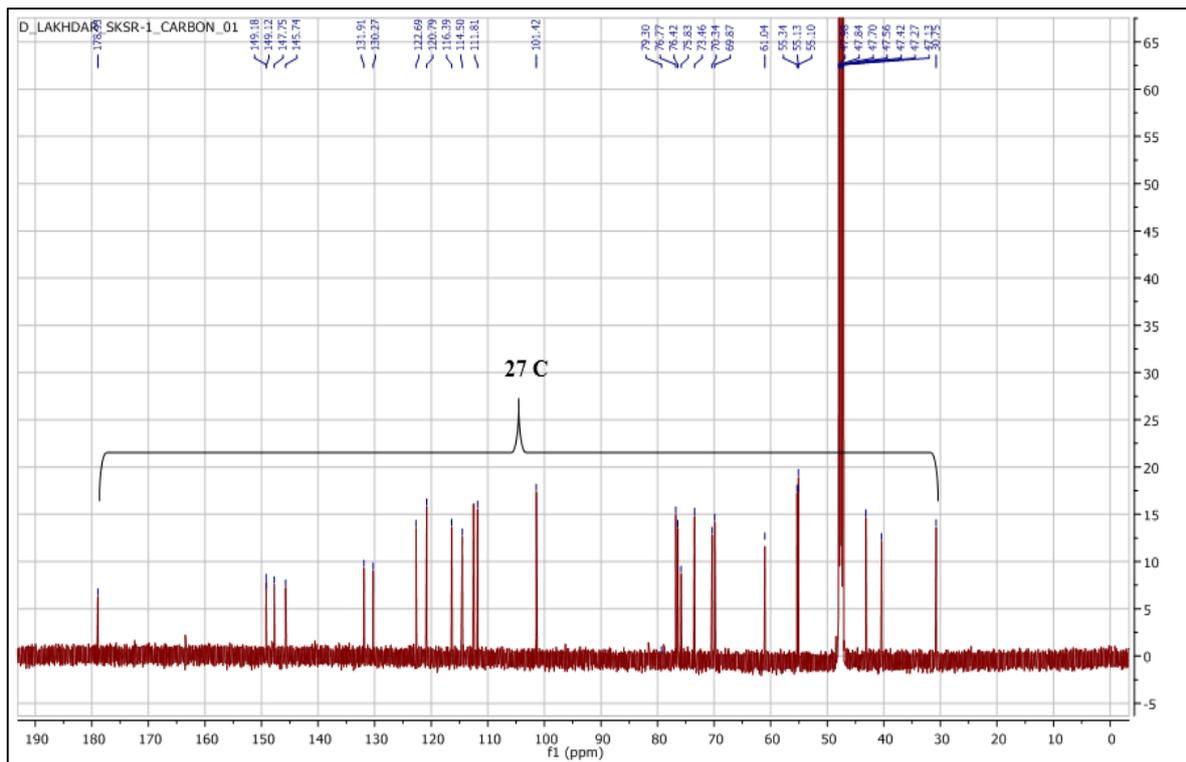
✓ Huit carbones quaternaires (8 C<sub>q</sub>) dont :

- 4 carbones aromatiques oxygénés à  $\delta_C = 149,2 ; 149,1 ; 147,8$  et  $145,7$  ppm.

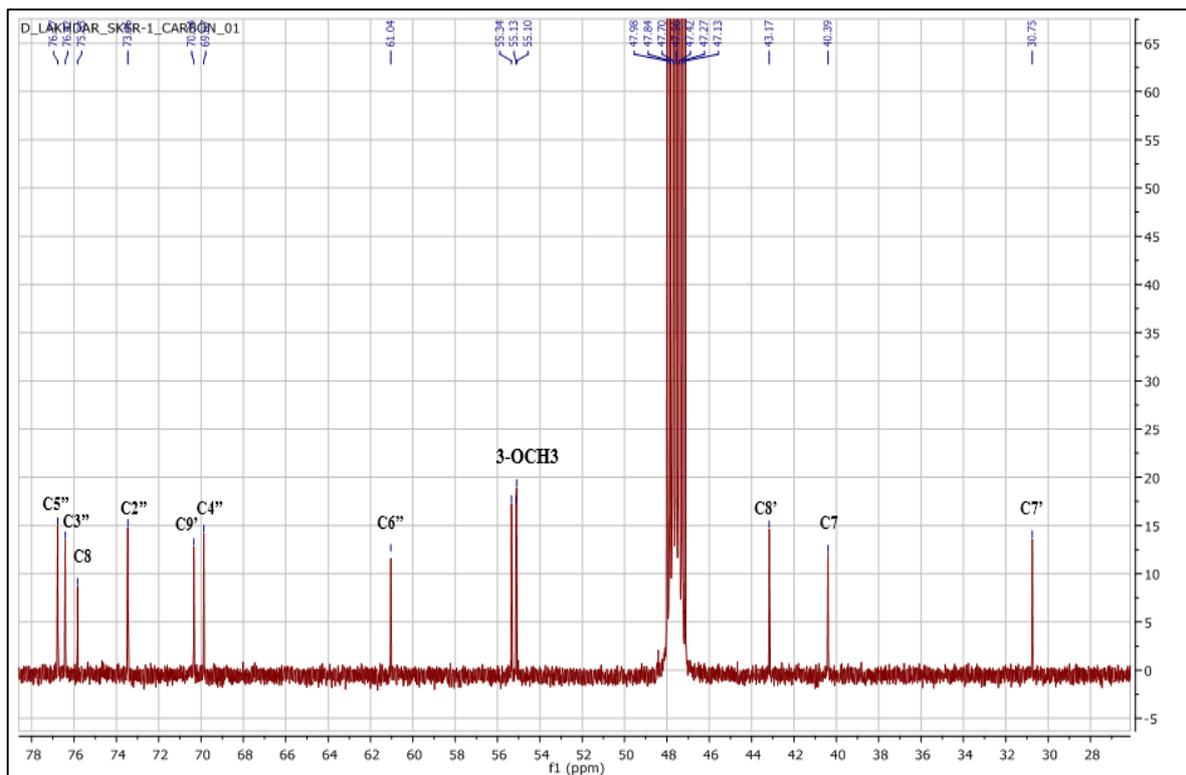
- 2 carbones aromatiques non oxygénés à  $\delta_C = 131,9$  ppm et  $130,3$  ppm.
- 1 carbone non aromatique oxygéné à  $\delta_C = 75,8$  ppm.
- 1 carbone à  $\delta_C = 178,9$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone  $\alpha$ ,  $\beta$ -saturée ou d'une fonction acide d'après la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Un carbone anomérique à  $\delta_C = 101,4$  ppm.
- ✓ Onze groupements méthynes (11 CH) dont :
  - 6 aromatiques à  $\delta_C = 122,7$  ;  $120,8$  ;  $116,4$  ;  $114,5$  ;  $112,5$  ;  $111,8$  ppm
  - Un hybridés  $sp^3$  et non oxygénés à  $\delta_C = 43,2$  ppm.
  - Quatre carbones oxygénés appartiennent au sucre à  $\delta_C = 76,8$  ;  $76,4$  ;  $73,5$  ;  $69,9$  ppm.
- ✓ Quatre groupements méthylènes ( $CH_2$ ) hybridés  $sp^3$  dont :
  - 2 oxygénés dont un appartenant à un hexose à  $\delta_C = 61,0$  ppm et l'autre à  $\delta_C = 70,3$  ppm, la valeur du déplacement chimique de ce dernier oriente vers un  $CH_2$  de fermeture d'une  $\gamma$ -lactone, ce qui exclut la présence de la fonction acide dans cette molécule.
  - 2 non oxygénés à  $\delta_C = 40,4$  ppm et  $30,8$  ppm.
- ✓ Trois groupements méthoxyles ( $\delta_C = 55,3$  ppm ;  $\delta_C = 55,1$  ppm et  $\delta_C = 55,0$  ppm).

Ces données permettent de déduire une formule brute  $C_{27} H_{34} O_{12}$  pour ce composé, cette formule indique alors la présence de 11 degrés d'insaturations dans cette molécule. Que nous pouvons répartir comme suit :

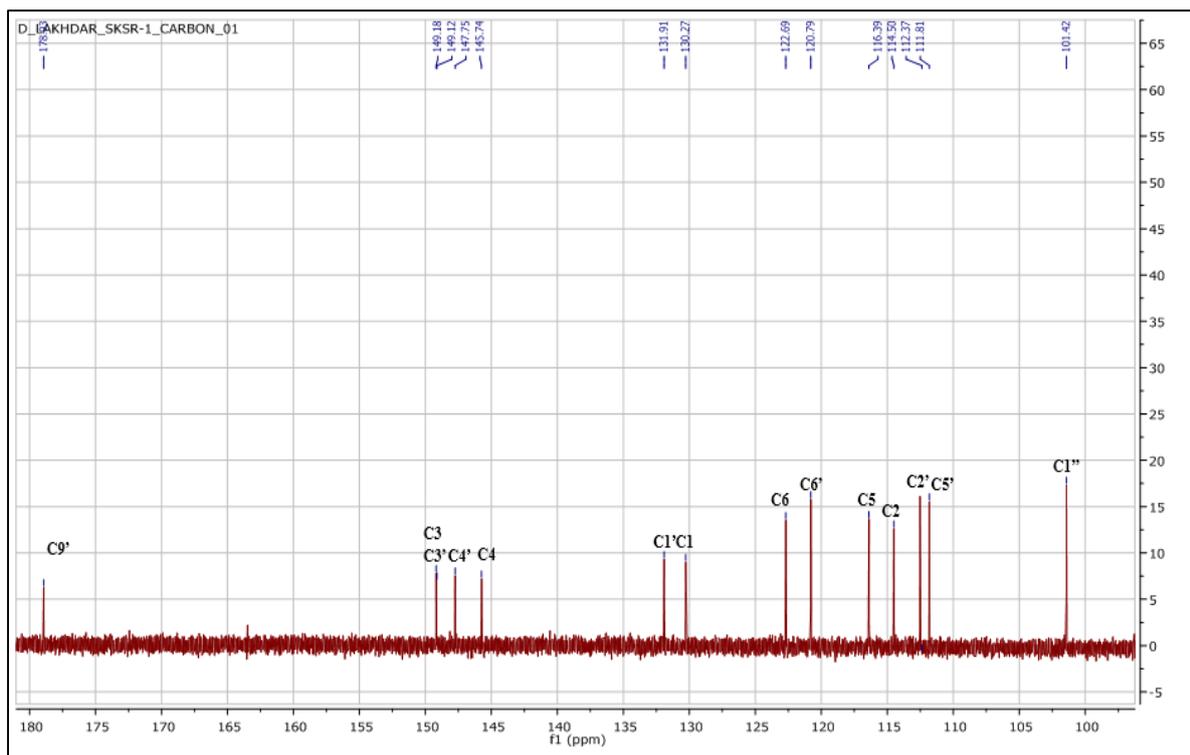
- Une fonction carbonyle et le cycle lactone.
- Deux cycle benzéniques tri-substitués.
- Il restera une insaturation qu'on attribuera au cycle du sucre.



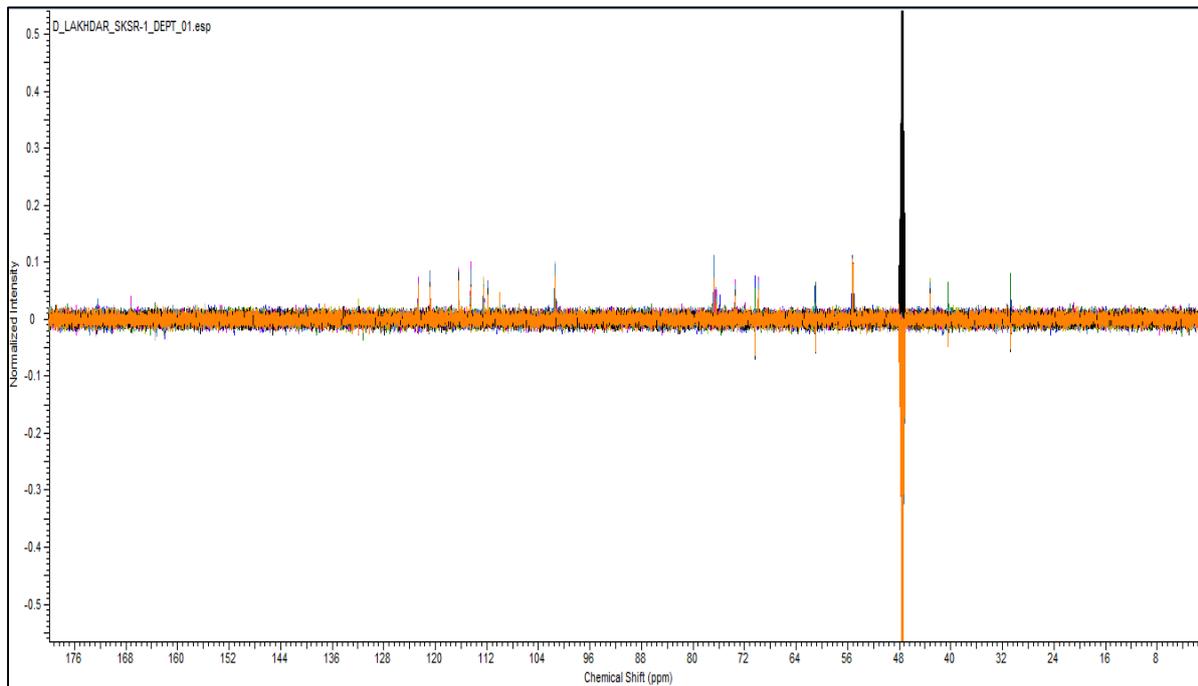
Spectre III.31 : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ) du composé CEIN-7



Spectre III.31a : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ) du composé CEIN-7



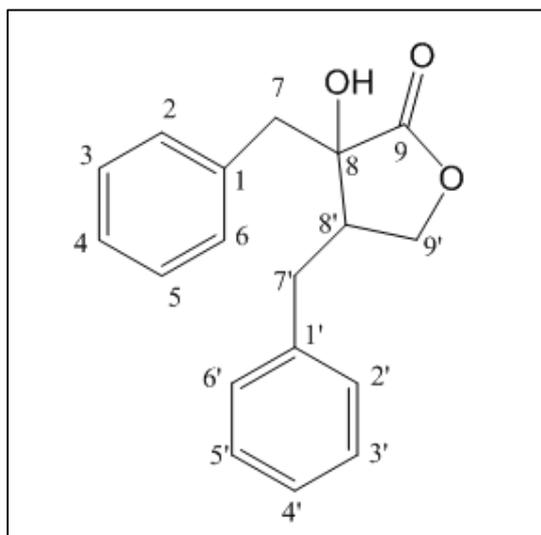
**Spectre III.31b** : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ), étalé (100 à 180 ppm) du composé CEIN-7



**Spectre III.32** : Expérience DEPT 135 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ) du composé CEIN-7

Vu la formule brute de cette molécule  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$  et la présence de trois groupement méthoxyles, un groupement hydroxyle et un sucre, il apparait clairement que le squelette de

cette molécule admet comme formule brute  $C_{18}H_{15}O_3$ . Par ailleurs nos données montrent la présence de 2 noyaux aromatiques et la présence de 6 groupements carbonés dont ceux faisant partie de la  $\gamma$ -lactone  $\alpha, \beta$ -saturée orientent vers un squelette de type  $(C_6-C_3)_2$  soit donc un squelette résultant de la combinaison de deux acides phénoliques et donc un lignane. La présence de la  $\gamma$ -lactone  $\alpha, \beta$ -saturée indique donc que cette molécule est un lignane de type 8-hydroxydibenzylbutyrolactone figure III.16 (Bruneton, 2016).

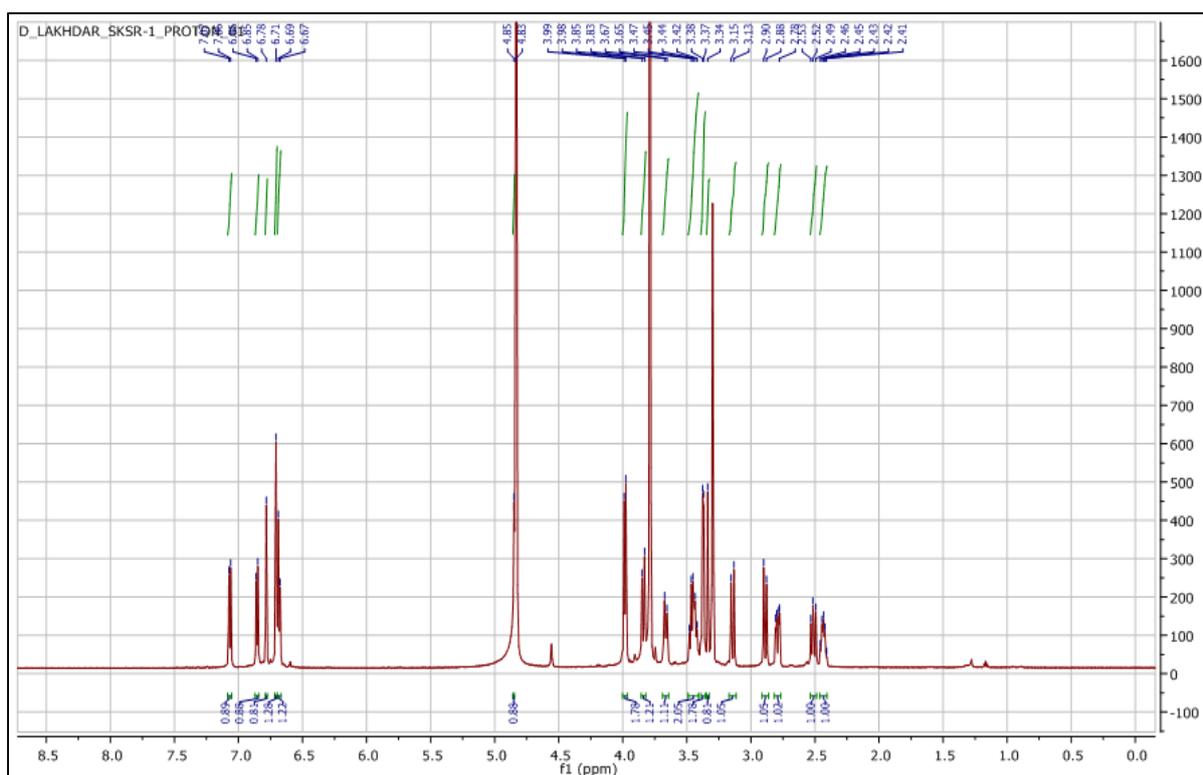


**Figure III.16 :** squelette d'un lignane de type 8-hydroxydibenzylbutyrolactone

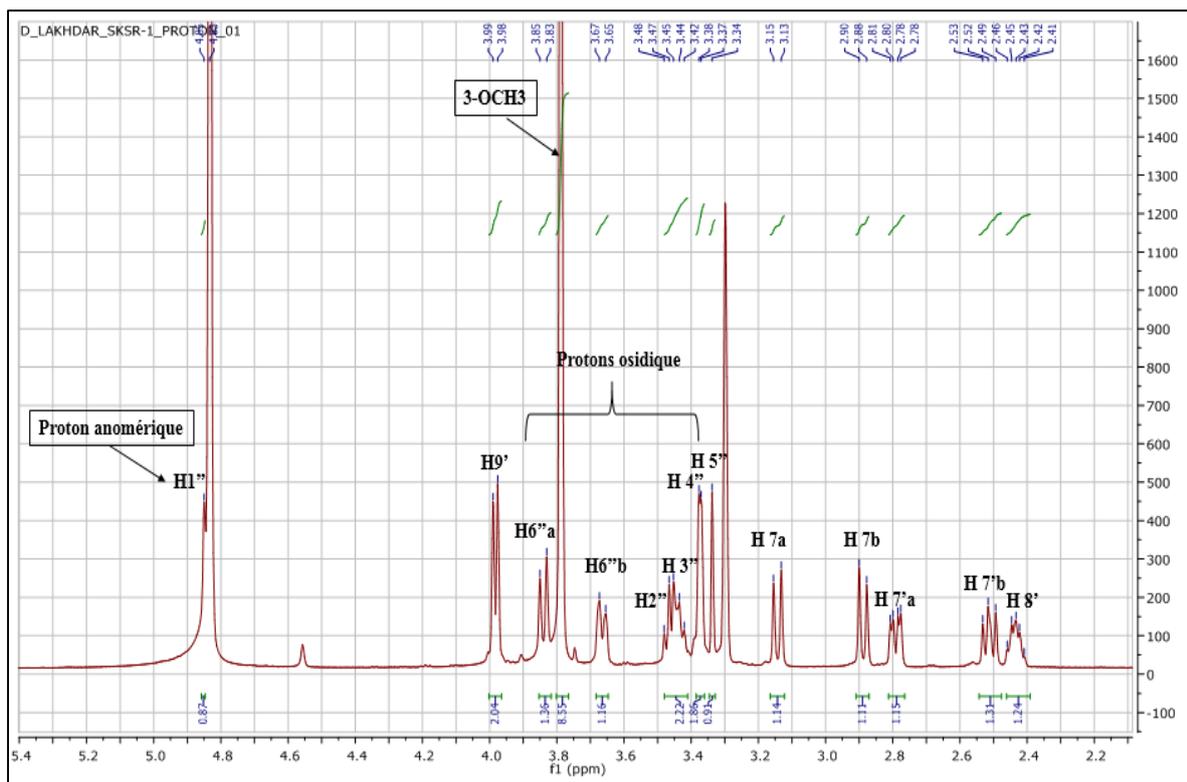
Le spectre RMN- $^1H$  de cette molécule (spectre III.33) et ses étalements (spectre III.33a et spectre III.33b) montrent :

- Un singlet intégrant pour neuf protons à  $\delta_H = 3,78$  ppm attribuable à trois groupements  $OCH_3$ .
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 2H à  $\delta_H = 3,98$  ppm ( $J = 8,2$  Hz) ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC (spectre III.34) au carbone du méthylène à  $\delta_C = 70,3$  ppm. Sachant que ce carbone n'est autre que le carbone de fermeture de la  $\gamma$ -lactone  $\alpha, \beta$ - saturée et tenant compte de la numérotation propre aux lignanes de ce type, ces deux protons sont attribués aux noyaux H-9' et par conséquent le carbone qui les porte sera attribué au C-9'.
- Une unité osidique dont le proton anomérique H-1'' recouvert par le signal du solvant à  $\delta_H = 4,85$  ppm ( $J = 10,2$  Hz) ce signal porté d'après le spectre HSQC (spectre III.34) par le carbone C-1'' à  $\delta_C = 101,4$  ppm dû au proton anomérique du sucre H-1'' et son carbone relatif. La valeur de ce déplacement chimique indique que cette unité osidique est reliée à l'aglycone par une jonction oxygénée. L'examen du spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  enregistré dans méthanol (spectre III.35) permet en effet de mettre en évidence :

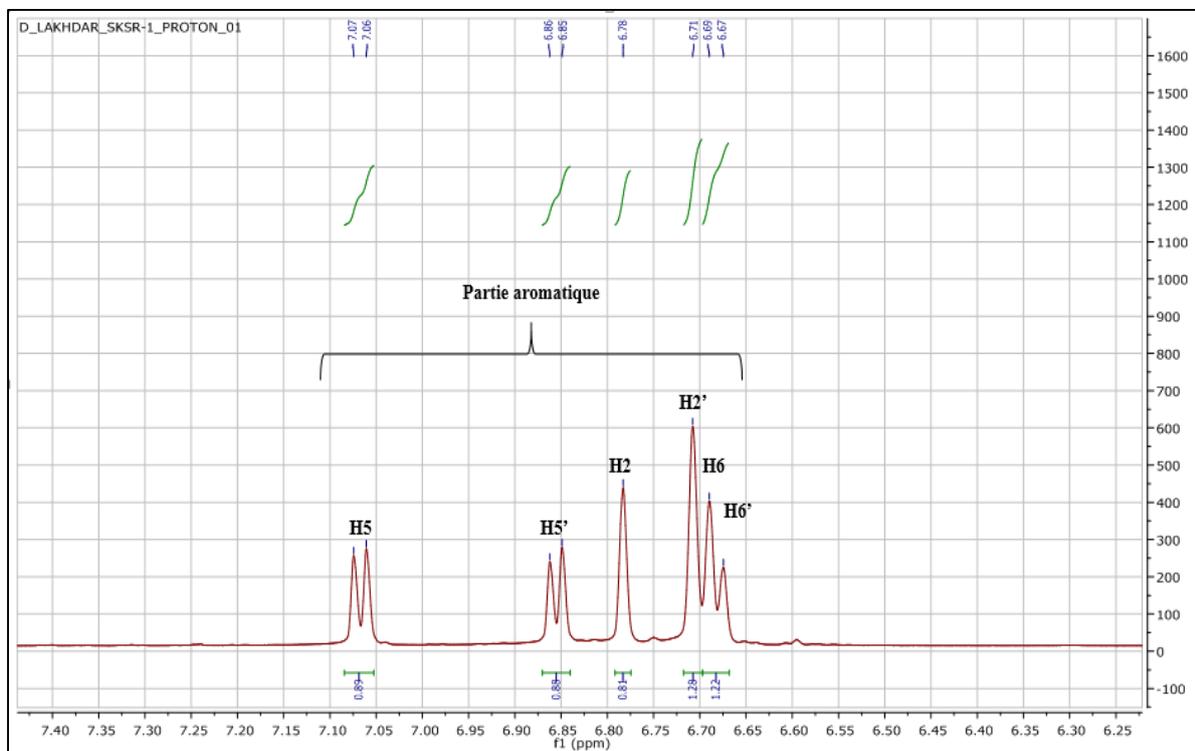
- La présence de H-2'' à  $\delta_H = 3,45$  ppm sous forme d'un multiplet par sa corrélation avec le H-1''. Le carbone C-2'' apparaît à  $\delta_C = 73,5$  ppm, HSQC (Spectre III.34).
- La localisation de H-2'' permet d'attribuer H-3'' sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 3,43$  ppm. Ce signal porté d'après le spectre HSQC (Spectre III.34) par le carbone C-3'' à  $\delta_C = 78,2$  ppm.
- L'attribution de H-6''a à  $\delta_H = 3,87$  ppm sous forme d'un doublet ( $J = 11,4$  Hz) permet à son tour de localiser H-6''b à  $\delta_H = 3,63$  ppm qui est sous forme d'un doublet ( $J = 11,9$  Hz), cette attribution mène aussi à localiser le H-5'' à  $\delta_H = 3,37$  ppm, son signal apparaît sous forme d'un multiplet. Les deux protons (H-6''a, H-6''b) corrélient sur les spectres HSQC (Spectre III.34) au carbone du méthylène à C-6'' à 61,0 ppm, et le proton H-5'' corrèle avec le carbone C-5'' à 76,8 ppm. Au terme de ces résultats, la grande valeur de constante de couplage  $J$  (H-1''-H-2'') = 10,2 Hz et vu les valeurs des déplacements chimiques des carbones comparées à celles de la littérature (Agrawal, 1992) suggèrent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$ .



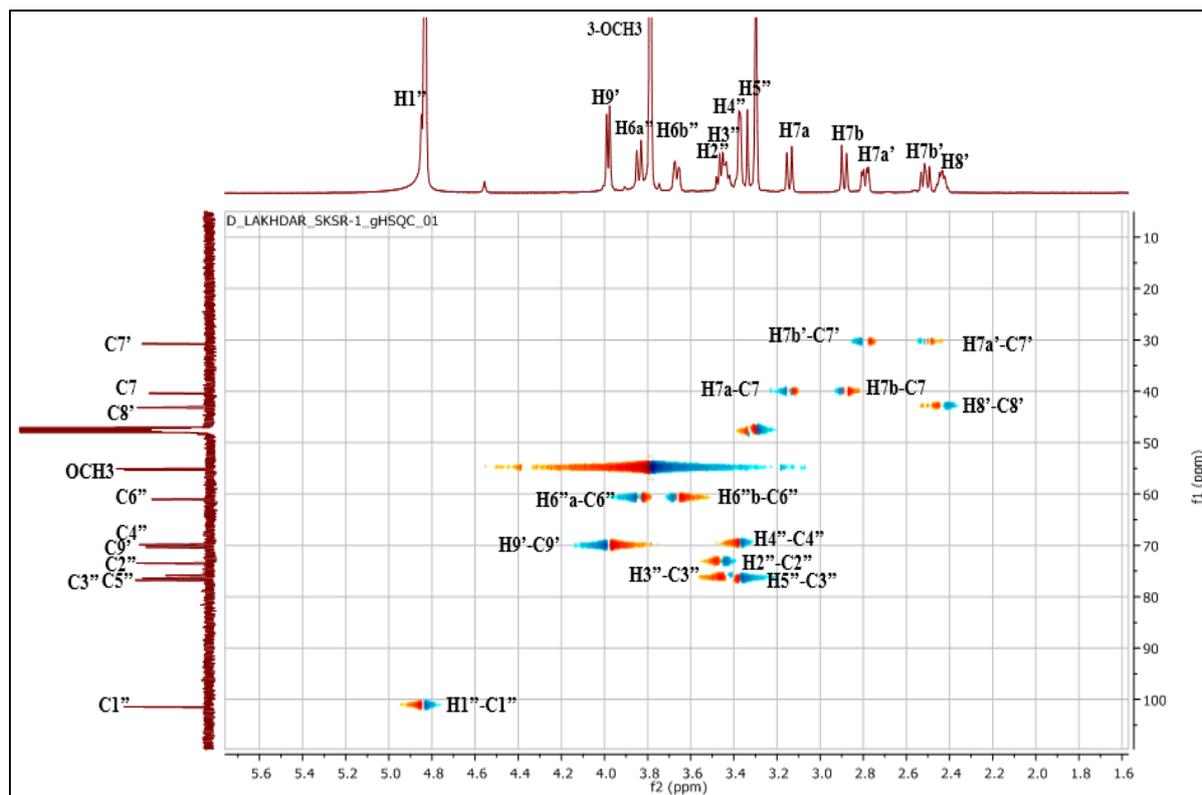
Spectre III.33 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-7



**Spectre III.33a** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé (2,2 à 5,4 ppm) du composé CEIN-7



**Spectre III.33b** : RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), du composé CEIN-7 étalement de la zone aromatique

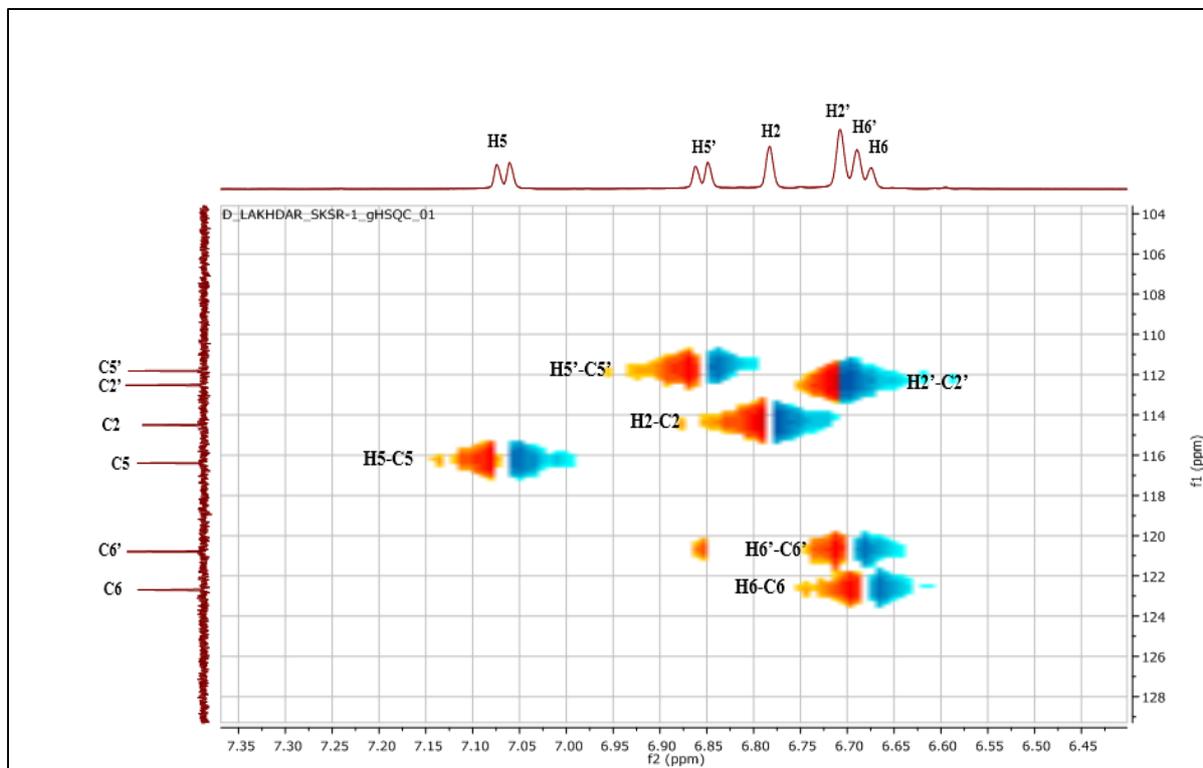


**Spectre III.34** : Expérience HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (1,6 à 5,6 ppm) du composé CEIN-7

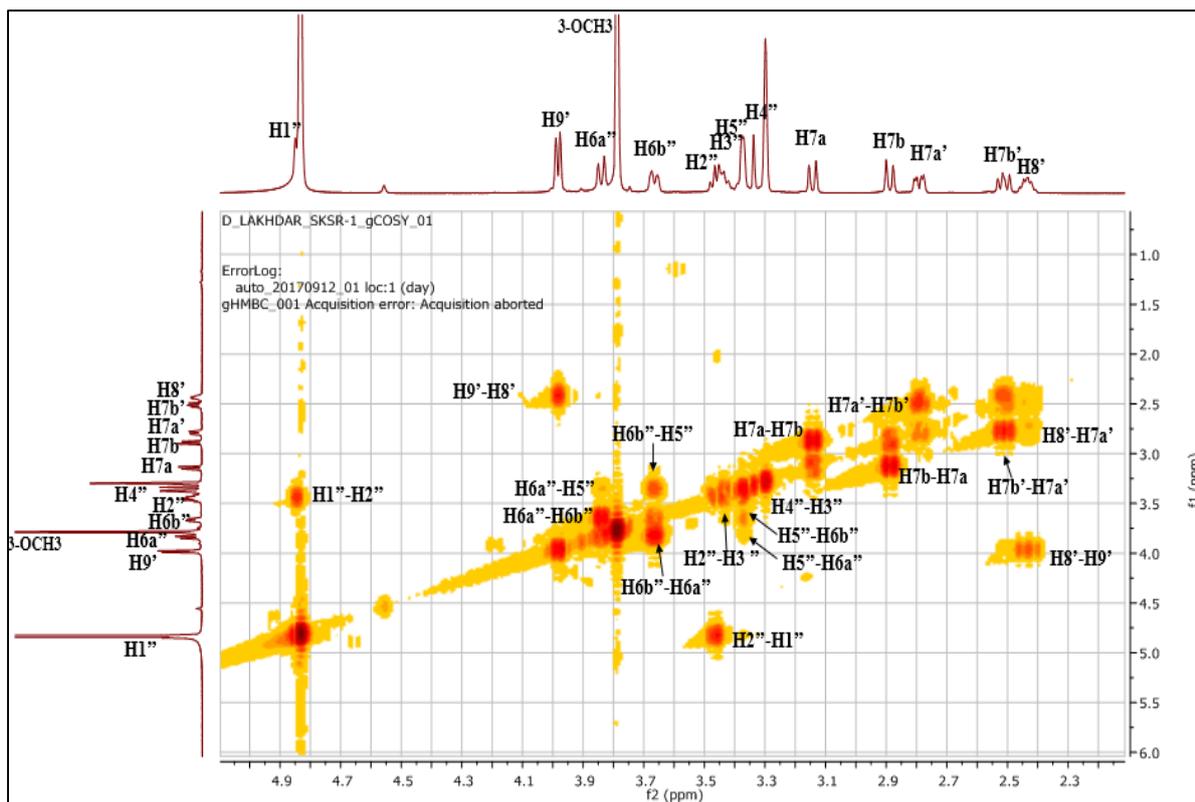
D'après l'analyse approfondie des spectres RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.33a et spectre III.33b), HSQC (spectre III.34, III.34a) et COSY (spectre III.35 et spectre III.35a) on observe aussi bien la présence de :

- Un signal sous forme de multiplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 2,45$  ppm. Ce proton corrèle sur le spectre HSQC (spectre III.34) avec le carbone à  $\delta_C = 43,2$  ppm et sur le spectre COSY (Spectre III.35) aux deux protons du groupement méthylène lactonique oxygéné de la position 9' (CH<sub>2</sub>-9'). Cette observation permet d'attribuer ce proton au noyau H8' du lignane, le carbone à  $\delta_C = 43,2$  ppm sera donc attribué à C-8'.
- Deux signaux d'intégration 1H chacun sous forme de doublet de doublets à  $\delta_H = 2,78$  ppm ( $J = 13,8 ; 4,9$  Hz) et le second à  $\delta_H = 2,51$  ppm ( $J = 13,8 ; 9,5$ Hz). Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC (spectre III.34) au carbone du méthylène à  $\delta_C = 30,8$  ppm et sur le spectre COSY avec le proton H-8', cette donnée permet d'attribuer ces deux protons aux noyaux H-7'a et H-7'b.

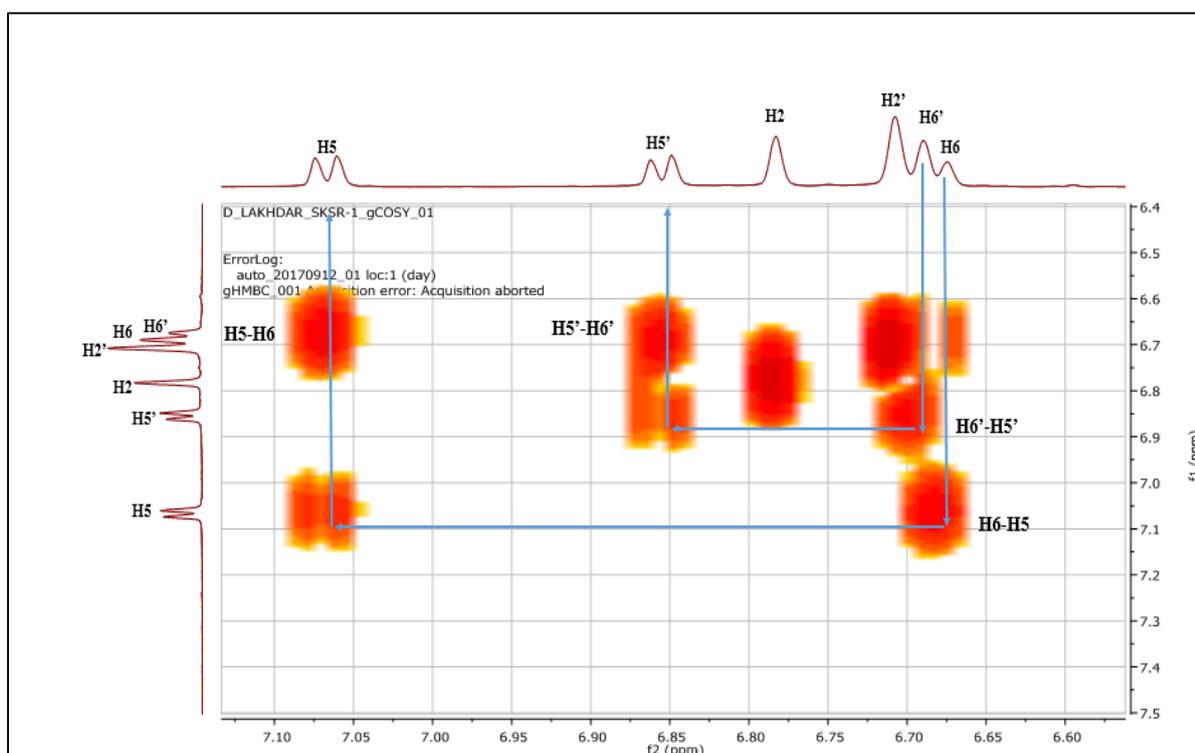
- Un système AB formé de doublets à  $\delta_H = 3,13$  ppm et à  $\delta_H = 2,88$  ppm ( $J = 13,6$  Hz) relatifs aux deux protons du groupement méthylène de H7a et H7b. Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC au carbone du méthylène à  $\delta_C = 40,4$  ppm.



**Spectre III.34a** : Expérience HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalement de la zone aromatique du composé CEIN-7



Spectre III.35 : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (2,3 à 4,9 ppm) du composé CEIN-7



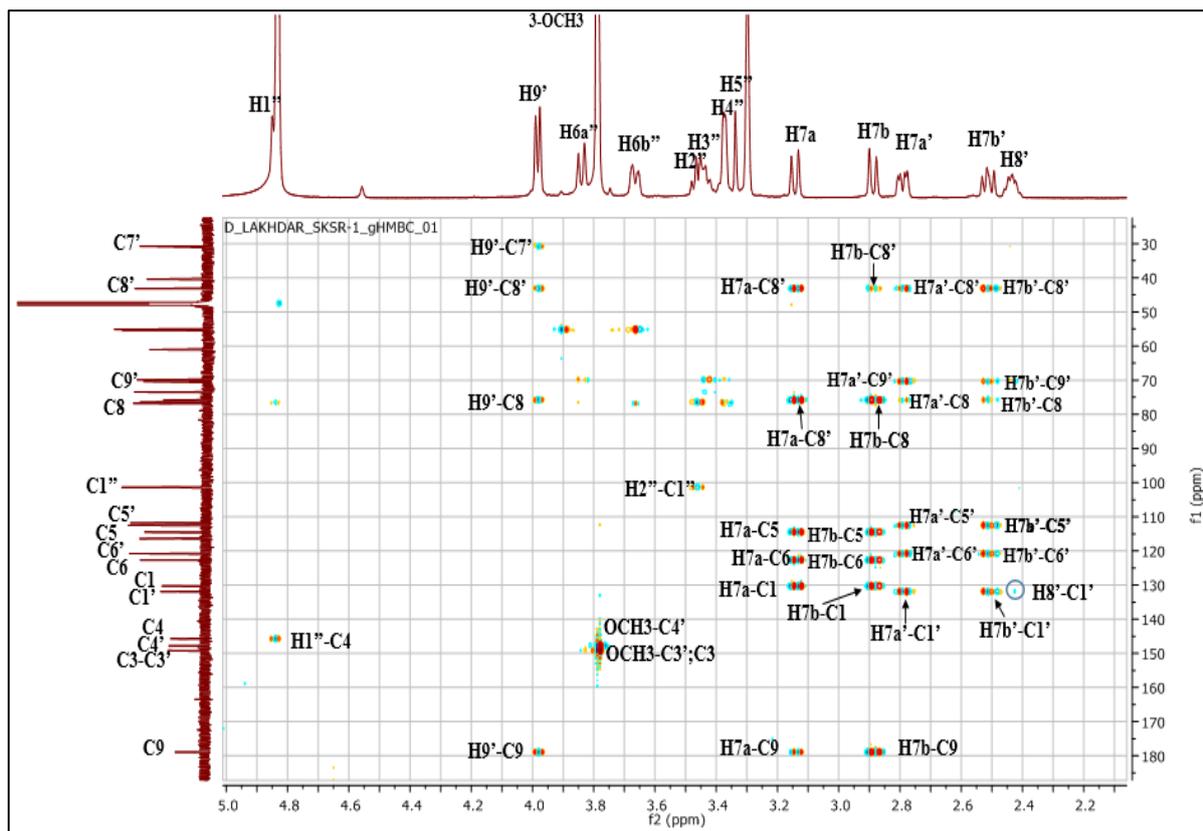
Spectre III.35a : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), du composé CEIN-7 étalement de la zone aromatique.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.36), les deux protons (CH<sub>2</sub>- 9') montrent des taches de corrélation avec le carbone du carbonyle de la  $\gamma$ -lactone confirmant ainsi son point de fermeture en C-9'. Toujours sur le même spectre les protons H-7a, H-7b montrent également des taches de corrélation avec le carbone de ce carbonyle, confirmant ainsi le cycle  $\gamma$ -lactonique.

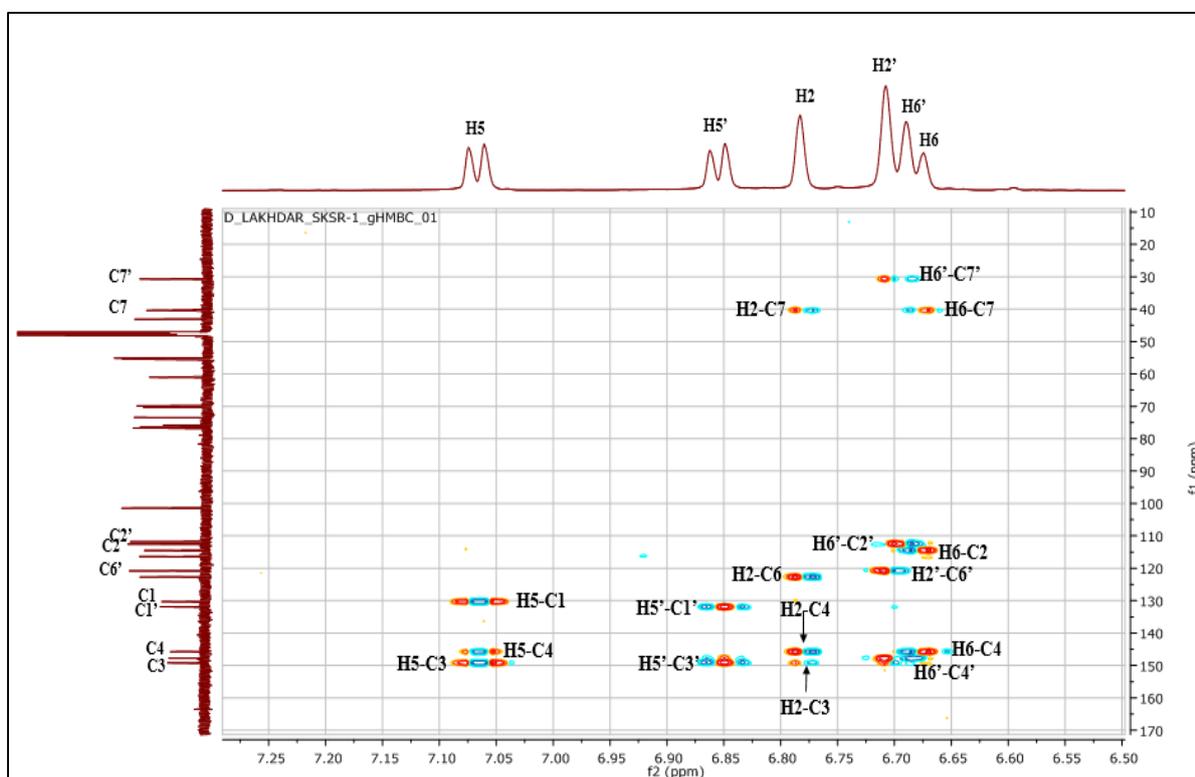
Par ailleurs, ce spectre HMBC (spectre III.36) montre les taches de corrélation entre les protons H-7a et H-7b et le carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C = 130,3$  ppm permettant ainsi son attribution au carbone C-1 du premier noyau aromatique du lignane, et montrent aussi des taches de corrélation nettes avec les deux carbones des méthynes aromatiques à  $\delta_C = 114,5$  ppm (C-2) et  $\delta_C = 122,7$  ppm (C-6). Sur le spectre relatif à l'expérience HSQC (spectre III.34a), le carbone à  $\delta_C = 114,5$  ppm (C-2) corréle avec le proton résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 6,78$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 122,7$  ppm (C-6) corréle avec le proton résonant sous forme d'un doublet à  $\delta_H = 6,68$  ( $J = 10,8$  Hz). Ces données permettent d'une part d'attribuer ces deux protons aux H-2 et H-6 de ce noyau aromatique respectivement et d'autre part de déduire que ce noyau aromatique est substitué en C-3 et C-4.

Le proton H-5 de ce noyau aromatique est attribué au signal à  $\delta_H = 7,07$  (d,  $J = 8,2$  Hz) grâce à sa corrélation sur le spectre COSY (spectre III.35a) avec H-6. Le carbone C-5 apparaît à  $\delta_C = 116,4$  ppm HSQC (Spectre III.34a).

L'attribution de ce proton (H-5) permet la localisation de C-3 de ce noyau aromatique à  $\delta_C = 149,2$  ppm grâce à leur tâche de corrélation relevée sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.36a). Ce carbone C-3 montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,77$  ppm indiquant également sa méthylation.



**Spectre III.36** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé (2,2 à 5,0 ppm) du composé CEIN-7



**Spectre III.36a** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé du composé CEIN-7

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.36) où les protons H-7'a, H-7'b montrent les taches de corrélation avec le carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C = 131,9$  ppm permettant ainsi son attribution au carbone C-1' du deuxième noyau aromatique du lignane, et montrent des taches de corrélation nettes avec les deux carbones des méthynes aromatiques à  $\delta_C = 112,5$  ppm et  $\delta_C = 120,8$  ppm. Sur le spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre III.34a), le carbone à  $\delta_C = 112,5$  ppm corréle avec le proton résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 6,70$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 120,8$  ppm corréle avec le proton résonant sous forme d'un doublet  $\delta_H = 6,69$  ppm ( $J = 9,2$  Hz). Ces données permettent d'une part d'attribuer ces deux protons aux H-2' et H-6' de ce noyau aromatique et d'autre part de déduire que ce noyau aromatique est substitué en C-3' et C-4'. Le proton H-5' de ce noyau aromatique est localisé à  $\delta_H = 6,85$  ppm (d,  $J = 7, 9$  Hz) grâce à sa corrélation sur le spectre COSY (Spectre III.35a) avec H-6'.

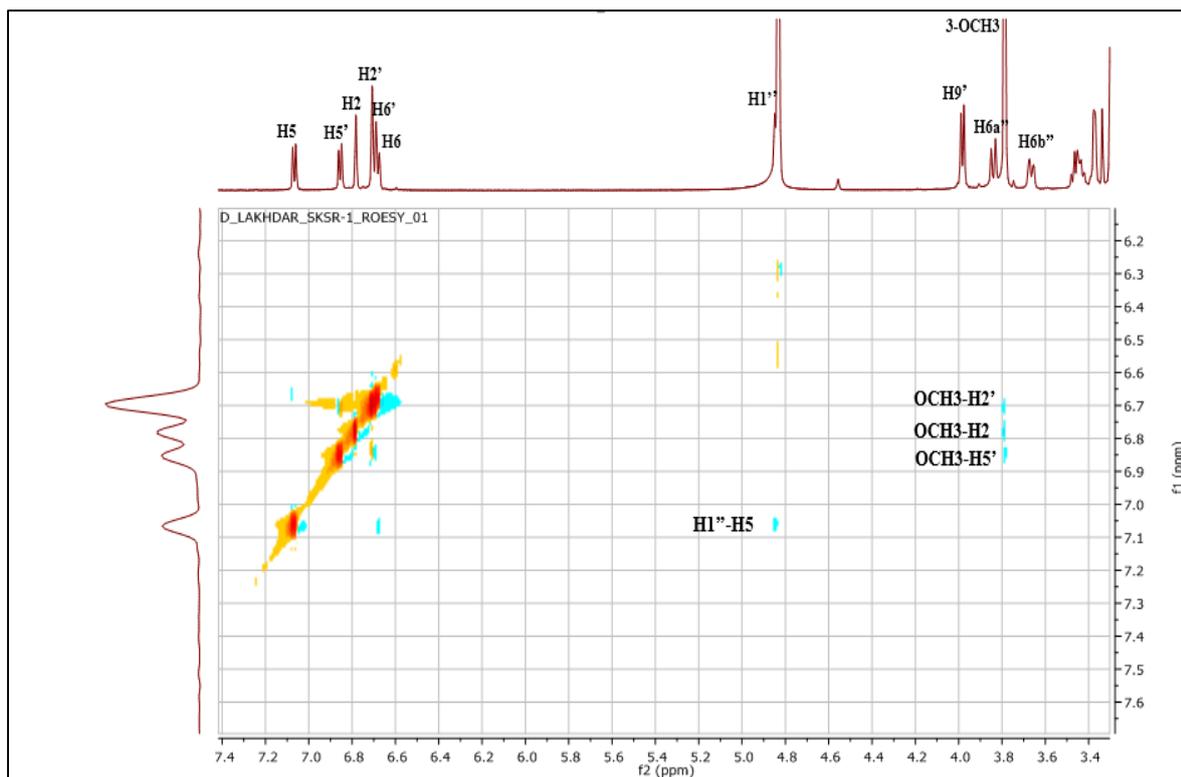
Le spectre HSQC (Spectre III-50) permet la localisation de C-5' à  $\delta_C = 111,8$  ppm. L'attribution de ce proton (H-5') permet la localisation de C-3' de ce noyau aromatique à  $\delta_C = 149,1$  ppm grâce à leur tâche de corrélation relevée sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.36a). Ce carbone C-3' montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,77$  ppm indiquant également sa méthylation.

Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.36a) le proton H6' corréle avec le carbone à  $\delta_C = 147,8$  qui ne peut être que C4'. Ce dernier montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,77$  ppm indiquant également sa méthylation.

Cela permet de localiser les trois groupements méthoxyles qui apparaissent sur le spectre RMN- $^1H$  (Spectre III.33a) sous forme d'un singulet d'intégration 9H à  $\delta_H = 3,78$  ppm, deux sur le carbone C-3' et C-4' et l'autre sur C-3 HMBC (Spectre III.36a). Cela laisse à C-4 ( $\delta_C = 145,7$  ppm) la seule possibilité de porter un groupement oxygéné, Cette hypothèse est confirmée par une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et ce carbone sur le spectre HMBC (Spectre III.36).

