

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE HADJ LAKHDAR BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA MATIERE

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Magister en chimie organique

Présenté par

Soumia MOUFFOK

**Etude des métabolites secondaires
de *Centaurea pubescens*
ssp. *omphalotricha* (Asteraceae)**

Soutenu le : 28/ 06/ 2011

DEVANT LE JURY

Mohammed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Président
Hamada HABA	Maître de Conférences Université de Batna	Rapporteur
Belgacem LEGSEIR	Professeur Université de Annaba	Examineur
Ammar DIBI	Professeur Université de Batna	Examineur
Amar ZELLAGUI	Maître de Conférences Université de Oum El Bouaghi	Examineur

Remerciements

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Magister en chimie organique au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de la faculté des Sciences Université de Batna, sous la direction du Docteur **Hamada HABA**, Maître de conférences au Département de chimie.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Monsieur **Hamada HABA** pour m'avoir accueilli au sein du groupe de phytochimie du Laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien illimité et sa grande générosité, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Mohammed BENKHALED** de l'université de Batna pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de mémoire de Magister.

J'aimerais également remercier vivement Monsieur le Professeur **Belgacem LEGSEIR** de l'université de Annaba, Monsieur le Professeur **Ammar DIBI** de l'université de Batna et Monsieur **Amar ZELLAGUI**, Maître de conférences à l'université de Oum El Bouaghi pour avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Tahar BENDAIKHA**, directeur du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de l'université de Batna et doyen de la faculté des Sciences pour la réalisation des spectres Infra-rouge (IR).

J'exprime mes vifs remerciements au professeur **Catherine LAVAUD** et Docteur **Dominique HAKAKAT** de l'institut de chimie moléculaire de Reims France, au Docteur **Christophe LONG** du centre de recherche sur les substances naturelles de Pierre Fabre de Toulouse France et au Professeur **Patrick PALE** de l'université Strasbourg France pour leur aide et disponibilité en me permettant la réalisation des spectres RMN 1D et 2D, Masse et UV.

J'aimerais également remercier vivement ma sœur **Sara MOUFFOK** enseignante à l'université de Batna pour son aide constante et ses précieux conseils pendant toute la durée de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **lotfi LOUCIF** enseignant à l'université de Batna pour la réalisation des tests biologiques relatifs aux activités anti-bactériennes au sein du laboratoire de microbiologie du département de biologie de la faculté des Sciences université de Batna.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme **Naouel MESSADIA**, enseignante à l'université de Batna pour ses précieux conseils.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble, en particulier **Amel, Lynda, Badra, Hassina, Hasna, Leila, Zina, Imane, Wassila et Yamine**.

Dédicaces

Avant tout je remercie mon DIEU tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

A mes chers parents, merci de m'avoir toujours soutenu durant mon enfance et pendant les années d'études, pendant les bons moments et les plus difficiles, merci de m'avoir toujours encouragé et cru en moi et merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté .

A mes chères soeurs (Samia, Sara, Asma, Chaima et Nada)

A mes chers frères Badreddine et Salim

A mes chers petits Nadine, Salsabile et Achraf

*A mon grand père SALAH MOUFFOK et
aux autres membres de ma famille.*

Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation et auxquelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.

Abréviations

AcOEt :	Acétate d'éthyle
EP :	Ether de pétrole
MeOH :	Méthanol
CHCl₃ :	Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
EtOH :	Ethanol
MgSO₄ :	Sulfate de Magnésium
CDCl₃ :	Chloroforme deutéré
CD₃OD :	Méthanol deutéré
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CC :	Chromatographie sur colonne ouverte
CPP :	Chromatographie sur plaque préparative
VLC :	Chromatographie liquide sous vide
SiO₂ :	Gel de silice normale 60F
SiO₂ C₁₈ :	Silice greffée en C-18
s :	Singulet
sl :	Singulet large
d :	Doublet
dd :	Doublet de doublets
td :	Triplet de doublets
m :	Multiplet
RMN ¹H :	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³C :	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
HMBC :	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC :	Heteronuclear single quantum correlation
COSY H-H :	Correlation spectroscopy H-H
SM :	Spectrométrie de masse
ESI :	Spectrométrie de masse par ionisation douce (Electrospray)
δ :	Déplacement chimique

J :	Constante de couplage
uma :	Unité de masse atomique
m/z :	Masse/charge d'un ion
IR :	Infra-rouge
UV :	Ultra-violet
ATP :	Adénosine triphosphate
DMAPP :	Diméthylallyl diphosphate
MVA :	Mévalonate
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
FDP :	Farnésyl diphosphate
GDP :	Géranyl diphosphate
GGDP :	Géranylgéranyl diphosphate
R :	Radicale
Glc :	Glucose
Gla :	Galactose
Rut	Rutinosé
CoA :	Coenzyme-A
°C :	Degré celsius
F :	Fraction
ppm :	Partie par million
Hz :	Hertz
épi :	Epimère
OMe :	Méthoxyle
ATCC :	American type culture collection
MRSA :	<i>Staphylococcus</i> résistante aux antibiotiques méthicillines
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
UFC	Unités formant des colonies
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
PAMA	Plantes alimentaires, médicinales et aromatiques

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

Chapitre I- Rappel bibliographique

I-1-Position systématique de la famille Asteraceae	4
I-2-Caractéristiques botaniques de la famille Asteraceae	4
I-3-Utilisation en médecine traditionnelle	5
I-4-Présentation du genre <i>Centaurea</i>	6
I-5-Métabolites secondaires isolés du genre <i>Centaurea</i>	7

Chapitre II- Etude des Flavonoïdes et Triterpénoïdes

II-1- Les flavonoïdes	27
II-1-1- Généralités sur les flavonoïdes	27
II-1-2- Biosynthèse des flavonoïdes	28
II-1-3- Structures chimiques et classification	30
II-1-4-Substitution du squelette flavonique	31
II-1-5-Rôle des flavonoïdes dans les plantes	31
II-1-6- Importance des flavonoïdes dans l'alimentation	32
II-1-7- Propriétés biologiques des flavonoïdes	32
II-2-Les triterpènes.....	33
II-2-1- Introduction	33
II-2-2- Biosynthèse des triterpènes	33
II-2-3- Intérêts des triterpènes	37

Chapitre III- Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

III-1- Rappel botanique	38
III-2- Extraction	39
III-3- Purification des composés	41

III-4- Caractérisation des produits obtenus	44
III-4-1- Elucidation structurale du composé CP ₂ = CP ₅	44
III-4-2- Elucidation structurale du composé CP ₃	56
III-4-3- Elucidation structurale du composé CP ₄	63
III-4-4- Elucidation structurale du composé CP ₈	72
III-4-5- Elucidation structurale du composé CP ₉	80
III-4-6- Elucidation structurale du composé CP ₆	87
III-4-7- Elucidation structurale du composé CP ₁₁	97
III-4-8- Elucidation structurale du composé CP ₁	102
III-4-9- Elucidation structurale du composé CP ₁₀	112
CONCLUSION.....	118

Chapitre IV- Activités biologiques

IV-1- Introduction.....	120
IV-2- Travaux antérieurs.....	122
IV-2-1- Microbiologie.....	122
IV-2-2- Bactéries.....	122
IV-2-3- Procaryotes.....	122
IV-2-4- Paroi cellulaire.....	123
IV-2-5- Types de bactéries.....	123
IV-2-5-1- Gram négatif.....	123
IV-2-5-2- Gram positif.....	123
IV-2-6- Gélose de MUELLER-HINTON (MH).....	124
IV-2-7- Les antibiotiques.....	124
IV-2-8- Activités biologiques des flavonoides.....	125
IV-2-9- Activités biologiques des triterpènes.....	128
IV-2-10- Mécanisme de l'effet anti-microbien des polyphénols.....	128

Résultats et discussion

IV-3- Résultats.....	129
IV-3-1- Activité anti-bactérienne.....	129
IV-3-2- Activité anti-oxydante.....	132

IV-4- Discussion.....	134
IV-4-1- Activité anti-bactérienne.....	134
IV-4-2- Activité anti-oxydante.....	135
CONCLUSION	136
CONCLUSION GENERALE.....	137

Chapitre V- Partie expérimentale

Partie phytochimie : Extraction-purification et donnés spectrales

V-1- Matériels et appareillage	141
V-1-1- Récolte de la plante <i>Centaurea pubescens</i> Willd. ssp. <i>omphalotricha</i> Batt. ..	141
V-1-2- Chimie extractive	141
V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)	141
V -1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	141
V -1-2-3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	141
V -1-3- Chimie structurale	142
V -1-3-1- Spectroscopie de RMN	142
V-1-3-2- Spectrométrie de masse	142
V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible	142
V-1-3-4- Spectrométrie Infra-Rouge (IR)	143
V-1-3-5- Pouvoir rotatoire	143
V-1-4- Etude de l'espèce <i>Centaurea pubescens</i> ssp. <i>omphalotricha</i>	143
V -1-4-1- Extraction de l'espèce <i>C. pubescens</i>	143
V -1-4-2- Contrôle chromatographique.....	143
V-1-4-3- Etude de l'extrait CH ₂ Cl ₂ de l'espèce <i>C. pubescens</i> ssp. <i>omphalotricha</i> .	144
V-1-4-4-Purification.....	146
V-1-4-4-1- Etude de la fraction F-3' = F-3 + F-4.....	146
V-1-4-4-2- Etude de la fraction F-6' = F-5 + F-6.....	147
V-1-4-4-3- Etude de la fraction F-8' = F-8 + F-7.....	148

V-1-4-4- Etude de la fraction F-10.....	150
V-1-5- Composés isolés de l'espèce <i>Centaurea pubescens</i>	152

Partie biologie : Activités biologiques

V-2-Matériel et méthode.....	157
V-2-1-Matériel végétal.....	157
V-2-2- Activité anti-bactérienne.....	157
V-2-2-1-Matériel biologique.....	157
V-2-2-1-1-Les germes testés.....	157
V-2-2-1-2-Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	157
V-2-2-2-Méthode.....	158
V-2-2-2-1-Préparation de l'extrait végétal.....	158
V-2-2-2-1-a-Pulvérisation.....	158
V-2-2-2-1-b-Préparation des extraits organiques de <i>Centaurea pubescens</i>	158
V-2-2-2-1-c-Tests de l'activité anti-bactérienne	158
V-2-2-2-1-d-Lecture des résultats.....	158
V-2-3-Activité anti-oxydante.....	159
Bibliographie.....	160
Liste des Figures.....	173
Liste des Tableaux.....	178

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'antiquité, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes médicinales dans tous les continents du globe pour le traitement de diverses maladies est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. Cette pratique ancestrale connaît à ce jour un engouement remarquable au niveau de plusieurs franges de la population à travers le monde.