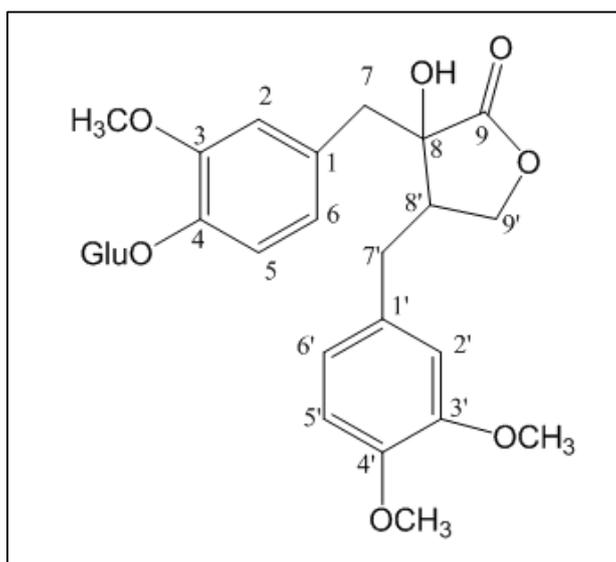
La position des méthoxyles en C-3, C3'et C-4 est confirmée par l'analyse du spectre ROESY (Spectre III.37) qui montre des taches de corrélations nettes des méthoxyles à  $\delta_H = 3,78$  ppm avec :

- H-2' ( $\delta_H = 6,70$  ppm) indiquant qu'il est en C-3' ( $\delta_C = 148,1$  ppm).
- H-5' ( $\delta_H = 6,86$  ppm) confirmant son positionnement en C-4'.
- le proton H-2 ( $\delta_H = 6,78$  ppm) et donc bien en position C-3.



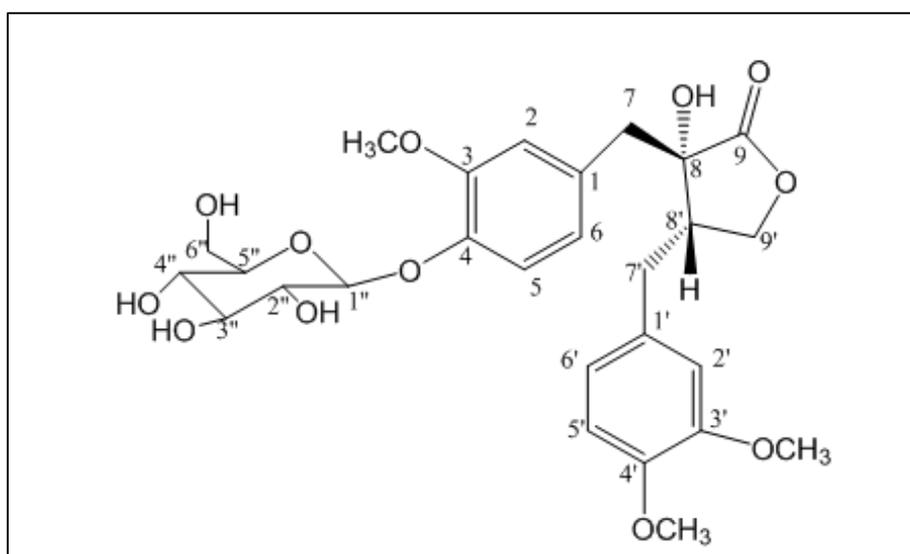
**Spectre III.37** : Spectre ROESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé (3,4 à 7,4 ppm) du composé CEIN-7

L'ensemble de ces données mène à la structure plane reportée dans la figure III.17.



**Figure III.17** : Structure plane du composé CEIN-7

Concernant l'orientation  $\beta$  du 8-OH, les déplacements chimiques C-7 et C-8' des isomères optiques de la 8 hydroxydibenzylbutyrolactone lignane sont différents. Les isomères trans ont des déplacements à  $\delta_C= 42,0$  ppm (C-7) et  $\delta_C= 43,7$  ppm (C-8'), mais les isomères cis ont des déplacements à environ  $\delta_C=38,3$  ppm et  $\delta_C= 48,1$  ppm. De plus, la configuration 8S a une rotation optique négative contrairement à la rotation optique positive de son épimère (**Khamlach et al., 1989**). Le composé CEIN-7 montre des signaux C-7 et C-8' similaires à  $\delta_C= 40,0$ , 43,1 ppm et une rotation optique négative  $[\alpha]_D^{20} = -63,7^\circ$  (EtOH,  $c$  0,5) a révélé que sa configuration absolue était 8S, 8'S. Ces informations mènent à la structure finale du composé CEIN-7 reportée dans la figure III.18, qui est le (8S, 8'S)-8-hydroxy-3,3',4'-triméthoxylignan-9,9'-olide-4-O- $\beta$  D-glucopyranoside, elle est connue sous le nom de **trachéloside**.



**Figure III.18** : Structure finale du composé CEIN-7, **trachéloside**

Ce lignane a été isolé pour la première fois chez *Trachelospermum asiaticum* Nakai var. par Inagaki (**Inagaki et al., 1971**). Par la suite, il a été aussi isolé de : *Trachelospermum liukiense* (**Nishibe et al. 1973**), *Trachelospermum asiaticum* (**Abe et al., 1986 ; Lee et al., 2020**), *Trachelospermum jasminoides* (**Tan et al., 2005**), *Leuzea carthamoides* (**Harmatha et al., 2007**), *Cirsium arvense* et *Cirsium canum* (**Boldizsár et al., 2010**) et *caulis trachelospermi* (**Liu et al. 2014**).

Chez le genre *Centaurea* il a été isolé une seule fois de *Centaurea furfuracea* (**Fakhfakh et al., 2005**). Ce lignane avait une forte activité inhibitrice sur la voie JAK (Janus kinase)/STAT (transducteur de signal et activateur de la transcription) et une autre voie de signalisation responsable de la transduction du signal d'un grand nombre de cytokines (**Liu et al., 2014**)

Les résultats de la spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont résumés dans le tableau III.14.

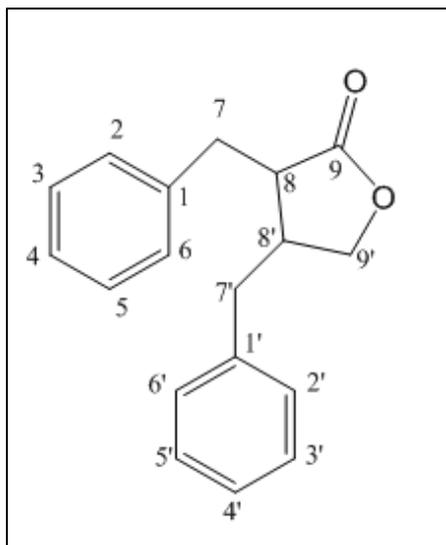
**Tableau III.14** : Les données spectrales RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-7

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, J(Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	-	130,3
2	6,78 (s)	114,5
3	-	149,2
4	-	145,7
5	7,07 (1H, d ; J = 8,2)	116,4
6	6,68 (1H, d ; J = 10,8)	122,7
7a	2,88 (1H, d ; J = 13,6)	40,4
7b	3,13 (1H, d ; J = 13,6)	
8	-	75,8
9	-	178,9
1'	-	131,9
2'	6,70 (1H, s)	112,5
3'	-	149,1
4'	-	147,8
5'	6,85 (1H, d ; J = 7,9)	111,8
6'	6,69 (1H, d ; J = 9,2)	120,8
7a'	2,51 (1H, t ; J = 9,5)	30,8
7b'	2,78 (1H, dd ; J = 13,8 ; 4,9)	
8'	2,45 (1H, m)	43,2
9'	3,99 (2H, d ; J = 8,2 Hz)	70,3
1''	4,85 (1H, d ; J = 10,2)	101,4
2''	3,43 (1H, m)	73,5
3''	3,45 (1H, m)	76,4
4''	3,37 (1H, d ; J = 3,8)	69,9
5''	3,35 (1H, m)	76,8
6''a	3,83 (1H, d ; J = 11,4)	61,0
6''b	3,63 (1H, d ; J = 11,9Hz)	
3-OCH <sub>3</sub>	3,77 (9H, s)	55,0 ; 55,1 ; 55,3

### III.6.8. Détermination structurale du composé CEIN-8

Le composé CEIN-8 se présente sous forme incolore, soluble dans le méthanol. Il est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et après révélation par l'acide sulfurique.

La comparaison du spectre RMN-<sup>1</sup>H de ce composé avec celui du composé CEIN-7 montre une grande similitude. On peut donc déduire que ce produit est un lignane de type dibenzylbutyrolactone (figure III.19).



**Figure III.19** : squelette d'un lignane de type dibenzylbutyrolactone

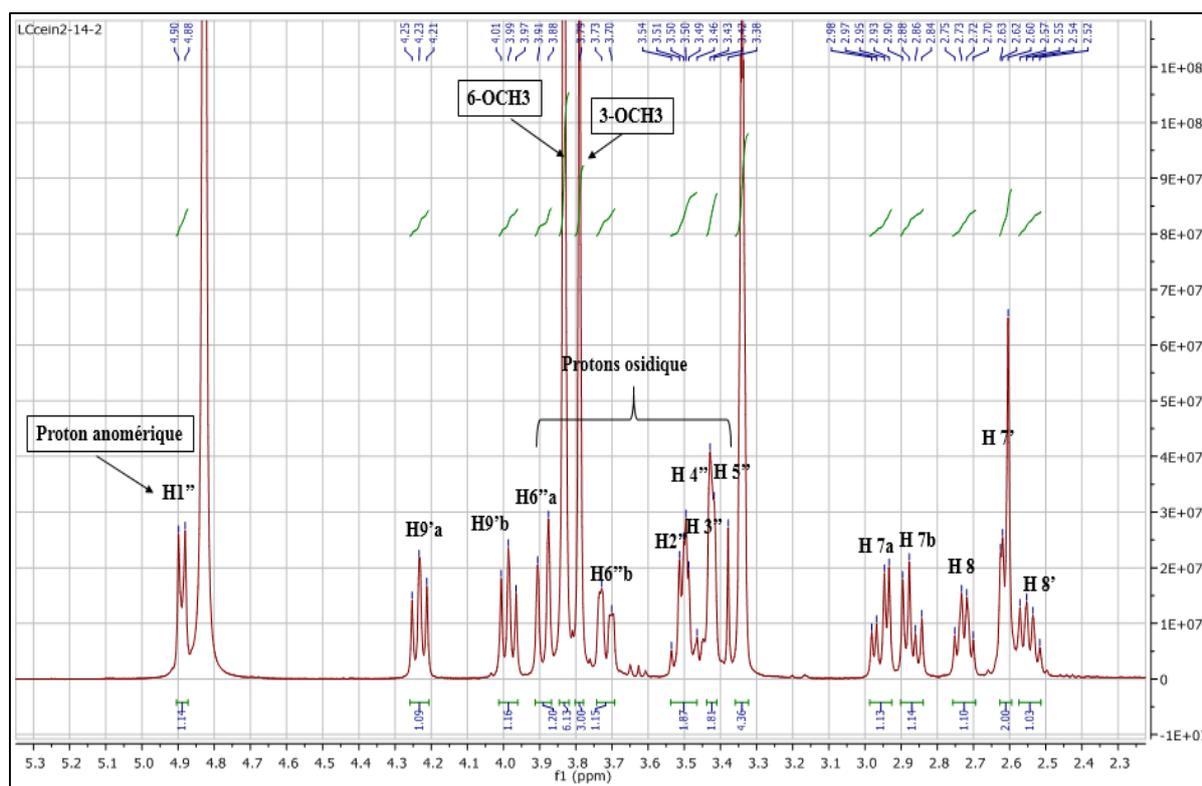
Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.38) de ce composé et son étalement (spectre III.38a) montrent :

- Deux singulets à  $\delta_H = 3,83$  et  $3,80$  ppm intégrant 3 protons et 6 protons respectivement, attribuables à trois OCH<sub>3</sub>
- Deux doublets à  $\delta_H = 7,09$  ppm ( $J = 8,2$  Hz) et à  $\delta_H = 6,86$  ppm ( $J = 8,6$ ) attribués à H-5 et H-5' à cause de leur *ortho*-couplage avec les protons H-6 et H-6' respectivement d'après le spectre COSY, (spectre III.39).
- Un doublet dédoublé à  $\delta_H = 6,68$  ppm ( $J = 8,2 ; 1,4$  Hz) attribué au proton H-6.
- Deux doublets ont été identifiés à  $\delta_H = 6,79$  ( $J = 1,4$  Hz) et  $\delta_H = 6,64$  ( $J = 1,5$  Hz) attribués aux protons H-2 et H-2'.
- Un multiplet à  $\delta_H = 6,65$  ppm recouvert par le signal H-2' attribué au proton H-6'.
- Une unité osidique dont le proton anomérique H-1'' est sous forme d'un doublet à  $\delta_H = 4,88$  ppm ce signal porté d'après le spectre HSQC (spectre III.40) par le carbone C-1'' à  $\delta_C = 102,6$  ppm. La valeur de ce déplacement chimique indique que cette unité osidique est reliée à l'aglycone par une jonction oxygénée.

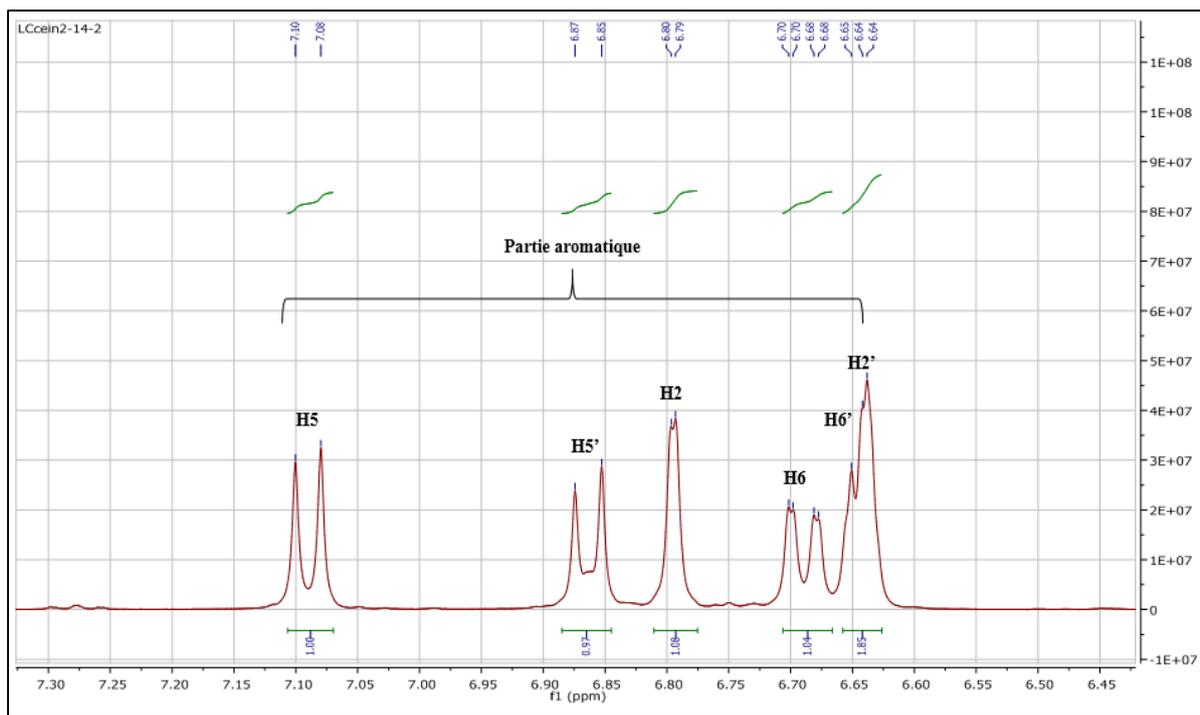
L'examen du spectre COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (spectre III.41) permet en effet de mettre en évidence :

- La présence de H-2'' à  $\delta_H = 3,50$  ppm sous forme d'un multiplet par sa corrélation avec le H-1''. Le carbone C-2'' apparaît à  $\delta_C = 74,6$  ppm, HSQC (Spectre III.40).
- La localisation de H-2'' permet d'attribuer H-3'' sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 3,50$  ppm. Ce signal porté d'après le spectre HSQC (Spectre III.40) par le carbone C-3'' à  $\delta_C = 77,1$  ppm.

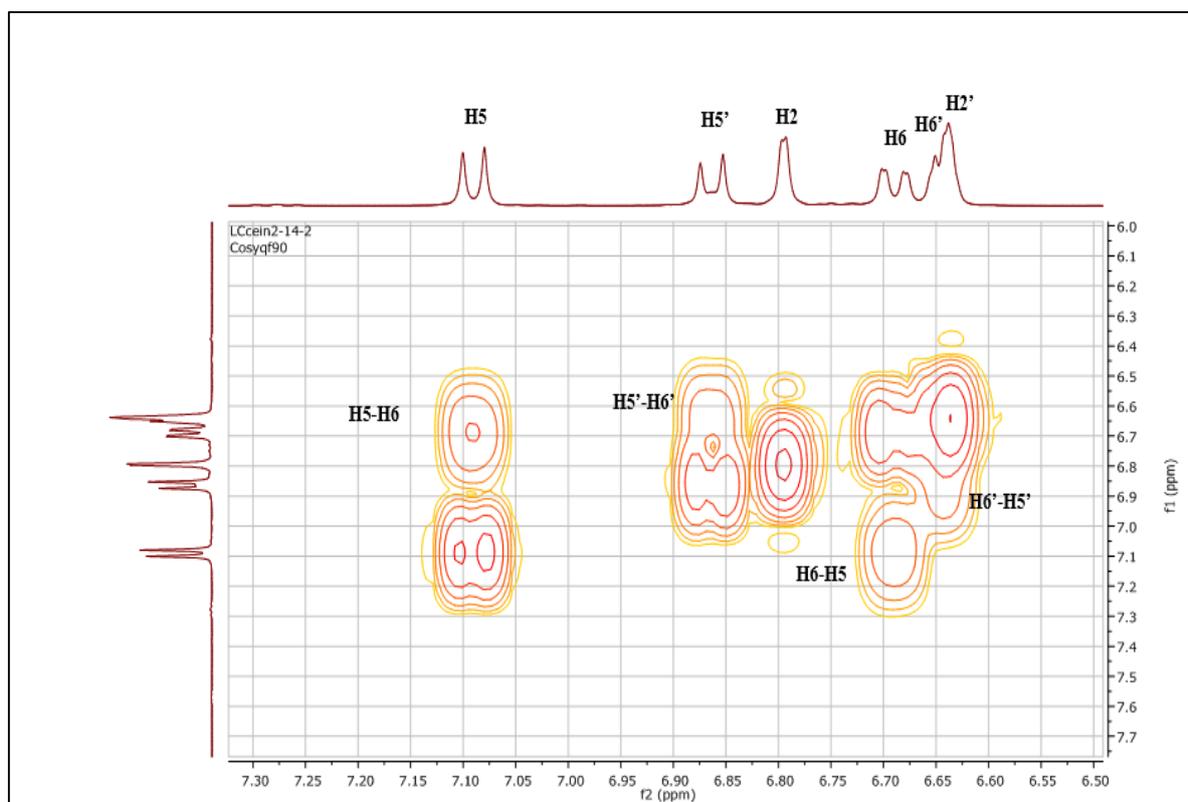
➤ L'attribution de H-6''a à  $\delta_H = 3,88$  ppm sous forme d'un doublet ( $J = 11,9$  Hz) permet à son tour de localiser H-6''b à  $\delta_H = 3,72$  ppm qui est sous forme d'un doublet ( $J = 11,2$  Hz), cette attribution mène aussi à localiser le H-5'' à  $\delta = 3,42$  ppm, son signal apparaissant sous forme d'un multiplet. Les deux protons (H-6''a ; H-6''b) corrélient sur les spectres HSQC (Spectre III.40) au carbone du méthylène à C-6'' à  $\delta_C = 62,1$  ppm, et le proton H-5'' corrélie au carbone C-5'' à  $\delta_C = 77,8$  ppm. Au terme de ces résultats, la grande valeur de constante de couplage H-1''-H-2'' ( $J = 7,3$  Hz) et vu les valeurs des déplacements chimiques des carbones comparées à celles de la littérature (Agrawal, 1992) suggèrent qu'il s'agit d'un glucose.



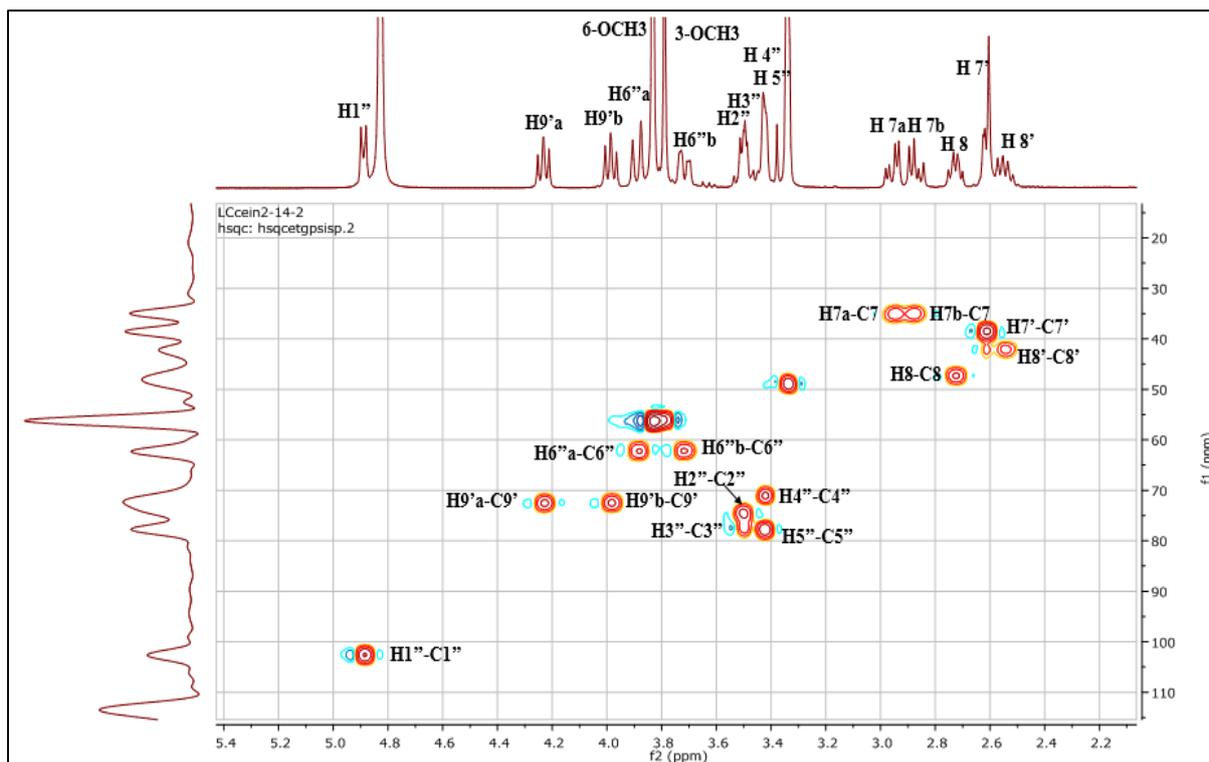
Spectre III.38 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), étalé (2,3 à 5,3 ppm) du composé CEIN-8



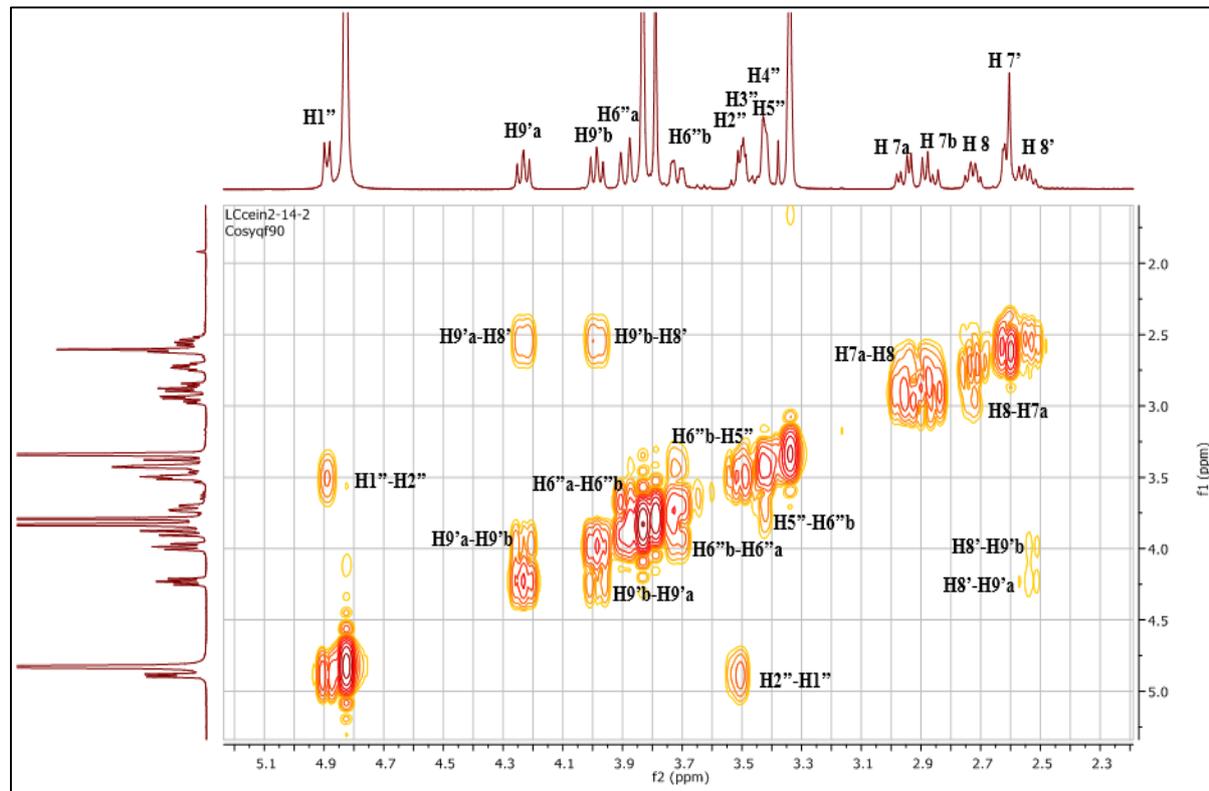
**Spectre III.38a** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), du composé CEIN-8 étalé de la zone aromatique



**Spectre III.39** : Spectre Cosy (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), du composé CEIN-8 étalé de la zone aromatique



**Spectre III.40** : Expérience HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (2,2 à 5,4 ppm) du composé CEIN-8



**Spectre III.41** : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (2,3 à 5,1 ppm) du composé CEIN-8

Toujours sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H (Spectre III.38) qui montre les protons de la jonction des deux benzyles avec l'anneau lactonique comme suit :

-Deux signaux sous forme de triplet d'intégration 1H chacun à  $\delta_H = 4,22$  ppm ( $J = 7,7$  Hz) et à  $\delta_H = 3,98$  ppm ( $J = 7,7$  Hz), ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC (Spectre III.40) au carbone du méthylène à  $\delta_C = 72,5$  ppm, qui est le carbone de fermeture de la  $\gamma$ -lactone  $\alpha, \beta$ -saturée. Ces deux protons sont attribués aux noyaux H-9'a et H-9'b et par conséquent le carbone qui les porte sera attribué au C-9'.

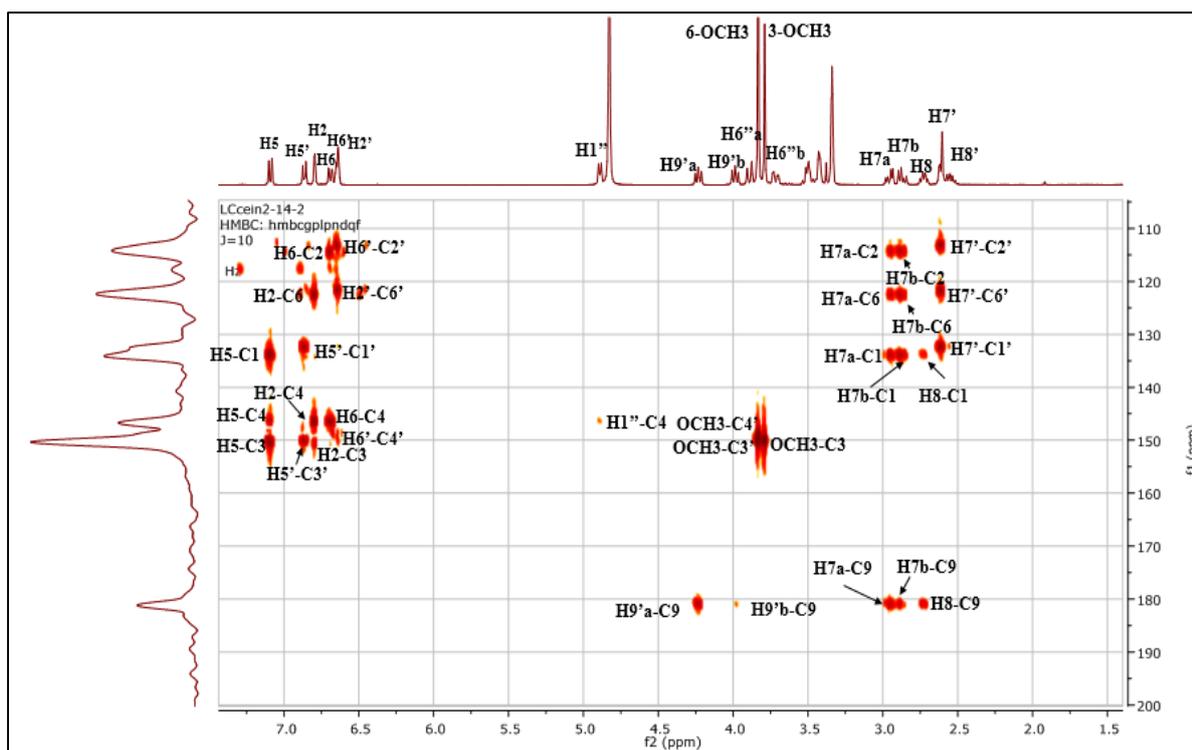
-Un signal sous forme de doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 2,55$  ( $J = 14,3 ; 7,5$  Hz). Ce proton corrélie sur le spectre HSQC au carbone à  $\delta_C = 42,0$  ppm et sur le spectre COSY (Spectre III.41) aux deux protons H-9'a et H-9'b. Cette observation permet d'attribuer ce proton au noyau H-8' du lignane en question, le carbone à  $\delta_C = 42,0$  ppm sera donc attribué à C-8'.

-Deux signaux sous forme de doublet de doublet d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_H = 2,95$  ( $J = 13,9 ; 5,3$  Hz) et le second à  $\delta_H = 2,88$  ( $J = 13,9 ; 7,2$ ). Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC (Spectre III.40) au carbone du méthylène à  $\delta_C = 35,0$  ppm et sur le spectre COSY au proton H-8, cette donnée permet d'attribuer ces deux protons aux noyaux H-7a et H-7b.

-Un signal d'intégration 1H sous forme de quadruplet à  $\delta_H = 2,72$  ( $J = 7,6$  Hz), ( $\delta_C = 47,3$  ppm, HSQC), qui ne peut être que H-8 grâce à sa corrélation selon spectre COSY (Spectre III.41) avec les proton H-7a et H-7b.

-Un signal sous forme de multiplet d'intégration 2H à  $\delta_H = 2,61$  ppm. Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC au carbone à  $\delta_C = 38,5$  ppm et sur le spectre COSY au proton H-8', cette donnée permet de les affecter aux noyaux H-7'.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.42) les deux protons H-9' montrent les taches de corrélation avec le carbone du carbonyle de la  $\gamma$ -lactone confirmant ainsi son point de fermeture en C-9. Toujours sur le même spectre les protons H-7a, H-7b, H-8 montrent également des taches de corrélation avec le carbone de ce carbonyle, confirmant ainsi le cycle  $\gamma$ -lactonique.



**Spectre III.42** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (1,5 à 7,0 ppm) du composé CEIN-8

Par ailleurs ce spectre HMBC (Spectre III.42) montre les taches de corrélation entre le proton H-8 et le carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C = 134,1$  ppm permettant ainsi son attribution au carbone C-1 du premier noyau aromatique du lignane. Toujours sur le même spectre les protons H-7a et H-7b montrent des taches de corrélation nettes avec le carbone C-1 et avec les deux carbones des méthynes aromatiques à  $\delta_C = 114,6$  ppm et  $\delta_C = 122,8$  ppm attribuable au C-2 et C-6 respectivement selon le spectre HSQC (Spectre III.43). Par ailleurs, les deux protons H-2 et H-6 montrent deux taches de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique à  $\delta_C = 146,6$  ppm attribuable au carbone C-4, la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné. Cette oxygénation est claire sur le spectre HMBC car ce carbone montre une tache de corrélation avec le proton anomérique du glucose à  $\delta_H = 4,88$  ppm indiquant ainsi que l'unité du glucose est portée par ce carbone.

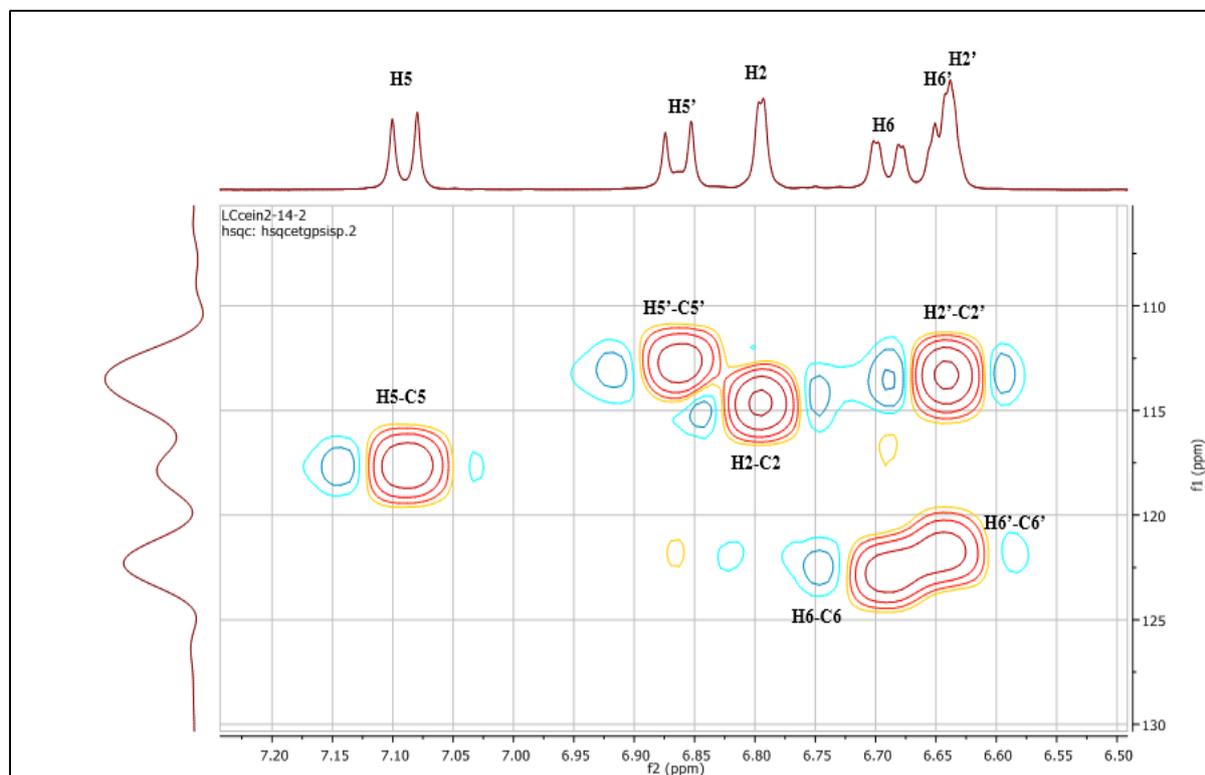
Le proton (H-5) permet la localisation de C-3 de ce noyau aromatique à  $\delta_C = 150,2$  ppm grâce à leur tâche de corrélation relevée sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.42). Ce carbone C-3 montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,83$  ppm indiquant également sa méthylation.

En effet et toujours sur le spectre HMBC qui montre les taches de corrélation suivantes :

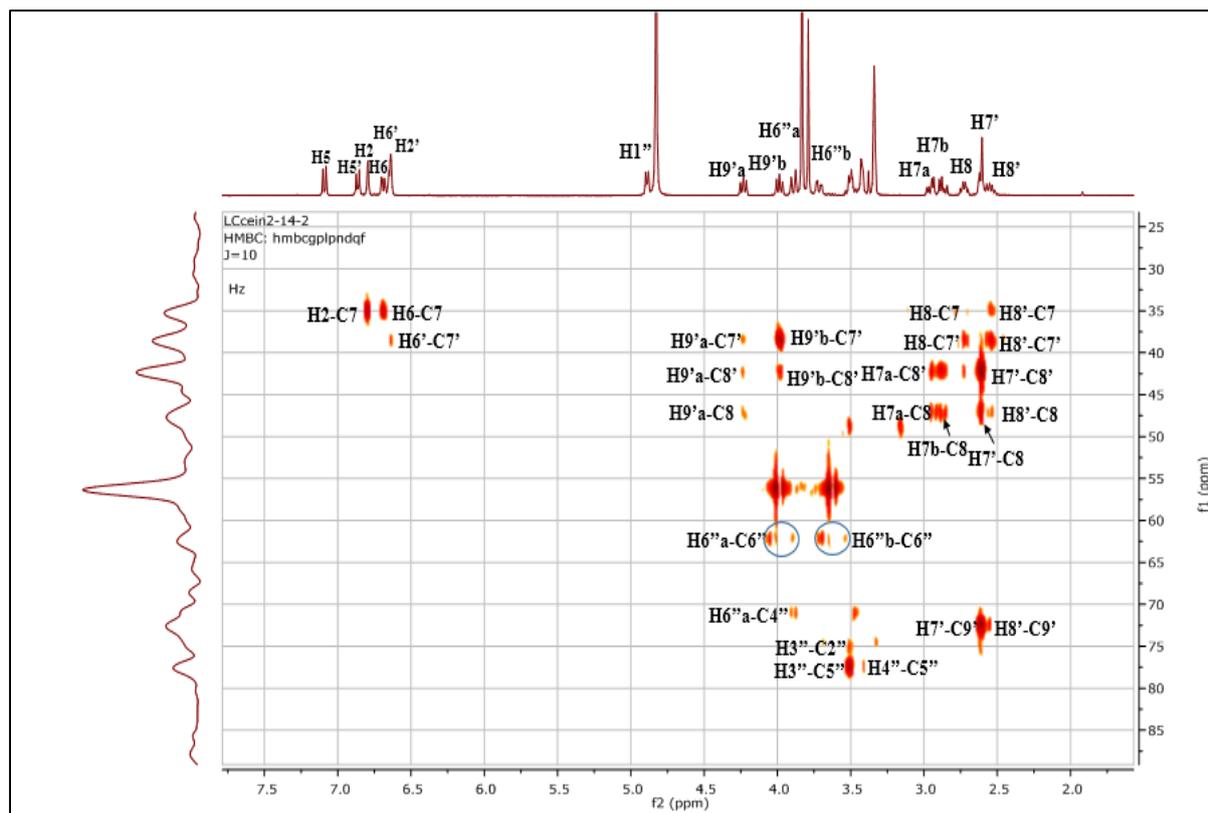
- Le proton H-8' avec le carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C = 132,6$  ppm attribuable au carbone C-1' du deuxième noyau aromatique.
- Les protons H-7' avec les deux carbones des méthynes aromatiques à  $\delta_C = 113,3$  ppm et  $\delta_C = 121,8$  ppm. attribuable au C-2' et C-6'.

La substitution des positions C-3' et C-4' est établie par le biais du spectre HMBC où les deux protons H-2' et H-6' montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique à  $\delta_C = 149,4$  ppm attribuable au carbone C-4', ce dernier montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle ( $\delta_H = 3,80$  ppm ;  $\delta_C = 56,1$  ppm).

La méthylation de C-3' est appuyée par la valeur de son déplacement chimique ( $\delta_C = 150,2$  ppm) et surtout par la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC entre les protons du méthoxyle résonant à  $\delta_H = 3,83$  ppm et ce carbone (Spectre III.42).

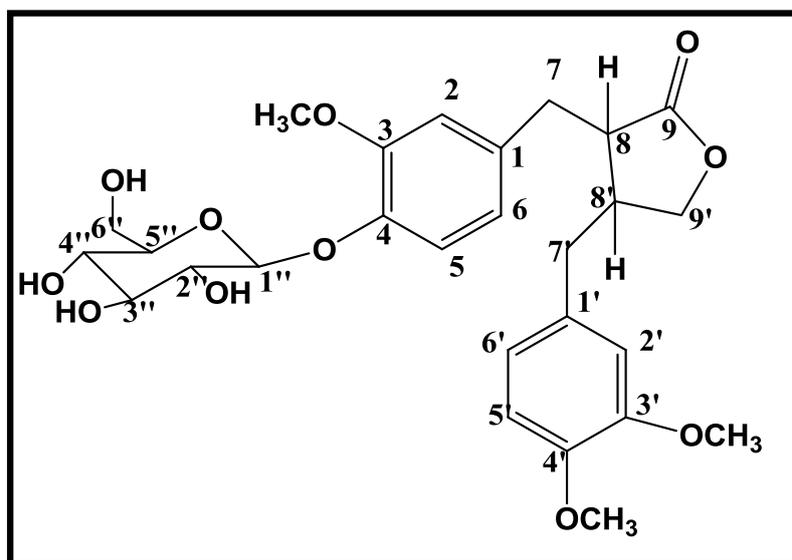


**Spectre III.43** : Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), du composé CEIN-8 étalé dans la zone aromatique



**Spectre III.44** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (2,0 à 7,5 ppm) du composé CEIN-8

L'ensemble de ces données mènent à la structure plane reportée dans la Figure III-20



**Figure III.20** : Structure plane du composé CEIN-8

En matière de stéréochimie, il est connu selon la biogénèse des lignanes de type dibenzylbutyrolactones qu'après oxydation, lactonisation, les protons : H-8 et H-8' adoptent

des orientations  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement (Bruneton, 2016). De ce fait, nous pouvons définir une configuration (8R, 8'R) pour cette molécule.

Ces informations mènent à la formule finale de ce composé qui est reportée dans la figure III.21

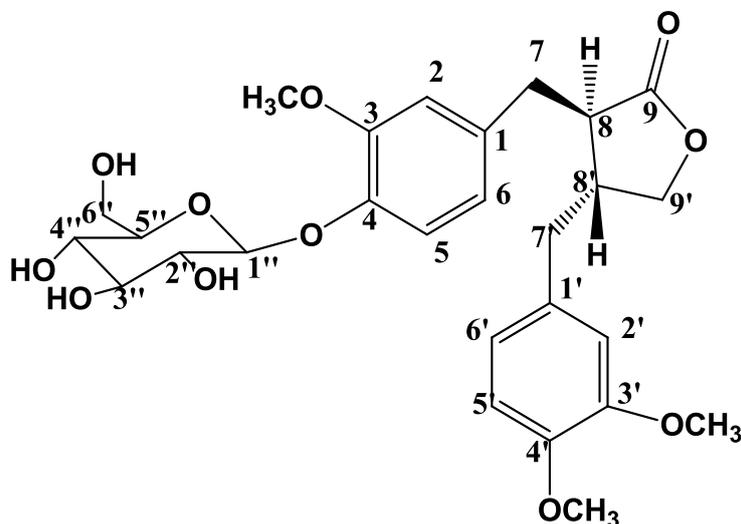


Figure III.20 : Structure finale du composé CEIN-8, l'arctiine.

Ce lignane a été isolé pour la première fois en 1929 par les semences d'*Arctium lappa* L. (Shinoda *et al.*, 1929). Par la suite, il a été aussi isolé de : *Trachelospermum asiaticurn* Nakai var. (Inagaki *et al.*, 1971), *Arctium lappa* L. (Liu *et al.*, 2003), *Forsythia suspensa* (Lee *et al.*, 2011), *Fructus Arctii* (Lü *et al.*, 2016).

Chez le genre *Centaurea* il a été isolé de plusieurs Centaurées comme : *Centaurea macrocephala* (Shoeb *et al.*, 2004), *C. americana* (Shoeb *et al.*, 2006), *C. zuccariniana* (Ciric *et al.*, 2012), *C. vlachorum* Hartvig (Hodaj *et al.*, 2017) et *C. polyclada* DC. (Demir *et al.*, 2018).

Ce lignane avait plusieurs propriétés biologiques anti-inflammatoire, effets antibactériens et antiviraux in vitro (Lee *et al.*, 2011).

Les résultats des études par spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont résumés dans les tableaux III.15.

Tableau III.15 : Les données spectrales RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-8

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	-	134,1
2	6,79 (1H, d ; $J = 1,4$ )	114,6
3	-	150,4
4	-	146,6
5	7,09 (1H, d ; $J = 8,2$ )	117,6
6	6,68 (1H, dd ; $J = 8,2 ; 1,4$ )	122,8
7a	2,95 (1H, dd ; $J = 13,9 ; 5,3$ )	35,0
7b	2,88 (1H, dd ; $J = 13,9 ; 7,2$ )	
8	2,72 (1H, q ; $J = 7,6$ )	47,3
9	-	181,0
1'	-	132,6
2'	6,64 (1H, d ; $J = 1,5$ )	113,3
3'	-	150,2
4'	-	149,4
5'	6,86 (1H, d ; $J = 8,6$ )	112,8
6'	6,65 (1H, m)	121,8
7'	2,61 (1H, m)	38,5
8'	2,55 (1H, dd ; $J = 14,3 ; 7,47$ )	42,0
9'a	4,22 (1H, t ; $J = 7,7$ )	72,5
9'b	3,98 (1H, t ; $J = 7,7$ )	
1''	4,88 (1H, d ; $J = 7,3$ )	102,6
2''	3,50 (1H, m)	74,6
3''	3,50 (1H, m)	77,1
4''	3,42 (1H, m)	70,9
5''	3,42 (1H, m)	77,8
6a''	3,88 (1H, d ; $J = 11,9$ )	62,2
6b''	3,72 (1H, d ; $J = 11,2$ )	
2-OCH <sub>3</sub>	3,83 (6H, s)	56,1
OCH <sub>3</sub>	3,80 (3H, s)	56,0

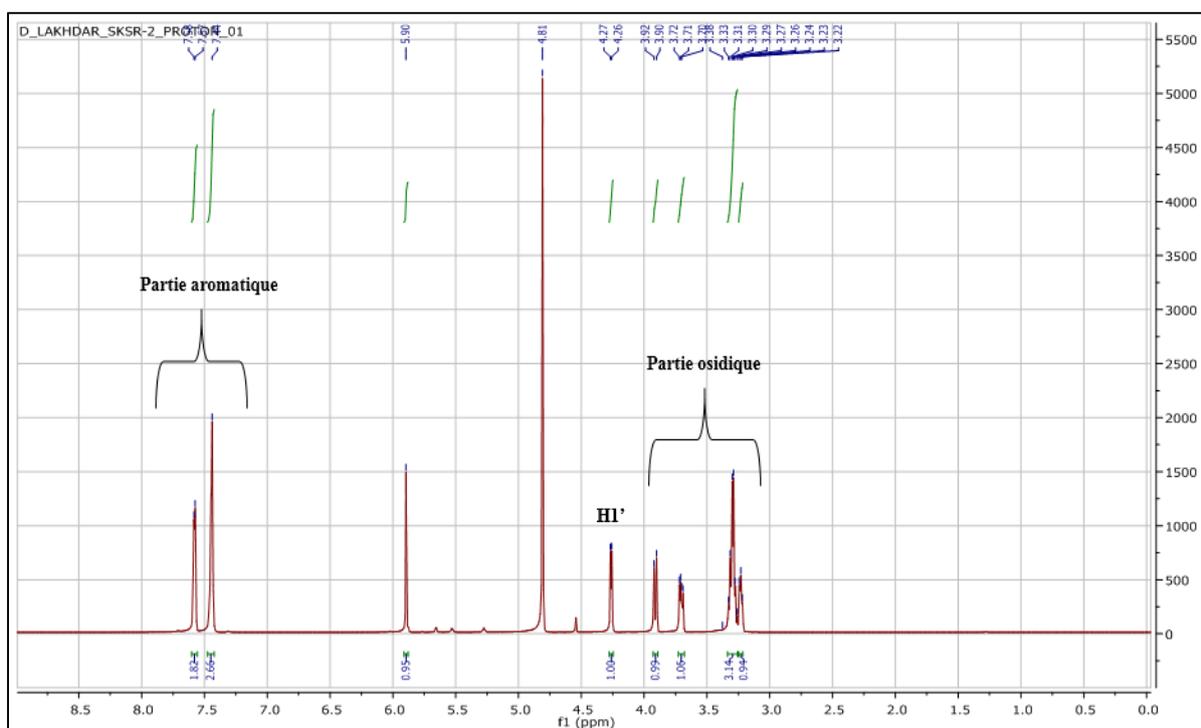
### III.6.9. Détermination structurale du composé CEIN-9

Le composé CEIN-9 est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm et noir verdâtre après révélation par l'anisaldéhyde.

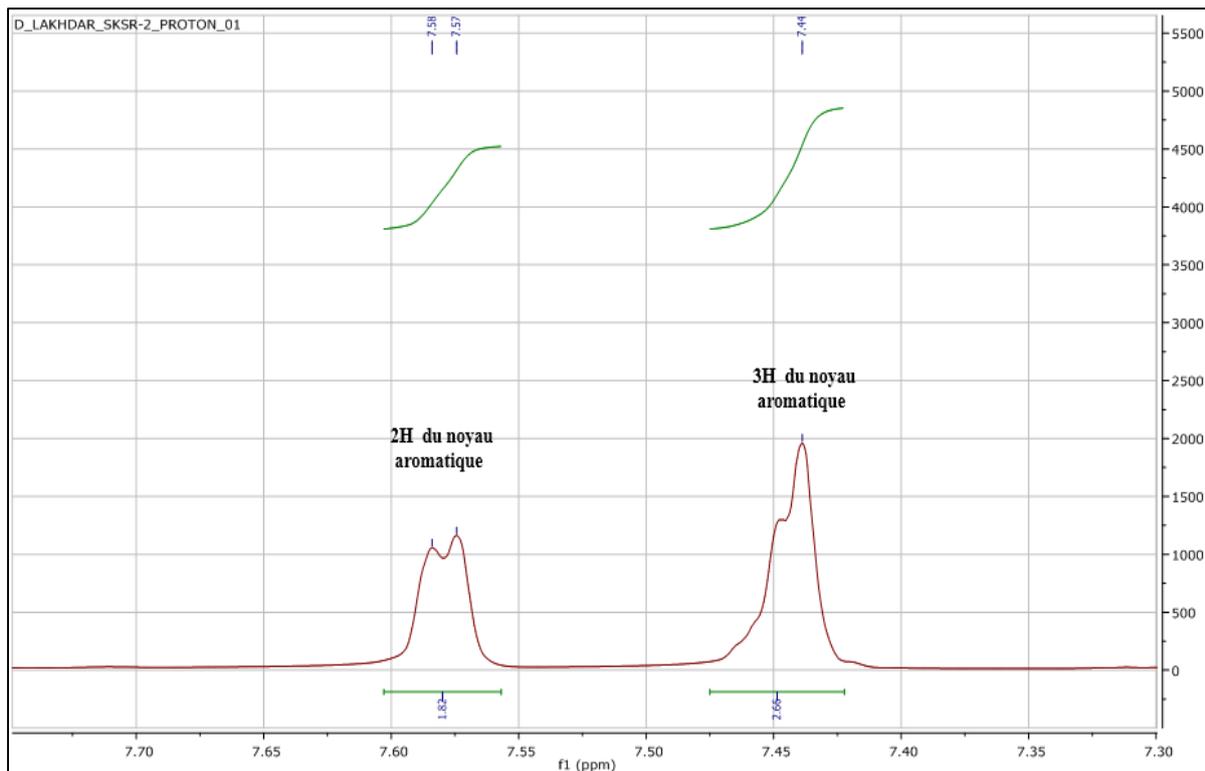
L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H (Spectre III.45) et ces étalements (Spectre III.45a, Spectre III.45b) montrent la présence :

- Des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué dont : un signal d'intégration 3H sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 7,44$  ppm et un autre d'intégration 2H sous forme d'un doublet à  $\delta_H = 7,57$  ppm ( $J = 5,8$  Hz).

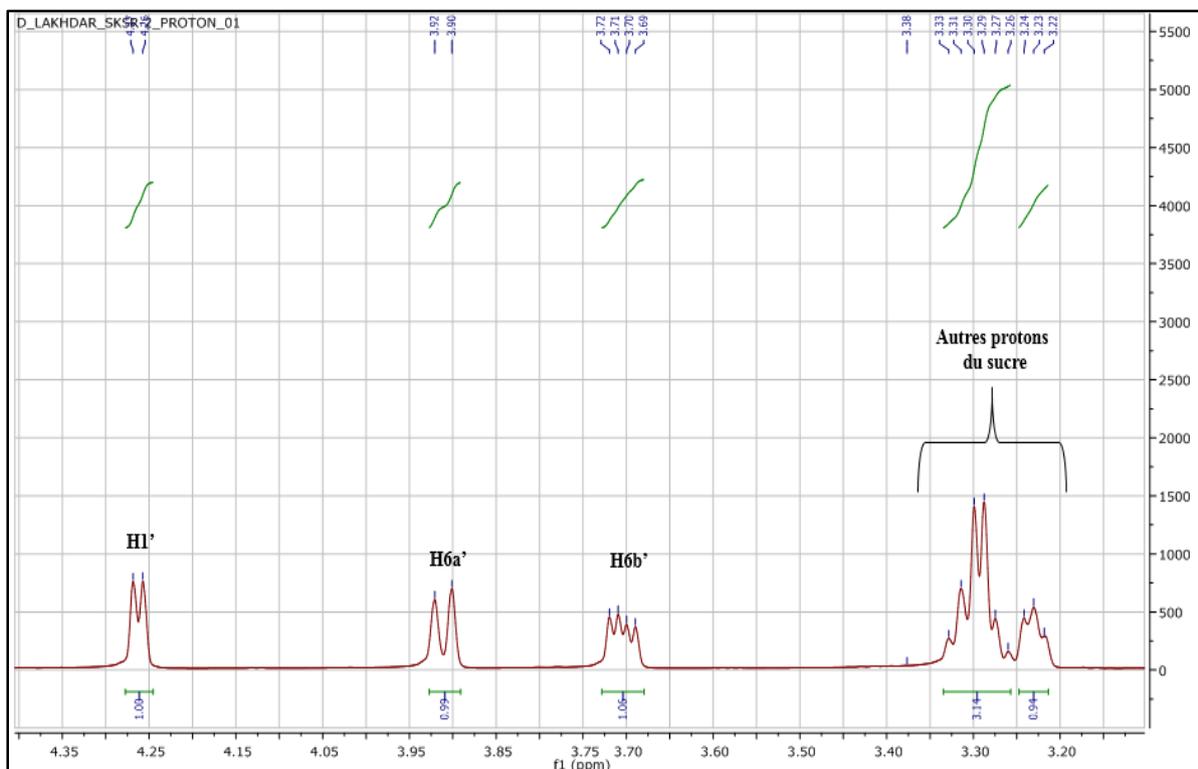
- Un ensemble de signaux caractéristiques d'un hexose notamment le signal à  $\delta_H = 4,27$  ppm sous forme d'un doublet ( $J = 6,7$  Hz) attribuable au proton anomérique (H-1') de l'hexose.
  - ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun attribuables respectivement à H-6'b, et H-6'a à  $\delta_H = 3,71$  ppm (dd,  $J = 11,8 ; 6,1$  Hz) et  $\delta_H = 3,90$  ppm (dl,  $J = 11,8$  Hz).
  - ✓ Un ensemble de signaux dans l'intervalle 3,20 – 3,35 ppm attribuable aux autres protons du sucre (H-2', H-3', H-4' et H-5').
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 5,89$  ppm, porté d'après le spectre HSQC (Spectre III.46) par le carbone à  $\delta_C = 67,1$  ppm.



Spectre III.45 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé CEIN-9



Spectre III.45a : Spectre RMN-<sup>1</sup>H étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-9



Spectre III.45b : Spectre RMN-<sup>1</sup>H étalé (600MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-9

Sur le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  (Spectre III.47) et HSQC (Spectre III.46). On observe la présence des atomes de carbone suivants :

✓ Neuf groupements méthynes (9 CH) dont :

- Cinq carbones oxygénés du sucre à  $\delta_{\text{C}} = 76,9$  ;  $76,4$  ;  $73,3$  ;  $69,9$  le 5<sup>ème</sup> étant le carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}} = 100,5$  ppm.

- 3 correspondant aux autres carbones du noyau aromatique monosubstitué notamment les C-4 et C-8 à  $\delta_{\text{C}} = 127,6$  ppm, les C-5 et C-7 à  $\delta_{\text{C}} = 128,8$  ppm et le C-6 à  $\delta_{\text{C}} = 129,6$  ppm.

- Un CH oxygéné à  $\delta_{\text{C}} = 67,1$  ppm

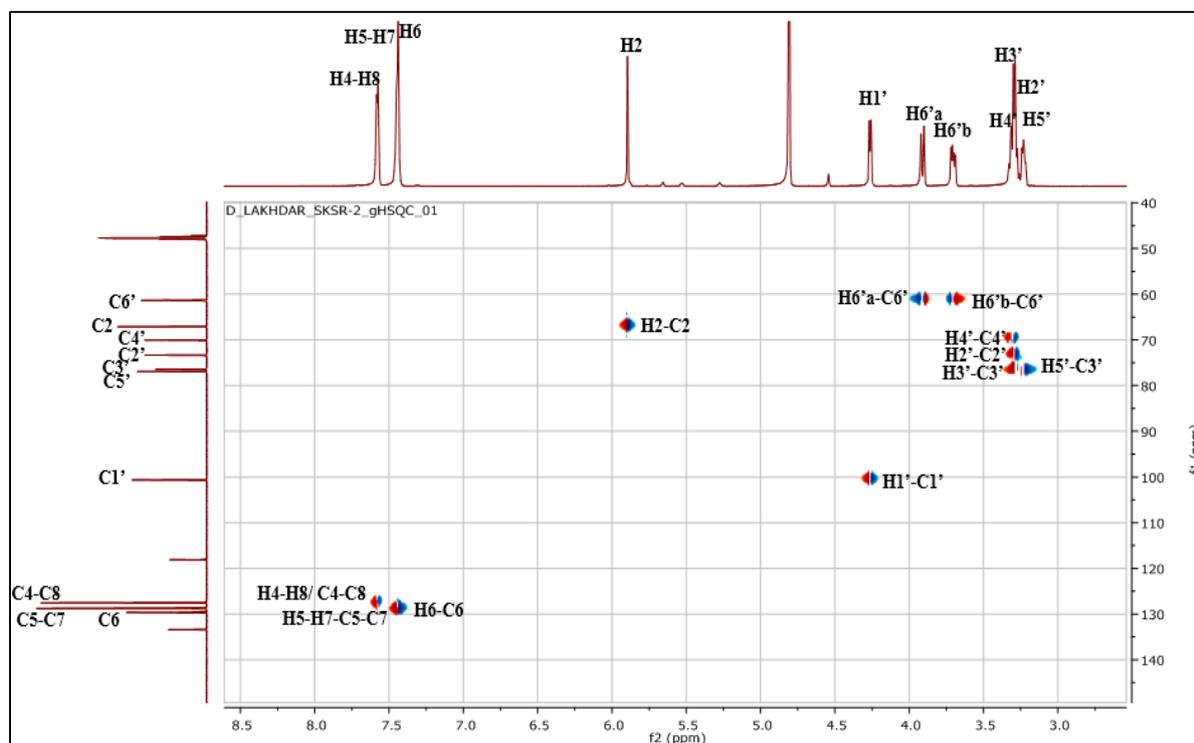
✓ Un groupement méthylène du sucre ( $\text{CH}_2$ ) oxygéné à  $\delta_{\text{C}} = 61,3$  ppm

✓ Deux carbones quaternaires dont :

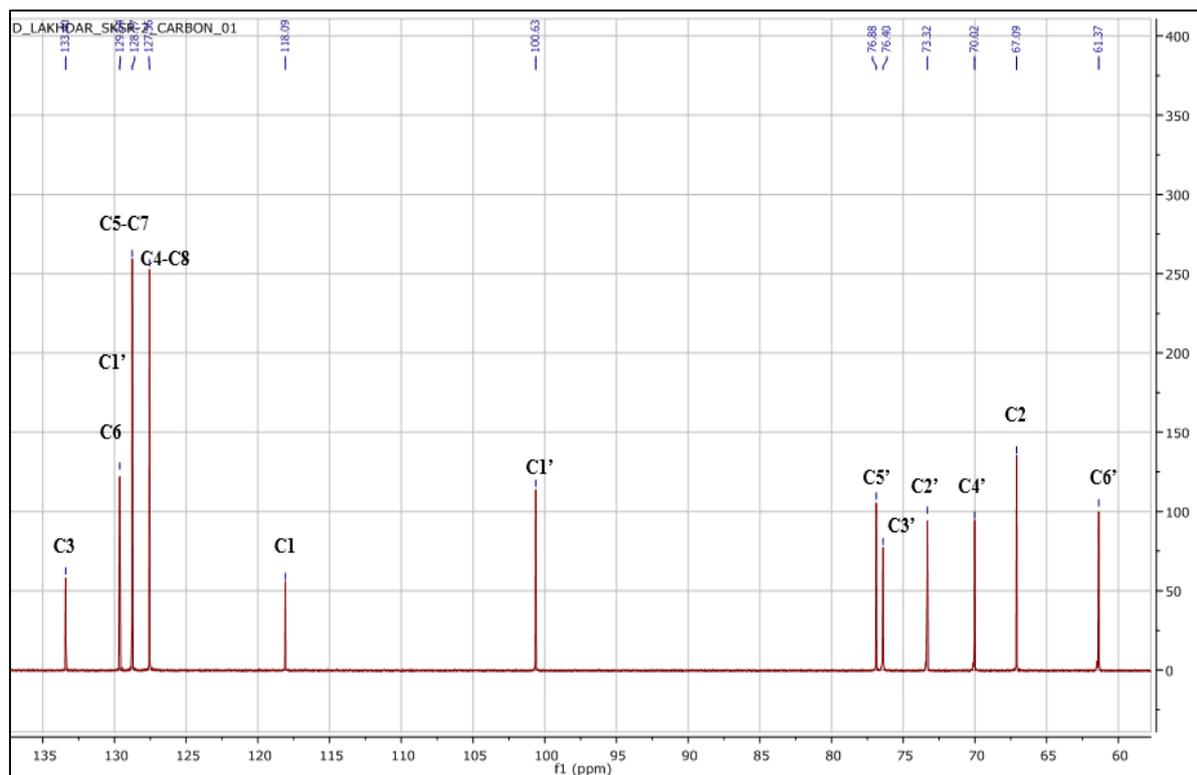
- Un à  $\delta_{\text{C}} = 133,4$  ppm attribué à un carbone du noyau aromatique et l'autre  $\delta_{\text{C}} = 118,1$  ppm.

Le déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du carbone d'un groupement nitrile.

La présence de ce groupement justifie l'abaissement du déplacement chimique du groupement CH oxygéné à  $\delta_{\text{C}} = 61,3$  ppm explicable par la proximité de ce noyau de la zone positivante de la triple liaison de ce groupement nitrile.



**Spectre III.46** : Spectre HSQC étalé (600MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé CEIN-9



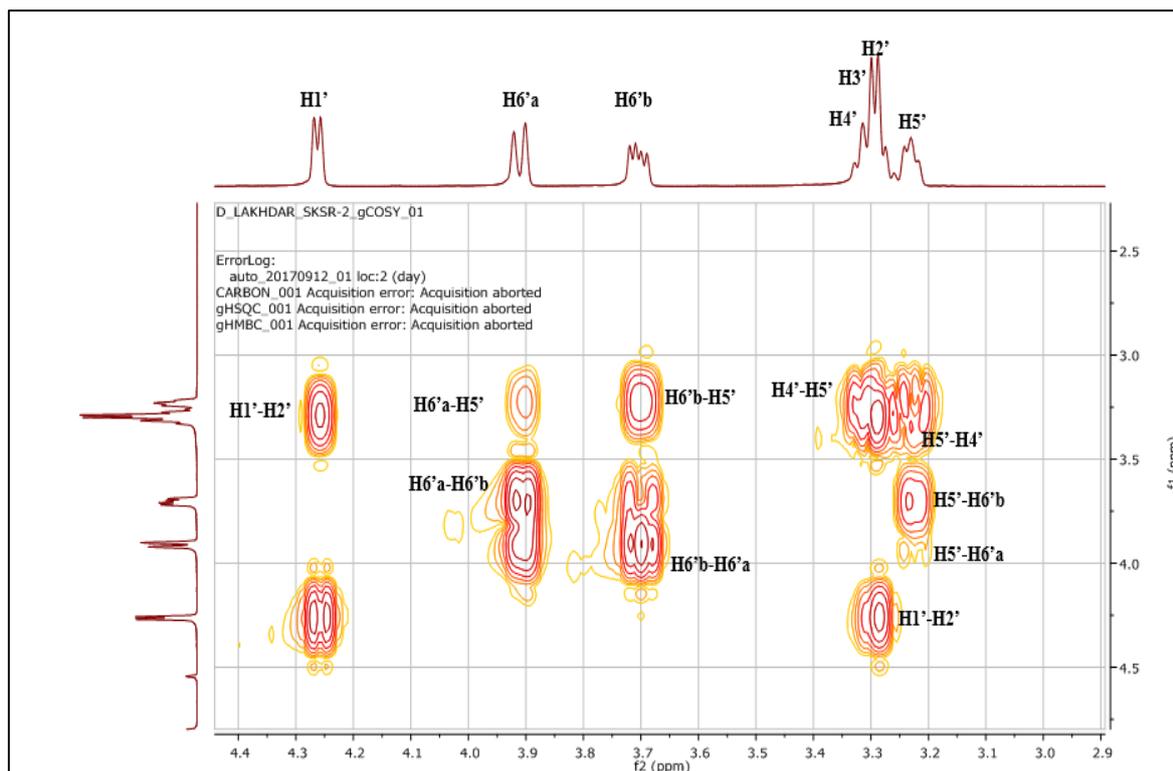
**Spectre III.47** : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé CEIN-9

L'examen du spectre de l'expérience HSQC (Spectre III.46) montrent que le proton anomérique H-1' est associé au C-1' à  $\delta_{\text{C}} = 100,5$  ppm. La valeur de ce déplacement chimique indique que cet hexose est relié à l'aglycone par une jonction oxygène.

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III.48), le proton anomérique H-1' montre une tache de corrélation avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,27$  ppm intégrant 1H. Ce proton est attribuable à H-2' ( $\delta_{\text{C}} = 73,3$  ppm).

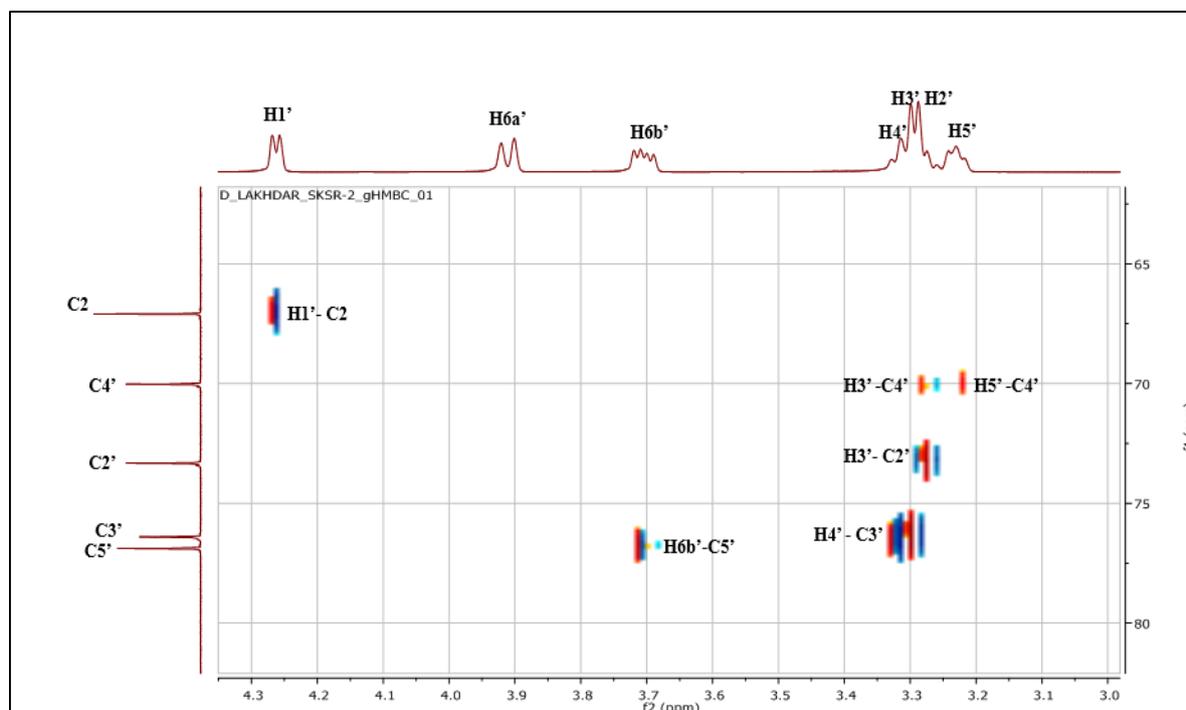
On distingue aussi que le proton H-4' à  $\delta_{\text{H}} = 3,32$  ppm sous forme de multiplet donne une tache de corrélation avec un proton résonant sous forme de multiplet 1H à  $\delta_{\text{H}} = 3,22$  ppm attribuable à H-5'. On remarque que ce dernier donne deux taches de corrélations avec les deux protons du H-6'a,b. On remarque aussi que les deux protons du H-6'a,b corrélaient entre eux.

La grande valeur de constante de couplage du proton anomérique  $J_{1'-2'} = 6,7$  Hz et notamment les valeurs des déplacements chimiques des carbones comparées à celles de la littérature indique qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  (Pawan, 1992).



**Spectre III.48** : Spectre RMN COSY étalé (600MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-9

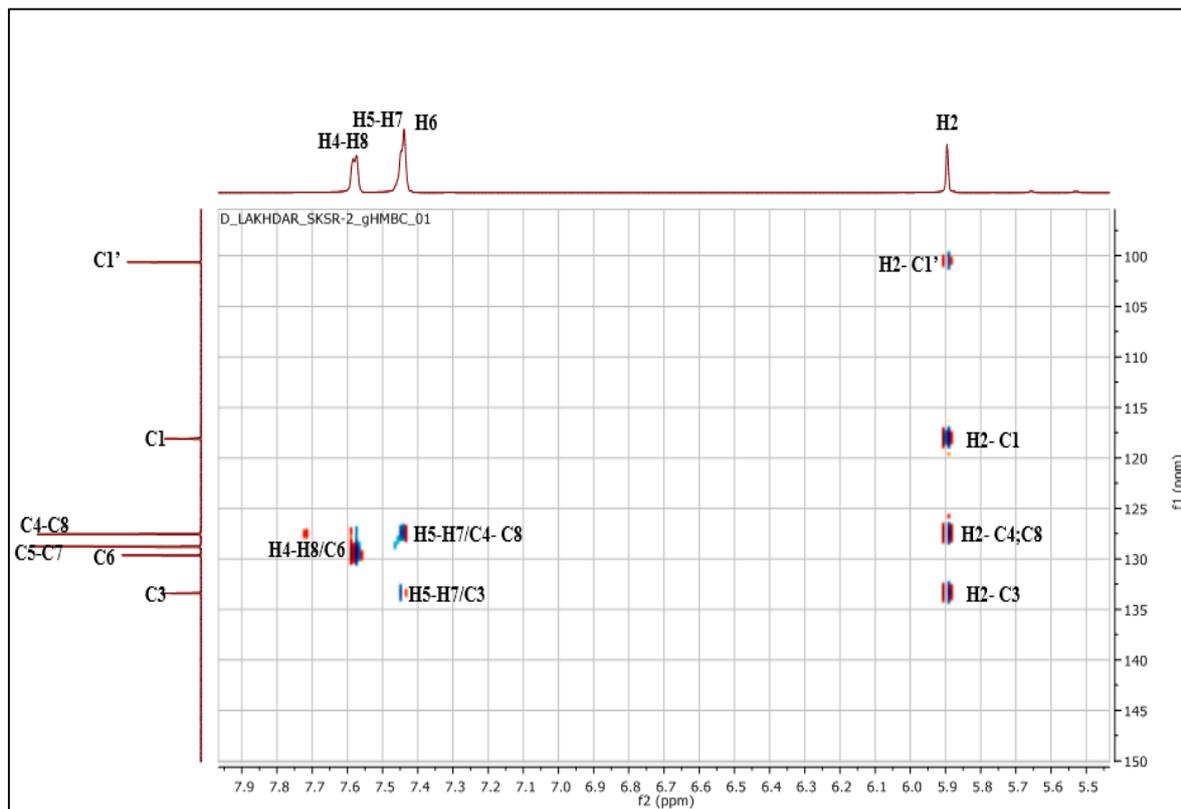
L'analyse du spectre HMBC (Spectre III.49) a permis de positionner le glucose sur le squelette de la génine par la présence d'une tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone C-2.



**Spectre III.49** : Spectre HMBC étalé (600 M Hz, CD<sub>3</sub>OD, δppm) du composé CEIN-9

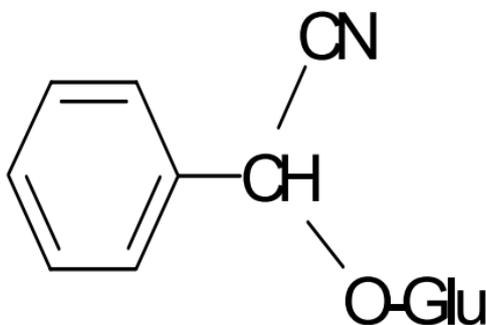
Le deuxième étalement du spectre HMBC (Spectre III.49a) montre les corrélations suivantes :

- ✓ H-4-H-8 corrélient avec C-6.
- ✓ H-5/H-7 corrélient avec C-4, C-8 et avec le C-3.
- ✓ H-2 corrélient avec C-1', C-1, C-4, C-8 et en fin donne une tache de corrélation avec C-3.



**Spectre III.49a** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN-9, étalement de (5,5 à 7,9 ppm)

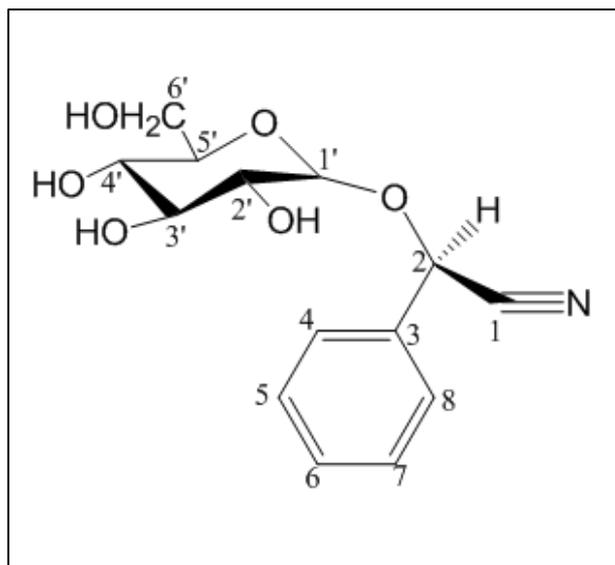
L'ensemble de ces données mène à la structure plane reportée dans la figure III.22.



**Figure III.22** : Structure plane du composé CEIN-9

La configuration absolue du centre chiral dans la partie aglycone de la position C-2 du composé a été suggérée comme étant R par comparaison des déplacements chimiques de H-2 et H-1' de ce composé  $\delta_{\text{H}} = 5,89$  ppm (H-2) ;  $\delta_{\text{H}} = 4,26$  (H-1') avec ceux de la prunasine et de la sambunigrine rapportés dans la littérature (Seigler *et al.*, 2002, 2005 ; Ling *et al.*, 2002)

En effet ces résultats mènent à une molécule naturelle connue sous le nom de prunasine, la structure finale est reportée dans la figure III.23.



**Figure III.23** : Structure finale du composé CEIN-9, la prunasine.

Ce composé a été isolé pour la première fois chez cherry laurel « *prunus laurocerasus* » (Trim, 1955). Par la suite, il a été aussi isolé de : *Bracken fern* (Bennett, 1968), *Prunus serotina* (Horsley *et al.* 1981), *Prunus amygdalus* (Frehner *et al.*, 1990), *Prunus dulcis* (Arrázola, 2002).

Pour les espèces du genre *Centaurea* il a été isolé de : *Centaurea Aspera* var. *Subinermis* (Cardona *et al.*, 1992), *C. nicaeensis* (Hammoud *et al.*, 2012) et *C. microcarpa* (Baatouche *et al.*, 2018).

Les résultats des études par spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont résumés dans le tableau III.16.

**Tableau III.16** : Les données spectrales RMN-1H et RMN-13C du composé CEIN-9

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, $J$ (Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	/	118,1
2	5,89 (1H, s)	67,1
3	/	133,4
4	7,58 (1H, d ; $J = (5,8)$ )	127,6
5	7,44 (1H, m)	128,8
6	7,44 (1H, m)	129,6
7	7,44 (1H, m)	128,8
8	7,58 (1H, d ; $J = 5,8$ )	127,6
1'	4,26 (1H, d ; $J = 6,7$ )	100,5
2'	3,27 (1H, m)	73,3
3'	3,26 (1H, m)	76,4
4'	3,32 (1H, m)	69,9
5'	3,22 (1H, m)	76,9
6a'	3,90 (1H, dl ; $J = 11,9$ )	61,3
6b'	3,71 (1H, dd ; $J = 11,8 ; 6,1$ )	

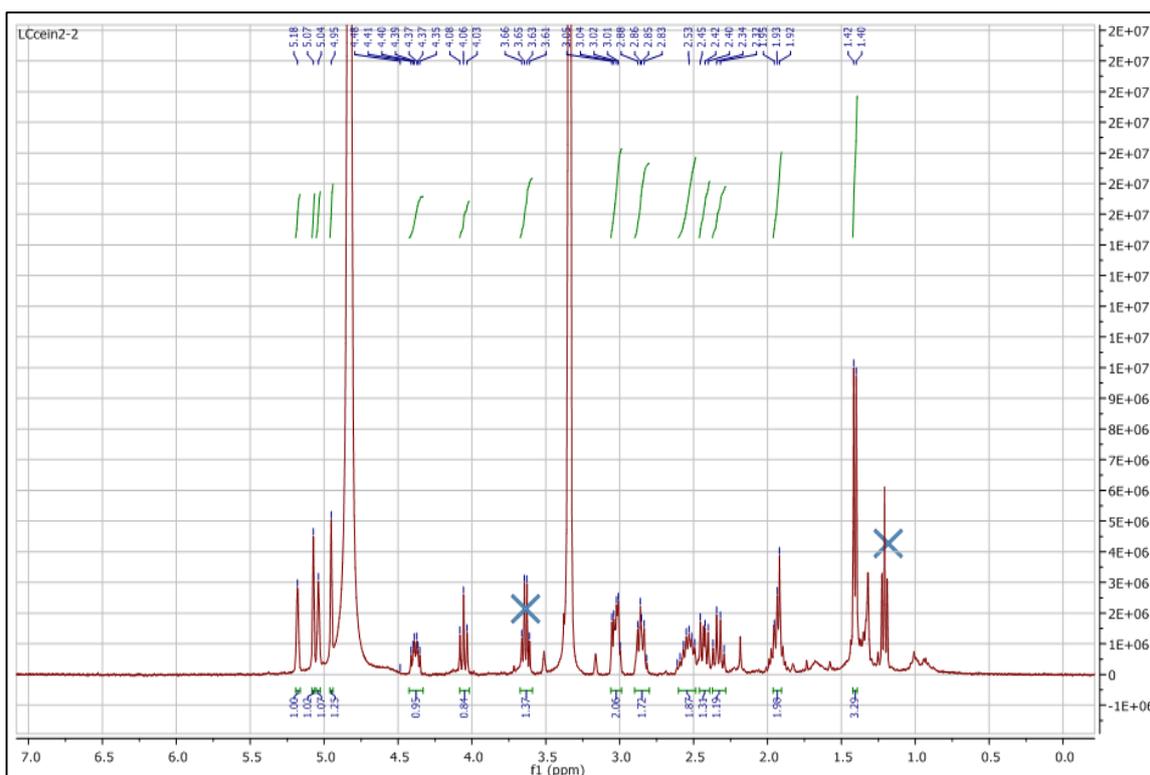
**III.6.10. Détermination structurale du composé CEIN-10**

Ce produit se présente sous forme de cristaux soluble dans le méthanol. Ce composé a une fluorescence noire sous lampe UV à 254 nm et une couleur rose après révélation par l'acide sulfurique révélatrice d'un squelette sesquiterpénique.

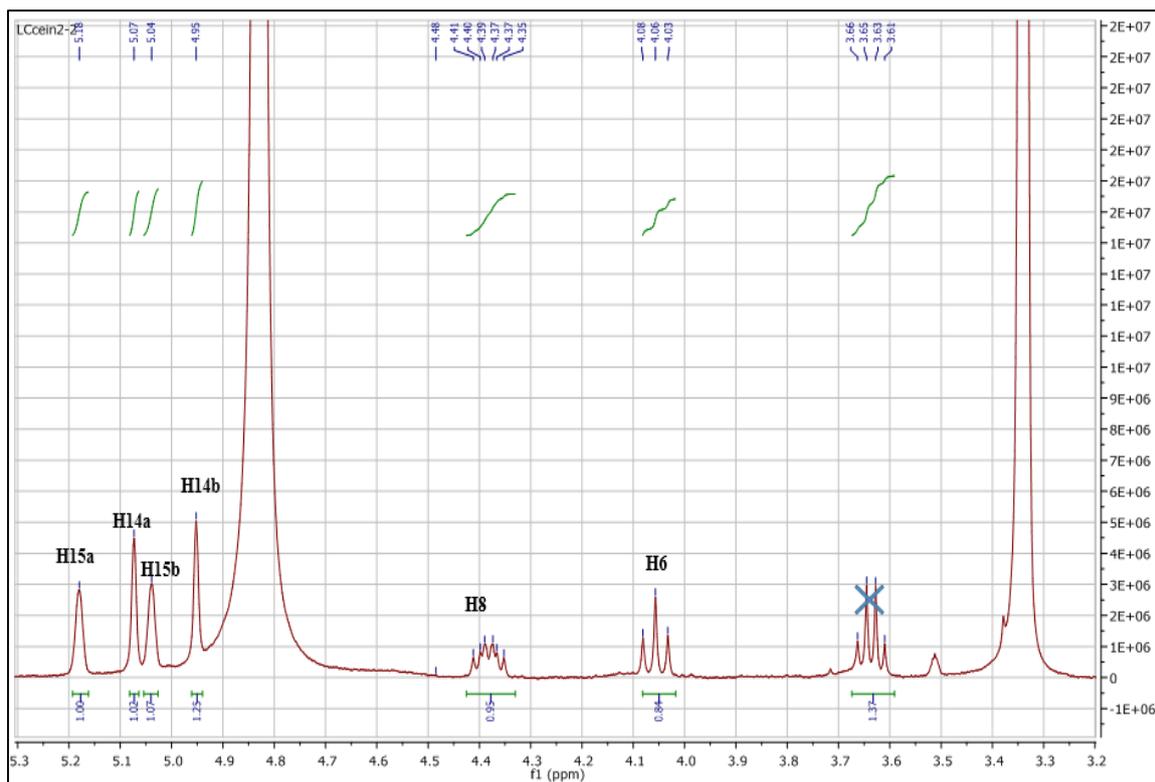
L'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.50, spectre III.50a, spectre III.50b) et HSQC (spectre III.51) de ce composé permet de relever la présence des groupements suivants :

- ✓ Deux protons éthylénique sous forme d'un singulet large d'intégration 1H chacun à  $\delta_H = 5,18$  ppm et  $\delta_H = 5,04$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 109,4$  ppm.
- ✓ Deux autres signaux sous forme d'un singulet large et d'intégration 1H chacun à  $\delta_H = 4,07$  ppm et  $\delta_H = 4,95$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone éthylénique à  $\delta_C = 115,1$  ppm.
- ✓ Un signal sous forme d'un triplet d'intégration 1H ( $J = 9,7$  Hz) à  $\delta_H = 4,06$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 81,4$  ppm la valeur de son déplacement chimique indique qu'il peut être le carbone de fermeture d'une  $\gamma$  lactone où être oxygéné
- ✓ Un signal sous forme d'un triplet de doublet ( $J = 9,8 ; 5,5$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H = 4,38$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 81,8$  ppm.
- ✓ Un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 3,02$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 48,4$  ppm.

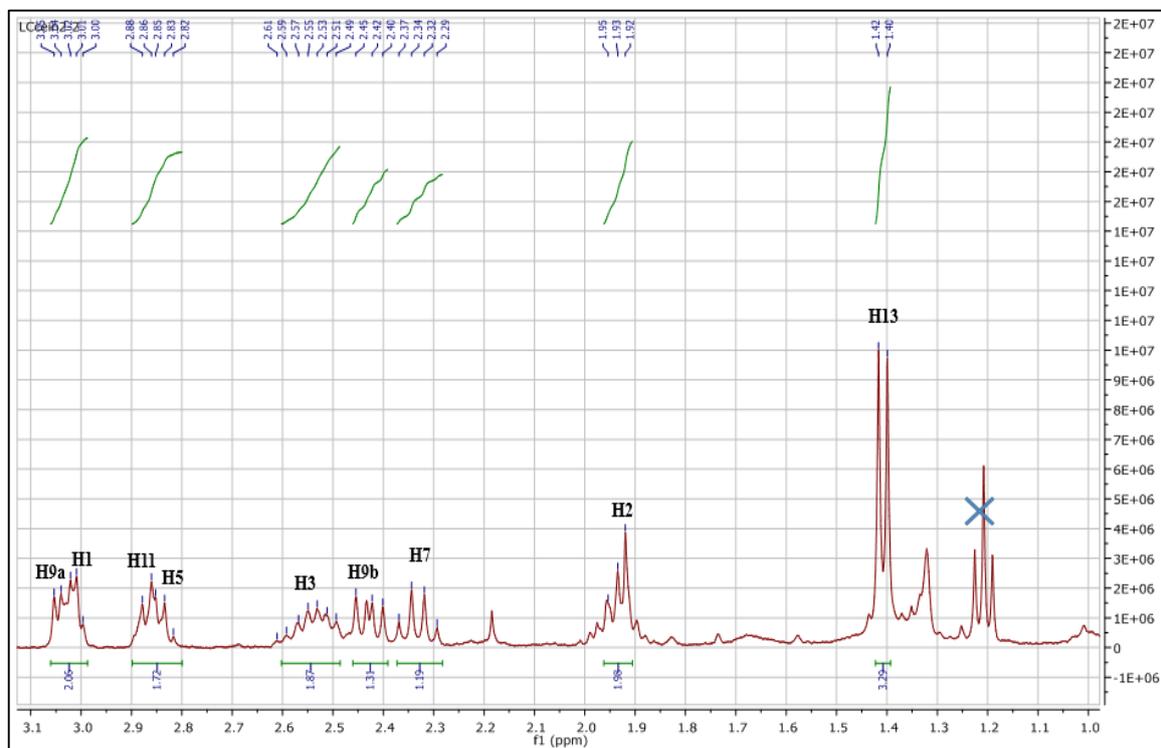
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier sous forme d'un multiplet à  $\delta_H=3,03$  et l'autre sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 12,8 ; 8,4$  Hz) à  $\delta_H = 2,43$  ppm. Ces deux protons corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 44,1$  ppm.
- ✓ Un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 2,86$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 42,5$  ppm
- ✓ Un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 2,85$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 53,6$  ppm
- ✓ Un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 2H à  $\delta_H = 2,53$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 32,9$  ppm.
- ✓ Un autre signal sous forme d'un quadruplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 2,33$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 54,3$  ppm.
- ✓ Encore un autre signal sous forme d'un multiplet d'intégration 2H à  $\delta_H = 1,93$  ppm corrént sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C = 30,7$  ppm.
- ✓ En fin un signal sous forme d'un doublet d'intégration 3H à  $\delta_H = 1,41$  ppm ( $J = 3,4$  Hz) corrént avec le carbone à  $\delta_C = 15,9$  ppm selon le spectre HSQC.



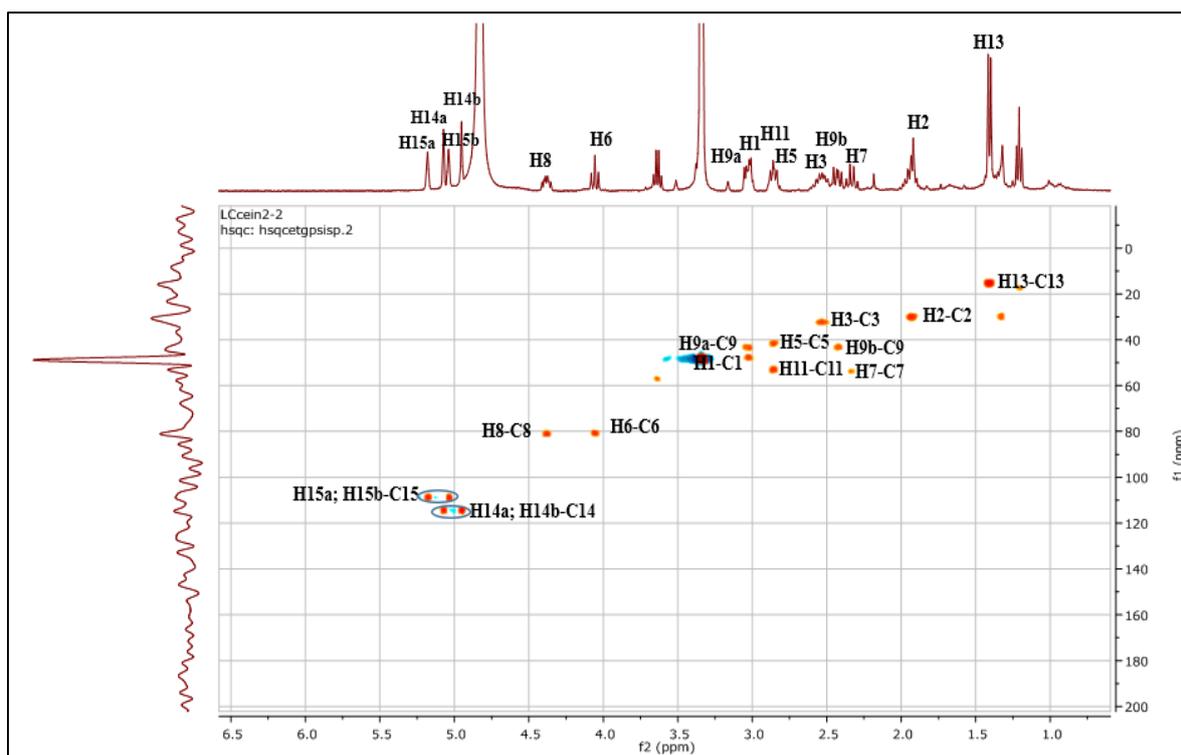
**Spectre III.50 :** Spectre RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé CEIN-10



**Spectre III.50a** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) étalé (3,2 à 5,3 ppm) du composé CEIN-10



**Spectre III.50b** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) étalé (1,0 à 3,1 ppm) du composé CEIN-10



**Spectre III.51** : Spectre HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé CEIN-10

En effet le nombre de carbone totale est déduire à partir du spectre de corrélation HMBC (Spectre III.53) qui met en évidence la présence de :

- Trois carbones quaternaires, dont un de type carbonyle à  $\delta_{\text{C}} = 181,2$  ppm et les deux autres à  $\delta_{\text{C}} = 145,7$  et  $153,1$  ppm, on compte donc au totale 15 carbones.

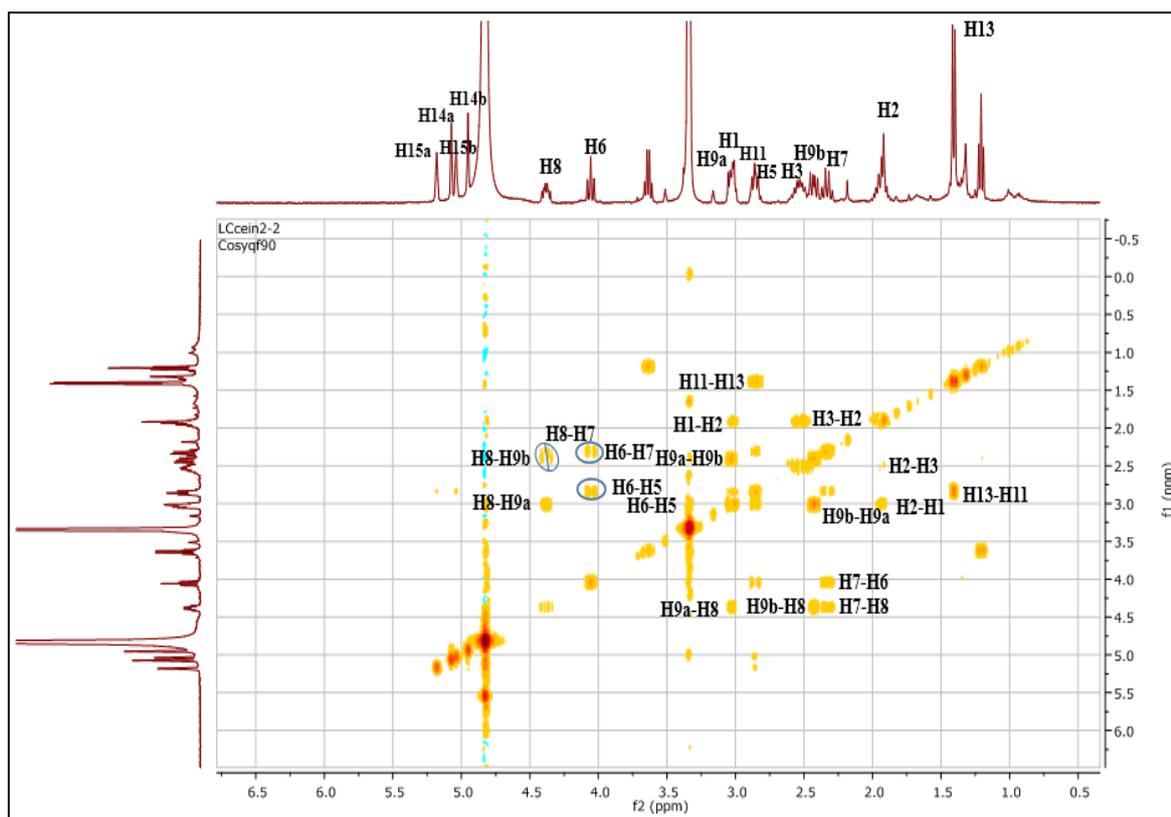
Un décompte de l'ensemble des noyaux formant ces groupements mène à une formule brute partielle de  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_2$ . Comme cette molécule ne comporte que 15 atomes de carbone, cela suppose qu'ils sont tous engagés dans le squelette sesquiterpénique, par conséquent, le groupement CH oxygéné précédemment signalé, est porteur d'un groupement hydroxyle. Cette observation mène à une molécule de formule brute totale  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$  comportant 6 insaturations. Comme elle comporte une fonction lactone et deux doubles liaisons, il en résulte que cette lactone sesquiterpénique admet un squelette bi-cyclique.

Pour essayer de connaître le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique (en C-6 ou en C-8), nous avons examiné le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III.52), ce spectre montre en effet, des taches de corrélation nettes entre le proton de fermeture de la lactone et le proton de l'hydroxyméthyne avec le même proton dont le signal est situé à  $\delta_{\text{H}} = 2,33$  ppm (q,  $J = 10,0$  Hz ;  $\delta_{\text{C}} = 54,3$  ppm). De cette observation on conclut que, quel que soit le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique, ce dernier proton est attribuable au H-7, ceci d'une

part ; d'autre part on peut affirmer que cette lactone est soit fermée en C-6 et hydroxylée en C-8 ou fermée en C-8 et hydroxylée en C-6. Pour trancher définitivement, nous sommes revenus au signal du proton de fermeture de cette lactone où l'on relève un triplet avec une constante de couplage de 9,7 Hz. La multiplicité de ce signal permet son attribution à H-6 et mène par conséquent à une lactone sesquiterpénique 6-12 olide. La valeur de la constante de couplage oriente vers une interaction 1, 2 diaxiales de ce noyau avec les protons voisins dont le H-7, ceci permet de déduire une orientation  $\beta$  de H-6 et  $\alpha$  de H-7. En plus, l'hydroxyméthine résonant à  $\delta_{\text{H}} = 4.38$  ppm (td  $J = 9,8 ; 5,5$  Hz ;  $\delta_{\text{C}} = 81,7$  ppm) est attribué à la position C-8. Vu la valeur de la constante de couplage du H-7 ( $J = 10.0$  Hz) prévoyant également un couplage 1,2 diaxiales entre H-7 et H-8 et menant par conséquent à une orientation  $\beta$  du H-8.

Par ailleurs et toujours grâce au spectre COSY (Spectre III.52), l'attribution de H-7 mène à celle de H-11 du cycle  $\gamma$ -lactonique à  $\delta_{\text{H}} = 2,86$  ppm (m ;  $\delta_{\text{C}} = 42,5$  ppm). Ce proton (H-11) corrèle avec les protons du  $\text{CH}_3$  résonant à  $\delta_{\text{H}} = 1,41$  (d,  $J = 3,4$  Hz ;  $\delta_{\text{C}} = 15,9$  ppm), permettant alors l'attribution de ce méthyle au carbone et protons de la position 13.

De même, l'attribution de H-8 permet grâce toujours à l'analyse du spectre COSY (Spectre III.52) de localiser les signaux des protons H9a sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,03$  ppm et H-9b sous forme de doublet de doublet ( $J = 12,8 ; 8,4$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 2,43$  ppm.



**Spectre III.52** : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé CEIN -10

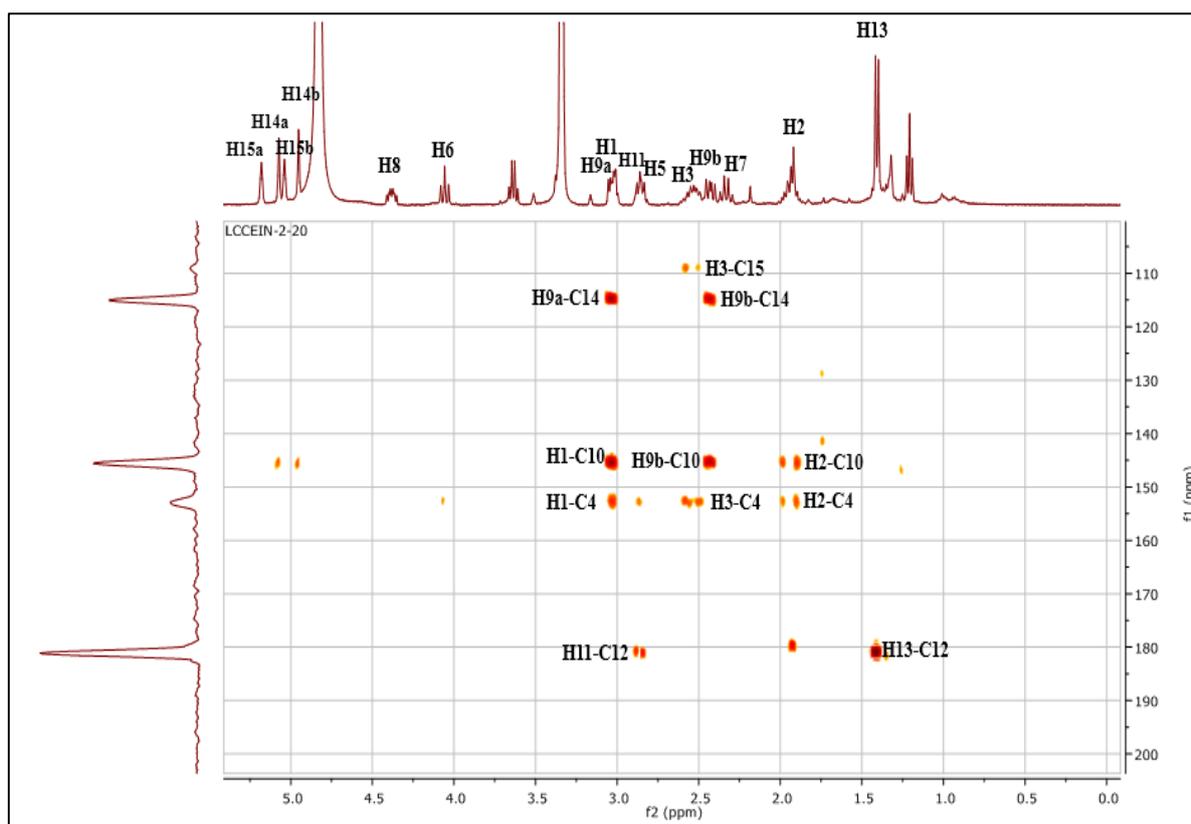
Toujours sur le spectre COSY, H-6 permet la localisation de H-5 à  $\delta_{\text{H}} = 2,85$  ppm sous forme d'un multiplet. Ce dernier montre des taches de corrélation avec les deux protons de la double liaison exocyclique à  $\delta_{\text{H}} = 5,18$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 5,04$  ppm. Ces deux protons ne peuvent être attribués qu'à H-15a et H-15b respectivement. Cette observation confirme bien la présence d'une double liaison exocyclique entre C-4 et C-15. Par ailleurs, H-5 montre une tache de corrélation avec le proton résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 3,02$  ppm sous forme d'un multiplet, ce proton ne peut être attribué qu'à H-1 vu que C-4 est quaternaire. Cette analyse oriente vers un squelette sesquiterpénique du type guaianolide.

En effet, ce H-1 ( $\delta_{\text{H}} = 3,49$  ppm) corrèle avec deux protons, à  $\delta_{\text{H}} = 1,93$  ppm sous forme d'un multiplet attribuables à H-2. Ces protons corrélient à leurs tours avec deux protons à  $\delta_{\text{H}} = 2,53$  ppm qui ne peuvent être que les protons H-3.

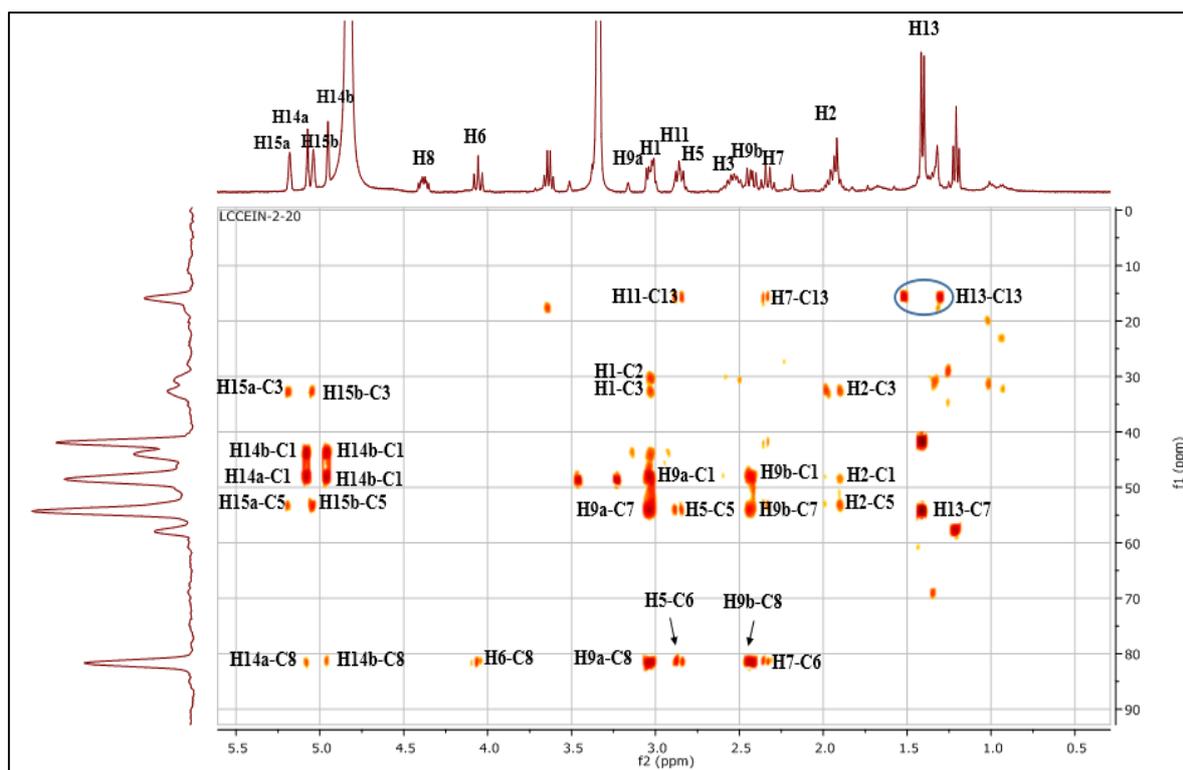
L'examen du spectre de corrélation HMBC (Spectre III.53, Spectre III.53a) dévoile en plus des corrélations attendues vu le spectre (COSY) que le proton H<sub>13</sub> présente une corrélation avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 181,2$  ppm caractéristique de carbonyle du  $\gamma$ -lactone et les carbones à  $\delta_{\text{C}} = 42,5$  ppm et  $\delta_{\text{C}} = 54,3$  ppm attribuable à H-11 et H-7 respectivement.

Les deux protons H-9a et H-9b corrént avec le carbone à  $\delta_C = 115,3$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 145,7$  ppm. Ces données indiquent clairement que ce dernier carbone est porteur de la double liaison exocyclique C-10-C-15.

Toujours sur le spectre HMBC (spectre III.53a) le C-5, C-4 et C-1 corrént avec les même protons dont le signal apparaît à  $\delta_H = 1,93$  ppm attribuable à H-2. Par ailleurs le fait que C-5 et C-1 corrént avec un même noyau cela suppose une jonction C-5—C-1 et confirme qu'on a un squelette sesquiterpénique du type guaianolide.

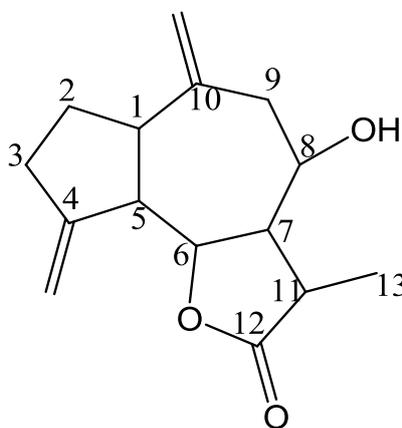


**Spectre III.53 :** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (0,0 à 5,0 ppm) du composé CEIN-10



**Spectre III.53a** : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) étalé (0,5 à 5,5 ppm) du composé CEIN-10

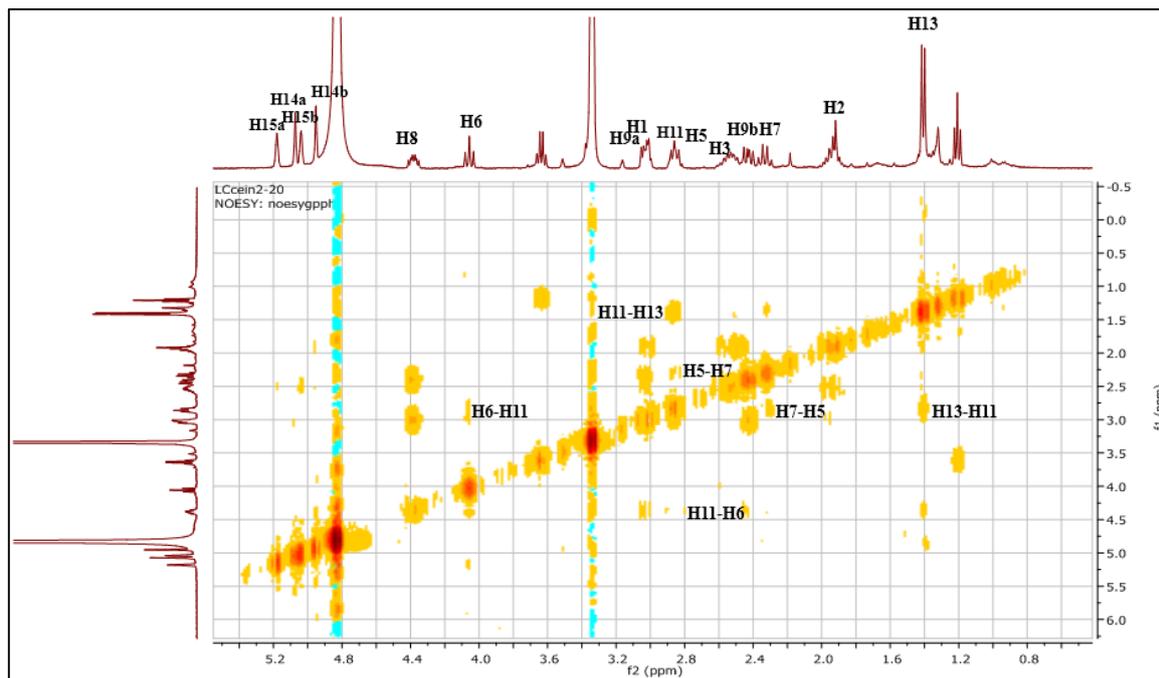
Toutes ces constatations mènent à la structure partielle suivante (figure III.24).