Les ressources naturelles en plantes alimentaires, médicinales et aromatiques (PAMA) constituent une richesse pour le développement socio-économique des populations de l'Algérie et en particulier celles des régions des Aurès et du nord du Sahara. L'étude chimique de ces ressources (PAMA) est un sujet porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques sont toujours en concurrence pour l'élaboration de nouveaux principes actifs d'origine végétale. Les activités de recherche passent tout d'abord par la récolte et l'identification des espèces végétales présentant un intérêt en médecine traditionnelle en particulier, à l'extraction de la matière végétale, au criblage biologique des extraits obtenus, à l'isolement des biomolécules ainsi qu'à leur caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques et à l'évaluation biologique des produits isolés à l'état pur. Les structures découvertes ayant un potentiel pharmacologique intéressant vont servir de modèle moléculaire pour la conception de nouveaux médicaments et faire face à la résistance bactérienne aux antibiotiques. A cet effet, des investissements colossaux ont été entrepris par des boîtes pharmaceutiques à travers le monde pour la mise au point de médicaments susceptibles de guérir des maladies telles que : le cancer, le sida et le diabèteetc.

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est dû en grande partie à la prescription massive d'antibiotiques par les médecins et leur mauvaise administration ^[1,2]. Egalement, l'utilisation des antibiotiques en agriculture comme promoteurs de la croissance et dans la prévention des infections est suspectée de contribuer au développement de souches résistantes non seulement chez les animaux, mais aussi chez les populations humaines ^[3]. Fait intéressant, aux États-Unis, plus de 50% des antibiotiques produits sont utilisés en agriculture et la situation est sensiblement la même à travers le monde ^[4].

Étant donné que les plantes médicinales offrent diverses biomolécules utilisées comme remèdes contre plusieurs maladies et qu'une frange importante de la population en Algérie et

notamment au niveau des zones rurales a recours aux plantes médicinales, réputées pour leurs vertus thérapeutiques, il est impératif de donner beaucoup d'importance à cette catégorie d'espèces végétales d'une part, et d'autre part, construire du savoir autour des plantes médicinales et de réaliser des recherches phytochimique et pharmacologique sur cette ressource naturelle pour en isoler de nouvelles biomolécules aux activités biologiques prometteuses. Cette thématique transversale s'intéresse donc à la substance naturelle, support de l'activité biologique. La chimie et la biologie sont donc indispensables pour préciser la relation structure-activité des biomolécules, notamment celles d'intérêts thérapeutiques. Ces composés bioactives sont vraisemblablement à l'origine du développement de l'industrie pharmaceutique.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés et d'activités biologiques d'origine végétale qui peuvent trouver en général des applications thérapeutique, cosmétique et agroalimentaire, notre laboratoire a entamé un programme de recherche destiné à la valorisation des ressources naturelles d'origine végétale poussant dans les régions des Aurès et du nord de Sahara. Les critères de sélection des plantes objets d'études sont basés sur l'endémisme et/ou l'utilisation en médecine traditionnelle. Dans cet ordre d'idées, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et biologique d'une plante saharienne *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. appartenant à la famille des Asteraceae. Cette espèce endémique pour l'Algérie et la Tunisie ^[5] n'a pas fait l'objet antérieurement d'investigations chimique et biologique.

Les travaux de recherche dénotent largement que la famille des Asteraceae est la plus vaste du règne végétal et est constituée de plusieurs genres. Parmi, les genres qui composent cette famille, on peut citer les genres *Artemisia*, *Cotula*, *Matricaria*, *Chrysanthemum*, *Atractylis*, *Asteriscus*, *Pulicaria*, *Scorzonera*, *Launaea* et *Centaurea* ^[5]. Ce dernier présente une large distribution géographique et se rencontre en Europe, Asie, Afrique, Amérique du Nord (Canada et USA) et Australie ^[6].

Les espèces du genre *Centaurea* sont riches en biomolécules appartenant à différentes classes de métabolites secondaires tels que les sesquiterpènes lactones, triterpènes, stéroïdes et polyphénols et particulièrement les flavonoïdes. Ces derniers considérés comme constituants typiques de la famille Asteraceae en général et du genre *Centaurea* en particulier agissent

comme antioxydants primaires et stabilisent les radicaux peroxydes et encore chélatent les métaux ^[7].

Le premier chapitre de ce travail concerne tout d'abord l'étude bibliographique de la plante. Cette étude commence par une description botanique de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., description qui permet de positionner cette espèce dans la systématique des plantes Asteraceae. Elle se poursuit également par les travaux de chimie antérieurs relatifs à plusieurs espèces du genre *Centaurea*.

Le deuxième chapitre a trait à l'étude des flavonoïdes et triterpénoïdes tout en présentant leurs définitions, classifications, biogenèses et propriétés biologiques.

Le troisième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques personnels obtenus à partir des parties aériennes de la plante *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. Cette partie du mémoire décrit l'isolement, la purification et la caractérisation structurale de neuf produits naturels issus de l'extrait CH₂Cl₂ ainsi que les techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées.

Le quatrième chapitre présente particulièrement des testes de recherche d'activité antibactérienne et anti-oxydante des extraits végétaux préparés : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol et des biomolécules isolées de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de l'espèce *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

Le cinquième chapitre résume les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de l'investigation phytochimique de l'extrait CH₂Cl₂ des parties aériennes de la plante *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. et de l'évaluation biologique des extraits végétaux (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) et des biomolécules isolées.

A la lumière des résultats obtenus tant phytochimique que biologique, différentes perspectives de recherche seront évoquées à la fin du manuscrit.

Chapitre I

Rappel bibliographique

I-1- Position systématique de la famille Asteraceae

La famille Asteraceae est la plus vaste de la classe des dicotylédones, car elle comprend environ 900 genres et entre 15 000 et 20 000 espèces selon les estimations, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. Ce sont des plantes herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes^[8].

I -2- Caractéristiques botaniques de la famille Asteraceae

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre^[9].

La fleur des Astéracées est très particulière : les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des « brosses à pollen ». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut penser qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées sous-tendu par un involucre de bractées disposées sur un à plusieurs rangs. Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Les capitules sont disposés en cymes ou en corymbes ou quelques fois réunis en glomérules, dans ce cas, ils sont uniflores (*Echinops*).

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée *pappus* qui favorise la dispersion des graines par le vent^[10] (figure-I-1).

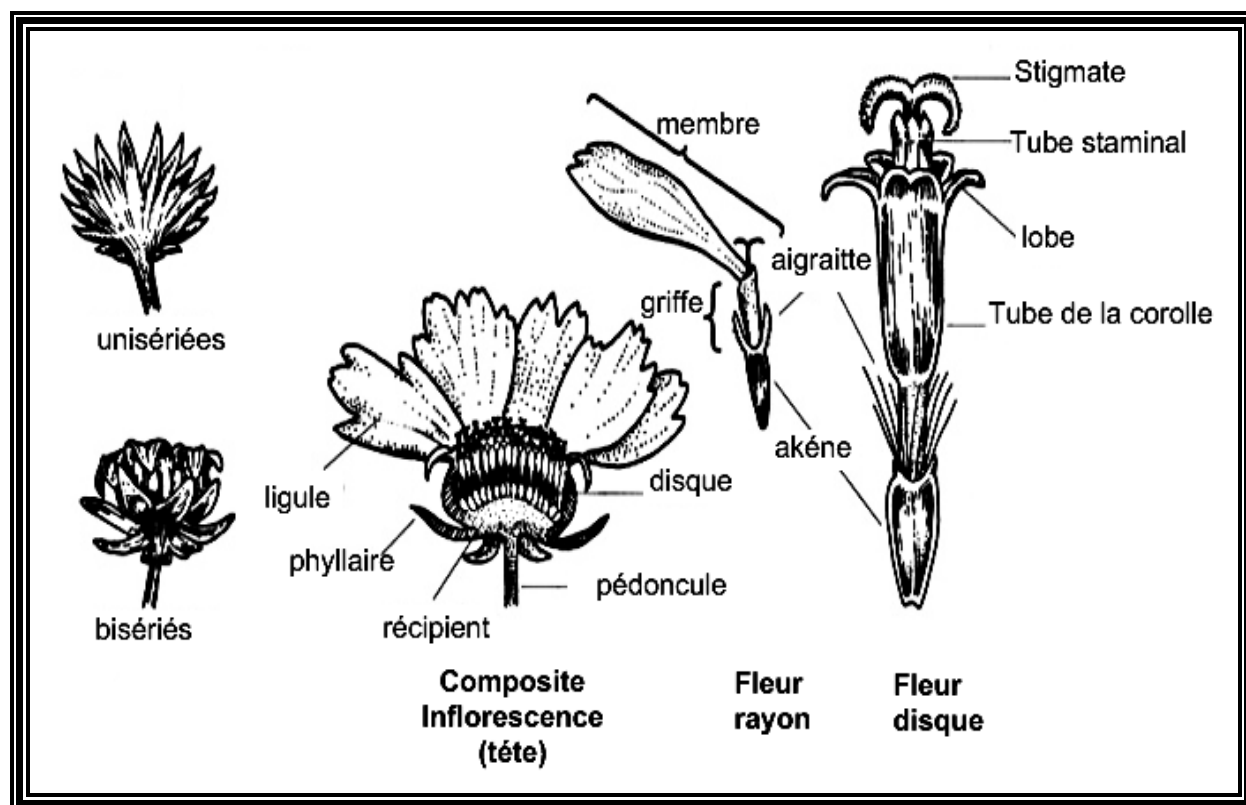


Figure-I-1: Taxonomie des Asteraceae

I -3- Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes Asteraceae sont largement utilisées en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies ^[11]. Cette utilisation à grande échelle par les sociétés ne pouvant pas accéder à la médecine moderne, en fait un argument prépondérant qui justifie les travaux intensifs de recherches réalisés tant du point de vue phytochimique que pharmacologique. A ce jour, nombre d'espèces sont utilisées en médecine traditionnelle. On citera :

Centaurea chamaerhaponticum Bail.: A Marrakech et à Fès, les racines, fraîches ou sèches, en décoction, sont utilisées dans le traitement des maladies du foie, de l'estomac et des intestins.

Centaurea maroccana Ball. et *C. calcitrapa* L.: A Marrakech et dans la région de Kalâa des Sraghna, les sommités fleuries, en décoction, sont employées contre les palpitations.

Centaurea pungens Pomel.: A Tissint, la plante entière, réduite en poudre, est utilisée par voie orale pour combattre les refroidissements.

Centaurea montana L.: Cette plante est utilisée contre les dyspepsies. Employée en collyre ou compresse, elle soigne les affections des yeux aussi, elle est connue comme diurétique ^[5].

I -4-Présentation du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles 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. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, multiflores homomorphes ou dimorphes, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longues ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque ^[5].