**Figure III.24** : Structure partielle du composé CEIN-10

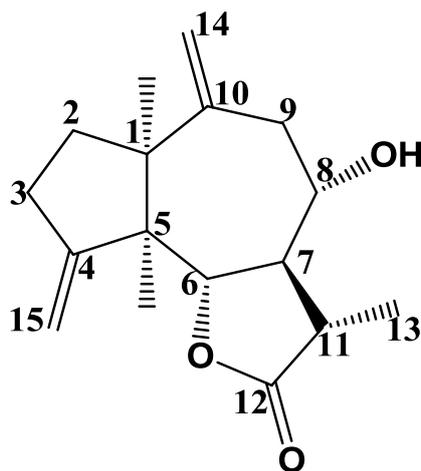
La structure de CEIN-10 comporte six carbones asymétriques, il s'agit de C-1, C-5, C-6, C-7, C-8 et C-11. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H montre que le proton H-6 donne un couplage axial-axial avec les protons H-5 et H-7 donc il est en position β et H5 et H7 sont forcément en position α, ceci est confirmé par le spectre NOESY (spectre III.54).

Ce spectre montre une tâche de corrélation entre H-5 et H-7; d'autre part, les protons adjacents H-5 et H-1 donnent une corrélation indiquant qu'ils se trouvent sur le même côté du plan de la molécule, donc H-1 est en position  $\alpha$  ; en ce qui concerne le proton H-8 on a vu précédemment que la valeur de la constante de couplage du H-7 (10.0 Hz) prévoyant également un couplage 1,2 diaxiaux entre H-7 et H-8 et menant par conséquent à une orientation  $\beta$  du H-8. Les protons H-13 montrent une corrélation avec le proton H-7 indiquant qu'ils sont en position  $\alpha$ , tandis que H-11 est forcément en position  $\beta$  puisqu'il ne corréle pas avec H-7 mais avec H-6.



**Spectre III.54 :** Spectre NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), étalé du composé CEIN-10

L'ensemble de ces constatations nous mène à la structure du guaianolide 8 $\alpha$  hydroxy-11  $\beta$  - 13H dehydrocostus lactone, la structure finale est reportée dans la figure III.25



**Figure III.25** : Structure final du composé CEIN-10, **8 $\alpha$  hydroxy-11  $\beta$  -13H dehydrocostus lactone**

Ce composé a été isolé la première fois chez *Centaurea canariensis* ssp. subexpin par (Bohlmann et Gupta, 1981), par la suite il a été isolé de la même espèce par (Nowak *et al.*, 1986) puis chez *Amberboa ramosa* (Khan, 2004), *Saussurea involucrata* (Xiao *et al.*, 2011).

Ce produit possède des propriétés anti-inflammatoire et antiproliférative (Xiao *et al.*, 2011)

Les résultats des études par spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont résumés dans les tableaux III.17.

**Tableau III.17** : Les données spectrales RMN-1H et RMN-13C du composé CEIN-10

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, J(Hz))	$\delta_C$ (ppm)
1	3,02 (1H, m)	48,4
2	1,93 (2H, m)	30,7
3	2,53 (2H, m)	32,9
4	-	153,1
5	2.85 (1H, m)	53,6
6	4.06 (1H, t ; J = 9,7Hz)	81,4
7	2.33 (1H, m)	54,3
8	4,38 (1H, td ; J = 9,8 ; 5,5 Hz)	81,8
9a	3,03 (m)	44,1
9b	2,43 (1H, dd ; J = 12,8 ; 8,4 Hz)	
10	-	145,7
11	2,86 (1H, m)	42,5
12	-	181,2
13	1,41 (3H, d ; J = 3,4)	15,9
14a	4,95 (1H, s)	115,1
14b	5,07 (1H, s)	
15a	5,04	109,4
15b	5,18	

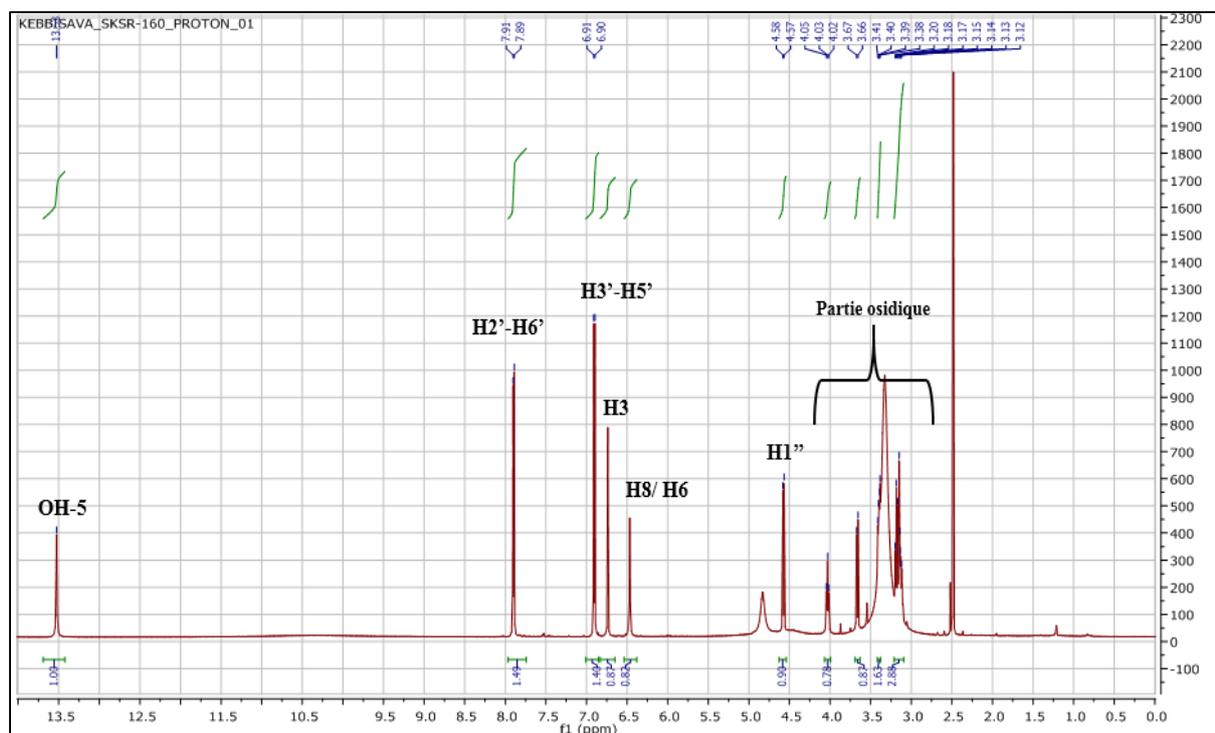
### III.6.11. Détermination de la structure du composé CEIN-11

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 spectroscopie RMN :

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (spectre III.55) du composé, indique la présence de signaux caractéristiques d'une flavone ainsi que des signaux entre  $\delta_H = 3,12$  ppm et  $\delta_H = 4,03$  ppm signifiant la présence d'un hexose dans la structure de ce composé :



**Spectre III.55 :** Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) du composé CEIN-11

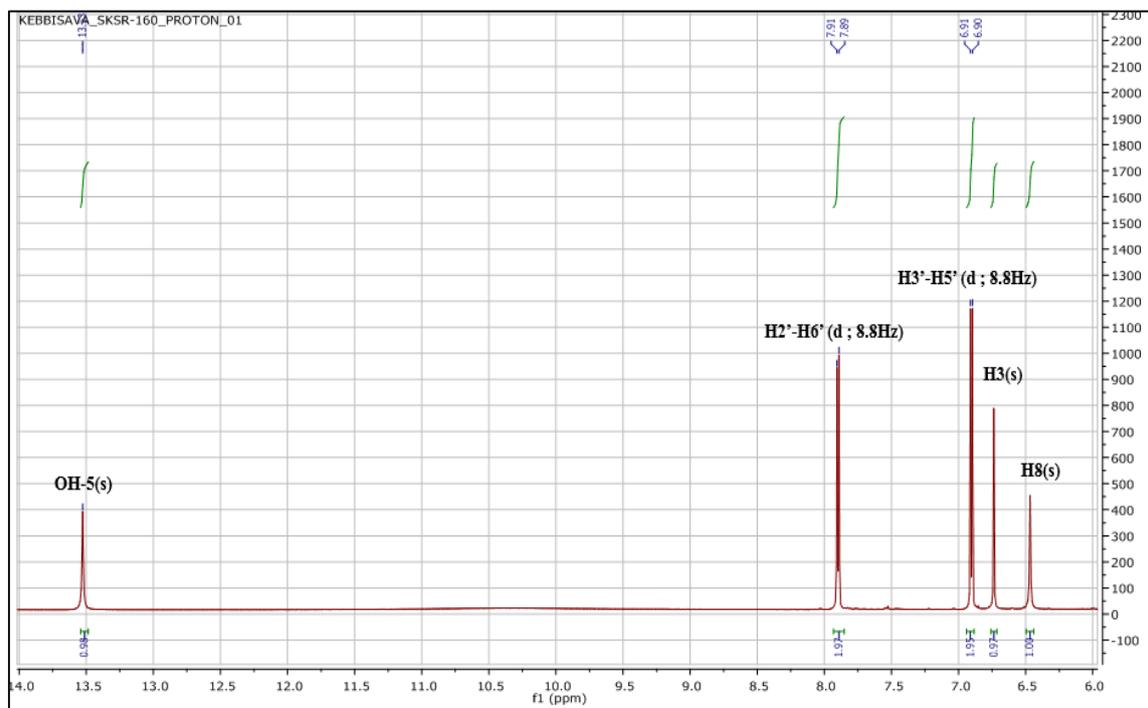
Le spectre RMN-<sup>1</sup>H étalé de la partie aglycone (spectre III.55a) montre l'apparition des signaux suivants :

- Un singulet à  $\delta_H = 6,45$  ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 ou H-6.
- Un singulet à  $\delta_H = 6,74$  ppm d'intégration 1H attribuable à H-3.
- Un doublet à  $\delta_H = 6,89$  ppm d'intégration 2H ( $J = 8,8$  Hz) attribuables aux protons aromatiques H-3'/H-5'. Leur constante de couplage indique qu'ils couplent en ortho avec leurs protons voisins du même cycle aromatique B (H-2'/H-6').
- Un doublet à  $\delta_H = 7,88$  ppm d'intégration 2H ( $J = 8,8$  Hz) attribuable aux protons

aromatiques H-2'/H-6'.

Ces attributions indiquent que le cycle aromatique B est para substitué.

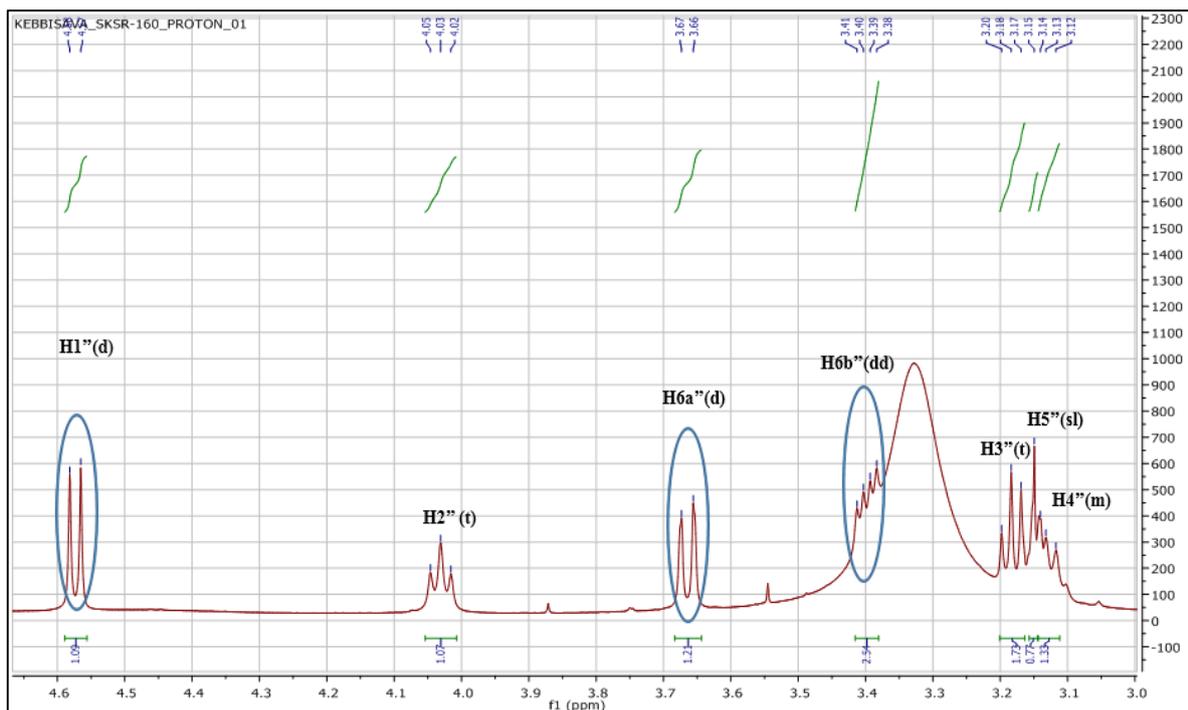
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H = 13,53$  ppm caractéristique du groupement hydroxyle OH positionné en C-5.



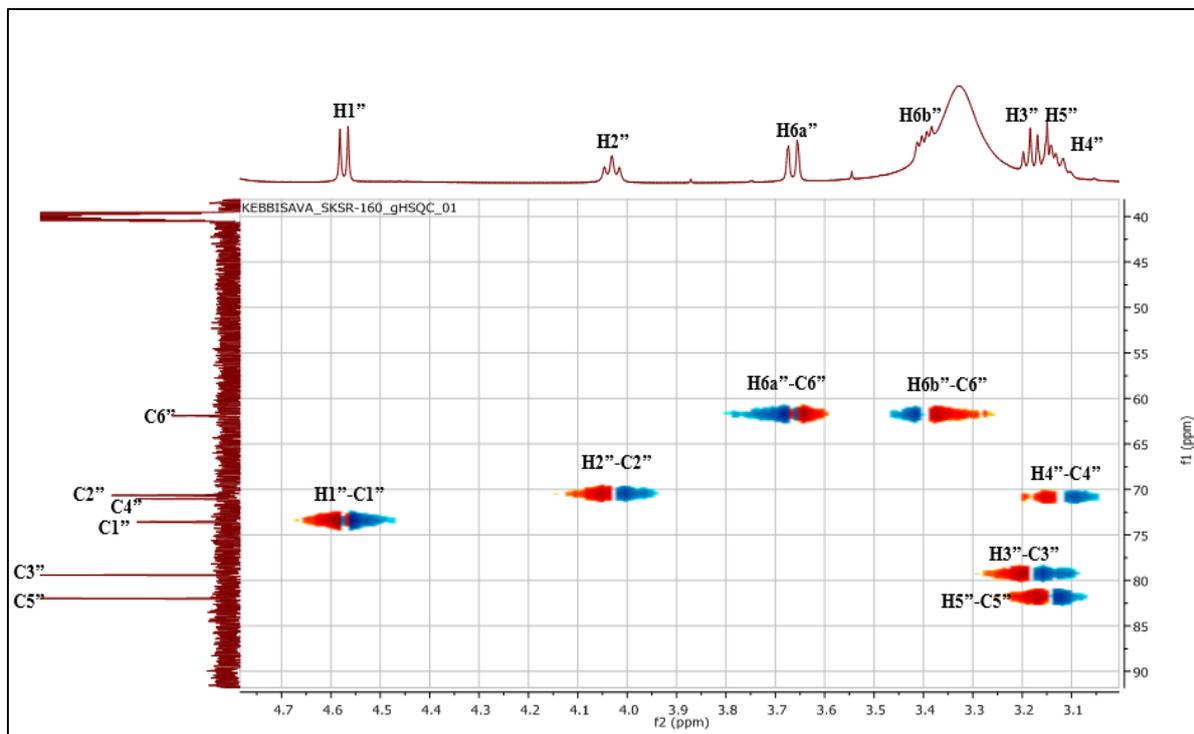
**Spectre III.55a** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_4$ ) étalé (6,0 à 14 ppm) du composé CEIN-11

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  (spectre III.55b) et le spectre HSQC (spectre III.56) montrent que le proton anomérique H-1'' à  $\delta_H = 4,57$  ppm est sous forme d'un doublet d'intégration 1H ( $J = 9,8$  Hz) associé au C1'' à  $\delta_C = 73,6$  ppm. Cette valeur du déplacement chimique est en faveur d'une jonction C-glycosidique entre l'aglycone et l'hexose.

La présence d'un groupement  $\text{CH}_2$  sous forme d'un doublet large à  $\delta_H = 3,66$  ppm d'intégration 1H ( $J = 10,5$  Hz) et un doublet de doublet à  $\delta_H = 3,39$  ppm d'intégration 1H ( $J = 11,7 ; 5,7$  Hz). Sur le spectre HSQC étalé ces deux protons corréleront avec le signal à  $\delta_C = 61,9$  ppm, attribuables au C6''.



**Spectre III.55b** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (3,0 à 4,6 ppm) du composé CEIN-11



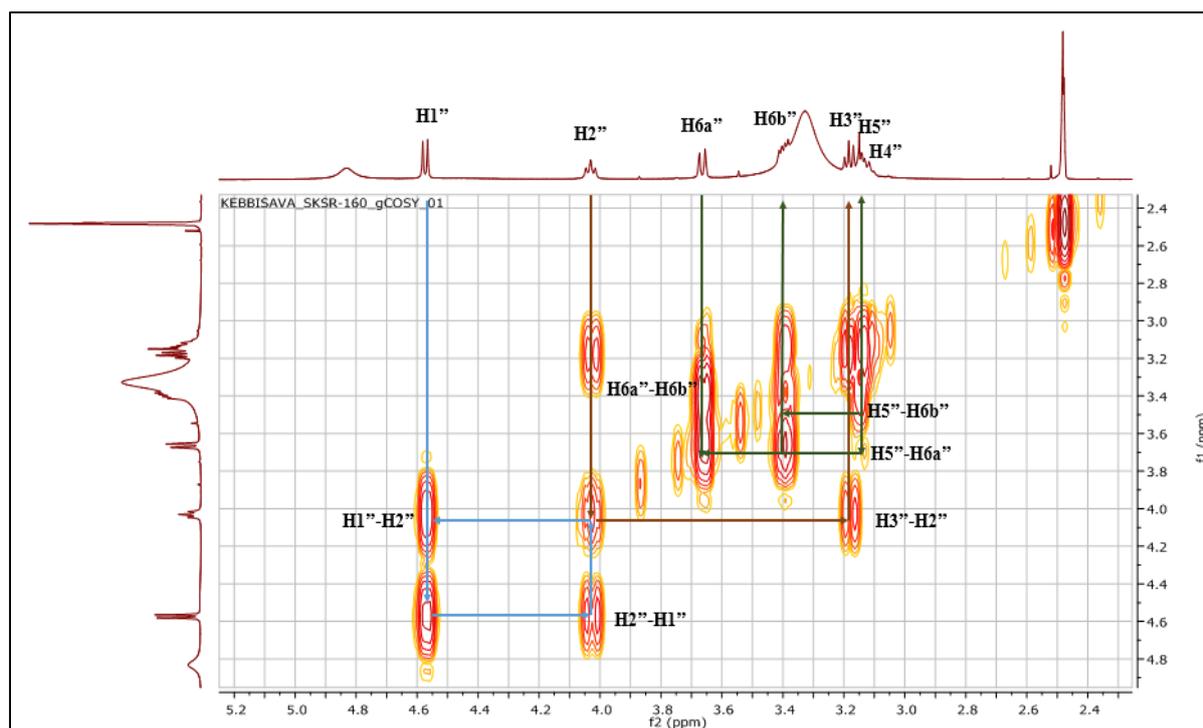
**Spectre III.56** : Spectre RMN HSQC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (3,1 à 4,7 ppm) du composé CEIN-11

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (spectre III.57), le proton anomérique H1'' montre une tache de corrélation avec un proton résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_H = 4,03$  ppm ( $J = 9,1$  Hz) intégrant 1H. Ce proton est attribuable à H-2'' ( $\delta_C = 70,6$  ppm).

Le proton H-2'' corrèle avec un proton résonant sous forme d'un triplet d'intégration 1H à  $\delta_H = 3,18$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) attribuable à H-3'' ( $\delta_C = 79,4$  ppm) ; la multiplicité de ce signal et la valeur de sa constante de couplage supposent des interactions axiale-axiale entre H-3''/H2'' et H-3''/ H-4''. Le déplacement chimique du carbone C-3'' nous confirme que l'hexose est un glucose.

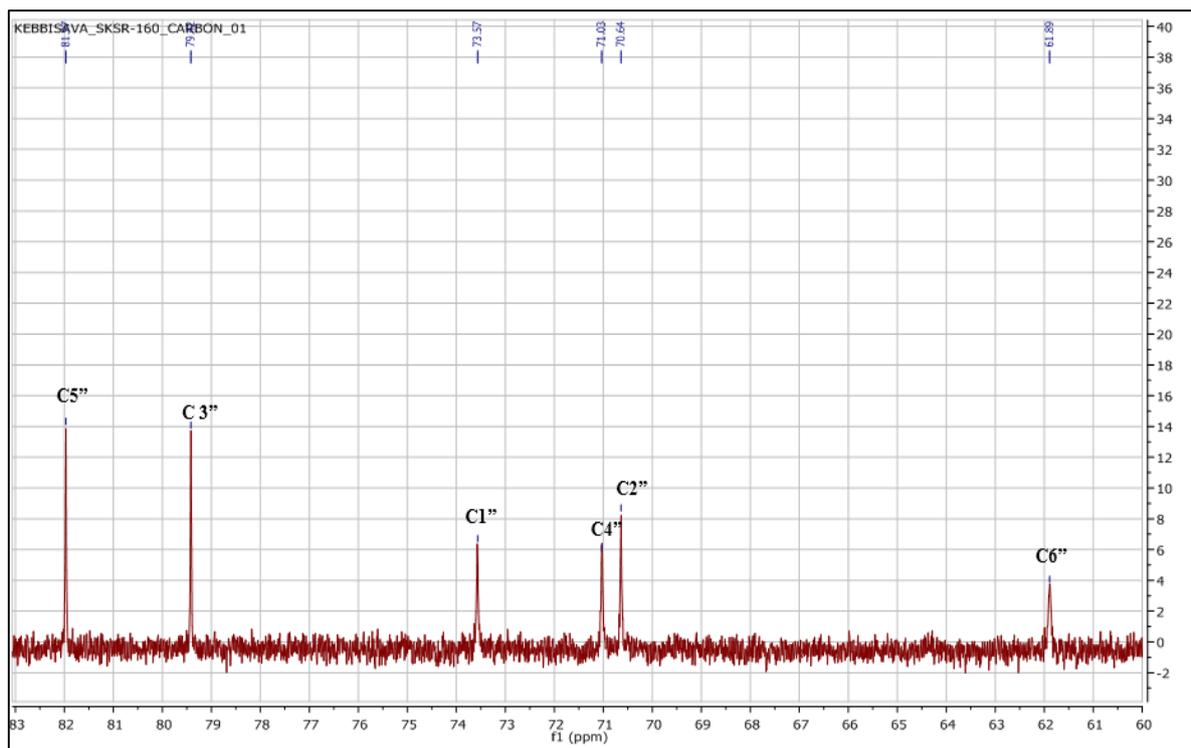
On distingue aussi que le proton intégrant 1H à  $\delta_H = 3,15$  ppm attribuable à H-5'' ( $\delta_C = 82,0$ ) donne deux taches de corrélations avec les deux protons du H-6'' ( $\delta_C = 61,9$  ppm). On remarque aussi que les deux protons du H-6'' corrélient entre eux.

Ces données sont en faveur d'une structure de type glucosidique pour cet hexose.



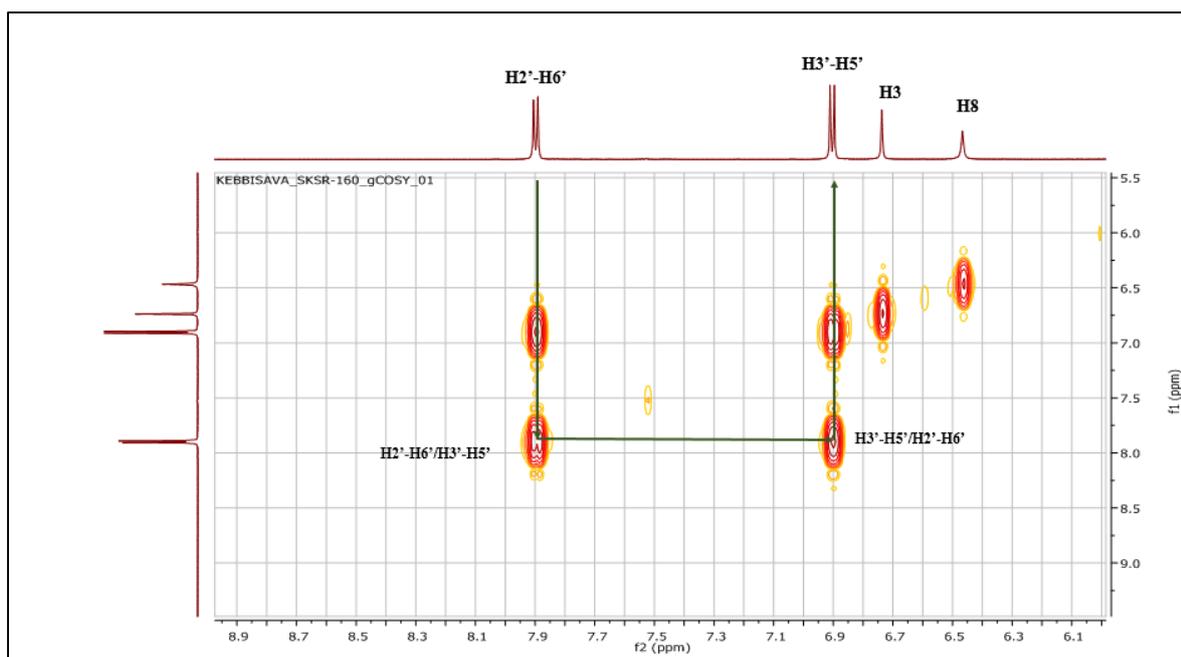
**Spectre III.57** : Spectre RMN COSY (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (2,4 à 5,2 ppm) du composé CEIN-11

Ces attributions sont confirmées sur les spectres relatifs aux expériences HSQC (spectre III.56) et RMN- $^{13}C$  (spectre III.58).



**Spectre III.58** : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150MHz,  $\delta$ ppm) étalé (60 à 83 ppm) du composé CEIN-11

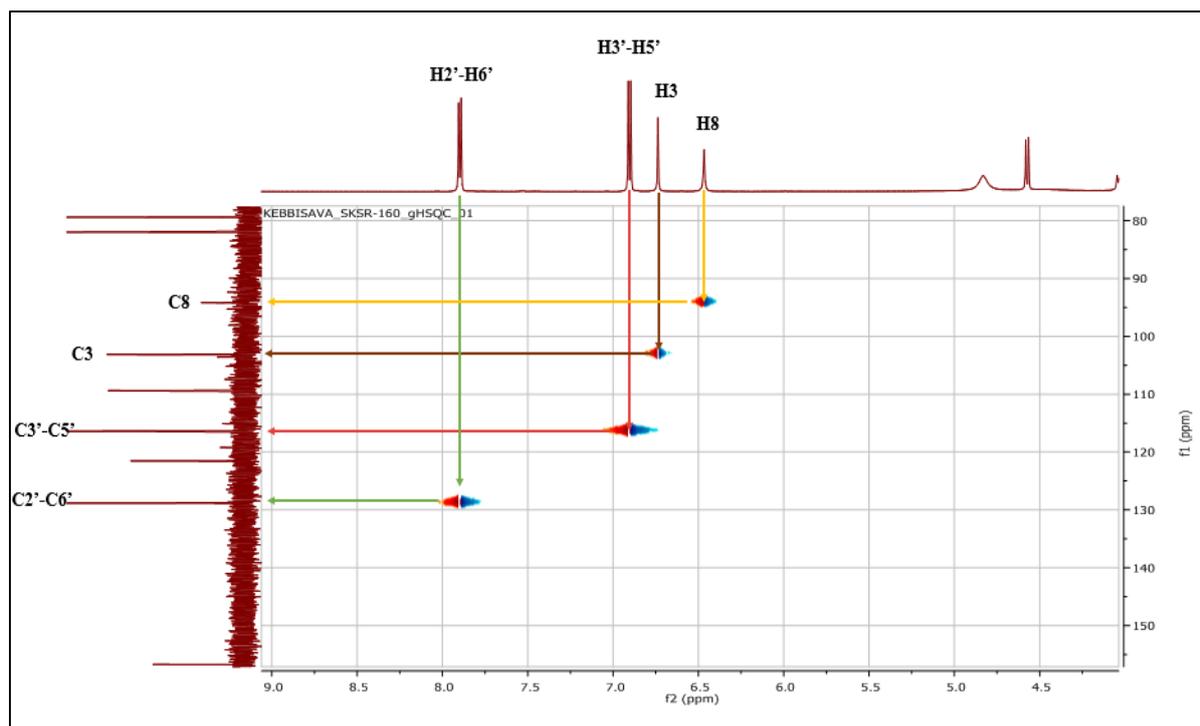
En ce qui concerne la partie aglycone, le spectre COSY (spectre III.59) confirme l'attribution précédente (cycle B para substitué) à travers une taches de corrélation entre H-2' ; H-6' et H-3' ; H-5'.



**Spectre III.59** : Spectre COSY étalé (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) du composé CEIN-11

Les carbones C-2', C-3', C-5', C-6', C-3 et C-8 sont attribués sur la base de l'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre III.60) qui montre en effet :

- Une corrélation entre H-2' et H-6' et le carbone à  $\delta_C = 128,9$  ppm attribuable à C-2' et C-6'.
- Une corrélation entre H-3' et H-5' le carbone à  $\delta_C = 116,4$  ppm attribuable à C-3' et C-5'.
- Une corrélation entre H-3 avec le carbone à  $\delta_C = 103,1$  ppm attribuable à C-3.
- Une corrélation entre H-8 ou H-6 et le carbone à  $\delta_C = 94,2$  ppm attribuable à C-8 ou C-6.



**Spectre III.60** : Spectre HSQC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (4,5 à 9,0 ppm) du composé CEIN-11

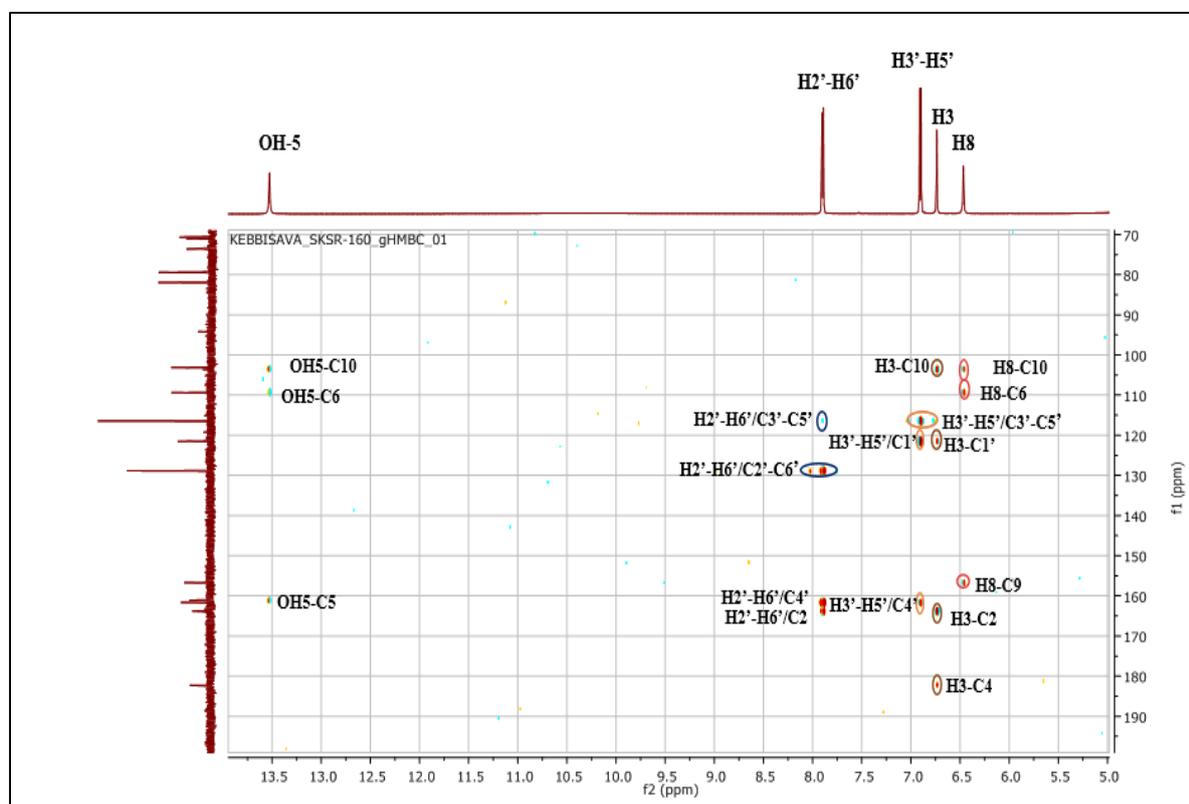
L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.61) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent trois tâches de corrélation, la première avec un carbone à  $\delta_C = 116,4$  ppm attribuable à C-3' et C-5', La seconde est avec un carbone quaternaire à  $\delta_C = 161,7$  ppm qui ne peut être que le C-4'. La dernière est avec un carbone quaternaire à  $\delta_C = 163,8$  ppm attribuable au carbone C-2.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' donnent deux tâches de corrélation, la première avec le carbone quaternaire à  $\delta_C = 121,5$  ppm, qui ne peut être que le C-1' et la seconde avec le carbone C-4' à  $\delta_C = 161,7$  ppm.

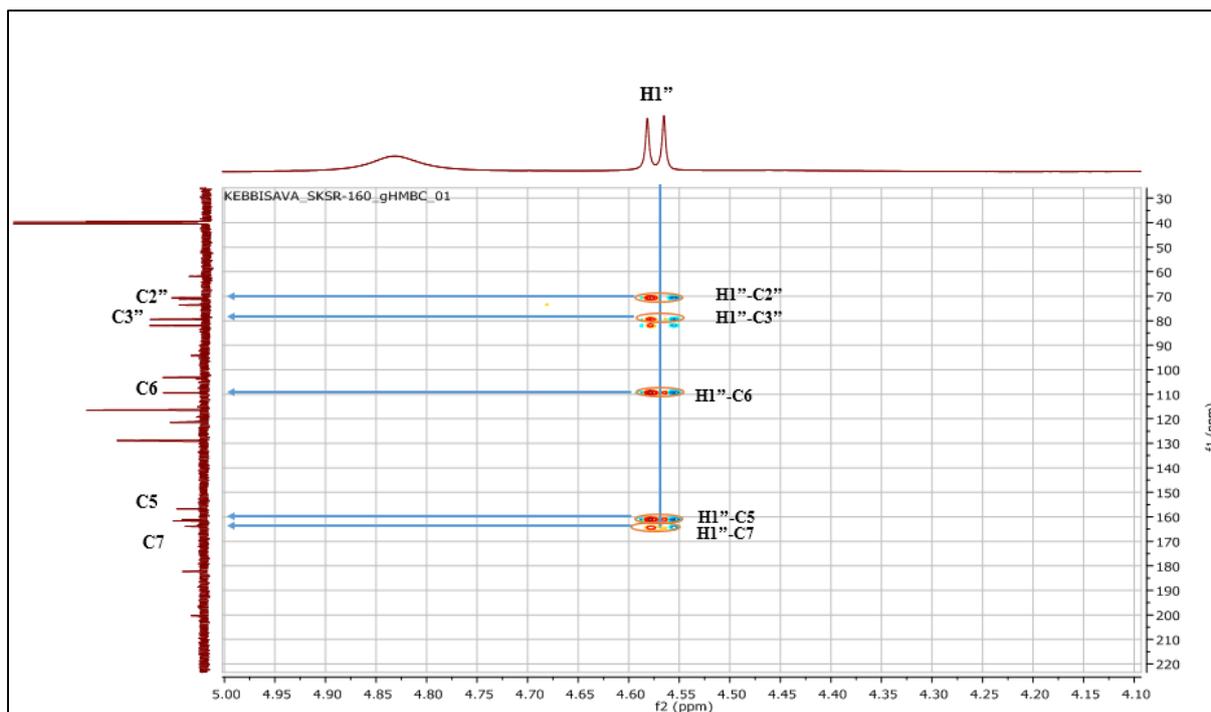
✓ Le proton H-3 donne quatre tâches de corrélation, la première avec le signal à  $\delta_C = 103,5$  ppm attribuable à C-10, la deuxième et la troisième avec les carbones C-1' et C-2 à  $\delta_C = 121,5$  et 163,8 ppm. La dernière est avec un carbone quaternaire à  $\delta_C = 182,3$  ppm attribuable à C4.

✓ Le proton du groupement hydroxyle en C-5 donne trois tâches de corrélation selon le spectre HMBC (spectre III. :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 103,5$  ppm attribuable à C-10.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 109,4$  ppm qui ne peut être que le C-6, ce même atome de carbone montre une tâche de corrélation avec anomérique H-1'' ceci mène à localiser le glucose sur le carbone C-6 et permet en même temps d'éliminer la probabilité d'existence de H-6, donc le singulet à  $\delta_H = 6,45$  ppm ne peut être que H-8

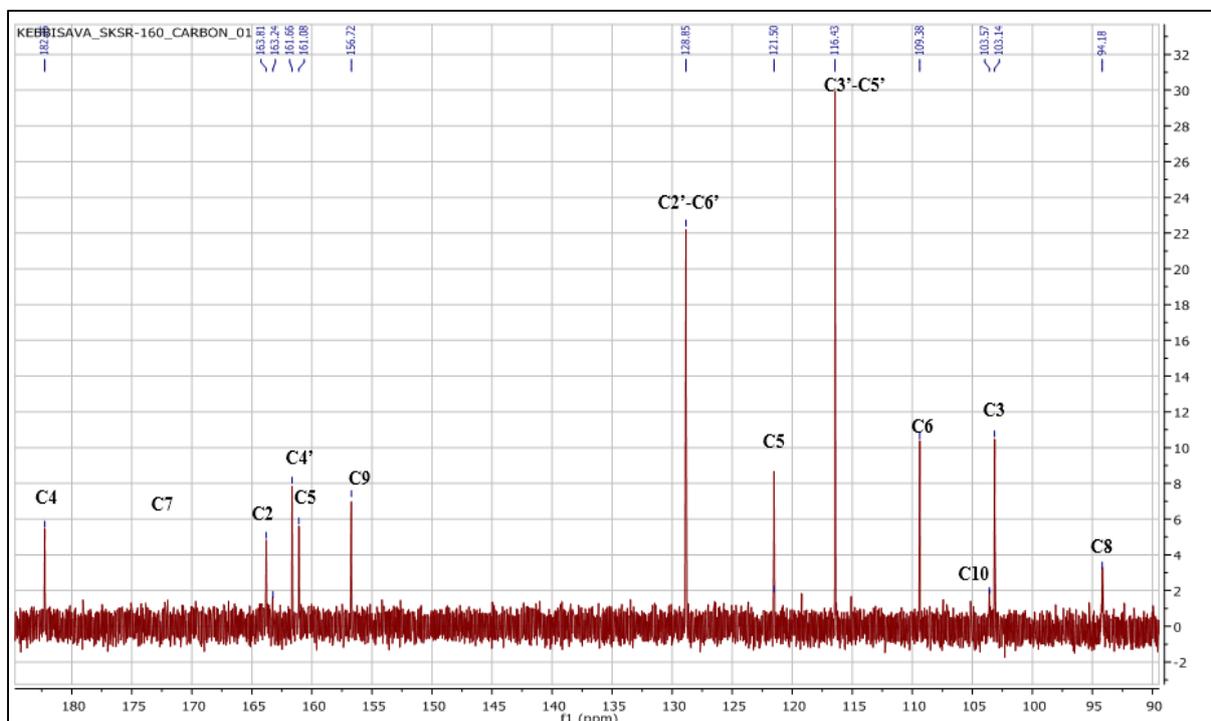


**Spectre III.61** : Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (5,0 à 13,5 ppm) du composé CEIN-11



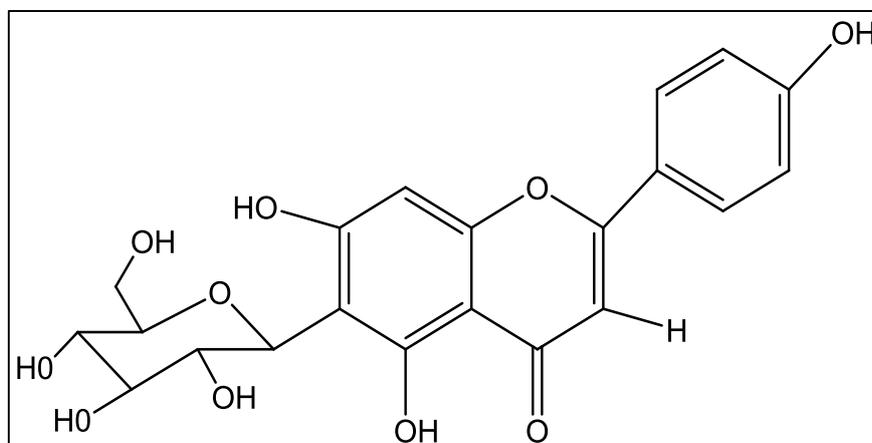
**Spectre III.62** : Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) étalé (4,1 à 5,0 ppm) du composé CEIN-11

L'analyse des corrélations dans le spectre HMBC permet l'identification des carbones restants de la molécule dans le spectre relatif à l'expérience RMN- $^{13}\text{C}$  (spectre III.63)



**Spectre III.63** : Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150MHz,  $\delta\text{ppm}$ ) du composé CEIN-11

Sur la base de l'ensemble de ces données et la comparaison avec les données de la littérature le composé CEIN-11 est identifié comme étant l'isovitexine (6-C- $\beta$ -D glucopyranosyl apigénine), reportée dans la figure III.26



**Figure III.25 : La structure du composé CEIN-11, isovitexine**

Ce composé a été isolé pour la première fois chez *Vitex Lucens* par Briggs et Cambie en 1958, il a été aussi isolé de : *Drosophyllum lusitanicum* (Budzianowski *et al.*, 2002), *Wasabi japonica* (Hosoya *et al.*, 2005), *Rhubarb rhizomes* (Krafczyk *et al.*, 2008), *Patrinia villosa* Juss (Peng *et al.*, 2008), *Celtis australis* L. (Zehrmann *et al.*, 2010), *Ficus deltoidea* (Choo *et al.*, 2012).

Pour les espèces du genre *Centaurea* il a été isolé de : *C. lippii* (Mezache *et al.*, 2010), *C. calolepis* (Erel *et al.*, 2011), *C. alexanderina* (Kubacey *et al.*, 2012). Ce produit est connu par ces propriétés biologiques : antioxydante, antiplaquettaire, antidiabétique et antivirale (Xiao *et al.*, 2015).

Le tableau III.18 reporte les données relatives aux spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C.

**Tableau III.18** : Données de la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C du composé CEIN-11

Position	$\delta_H$ (ppm) (intégration, multiplicité, J(Hz))	$\delta_C$ (ppm)
Partie aglycone		
2	/	163,8
3	6,74 (1H, s)	103,1
4	/	182,3
5	/	161,2
6	/	109,4
7	/	164,2
8	6,45 (1H, s)	94,2
9	/	156,7
10	/	103,5
1'	/	121,5
2'	7,88 (1H, d ; J = 8,8)	128,9
3'	6,89 (1H, d ; J = 8,8)	116,4
4'	/	161,7
5'	6,89 (1H, d ; J = 8,8)	116,4
6'	7,88 (1H, d ; J = 8,8)	128,9
OH-5	13.57 (s)	/
6-C- $\beta$ -D- glucose		
1''	4,57 (1H, d ; J = 9,8)	73,6
2''	4,03 (1H, t ; J=9,1)	70,6
3''	3,18 (1H, t ; J=8,5)	79,4
4''	3,12 (1H, m)	71,0
5''	3,15 (1H, sl)	81,9
6a''	3.66 (1H, d ; J =10,5)	
6b''	3.38 (1H, dd, J = 11,7 ; 5,7)	

**Conclusion**

L'étude phytochimique portée sur la phase acétate d'éthyle des parties aériennes de *Centaurea involucrata* a conduit à l'isolement et l'identification de 11 molécules de structure variable : 3 sesquiterpènes lactones, 3 flavonoïdes, 2 lignanes, un triterpène, un acide phénolique et un composé glycoside cyanogène. Tous ces produits sont décrits pour la première fois dans cette espèce, et le produit acide 3-oxo oléanolique est isolé pour la première fois du genre *Centaurea*

L'étude GC-MS de l'extrait d'éther de pétrole a montré la présence de 13 composés phytochimiques dont la pluparts sont cités dans la littérature pour leurs propriétés biologiques intéressantes. L'analyse des extraits chloroforme et *n*-butanol par HPLC-DAD et l'acétate d'éthyle par LC-MS/MS montre que ces extraits sont riches en composés phénoliques.

# *Chapitre VI*

**Activités biologiques, dosage des  
polyphénols et flavonoïdes**

## IV.1. Introduction

Les produits végétaux sont particulièrement riches en métabolites secondaires qui peuvent exercer des rôles biologiques divers. Pour cette raison nous avons effectuée quelques activités biologiques sur les différents extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanol) de l'espèce *C. involucrata* Desf. en commençant tout d'abord par la quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux puis l'évaluation du potentiel antioxydant en utilisant différentes méthodes, ensuite l'évaluation de l'activité antiproliférative et antimicrobienne.

## IV.2. Analyses quantitatives des polyphénols et des flavonoïdes totaux

### IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de l'espèce *C. involucrata* est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller (**Muller et al., 2010**).

Une masse de 1mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1mL de méthanol. Un volume de 100 µL de FCR dilué (1 :10) et 75 µL de solution de carbonate de sodium (7,5%) a été ajouté dans des puits d'une microplaque à 96 puits contenant 20 µL d'échantillon. Le mélange a été laissé dans l'obscurité pendant 2 heures à la température ambiante. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'absorption du mélange a été évaluée à 765 nm dans le lecteur de microplaques (Perkin Elmer, Enspire). La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en équivalent d'acide gallique en µg /mg d'extrait en utilisant une courbe d'étalonnage (l'acide gallique a été utilisé comme étalon).

### IV.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts a été déterminée selon la méthode de Topçu (**Topçu et al., 2007**). Le principe de la méthode est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage est établie avec la Quercétine, les concentrations utilisées sont d'ordre 25 à 175 µg/mL et les résultats sont exprimés en en µg d'équivalents de la Quercétine par milligramme d'extrait.

Environ 1mg d'extrait a été dissous dans 1mL de méthanol. On mélange 50 µL de cette solution méthanolique avec 130 µL de MeOH, 10 µL d'acétate de potassium ( $CH_3COOK$ ) et 10 µL de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_2 \cdot 9 H_2O$ ) dans les puits de la microplaque. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante, puis la lecture est faite à 415 nm.

### IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par quatre méthodes différentes : la méthode de réduction de radical libre DPPH, ABTS, CUPRAC et le test de DMSO alcalin.

#### IV.3.1. Activité anti-radicalaire DPPH

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchezmoreno, 2002).

- **Protocole**

L'activité antioxydante a été évaluée selon la méthode de Blois (Blois, 1958). Un volume de 40 µL de différentes concentrations de chaque échantillon testé est déposé sur une microplaque à 96 puits, de même pour les antioxydants standards BHA et BHT, puis on ajoute à chaque puits 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH (0,4 mM). Le contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 40 µL du méthanol avec 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en insérant la microplaque dans le spectrophotomètre. Le pourcentage de piégeage (l'inhibition) du radical DPPH est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Capacité de piégeage de DPPH(\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

#### IV.3.2. Activité anti radicalaire par piégeage de l'ABTS

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) pour former le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-vert. L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical ABTS<sup>•+</sup> présente une bande d'absorption caractéristique (Re *et al.*, 1999).

- **Protocole**

La solution ABTS<sup>•+</sup> a été produite à partir de l'ABTS (7mM) et du persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45mM). Les deux produits en solution aqueuse ont été mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. L'absorbance de la solution ainsi obtenue a été ajustée avec de l'eau pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734nm. Ensuite, 160 µL de solution ABTS<sup>•+</sup> est rajoutés à 40 µl de solution échantillon dans le méthanol à différentes concentrations (12,5 -800 mg/µL). Après 10 minutes, l'absorption est encore mesurée à 734 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards pour la comparaison de l'activité. Les pourcentages d'inhibitions sont calculés à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Capacité de piégeage d'ABTS}^{\bullet+} (\%) = \frac{A_{\text{contrôle}}}{A_{\text{contrôle}} - A} \times 100$$

#### IV. 3.3. Le piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin

Dans la méthode DMSO alcalin, un radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est généré par l'addition d'hydroxyde de sodium à l'air saturé DMSO. Le superoxyde généré reste stable dans la solution, qui réduit le nitro bleu tétrazolium (NBT) de couleur jaune en formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm à température ambiante (**Kalpoutzakis *et al.*, 2003**).

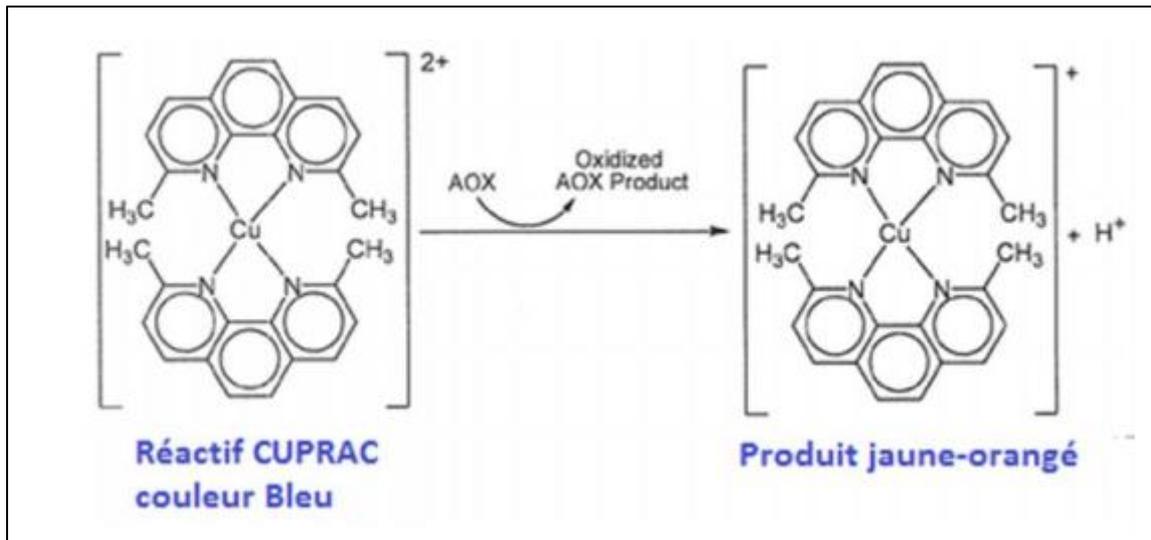
- **Protocole**

L'activité de piégeage des radicaux superoxydes a été déterminée par la méthode d'Elizabeth (**Elizabeth *et al.*, 1990**). Brièvement, 40 µL de l'extrait dilué est mélangé avec 130 µL de DMSO alcalin (20 mg de NaOH est dissoute dans 1 mL de MeOH et compléter par le DMSO à 100 mL) et 30 µL NBT (10 mg dans 10 mL de l'eau distillé). Enfin l'absorbance est mesurée à 560 nm. Le pourcentage d'inhibition de la production d'anion superoxyde (activité scavenger) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Activité scavenger} = [(A_{\text{Extrait}} - A_{\text{Contrôle}}) / A_{\text{Extrait}}] \times 100$$

#### IV. 3.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le principe de cette méthode est basé sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones par la réduction du complexe Cu<sup>+2</sup>-Nc, produisant un complexe chromogène de Cu<sup>+2</sup>-Nc qui absorbe à 450 nm (Figure IV.1).



**Figure IV.1 :** Réduction du complexe chromogène de  $Cu^{+2}$ -Nc

La détermination de cette activité a été effectuée par la méthode d'Apak (Apak *et al.*, 2004)

- **Protocole**

40  $\mu$ L d'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 50  $\mu$ L d'une solution de chlorure de cuivre(II) (10mM), 50  $\mu$ L de solution alcoolique de néocuprone (7,5mM) et 60  $\mu$ L d'acétate d'ammonium (1M, PH=7,0). Après une heure, l'absorbance a été mesurée à 450nm et les résultats ont été exprimés en  $A_{0,50}$  ( $\mu$ g/mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 absorbance.

#### IV.4. L'évaluation de l'activité antimicrobienne

##### IV.4.1. Souches microbiennes testées

Il s'agit de six 6 souches dont 4 bactéries : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Escherichia Coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), un champignon *fusarium* et une levure *candida albican*.

##### IV.4.2. Test antimicrobien

Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu solide en déterminant les diamètres des zones d'inhibition en mm (Vinod *et al.*, 2010 ; Traoré *et al.*, 2012)

##### IV.4.3. Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre découpés à partir d'un papier Wattman n°1, stérilisés et imprégnés de différentes concentrations des extraits (25, 50, 100, 200 et 400 mg/mL), de

l'antibiotique (Amoxicilline 20 µg et Penicillium 10 µg), de l'antifongique (Fluconazol 1 mg/ml) et de DMSO à raison de 20 µL par disque (Traoré et al., 2012).

#### **IV.4.4. Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Les champignons sont activés pendant 7 jours dans le PDA à une température de 28°C avant le test. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0,5 ou à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm ( $10^6$  UFC/mL) pour les bactéries et  $10^4$ - $10^5$  UFC/mL pour les champignons.

#### **IV.4.5. Test d'efficacité**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension microbienne, puis essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée (gélose Mueller Hinton pour les bactéries ; Sabouraud pour la levure et PDA pour les moisissures), de haut en bas en stries serrées. Les disques préparés ont été déposés délicatement à l'aide d'une pince flambée au Bec Bensen sur la surface d'un milieu préalablement ensemencé par les souches microbiennes. Parallèlement, l'antibiotique, l'antifongique et le DMSO ont été utilisés. Les boîtes gélosées ainsi préparées sont maintenues à 4°C durant 20 mn afin de permettre la pré-diffusion. Ensuite, elles ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 h pour la levure, tandis que le champignon a été incubé pendant 72h à 25 °C.

#### **IV.4.6. Lecture**

La mesure des diamètres d'inhibition des souches étudiées ont été réalisées après 24heures d'incubation.

#### **IV.4.7. Détermination de la CMI**

La CMI de l'extrait de la plante sur la souche étudiée est définie comme sa plus faible concentration inhibant l'activité microbienne après 18 à 24 h de contact à 37°C, c'est à dire on observe aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu (Skandamis et Nycha, 2001).

### **IV.5. Activité antiproliférative**

#### **IV.5. 1. Préparation des solutions mères**

Les solutions mères des extraits et le 5-FU ont été préparés dans le DMSO et dilués avec Médium Eagle modifié de Dulbecco (DMEM). La concentration finale du DMSO est inférieure à 1% dans tous les essais.

### IV.5.2. Culture des lignées cellulaire

Les lignées cellulaires HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) ont été cultivées dans le DMEM supplémenté par 10% de sérum de fœtus bovin (FBS), 2% de pénicilline/streptomycine. Le milieu est changé deux fois par semaine.

### IV.5.3. Test de prolifération cellulaire

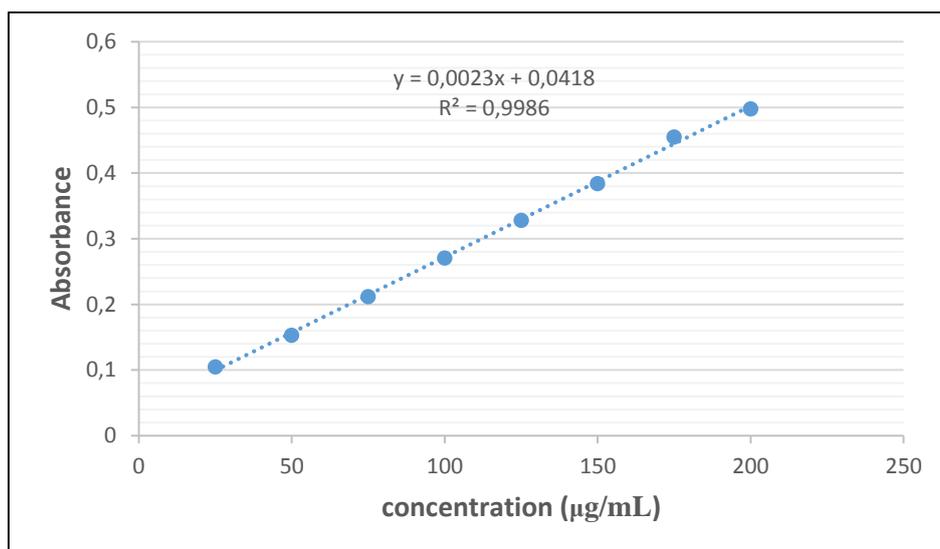
Les effets antiprolifératifs des extraits ont été étudiés sur des lignées cellulaires HeLa à l'aide du dosage de prolifération BrdU ELISA (Sahin Yaglioglu *et al.*, 2014 ; Karakus *et al.*, 2013). Le 5-fluorouracile (5-FU) a été utilisé comme témoin positif. Les cellules sont cultivées dans des plaques à 96 puits (COSTAR, Corning, USA) à une densité de 30 000 cellules / puits. Dans chaque modèle expérimental, les cellules sont cultivées deux fois en triplicata. Les lignées cellulaires ont été exposées à huit concentrations des extraits et 5-FU pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont incubées pendant une nuit avant d'appliquer le réactif du test ELISA BrdU de prolifération cellulaire, selon le procédé du fabricant. La quantité de prolifération cellulaire a été évaluée par détermination de l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Awareness Chromate, USA), après addition de la solution de substrat dans le milieu de culture. Les résultats sont rapportés en pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire, où la densité optique mesurée à partir des cellules traitées du véhicule était considérée comme correspondant à 100% de prolifération. Tous les dosages ont été répétés au moins deux fois en utilisant les cellules HeLa. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire a été calculé comme suit :

$$\% = [1 - (A_{\text{treatments}} / A_{\text{vehicle control}})] \times 100.$$

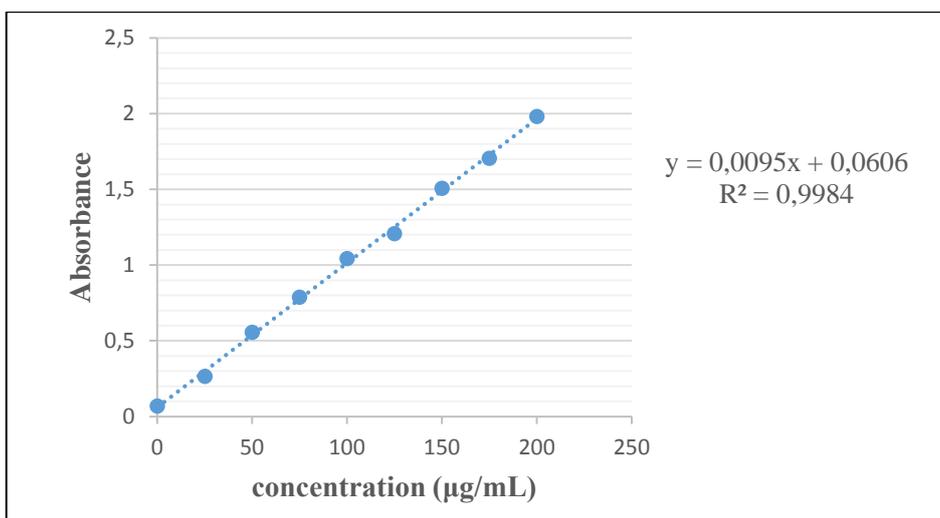
## IV.6. Résultats et discussion

### IV.6.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de cette plante (tableau IV.1) ont été exprimées en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait) pour les polyphénols et en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/ mg d'extrait) pour les flavonoïdes.



**Figure IV.2 :** Représentation du taux des polyphénols par la courbe linéaire de standard d'acide gallique



**Figure IV.3 :** Représentation du taux de flavonoïdes par la courbe linéaire de standard

**Tableau IV.1 :** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *C. involucrata*

Extrait	polyphénols totaux (µg EAG/mg d'extrait)	Flavonoïdes totaux (µg EQ/mg d'extrait)
chloroforme	148,06 ± 2,52	6,92 ± 0,52
acétate d'éthyle	219,07 ± 0,54	56,25 ± 0,32
<i>n</i> -butanol	216,17 ± 2,61	39,62 ± 1,57

Les résultats présentés dans le tableau IV.1 montrent que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol sont riches en polyphénols avec des teneurs égales à  $219,07 \pm 0,54$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait et  $216,17 \pm 2,61$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait, respectivement. Tandis que l'extrait chloroforme renferme la teneur la plus basse par rapport à ces deux extraits ( $148,06 \pm 2,52$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait). L'extrait le plus riche en flavonoïdes était également l'extrait acétate d'éthyle avec une teneur égale à  $56,25 \pm 0,32$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait suivi par l'extrait *n*-BuOH ( $39,62 \pm 1,57$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) et l'extrait chloroforme ( $6,92 \pm 0,52$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait).

Ces résultats sont largement supérieurs à ceux trouvés par (Belbach, 2018) pour une espèce appartenant au genre *Centaurea* (*Centaurea sempervirens* L.) et moyenne à ceux trouvés par (Azzouzi *et al.*, 2016) pour deux espèces (*Centaurea choulettiana* Pomel et *Centaurea fragilis* Dur.). En effet, plusieurs études récentes ont montré que la teneur en composés phénoliques peut être influencée par un certain nombre de facteurs, tels que des facteurs géographiques, climatiques, génétiques, ainsi que le degré de maturation de la plante et la durée de stockage (Podsdek, 2007).

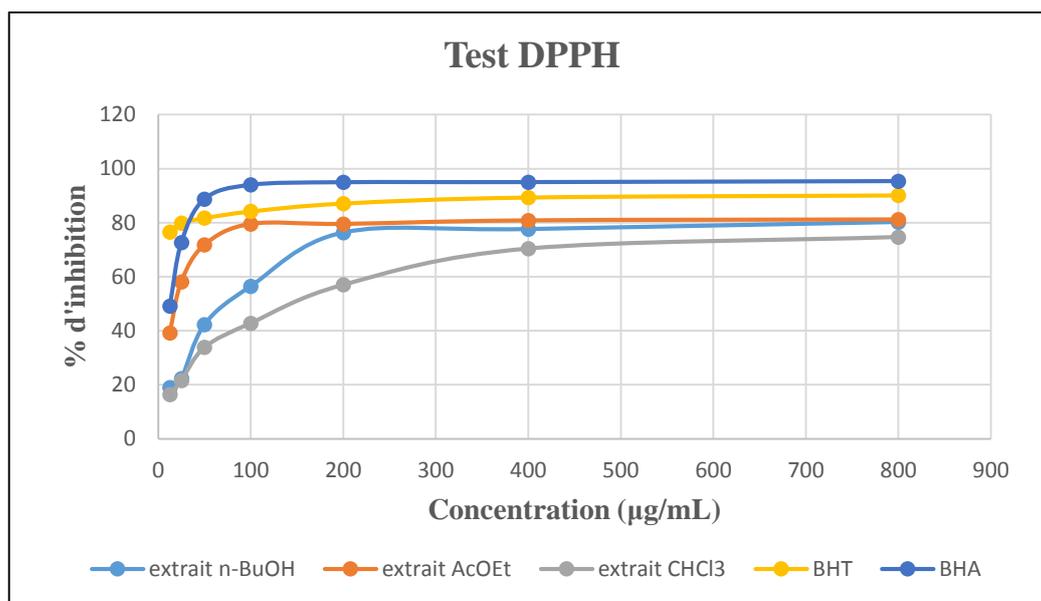
#### IV.6.2. Activité antioxydante

Quatre méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Centaurea involucreata* : DPPH, ABTS, DMSO Superoxyde et l'activité réductrice du cuivre (CUPRAC).

##### IV.6.2.1. Activité anti-radicalaire DPPH

Les standards utilisés sont le BHA et BHT. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et des standards (Figure IV.4).

L'activité antioxydante est exprimée en  $IC_{50}$ , plus la valeur de  $IC_{50}$  est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. Les valeurs des  $IC_{50}$  exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , calculées graphiquement à partir des droites de régression obtenues, représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait testé.



**Figure IV.4 :** Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents échantillons

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> de chaque extrait ainsi que celle des standards sont présentées dans le Tableau IV.2 :

**Tableau IV.2 :** Pouvoir d'inhibition IC<sub>50</sub> des extraits et du standard utilisant le test du DPPH

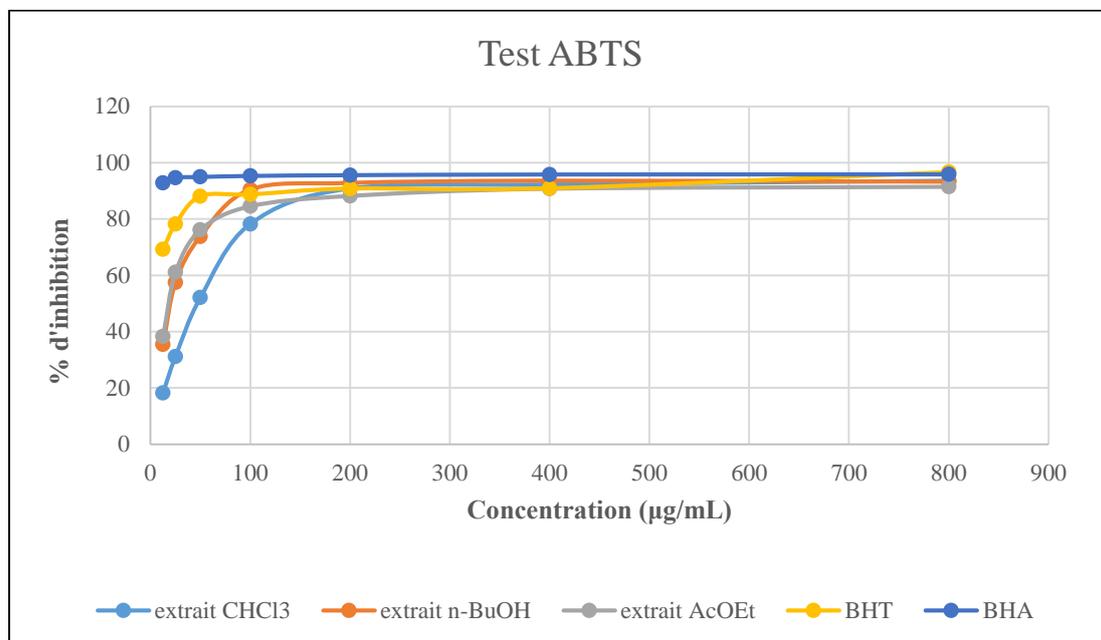
Test DPPH		IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>Extraits</b>	Extrait chloroforme	157,12±0,71
	Extrait acétate d'éthyle	21,34±1,08
	Extrait <i>n</i> -butanol	79,15±0,50
<b>Standards</b>	BHA	6,16±0,41
	BHT	12,99±0,41

Comme figurant dans le tableau ci-dessous l'extrait acétate d'éthyle représente l'extrait le plus actif avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre 21,34±1,08 µg/mL suivi par l'extrait *n*-butanol (79,15±0,50 µg/mL) et l'extrait chloroformique (IC<sub>50</sub> =157,12±0,71 µg/mL).

En comparant avec les standards, l'extrait acétate d'éthyle présente une activité 2 fois inférieure à celle du BHT et 3 fois inférieures à celle du standard BHA. Les autres extraits testés s'avèrent moins actives par rapport aux standards.

#### IV.6.2.2. Activité anti radicalaire par piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>

Les résultats obtenus du test de mesure d'ABTS<sup>•+</sup> nous ont permis de tracer les graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait (figure IV.5).



**Figure IV.5** : courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons

Le tableau IV.3 présente les valeurs du pouvoir antioxydant ( $IC_{50}$ ) des 3 extraits ainsi que les standards BHA et BHT, calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés.

**Tableau IV.3** : Pouvoir d'inhibition  $IC_{50}$  des extraits et du standard utilisant le test d'ABTS.

Test ABTS		$IC_{50}$ (µg/mL)
<b>Extraits</b>	Extrait chloroforme	52,02±0,79
	Extrait acétate d'éthyle	20,25±1,08
	Extrait <i>n</i> -butanol	23,42±0,83
<b>Standards</b>	BHA	1,81±0,10
	BHT	1,29±0,30

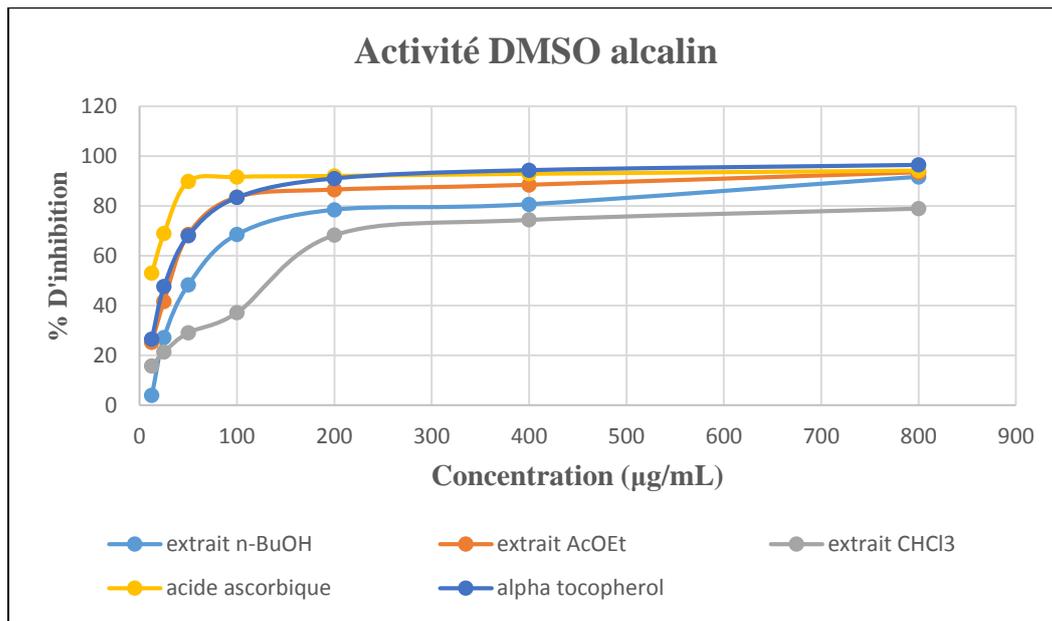
Les pourcentages d'inhibition et les valeurs des  $IC_{50}$  révèlent que les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol possèdent une meilleure activité inhibitrice ( $IC_{50}=20,25 \pm 1,08$  µg/mL et  $23,42 \pm 0,83$  µg/mL, respectivement) par rapport à l'extrait chloroforme ( $IC_{50}=52,02 \pm 0,79$

$\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Comparant aux standards BHA et BHT, les trois extraits testés possèdent une activité modérée.

#### IV.6.2.3. Le Test d'effet scavenger du superoxyde produit par DMSO alcalin

Contrairement aux tests précédents (ABTS, DPPH), le pourcentage d'inhibition du radical superoxyde est calculé selon cette formule :

$$\% \text{ Activité scavenger} = [(A_{\text{Extrait}} - A_{\text{Contrôle}}) / A_{\text{Extrait}}] \times 100$$



**Figure IV.6 :** Courbe de pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin par différents échantillons

**Tableau IV.4 :** Les différentes valeurs des  $\text{IC}_{50}$  de l'activité DMSO alcalin

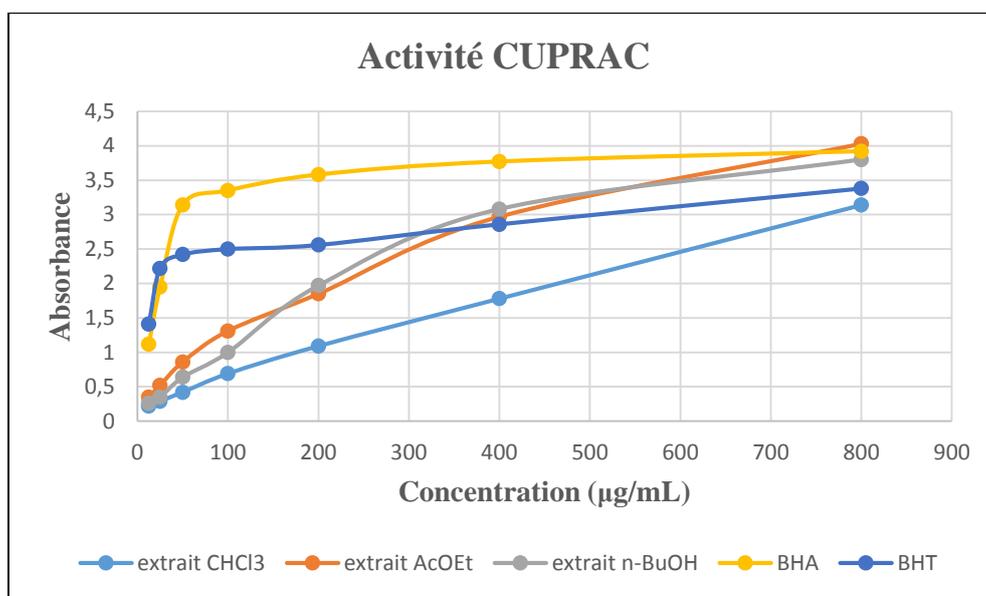
Test DMSO alcalin		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<b>Extraits</b>	Extrait chloroforme	135,54 $\pm$ 2,27
	Extrait acétate d'éthyle	33,36 $\pm$ 0,72
	Extrait <i>n</i> -butanol	61,86 $\pm$ 2,37
<b>Standards</b>	Acide ascorbique	7,59 $\pm$ 1,16
	$\alpha$ tocophérol	31,52 $\pm$ 2,22

Les résultats des  $\text{IC}_{50}$  du test Superoxyde alcalin présentés dans le tableau IV.4 révèlent que l'extrait acétate d'éthyle possède un effet scavenger important ( $\text{IC}_{50}$ = 33,36 $\pm$ 0,72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et proche de celle de  $\alpha$  tocophérol ( $\text{IC}_{50}$ =31,52 $\pm$ 2,22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mais 4 fois inférieur à celle de l'acide ascorbique.

On remarque aussi que les extraits chloroforme et n-butanol ont des valeurs de IC<sub>50</sub> faible comparativement à cet extrait et celle des standards  $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique.

#### IV.6.2.4. La réduction cuprique (CUPRAC)

Le test CUPRAC est basé sur la capacité antioxydante par réduction du cuivre, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.5.



**Figure IV.7 :** Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons

**Tableau IV.5 :** Les différentes valeurs des A<sub>0,50</sub> de l'activité CUPRAC

Test CUPRAC		A <sub>0,50</sub> (µg/mL)
<b>Extraits</b>	Extrait chloroforme	64,66±1,37
	Extrait acétate d'éthyle	23,65±0,89
	Extrait n-butanol	37,33±0,71
<b>Standards</b>	BHA	5,35±0,71
	BHT	8,97±3,94

La figure IV.7 présente les courbes d'absorbance en fonction de la concentration des standards et des extraits. Les résultats obtenus ont permis de déduire que l'extrait acétate d'éthyle montre un pouvoir réducteur de cuivre plus important ( $A_{0,50} = 23,65 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$ ) que celui de l'extrait n-butanol et chloroforme. Toutefois ces extraits s'avèrent moins actives par rapport aux standards BHT et BHA.

L'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de l'activité antioxydante, en utilisant quatre méthodes complémentaires, il apparaît que l'extrait acétate d'éthyle possède une bonne activité par rapport à l'extrait *n*-butanol et chloroforme. Cette activité est due à la présence des flavonoïdes et des polyphénols qui constituent les métabolites secondaires les plus importants dans les plantes. L'activité antioxydante varie en fonction du taux de ces composés dans chaque extrait et même par la différence dans leurs structures qui résulte de la variation des substituants et de la position et du nombre des hydroxyles. Les résultats obtenus de LC-MS/MS ont montré que l'extrait acétate d'éthyle est riche en acides phénoliques, ainsi que sa séparation chromatographique qui nous a permis d'isoler des composés phénoliques tels que la hispiduline l'isovitexine et l'acide para hydroxybenzoïque qui sont connus par leur propriétés antioxydante remarquables. Cela explique bien les résultats obtenus dont les quels l'extrait acétate d'éthyle a montré l'activité anti-radicalaire la plus intéressante et la teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes

Nos résultats sont en bon accord avec les travaux antérieurs effectués sur l'activité antioxydante de ce genre, qui montrent que l'extrait acétate d'éthyle possède une capacité inhibitrice remarquable (Azzouzi *et al.*, 2016 ; Belbach, 2018).

#### **IV.6.3. Activité antimicrobienne**

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux extraits (antibioaromatogrammes) sont regroupés dans le tableau IV.6. Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures. L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. D'après la littérature un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 8 mm (Sagdaç, 2003).

**Tableau IV.6** : Zone d'inhibition de l'activité antimicrobienne des extraits de *C. involucrata*

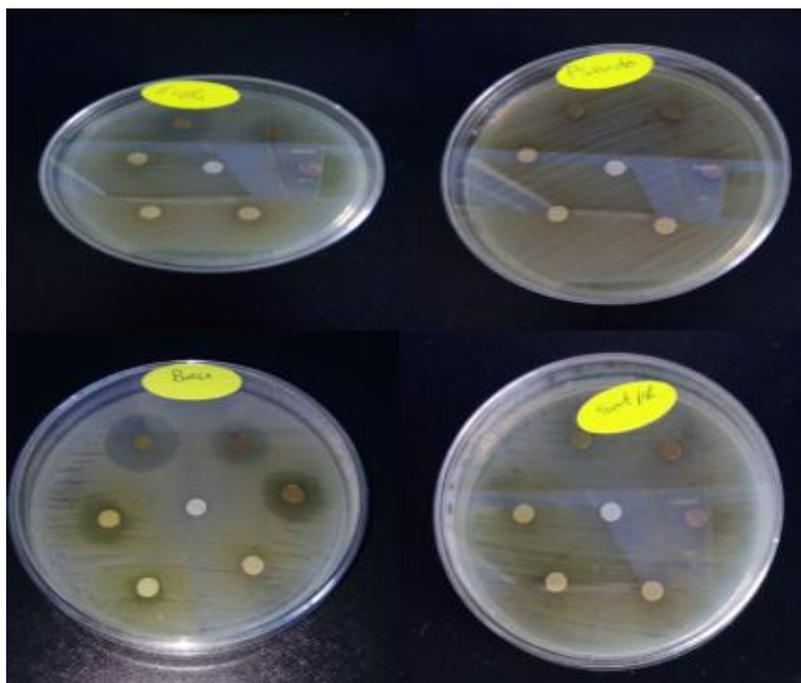
extrait	[C] (mg/mL)	Zones d'inhibition (mm)					
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>	<i>fusarium</i>
chloroforme	25	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	100	8,0 ± 0,70	-	-	-	-	-
	200	13,75 ± 0,35	-	-	-	-	-
	400	22,25 ± 0,35	-	-	-	-	8,25±0,35
acétate d'éthyle	25	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-
	200	8,0± 0,00	-	-	-	-	-
	400	15,5± 0,70	-	-	-	-	10±0.00
<i>n</i> -butanol	25	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-
	200	7,5 ± 0,70	-	-	-	-	-
	400	10,0 ± 0,00	-	-	-	-	-
Amoxicilline	20ug	11,5 ± 0,70	28,25±2,47	34±1,41	-	/	/
Penicillium	10ug	6,0 ± 0,00	31,5±0,70	30±0,00	-	/	/
Fluconazol	1g/l	/	/	/	/	31,75±1,7	25,0± 0,00
DMSO	20ul	-	-	-	-	-	-

D'après les résultats présentés dans le tableau IV.6, on observe que :

- ❖ Les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* et la levure *Candida albican* semble très résistante à la solution mère et les autres dilutions des différents extraits organique chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol (l'absence des zone d'inhibition autour les disques).
- ❖ les trois extraits ont inhibé la croissance d'une seule souche *Bacillus subtilis*. Ces extraits exercent une activité antibactérienne dose dépendante. La plus forte activité a été obtenue avec l'extrait chloroformique avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de  $22,2 \pm 0,01$ mm (C= 400 mg/mL).

- ❖ Le champignon *Fusarium* semble très résistant à la solution mère et les dilutions de l'extrait *n*-butanol. Mais il semble sensible à la solution mère de l'extrait chloroforme et l'extrait acétate d'éthyle avec une zone d'inhibition entre 10-8mm. Cette dernière est relativement faible en comparaison avec la zone d'inhibition de l'antibiotique utilisé (25mm).
- ❖ Par ailleurs, les antibiotiques «Amoxicilline et Penicillium», ont remarquablement inhibés la croissance des souches bactériennes *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis*. Toutefois, ces antibiotiques n'exercent aucun effet pour les doses testées sur la souche bactérienne *P. aeruginosa*.

Nos résultats sont cohérents avec ceux trouvés par (Mouffok, 2012) sur l'espèce *Centaurea omphalotricha*, mais ils sont incompatibles avec les études précédentes sur *Centaurea dimophra* (Azzouzi, 2016) car ils ont constaté que les extraits possèdent une bonne activité inhibitrice sur l'ensemble des souches bactériennes Gram- (*E. coli* et *P. aeruginosa*).



**Figure IV.8 :** Les zones d'inhibition des extraits sur les souches bactériennes

**Tableau IV.7 :** Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Extrait	CMI (mg/ml)					
	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeuginosa</i>	<i>C.albican</i>	<i>fusarium</i>
chloroforme	100	/	/	/	/	400
acétate d'éthyle	200	/	/	/	/	400
<i>n</i> -butanol	200	/	/	/	/	

D'après le tableau ci-dessus, les valeurs de la CMI des différents extraits sont variées entre 100 mg/mL et à 400 mg/mL. La CMI la plus faible (100 mg/mL) est enregistrée par l'extrait chloroforme sur la bactérie *B. subtilis*. Tandis que, la CMI la plus élevée (400 mg/mL) est remarquée par les extraits chloroforme et acétate d'éthyle sur le champignon *fusarium*.

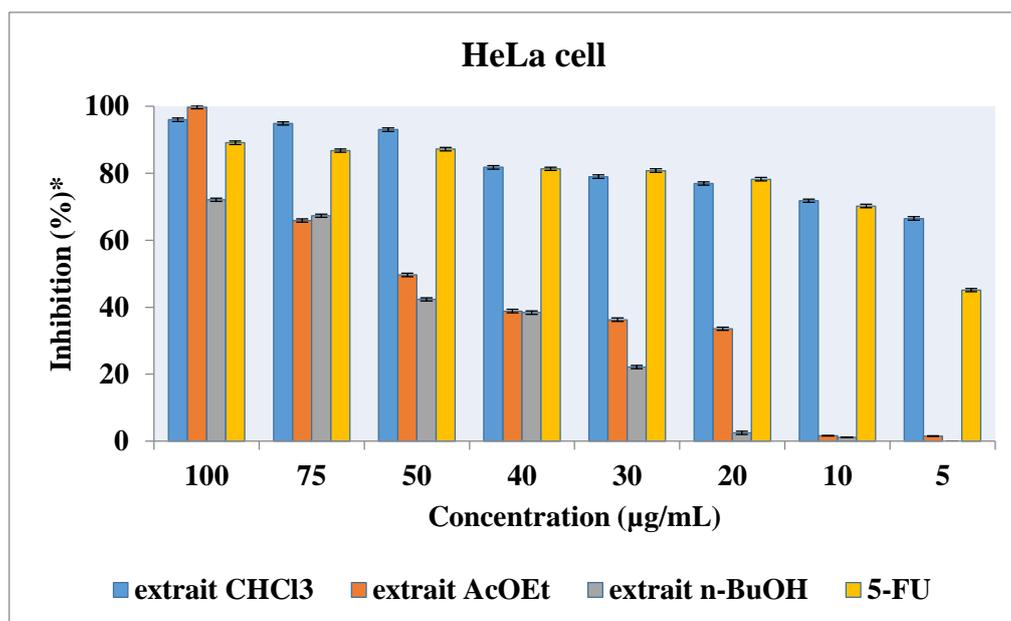
#### IV.6.4. Activité antiproliférative

L'activité antiproliférative des extraits et du témoin positif a été déterminée vis-à-vis des lignées cellulaires HeLa en utilisant le test de prolifération BrdU ELISA. Des concentrations croissantes (5, 10, 30, 40,50, 75 et 100 µg / mL) des extraits de la plante et du 5-FU ont été choisis pour cette étude.

D'après les résultats de l'histogramme (figure IV.9) nous avons observé que l'activité antiproliférative de tous les extraits augmente en fonction de l'augmentation de la dose contre les cellules HeLa. De plus, il a été déterminé que l'extrait chloroforme a une activité antiproliférative plus élevée que le 5-FU contre les cellules HeLa à des concentrations de 100 à 40 µg / mL.

Nous avons constaté à 5 µg/mL, que l'extrait *n*-butanol n'a pas un effet antiprolifératif sur la lignée cellulaire HeLa et la faible activité est enregistrée dans l'extrait acétate d'éthyle avec un pourcentage d'inhibition de 1,51 %. La plus forte activité est enregistrée dans l'extrait chloroforme avec un pourcentage d'inhibition de 66,51%.

La capacité d'inhibitrice de chaque extrait et du 5-FU à la concentration de 100 µg/mL est dans l'ordre décroissant suivant : extrait acétate d'éthyle > extrait chloroforme > 5-FU > extrait *n*-butanol.



**Figure IV.9 :** L'activité antiprolifératif des extraits de *C. involucrata* et le témoin positif vis-à-vis la lignée cellulaire HeLa

• **IC<sub>50</sub> et IC<sub>75</sub> :**

Les différents extraits ont manifesté des effets inhibiteurs sur la croissance des lignées cellulaires HeLa. Ces effets sont exprimés en concentrations qui causent 50% ou 75% d'inhibition de la croissance cellulaire (IC<sub>50</sub> et IC<sub>75</sub>), et sont représentés dans le tableau IV.8

L'extrait chloroforme est l'extrait le plus actif contre la lignée cellulaire HeLa avec une IC<sub>50</sub> inférieure à 5 µg/ml et IC<sub>75</sub> de 7,93 µg/ml, suivi par l'extrait *n*-butanol avec une IC<sub>50</sub> de 47,41 µg/mL et IC<sub>75</sub> de 68,33 µg/mL et l'extrait acétate d'éthyle (IC<sub>50</sub> = 50,59 µg/mL et IC<sub>75</sub> = 76,55 µg/mL).

**Tableau IV.8 :** les valeurs d'IC<sub>50</sub> et IC<sub>75</sub> des différents extraits et standard

HeLa		IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>75</sub> (µg/mL)
<b>Extraits</b>	Extrait chloroforme	*	7,93 ± 0,02
	Extrait acétate d'éthyle	50,59 ± 0,05	76,55 ± 0,05
	Extrait <i>n</i> -butanol	47,412 ± 0,02	68,33 ± 0,06
<b>Standard</b>	5-FU	*	8,55 ± 0,010

\* : non détectée

De ces résultats d'études de l'activité antiproliférative, il apparaît que l'extrait chloroforme montre une bonne activité qui peut être expliqué par la nature de sa composition phytochimique. Plusieurs études ont montré que la forte activité antiproliférative pourrait être liée aux concentrations élevées de composés phénoliques. Une autre étude menée sur l'activité antiproliférative des composés volatils 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 (**Demirtas et al., 2013**). Cela explique peut-être nos résultats obtenus pour l'extrait chloroforme.

## **Conclusion**

Cette étude biologique montre que les trois extraits de notre plante possèdent une activité antioxydante et antimicrobienne modérée, mais l'extrait chloroforme possède une activité antiproliférative importante cela peut-être due à sa composition chimique.

## Références bibliographiques

Abe, F., Yamauchi, T. 1986. Lignans from *Trachelospermum asiaticum* (Trachelospermum.II) *Chem Pharm Bull.* 34, 4340.

Abedi, F., Razavi, B.M., Hosseinzadeh, H. 2019. A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin : Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects. *Phytother Res.* 34, 729–741.

Ahmed, S.A., Kamel, E.M. 2014. Cytotoxic activities of flavonoids from *Centaurea scoparia*. *Sci World J.* 274207.

Agrawa, P.K. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry.* 31 :3307-3330.

Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. 2007. Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chem Nat Compd.* 43:319.

Akkol, E.K., Arif, R., Ergun, F., Yesilada, E. 2009. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *J Ethnopharmacol.*122(2) :210–215.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. et Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem.* 52, 7970–7981.

Ali, Y.E., Omar, A.A., Sarg, T.M., Slatkin, D.J. 1987. Chemical constituents of *Centaurea pallescens*. *Planta Med.* 53, 503–504.

Arrázola, G. 2002 Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética. PhD thesis. Universidad de Alicante, Alicante, Spain.

Atolani, O., Olatunji, A.G., Adeyemi, O.S., and Fayemi O.S. 2009. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Cuticular Wax from *kigelia africana*. *J Pharm Sci.* 34, 187-194.

Azzouzi, S. 2016. Thèse de doctorat, Université de Constantine1.

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. *Inter J of Pharmaco and Phytochemi Res.* 8(9), 1545-1548.

Baatouche, S., Cheriet, T., Sarri, D., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Benayache, F., Brouard, I., Leon, F., Seghiri, R. 2018. *Centaurea microcarpa* Coss. & Dur. (Asteraceae) extracts: New cyanogenic glucoside and other constituents. *Nat Prod Res.*1–7.

Bach, S.M., Fortuna, M.A., Attarian, R., de Trimarco, J.T., Catalán, C.A., Av-Gay, Y., Bach, H. 2011. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. *Nat Prod Commun.* 6, 163–166.

Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Rodriguez, I. and Soria Sanz, C. 1989. Germacranolides from *Centaurea melitensis*. *Phytochemistry.* 28, 1975-1976.

- Baytop, T.**, 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmiste ve Bugün. Nobel Tip Kitabevleri, II. Baskı ISBN: 975-420-0211-İstanbul, p.316.
- Bekro, Y.A., Jana, A., Mamyrbekova B.** 2007. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Bail) Herend et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Science Nature*. 4, 217-25.
- Belbache, H.** 2018. Thèse de doctorat, Université de Constantine1.
- Belkacem, S., Belbache, H., Boubekri, C., Mosset, P., Mosbah, O.R., Marchioni, E., Benayache, S., Benayache, F.** 2014. Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Res J Pharmaceut Biological Chem Sci*. 5 (3), 1275-1279.
- Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Bermejo, J., Benayache, F.** 2007. Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Comp*. 43, 749–750.
- Bentamene, A., Baz, M., Boucheham, R., Benayache, S., Creche, J., Benayache, F.** 2008. Flavonoid aglycones from *Centaurea sphaerocephala*. *Chem Nat Compd*. 2: 234-235.
- Bentamene, A., Boucheham, R., Baz, M., Benayache, S., Creche, J., Benayache, F.** 2010. Flavonoid glucosides from *Centaurea sphaerocephala*. *Chem Nat Comp*.46(3), 452-453.
- Bennett, W.D.** 1968. Isolation of the cyanogenetic glucoside prunasin from *bracken fern*. *Phytochemistry*. Vol. 7, pp. 151 to 152.
- Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V.P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F.** 2011. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Comp*. 47, 105–106.
- Bicha, S., Amrani, A., Benaissa, 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 Pharm Lett*. 5(6):24-30.
- Bicha, S., Chalard P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, VP., 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.
- Blois M.S.**1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 4617 (181): 1119-1200.
- Bohlmann, F., Gupta, R.K.** 1981. Guaianolides from *Centaurea canariensis*. *Phytochemistry*. 20, 2773–2775.
- Boldizsár, I., Kraszni, M., Tóth, F., Noszál, B., Molnár-Perl, I.** 2010. Complementary fragmentation pattern analysis by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmed the precious lignan content of *Cirsium weeds*. *J Chromatogr*. 1217: 6281–6289.
- Briggs, L.H., Cambie, R.C.** 1958. The Extractives of *Vitex Lucens*-1. *Tetrahedron* 3, 269-273.

Bruno, M., Fazio, C., Paternostro, M.P., Diaz, J.G., Herz, W., 1995. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea napifolia*. *Planta Medica*. 61, 374–375.

Bonnier, G. 1934. Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique (comprenant la plupart des plantes d'Europe). *Librairie générale de l'enseignement, Paris*, vol 12. Livre.

Bouquet, A. 1972. Plantes médicinales de Congo Brazzaville. Travaux et documents ORSTOM paris, pp 8, 9, 23–6.

Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2eme édition ; université de Paris- sud, France, 389-617.

Bruneton, J. 2016. Pharmacognosie phytochimie- plantes médicinales LAVOISIER S.A.S. (5): 389-393.

Budzianowski, J., Budzianowska, A., Kromer, K. 2002. Naphtalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry*. 61, 421-25.

Bulut, F., Demirtas, I., Koldas, S., Gul, F., Behcet, L., Ozen, T., Oke-Altuntas, F. 2019. The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic *Centaurea derderiifolia*. *Nat Prod Res*. 1–4.

Cardona, M.L., Fernández, I., Pedro, J. R., Pérez, B. 1991. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*. 30(7) : 2331–2333.

Cardona, L., Fernandez, I, Pedro, J.R. and Vidal, R. 1992. Polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea Aspera* var. *Subinermis*, *Phytochemistry*.31(10), 3507-3509.

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*. *Biochem. Syst Ecol*. 34, 349–352.

Chandrasekaran, M., Senthilkumar, A., Venkatesalu, V. 2011. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *European Rev Med Pharmacol. Sci*. 15- 775.

Charnock, C., Brudeli, B., Klaveness, J. 2004. Evaluation of the antibacterial efficacy of diesters of azelaic acid. *Eur J Pharm Sci. Apr* ; 21(5) : 589-96.

Chiang, L.C., Chiang, W., Liu, M.C., Lin, C.C. (2003). *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother*. 52(2) : 194-198.

Choo, C. Y., Sulong, N. Y., Man, F. and Wong, T. W. 2012. Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *J Ethnopharmacol*. 142:776–781.

Ciric, A., Karioti, A., Koukoulitsa, C., Sokovic, M., Skaltsa, H. 2012. Sesquiterpene lactones from *Centaurea zuccariniana* and their antimicrobial activity. *Chem Biodivers*. 9, 2843e2853.

- Ciric, A., Karioti, A., Glamoclija, J., Socovic, M., Skaltsa, H. 2011. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J Serb Chem Soc.* 76, 27–34.
- Curkovic-Perica, M., Likic, S., Rusak, G. 2014. Phenolic compounds in *Centaurea rupestris* tissues and their antiphytovial activity. *Croat Chem Acta.* 87(1), 79-84.
- Demir, S., Karaalp, C., Bedir, E. 2016. Unusual sesquiterpenes from *Centaurea athoa* DC. *Phytochem Lett.* 15: 245-250.
- Demirtas, I., Sahin, A., (2013), Bioactive Volatile Content of the Stem and Root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*. *J Chem.* 1-6.
- Dey, P.M., Harborne, J.B.1991. Methods in plant biochemistry. Volume 7, Academic press.
- 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. *Bioorg Med Chem.* 16, 3725–3731.
- Djeddi, S., Argyropoulou, C., Skaltsa, H. 2008. Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. *Biochem Syst Ecol.* 36, 336–339.
- Dohou, N., Yamini, K., Tahrouch, S., Hassani, L.M I., Badoc, A., Gmira, N. 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *thymelaea lythroides*. Bulletin de la Société Pharmacie Bordeaux, p.66.
- Dumlu, M.U., Elcin, G. 2006. A new active compound from *Centaurea* species. *Z Naturforsch.* 61C : 44-46.
- Drozd, B., Holub, M., Samek, Z., Herout, V., Sorm, F. 1968. On terpenes. CXCII. The constitution and absolute configuration of onopordopicrine a sesquiterpene lactone from *Onopordon acanthium* L. Coll. Czech. *Chem Commun.* 33, 1730–1737.
- Ehsan, A., Omar, A. A., Sarg, T. M., Slatkin, D. J. 1987. Chemical Constituents of *Centaurea pallescens*. *Planta Med.* 53(5):503-504.
- Elizabeth, K., Rao, M.N.A. 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharm.* 58, 237–240.
- Erel, S.B., Bedir E., Ikhlas, A., Khan, I.A., Karaalp, C. 2010. Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* P.H. Davis. *Biochem Syst Ecol.* 38, 1056–1058.
- Erel, S.B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S., Krenn, L.2011. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharm Biol.* 49, 840–849.
- Erenler, R., Sen, O., Yaglioglu, A.S., Demirtas, I. 2016. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Comb Chem High Throughput Screen.* 19: 66-72.
- Fakhfakh, J.A., Martinb, M.T., Damak, M. 2005. RMN 2D de lignanes et de flavonoides isolés de *Centaurea furfuracea* (Asteraceae). *Journal de la Société Chimique de Tunisie.* 7, 11-18.

- Forgo, P., Zupko, I., Molnár, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J. 2012. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. 83(5):921–925.
- Frehner, M., Scalet, M., Conn, E.E. (1990) Pattern of the cyanide-potential in developing fruits. *Plant Physiol.* 94: 28–34.
- Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E.E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., García-Jacas, N.T., Susanna, A., Jansen, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis, I., Balslev, H., (Eds.), *Plant Diversity and Complexity Patterns : Local, Regional and Global Dimensions*. *Biol Skr.* vol. 55, pp. 343–373.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F., Robinson, H.E. 2009. Classification of *Compositae*. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ. *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. *International Association for Plant Taxonomy, Vienna*. 171–189.(livre).
- Garabeth, F., Bouaoun, D., Elyafi-Elzahri, G. 2007. Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie*, 5(1):259–263.
- Gaussen, H., Leroy, F., Ozenda, P. 1982. Précis de botanique (Végétaux supérieurs). 2<sup>e</sup> Ed *Masson, Paris*, 580p.livre.
- Gomathi, D., Kalaiselvi, M., Ravikumar, G., Devaki, K., Uma, C. 2015. GC-MS analysis of bioactive compounds from the whole plant ethanolic extract of *Evolvulus alsinoides* L. *J Food Sci Technol.* 52(2) :1212–1217.
- Gonzalez, A.G., Arteaga, J.M., Bermejo, J. and Breton, J.L. 1971 Chemistry of plant constituents. XIII. Melitensin, new sesquiterpene lactone from *Centaurea mehtensis*. *Anales de Quimica.* 67, 1243-1244.
- Gouda, A.A., Amin, A.S. 2010). Copper (II)-neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. *Arab J Chem.* 3, 159-165.
- Gulcemal, D., Alankus-Caliskan, O., Karaalp, C., Ors, A.U., Ballar, P., Bedird, E.2010. Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydr Res.* 345(17), 2529-2533.
- Gürbüz, İ., Yesilada, E. 2007. 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.* 112:284-291.
- Güven, K., Çelik, S., Uysal, İ. 2008. Antimicrobial Activity of *Centaurea* Species, *J. Pharm. Bioly.* 43 (1), 67-71.
- Hladik, C.M., Simmen, B., Ramasiarisoa, P. 2000. Rôle des produits secondaires (tanins et alcaloïdes) des espèces forestières de l'Est de Madagascar face aux populations animales. In: Lourenço WR, Goodman SM (eds) *Diversity and Endemism in Madagascar*. Mémoires de la société de biogéographie (Editions). Paris, pp 105–114.
- Hamedeyazdan, S., Niroumand, F., Fathiazad, F. 2017. Phytochemical analysis and antioxidative properties of *Centaurea albonitens*. *Res J Pharma.* 4(4), 57-64.

- Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. 2012. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Nat Prod Res.* 26, 203-208.
- Harborne, J.B. 1994. The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge.
- Harborne J. B, Baxter H. The hand book of natural flavonoids. Willey 1999.
- Harmatha, J., Budesinsky, M., Vokac, K., Pavlik, M., Grüner, K., Laudova, V. 2007. Lignan glucosides and serotonin phenylpropanoids from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Collect Czech. Chem Commun.* 72: 334–346.
- Hema, R., Kumaravel, S., and Alagusundaram. 2011. GC/MS Determination of Bioactive components of *Murraya koenigii*. *Am J Sci.* 7(1).
- Herz, W., Sumi, Y. 1964. Constituents of *Ambrosia hispidula* *J Org Chem.* 29,3438.
- Herz, W., Sudansanam, V.1970. Flavones of *Iva hayesiana*. *Phytochemistry. Vol 9pp.* 895-896.
- Hodaj, E., Tsiftoglou, O., Abazi, S., Hadjipavlou-Litina, D., Lazari, D. 2017. Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Nat Prod Res.* 31(10):1195–1200.
- Horsley, S. B. and Meinwald, J. 1981. Glucose-1-benzoate and prunasin from *Prunus serotina* *Phytochemistry.* 20,1127.
- Hosoya, T., Yun, Y.S., Kunugi, A. 2005. Five novel flavonoids from *Wasabi japonica*. *Tetrahedron.* 61, 7037–7044.
- Huang, D., Ding, Y., Li Y., Zhang, W., Fang, W., Chen X. 2006. *Cancer Lett.*233(2) :289–296.
- Hussain, H., A. Al-Harrasi, G. Abbas, N.U. Rehman, F. Mabood, I. Ahmed, M.Saleem, *et al.* 2013. The genus *Pluchea*: phytochemistry, traditional uses, and biological activities. *Chem Biodivers.* 10 (11): 1944-71.
- Inagaki, I., Hisada, S., Nishibe, S. 1971. Lignan glycosides of *Trachelospermum asiaticum* var. *intermedium*. *Phytochemistry.* 10:211–213.
- Ismail, S.I., Hammouda, F. M., Rimpler, H., Abdellah, S.M. 1986. Flavonoids and sesquiterpene lactones, constituents of *Centaurea alexandrina*. *Planta Med.* 52(6):527
- Iswandana, R., Pham, B.T., Van Haften, W.T., Luangnon, K.T., Oosterhuis, D., Musaers H.A., Olinga, P. 2016. Organ and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicol in vitro.* 32: 261-268.
- Jagessar, R.C. 2017. Phytochemical Screening and TLC Profile of *Montrichardia arborescens*. *Am J Res Commun.* 5(1): 129-142.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Bruneau, C. 2011. Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chem Nat Comp.* 46, 966–967.

- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L. et Mitakou, S. 2003. Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *J Nat Prod.* 66, 316-319.
- Karakus G., Polat Z.A., Sahin Yaglioglu A., Karahan M. and Yenidunya A.F. 2013. Synthesis, characterization, and assessment of cytotoxic, antiproliferative, and antiangiogenic effects of a novel procainamide hydrochloride-poly (maleic anhydride-co-styrene) conjugate. *J Biomater Sci Polym Ed.* 24(10):1260-76.
- Karamenderes, C., Bedir, E., Pawae, R., Baykan, S., Khan, I.A. 2007. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry.* 68, 609–615.
- Karamenderes, C., Bedir, E., Abou-Gazar, H., Khan, I.A. 2007. Chemical constituents of *Centaurea cadmea*. *Chem Nat Comp.* 43, 694–695.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K.A. 2004. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood- brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Br J Pharmacol.* 142 : 811e820.
- Khalfallah, A., Berrehal, D., Kabouche, A., Touzani, R., Kabouche, Z. 2012. Flavonoids from *Centaurea omphalodes*. *Chem Nat Comp.* 48(3), 482-483.
- Khamlach, K., Dhal, R., Brown, E. 1989. Total syntheses of (-)-trachelogenin, (-)-nortrachelogenin and (+)-wikstromol. *Tetrahedron Lett.*30, 2221–2224.
- Khan, S.B., 2004. Phytochemical Investigation on the Constituents of *Amberboa ramosa*. Doct. Thesis University of Karachi, Pakistan.
- Khan, A.K., Rashid, R., Fatima, N., Mahmood, S., Mir, S., Khan, S., Jabeen, N., Murtaza, G. 2015. Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Pol Pharm. Drug Res.* 72, 643–650.
- Kolli, E.H., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, S. 2012. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *J Braz Chem Soc.* 23(5), 977-983.
- Kongo-Nzuzi, Y. 2009. Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de *candidas albicans*, ISTM Kinshasa.
- Krafczyk, N., Kötke, M., Lehnert, N., Glomb, M. 2008. Phenolic composition of *rhubarb*. *Eur Food Res Technol.* 228, 187-196.
- Kubacey, T.M., Haggag, E.G., El-Toumy, S.A., Ahmed, A.A., ElAshmawy, I.M., Youns, M.M.2012. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *J Pharm Res.*5(6), 3352-3361.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Dinan, L.N., Ferguson, C.A., Finnie, D., Jaspars, M., Sarker, S.D. 2003. Biological activities of lignans from *Centaurea scabiosa*. *Pharm Biol.* 41, 203–206.

- Kwon, H.C., Cha, J.W., Park, J.S.** 2011. Rapid identification of bioactive compounds reducing the production of amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) from south African plants using an automated HPLC/SPE/HPLC coupling system. *Biomol Ther.* 19:90–96.
- Labed, F., Masullo, M., Mirra, V., Nazzaro, F., Benayache, F., Benayache, S., Piacente, S.** 2019. Amino acids sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia.* 133, 51–55.
- Lakhal, H., Boudiar, T., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Bruneau, C.** 2010. New sesquiterpene lactone and other constituents from *Centaurea sulphurea* (Asteraceae). *Nat Prod Commun.* 5, 849–850.
- Lee, K.H.** 2004. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead. *J Nat Prod.* 67: 273-283.
- Lee S, Shin S, Kim H, Han S, Kim K, Kwon J, et al.** 2011. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-kappaB pathways. *J Inflamm (Lond).*8:16
- Lee, J., Yang, H.S., Jeong, H., Kim, J.H., Yang, H.** 2020. Targeted isolation of lignans from *Trachelospermum asiaticum* using molecular networking and hierarchical clustering analysis. *Biomolecules .*10, 378.
- Li, G.H., Liu, F., Xin Z.** 1979. Studies on pharmacodynamics actions in *Saussurea medusa*, *Chin Bull Pharma.* 14: 86-87.
- Lin, Y.C., Hung, C.M., Tsai, J.C.** 2010. Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Agric Food Chem.* 58:9511e9517.
- Ling SK, Tanaka T, Kouno I.** 2002. New cyanogenic and alkyl glycoside constituents from *Phyllagathis rotundifolia*. *J Nat Prod.* 65:131–135.
- Liu S., Chen K., Schlemann W., Strack D.** 2003. Isolation and identification of trace lignans, arctiin and arctigenin, in *Arctium lappa* L. leaves. *Sepu.* 21(1): 52-55.
- Liu, X., Wang, Z., Yang, Y., Wang, L., Sun, R., Zhao, Y., Yu, N.** 2014. Active components with inhibitory activities on IFN-G/STAT1 and IL-6/STAT3 signaling pathways from *caulis trachelospermi*. *Molecules.*19, 11560–11571.
- Lokadi, L.P.** 2008. Etude Chimique de l'espèce *Jacobinia Carnea*, Université de Lubumbashi.
- Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J.** 1992. Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *J Nat Prod.* 55, 225–228.
- Louaar, S., Achouri, A., Lefahal, M., Laouer, H., Medjroubi, K., Duddeck, H., Akkal, S.** 2011. Flavonoids from Algerian Endemic *Centaurea microcarpa* and their Chemotaxonomical Significance. *Nat Prod Commun.* 6(11), 1603-1604.