Le genre *Centaurea* qui totalise environ 500 espèces, présente une large distribution géographique. Ce genre se rencontre en Europe, Asie, Afrique, Amérique du Nord (Canada et USA) et Australie ^[6]. Quelques exemples sont résumés dans le tableau 1 qui suit :

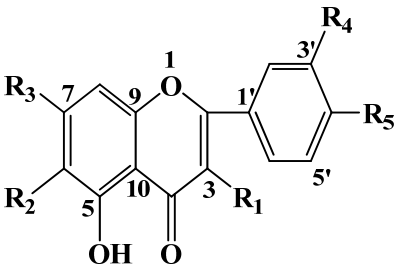
Tableau 1: Espèces du genre *Centaurea*

Localisation	Espèces
Région méditerranéenne.	<i>C. calcitrapa</i> , <i>C. hololeuca</i>
Afrique du Nord	<i>C. chamaerhaponticum</i> , <i>C. pullata</i>
Toute l'Europe	<i>C. maroccana</i> , <i>C. Ptosimopappa</i>
Saharienne	<i>C. ruthencia</i> , <i>C. Tougourensis</i>
Europe de l'Est.	<i>C. solstitialis</i> , <i>C. diffusa</i>
Algérie	<i>C. pubescens</i> , <i>C. Musimomum</i>

I -5-Métabolites secondaires isolés du genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* est connu pour produire des lactones sesquiterpéniques du groupe des germacranolides et des guainolides ^[11]. Les flavonoïdes ont été signalés dans de nombreuses espèces *Centaurea* et près de 80 taxons ont été étudiés pour leur contenu en composés flavonoïdiques, isolés à partir des feuilles, des parties aériennes et parfois des racines (Tableau 2), et identifiés comme des flavones, flavonols, 6-deoxyflavones, et leurs *O*- et *C*-glycosides ^[6].

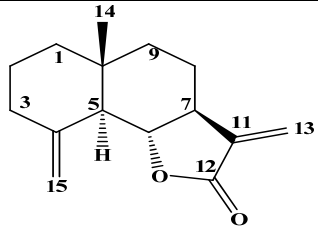
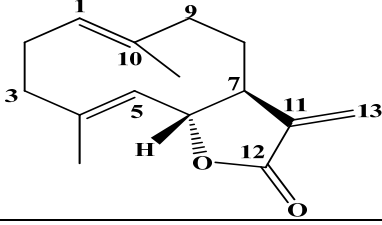
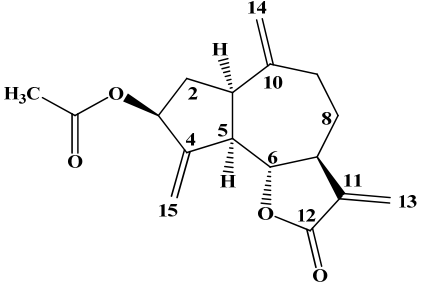
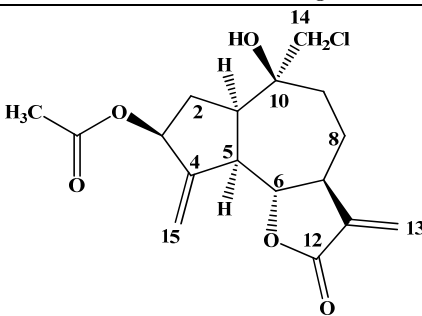
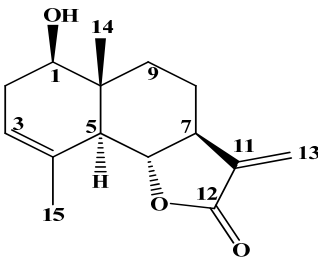
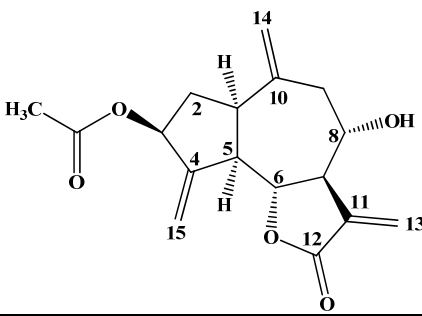
Tableau 2: Métabolites secondaires isolés du genre *Centaurea*

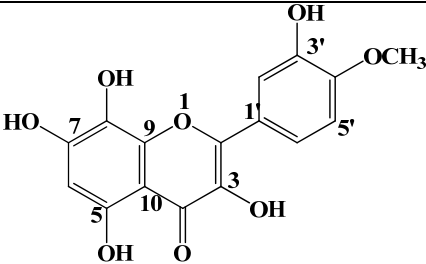
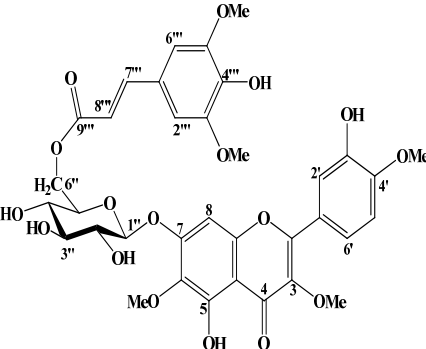
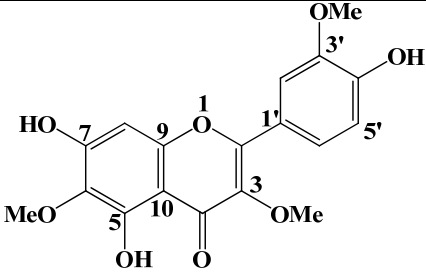
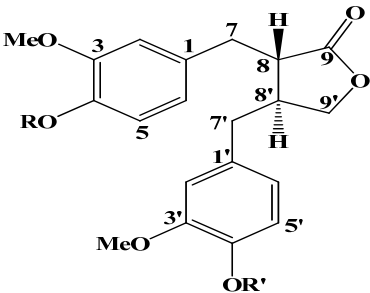
Nom du composé	Structure	Plante	Réf.
Patuletine : R ₁ = OH; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = OH; R ₄ = OH; R ₅ = OH.		<i>C. ruthenica</i>	[6]
Patuletine 7- <i>O</i> -glucoside: R ₁ = OH; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = OGlc ; R ₄ = OH; R ₅ = OH.			
Patuletine 3,7-di- <i>O</i> -glucoside: R ₁ = OGlc; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = OGlc; R ₄ = OH; R ₅ = OH			
Quercétagine: R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OH; R ₅ = OH			

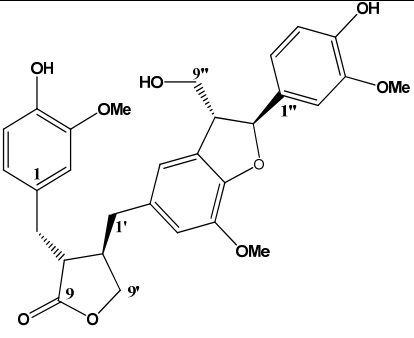
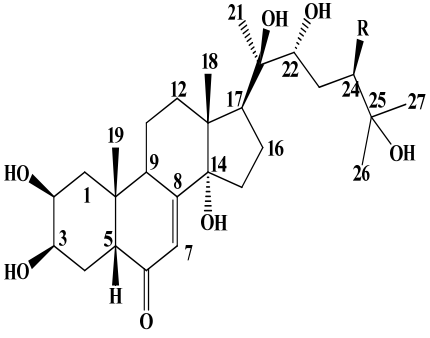
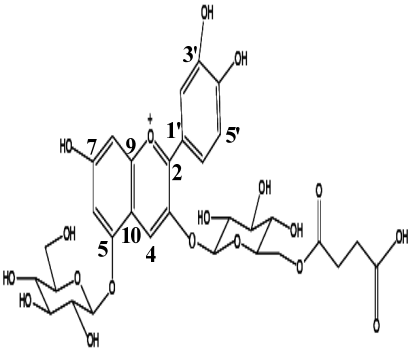
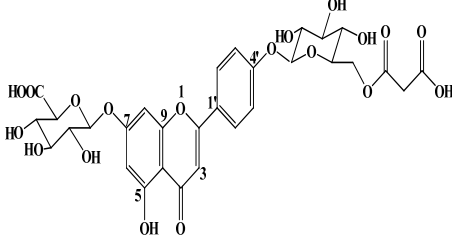
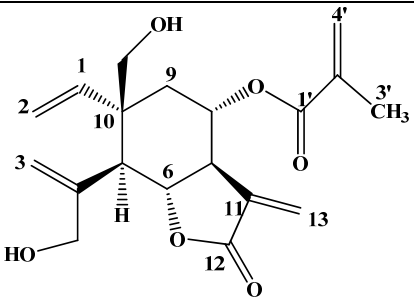
Quercétagine 7-<i>O</i>-glucoside: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{OGlc};$ $R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}.$			
6-méthoxykaempferol: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH};$ $R_4 = \text{H}; R_5 = \text{OH}.$			
6-méthoxykaempferol 7-<i>O</i>-glucoside: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OGlc};$ $R_4 = \text{H}; R_5 = \text{OH}$			
Axillarine: $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH};$ $R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}.$			
Axillarine 7-<i>O</i>-galactoside: $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OGal};$ $R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}.$			
Axillarine 7-<i>O</i>-glucoside: $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OGlc};$ $R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}.$			
Jaceosidine: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH};$ $R_4 = \text{OCH}_3; R_5 = \text{OH}.$			
Jaceosidine 7-<i>O</i>-glucoside: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OGlc};$ $R_4 = \text{OCH}_3; R_5 = \text{OH}.$			
Quercétine 3-<i>O</i>-glucoside: $R_1 = \text{OGlc}; R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH};$ $R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}.$			

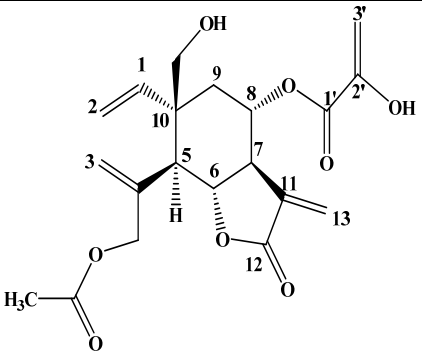
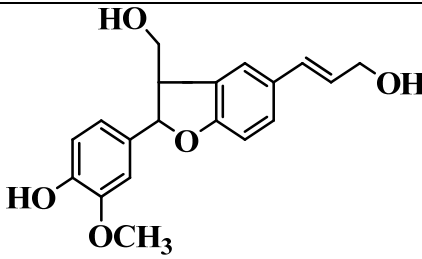
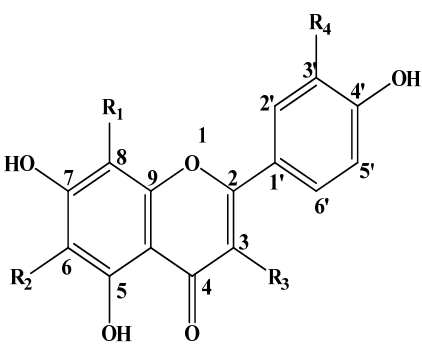
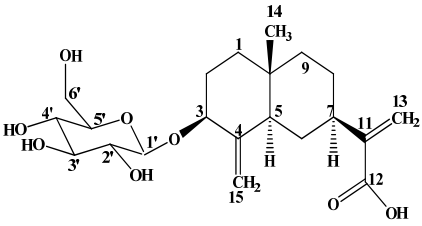
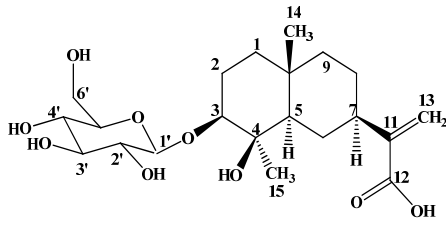
C. ruthenica

[6]