- Louaar, S., Zelligui, A., Gherraf, N., Medjroubi, K., Derbre, S., Seguin, E., Laouer, H., Akkal, S. 2014. Antiradical activity of flavonoids from the Algerian native plant: *Centaurea microcarpa* Coss. et Dur. *J Bio Act Prod Nat.* 4:249–253.
- Lopez-Rodriguez, M., Garcia, V.P., Zater, H., Benayache, S., Benayache, F. 2009 Cynaratriol, a sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. *Acta Cryst.* E65:867–868.
- Lü, H., Sun, Z., Shan, H., Song, J. 2016. Microwave-assisted extraction and purification of arctiin and arctigenin from Fructus Arctii by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 54: 472–478.
- Machado, F. B., Yamamoto, R. E., Zanolli, K., Nocchi, S. R., Novello, C. R., Albrecht Schuquel, I. T., Sakuragui, C. M., Luftmann, H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Palazzo de Mello, J. C. 2012. Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation. *Molecules*, 17(2), 1852–1859.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Yuste, A., Félix, S., Miguel, C. 2005. Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochem.* 66, 1644-1650.
- Marco, J.A., Sanz, J.F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M. 1992. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 31, 3527–3530.
- Marco, J. G. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Amer Oil's Chem.* 45, 594-598.
- Masso, J.L., Bertran, M.N., Adzet, T. 1979. Chemical and pharmacological study of some *Centaurea* species (Compositae). *Plant Med Phtother.* 13: 41-45.
- Medjroubi, K., Bounderdara, N., Benayache, F., Akkal, S., Seguin, E., Tillequin, F., 2003. Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*. *Chem. Nat. Comp.* 39, 506–507.
- Medjroubi, K., Mezhoud, S., Benayache, F., Seguin, E., Tillequin, F. 2005. Flavonoids of the Aerial Part of *Centaurea pullata*. *Chem Nat Compd.* 41: 226-227.
- Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 326–329.
- Mezache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, E. 2010. Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chem Nat Comp.* 46, 801–802.
- Milošević Ifantis, T., Solujić, S., Pavlović-Muratspahić, D., Skaltsa, H. 2013. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry.* 94, 159–170.
- Mibindzou, M.A. 2004. Screening phytochimique de deux espèces de plantes: *Crotalaria retusa* L(Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata* Aubrev. & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon. 62.
- Mishio, T., Honma, T., Iwashina, T. 2006. Yellow flavonoid in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. *Biochem Systemat Ecol.* 34:180–184.

- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol* 9:e1001127.
- Mosaddegh, M., Tavakoli, M., Behzad, S. 2018. Constituents of the aerial parts of *Centaurea behen*. *Chem Nat Compd.* 54, 1015.
- 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, 292–295.
- Mouffok, S. 2012. Thèse de doctorat. Université Hadj Lakhder, Batna.
- Mujeeb, F., Bajpai, P., Pathak, N. 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Res. Inter.* Hindawi Publishing Corporation. Article ID 497606.
- Mues, R., Timmermann, B.N., Ohno, N., Mabry, T.J., 1979. 6-Methoxyflavonoids from *Brickellia californica*. *Phytochemistry* 18, 1379–1383.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., Böhm V.V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *Lwt – Food Sci Technol.* 43: 992–999.
- Nacer, A., Merza, Z., Kabouche, Z., Rhouati, S., Boustie, J., Richomme, P. 2012. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochem Syst Ecol.* 163e165.
- Nebras, M.S. 2016. Evaluation of Insecticidal Activity of Bioactive Compounds from *Eucalyptus citriodora* Against *Tribolium castaneum*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*8(8) 1256-1270.
- Negrete, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Erazo, S., Garcia, R., Avendano, S., 1987. Some flavonoids of *Centaurea floccose* Hook. et Arn. *Plant Med Phytother.* 21(2), 168-172.
- Nishibe, S., Hisada, S., Inagaki, I. 1973. Lignans of *Trachelospermum liukiense* and *T. foetidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 21, 674.
- Nowak, G., Drozd, B., Kroszczyński, W., Holub, M. 1986. Sesquiterpene lactones. Cynaropicrin in species of the subtribe Centaureinae. *Acta Soc. Bot. Pol.* 55, 17–22.
- Nurettin, Y., Canan, G., Osman, U., Ahmet, Y., Serdar, U., Kamil, C., and Salih, T. 2006. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. *Turk, J. Chem.* 30 ; 70-76.
- Orabi, K.Y., Sary, H.G., Ayoub, N.A., Singab, A.N.B., Vinodh, V. 2018. Isolation of bioactive compounds from *centaurea aegyptiaca*. *Int J Pharm Pharm Sci.* Vol 10, Issue 4, 1-6.
- Ozcelik, B., Gurbuz, I., Karaoglu, T., Yesilada, E. 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiol Res* 164: 545-552.
- Ozenda, P. 1977. Flore du Sahara septentrional et central. Paris: CNRS; 250-259.
- Pawan, K. 1992. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry.* 31, 3307-3330.

- Podsedeck, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *brassica vegetables*. *LWT Food Sci and Technol.* 240, 1-11.
- Pengelly, A. 2004. The constituents of Medicinal Plants : An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine, CABI publishing.
- Peng, X., Zheng, Z., Cheng, K.W., Shan, F., Ren, G.X., Chen, F., Wang, M., 2008. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry.* 106, 475–481.
- Picher, M.T., Seoane, E., Tartajada, A.1984. Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* subsp. *stenophylla*. *Phytochemistry.* 23, 1995–1998.
- Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1- 2. Ed. CNRS, Paris France.
- Radford, E.A., Catullo, G., De Montmollin, B .2011. Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale, VICN, Planta life, Gland, Suisse et Malaga, Espagne.
- Rajendra, K.N., Vasantha, K., Mohan, V.R. 2014. GC-MS Analysis of Bioactive Components of Tubers of *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae). *Americ. J. Phytomed. Clin. Therapeut.* 2(2): 209-216.
- Raphel, I.1969. Natural products, Deuxième édition, Academic Press, INC.A laboratory guide, pp: 1-21, pp 169-181.
- Re, R., PellegriniN., ProteggenteA., PannalaA., YangM., Rice-Evans,C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. *Free Radical Bio Med.* 26: 1231–1237.
- Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R.A., Simmonds, M.S.J., Arnold, N.A., Bruno, M., 2006. Guaianolides from the aerial parts of *Centaurea hololeuca*. *Nat Prod Commun.* 1, 281–285.
- Sahin Yaglioglu, A., Demirtas, I., Goren, N. 2014. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiiformis* DC. *Phytochem Lett.* 8, 213-219.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Review : Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 3 (8): 121-137.
- Sen, A., Gurbuz, B., Gurer, U., Bulut, G., Bitis, L. 2014. Flavonoids and biological activities of *Centaurea stenolepis*. *Chem Nat Compd.* 50:128–129.
- Sen, A., Ozbas, T.S., Bitis, L. 2017. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharm Biol.* 55(1): 541-546.
- Seigler DS, Pauli GF, Nahrstedt A, Leen R. 2002. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry.* 60:873–882.
- Seigler DS, Pauli GF, Frohlich R, Wegelius E, Nahrstedt A, Glander KE, Ebinger JE. 2005. Cyanogenic glycosides and menisdaurin from *Guazuma ulmifolia*, *Ostrya virginiana*, *Tiquilia plicata* and *Tiquilia canescens*. *Phytochemistry.* 66:1567–1580.

- Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estevez, F., Leon, F., Bermejo, J., Benayache, F. 2009. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett.* 2:114–118.
- Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermijo, J., Benayache, F. 2006. Pheolic compounds from *Centaurea africana*. *Chem Natr Comp.* 42 (5), 610-611.
- Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S., Iranshahi, M. 2018a. Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. *Nat Prod Res.* 32, 1436–1440.
- Shakeri, A., Masullo, M., Bottone, A., Asili, J., Emami, S.A., Piacente, S., Iranshahi, M. 2018b. Sesquiterpene lactones from *Centaurea rhizantha* C.A. Meyer. *Nat Prod Res.* 33, 2016–2023.
- Shinoda, J., Kawagoye, M., 1929. Ueber die bestandteile des *Arctium lappa* L. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 49, 565e575.
- Shirane, N., Hashimoto, Y., Ueda, K., Takbnaka, H., Katoh, K. 1996. Ring a cleavage 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium longirostre*. *Phytochemistry.* 43:99-104.
- Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S.M., Nahar, L., Kong-ThooLin, P.K., Sarker, S.D. 2005. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron.* 61, 9001–9006.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy. Y., Jaspars, M., Nahar, L., Kong Thoo-Lin, P., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D. 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan from the seeds of *Centaurea Americana*. *Phytochemistry.* 67, 2370–2375.
- Shoeb M., Macmanus S.M., Jaspars, M., Trevidu J., Nahar L., Kong-Thoo-Lin P., 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, 11172–11177.
- Shoeb, M., Çelik, S., Nahar, L., MacManus, S.M., Kong-Thu-lin, P., Jaspars, M., Sarker, S.D. 2007. Two salonitenolide derivatives from the aerial parts of *Centaurea gigantea* inhibit the growth of colorectal cancer cells in vitro. *Nat Prod Commun.* 2, 121–125.
- Shoeb, M., MacManus, S.M., Kong-Thu-lin, P., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. 2007. Bioactivity of the extract and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *Daru J Fac Pharm.*15, 118–122.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M. 2000. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry.* 55:903–8.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Applied Microbiol.* 91: 1011-1022.

- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V, Figeat, M., Jeanmonod, D. 2004. Botanique Systématique des plantes à fleurs. 3ème édition, Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne, Suisse. pp. 348-349. Livre.
- Tan, X.Q., Chen, H.S., Liu, R.H., Tan, C.H., Xu, C.L., Xuan, W.D. 2005. Lignans from *Trachelospermum jasminoides*. *Planta Med.* 71:93–5.
- Tastan, P., Hajdu, Z., Kusz, N., Zupko, I., Sinka, I., Kivcak, B., Hohmann, J. 2019. Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Psephellus pyrrhoblepharus* with Antiproliferative Activity on Human Gynecological Cancer Cell Lines. *Molecules.* 24, 3165.
- Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food. Chem.* 103: 816-822.
- Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I. Coulibaly A. 2012. Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J Appl Biosci.* 58: 4234– 4242.
- Trendafilova, A., Todorova, M., Bancheva, S. 2007. Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*. *Biochem Syst Ecol.* 35, 544–548.
- Turkan, F., Atalar, M.N., Aras, A., Gulcin, I., Bursal, E. 2020. ICP-MS and HPLC analyses, enzyme inhibition and antioxidant potential of *Achillea schischkinii* Sosn. *Bioorg Chem.* 94:103333
- Tuzun, B.S., Hajdu, Z., Orban-Gyapai, O., Zomborszki, Z.P., Jedlinszki, N., Forgo, P., Kivcak, B., Hohmann, J. 2017. Isolation of chemical constituents of *Centaurea virgata* lam. And xanthine oxidase inhibitory activity of the plant extract and compounds. *Med Chem.* 13, 498–502.
- Tuzlacı, E., Erol, M.K. 1999. Turkish folk medicinal plants. Part II: Egirdir (Isparta). *Fitoterapia.* 70, 593–610.
- Ulubelen, A., iiksiiz, S. and Meriqli, A. H. 1988. Palmitic acid ester of sitosteryl 3p-glucoside from *Centaurea regia* . *Phytochemistry.* 27, 3944.
- Vinod, K.G., Amit, R., Vikas, K.N., Kalishankar, M. 2010. Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *J Med Plant Res.* 4(16). pp. 1656-1661.
- Xiao, J.B.; Capanoglu, E.; Jassbi, A.R.; Miron, A. 2015. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*
- Xiao, W., Li, X., Li, N., Bolati, M., Wangn, X., Jia, X., Zhao, Y. 2011. Sesquiterpene lactones from *Saussurea involucrata*. *Fitoterapia.* 82(7): 983–987.
- Yaglioglu, A. S., Demirtas, I., Goren, N. 2014. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiformis* DC. *Phytochem lett.* 8: 213-219.
- Yamada, J., Tomita, Y. 1996. Antimutagenic activity of caffeic acid and related Compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 328-329.

- Yayli, N., Baltaci, C., Gök, Y., Aydin, E., Üçüncü, O. 2006. Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss. *Turk J Chem.* 30, 229–233.
- Yesilada, E. 2002. Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Şener, B. (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, London, UK, pp.119-135.
- Yesilada, E., Gürbüz, I., Bedir, E., Tatli, I., Khan, I.A. 2004. Isolation of antiulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *J Ethnopharmacol.* 95, 213–219.
- Yilmaz, M.A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Ind Crops Prod.* 149, 112347.
- Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stévigny, C., Duez, P., Benayache, F. 2016. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pac J Trop Med.* 9:554-561.
- Zehrmann, N., Zidorn, C. and Ganzera, M. 2010. Analysis of rare flavonoid C-glycosides in *Celtis australis* L. by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 51:1165–1168.
- Zhao D, Xing J, Li M, Lu D, Zhao Q. 2001. Tissue and organ culture. 67: 227-234.

## ***Partie II***

**Etude de la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut, *Marrubium vulgare* L. et la composition chimique et les activités biologiques de *Senecio massaicus***

# *Chapitre I*

## **Revue bibliographique**

## **I.1. Introduction**

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales, qui ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques comme antispasmodique, carminative, hépatoprotecteur, antiviraux, anticancéreux (Bowles, 2004 ; Lahlou, 2004) et antioxydants (Viuda Martos *et al.*, 2011).

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés, principalement des mono terpènes, des sesquiterpènes et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, éthers, cétones et phénols). D'autres composés volatiles spécifiques comprennent le phénylpropène, le soufre ou l'azote. Généralement, la composition de l'huile est un équilibre de divers composés, bien que de nombreuses espèces puissent comporter le même constituant (Cowan, 1999). Elles ont trouvées leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments.

Des études approfondies sur les composants chimiques des espèces Asteraceae et Lamiaceae ont conduit à l'identification de plusieurs substances, y compris les huiles essentielles, avec des activités intéressantes. Ce chapitre résume certains des principaux rapports sur la chimie des huiles essentielles du genre *Senecio*, *Thymus* et *Marrubium* dans la littérature.

## **I.2. Généralités sur les huiles essentielles**

### **I.2.1. Définition et localisation**

Les huiles essentielles (HE) sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau, obtenues principalement à partir de la matière végétale. Elles peuvent être stockées dans les fleurs, feuilles, fruits, racines, écorces, bois ou graines.

### **I.2.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle. La distillation à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation de la plante sèche ou fraîche sont les méthodes les plus couramment utilisées pour la production d'HE, mais d'autres méthodes

peuvent être employées (expression, fermentation, enflourage ou extraction) et leur choix peut influencer sur la composition chimique, les propriétés organoleptiques et donc l'activité biologique (Corbo *et al.*, 2009).

### I.3. Aperçu bibliographique sur le genre *Senecio*

#### I.3.1. Présentation du genre *Senecio*

Le genre *Senecio* est l'un des genres les plus importants de la famille des *Asteraceae*. Ce genre est représenté en Algérie par 18 espèces, dont 5 espèces endémiques (Quezel et Santa, 1962-1963). Ce sont des plantes herbacées annuelles et vivaces, à feuilles alternes et des capitules groupés en corymbes hétérogames ou homogames. Les fleurs du rayon sont ligulées ou non, femelles, fertiles ou stériles. Les fruits sont des akènes de 5-10 costés (muni de côtes), pourvus d'une aigrette, souvent caduque, de poils entiers, scabres ou plumeux. Les akènes du rayon sont rarement sans poils (Quezel et Santa, 1962- 1963).

#### I.3.2. Composition chimique des huiles essentielles du genre *Senecio*

Les huiles essentielles du genre *Senecio* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études phytochimiques, les composants majoritaires des huiles essentielles de 20 espèces du genre *Senecio* de différentes localités sont classés dans le tableau I.1 :

La comparaison des huiles essentielles des espèces du genre *Senecio* permet de mettre en évidence une variabilité chimique interspécifique tant au niveau qualitatif que quantitatif traduisant la grande variation des composants majoritaires.

Les composants ayant les pourcentages les plus élevés dans la composition chimique des différents espèces du genre *Senecio* sont le,  $\alpha$ -humulene (57.3%) dans l'espèces *S. vulgaris* (Andrani, 2015), le 1,10-epoxy furano eremophilane (55.30%) trouvés dans l'huile essentielle de l'espèce *S. aegyptius* (El-Shazly *et al.*, 2002), le Curcumene (42.8%) dans l'huile de *S. nemorensis* (Uçüncü *et al.*, 2010) et l' $\alpha$ -pinene (33.97%) dans l'huile de *S. graciliflorus* (Lone *et al.*, 2014).

La différence entre la composition chimique des huiles essentielles a été signalée par la présence et l'absence de certains composés de part et d'autre, Le 1,10- epoxy furanoeremophilane est le composé majoritaire de l'huile essentielle de *Senecio aegyptius* avec un pourcentage élevé (55.30%) (El-Shazly *et al.*, 2002), ce composé est absent complètement dans les huiles essentielles des autres espèces, le même cas pour le  $\gamma$ -amorphe (19,1%) et le

1-undécanol (19,5%) qui sont présents seulement dans *S. racemosus* et *S. belgaumensis* respectivement (Uçüncü *et al.*, 2010 ; Joshi, 2011).

**Tableau I.1** : Composés majoritaires ( $\% \geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre *Senecio*

Espèce	Composants majoritaires	(%)	Origine	référence
<i>S. aegyptius</i>	Nonane	17	Egypte	<b>El-Shazly <i>et al.</i>, 2002</b>
	Myrcène	8,9		
	1,10- Epoxy	55,3		
	furanoeremophilane			
<i>S. squalidus</i>	<i>p</i> -Cymène	29,3	Serbie	<b>Chalchat <i>et al.</i>, 2004</b>
	$\alpha$ -Phellandrène	24,7		
	$\alpha$ -Pinène	8,0		
<i>S. nutans</i>	<i>p</i> -Cymène	51,7	Italie	<b>Belaund <i>et al.</i>, 2007</b>
	$\alpha$ -Phellandrène	21,8		
<i>S. leucostachys</i>	Sabinène	20,7	Irane	<b>Mirza <i>et al.</i>, 2008</b>
	$\alpha$ -Phellandrène	19,7		
	Germacrène D	10,8		
	$\beta$ -Caryophyllène	8,2		
<i>S. trapezuntinus</i>	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesène	26,3	Turquie	<b>Üçüncü <i>et al.</i>, 2008</b>
	$\beta$ -Selinène	11,8		
	( <i>E</i> )-Caryophyllène	7,8		
<i>S. vernalis</i>	Spathulénol	37,1	Irane	<b>Nori-Shargh <i>et al.</i>, 2008</b>
	1,8-cinéole	19,0		
	Isobicyclogermacrenal	15,2		
<i>S. platyphyllus</i>	<i>E</i> -Caryophyllène	28,6	Turquie	<b>Usta <i>et al.</i>, 2009</b>
	Germacrène D	23,4		
	<i>E</i> - $\beta$ -farnesène	6,8		
<i>S. polyanthemoides</i>	Limonène	8,7 - 43,0	Afrique du sud	<b>Lawal <i>et al.</i>, 2009</b>
	<i>p</i> -Cymène	5,3 - 36,3		
	$\beta$ -Selinène	32,7		
	$\alpha$ -Pinène	7,4 -21,4		
	$\beta$ -Pinène	7,6 – 16,5		
	1,8-Cinéole	9,3 – 11,4		
	Humulène époxide II	8,6 – 10,3		
	L'oxyde de caryophyllène	5,7 – 13,4		
<i>S. nemorensis</i>	Curcuemène	42,8	Turquie	<b>Üçüncü <i>et al.</i>, 2010</b>
<i>S. coincyi</i>	1- Tridecène	13,9	Espagne	<b>Arrabal, 2011</b>
	1- Pentadecanone	6,5		
	$\beta$ -Bisabolène	5,6		

Tableau I.1 : Composés majoritaires ( $\% \geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre *Senecio* (suite)

<i>S. belgaumensis</i>	1-undécanol $\beta$ -Caryophyllène L'oxyde de caryophyllène $\gamma$ -Terpinène	19,5 18,9 10,4 9,2	Inde	<b>Joshi, 2011</b>
<i>S. perralderianus</i>	$\gamma$ -Cadinène $\alpha$ -Pinène Germacrène D	15,3 8,8 5,8	Algérie	<b>Lograda et al., 2012</b>
<i>S. giganteus</i>	$\alpha$ -Pinène 6,10,14-Triméthyl-2-pentadécanone Pentacosane Tricosane	19,4 19,1 16,9 11,9	Algérie	<b>Chibani et al., 2013</b>
<i>S. flammeus</i>	$\alpha$ -Farnésène Caryophyllène Acide hexadécanoïque $\alpha$ -Pinène	11,3 8,7 7,2 6,4	Chine	<b>Xiao et al., 2014</b>
<i>S. nudicaulis</i>	L'oxyde de caryophyllène Humulène époxyde-II $\alpha$ -Humulène	24,9 21,3 18,8	Inde	<b>Sharma et Shah, 2014</b>
<i>S. graciliflorus</i>	$\alpha$ -Pinène $\beta$ -Pinène Sabinène	33,9 11,9 5,4	Inde	<b>Lone et al., 2014</b>
<i>S. vulgaris</i>	$\alpha$ -Humulène $\beta$ -Caryophyllène Terpinolène	57,3 5,3 5,2	France (Corse)	<b>Andrani et al., 2015</b>
<i>S. amplexicaulis</i>	$\alpha$ -Phellandrène <i>o</i> -cymène $\beta$ -ocimène	48,6 16,8 7,6	Inde	<b>Singh et al., 2015</b>
<i>S. giganteus</i>	Acide hexadécanoïque Isophytol Phytol	17,8 12,4 6,7	Algérie	<b>Kenoufi et al., 2016</b>
<i>S. nudicaulis</i>	$\alpha$ -Humulène $\beta$ -Caryophyllène Germacrène D Acide linoléique	30,2 22,3 26,3 9,7	Inde	<b>Kumar et Mathela, 2018</b>

### I.3.3. Activité biologique des huiles essentielles du genre *Senecio*

Les huiles essentielles du genre *Senecio* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études phytochimiques et plusieurs activités biologiques ont été mises en évidence :

L'huile essentielle des fleurs et de feuilles de *S. aegyptius* possède une activité antifongique contre *Candidat. albicans* et contre les bactéries à Gram positif (El-Shazly et al., 2002), alors que celle de *S. racemosus* a montré une activité antifongique contre *Candida tropicalis* (Uçüncü et al., 2010). L'huile essentielle de *S. flammeus* est efficace dans le traitement inflammatoire aigu et chronique et ce résultat confirme l'utilisation traditionnelle de cette plante (Xiao et al., 2014). L'huile essentielle de *S. nudicaulis* a un pouvoir antioxydant significative. (Sharma et Shah, 2015).

Selon (Lone et al., 2014) l'huile essentielle des fleurs de *S. graciliflorus* présentait un potentiel antioxydant puissant et une cytotoxicité élevée contre des lignées cellulaires du cancer de poumons.

### **I.3.4. *Senecio massaicus***

Cette espèce admet le synonyme suivant : *Senecio coronopifolius*.

#### **I.3.4.1. Description botanique**

C'est une plante Annuelle à racines fibreuses et tige dressée, atteignant 30–40 cm de haut, ramifiée à partir de la moitié inférieure avec des branches suberectes aussi longues que la tige principale. Elle a également des capitules discoïdes, mais ses feuilles sont divisées en segments étroits et elles n'ont pas de grandes oreillettes. De plus, il pousse à des altitudes plus basses dans des lits de rivières graveleux et secs et n'atteint pas la chaîne de montagnes de l'Anti Atlas (Jahandiez et Maire 1931–1934 ; Fennane et Ibn Tattou 1998). Cette espèce n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques ou biologiques auparavant.

#### **I.3.4.2. Place dans la systématique**

**Royaume :** Plante

**Embranchement :** Spermatophytes

**Classe :** Dicotylédones (Magnoliopsida)

**Sous classe :** Asteridae

**Ordre :** Astérales

**Famille :** Asteraceae

**Genre :** *Senecio*

**Espèce :** *Senecio massaicus*= *Senecio coronopifolius*.

## I.4. Aperçu bibliographique sur le genre *Marrubium*

### I.4.1. Présentation du genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des Lamiacées. Ses espèces poussent principalement dans les terrains en friche, pierreux, secs et ensoleillés. Ils présentent des tiges anguleuses et portent des paires opposées, alternés de feuilles ovales ou oblongues souvent malodorantes, mais très décoratives par leur aspect velouté. Les fleurs, bilabiées, tubulaires, sont groupées en verticilles axillaires (Anonyme, 2004).

### I.4.2. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Marrubium* :

Plusieurs études sur la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces du genre *Marrubium* présentent un polymorphisme chimique très important. En effet, la teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes et la période de la cueillette. Les composés l'oxyde de caryophyllène, bicyclogermacrène, germacrène D, l'acide hexadécanoïque, *m*-tolualdéhyde,  $\beta$ -farnesène et l'acide oleïque sont les principaux constituants de quelques espèces du genre *Marrubium* (tableau I.2) :

**Tableau I.2 :** Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles du genre *Marrubium*

Espèce	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>M. astracanicum</i>	L'oxyde de Caryophyllène	35,8	Iran	<b>Baher Nik et Mirza, 2003</b>
	Citronellal	16,9		
	$\beta$ -Caryophyllène	13,1		
<i>M. cuneatum</i>	Bicyclogermacrène	37,9	Iran	<b>Baher Nik et al., 2004</b>
	Germacrène D	24,1		
<i>M. bourgaei</i>	L'acide-hexadécanoïque	33,3	Turquie	<b>Kurkcuoglu et al., 2007</b>
	L'acétone	6,4		
	hexahydrofarnesyl			
<i>M. deserti</i>	germacrène D	45,5	Algérie	<b>Laouer et al., 2009</b>
<i>M. incanum</i>	( <i>E</i> )-caryophyllène	27,0	Monténégro	<b>Pétrovic et al., 2009</b>
	germacrène D	26,2		
	bicyclogermacrène	11,5		
<i>M. crassidens</i>	<i>m</i> -Tolualdéhyde	23,3	Azarbaïdjan	<b>Hamedeyazda et al., 2013</b>
	Acetophenone	15,8		
	Nonacosane	13,1		
<i>M. anisodon</i>	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Farnesene	20,2	Turquie	<b>Kırimer et al., 2015</b>
	Nonacosane	18,5		
	$\beta$ -Caryophyllène	13,3		

**Tableau I.2** : Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles du genre *Marrubium* (suite)

Espèce	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>M. persicum</i>	$\alpha$ -Pinène Spathulenol $\alpha$ -Thujène	21,5 19,5 17,4	Iran	<b>Mohammadhosseini et al., 2016</b>
<i>M. deserti</i>	Tetracosane Germacrène D $\gamma$ -Cadinène $\alpha$ -Cadinol <i>t</i> -Cadinol	31,1 7,9 6,5 6,3 5,81	Algérie	<b>Chemsa et al., 2016</b>
<i>M. propinquum</i>	Acide oleique $\beta$ -caryophyllène L'oxide caryophyllène	19,0 7,4 5,4	Iran	<b>Hamedeyazdan et al., 2017</b>
<i>M. parviflorum</i>	Acide oleique $\alpha$ -Pinène Germacrène D	11,8 10,2 9,8		
<i>M. parviflorum</i>	(Z,Z)-Farnesyl acetone L'oxide caryophyllène Pulegone	19,3 15,9 7,2	Turquie	<b>Sarikurkcu et al., 2018</b>

### I.4.3. *Marrubium vulgare* L.

#### I.4.3.1. Descriptions botanique

Le marrube blanc (figure I.1) est une plante herbacée vivace à tige quadrangulaire cotonneuse pouvant atteindre 80 cm de hauteur. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords sont blanchâtres, et duveteux sur la face inférieure. Les fleurs petites, blanches, avec un calice à dents crochues sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles. Le fruit est un tétra-akène. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère (Aouadhi, 2010).



**Figure I.1 :** *Marrubium vulgare*

#### **I.4.3.2. Place dans la systématique**

**Règne :** Végétale

**Embranchement :** Angiosperme.

**Classe :** Eudicotylédones.

**Sous-classe :** Gamopétale.

**Ordre :** Lamiales.

**Famille :** Lamiacées.

**Genre :** *Marrubium*.

**Espèce :** *Marrubium vulgare* L.

#### **I.4.3.3. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielles de *Marrubium vulgare* :**

Les études bibliographique sur les huiles essentielles de l'espèce *Marrubium vulgare* récoltées de plusieurs pays du monde (tableau I.3), montre la presence des constituents majoritaires suivants :

Le  $\beta$ -bisabolene qui a été obtenu dans les HEs des plantes Iranienne (20,4-25,4%) (**Morteza - Semnani et Saedi ,2004 ; Khanavi et al., 2005**), Algérienne (29,0 %) (**Belhattab et al., 2006**) et Tunisienne (28,2%) (**Hamdaoui et al., 2013**), le  $\beta$ -caryophyllene (**Nagy et Svajdlenka, 1998 ; Zawislak, 2012**) le caryophyllene-oxide (**Asadipour et al., 2005**), eudesmol (**Kadri et al., 2011**),  $\alpha$ -Pinene (**Bayir et al., 2014**) et le 4,8,12,16- tetraméthyl heptadécan-4-olide (16,9 %) qui est présent seulement dans l'huile essentielle étudiée par (**Abadi et al., 2013**).

**Tableau I.3 :** Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce *Marrubium vulgare*

Plante	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>Marrubium vulgare</i>	$\beta$ -Caryophyllène Germacrène D	45,8 14,4	Slovaquie	<b>Nagy and Svajdlenka, 1998</b>
	(Z)- $\beta$ -Farnesène $\beta$ -Caryophyllène	9,6 8,5	Lituanie	<b>Weel et al., 1999</b>
	$\beta$ -Bisabolène $\delta$ -Cadinène Isocaryophyllène	20,4 19,1 14,1	Iran	<b>Morteza - Semnani et Saeedi ,2004</b>
	$\beta$ -Bisabolène $\beta$ -Caryophyllène Germacrène D <i>E</i> - $\beta$ -farnesène	25,4 11,6 9,7 8,3	Iran	<b>Khanavi et al., 2005</b>
	Oxyde de caryophyllène Trans-caryophyllène Germacrène-D	18,7 12,8 10,0	Iran	<b>Asadipour et al., 2005</b>
	$\beta$ -Bisabolène	29,0	Algérie	<b>Belhattab et al., 2006</b>
	Eudesmol Citronellol Citronellyl format Germacrène D	11,9 9,9 9,5 9,4	Tunisie	<b>Kadri et al., 2011</b>
	$\beta$ -Caryophyllène Germacrène-D Bicyclogermacrène $\delta$ -Amorphène	34,5 22,5 9,5 6,2	poland	<b>Zawislak , 2012</b>
	4,8,12,16- Tetramethyl heptadecan-4-olid Germacrène D-4-ol $\alpha$ - Pinéne	16,9 9,6 9,4	Algérie	<b>Abadi et al., 2013</b>
	$\beta$ -Bisabolene $\beta$ -Caryophyllène (E)- $\beta$ -farnesene	28,3 7,8 7,4	Tunisie	<b>Hamdaoui et al., 2013</b>
	Thymol Carvacrol	25,1 12,1	Libye	<b>EL-Hawary et al., 2013</b>
	$\alpha$ -Pinène $\beta$ -Pinène $\beta$ -Phellandrène 2-Hexenal	28,9 18,3 17,4 14,8	Turquie	<b>Bayir et al., 2014</b>

**Tableau I.3 :** Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce *Marrubium vulgare* (suite)

Plante	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>Marrubium vulgare</i>	$\beta$ -Caryophyllène	32,2	Iran	<b>Golparvar et al., 2015</b>
	(E)- $\beta$ -farnesène	11,4		
	Cineole	8,2		
	$\alpha$ -Pinène	6,6		
	Carvacrol	36,3	Egypte	<b>Said-Al Ahl et al., 2015</b>
	$\beta$ -phellandrène	15,5		
	carvyl acetate	11,5		
	Eugenol	21,5	Algérie	<b>Reazi et al., 2017</b>
	$\beta$ -Caryophyllène	11,5		
	$\beta$ -Bisabolène	10,3		
$\beta$ -Bisabolène	43,4	Algérie	<b>Elbali et al., 2018</b>	
Camphre	70,9	Iran	<b>Sardarodiyani et al., 2018</b>	
$\beta$ -Bisabolène	7,1			
E- $\beta$ -Farnesène	5,4			

## I.5. Aperçu bibliographique sur le genre *Thymus*

### I.5.1. Présentation du genre *Thymus*

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des Lamiacées. Ce sont des plantes basses sous-ligneuses, odorantes, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncée, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les huiles essentielles de trichomes contiennent majoritairement les composés de type mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Quezel et Santa, 1962)

### I.5.2. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Thymus* :

Un grand nombre d'espèces du genre *Thymus* a déjà fait l'objet d'études chimiques sur les huiles essentielles. Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques trouvés dans les huiles essentielles de ce genre, ainsi que le *p*-cymène, le 1,8-cinéole, le linalol et d'autres monoterpènes. Le tableau I.4 rapporte les composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus*.

Tableau I.4 : Composés majoritaires ( $\% \geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre *Thymus*

Espèce	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>T. citriodorus</i>	Géranol Géranial Néral Nérol	45,5 13,9 10,1 5,2	Iran	<b>Omidbaigi et al., 2005</b>
<i>T. persicuss</i>	Thymol Carvacrol $\beta$ -Phéllandrène $\gamma$ -Terpinène 1,8-Cinéol	10,3 25,7 11,6 5,6 5,2	Iran	<b>Meshkatsadat et al., 2006</b>
<i>T. zygoides</i>	Thymol <i>p</i> -Cymène $\gamma$ -Terpinène	19,5 19,4 17,2	Grèce	<b>Tzakou et al., 2008</b>
<i>T. glabrescens</i>	Géranol Acétate de néryl $\beta$ -Bisabolène	55,5 11,1 6,7	Roumanie	<b>Pavel et al., 2010</b>
<i>T. eriocalyx</i>	Thymol Ornéol 1,8-Cinéol	79,0 11,9 9,8	Turquie	<b>Kucukbay et al., 2010</b>
<i>T. praeocox</i>	Thymol Carvacrol	48,1 22,2	Turquie	<b>Avci et al., 2011</b>
<i>T. vulgaris</i>	Thymol Carvacrol <i>p</i> -Cymène $\gamma$ -Terpinène	32,6 8,3 16,6 12,6	Iran	<b>Moghtader, 2012</b>
<i>T. longicaulis</i>	Thymol Carvacrol $\beta$ -Phéllandrène $\alpha$ -Terpinéol Linalool	15,26 12,65 19,07 14,23 9,63	Kosovo	<b>Hatipi et al., 2013</b>
<i>T. numidicus</i>	Thymol Linalol <i>p</i> -Cymène	54,1 5,4 15,3	Algérie	<b>Benayache et al., 2014</b>
<i>T. palludis</i>	camphre Bornéol $\alpha$ -Terpinéol	18,9 36,6 10,0	Maroc	<b>Elbouchttaoui et al., 2014</b>
<i>T. lanceolatus</i>	Thymol Carvacrol	80,2 6,2	Algérie	<b>Nouasri et al., 2015</b>
<i>T. vulgaris</i>	Thymol	38,7	L'Arabie saoudite	<b>Al-Asmari et al., 2017</b>
<i>T. numidicus</i>	Thymol Carvacrol	40,4 13,37	Algérie	<b>Messara et al., 2018</b>

**Tableau I.4 :** Composés majoritaires ( $\% \geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre *Thymus* (suite)

Espèce	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>T. guyonii</i>	Thymol Carvacrol O-cymène	21,2 55,6 9,7	Algérie	<b>Zeghib et al., 2017</b>
<i>Thymus ciliatus</i>	Elémol Carvacrol $\gamma$ -Muurooléne $\beta$ -Sesquiphellandrène	6,8 5,9 5,2 5,1	Algérie	<b>Achoub et al., 2019</b>
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol <i>p</i> -Cymène	42,1 19,20	Italie	<b>Capitana et al., 2020</b>

### I.5.3. *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut

#### I.5.3.1. Descriptions botanique

Cette plante (figure I.2) est ligneuse, formant souvent des coussinets, ses rameaux sont serrés, grêles, plus ou moins dressés et velus, recouverts de feuilles opposées, effilées, courtement pétiolées, glabres, mais légèrement ciliées à la base, un peu enroulées sur les bords. Le limbe ponctué (vu à la loupe) ; très glanduleux, mesurant 1 à 2 cm de long sur 2 à 3 cm de large. Les feuilles florales sont peu différentes, lancéolées et égalant ou dépassant les calices. Les fleurs rosées, en capitules terminaux, avec un calice glanduleux, glabre ou légèrement velu, long de 5 à 6 cm, à 2 lèvres égales. La corolle dépasse de très peu le calice bilabié, à lobe médian plus grand (Beloued , 2005).



**Figure I.2 :** *Thymus algeriensis*

**I.5.3.2. Place dans la systématique****Règne :** Plantae**Sous règne :** Tracheobionta**Division :** Magnoliophyta**Classe :** Magnoliopsida**Sous classe :** Astéridae**Ordre :** Lamiales**Famille :** Lamiaceae**Genre :** *Thymus***Espèce :** *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.**I.5.3.3. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* :**

Les huiles essentielles de l'espèce *T. algeriensis* récoltées dans les pays maghrébins renferment les composés majoritaires suivants : linalool, thymol, camphre, carvacrol et le bornéol qui se trouve seulement en pourcentage plus élevé dans les parties aériennes fraîches de l'huile essentielle de Maroc avec un pourcentage de 23,5% (**Ait-Ouazzou et al., 2011**) (tableau I.5).

**Tableau I.5 :** Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce *Thymus algeriensis*

Plante	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>Thymus algeriensis</i>	Linalool	78,8	Algérie	<b>Houmani et al., 2002</b>
	Thymol	62,7	(Blida)	
	Linalool	47,3	Algérie (Media)	<b>Dob et al., 2006</b>
	Géranyl acétate	16,4	Algérie (Bouira)	<b>Hazzit et al., 2007</b>
	$\alpha$ -Pinène	25,5	Algérie (Souk-aharas)	<b>Giordiani et al., 2008</b>
	Camphre	8,8		
	1,8-Cinéol	7,6		
	Sabinene	5,3		
Thymol	29,5	Algérie	<b>Hazzit et al. 2009</b>	
Terpinyl acétate	18,0	(Bouira)		
Camphre	27,7	Maroc	<b>Amarti et al., 2010</b>	
$\alpha$ -Pinène	20,5			
1,8-Cinéol	7.55- 22.07	Tunisie	<b>Zouari et al., 2011</b>	

**Tableau I.5** : Composés majoritaires ( $\geq 5\%$ ) d'huiles essentielles de l'espèce *Thymus algeriensis*

Plante	Composants majoritaires	(%)	Origine	Référence
<i>Thymus algeriensis</i>	Bornéol	23,5	Maroc	<b>Ait-Ouazzou et al., 2011</b>
	Linalool	8,9		
	Carvacrol	7,8		
	$\beta$ -Caryophyllène	6,4		
	Thymol	38,5	Libye	<b>Giweli et al., 2013</b>
	<i>p</i> -Cymène	8,9		
	$\gamma$ -Terpinène	7,2		
Camphre	33,3	Algérie (Guelma)	<b>Touhami et al., 2016</b>	
Limonène	5,3			
O.Cymène	6,4			
Carvacrol	48,4	Algérie (Ain-Defla)	<b>Kouache et al., 2017</b>	
<i>p</i> -Cymène	14,7			
$\gamma$ -Terpinène	14,9			
Thymol	5,6			
Acétate- $\alpha$ -terpinényle	27,3	Algérie	<b>Benabed et al., 2017</b>	
Carvacrol	43,2	Algérie (Relizane)	<b>Bendjabeur et al., 2018</b>	
<i>p</i> -Cymène	18,7			
$\gamma$ -Terpinène	14,8			

## Conclusion

Nous pouvons conclure que la composition chimique diffère non seulement entre deux espèces mais aussi entre la même espèce récoltée dans des régions différentes. Cette variation peut être due à l'origine géographique des plantes et des conditions écologiques tels que la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc... Ces facteurs influencent les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent la proportion relative des composés principaux caractéristiques (**Masotti et al., 2006 ; Angioni et al., 2003**). Cela conduit à l'existence de chémotypes différents qui distinguent les HEs de différentes origines.

# *Chapitre II*

**Description des travaux et  
discussion des résultats**

## II.1. Matériel et méthode

### II.1.1. Récolte des plantes

La plante *M. vulgare* a été collecté en janvier 2015 à El-Kantina de la région de Yabous (61 km au sud-ouest de Khenchla, 35 ° 24 ' 29 " nord, 6 ° 38 ' 31 " est, altitude : 1167 m), *T. algeriensis* a été collecté en juin 2015 dans la région de Foum-Toub (57 km au sud-est de Batna, 35 ° 24 ' 18 " nord, 6 ° 32 ' 59 " est, altitude : 1164 m). Enfin, l'espèce *Senecio massaicus* était collectée en avril 2017 dans la région de Béchar et identifiée par Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de préservation de la nature, Béchar. Les spécimens de bons authentifiés (TA /107 /VAR / 06-15), (MV/102 /VAR /01-15) et (SM/VAR/ 04-17) ont été déposés à l'Herbier de l'Unité de Recherche (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri, Constantine1, Algérie.

### II.1.2. Extraction des huiles essentielles

Des parties aériennes séchées de *T. algeriensis* (186 g) de *M. vulgare* (130 g) et de *S. massaicus* (150g) ont été soumises à une distillation à la vapeur dans un appareil Kaiser Lang pendant trois heures. Les huiles essentielles obtenues (94, 50 et 271 mg, respectivement) ont été collectées et séchées sur du sulfate de sodium anhydre et conservées à 4 ° C jusqu'à l'analyse. Les rendements en huiles essentielles ont été calculés en fonction des matières végétales sèches de l'espèce.

### II.1.3. Identification et analyses chromatographiques des huiles essentielles

#### II.1.3.1. Identification et analyse des huiles essentielles de *T. algeriensis* et *M. vulgare*

##### ❖ Analyse GC-FID

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent (GC-FID) Modèle 6890, équipé d'une colonne capillaire de silice HP-5MSf usagée (5% - diphényl-95% - diméthylpolysiloxane, 25 mx 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm), programmé de 50 ° C (5 min) à 250 ° C à 3 ° / min et maintenu pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme étaient respectivement de 280 et 300 ° C. Les huiles essentielles ont été diluées dans de l'acétone (3,5%, v / v) et injectées en mode fractionné (1/60) de l'hélium a été utilisé comme gaz porteur (1,0 mL / min). Des solutions d'alcane standards (C8-C20) ont été analysées dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention (RI) avec l'équation de Van del Dool et Kratz (**Fadel et al., 2019** ).

### ❖ Analyse GC-MS

La spectrométrie de masse a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent-spectromètre de masse (GC-MS) modèle 7890/5975, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (25 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm) programmée avec les mêmes conditions que pour GC-FID. L'ionisation du spectromètre de masse (MS) a été réglée en mode d'impact d'électrons positifs à 70 eV et le multiplicateur d'électrons a été réglé à 2200 V. Les températures de la source d'ions et du quadripôle MS étaient de 230 ° C et 180 ° C, respectivement. Les données spectrales de masse ont été acquises en mode balayage dans la plage m / z 33-450. Les constituants des huiles essentielles ont été identifiés en faisant correspondre leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux des composés de référence des bibliothèques (Adamas, 1995 ; Mc Lafferty, 1991). Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

#### II.1.3.2. Identification et analyse de l'HE de *S.massaicus*

L'huile essentielle de *S.massaicus* a subi une analyse par GC/MS selon la même méthode que précédemment utilisée pour la phase éther de pétrole indiqué dans la première partie (chapitre II).

## II.2. Les activités biologiques d'HE de *S.massaicus*

### II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *S. massaicus* a été évaluée à l'aide de quatre méthodes différentes : DPPH, ABTS, CUPRAC et dosage du pouvoir réducteur. Le protocole utilisé pour la détermination de l'activité anti-radicalaire par les trois premières méthodes et le même utilisé pour les extraits de *Centaurea involucrata* mentionnées dans le chapitre des activités biologiques (chapitre IV, partie II).

#### II.2.1.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est basé principalement sur la capacité des anti-oxydants à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ferreux ( $Fe^{2+}$ ) suite à une donation d'électrons. En solution, cette forme réduite prend une couleur vert-bleue, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur (Blázovics *et al.*, 2003)

- **Protocole**

40  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 $\mu\text{l}$  de ferricyanure de potassium (1%) sont rajoutés à chaque puits, la plaque ainsi est incubée à 50° C pendant 20 min. Ensuite, 50 $\mu\text{L}$  de TCA (10%), 40 $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{L}$  de chlorure ferrique (0,1%) ont été ajoutés dans chaque puits afin de mesurer l'activité de la puissance réductrice. l'absorbance a été mesurée dans un lecteur de microplaques à 700 nm et les résultats ont été exprimés en  $A_{0,50}$  (Oyaizu *et al.*, 1986).

## II.2.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase

Les cholinestérases sont des enzymes qui permettent la transmission de l'influx nerveux au niveau central et périphérique. Leur réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation à la fin d'une transmission de l'influx nerveux. On distingue deux enzymes appartenant au groupe des cholinestérases, l'acétylcholinestérase (AChE) qui se présente dans les synapses et la pseudocholinestérase ou la butyrylcholinestérase (BChE) survenant dans le sérum sanguin (Wandhammer, 2012).

La fonction particulière des enzymes reste non découverte mais leur hyperactivité peut entraîner des dommages au niveau des cellules nerveuses (maladie d'Alzheimer) ce qui nécessite leur inhibition. La recherche sur les inhibiteurs naturels (anti cholinestérases) a commencé il y a longtemps. Dans ce contexte, nous avons effectué des tests *in vitro* sur la capacité d'HE d'inhiber les deux enzymes AChE et BChE.

- **Protocole**

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement). Le DTNB (Acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque) utilisé pour la mesure de l'activité anticholinestérase. Brièvement, 150  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium 100mM (pH 8,0), 10 $\mu\text{L}$  de solution d'échantillon dissous dans le méthanol à des concentrations variables et 20  $\mu\text{L}$  de solution d'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ou de BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés, après une incubation de 15 minutes à 25 ° C, 10  $\mu\text{L}$  d'acide DTNB [5,5'-dithio-bis (2- nitrobenzoïque) 0,5 mM] sont rajoutés. La réaction est ensuite initiée par addition de 10 $\mu\text{L}$  d'iodure d'acétylthiocholine (0,71mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2mM). L'absorbance est mesurée à une

longueur d'onde 412 nm, toutes les 5 minutes pendant 15 minutes. La galanthamine est utilisée comme composé de référence. Les résultats sont exprimés en concentration d'inhibition de 50% (IC<sub>50</sub>) et le pourcentage d'inhibition est mesuré en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{control}}] * 100$$

### II.2.3. L'étude de docking moléculaire

Le monde est actuellement confronté à la pandémie COVID-19 causée par le virus SARS-CoV-2 qui provoque un syndrome respiratoire aigu, plus de 2058227 personnes sont aujourd'hui décédées et environ 95321880 personnes infectées par ce virus dans le monde et le nombre continue d'augmenter. La réponse immunitaire et l'inflammation excessive du COVID-19 peuvent également accélérer la progression de la neurodégénérescence inflammatoire cérébrale, qui joue un rôle principal dans la maladie d'Alzheimer (Naughton *et al.*, 2020). Au cours de la propagation de cette pandémie, les chercheurs et les scientifiques du monde entier s'efforcent de découvrir de nouveaux vaccins ou des médicaments efficaces à partir de plantes et d'autres sources naturelles, où ils ont exploité des modèles d'amarrage moléculaire pour tester les bibliothèques chimiques de composés bioactifs.

Dans ce contexte nous avons étudié l'interaction d'amarrage moléculaire des composés volatils de l'huile essentielle de *S. massaicus* avec la protéase principale Covid-19 et l'endoribonucléase Nsp15 qui sont efficaces dans la réplication virale et l'infection dans la cellule, ainsi qu'avec les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer AChE et BChE. Cette étude est effectuée à l'aide du programme Molegro Virtual Docker 7 (Molegro, 2019).

Les structures cristallines de l'acétylcholinestérase (4EY7), de la butyrylcholinestérase (4BDS), de la protéase principale du virus COVID-19 (6LU7) et de l'endoribonucléase Nsp15 (6VWW) ont été téléchargées à partir du format pdb de la banque de données sur les protéines (<http://www.rcsb.org/pdb>). Les principaux sites de liaison ont été utilisés pour l'analyse d'ancrage. Les structures chimiques 3D des molécules sélectionnées et des molécules de référence ont été extraites du site PubChem avec leurs ID PubChem: 6654, 440968, 519324, 22311, 7460, 10812, 30874, 5363201, 11564, 5281515, 164888, 91354, 92139, 527087, 1742210, 10219606, 10364, 560684, 123921, 41440, 985, 985. Le nelfinavir a été utilisé comme contrôle positif pour les cibles virales et la galanthamine pour AChE et BChE.

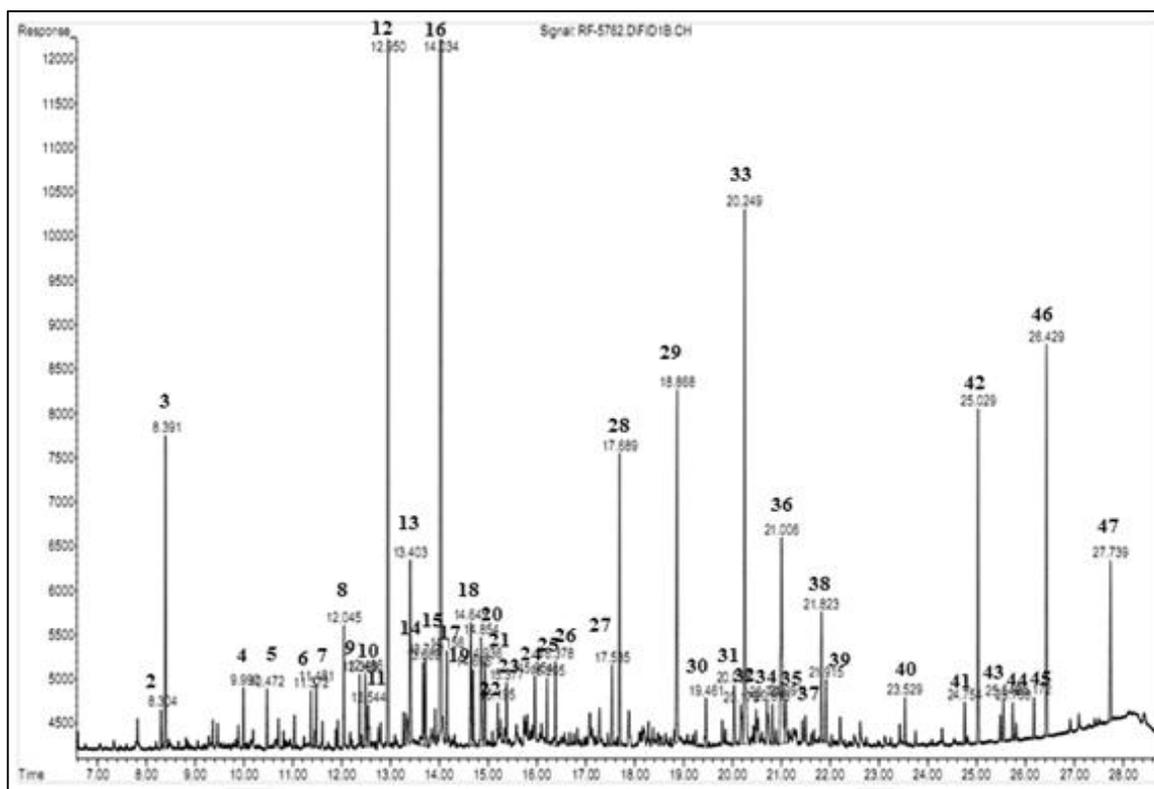
## II.3. Résultats et discussion

### II.3.1. Analyse comparative de la composition d'huile essentielle de *M. vulgare*

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de *M. Vulgare* a un rendement de 0,02% et a une couleur jaune pâle.

L'analyse de cette l'huile par GC-FID et la GC-MS a permis l'identification de 29 composés avec un pourcentage de 81,3% dominée par les sesquiterpènes (53,8%) dont les sesquiterpènes hydrogénés constituent le groupe le plus abondant (50,0%). Les principaux constituants étaient respectivement le  $\beta$ -bisabolène (36,3%), le  $\beta$ -caryophyllène (7,8%), le phytol (6,2%), le nonacosane (4,0%), l'heptacosane (3,3%), le nonanal (2,8%), 6, 10,14 -triméthyl-2 pentadécane (2,6%) et  $\alpha$ -humulène (2,0%).

Les résultats d'analyse sont consignés dans le tableau II.1, et le profile chromatographique est illustré dans la figure II.1.