β-cyclocostunolide (5αH, 6βH, 7αH, 10βCH₃-eudesma - 4(15), 11(13)-dièn-6, 12-olide)		<i>C. acaulis</i>	[12]
Costunolide (6βH, 7αH-germacra - 1(10), 4(5)-dièn-6, 12-olide)			
Zaluzanine D (3β-acétoxy-1αH, 5αH, 6βH, 7αH-guaia-4(15), 10(14), 11(13)-trièn-6, 12-olide)			
14-chloro-10β-hydroxy-10(14)-dihydrozaluzanine D (3β-acétoxy-14-chloro-10β-hydroxy-1αH, 5αH, 6βH, 7αH-guaia-4(15), 11(13)-dièn-6, 12-olide)			
Santamarine (1β-hydroxy-5αH, 6βH, 7αH, 10βCH₃-eudesma-3(4), 11(13)-dièn-6, 12-olide)			
Kandavanolide (3β-acétoxy-8α-hydroxy-1αH, 5αH, 6βH, 7αH-guaia-4(15), 10(14), 11(13)-trièn-6, 12-olide)			

4'-méthylgossypetine			
Algérianine		<i>C. africana</i>	[13]
Jaceidine			
Americanine: R = D-(3-O-caffeoyl)-gluco- pyranosyl R' = Me Arctiine: R= D-glucopyranosyl R' = Me Matairesinoside : R = D-glucopyranosyl R' = H Matairesinol : R = H R' = H Arctigenine: R = H R' = Me		<i>C. americana</i>	[14]

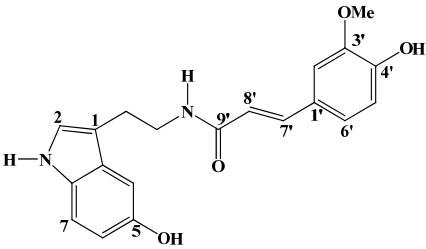
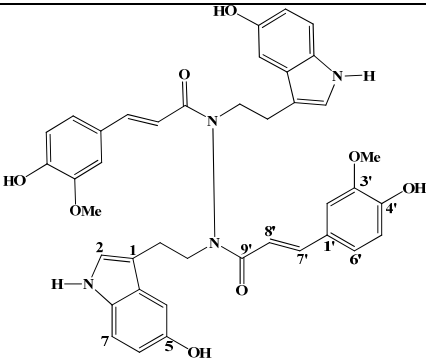
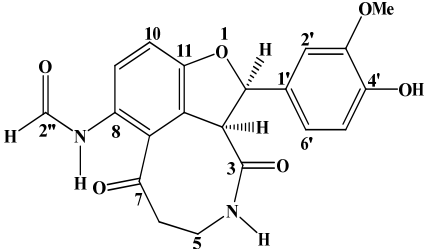
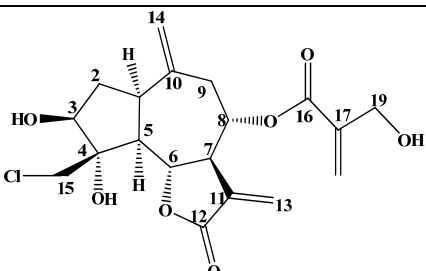
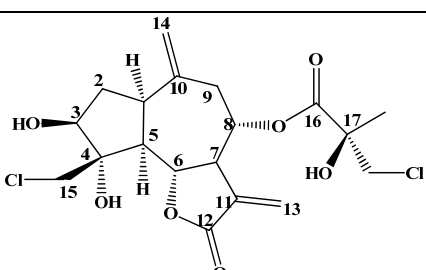
Lappaol A			
20-Hydroxyecdysone: R = H Makisterone A: R = Me		<i>C. americana</i>	[14]
Cyanidine 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -succinyl-glucoside) -5- <i>O</i> -glucoside		<i>C. cyanus</i>	[15]
Apigenine 7- <i>O</i> -glucuronide-4'- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -malonylglucoside)			
Hierapolitanine A		<i>C. hierapolitana</i>	[16]

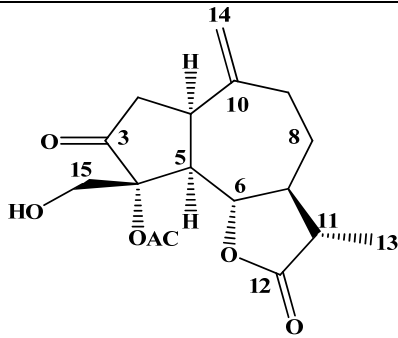
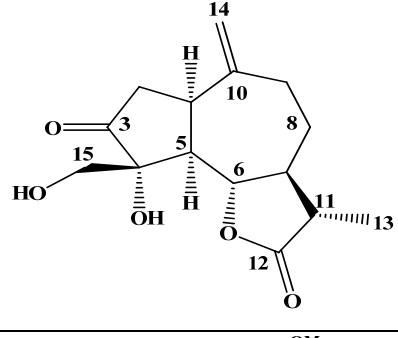
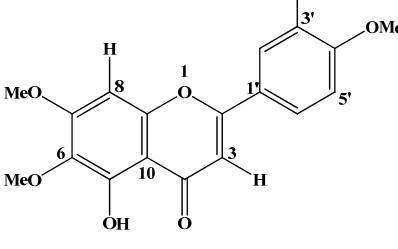
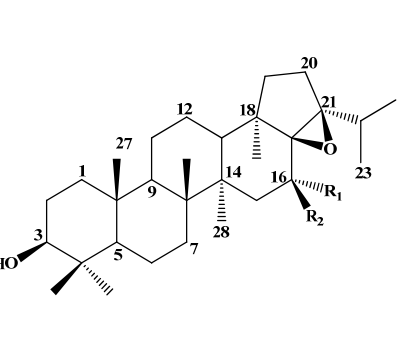
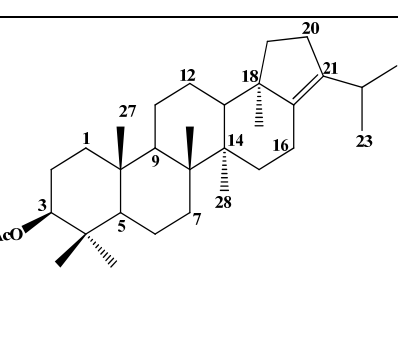
Hierapolitanine B		C. <i>hierapolitana</i>	[16]
Dehydrodiconiferol			
Hispiduline : $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H, R_4 = H$ Jaceocidine : $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H, R_4 = OCH_3$ Shaftoside : $R_1 = R_2 = Glu, R_3 = R_4 = H$ Kaempferol 3-O-rutinoside : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = ORut, R_4 = H$			
Hierapolitanine C			
Hierapolitanine D			

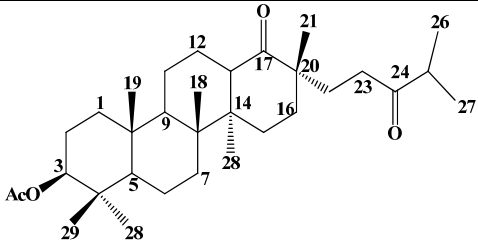
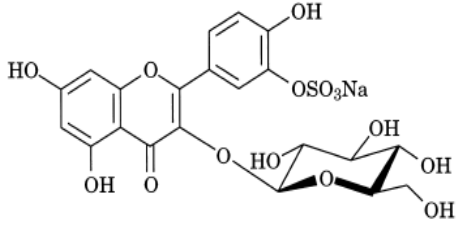
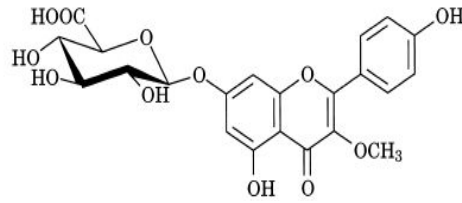
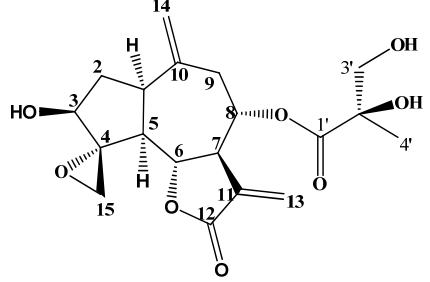
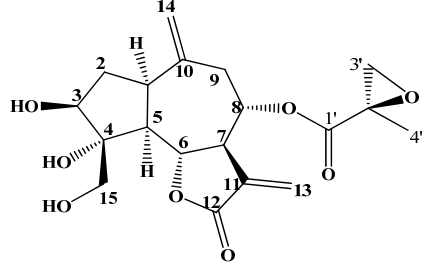
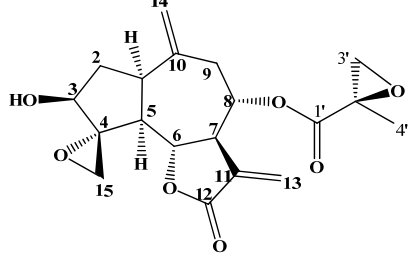
Isoorientine		<i>C. macrocephala</i>	[17]
Isovitexine			
Arctigenine			
Chrysine 7- <i>O</i> -β-galactopyranuronoside		<i>C. pseudoscabiosa</i>	[18]
Baicaleine 6-méthylether-7- <i>O</i> -β-galactopyranuronoside			
Pinocembrine 7- <i>O</i> -α-arabino-pyranosyl-(1→2)-β-glucopyranoside			

Zaluzanine D: R = Ac Zaluzanine C: R = H		<i>C.</i> <i>ptosimopappa</i>	[19]
Arctigenine: R = H Matairesinol: R = Me			
Janerine			
Chlorojanerine			
Cynaropicrine			

Deacylcynaropicrine		<i>C. ptosimopappa</i>	[19]
11 α ,3 α -dihydrodeacylcynaropicrine			
11 β ,3 α -dihydrodeacylcynaropicrine			
4 β ,15-dihydro-3-dehydro-solstitialine A: R = R ₁ = H 4 β ,15-dihydro-3-dehydro-solstitialine A diacétate: R = R ₁ = Ac			
Montanoside		<i>C. montana</i>	[20]

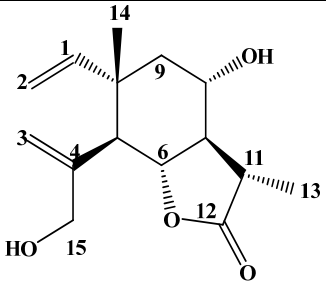
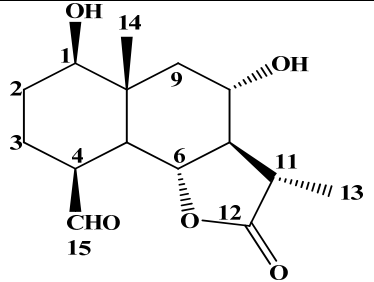
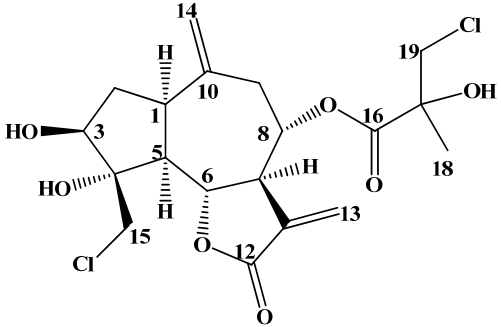
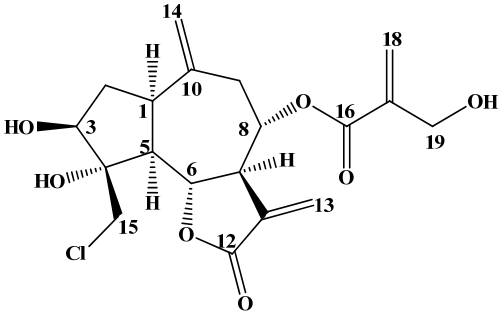
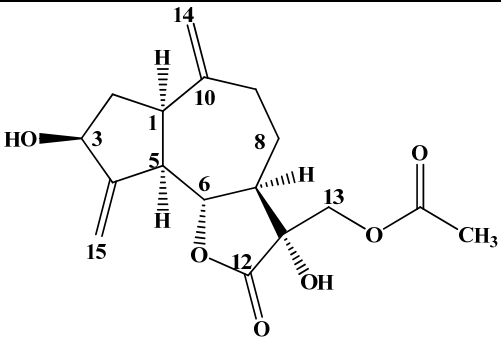
Moschamine			
Montamine		<i>C. montana</i>	[20]
Moschamide		<i>C. moschata</i>	[21]
Chlorojanerine		<i>C. alba et conifera</i>	[22]
Centaurepsine			

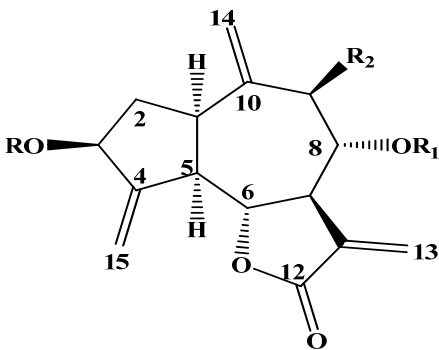
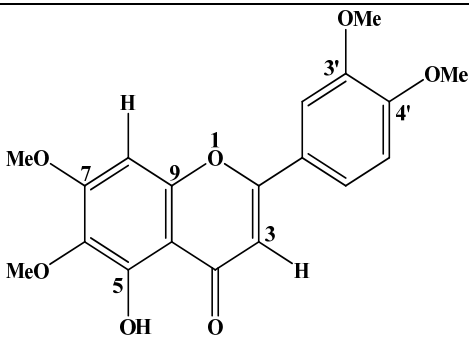
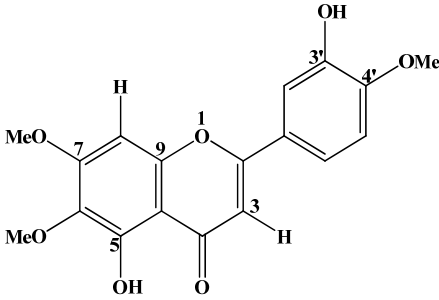
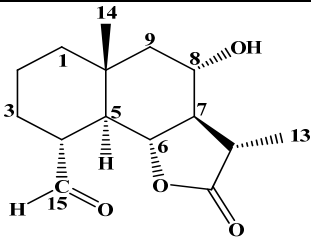
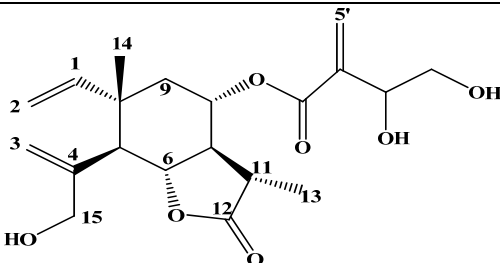
3-oxo-4 α -acétoxy-15-hydroxy-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H,11 β H-guai-10(14)-èn-6,12-olide		<i>C. musimomum</i>	[23]
3-oxo-4 α -hydroxy-15-hydroxy-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H,11 β H-guai-10(14)-èn-6,12-olide.			
5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone			
17 β ,21 β -époxy-16 α -éthoxyhopan-3 β -ol : R ₁ = OCH ₂ CH ₃ R ₂ = H 17 β ,21 β -époxyhopan-3 β -ol : R ₁ = R ₂ = H		<i>C. ptosimopappoides</i>	[24]
3 β -acétoxyhop-17(21)-ène			

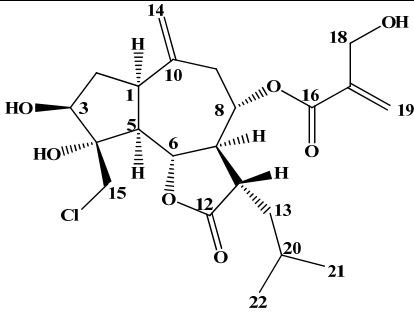
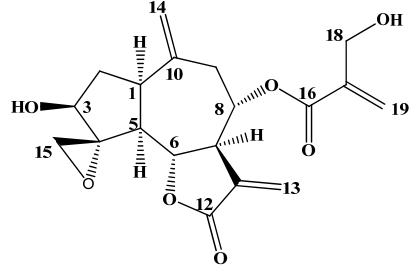
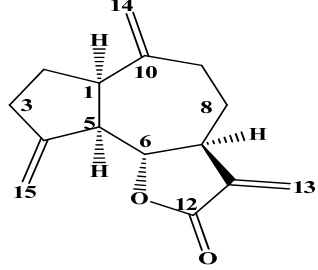
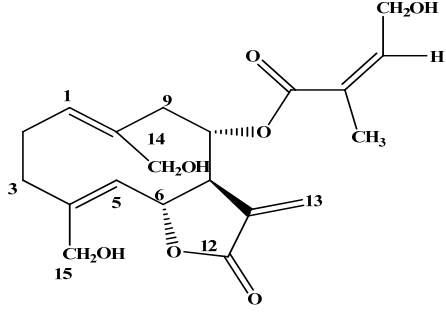
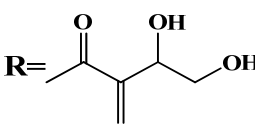
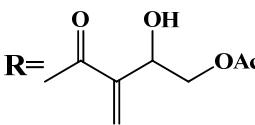
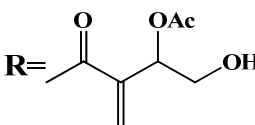
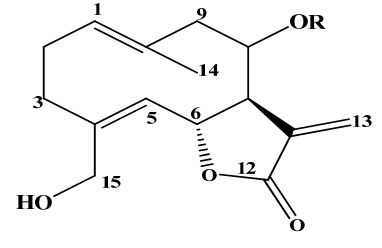
3 β -acétoxy-17,24-dioxo-baccharane		<i>C. ptosimopappoides</i>	[24]
Centabracteine		<i>C. bracteata</i>	[25]
Bracteoside			
Babyline A			
Babyline B		<i>C. babylonica</i>	[26]
Repine			

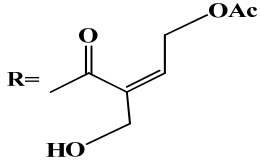
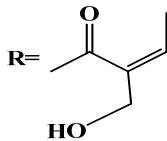
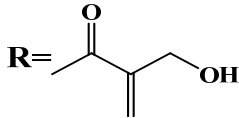
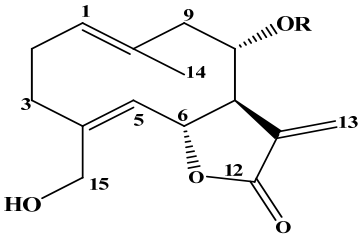
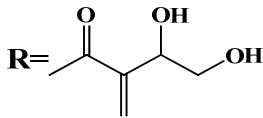
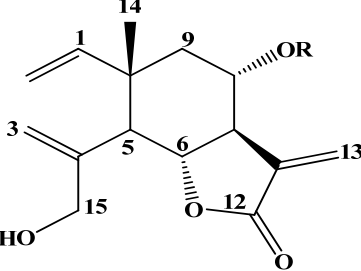
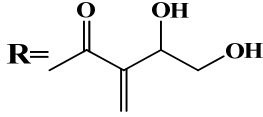
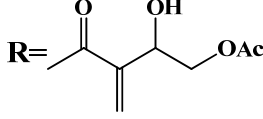
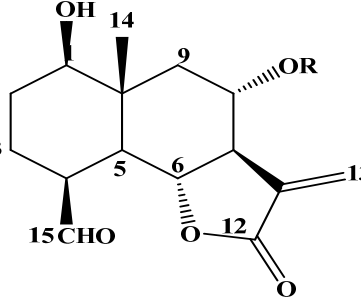
Chlorohyssopifoline			
Janerine		<i>C. babylonica</i>	[26]
Cebelline			
11β,13-dihydrocnicine $R =$ 11β,13-dihydro-19-désoxy cnicine $R =$			
8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxyangeloyl)-11 β ,13-dihydrocnicine		<i>C. pullata</i>	[27]

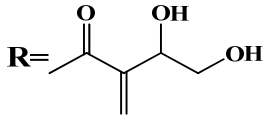
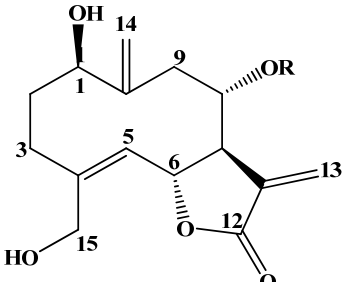
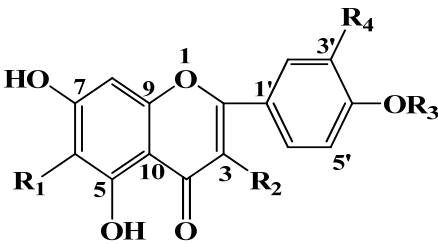
11 β ,13-dihydrosalonitenolide		<i>C. pullata</i>	[27]
8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-11 β ,13-dihydrosonchucarpolide			
8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide			
8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide			
8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)melitensine			

Melitensine		<i>C. pullata</i>	[27]
8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-onopordaldehyde			
Centaurepsine			
Chlorojanerine		<i>C. solstitialis</i>	[28]
13-acétylsolstitialine A			

Kandavanolide : $R = \text{Ac}, R_1 = R_2 = \text{H}$ Salograviolide A: $R = \text{Ac}, R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$ 3-deacetyl-9-O-acétyl-Salograviolide A: $R = R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OAc}$		<i>C. nicolai</i>	[29]
5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone		<i>C. granata</i>	[30]
5,3'-dihydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone			
8α-hydroxy-11β,13-dihydroonopordaldehyde			
(5R,6R,7R,8S,10S,11S)-15-hydroxy-8-(1,2-dihydroxyéthyl)-acryloxyelema-1,3-dièn-6,12-olide.		<i>C. nicaensis</i>	[31]

Diaine		<i>C. scoparia</i>	[32]
Janerine			
Guaianolide Dehydrocostus lactone			
Germacranolide Jurineolide			
Cnicine :  4'-acétylcnicine :  3'-acétylcnicine : 		<i>C. moesiaca</i>	[33]

Salonitenolide-8-<i>O</i>-(4'-acétoxy-5'-hydroxy-angelate)  8α-(5-hydroxy)-angeloyl-salonitenolide :  Onopordopicrine : 		
8α-(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-dehydro-melitensine 		<i>C. moesiaca</i>
Malacitanolide :  8α-(3-hydroxy-4-acétoxy-2-méthylènebutanoyloxy)-4-épi-sonchucarpolide 		[33]

8α-acyloxy-1,15-dihydroxy-4<i>E</i>,10(14),11(13)-germacra-trièn-12,6α-olide  $\text{R} = \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$			
Pectolinarigenine: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$, $\text{R}_4 = \text{H}$ Jaceidine: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{OCH}_3$. Centaureidine: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{Me}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$. Desméthoxycentaureidine: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$ kaempferol-3,6-diméthyl ether: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{H}$. Hispiduline: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{H}$. Isokaempferide: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{H}$. Apigenine: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$. Axillarine: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$.		<i>C. moesiaca</i>	[33]

A l'issue de cette recherche bibliographique exhaustive, il est à relever aisément que les flavonoïdes, les triterpènes et les sesquiterpènes lactones constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferment les plantes du genre *Centaurea*. Ces métabolites sont particulièrement caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques à savoir : RMN 1D et 2D, Masse, UV, IR,....etc. Ces composés possédant des activités biologiques intéressantes (anti-oxydante, anti-bactérienne, anti-fongique, anti-inflammatoire....etc.), sont tout à fait typiques des plantes du genre *Centaurea* en particulier et de la famille Asteraceae en général.