**Figure II.1** : Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de *M. Vulgare*

**Tableau II.1** : Composition chimique de l'huile essentielle de *M. Vulgare*

N°	composant	TR	IR	%
1	NI	4,68	910	0,5
2	Linalool	8,30	1101	0,3
3	Nonanal	8,39	1106	2,8
4	Decanal	9,99	1208	0,5
5	Pulégone	10,47	1241	0,5
6	Undécanal	11,37	1304	0,4
7	NI	11,48	1312	0,6
8	Eugénol	12,05	1354	1,0
9	$\alpha$ -copaène	12,37	1379	0,6
10	$\beta$ -bourbonène	12,49	1387	0,9
11	$\beta$ -élémyène	12,54	1392	0,6
12	$\beta$ -aryophyllène	12,95	1424	7,8
13	$\alpha$ -humulène	13,40	1460	2,0
14	germacrène-D	13,67	1481	0,9
15	E-béta-ionone	13,72	1485	1,0
16	$\beta$ -bisabolène	14,03	1511	36,3
17	$\gamma$ -cadinène	14,16	1521	0,8
18	E-nérolidol	14,65	1563	1,3
19	NI	14,69	1567	0,7
20	3,5,7-triméthyl-2E.4E.6E.8E-undécatétraène	14,85	1580	1,6
21	Oxyde de caryophyllène	14,94	1587	0,9
22	NI	15,19	1610	0,3
23	mégastigma-5.7 E .9-triène-4-one	15,38	1626	0,5
24	1-heptadécène	15,95	1678	0,6
25	Heptadécane	16,21	1700	0,6
26	Pentadécanal	16,38	1716	0,9
	1-octadécène	17,08	1782	tr
27	NI	17,54	1827	0,8
28	6,10,14-triméthyl-pentadécane-2-one	17,69	1842	2,6
29	NI	18,87	1961	4,0
30	NI	19,46	2021	0,5
31	NI	20,04	2077	0,6
32	NI	20,18	2091	0,7
33	Phytol	20,25	2098	6,2
34	NI	20,71	2155	0,1
35	NI	20,82	2169	0,4
36	NI	21,01	2192	3,9
37	NI	21,09	2203	0,7
38	NI	21,82	2288	1,4
39	NI	21,92	2299	0,8
40	Pentacosane	23,53	2499	0,4

**Tableau II.1** : Composition chimique de l'huile essentielle de *M. Vulgare*  
(suite)

41	NI	24,75	2662	0,4
42	Heptacosane	25,03	2700	3,3
43	NI	25,55	2772	0,4
44	Octacosane	25,74	2799	0,4
45	NI	26,17	2863	0,4
46	Nonacosane	26,43	2901	4,0
47	Uncontane	27,74	3101	1,6
Total				98,5
Total des composés identifiés				81,3
Total des composés non identifiés				17,2
sesquiterpènes hydrogénés				50,0
sesquiterpènes oxygénés				3,8
monoterpènes oxygénés				1,8
Hydrocarbures				12,5
autres				13,9

Les résultats obtenus sont en accord avec certaines études précédemment mentionnées au chapitre précédent. où le composé  $\beta$ -bisabolène apparaît comme le composant principal mais avec des rendements différents (**Morteza-Semnani et al., 2004 ; Khanavi et al., 2005; Belhattab et al., 2006 ; Hamdaoui et al., 2013 ; Elbali et al., 2018** ). En revanche, on note de nombreuses différences quantitatives et qualitatives dans d'autres travaux. En effet, l'huile essentielle de cette espèce provenant de deux échantillons algériennes de la région de Tbessa (**Abadi et Hassani, 2013**) et medea (**Reazi et al., 2017**) sont dominée par la présence de 4,8,12,16-tetraméthyl heptadecan-4-olide (17.0%) et l'eugénol (21.5%), respectivement.

L'étude de HE de la même espèce de la Lituanie, a montré que le (Z)-  $\beta$ -farnesène et le  $\beta$ -caryophyllène sont ses principaux constituants (**Weel et al., 1999**), alors que celle étudiée en République Slovaque, renferme le  $\beta$ -caryophyllène (45,8%) et le germacrène D (14,4%) (**Nagy et Svajdlenka, 1998**). Tandis que les principaux composés de différentes régions de l'Egypt sont carvacrol (36.3%) et  $\beta$ -phellandrène (15.5%) (**Said-Al-Ahl et al., 2015**) et le thymol (34.5%) et  $\gamma$ -cadinene (17.7%) (**Salama et al., 2012**).

Il est aussi très intéressant de noter la présence dans notre H.E analysée, quelques composés undécanal, E- $\beta$ -ionone, 3,5,7-triméthyl-2E, 4E, 6E, 8E-undécatétraène, megastigma-5,7 (E), 9-trién-4-one, 1-heptadécène, pentadécanal, 6,10,14-triméthyl-2-pentadécanone, l'octacosane, le nonacosane et uncontane qui ont été identifiés pour la première fois dans la composition chimique de l'huile essentielle de *M. vulgare*.

### **II.3.2. Analyse comparative de la composition d'huile essentielle de *T. algeriensis***

L'huile essentielle obtenue de la partie aérienne de *T. algeriensis* est de couleur jaune et dégage une odeur forte, le rendement obtenu de l'huile a été de 0,05 % par rapport à la matière végétale.

L'analyse de cette huile a permis l'identification de 35 constituants correspondants à 94,8 % de l'huile totale. Parmi ces derniers, les sesquiterpènes représentent 81,0% dont les sesquiterpènes hydrogénés constituent le groupe le plus abondant (67,0%) suivis des sesquiterpènes oxygénés (14,0%). Alors que les monoterpènes oxygénés représentent (7,7%), tandis que les monoterpènes non oxygénés sont présents seulement avec un taux de (3,2%).

Les principaux composants de cette huile sont le germacrène D (29,6%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,0%), le E- $\beta$ -farnésène (7,8%), le  $\beta$ -eudesmol (5,3%), le bicyclogermacrène (4,4%), le  $\delta$ -cadinène (4,0% ),  $\alpha$ -humulène (3,5%),  $\alpha$ -bulnésène (2,4%), E-nérolidol (2,4%),  $\alpha$ -guaiène (2,3%), phytol (2,3%), spathulénol (2,2%) et verbénol (2,0% ).

Le profil chimique général de l'huile essentielle est représenté dans la figure II.2, la teneur en pourcentage et les indices de rétention des constituants sont résumés dans le tableau II.2.

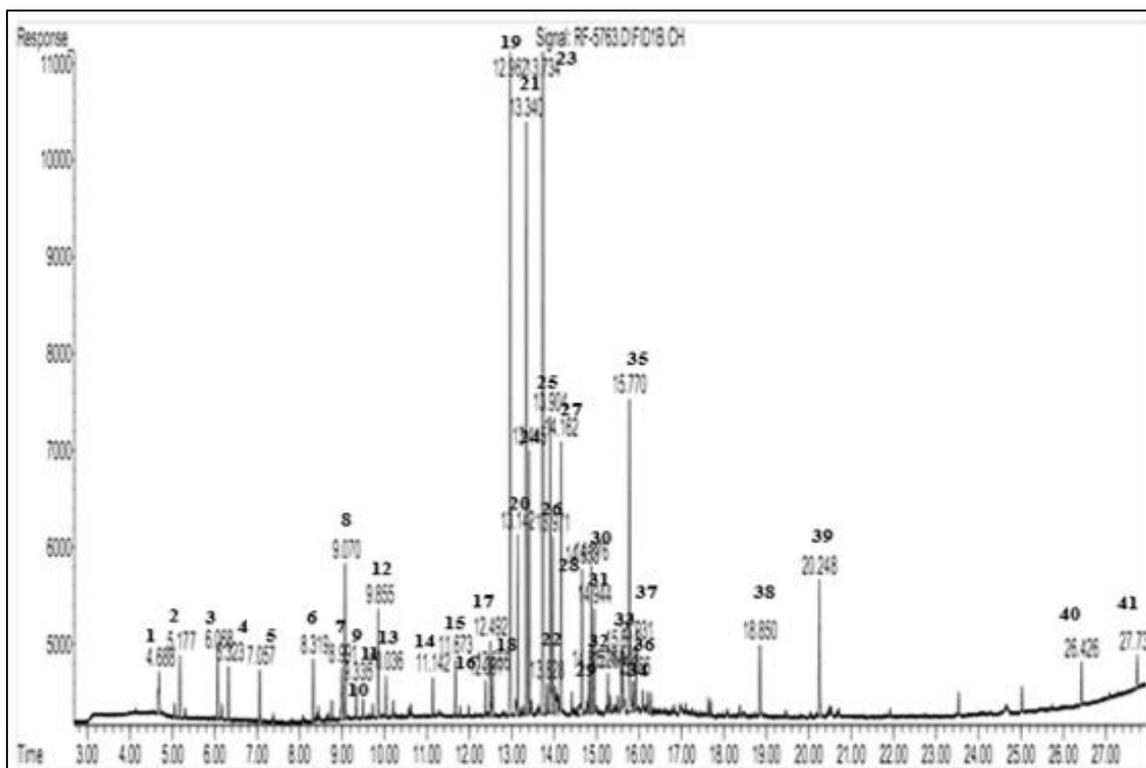


Figure II.2. Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. algeriensis*

Tableau II.2. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. algeriensis*

N°	composant	TR	IR	%
1	NI	4,69	910	0,9
2	$\alpha$ -pinène	5,18	934	0,9
3	$\beta$ - pinène	6,07	978	0,9
4	Myrcène	6,32	991	0,7
5	Limonène	7,06	1031	0,7
6	Linalool	8,32	1102	0,8
7	Trans pinocarvéol	8,99	1144	1,0
8	Trans verbénol	9,07	1149	2,0
9	Pinocarvone	9,34	1166	0,4
10	Bornéol	9,49	1176	tr
11	Alpha terpinéol	9,73	1191	tr
12	Myrténol	9,86	1199	1,7
13	Verbénone	10,04	1211	0,6
14	Acétate de bornyle	11,14	1288	0,5
15	Acétate de myrtényle	11,67	1326	0,7
16	Alpha copaène	12,38	1379	0,4
17	$\beta$ -copaène	12,49	1388	1,0
18	$\beta$ - élémène	12,56	1393	0,6
19	$\beta$ -caryophyllène	12,96	1424	11,0

**Tableau II.2.** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. algeriensis* (suite)

N°	composant	TR	IR	%
20	$\alpha$ -guaïène	13,14	1439	2,3
21	E- $\beta$ -farnésène	13,34	1455	7,8
22	$\alpha$ -humulène	13,42	1461	3,5
23	germacrène-D	13,73	1486	29,6
24	NI	13,83	1494	0,4
25	Bicyclogermacrène	13,90	1500	4,4
26	$\alpha$ -bulnésène	13,97	1505	2,4
27	$\gamma$ -cadinène	14,16	1522	4,0
28	E-nérolidol	14,65	1563	2,4
29	germacrène-D-4-ol	14,82	1577	0,5
30	Spathuléol	14,88	1582	2,2
31	oxyde de caryophyllène	14,94	1588	1,6
32	humulène-époxyde II	15,27	1616	0,6
33	NI	15,59	1645	0,4
34	Epi $\alpha$ -cadinol	15,61	1647	0,9
35	$\beta$ -eudesmol	15,77	1661	5,3
36	$\alpha$ -eudesmol	15,86	1670	0,5
37	NI	15,93	1676	0,9
38	NI	18,85	1959	1,0
39	Phytol	20,25	2098	2,3
40	Nonacosane	26,43	2900	0,6
41	NI	27,74	3101	0,5
Total				98,9
Total des composés identifiés				94,8
Total des composés non identifiés				04,1
sesquiterpènes hydrogénés				67,0
sesquiterpènes oxygénés				14,0
monoterpènes oxygénés				07,7
monoterpènes hydrogénés				03,2
Les autres				02,9

D'après les résultats obtenus auparavant sur les huiles essentielles de cette espèce qui ont été mentionnés au chapitre précédant, nous avons constaté une grande diversité en ce qui concerne les composés majoritaires (plusieurs chémo-types bien distincts).

En effet, notre huile est caractérisée pour la première fois par la présence de germacrène D (29,6%) et le  $\beta$ -caryophyllène (11,0%) comme des produits majoritaires. Tandis que les composés majoritaires provenant des échantillons algériens de différentes régions étaient linalol

(Houmani *et al.*, 2002 ; Dob *et al.*, 2006), l'acétate de géranyle (16,4%) (Hazzit *et al.*, 2009), l' $\alpha$ -pinène (25,5%) (Giordiani *et al.*, 2008), le carvacrol (43,2-48,4%) et le p-cymène (14,7-18,7%) (Bendjabeur *et al.*, 2018 ; Kouache *et al.*, 2017) et l'acétate  $\alpha$ - terpinényle (27,3%) (Benabed *et al.*, 2017). Alors que la même espèce étudiée en Tunisie révèle une composition différente à celle signalé en Algérie avec une dominance de 1,8-cinéole (7,55 à 22,07%) (Zouari *et al.*, 2011). Cependant les huiles essentielles de cette espèce récoltée au Maroc sont riches en Camphre (27,7%) (Amarti *et al.*, 2010) et le borneol (23,5) (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011).

### II.3.3. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *S.massaicus*

L'huile essentielle de *Senecio massaicus* a une couleur jaune, odeur forte et un rendement de 0,18% déterminé par rapport à la matière sèche.

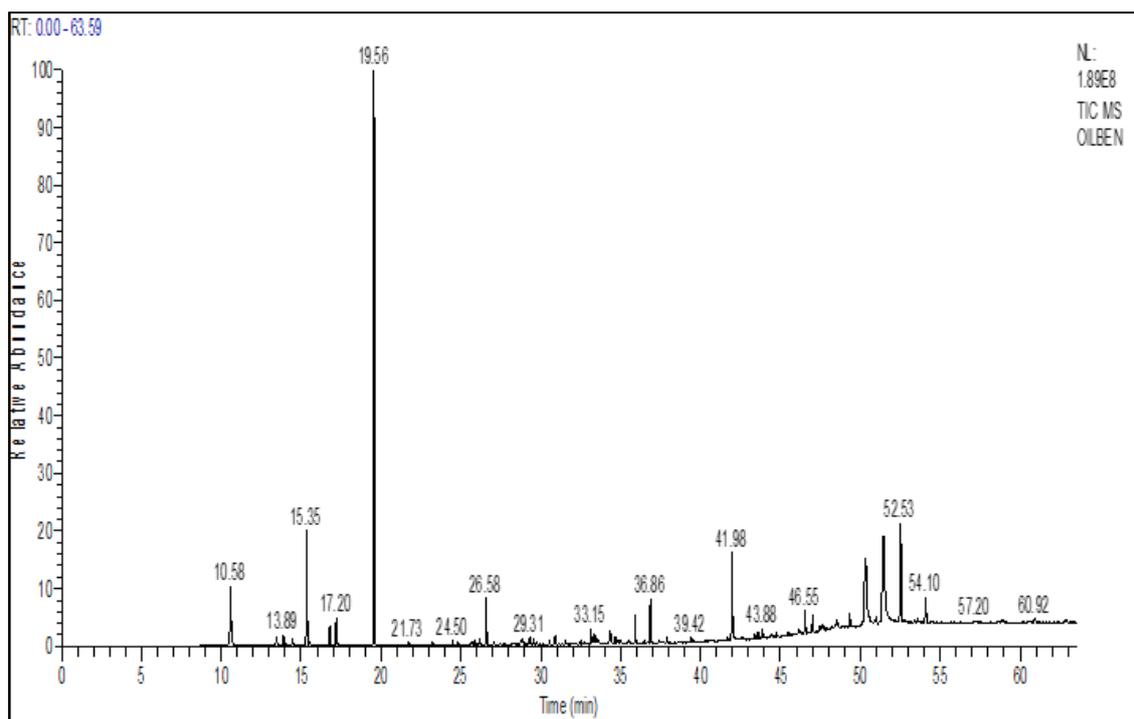
L'analyse chimique de HE de *S. massaicus* a permis l'identification de 22 composés qui correspondent à un pourcentage de 97.41% du total de l'huile (tableau II.3, figure II.3). Cette huile était caractérisée par la domination des monoterpènes (51,71%) dont les hydrocarbures monoterpènes étaient les plus présents (45,29%).

Les composés majoritaires de cette huile sont *m*-cymene (30,58%), acide *n*-hexadécanoïque (14,88%), docosane-11-décyl (10,43%),  $\alpha$ -myrcéne (6,56%), 1-indanone-2-isobutenyl-3-methoxy (6,04%),  $\alpha$ -pinene (4,82%) et l'oxyde de caryophyllène (4,80%).

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. Il est à signaler également que les principaux constituants de notre échantillon (*m*-cymene, docosane-11-décyl et 1-indanone-2-isobutenyl-3-methoxy) semblent être spécifiques à l'espèce algérienne et sont décrites pour la première fois dans le genre *Senecio*.

**Tableau II.3 :** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de  
*S.massaicus*

N°	Nom du composé	TR	%
1	$\alpha$ -pinène	10,58	4,82
2	$\alpha$ -pinène isomer	13,46	0,53
3	$\alpha$ -myrcène	15,35	6,56
4	DL-Limonène	16,80	1,1
5	$\alpha$ - phellandrène	17,20	1,70
6	<i>m</i> - cymène	19,56	30,58
7	1,12-Tridecadiene	26,16	0,91
8	Non-3-enyl acétate	26,58	2,02
9	Cyclohexène-1,3-diméthyl	29,31	1,41
10	Trans- caryophyllène	30,94	0,78
11	Cis- verbénol	33,15	2,34
12	Aromadendrène	34,32	1,16
13	$\alpha$ -curcumène	35,92	1,23
14	Epoxyde d'alpha-phellandrène	36,87	2,28
15	Oxyde de caryophyllène	41,98	4,80
16	Pinanediol	46,55	1,03
17	Carvacrol	47,02	0,77
18	15,15'-Bi (1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadécane)	47,60	0,75
19	Ether monododécylique d'octaéthylèneglycol	48,55	1,29
20	Docosane-11-décyl	50,34	10,43
21	acide <i>n</i> -hexadécanoïque	51,46	14,88
22	1-Indanone-2-isobutenyl-3-methoxy	52,53	6,04
Total			97,41
Monoterpène hydrogénés			45,29
Monoterpène oxygéné			6,42
sesquiterpene hydrogénés			3,17
sesquiterpene oxygéné			4,80
Hydrocarbures			12,75
Autres			24,98



**Figure II.3 :** Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de *S. massaicus*

#### **II.3.4. Activité antioxydante de l'huile essentielle de *S. massaicus***

Les résultats des tests DPPH, CUPRAC, ABTS et le pouvoir réducteur présentés dans le (tableau II.4) montrent que l'huile essentielle possède une activité modéré avec tous les tests utilisés par rapport aux standards : ABTS ( $IC_{50} = 88,78 \pm 0,28 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), le pouvoir réducteur ( $A_{0,50} = 93,05 \pm 2,96 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) et le test CUPRAC ( $A_{0,50} = 116,54 \pm 1,33 \mu\text{g} / \text{mL}$ ).

Pour la méthode DPPH, l'huile essentielle n'avait pas d'activité radicalaire où le taux d'inhibition ne dépassait pas 37% à la concentration élevée testée (200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Cela pourrait s'expliquer par l'absence ou la faible concentration de composés ayant des groupes phénol car quand la concentration de ces composés phénoliques ou leur degré d'hydroxylation augmente, leur activité de piégeage des radicaux DPPH augmente également.

**Tableau II.4 :** Les valeurs IC<sub>50</sub> et A<sub>0.50</sub> de l'activité antioxydant d'HE de *S. massaicus*

Echantillon	Test DPPH (IC <sub>50</sub> µg/mL)	Test ABTS (IC <sub>50</sub> µg/mL)	Test CUPRAC (A <sub>0.50</sub> µg/mL)	Test pouvoir réducteur (A <sub>0.50</sub> µg/mL)
HE	> 200	88,78±0,28	116,54±1,33	93,05±2,96
BHT	22,32±1,19	1,29±0,30	9,62±0,87	NT
BHA	5,73±0,41	1,81±0,10	3,64±0,19	8,41±0,67
Ascorbic acid	NT	NT	NT	9,01±1.46

NT : n'est pas testé

### II.3.5. L'activité anticholinestérase

Le tableau II.5 révèle les résultats de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase de l'huile essentielle de *S. massaicus*, comparé à la galanthamine. L'huile essentielle a présenté une activité anticholinestérase puissante proche de celle de la galanthamine contre l'enzyme AChE (IC<sub>50</sub> = 10,34 ± 0,34 µg / mL). En revanche, dans l'essai BChE, l'huile essentielle avait une activité plus élevée que le standard avec (IC<sub>50</sub> = 13,85 ± 0,10 µg / mL). Selon ces résultats, notre huile pourrait être utilisée comme un agent anticholinestérase.

**Tableau II.5 :** les valeurs IC<sub>50</sub> de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase de l'huile essentielle de *S. massaicus*

Échantillon	BChE (IC <sub>50</sub> µg/mL)	AChE (IC <sub>50</sub> µg/mL)
HE	13,85±0,10	10,34±0,34
Galanthamine	34,75±1,99	6,27±1,15

### II.3.6. L'études d'amarrage du COVID-19 et de l'anticholinestérase

La simulation d'amarrage moléculaire a été réalisée à l'aide du programme MVD pour trouver les types d'interactions et l'affinité de liaison des composants volatils de l'huile essentielle dans le site actif de l'acétylcholinestérase (4EY7), butyrylcholinestérase (4BDS), protéase principale du virus COVID-19 (6LU7) et endoribonucléase Nsp15 (6VWW).

Les résultats obtenus (tableaux II.6 et II.7) montrent que l'interaction protéine-ligand exprime la somme des effets stériques et des interactions de liaison hydrogène entre la protéine et les

molécules. L'interaction interne indique des effets stériques et de torsion dans la petite molécule. Le score MolDock est l'agrégation de ces deux valeurs.

En examinant les tableaux d'amarrage II.6 et II.7 et les figures II.4 à II.7 nous pouvons affirmer que le docosane-11-décyl, octaéthylène glycol monododécyl éther, le 15,15'-Bi 1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadécane et l'acide *n*-hexadécanoïque parmi les molécules testées ont montré des activités élevées contre toutes les cibles. Les résultats *in silico* montrent que ces composés jouent un rôle important dans les activités des huiles essentielles.

Une comparaison de ces résultats avec la galantamine (tableau II.6), a montré que les deux composés 15, 15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane et l'acide *n*-hexadécanoïque ont à peu près le même effet que le contrôle contre les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer. Alors que les composés docosane-11-décyl et octaéthylène glycol monododécyl éther ont l'affinité de liaison plus élevée que celle de la galantamine et se lie efficacement à l'AChE et au BChE en tant qu'inhibiteurs puissants (figure II.8).

Par conséquent, ces deux composés peuvent être considérés comme des molécules candidates ou lead à utiliser dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Pour les études virologiques *in silico*, nous avons comparé nos résultats avec le nelfinavir car des études récentes ont révélé que ce médicament pouvait être utilisé pour traiter le COVID-19 (Xu *et al.*, 2020).

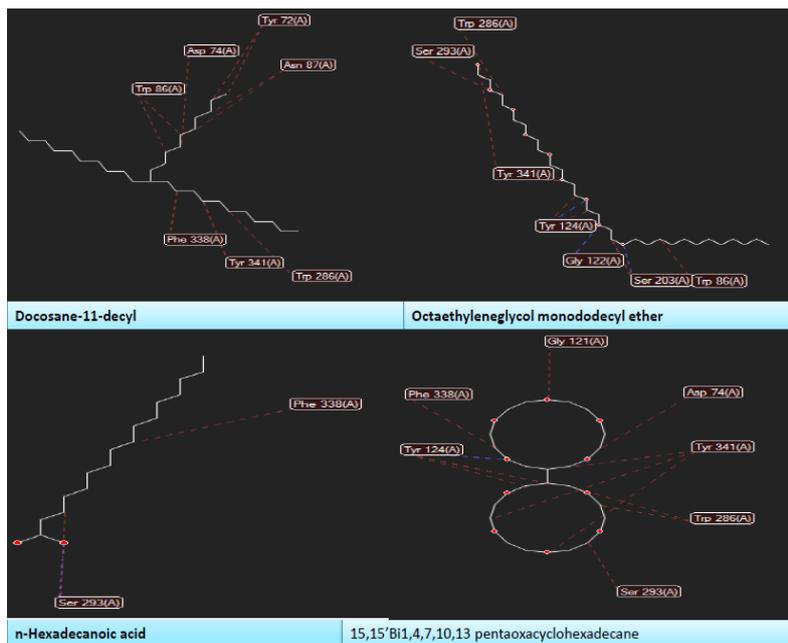
Le tableau II.7 montre que le docosane-11-décyl et octaéthylène glycol monododécyl éther ont des valeurs d'énergie de liaison proches de celles du médicament et présentent une forte interaction moléculaire avec les deux cibles virales (figure II.9).

**Tableau II.6** : Résultats de docking des composés d'huile essentielle sur la structure cristalline de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase

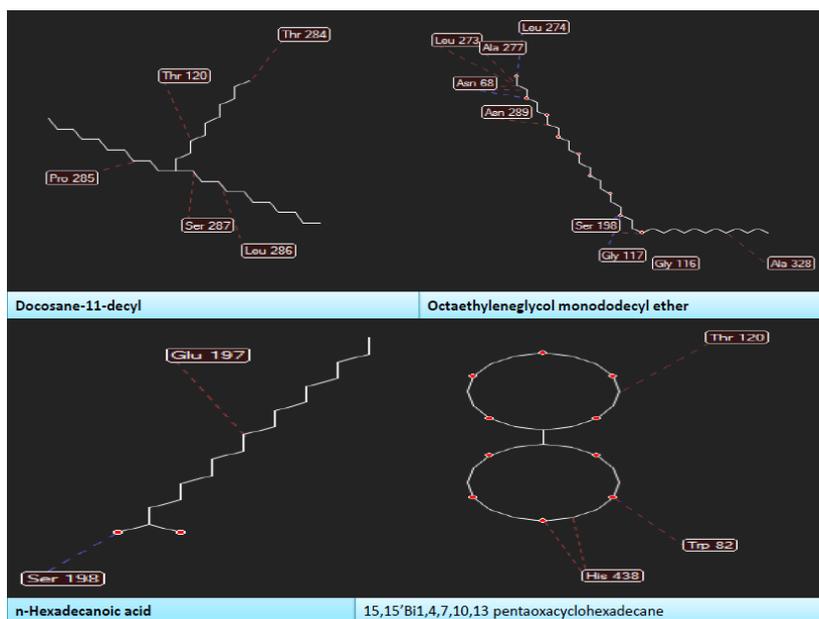
Nom du composé	Acétylcholinestérase			Butyrylcholinestérase		
	MolDock Score	Protein-ligand Interaction	Internal	MolDock Score	Protein-ligand Interaction	Internal
Docosane-11-décyl	-186,02	-213,23	27,21	-151,75	-155,16	3,41
octaéthylèneglycol monododécyl éther	-171,48	-194,17	22,69	-159,98	-205,81	45,83
15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane	-136,22	-132,93	-2,41	-133,29	-130,74	-2,55
acide <i>n</i> -hexadécanoïque	-128,25	-132,22	3,97	-114,36	-113,24	1,29
Galanthamine	-131,23	-136,23	4,99	-103,73	-108,67	4,94
1-Indanone-2-isobutenyl-3-methoxy	-114,77	-108,42	-6,35	-100,36	-93,71	-6,65
Non-3-enyl acetate	-106,08	-107,62	1,53	-99,78	-101,14	1,36
Oxyde de caryophyllène	-108,27	-102,87	-5,40	-95,28	-89,88	-5,40
1,12-Tridecadiène	-108,06	-106,46	-1,61	-93,67	-95,55	1,87
$\alpha$ -curcumène	-109,41	-112,92	3,51	-92,17	-101,39	9,23
Trans-caryophyllène	-93,54	-92,32	-1,23	-88,09	-86,86	-1,23
Aromadendrene	-103,28	-100,34	-2,95	-87,86	-84,91	-2,95
Alpha-Myrcène	-77,53	-77,73	0,19	-71,81	-72,77	0,97
Epoxyde $\alpha$ -phellandrène	-72,03	-82,07	10,04	-71,41	-77,33	5,93
Carvacrol	-77,55	-85,08	7,53	-69,86	-77,62	7,76
<i>m</i> -Cymène	-68,09	-74,54	6,44	-64,34	-70,42	6,08
dl-limonène	-71,64	-77,25	5,61	-63,79	-69,12	5,32
$\alpha$ -phellandrène	-70,19	-77,59	7,39	-63,41	-71,37	7,96
Pinanediol	-59,80	-83,95	24,15	-57,52	-81,66	24,14
Cis- verbénol	-56,49	-73,17	16,68	-56,74	-73,41	16,68
$\alpha$ -pinène isomer	-56,58	-72,34	15,76	-55,63	-71,39	15,76
$\alpha$ -pinène	-56,58	-72,34	15,76	-55,63	-71,38	15,76
Cyclohexène-1,3-diméthyl	-55,91	-61,34	5,44	-54,86	-60,29	5,44

**Tableau V.7 :** Résultats de docking des composés d'huile essentielle sur la structure cristalline de la protéase principale Covid-19 et de l'endoribonucléase Nsp15

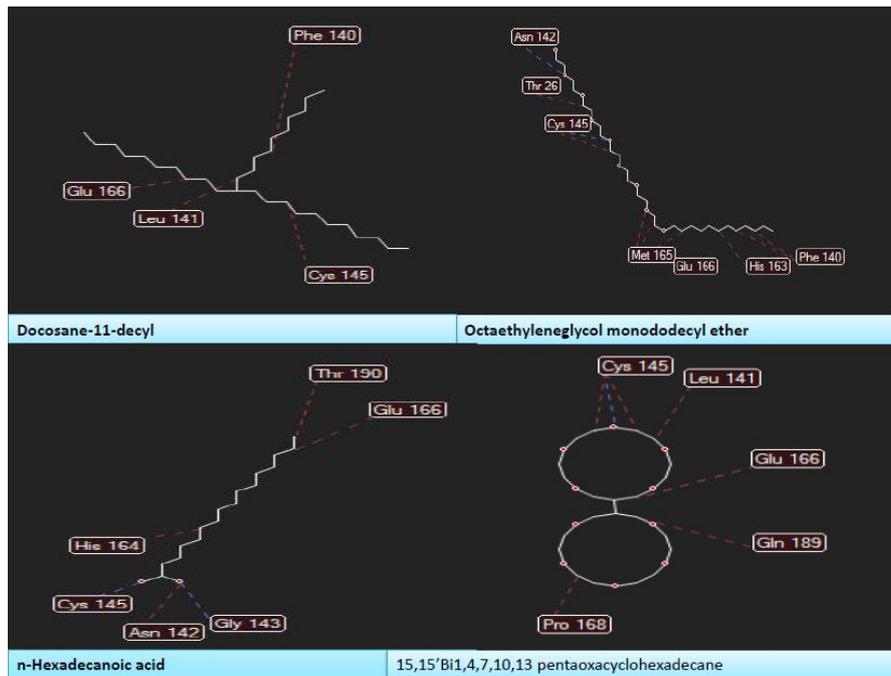
Nom du composé	Nsp15 endoribonucléase			M <sup>pro</sup> COVID-19		
	MolDock Score	Interaction	Internal	MolDock Score	Interaction	Internal
Nélfinavir	-149,41	-171,69	22,28	-148,41	-176,92	28,50
Docosane-11-décyl	-140,90	-155,93	15,03	-139,76	-156,79	17,03
octaéthylèneglycol monododécyl éther	-124,92	-179,68	54,76	-134,47	-166,12	31,63
acide <i>n</i> -hexadécanoïque	-111,22	-113,84	2,62	-117,81	-121,92	4,11
15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadécane	-115,56	-113,02	-2,55	-110,04	-107,49	-2,55
1-Indanone-2-isobutenyl-3- methoxy	-100,07	-93,03	-7,04	-103,66	-98,08	-5,58
$\alpha$ -curcumène	-95,78	-101,75	5,97	-99,86	-103,88	4,01
Non-3-enyl acétate	-89,05	-89,22	0,16	-97,21	-99,45	2,24
1,12-Tridecadiene	-90,83	-87,59	-3,24	-96,48	-93,76	-2,72
Oxyde de caryophyllène	-97,59	-92,19	-5,40	-91,84	-86,44	-5,4
Aromadendrène	-90,17	-87,21	-2,95	-89,99	-87,04	-2,95
Trans-caryophyllène	-91,24	-90,01	-1,23	-81,82	-80,59	-1,23
$\alpha$ -Myrcène	-75,07	-75,86	0,79	-80,96	-80,87	-0,09
Epoxyde $\alpha$ -phellandrene	-73,47	-79,37	5,89	-72,61	-78,68	6,07
<i>m</i> -Cymène	-67,38	-73,52	6,14	-72,59	-79,07	6,47
Carvacrol	-70,62	-78,03	7,41	-71,62	-79,17	7,54
dl-limonène	-66,71	-72,23	5,52	-67,30	-72,62	5,32
$\alpha$ -phellandrène	-66,18	-74,44	8,26	-65,34	-72,70	7,36
Cis-verbenol	-62,83	-79,51	16,68	-63,11	-79,78	16,68
Cyclohexene-1,3diméthyl	-59,64	-65,07	5,44	-61,50	-66,94	5,44
$\alpha$ - pinène	-57,06	-72,82	15,76	-60,35	-76,10	15,76
$\alpha$ - pinène isomer	-57,06	-72,82	15,76	-60,34	-76,10	15,76
Pinanediol	-60,13	-84,28	24,15	-56,01	-80,16	24,15



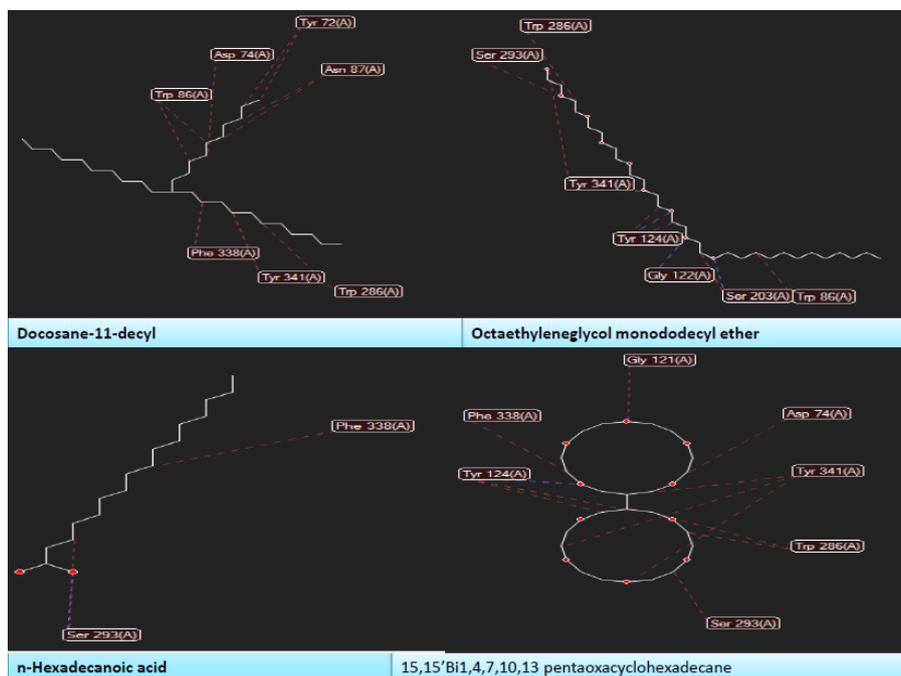
**Figure II.4 :** Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide *n*-hexadécanoïque et 15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadecane avec les résidus d'acides aminés du AChE



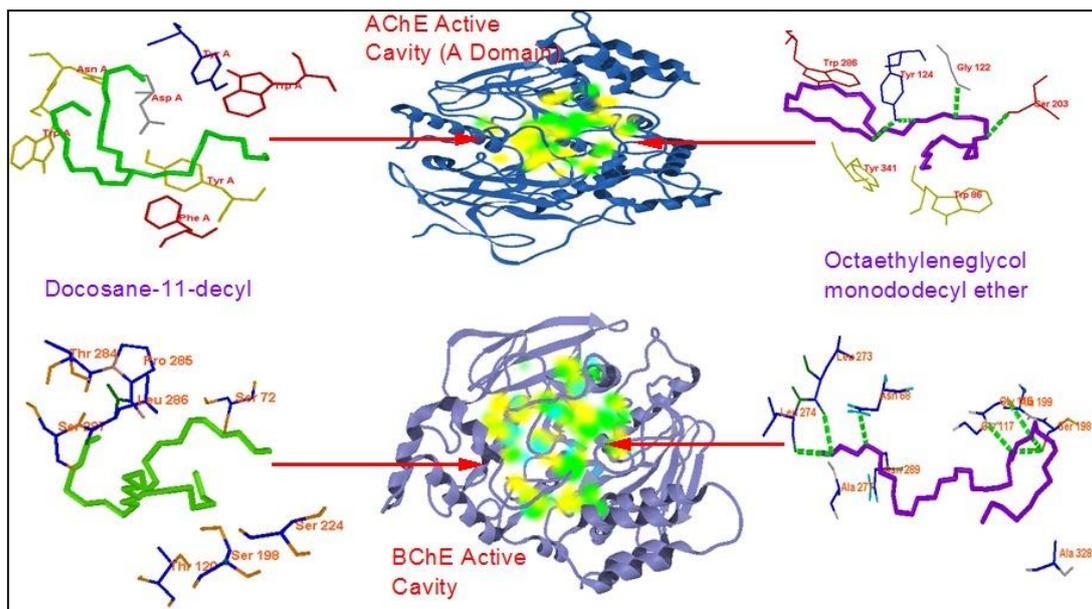
**Figure II.5 :** Interaction du docosane-11-décyl octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide *n*-hexadécanoïque et 15,15'Bi1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadecane avec les résidus d'acides aminés du BChE



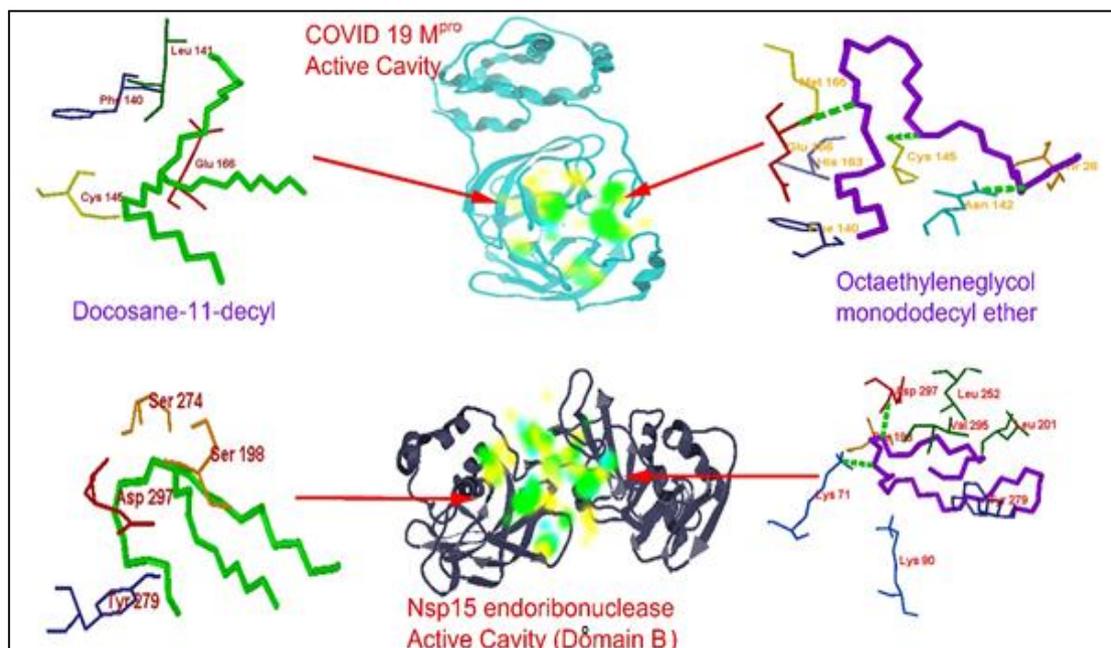
**Figure II.6 :** Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide *n*-hexadécanoïque et 15,15'Bi(1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadecane avec les résidus d'acides aminés du M<sup>PRO</sup> Covid-19.



**Figure II.7 :** Interaction du docosane-11-décyl, octaéthylèneglycol monododécyl éther, l'acide *n*-hexadécanoïque et 15,15'Bi(1,4,7,10,13 pentaoxacyclohexadecane avec les résidus d'acides aminés du Nsp15 endoribonuclease.



**Figure II.8 :** Animation 3D des interactions d'octaéthylèneglycol monododécyl éther et docosane-11-décy avec les résidus d'acides aminés du AChE et BChE.



**Figure II.9:** Animation 3D des interactions d'octaéthylèneglycol monododécyl éther et Docosane-11-décy avec les résidus d'acides aminés du Covid-19 M<sup>pro</sup> et Nsp15 endoribonuclease

## Conclusion

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. algeriensis*, *M. vulgare* et *S. massaicus* par GC-MS, a montré que les constituants majoritaires sont : germacrène D (29,6%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,0%) pour *T. algeriensis*,  $\beta$ -bisabolène (36,3%) pour *M. vulgare* et *m*-cymène (30,5%), *n*-hexadecanoic acid (14,8%), docosane-11-decyl (10,43) pour *S. massaicus*.

L'huile essentielle de *S. massaicus* possède une activité antioxydante modérée, en revanche a un pouvoir d'inhibition plus élevée contre la butyrylcholinestérase (BChE) par rapport à l'acétylcholinestérase (AChE). L'étude docking moléculaire montre que les composés docosane-11-décyl et octaéthylèneglycol monododécyl éther ont présenté une forte interaction contre les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer et contre la protéase principale Covid-19 et l'endoribonucléase Nsp15.

Par conséquent, ils pourraient être utilisés comme un bon agent anticholinestérase et des médicaments candidats anti coronavirus.

## Références bibliographiques

- Abadi, A., Hassani, A. 2013. Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Eastern Algeria, *ILCPA*, 14, 17-24.
- Achoub, H., Zaiter, L., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S. 2019. Chemical Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Thymus ciliatus* (Desf.). *Acta Sci Nat.* 6:62–70.
- Adams, R.P.1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Co, Carol Stream; Illinois.
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco, *J Sci Food Agric.* 91(14): 2643-2651.
- Al-Asmari, A., Athar, M., Al-Faraidy, A. and Almuhaiza, M. 2017. Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 7, 147-150.
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El-Ajjouri, M., Chaouch, A.2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc, *Biotechnol Agron Soc Environ.*14(1), 141-148.
- Andreani, S., Paolini, J., Costa, J., Muselli, A. 2015. Essential-oil composition and chemical variability of *Senecio vulgaris* L. from Corsica. *Chem Biodivers.* 12 (5):752-66.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V. 2003. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem*, 51, 7115-21.
- Anonyme.2004. Encyclopedie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin de A à Z. Larousse ed. française Patrick Mioulane P653.
- Aouadhi, S. 2010. Mémoire atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes.
- Arrabal, C., Garcia, F.M., Arraiza, M.P., Garcia, S.G. 2011. Chemical composition of essential oil of *Senecio coinnyi* an endemic species of the central Iberian peninsula. *Nat Prod Commun.* 6: 123-126.
- Avci, A.B. 2011. Chemical variation on the essential oil of *Thymus praecox* ssp. *scorpillii* var. *laniger*. *Int. J. Agric. Biol.* 13 : 607-610.
- Baher Nik, Z., Mirza, M. 2003. Composition of the essential oil of *Marrubium astracanicum* Jacq. *J Essent Oil Res.* 15: 342 – 343.
- Baher Nik, Z., Mirza, M., Shahmir, F. 2004. Essential oil of *Marrubium cuneatum* Russell and its secretory elements. *Flav Frag J.* 19: 233 – 235.
- Bayir, B., Gündüz, H., Usta, T., Şahin, E., Özdemir, Z., Kayır, Ö., Sen, Ö., Akşit, H., Elmastaş, M., Erenler, R. 2014. Chemical Composition of Essential Oil from *Marrubium Vulgare* L. Leaves. *J New Res Sci.* 3 (6), 44-50

- Belaunde, A.J., Sandoval, J.G., De Martino, L., Senatore, F., De Feo, V.** 2007. Chemical composition of essential oils of *Senecio nutans* Sch. Bip. (Asteraceae), *J Essent Oil-Bear Plant.* 10, 332-338.
- Belhattab, R., Larous, L., Figueiri, A., Pedro, A.** 2006. Essential oil composition and glandular trichoma of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria, *J Essent Oil Res*, 18, 369-373.
- Beloued, A.** 2005. *Plantes médicinales d'Algérie*. Ed. Office Des Publications Universitaires, Alger. 284 P.
- Benabed, K.H., Gourine, N., Ouinten, M., Bombarda, I., Yousfi, M.** 2017. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of three Algerian Lamiaceae species, *J Food Sci*, 13(2), 97-109.
- Benayache, F., Chalard, P., Figueredo, G., Benayache, F., Benayache, S.** 2014. Chemical composition of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret. *Pharm Lett* .6:182-185.
- Bendjabeur, S., Benchabane, O., Bensouici, C., Hazzit, M., Baaliouamer, A. Bitam, A.** 2018. Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria, *J Food Meas Charact.* 12(4), 2278-2288.
- Blázovics, A., Lugasi, A., Szentmihályi, K., Kéry, Á.** 2003. Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. *Acta Biol Szegediensis* 47 4: 99-102
- Bowles, E., J.** 2004. *The chemistry of aromatherapeutic oils*. 3rd Ed. Crows Nest, NSW: Allen & Unwin Academic.
- Capatina, L., Todirascu-Ciornea, E., Napoli, E.M., Ruberto, G., Hritcu, L., Dumitru, G.** 2020. *Thymus vulgaris* essential oil protects zebrafish against cognitive dysfunction by regulating cholinergic and antioxidants systems. *Antioxidants*. 9, 1083.
- Chalchat, J.C., Maksimovic, Z.A., Petrovic, S.D., Gorunovic, M.S.** 2004. Essential oil of *Senecio squalidus* L. Asteraceae. *J Essent Oil Res*. 16:227-8.
- Chemsa, A.E., Zellagui, A., Ozturk, M., Erol, E., Ceylan, O., Duru, M.E., Gherraf, N.** 2016. Antibiofilm formation, antioxidant and anticholinesterase activities of essential oil and methanol extract of *Marrubium deserti* de Noe. *J. Mater. Env. Sci.* 7, 993–1000
- Chibani, S., Gherboudj, W., Kabouche, A., Touzani, R., Aburjai, T., Kabouche, Z.** 2013. GC-MS Analysis of *Senecio giganteus* Desf. from Algeria *J Essent Oil-Bear Plants* 16(1): 123-125.
- Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Campaniello, D.D., Speranza, B., Sinigaglia, M.** 2009. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and nonthermal approaches a review. *Int J Food Sci Technol.* 44: 223-241.
- Cowan, M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev*; 12 (4); pp 564-582.
- Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C.** 2006. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut, *Int J Aromather*, 16(2), 95-100.

- Elbali, W., Djouahri, A., Djerrad, Z., Saka, B., Aberrane, S., Sabaou, N., Baaliouamer, A., Boudarene, L. 2018. Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors, *J Essent Oil Res.* 30(6), 470-487.
- Elbouchtaoui, M.C., Anejjar, A., Salghi, R., Chebli, B., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M., Hammouti, B. 2014. Inhibition of steel corrosion in 1 M HCl by the essential oil of *Thymus pallidus*. *Der Pharma Chemica* 6: 406-414.
- EL-Hawary, S., EL-Shabrawy, A., Ezzat, S., Elshibany, F. 2013. Gas chromatography-mass spectrometry analysis, hepatoprotective and antioxidant activities of the essential oils of four Libyan herbs. *J Med Plant Res.* 7(24): 1746-1753.
- El-Shazly, A., Doral, G., Wink, M. 2002. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. *Verlag der Z. Naturforsch C*, 57, 434-439.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem pharmacol.* 7:88-95.
- Fadel, H., Benayache, F., Chalchat, J.C., Figueredo, G., Chalard, P., Hazmoune, H., Benayache, S. 2019. Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) growing in Aures region of Algeria, *Nat Prod Res.*
- Fennane, M., Ibn Tattou, M. 1998. Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. *Bocconeia* 8: 5-243.
- Giordiani, R., Hadeif, Y., Kaloustian, J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants, *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
- Giweli, A.A., Dzamic, A.M., Sokovic, M.D., Ristic, M.S., Marin, P.D. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya, *Cent Eur J Biol.* 8(5), 504-511.
- Gloparvar, A.R., Hadipanah, A., Mehrabi, A.M., Armin, A. 2015. Essential oil. Composition of *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Journal of Herbal Drugs.* 6,1: 1-5.
- Hamdaoui, B., Wannes, W.A., Marrakchi, M., Brahim, N., Marzouk, B. 2013. Essential oil composition of two Tunisian horehound species: *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium aschersonii* Magn us. *J Essent Oil Bear Plants*, 16 (5):608-612.
- Hamedeyazdan, S., Asnaashari, S., Fathiazad, F. 2013. Characterization of non-terpenoids in *Marrubium crassidens* Boiss. essential oil. *Adv. Pharm. Bull.* 3, 429-432.
- Hamedeyazdan, S., Zarei, M., Salem, A., Asnaashari, S., Fathiazad, F. 2017. Essential oil of two Iranian horehound species: *Marrubium propinquum* and *Marrubium parviflorum*. *Pharm. Sci.* 23, 143-149
- Hatipi, I.M., Papajani, V., Cavar, S., Matevski, V. 2013. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus longicaulis* Presl. From Kosovo. *Glas. hem. tehnol. Bosne Hercegovine* .41: 6-10.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A. 2007. Composition of essential oils of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. and *Thymus numidicus* Poiret from Algeria, *Rivista Italiana, EPPOS.* 43, 11-18.

- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils, *Food Chem*, 116(3), 714-721.
- Houmani, Z., Azzoudj, S., Naxakis, G., Skoula, M. 2002. The essential oil composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* ssp. And *Thymus* ssp, *J Herbs Spices Med Plants*, 9(4), 275-280.
- Jahandiez, E. MAIRE, R. 1931–1934. *Catalogue des Plantes du Maroc. Vols. 1–3*. Alger: Minerva.
- Kadri, A.; Zarai, Z.; Bekir, A.; Gharsallah, N.; Damak, M.; Gdoura, R. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.*, 10, 3908-3914.
- Khanavi, M., Ghasemian, L., Hosseiny Motlagh, E., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A. 2005. Chemical Composition of The Essential Oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & C.A.Mey and *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Flav. Fragr. J.* 20: 324-326.
- Kouache, B., Brada, M., Saadi, A., Fauconnier, M.L., Lognay, G., Heuskin, S. 2017. Chemical composition and acaricidal activity of *Thymus algeriensis* essential oil against *Varroa destructor*, *Nat Prod Commun.* 12(1), 135-138
- Kenoufi, M., Lograda T., Chalard, P., Figueredo, G., Ramdani, M. 2016. Chemical composition, antimicrobial activity and chromosome number of *senecio giganteus* Desf. from Algeria. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 8 (11); 1772-1777.
- Kırimer, N., Kurkcuoglu, M., Akgul, G., Baser, K.H.H., Mahmoud, A.A. 2015. Composition of the essential oil of *Marrubium anisodon* C.Koch of Turkish origin. *Rec Nat. Prod.* 9, 234–236.
- Kucukbay, F.Z., Kuyumcu, E. 2010. Essential oil composition of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas Turkey. *Asian J Chem* .22:3615-3621.
- Kumar, V., and Mathela, C.S. 2018. Chemical constituents of essential oils of Himalayan *Nepeta ciliaris* Benth. And *Senecio nudicaulis* Buch-Ham. Ex D. Don. *J Essent Oil Res.* 30:207–13.
- Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., Tosun, A., Dogan, E. Duman, H. 2007. Essential oil composition of an Endemic Spices of Turkey : *Marrubium bourgaei*.ssp. *bourgaei* (Labiatae). *J Essent Oil Res.* 19(1) : 34.
- Lahlou, M. 2004. Essential oils and fragrance compounds : bioactivity and mechanisms of action. *Flav Frag J* .19, 159 165.
- Laouer, H., Yabrir, B., Djeridane, A., Yousfi, M., Beldovini, N., Lamamra, M. 2009. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Marrubium deserti*. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1133–1138.
- Lawal, A.O., Oyedeji, A.O. 2009. Chemical composition of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two *Senecio polyanthemoides* Sch. Bip. samples from South Africa. *Molecules.* 14: 2077-2086.
- Lograda, T., Ramdani, M., Chalard, P., Gharzouli, R., Feguirodo, G., Chalchat, J.C. 2012. Essential oil and antimicrobial activity of *Senecio perralderianus*. *Int J Med Arom Plants.* 2,632-637.

- Lone, S.H., Bhat, K.A., Bhat, H.M., Majeed, R., Anand, R., Hamid, A., Khuroo, M.A. 2014. Essential oil composition of *Senecio graciliflorus* DC : comparative analysis of different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Jeanmonod Phytomedicine*. 15 : 21(6) :919,925.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessièrè, J M., Viano, J. 2006. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem*. 4364-70.
- Mc Lafferty, F.W. 1991. Stauffer, D.B., The Wiley/NBS registry of mass spectral data 5<sup>th</sup> Edition, J Wiley and Sons, New York.
- Meshkatsadat, M.H., Sarabi, R.S., Amiri, H., Piraei, M. 2006. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus persicus* leaves. *Asian J Chem* .18:2385-2387.
- Messara, Y., Fernane, F., Meddour, R. 2018. Chemical Composition, Antibacterial, and Antifungal activities of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Phytothérapie*. 16:163 168.
- Mirza, M., Baher, N.Z. 2008. Chemical composition of essential oil of *Senecio leucostachys* Baker. *J Essent Oil Bearing Plants*.11, 179-183.
- Moghtader, M. 2012. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. comparison with synthetic thymol on *Aspergillus Niger*. *J Yeast Fungal Res* .3:83-88.
- Molegro A. 2019. MVD 7.0 Molegro Virtual Docker, DK-8000 Aarhus C, Denmark.24.
- Mohammadhosseini, M. 2016. First report of screening of the profiles of the essential oils and volatiles from the aerial parts of *Marrubium persicum* using classical and advanced methods prior to Gas Chromatographic Mass Spectrometric determination. *J. Med. Plants Prod*. 2, 169-180.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M .2004. The Essential Oil Composition of *Marrubium astracanicum* Jacq. From Iran. *J. Essent. Oil Bearing Plants*. 7: 239-242.
- Nagy, M., Svajdlenka, E.1998. Comparison of Essential Oils from *Marrubium vulgare* L. and *M. peregrinum* L. *J. Essent. Oil Res*. 10: 585-587.
- Naughton, S.X., Raval, U., Pasinetti, G.M. 2020. Potential novel role of COVID-19 in Alzheimer's disease and preventative mitigation strategies. *Journal of Alzheimers Disease*. 76, 21–25.
- Nori-Shargh, D., Raftari, S., Deyhimi, F. 2008. Analysis of the essential oil of *Senecio vernalis* waldst. And kit. from Iran. *Flav Frag J*. 23:357-359.
- Nouasri, A., Dob, T., Toumi, M., Dahmane, D., Krimat, S., Lamari, L., Chelgoume C. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus lanceolatus* Desf., an endemic thyme from Algeria, *J. Essent. Oil Bear. Pl* . 18 : 1246-1252.
- Omidbaigi, R., Sefidkon, M.H. 2005. Essential oil composition of *Thymus citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flav Frag J* .20 : 237-238.

- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn J Nutri.* 44(6):307-315.
- Pavel, M., Ristic, M., Stevic, T. 2010. Essential oil of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania : chemical composition and antimicrobial activity. *J Serb Chem Soc.* 75: 27-34.
- Petrovic, S., Pavlovic, M., Maksimovic, Z., Milenkovic, M., Couladis, M., Tzakou, O., Niketic, M. 2009. Composition and antimicrobial activity of *Marrubium incanum* Desr. (Lamiaceae) essential oil. *Nat. Prod. Commun.* 4, 431–434.
- Quezel, P., Santa, S. 1962. N désertiques méridionales, Tome I, centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 611.
- Quezel P et Santa S. 1962-1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 1-2 Ed, CNRS, Paris, 1170p.
- Rezazi, S., Hanini, S., Si-Moussa, C., Abdelmalek, S. 2017. Kinetic modeling and parameters identification based on metaheuristic optimization techniques for extraction process of *Marrubium vulgare* L. essential oil, *J Agr Sci Tech*, 19, 307-322.
- Said-Al Ahl, H.A.H., Gendy, A.S.H., Mahmoud, A.A. and Mohamed, H.F.Y. 2015. Essential Oil Composition of *Marrubium vulgare* L. Cultivated in Egypt. *Intern J Plant Research.* 1 (4): 138-141.
- Salama, M.M., Taher, E.E., El-Bahy, M.M. 2012. Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* HOFF. ET LINK. and *Marrubium vulgare* L, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 54(5), 281-286.
- Sardarodiyani, M., Mohammadi, M. 2018. Chemical composition and antioxidant activity from the essential oil of white Horehound (*Marrubium vulgare*). *IJLAS.* 2277 785.
- Sarikurkcu, C., Ozer, M.S., Calli, N., Popovi´c-Djordevi´c, J. 2018. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Marrubium parviflorum* subsp. *oligodon*. *Ind. Crops Prod.* 119, 209–213.
- Sharma, P., Shah, G.C. 2014. Composition and antioxidant activity of *Senecio nudicaulis* wall. Ex DC. (Asteraceae): a medicinal plant-growing wild in Himachal Pradesh. India. *Nat Prod Res* 29:883–886.
- Singh, R., Ahluwalia, V., Singh, P., Kumar, N., Prakash Sati, O., Sati, N. 2015. Antifungal and phytotoxic activity of essential oil from root of *Senecio amplexicaulis* Kunth. (Asteraceae) growing wild in High Altitude Himalayan Region. *Nat Prod Res.* 30(16): 1875-1879.
- Touhami, A., Chefrou, A., Boukhari, A., Ismail, F. 2016. Comparative study of chemical compositions and antimicrobial effect of different genotypes of *Thymus harvested* during two periods of development, *J Appl Pharm Sci.* 6(8), 51-56.
- Üçüncü, O., Yayli, N., Yaşar, A., Terzioğlu, S., Yayli, N. 2008. Chemical composition of the essential oils from flower, leaf, and stem of *Senecio trapezuntinus* Boiss. grown in Turkey. *J Nat Commun.* 3:925–8.
- Üçüncü, O., Kahriman, N., Terzioğlu, S., Karaoglu, S.A., Yayli, N. 2010. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from flowers of *Senecio othonnae*, *Senecio racemosus* and *Senecio nemorensis*. *Nat Prod Commun.* 5: 831-834.

- Usta, A., Üçüncü, O., Cansu, T.B., Terzioglu, S., Yayli, N. 2009. Chemical composition of the essential oils from flower of *Senecio vernalis*, and *Senecio platyphyllus* var. *platyphyllus*. *Asian J Chem*.21:6369–74.
- Viuda Martos, M., Mohamady, M., A., Fernández, L., J., Abd ElRazik, K., A., Omer, E., A., Pérez Alvarez, J., A., Sendra, E. 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22:1715-1722.
- Wandhammer M. 2012. Thèse : Etude structurale de l'inhibition des cholinesterases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. Autre. Université de Strasbourg, 2012
- Weel, K.G.C., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Gruzdiene, D., Linssen, J.P.H. 1999. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *Fett Lipid*, 101(10), 395-400.
- Xiao, K.J., Wang, W.X., Dai, J.L., Zhu, L. 2014. Anti-inflammatory activity and chemical composition of the essential oils from *Senecio flammeus*. *EXCLI J*. 18(13):782- 791.
- Zawiślak, G. 2012. Chemical composition of essential oils of *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium ncanum* Desr. grown in Poland. *Chemija*,23. (2): 136-140.
- Xu, Z., Yao, H., Shen, J., Wu, N., Xu, Y., Lu, X., Li, L.I. 2020. Nelfinavir is active. against SARS-CoV 2 in Vero E6 cells. *ChemRxiv*.
- Zeghib, A., Kabouche, A., Laggoune, S., Calliste, C.A, Simon, A., Bressolier, P.H., Aouni, M., Duroux, J.L., Kabouche, Z. 2017. Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil. *Natural Product Communications*.12(10) :16551-1654.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, A., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A. 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. (Lamiaceae), *J Food Bioprod Process*, 89(4), 257-265.

# *Conclusion générale*

## ***Conclusion générale***

Notre travail de recherche est centré premièrement sur l'étude phytochimique et biologique des parties aériennes d'une espèce algérienne du genre *Centaurea* de la famille Asteraceae : *Centaurea involucrata* Desf., qui n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques ni biologiques auparavant. Deuxièmement ; sur la composition chimique des huiles essentielles issus des parties aériennes de deux espèces *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Marrubium vulgare* de la famille des Lamiacées et de l'espèce *Senecio massaicus* de la famille Asteraceae, ainsi que l'étude biologique de l'huile essentielle de cette dernière espèce .

La première partie du présent travail a commencé par un criblage phytochimique qui a révélé la présence de la majorité des classes de métabolites dans les différents organes de l'espèce *C. involucrata*

L'étude GC-MS de l'extrait d'éther de pétrole a montré la présence de 13 variétés de composés phytochimiques dont la plupart sont cités dans la littérature pour leurs propriétés biologiques intéressantes.

La détermination et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes des extraits chloroforme et *n*-butanol par HPLC/DAD a révélé la présence de 7 acides phénoliques et 3 flavonoïdes et que l'extrait *n*-butanol est riche en ces composés en comparaison avec l'extrait chloroforme. Alors que la quantification de l'extrait acétate d'éthyle par LC-MS / MS a permis d'identifier 26 composés phénoliques dont les acides : protocatéchique, 4-hydroxybenzoïque, gentisique et chlorogénique sont présentés avec les concentrations les plus élevées.

L'investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle a conduit à l'isolement de 11 composés naturels, leur identification a été réalisée par la combinaison des données des expériences de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC et NOESY), UV-Vis et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles reportées dans la littérature. Il s'agit de :

- CEIN-1 : **acide 3-oxo oléanolique**
- CEIN-2 : **hispiduline**
- CEIN-3 : **onopordopicrine**
- CEIN-4 : **melitensine**.
- CEIN-5 : **acide para-hydroxy benzoïque**
- CEIN-6 : **jacéosidine**
- CEIN-7 : **trachéloside**

- CEIN-8 : **arctiine**
- CEIN-9 : **prunasine**
- CEIN-10 : **8 $\alpha$  hydroxy-11  $\beta$  -13H dehydrocostus lactone**
- CEIN-11 : **isovitexine**

Ces produits sont isolés pour la première de l'espèce *Centaurea involucrata* Desf.

L'évaluation de l'activité antioxydante par 4 méthodes (DPPH, ABTS, DMSO alcalin et CUPRAC) a montré que l'extrait AcOEt possède un pouvoir antioxydant important par rapport aux autres extraits cela peut s'expliquer par leur teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes. Par ailleurs, les extraits possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis une seule souche de *Bacillus subtilis* parmi toutes les souches testées qui présente une forte résistance. Pour l'activité antiproliférative les extraits possèdent une activité considérable contre la lignée cellulaire testée (Hela).

La seconde partie du présent travail a concerné l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des trois espèces *T. algeriensis*, *M. vulgare* et *S. massaicus*, ainsi que l'évaluation des activités biologiques de l'HE de cette dernière espèce. L'analyse de leurs compositions chimiques a été effectuée par GC-MS. Les composés majoritaires ont été germacrène D (29,6%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,0%) pour *T. algeriensis*,  $\beta$ -bisabolène (36,3%) pour *M. vulgare* et *m*-cymène (30,58%), n-hexadécanoic acid (14,88%), docosane-11-décyl (10,43%) pour *S. massaicus*.

L'huile essentielle de *S. massaicus* possède une activité antioxydante modérée, en revanche elle a présenté une activité anti-cholinestérase puissante proche de celle de la galanthamine contre l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) et plus élevée contre la butyrylcholinestérase (BChE).

Les études docking moléculaire menées pour les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer ont montré que les composés docosane-11-décyl et octaéthylène glycolmonododécyl éther ont une forte puissance. Ces deux mêmes composés de l'huile essentielle ont présenté une forte interaction contre la protéase principale Covid-19 et l'endoribonucléase Nsp15.

Par conséquent, ils pourraient être utilisés comme un bon agent anticholinestérase et des médicaments candidats anticoronavirus.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *C. involucrata* afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les autres extraits.
- Poursuivre les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* de tous les extraits et les huiles décrits dans ce travail en particulier l'huile essentielle de l'espèce *Senecio massaicus*.

**Acta Scientifica Naturalis**

Former Annual of Konstantin Preslavsky University of Shumen: Chemistry, Physics, Biology, Geography  
 Journal homepage: [asn.shu.bg](http://asn.shu.bg)

**Chemical Composition of Algerian *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Marrubium vulgare* L.  
 (Lamiaceae) Essential Oils from the Aures Region**

**Sara Kebbi<sup>1</sup>, Hamza Fadel<sup>1\*</sup>, Jean-claude Chalchat<sup>2</sup>, Gilles Figueredo<sup>3</sup>, Pierre Chalard<sup>4</sup>, Hichem Hazmoune<sup>1</sup>, Fadila Benayache<sup>1</sup>, Samir Benayache<sup>1</sup> and Ramdane Seghiri<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> *Association de Valorisation des Huiles Essentielles et des Arômes (AVAHEA, La Haye 7, 63500 Saint Babel, France*

<sup>3</sup> *Laboratoire d'Analyses des Extraits Végétaux et des Arômes (LEXVA Analytique), 7 Rue Henri Mondor, Biopôle, Clermont-Limagne, 63360, Saint Beauzire, France*

<sup>4</sup> *Université Clermont Auvergne, CNRS SIGMA Clermont ICC, F-63000 Clermont Ferrand France*

**Abstract:** *This study was aimed to determine the chemical composition of essential oils obtained from aerial parts of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Marrubium vulgare* L. collected in the Aures region of Algeria. Essential oils were extracted by steam distillation method and analyzed using GC-MS and GC-FID techniques. Thirty-five (35) and twenty-nine (29) components were identified respectively in *T. algeriensis* and *M. vulgare* essential oils to represent respectively 94.8% and 75.7% of the total oil composition. The main compounds of *T. algeriensis* oil were germacrene D (29.6%),  $\beta$ -caryophyllene (11.0%), *E*- $\beta$ -farnesene (7.8%), bicyclogermacrene (4.4%) and  $\delta$ -cadinene (4.0%), while,  $\beta$ -bisaboene (36.3%),  $\beta$ -caryophyllene (7.8%), phytol (6.2%), nonacosane (4.0%) and heptacosane (3.3%) were the main components of *M. vulgare* oil. The richness of these two oils in germacrene D and  $\beta$ -bisaboene respectively could suggest a new bioactivity.*

**Keywords:** Essential oil, *Thymus algeriensis*, *Marrubium vulgare*, germacrene D and  $\beta$ -bisaboene

## Introduction

The essential oils obtained from various parts of the plants have considerable interests in the pharmaceutical industry due to their biological potential [1, 2]. The species of Lamiaceae family have been used in traditional medicine to treat several diseases, thus, it should be also highlighted for its essential oils potential [3]. Among the genera of this family of great biological interest and which is growing in Mediterranean area, we distinct the genus *Thymus* and *Marrubium* [4, 5]. *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. is an herbaceous annual plant which called in Algeria “Djertil” [6]. It is largely used in traditional medicine to treat respiratory disorders, illnesses of the digestive tube and as anti-abortion [7]. *Marrubium vulgare* L. is commonly known as “white horehound”, and in Algeria as “Marriout” [8]. It is used in folk medicine to treat the digestive tract, diarrhea, diabetes, rheumatism, coughs and cold [9, 10].

In fact, many authors have investigated the chemical composition of *T. algeriensis* [6, 11-22] and *M. vulgare* essential oils [10, 23-36]. In addition, several studies proved that some factors such geographic origin [37] genetic and extraction methods [38] could influence the variability of essential oils composition. Therefore, the present study is an attempt to identify and enrich the knowledge on the variation of the chemical composition of essential oils from two species of Lamiaceae family of the Aures area, named *Thymus algeriensis* and *Marrubium vulgare* using GC-MS and GC-FID analyzes.

## Material and Methods

### *Plant materials*

Plant materials were collected from north eastern of Algeria (Batna, Aures region). *M. vulgare* was collected in January 2015 from El-Kantina of Yabous (61 km south-west from Khenchla, 35°24'29" Nord, 6°38'31" East, Altitude: 1167 m), and *T. algeriensis* was collected in June 2015 from Foug-Toub region (57 km south east from Batna, 35°24'18" Nord, 6°32'59" East, Altitude: 1164 m). The authenticated voucher specimens (TA/107/VAR/06-15 and MV/102/VAR/01-15) were deposited in the Herbarium of Research Unit (VARENBIOMOL), University of Mentouri Brothers, Constantine1, Algeria.

### *Extraction of the essential oils*

Dried aerial parts of *T. algeriensis* (186 g) and of *M. vulgare* (130 g) were subjected to steam distillation in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oils (94 and 50 mg, respectively) were collected and dried over anhydrous sodium sulphate and kept at 4°C until analysis. The oils yields of essential oils were calculated according to the dry plant materials of the species.

### *GC-FID Analysis*

The essential oils were analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5MSf used silica capillary column (5%-diphenyl-95%-dimethylpolysiloxane, 25 m x 0.25 mm, film

thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), programmed from 50°C (5 min) to 250°C at 3°/min and held for 10 min. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300°C, respectively. The essential oils were diluted in acetone (3.5%, v/v) and injected in split mode (1/60) helium was used as a carrier gas (1.0 ml/min). Solutions of standard alkanes (C8-C20) were analyzed under the same conditions to calculate retention indices (RI) with Van del Dool and Kratz equation [38, 39].

### **GC-MS Analysis**

Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) Model 7890/5975, equipped with HP-5MS capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) programmed with the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) ionization was set in positive electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was set at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230°C and 180°C, respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the  $m/z$  range 33-450. The essential oils constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries [40, 41]. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

### **Results and Discussion**

The steam distillation of *T. algeriensis* aerial part produced sharp odorous yellow oil with a yield of 0.05% (w/w). The GC-MS (Table 1) and GC-FID (Figure 1) results showed the presence of 35 identified components (listed in order of their experimental retention times and retention indices), representing 94.8% of the total oil composition. Sesquiterpenes were found highly dominated to represent 81.0% of the total composition, where hydrocarbons sesquiterpenes were the predominant class (67.0%), followed by oxygenated sesquiterpenes (14.0%), oxygenated monoterpenes (7.7%), hydrocarbon monoterpenes (3.2%) and other compounds (2.6%). The major components were respectively germacrene D (29.6%),  $\beta$ -caryophyllene (11.0%), E- $\beta$ -farnesene (7.8%),  $\beta$ -eudesmol (5.3%), bicyclogermacrene (4.4%),  $\delta$ -cadinene (4.0%),  $\alpha$ -humulene (3.5%),  $\alpha$ -bulnesene (2.4%), E-nerolidol (2.4%),  $\alpha$ -guaiene (2.3%), phytol (2.3%), spathulenol (2.2%) and verbenol (2.0%).

According to the previously reported data, the results of some Algerian *T. algeriensis* oils from different regions showed variability in chemical profiles. Indeed, our sample was characterized by high content of germacrene D (29.6%) and  $\beta$ -caryophyllene (11.0%), while, Houmani et al. [12] found that *T. algeriensis* oil samples purchased from different herbalists of Blida, were rich in linalool (78.8%) and thymol (62.7%). Moreover, Dob et al. [6] and Giordiani et al. [14] revealed that linalool (47.3%) and  $\alpha$ -pinene (25.5% to 27.1%) were respectively the main constituents of *T. algerienis* oil from Media and Souk-aharas regions. However, Hazzit et al. [13] found that geranyl acetate (16.4%) was the major component of *T. algerienis* oil

from Blida and Bouira regions, while in 2009, the same author reported thymol (29.5%) and terpinyl acetate (18.0%) as the predominant components for samples from the same location. Touhami et al. [42] reported that camphor was the chemotype of the oil before flowering stage with (33.3%) and *p*-cymen-7-ol in flowering period (27.0%). Recently, it has been reported by Bendjabeur et al. [22] that carvacrol (43.2%) and *p*-cymene (18.7%) were the major components in *T. algeriensis* oil from Relizane and Bouira regions, and similar results were obtained by Kouache et al. [19] in the same sample from Ain-Defla region, whereas, Benabed et al. [21] found in their studies on two samples collected from Djelfa and Laghouat, that the main compounds were camphor (17.7%) and  $\alpha$ -terpinenyle acetate 27.3%. Furthermore, Benabdallah et al. [20] found that elemol (18.4%) and camphor (14.2%) were the main component in a sample collected from the national park of Bellazma (Batna). However, thymol (71.4 and 38.5%) was the predominant component in Algerian *T. algeriensis* oils from Hamam-Alwan of Blida [43] and in a Libyan sample [18]. Thus, Benjilali et al. [11] found thymol (14.4 to 65.1%) and carvacrol (22.8 to 70.3%) as the predominant compounds, while, Ait-Ouazzou et al. [44] found borneol (23.5%) as the major compounds of Moroccan samples. But, according to the results of Amarti et al. [16] and Zouari et al. [17] camphor (27.7%) and 1,8-cineole (7.55 to 22.07%) were the main components in *T. algeriensis* oil from Morocco and Tunisia, respectively.

In fact, the chemical composition of our sample was rather different, where we observed the presence of germacrene D,  $\beta$ -caryophyllene, E- $\beta$ -farnesene, bicyclogermacrene and  $\alpha$ -humulene with high contents. It is also interesting to note again that  $\alpha$ -bulnesene,  $\alpha$ -guaiene, phytol,  $\beta$ -copaene and nonacosane were identified for the first time in our *T. algeriensis* essential oil.

Our essential oil obtained from *M. vulgare* oil was produced as a pale yellow color with a yield of 0.04% (*w/w*). The results of analyzes by GC-MS (Table 2) and GC-FID (Figure 2) showed the presence of 29 identified compounds to represent 81.3% of the total oil components. The oil was characterized by domination of sesquiterpene (53.8%) where hydrocarbons sesquiterpenes were predominant class (50.0%), followed by oxygenated hydrocarbons (13.9%), hydrocarbons (12.5%), oxygenated monoterpenes (1.8%) and oxygenated sesquiterpens (2.6%). The main constituents were respectively  $\beta$ -bisabolene (36.3%),  $\beta$ -caryophyllene (7.8%), phytol (6.2%), nonacosane (4.0%), heptacosane (3.3%), nonanal (2.8%), 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (2.6%) and  $\alpha$ -humulene (2.0%).

Several studies have described the chemical composition of *M. vulgare* essential oils from different regions of Algeria, for example, Elbali et al. [37] reported  $\beta$ -bisabolene (43.4%) and  $\delta$ -cadinene (10.2%) as the major constituents of *M. vulgare* collected from Tazoult region of Batna. However, in Setif region, Belhattab et al. [29] reported that eugenol (50.1%) and  $\beta$ -bisabolene (28.8%) were found as major components in *M. vulgare* oil, whereas, Abadi et al. [10] reported that 4,8,12,16-tetramethyl heptadecan-4-olid (17.0%) and germacrene D-4-ol (9.6%) were the major constituents of the same sample from Tebessa region.

Moreover, eugenol (21.5%) and  $\beta$ -caryophyllene were the main constituents of the sample from Medea region [45]. Furthermore, Kadri et al. [30] reported that  $\gamma$ -eudesmol (11.9%) and  $\beta$ -citronellol (9.9%) were found as the main components of Tunisian *M. vulgare* oil. In a Libyan *M. vulgare* oil, [33] thymol (20.1%) and E- $\beta$ -farnesene (15.6%), respectively, were found as the major compounds, whereas, in Egypt, *M. vulgare* oil was found rich in thymol (34.5%) and  $\gamma$ -cadinene (17.7%) by Salama et al. [31], while, Said-Al-Ahl et al. [35] found that carvacrol (36.3%) and  $\beta$ -phellandrene (15.5%) were the major compounds of *M. vulgare* oil from Netherlands. Moreover, in different Iranian regions,  $\beta$ -bisabolene (25.4%) and  $\beta$ -caryophyllene (11.6%) were found as the major components of *M. vulgare* oil. [27] Similar results was found in another Tunisian *M. vulgare* oil by Hamdaoui et al. [34] where they found  $\beta$ -bisabolene (28.3%) and  $\beta$ -caryophyllene (7.8%) as the main compounds. Thus, Morteza-Semnani et al. [26] found that  $\beta$ -bisabolene (20.4%) and  $\delta$ -cadinene (19.1%) were the major components, whereas, another Iranian group research found caryophyllene oxide (18.7%) and *trans*-caryophyllene (12.8%) as the main components [28]. However, Bokaeian et al. [46] reported  $\gamma$ -eudesmol (11.0%), germacrene D (10.0%) and citronellyl formate (10.0%) as the major compounds, while, Golparvar et al. [36] found that  $\beta$ -caryophyllene (32.2%) and (E)- $\beta$ -farnesene (11.4%) were the major constituents. In addition, tricyclene and  $\beta$ -pinene were found as the main compounds of the same species oil from another Egyptian region [23]. Similar results were obtained by Nagy and Svajdlenka [24] where they found  $\beta$ -caryophyllene (45.8%) and germacrene D (14.4%) as the major constituents of *M. vulgare* oil from Slovakia. Moreover, E-caryophyllene (24.8 to 44.5%) and germacrene D (23.8 to 43.4%) was found as the major compound in Polish *M. vulgare* oil [32]. Weel et al. [25] reported that (Z)- $\beta$ -farnesene (9.6%),  $\beta$ -caryophyllene (8.5%) and (E)-hex-2-enal (4.7%) were the main components of *M. vulgare* oil from a Lithuanian region. However, Bayir et al. [47] reported that  $\alpha$ -pinene (28.8%),  $\beta$ -pinene (18.3%),  $\beta$ -phellandrene (17.4%) and 2-hexenal (14.8%) were the major compounds of *M. vulgare* oil from a Turkish area.

According to the previous published data of *M. vulgare* oil composition, the results revealed a significant variability for our sample, where we noticed that  $\beta$ -bisabolene was identified as a major component in many samples from different regions [26, 27, 29, 34] but we noticed that pulegone, undecanal, E- $\beta$ -ionone, 3,5,7-trimethyl-2E,4E,6E,8E-undecatetraene, megastigma-5,7(E),9-trien-4-one, 1-heptadecene, pentadecanal, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, octacosane, nonacosane and unctane were identified for the first time in our *M. vulgare* oil. This variability found in essential oils composition could be linked to several factors such as genetic, environmental or extraction methods [4, 38].

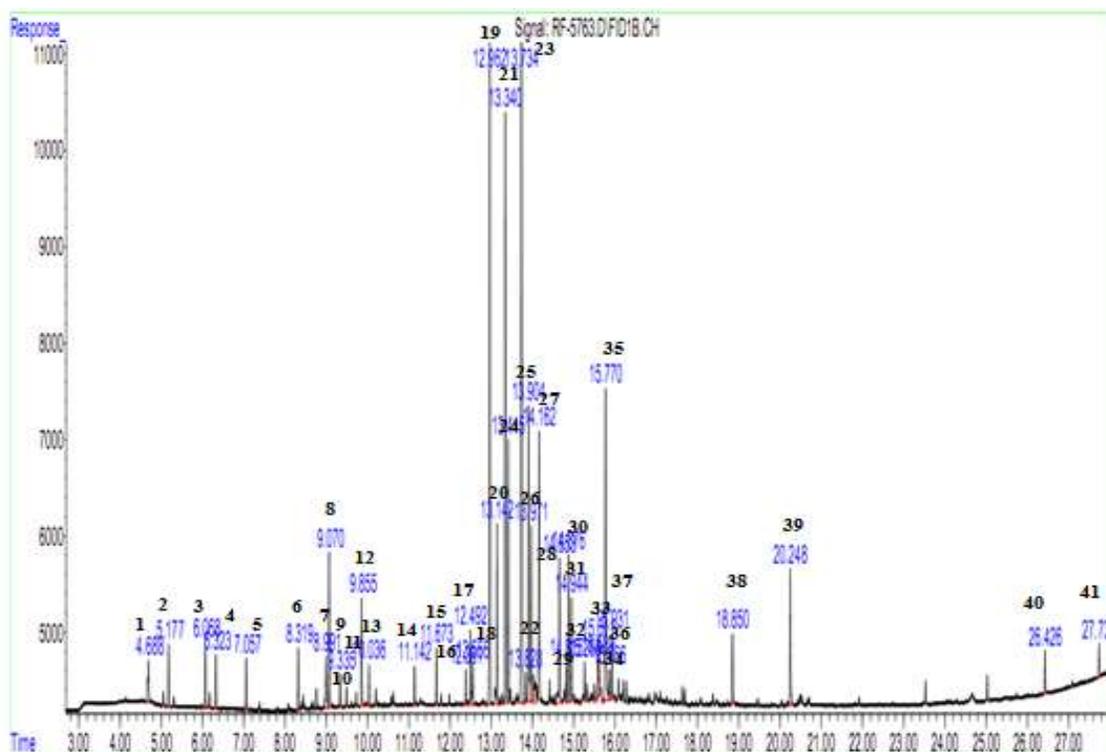


Figure 1. GC-FID Chromatogram of *T. algeriensis* essential oil

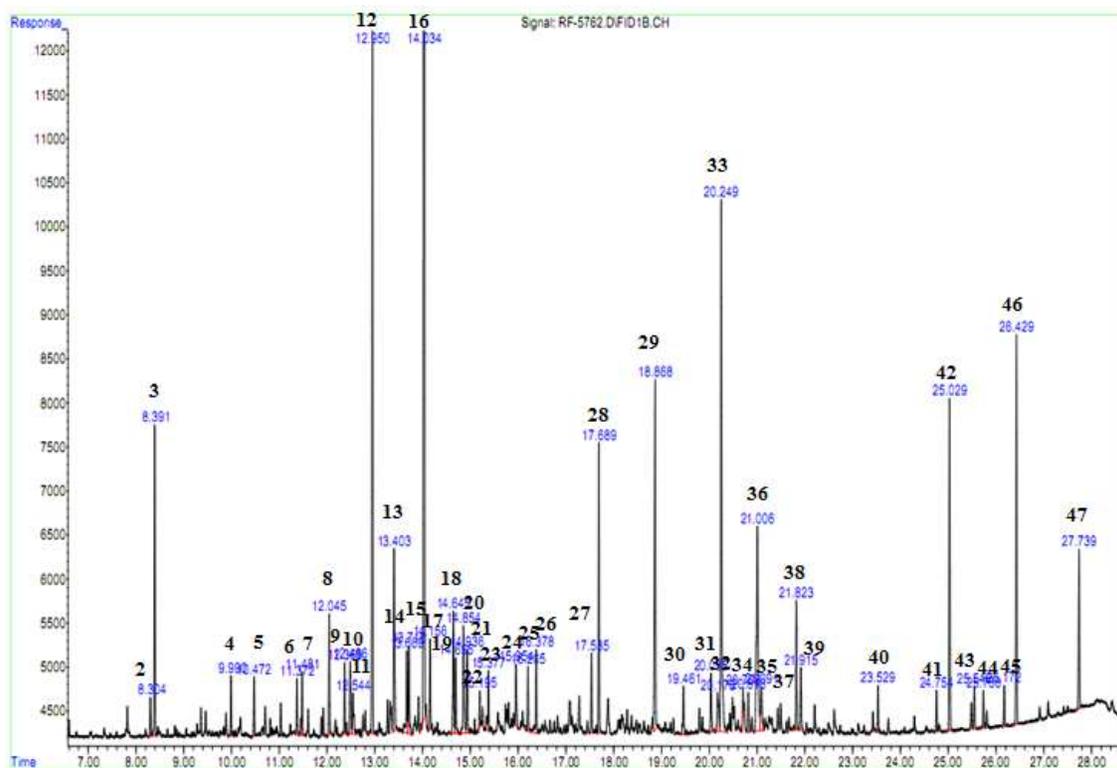


Figure 2. GC-FID Chromatogram of *M. vulgare* essential oil

**Table 1.** Chemical composition (%) of *Thymus algeriensis* essential oil

Peak N°	RT	<sup>b</sup> RI	<sup>a</sup> Components	%
1	4.688	910	Unknown	0.9
2	5.177	934	$\alpha$ -Pinene	0.9
3	6.068	978	$\beta$ -Pinene	0.9
4	6.323	991	Myrcene	0.7
5	7.057	1031	Limonene	0.7
6	8.319	1102	Linalol	0.8
7	8.991	1144	Trans -pinocarveol	1.0
8	9.070	1149	<i>trans</i> -Verbenol	2.0
9	9.335	1166	Pinocarpone	0.4
10	9.492	1176	Borneol	tr
11	9.727	1191	$\alpha$ -Terpineol	tr
12	9.855	1199	Myrtenol	1.7
13	10.036	1211	Verbenone	0.6
14	11.142	1288	Bornyl acetate	0.5
15	11.673	1326	Myrtenyl acetate	0.7
16	12.381	1379	$\alpha$ -Copaene	0.4
17	12.492	1388	$\beta$ -Copaene	1.0
18	12.556	1393	$\beta$ -Elemene	0.6
19	12.962	1424	$\beta$ -Caryophyllene	11.0
20	13.142	1439	$\alpha$ -Guaiene	2.3
21	13.340	1455	(E)- $\beta$ -Farnesene	7.8
22	13.415	1461	$\alpha$ -Humulene	3.5
23	13.734	1486	Germacrene D	29.6
24	13.828	1494	Unknown	0.4
25	13.904	1500	Bicyclogermacrene	4.4
26	13.971	1505	$\alpha$ -Bulnesene	2.4
27	14.162	1522	$\delta$ -Cadinene	4.0
28	14.653	1563	E-Nerolidol	2.4
29	14.815	1577	Germacrene D-4-ol	0.5
30	14.876	1582	Spathulenol	2.2
31	14.944	1588	Caryophyllene oxide	1.6
32	15.265	1616	Humuleneepoxide II	0.6
33	15.589	1645	Unknown	0.4
34	15.611	1647	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0.9
35	15.770	1661	$\beta$ -Eudesmol	5.3
36	15.866	1670	$\alpha$ -Eudesmol	0.5
37	15.931	1676	Unknown	0.9

**Table 1.** Chemical composition (%) of *Thymus algeriensis* essential oil (continued)

38	18.850	1959	Unknown	1.0
39	20.248	2098	Phytol	2.3
40	26.426	2900	Nonacosane	0.6
41	27.739	3101	Unknown	0.5
Total components				98.9
Total identified				94.8
Total not identified				4.1
Hydrocarbon monoterpenes				3.2
Oxygenated monoterpenes				7.7
Hydrocarbon sesquiterpenes				67.0
Oxygenated sesquiterpenes				14.0
Others				2.9

<sup>a</sup>Compounds are listed in order of their RI

<sup>b</sup>RI (retention index) measured relative to *n*-alkanes (C8-C20) using HP-5MS column

RT (retention time)

**Table 2.** Chemical composition (%) of *M. vulgare* essential oil

Peak N°	RT	<sup>b</sup> RI	<sup>a</sup> Components	%
1	4.675	910	Unknown	0.5
2	8.304	1101	Linalol	0.3
3	8.391	1106	Nonanal	2.8
4	9.990	1208	Decanal	0.5
5	10.472	1241	Pulegone	0.5
6	11.372	1304	Undecanal	0.4
7	11.481	1312	Unknown	0.6
8	12.045	1354	Eugenol	1.0
9	12.369	1379	Elphacopaene	0.6
10	12.486	1387	β-Bourbonene	0.9
11	12.544	1392	β-Elemene	0.6
12	12.950	1424	β-Caryophyllene	7.8
13	13.403	1460	α-Humulene	2.0
14	13.669	1481	Germacrene D	0.9
15	13.716	1485	E-β-Ionone	1.0
16	14.034	1511	β-Bisabolene	36.3
17	14.156	1521	δ-Cadinene	0.8
18	14.645	1563	E-Nerolidol	1.3

**Table 2.** Chemical composition (%) of *M. vulgare* essential oil (continued)

19	14.695	1567	Unknown	0.7
20	14.854	1580	3,5,7-Trimethyl-2E,4E,6E,8E-undecatetraene	1.6
21	14.936	1587	Caryophyllene oxide	0.9
22	15.195	1610	Unknown	0.3
23	15.377	1626	Megastigma-5,7(E),9-trien-4-one	0.5
24	15.954	1678	1-Heptadecene	0.6
25	16.205	1700	Heptadecane	0.6
26	16.378	1716	Pentadecanal	0.9
27	17.535	1827	Unknown	0.8
28	17.689	1842	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	2.6
29	18.868	1961	Unknown	4.0
30	19.461	2021	Unknown	0.5
31	20.035	2077	Unknown	0.6
32	20.176	2091	Unknown	0.7
33	20.249	2098	Phytol	6.2
34	20.708	2155	Unknown	0.1
35	20.818	2169	Unknown	0.4
36	21.006	2192	Unknown	3.9
37	21.091	2203	Unknown	0.7
38	21.823	2288	Unknown	1.4
39	21.915	2299	Unknown	0.8
40	23.529	2499	Pentacosane	0.4
41	24.754	2662	Unknown	0.4
42	25.029	2700	Heptacosane	3.3
43	25.546	2772	Unknown	0.4
44	25.738	2799	Octacosane	0.4
45	26.172	2863	Unknown	0.4
46	26.429	2901	Nonacosane	4.0
47	27.739	3101	Uncontane	1.6
Total components				98.5
Total identified				81.3
Total not identified				17.2
Oxygenated monoterpene				1.8
Sesquiterpene hydrocarbons				50.0
Oxygenated sesquiterpenes				2.6
Hydrocarbons				12.5
Oxygenated hydrocarbons				13.9

<sup>a</sup>Compounds are listed in order of their RI

<sup>b</sup>RI (retention index) measured relative to *n*-alkanes (C8-C20) using HP-5MS column

RT (retention time)

## Conclusions

The chemical composition of *Thymus algeriensis* and *Marrubium vulgare* essential oils collected from the Aures area of Algeria was characterized by high contents of sesquiterpenes (67.0% and 50.5%, respectively). The major compounds of *T. algeriensis* oil were germacrene D (29.6%),  $\beta$ -caryophyllene (11.0%), E- $\beta$ -farnesene (7.8%), bicyclogermacrene (4.4%) and  $\delta$ -cadinene (4.0%), while, the major components of *M. vulgare* oil were  $\beta$ -bisaboene (36.3%),  $\beta$ -caryophyllene (7.8%), phytol (6.2%), nonacosane (4.0%) and heptacosane (3.3%). Indeed, the present results revealed a relative variability according to the literature data. It was the first time that germacrene D and  $\beta$ -caryophyllene, E- $\beta$ -farnesene, bicyclogermacrene and  $\alpha$ -humulene were described with high contents in our *T. algeriensis* oil, as we observed that pulegone, undecanal, E- $\beta$ -ionone, 3,5,7-trimethyl-2E,4E,6E,8E-undecatetraene, megastigma-5,7(E),9-trien-4-one, 1-heptadecene, pentadecanal, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, octacosane, nonacosane and unctane were identified for the first time in our *M. vulgare* oil. Therefore, these results will certainly contribute to enrich the knowledge on the variation of essential oils composition of Lamiaceae species, which suggest a new activity and may act as an alternative to discover new biological drugs.

## Acknowledgements

The authors would like to thank MESRS (DGRSDT) for the financial support and Pr. Mohamed Kaabeche (Setif 1 University, Algeria) for the identification of the plant materials.

## References

- [1]. Franco Mancarz, G.F.; Laba, L.C.; Morais Silva, T.A.; de Santi Pazzim, M.; de Souza, D.; Maria Machado Prado, M.; de Souza, L.M.; Nakashima, T.; Guetter Mello, R., Chemical composition and biological activity of *Liquidambar styraciflua* L. leaf essential oil, *Ind Crop Prod*, **2019**, *138*, 111-446.
- [2]. Kulaksiz, B.; Sevda, E.R.; Üstündağ-Okur, N.; Saltan-İşcan, G., Investigation of antimicrobial activities of some herbs containing essential oils and their mouthwash formulations, *Turk J Pharm Sci*, **2018**, *15*(3), 370-375.
- [3]. Ahmed, J.H.; Ezer, N., Anatomical features of genus *Prunella* l. growing in turkey, *Turk Pharm Sci*, **2008**, *5*(1), 17-27.
- [4]. Mehalaine, S., Seed germination and propagation for regeneration of some medicinal plants growing wild in semiarid region of Algeria, *Handbook of Environmental Materials Management*, **2018**, 1-24.

- [5]. Mesquita, L.S.S.; Luz, T.R.S.A.; Mesquita, J.W.C.; Coutinho, D.F.; Amaral, F.M.M.; Ribeiro, M.N.S.; Malik, S., Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae, *Food Rev Int*, **2018**, 35(2), 105-131.
- [6]. Dob, T.; Dahmane, D.; Benabdelkader, T.; Chelghoum, C, Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut, *Int J Aromather*, **2006**, 16(2), 95-100.
- [7]. Boutaoui, N.; Zaiter, L.; Benayache, F.; Benayache, S.; Carradori, S.; Cesa, S.; Giusti, A.M.; Campestre, C.; Menghini, L.; Innosa, D.; Locatelli, M., Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts, *Molecules*, **2018**, 23, 463.
- [8]. Fadel, H.; Benayache, F.; Benayache, S., Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. and *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl), *Pharm Lett*, **2016**, 8(3), 72-79.
- [9]. Boudjelal, A.; Henchiri, C.; Siracusa, L.; Sari, M.; Ruberto, G., Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion, *Fitoterapia*, **2012**, 83(2), 286-292.
- [10]. Abadi, A.; Hassani, A., Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Eastern Algeria, *ILCPA*, **2013**, 14, 17-24.
- [11]. Benjilali, B.; Hammoumi, M.; Richard, H., Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils 1. compounds characterization, *Sci Aliments*, **1987**, 7(1), 77-91.
- [12]. Houmani, Z.; Azzoudj, S.; Naxakis, G.; Skoula, M., The essential oil composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* ssp. And *Thymus* ssp, *J Herbs Spices Med Plants*, **2002**, 9(4), 275-280.
- [13]. Hazzit, M.; Baaliouamer, A., Composition of essential oils of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. and *Thymus numidicus* Poiret from Algeria, *Rivista Italiana, EPPOS*, **2007**, 43, 11-18.
- [14]. Giordiani, R.; Hadeif, Y.; Kaloustian, J., Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants, *Fitoterapia*, **2008**, 79(3), 199-203.
- [15]. Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Verissimo, A.R.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G., Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils, *Food Chem*, **2009**, 116(3), 714-721.
- [16]. Amarti, F.; Satrani, B.; Ghanmi, M.; Farah, A.; Aafi, A.; Aarab, L.; El-Ajjouri, M.; Chaouch, A., Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc, *Biotechnol Agron Soc Environ*, **2010**, 14(1), 141-148.
- [17]. Zouari, N.; Fakhfakh, N.; Zouari, A.; Bougatef, A.; Karray, A.; Neffati, M.; Ayadi, M.A., Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. (Lamiaceae), *J Food Bioprod Process*, **2011**, 89(4), 257-265.

- [18]. Giweli, A.A.; Dzamic, A.M.; Sokovic, M.D.; Ristic, M.S.; Marin, P.D., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya, *Cent Eur J Biol*, **2013**, 8(5), 504-511.
- [19]. Kouache, B.; Brada, M.; Saadi, A.; Fauconnier, M.L.; Lognay, G.; Heuskin, S., Chemical composition and acaricidal activity of *Thymus algeriensis* essential oil against *Varroa destructor*, *Nat Prod Commun*, **2017**, 12(1), 135-138.
- [20]. Benabdallah, F.Z.; Zellagui, A.; Demirtas, I., Chemical composition of essential oils and antioxidant activities of extracts of two endemic plants from Algeria, *IJPSR*, **2017**, 8(1), 244-250.
- [21]. Benabed, K.H.; Gourine, N.; Ouinten, M.; Bombarda, I.; Yousfi, M., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of three Algerian Lamiaceae species, *J Food Sci*, **2017**, 13(2), 97-109.
- [22]. Bendjabeur, S.; Benchabane, O.; Bensouici, C.; Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Bitam, A., Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria, *J Food Meas Charact*, **2018**, 12(4), 2278-2288.
- [23]. Saleh, M.M.; Glombitza, K.W., Volatile oil of *Marrubium vulgare* and its anti schistosomal activity, *Planta Med*, **1989**, 55, 105-108.
- [24]. Nagy, M.; Svajdenka, E., Comparison of essential oils from *Marrubium vulgare* L. and *M. peregrinum* L., *J Essent Oil Res*, **1998**, 10, 585-587.
- [25]. Weel, K.G.C.; Venskutonis, P.R.; Pukalskas, A.; Gruzdiene, D.; Linssen, J.P.H., Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *Fett Lipid*, **1999**, 101(10), 395-400.
- [26]. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Babanezhad, E., The Essential oil composition of *Marrubium vulgare* L. from Iran, *J Essent Oil Res*, **2008**, 20(6), 488-490.
- [27]. Khanavi, M.; Ghasemian, L.; Hosseiny Motlagh, E.; Hadjiakhoondi, A.; Shafiee, A., Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & C.A. Mey and *Marrubium vulgare* L. from Iran, *Flav Fragr J*, **2005**, 20(3), 324-326.
- [28]. Asadipour, A.; Mehrabani, M.; Nazeri, V.; Tabarraii, M., Composition of the essential oil of *Marrubium vulgare* L, *Ulum-i-Daroei*, **2005**, 2, 77-82.
- [29]. Belhattab, R.; Larous, L.; Figueiri, A.; Pedro, A., Essential oil composition and glandular trichoma of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria, *J Essent Oil Res*, **2006**, 18, 369-373.
- [30]. Kadri, A.; Zarai, Z.; Bekir, A.; Gharsallah, N.; Damak, M.; Gdoura, R., Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia, *Afr J Biotechnol*, **2011**, 10(19), 3908-3914.

- [31]. Salama, M.M.; Taher, E.E.; El-Bahy, M.M., Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* HOFF. ET LINK. and *Marrubium vulgare* L., *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **2012**, 54(5), 281-286.
- [32]. Zawislak, G., The chemical composition of the essential oil of *Marrubium vulgare* L. from Poland, *Farmacia*, **2012**, 60(2), 287-292.
- [33]. EL-Hawary, S.; EL-Shabrawy, A.; Ezzat, S.; EL-Shibany, F., Gas chromatography-mass spectrometry analysis, hepatoprotective and antioxidant activities of the essential oils of four Libyan herbs, *J Med Plant Res*, **2013**, 7(24), 1746-1753.
- [34]. Hamdaoui, B.; Wannas, W.A.; Marrakchi, M.; Brahim, N.; Marzouk, B., Essential oil composition of two Tunisian horehound species: *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium aschersonii* Magnus, *J Essent Oil Bear Pl*, **2013**, 16(5), 608-612.
- [35]. Said-Al-Ahl, H.A.H.; Gendy, A.S.H.; Mahmoud, A.A.; Mohamed, H.F.Y., Essential oil composition of *Marrubium vulgare* L. cultivated in Egypt, *Int J Plant Res*, **2015**, 1(4), 138-141.
- [36]. Golparvar, A.R.; Hadipanah, A.; Mehrabi, A.M.; Armin, A., Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Marrubium vulgare* L. from Iran, *JHD*, **2015**, 6(1), 1-5.
- [37]. Elbali, W.; Djouahri, A.; Djerrad, Z.; Saka, B.; Aberrane, S.; Sabaou, N.; Baaliouamer, A.; Boudarene, L., Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors, *J Essent Oil Res*, **2018**, 30(6), 470-487.
- [38]. Fadel, H.; Benayache, F.; Chalchat, J.C.; Figueredo, G.; Chalard, P.; Hazmoune, H.; Benayache, S., Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) growing in Aures region of Algeria, *Nat Prod Res*, **2019**, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1687473>.
- [39]. Ourzeddine, W.; Fadel, H.; Mechehoud, Y.; Chalchat, J.C.; Figueredo, G.; Chalard, P.; Benayache, F.; Benayache, S., Chemical composition and antioxidant activity of the fruit essential oil of *Zizyphus lotus* (L.) Desf. (Rhamnaceae), *IJPPR*, **2017**, 9(2), 228-232.
- [40]. Adams, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Co, Carol Stream; Illinois, **1995**.
- [41]. Mc Lafferty, F.W.; Stauffer, D.B., The Wiley/NBS registry of mass spectral data 5<sup>th</sup> Edition, J Wiley and Sons, New York, **1991**.
- [42]. Touhami, A.; Chefrou, A.; Boukhari, A.; Ismail, F., Comparative study of chemical compositions and antimicrobial effect of different genius of *Thymus* harvested during two period of development, *J Appl Pharm Sci*, **2016**, 6(8), 51-56.
- [43]. Chemat, S.; Cherfouh, R.; Brahim, Y.; Meklati, B.Y.; Belanteur, K., Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis* genuinus) essential oil, *J Essent Oil Res*, **2012**, 24(1): 5-11.

- [44]. Ait-Ouazzou, A.; Lorán, S.; Bakkali, M.; Laglaoui, A.; Rota, C.; Herrera, A.; Pagán, R.; Conchello, P., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco, *J Sci Food Agric*, **2011**, *91*(14): 2643-2651.
- [45]. Rezazi, S.; Hanini, S.; Si-Moussa, C.; Abdelmalek, S., Kinetic modeling and parameters identification based on metaheuristic optimization techniques for extraction process of *Marrubium vulgare* L. essential oil, *J Agr Sci Tech*, **2017**, *19*, 307-322.
- [46]. Bokaeian, M.; Saboori, E.; Saeidi, S.; Niazi, A.A.; Amini-Borojeni, N.; Khaje, H.; Bazi, S., Phytochemical analysis, antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L against *Staphylococcus aureus* *in vitro*, *Zahedan J Res Med Sci*, **2014**, *16*(10), 60-64.
- [47]. Bayir, B.; Gunduz, H.; Usta, T.; Şahin, E.; Ozdemir, Z.; Kayır, O.; Şen, O.; Akşit, H.; Elmastaş, M.; Erenler, R., Chemical composition of essential oil from *Marrubium vulgare* L. leaves, *J New Res Sci*, **2014**, *6*, 44-50.

## ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة كيميائية نباتية وبيولوجية لـ *Centaurea involucreta* Desf. نبات جزائري والذي لم يكن موضوع أي دراسات كيميائية نباتية من قبل. من جهة ثانية دراسة التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية لكل من *Thymus algeriensis* , *Marrubium vulgare* و *Senecio massaicus* وكذلك تقييم الأنشطة البيولوجية للزيت العطري للنوع الاخير

كما كشف تحليل GC-MS لمستخلص الأثير البترولي من النوع *C. involucreta* عن 13 مركبًا، معظمها لها مجموعة واسعة من الأنشطة بينما أظهر القياس الكمي للأحماض الفينولية والفلافونويدات في مستخلصات الكلوروفورم و n-بيوتانول بواسطة HPLC / DAD وجود 7 مركبات فينولية الأحماض و 3 مركبات فلافونويدية. في حين أن التحديد الكمي لمستخلص أسينات الإيثيل بواسطة LC-MS / MS اعطى 26 مركبًا فينوليًا.

كما سمحت طرق الفصل الكروماتوغرافي المختلفة المستخدمة في هذا البحث من فصل 11 مركبا من مستخلص خلات الإيثيل بحيث تم تحديد هياكل هذه المركبات بفضل الجمع بين نتائج تحاليل أطيف الأشعة فوق البنفسجية UV وطيف الرنين النووي المغناطيسي (RMN) (DEPT;1H, 13C, COZY و HSQC و HMBC و NOESY) وبالمقارنة مع المراجع البيبليوغرافية. في حين أظهرت اختبارات الأنشطة البيولوجية: مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات التكاثر التي أجريت على المستخلصات أن النوع *Centaurea involucreta* له نشاط ملحوظ كمضاد للأكسدة ومضاد للتكاثر.

أظهر تحليل الزيت العطري للأجزاء الهوائية لكل من *Thymus algeriensis* ، *Marrubium vulgare* ، *Senecio massaicus* بواسطة GC-MS أن المكونات الرئيسية هي : germacrène D (29,6%) و  $\beta$ -caryophyllène (11,0%) للنوع *Thymus algeriensis* ،  $\beta$ -bisabolène (36,3%) لـ *M. vulgare* و m-cymene (30.5%) و docosane-11-decyl (10.43%)، n-hexadecanoic acid (14.8%) للنوع *S. massaicus*.  
أظهر الزيت الاساسي لـ *S. massaicus* نشاط معتدل كمضاد للأكسدة، ومن ناحية أخرى يتمتع بقدرة أعلى على تثبيط البيوتريل كولينستراز (BChE) مقارنةً بأسيثيل كولينستراز كما أظهرت دراسة الالتحام الجزيئي أن المركبين docosane-11-decyl glycolmonodecyl ether و octaethylene لهما تفاعلاً قوياً ضد الإنزيمات المرتبطة بمرض الزهايمر و ضد البروتياز الرئيسي Covid-19 و Nsp15 l'endoribucléase.

### الكلمات المفتاحية:

*Centaurea involucreta* Desf., GC/MS, الزيوت الأساسية، الالتحام الجزيئي، كوفيد 19, مضادات التكاثر,

مضادات الكولينستراز.

## ***Abstract***

On the one hand, this study is focused on a phytochemical and biological investigation of *Centaurea involucrata* Desf., an Algerian species that has never been the subject of phytochemical investigation. On the other hand, the chemical composition of the essential oils of *Thymus algeriensis*, *Marrubium vulgare*, and *Senecio massaicus* aerial parts, as well as the assessment of the biological activities of the last specie's essential oil.

The petroleum ether extract of *C. involucrata* was studied using GC-MS, and 13 compounds were identified, the majority of which have a wide range of activities. The HPLC/DAD analysis of phenolic acids and flavonoids of chloroform and *n*-butanol extracts showed the presence of seven phenolic acids and three flavonoids. While, the LC-MS/MS analysis of the ethyl acetate extract showed the presence of 26 phenolic compounds.

The various chromatographics methods of separation used in our research allowed the insulation of 11 products from the ethyl acetate extract. The structures of these compounds were elucidated by combining the results of analyzes of UV spectra, 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and DEPT) and 2D NMR (COZY, HSQC, HMBC and NOESY) and by comparison with data from the literature.

The biological activity tests on the extracts, which included antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity, showed that the species has notable antioxidant and anticancer activities.

The chemical analysis of the essential oil of the aerial parts of *T. algeriensis*, *M. vulgare* and *S. massaicus* by GC-MS, showed that the major constituents are: germacrene D (29.6%), β-caryophyllene (11.0%) for *T. algeriensis*, β-bisabolene (36.3%) for *M. vulgare* and *m*-cymene (30.5%), *n*-hexadecanoic acid (14.8%), and docosane-11-decyl (10.43%) for *S. massaicus*.

The essential oil of *S. massaicus* has on one hand moderate antioxidant activity, and the other hand has a higher power of inhibition against butyrylcholinesterase (BChE) compared to acetylcholinesterase (AChE). The molecular docking study shows that the compounds docosane-11-decyl and octaethyleneglycol monododecyl ether exhibited a strong interaction against enzymes linked to Alzheimer's disease and against the main protease Covid-19 and endoribonuclease Nsp15.

**Keywords:** *Centaurea involucrate* Desf., essential oil, molecular docking, Covid-19, GC/MS, anticancer, anticholinesterase.

## Résumé

Ce travail est basé, d'une part sur l'étude phytochimique et biologique d'une espèce algérienne, *Centaurea involucrata* Desf. qui n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant. En second lieu, sur la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *Thymus algeriensis*, *Marrubium vulgare* et *Senecio massaicus*, ainsi que l'évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de cette dernière espèce.

L'analyse GC-MS de l'extrait d'éther de pétrole de l'espèce *C. involucrata* a permis d'identifier 13 composés dont la plupart possèdent un large éventail d'activités. La quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes des extraits chloroforme et *n*-butanol par HPLC/DAD a révélé la présence de 7 acides phénoliques et 3 flavonoïdes. Alors que la quantification de l'extrait acétate d'éthyle par LC-MS / MS a identifié 26 composés phénoliques.

Les différentes méthodes chromatographiques de séparation utilisées dans notre recherche ont permis d'isoler à partir l'extrait acétate d'éthyle 11 composés. Les structures de ces composés ont été élucidées grâce à la combinaison des résultats des analyses des spectres UV, de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC, HMBC et NOESY) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les tests des activités biologiques : antioxydante, antimicrobienne et antiproliférative réalisés sur les extraits, montrent que l'espèce *Centaurea involucrata* présente une activité antioxydante et antiproliférative remarquable.

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. algeriensis*, *M. vulgare* et *S. massaicus* par GC-MS, a montré que les constituants majoritaires sont : germacrène D (29,6%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,0%) pour *T. algeriensis*,  $\beta$ -bisabolène (36,3%) pour *M. vulgare* et *m*-cymène (30,5%), *n*-hexadécanoïque acid (14,8%), docosane-11-décyl (10,43) pour *S. massaicus*.

L'huile essentielle de *S. massaicus* possède une activité antioxydante modérée, en revanche a un pouvoir d'inhibition plus élevée contre la butyrylcholinestérase (BChE) par rapport à l'acétylcholinestérase (AChE). L'étude docking moléculaire montre que les composés docosane-11-décyl et octaéthylène glycol monododécyl éther ont présenté une forte interaction contre les enzymes liées à la maladie d'Alzheimer et contre la protéase principale Covid-19 et l'endoribonucléase Nsp15.

**Mots clés :** *Centaurea involucrata* Desf., huiles essentielles, docking moléculaire, Covid-19, GC/MS, antiproliférative, anticholinestérase.