Chapitre II

Etude des Flavonoïdes et Triterpénoïdes

II-1- Les flavonoïdes

II-1-1- Généralités sur les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin ``*flavus*`, signifiant ``jaune`` est attribué aux composés possédant un squelette à 15 atomes de carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6) ^[34]. Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure II-1).

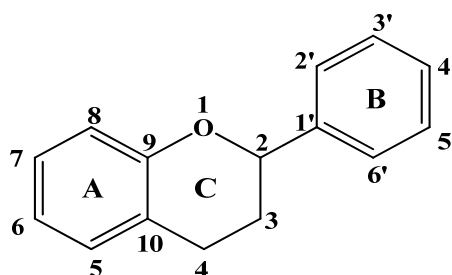


Figure II-1: Structure de base des flavonoïdes.

Ils ont été isolés par le scientifique Chervreuil E. En 1814, mais ont été réellement découverts en 1937, par Albert Szent-Györgyi, qui mit en exergue leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aurones, anthocyanes et tanins.

Plusieurs études ont souligné que les flavonoïdes de différentes sources botaniques agissent comme anti-oxydants puissants encore plus que la vitamine C ^[34]. Cette action est due principalement à la configuration catéchol du noyau B. Cette activité s'exerce surtout dans les milieux émulsionnés car ils sont peu solubles dans les phases lipidiques et protègent efficacement les lipoprotéines ou liposomes ^[7].

Les flavonoïdes agissent comme anti-oxydants primaires et stabilisent les radicaux peroxydes, mais peuvent aussi désactiver l'ion super-oxyde, le radical OH[•] ou l'oxygène singulet et inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les métaux ^[7].

II-1-2- Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose (voie de la glycolyse).

Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA, le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase).

Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à un seul énantiomère 2(S)-flavanone: la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes ^[35] (Figure II-2).

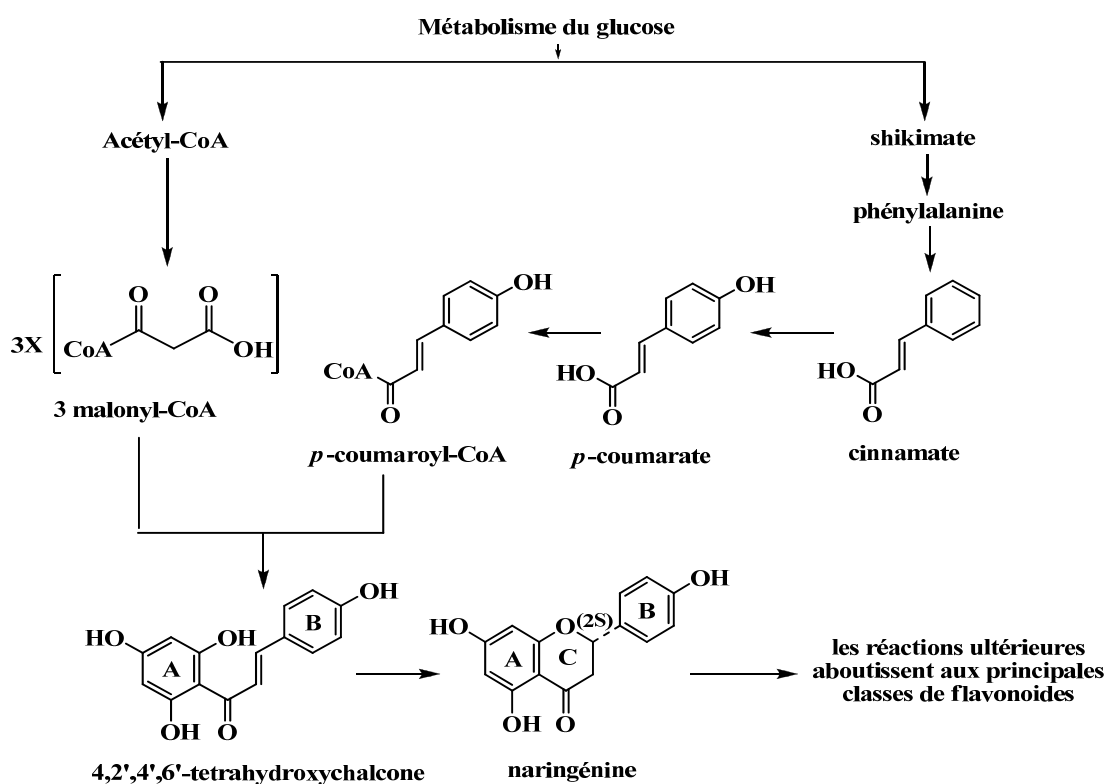


Figure II-2: Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyle CoA et de la phénylalanine.

La chalcone "4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone" est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes: flavanone, aurone, flavanonol, flavone, anthocyane et flavonol (Figure II-3).

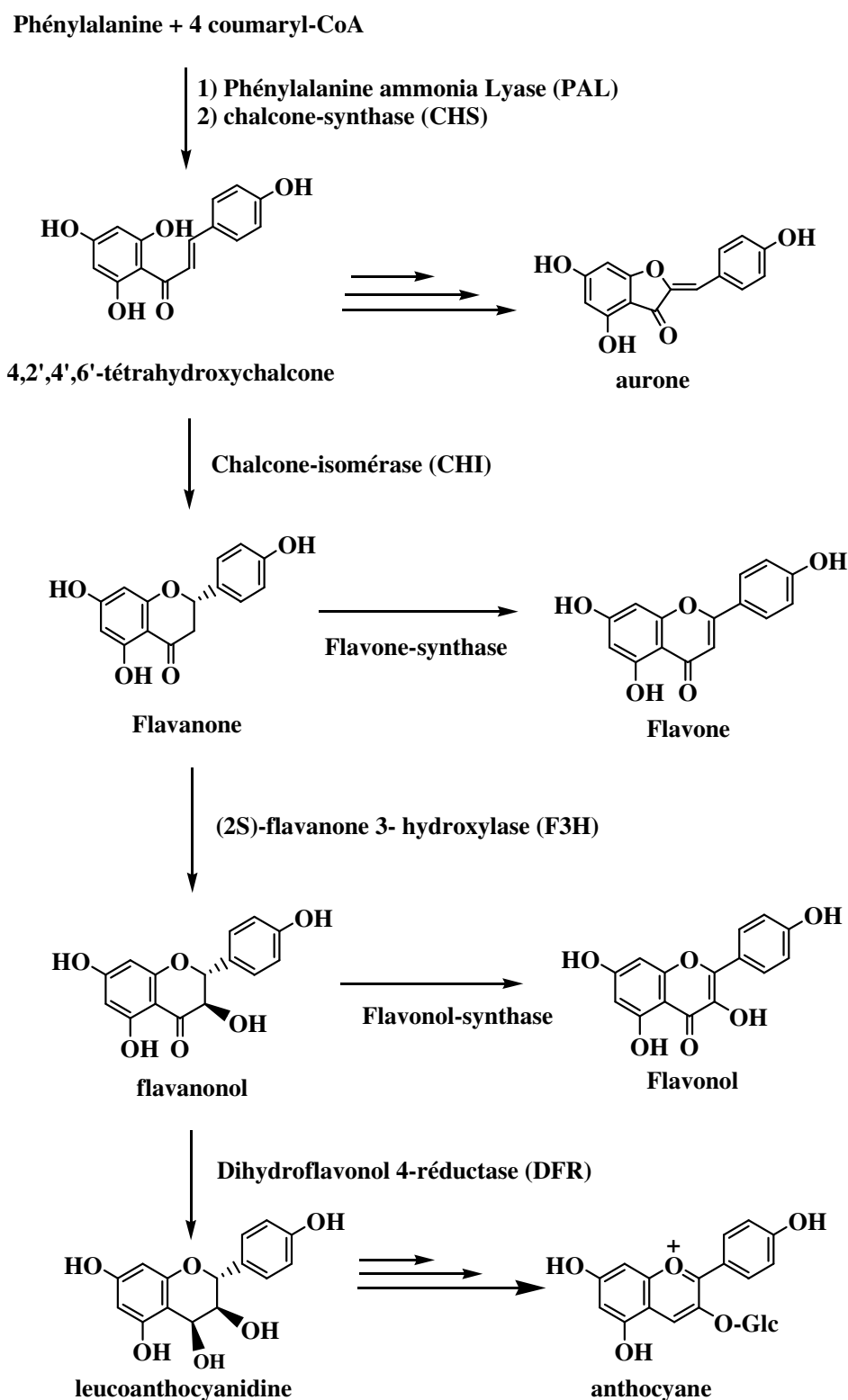


Figure II-3: Schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales classes de flavonoïdes.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

II-1-3- Structures chimiques et classification

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes existe: les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aurones, anthocyanes et isoflavones ^[36] (Figure II-4).

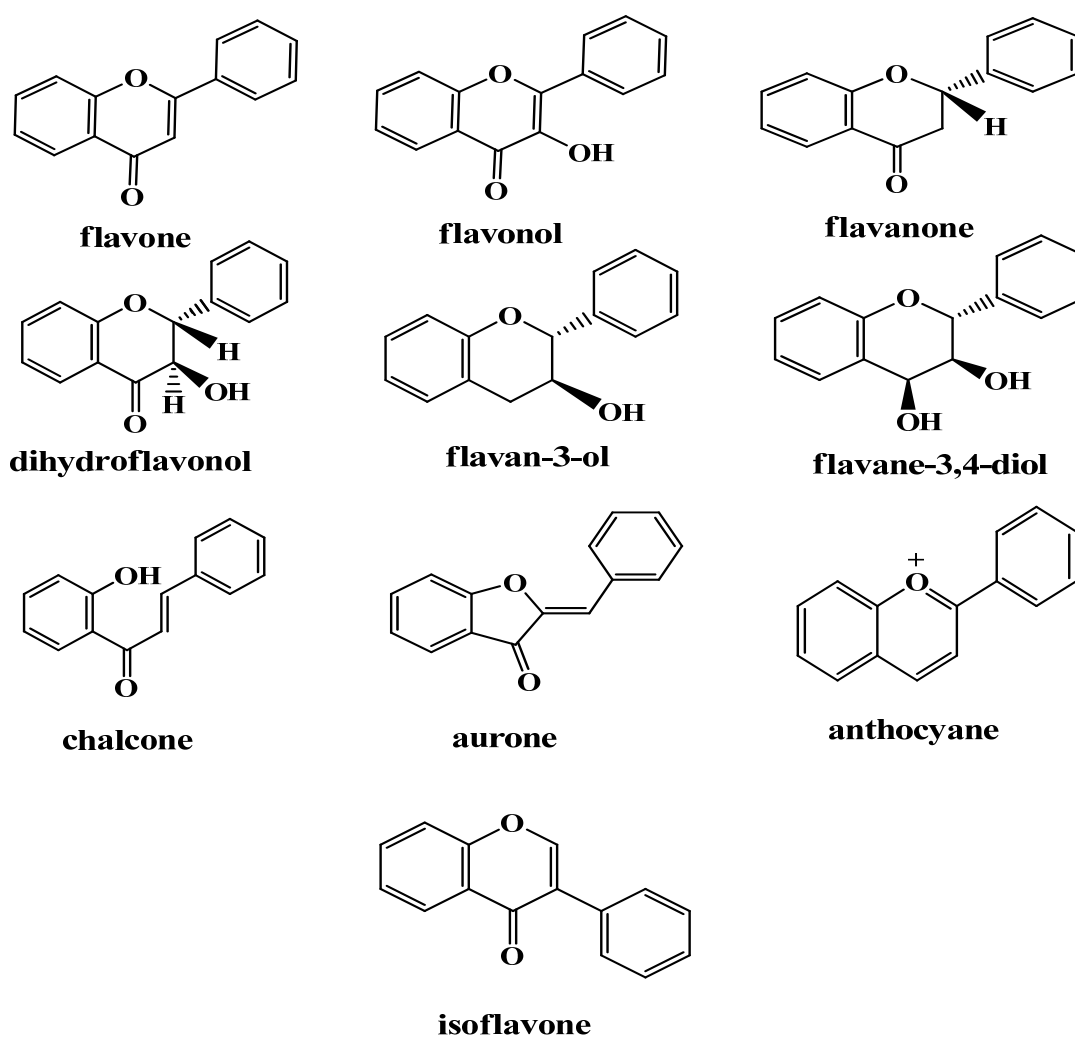


Figure II-4: Les diverses classes de flavonoïdes.

II-1-4- Substitution du squelette flavonique

Pour chaque classe de flavonoïdes, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyles, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une hydroxylation, alkylation (méthylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose.

Ainsi que les flavonoïdes sont essentiellement hydroxylés en positions 3, 7 et 4' et éventuellement en position 5. Ces groupes hydroxyles peuvent être alkylés. Ils sont fréquemment rencontrés sous forme glycosylée. La présence d'un sucre modifie les propriétés de la molécule par rapport à son analogue non glycosylé en particulier sa solubilité et son hydrophobicité. La liaison entre l'aglycone et l'ose se fait généralement par l'un des hydroxyles phénoliques, en particulier ceux en positions 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8 si ces positions sont hydroxylées. Les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont : le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose, et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose. Les oses les plus couramment rencontrés sont le D-glucose et le L-rhamnose.

Pour les flavonoïdes acylés, la partie acyle est soit un acide aliphatique (acétique, butyrique...etc.), soit un acide aromatique (benzoïque, *p*-hydroxybenzoïque...etc), soit les deux à la fois ^[37].

II-1-5-Rôle des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouge et bleue des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines).

Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes particulièrement dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants de métaux nocifs aux plantes. De plus, ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts

d'énergie, la morphogenèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes ^[38, 39].

II-1-6- Importance des flavonoïdes dans l'alimentation

La contribution au régime alimentaire humain des flavonoïdes est très importante. En effet, 50 à 800 mg/jour en fonction de la consommation de fruits et légumes mais aussi de boissons comme le thé ou le vin rouge (environ 200 mg par verre ou tasse) sont recommandés afin d'assurer une alimentation équilibrée ^[39]. On trouve également des flavonoïdes dans de nombreuses plantes médicinales et des préparations à base de plantes contenant de flavonoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle partout dans le monde pour guérir plusieurs maladies ^[40].

II-1-7- Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leur action anti-oxydante. Ils participent à combattre les radicaux libres issus de l'oxygène et de l'azote. Ces molécules mises en cause dans de nombreux processus dégénératifs, accélèrent le vieillissement des tissus et cellules. Le stress oxydatif occasionné par ces radicaux libres semble fragiliser la bonne santé de l'organisme. Les défenses naturelles servent à limiter leur effet, mais l'organisme ne peut, parfois, pas se défendre seul, notamment chez les personnes plus âgées, et, nécessite de trouver de nouvelles armes à travers une alimentation riche en composés flavonoïdiques ^[39].

Les sources d'anti-oxydants naturels se trouvent donc principalement dans les fruits et légumes colorés, mais également dans certaines céréales. Il semble aujourd'hui indispensable pour le bien-être de l'organisme d'avoir une alimentation variée et de manger au moins cinq fruits et légumes par jour. Selon certaines études, leur action de piéger les radicaux libres serait même plus efficace que celle des vitamines C et E. Ils améliorent l'action de ces vitamines sur l'organisme en augmentant leur absorption et en retardant leur élimination.

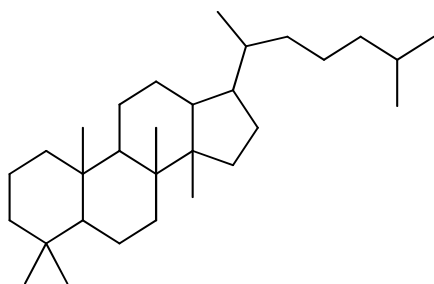
Les flavonoïdes augmentent aussi la résistance des parois capillaires et diminuent leur perméabilité (activité de type vitamine P ou C₂). Aussi, ils ont d'autres activités biologiques que nous citons ci-après : activité anti-bactérienne, activité anti-virale, activité anti-tumorale, activité anti-inflammatoire, activité anti-allergique et activité anti-cancéreuse ^[41].

II-2- Les triterpènes

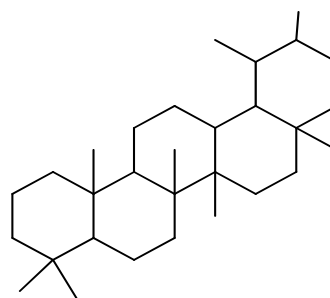
II-2-1- Introduction

Les triterpènes sont des substances d'origine organique en C₃₀ de la famille des terpènes. Très répandus dans la nature, on les trouve notamment dans les résines, à l'état libre, sous forme estérifiée ou hétérosidique. Jusqu'à présent ont été isolés des sources végétales plus de 30 000 terpènes, cela comporte plus de 4000 triterpènes dérivés de plus de 40 types de squelettes.

Les triterpènes aussi comme mono -, sesqui-, di-, et tétra- terpènes forment un grand sous-groupe de métabolites secondaires d'origine végétale. Ils sont largement étendus non seulement dans les végétaux supérieurs, mais aussi dans les organismes maritimes, les moisissures, les microorganismes ou rarement dans les bolets. Les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimique se rapportant à la conformation adoptée par l'époxysqualène avant la cyclisation initiale. Le cation formé lors de cette cyclisation peut ensuite être l'objet d'une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles qui aboutissent aux différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles ^[42].



Triterpène tétracyclique



Triterpène pentacyclique

II-2-2- Biosynthèse des triterpènes

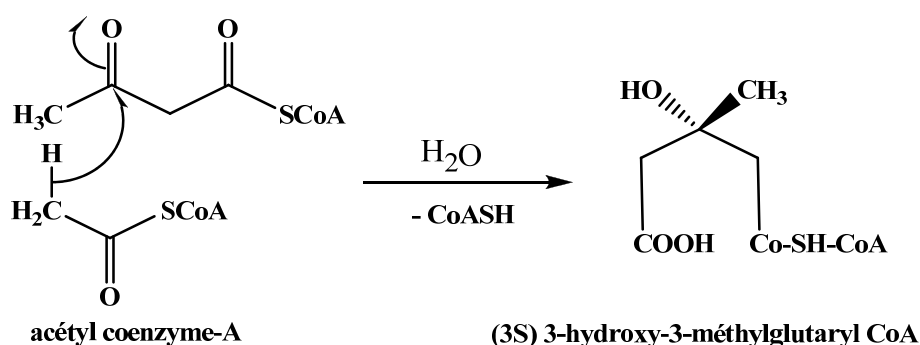
La diversité des structures des composés terpéniques rend délicate toute tentative de généralisation quant à leur biogenèse. Toutefois, Il est important de rappeler que la

biosynthèse des terpènes est conditionnée par la mise à contribution de trois séquences réactionnelles fondamentales ^[43-45] :

- formation de " l'isoprène actif " à partir de l'acétate via l'acide mévalonique
- couplage " tête à queue " des unités en C5 justifiant l'existence des mono, sesqui, di et polyterpènes.
- couplage queue à queue des unités en C15 ou C20 formant des triterpènes et tétraterpènes.

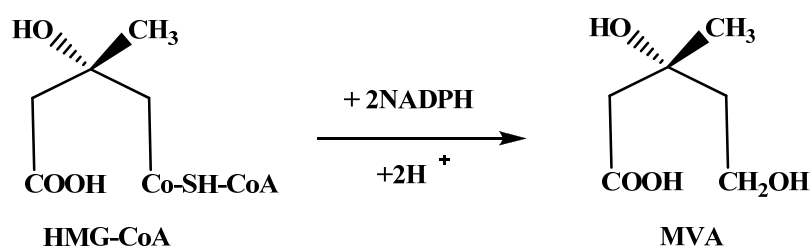
1ère étape :

Condensation aldolique de l'acétyl coenzyme-A sur l'acétoacétyl coenzyme-A ^[46] :



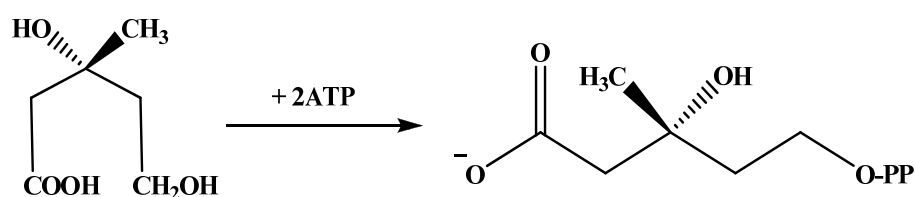
2ème étape :

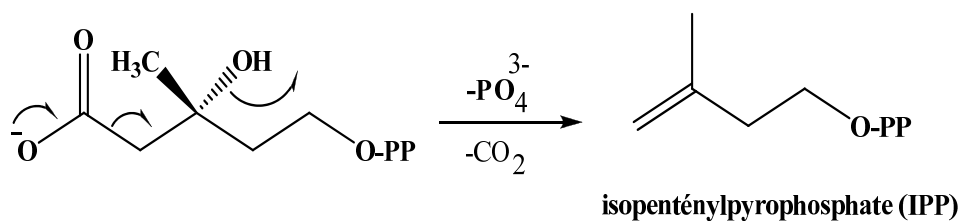
Réduction (irréversible) par le NADPH en acide 3R-mévalonique (MVA) ^[47] :



3ème étape :

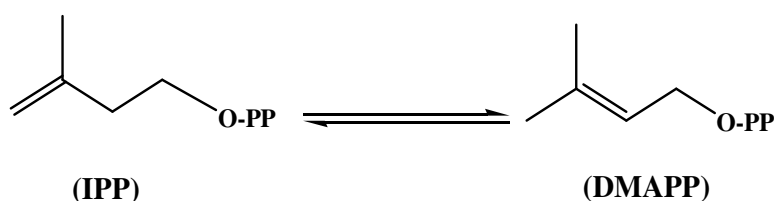
Conversion du MVA en isopenténylpyrophosphate (IPP) par phosphorylation suivie d'une décarboxylation assistée (élimination E2) par le départ du groupe phosphate ^[48] :



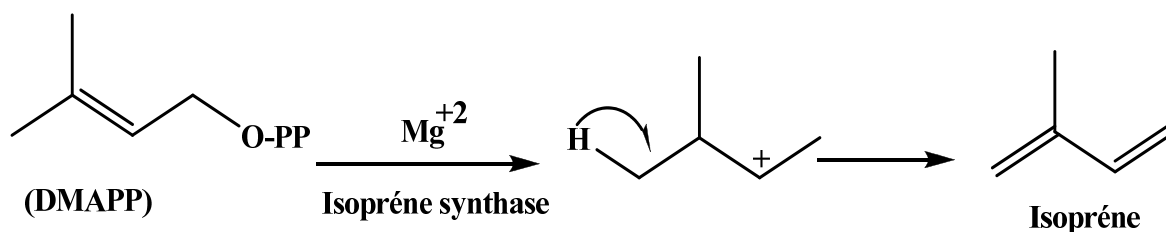


4ème étape :

Isomérisation de l'IPP en pyrophosphate d'isopentén-3-yle ou le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) ^[49] :



Pour finir, l'isoprène synthase, une enzyme en marge de ce processus biosynthétique localisée au niveau des chloroplastes catalyse l'élimination du motif diphosphate du DMAPP en le transformant en isoprène, un hémiterpène émis par les plantes et qui a en réalité une action protectrice ^[50] :



Après l'isomérisation de l'IPP en DMAPP, cette dernière molécule est condensée avec une, deux ou trois unités d'IPP, par l'intermédiaire de prényltransférases et permet respectivement la formation de :

- géranyl diphosphate (GDP: C-10)
- farnésyl diphosphate (FDP: C-15)
- géranylgéranyl diphosphate (GGDP: C-20).

Ces trois prényl-diphosphates acycliques subissent de nombreux réarrangements pour conduire aux squelettes carbonés parents de chaque classe de terpénoïdes. Ainsi, le GDP

permet la formation des monoterpènes. Le FDP conduit aux sesquiterpènes et triterpènes et enfin le GGDP aux diterpènes et tétraterpènes ^[43,44].

Le couplage queue-à-queue de deux unités en C-15, farnésylpyrophosphate (FPP) suivi d'une oxydation permet l'élaboration de l'époxysqualène, précurseur des triterpènes et stéroïdes ^[43-45] (Figure II-5).

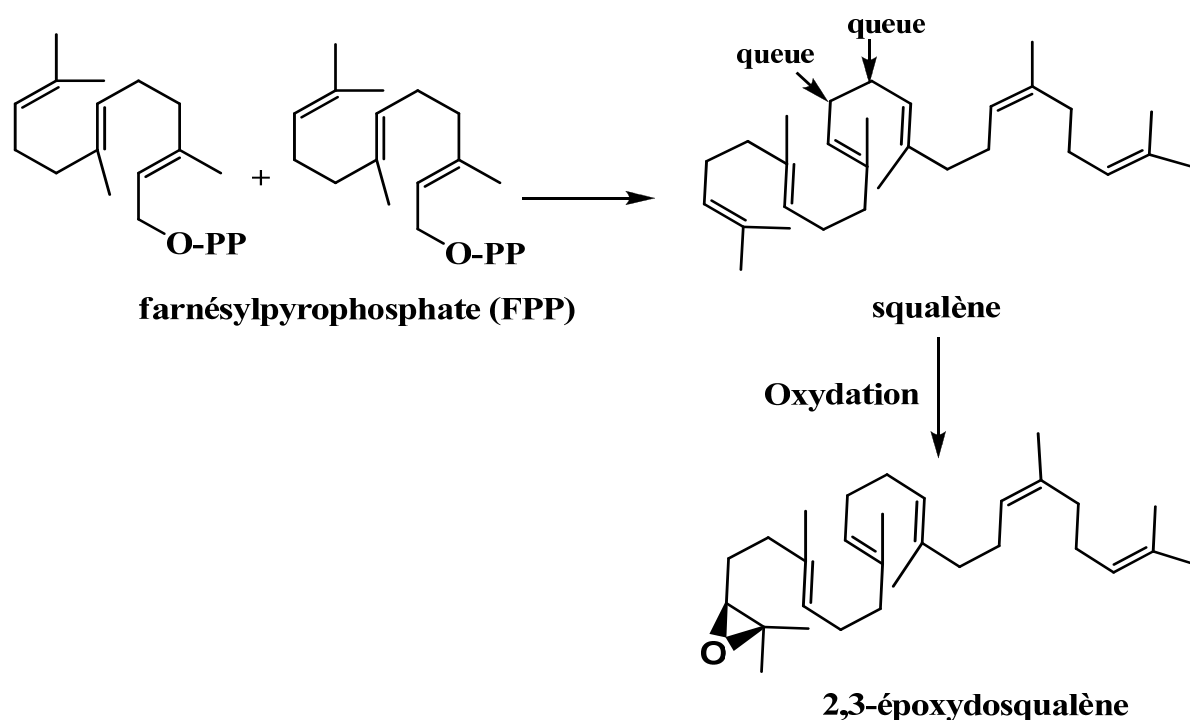


Figure II-5 : Formation du squalène

L'ouverture de l'époxyde amorce la cyclisation, l'enzyme responsable de cette cyclisation stabilise la conformation du polyisoprène de telle sorte que les impératifs stéréoélectroniques soient entièrement respectés. C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme que dépend l'orientation de la biosynthèse vers les triterpènes tétra- ou pentacycliques. L'époxysqualène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit par conséquent à un autre cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut évoluer afin de donner naissance aux triterpènes tétracycliques et pentacycliques (Figure II-6).

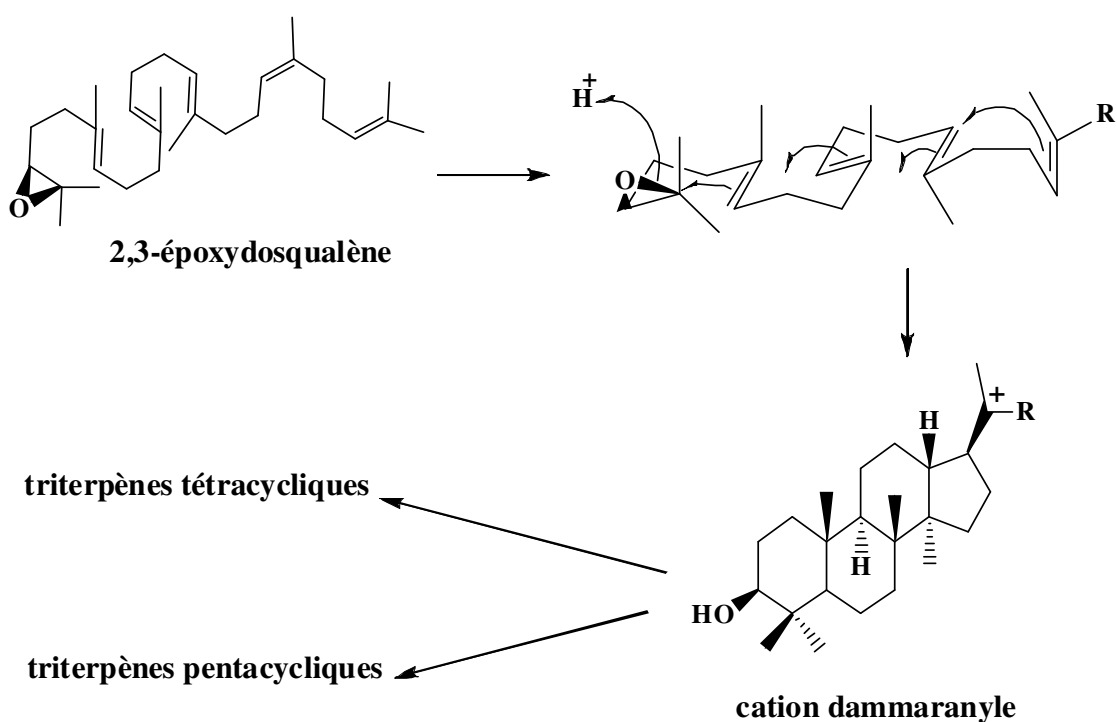


Figure II-6: Schéma de biogenèse des triterpènes tétra- et pentacycliques

II-2-3-Intérêts des triterpènes

Jusqu'à présent on a isolé des sources végétales plus de 30 000 terpènes, cela comporte 4000 triterpènes dérivés de plus de 40 types de squelettes. La palette des activités biologiques des triterpènes est incroyablement large et comporte par exemple des activités : anti-virale (les dérivés de l'acide bétulinique), anti-inflammatoire (lupéol), des effets anti-tumoraux (des acides bétuliniques), anti-cariés (glycyrrhétique), anti-angiogénique, anti-ulcéreuse (des acides glycyrrhétiques), hépatoprotectifs (lupéol). Dans la médecine traditionnelle les triterpènes sont utilisés pour soulager des douleurs, aussi comme fortifiant et pour le traitement de l'asthme.

Il est à signaler que les triterpènes pentacycliques (α et β amyrines, acides ursolique et oléanolique) ont une activité anti-bactérienne et un rôle de protection des plantes vis-à-vis des micro-organismes.

Chapitre III

Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

III-1- Rappel botanique

L'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. (Figure III-1) est une plante saharienne vivace. Elle est glabre, multicaule, élancée (40-50 cm) et rigide. Les fleurs sont jaunes et les feuilles lancéolées, entières lobulées à la base, coriaces et pétiolées. Cette plante possède de gros capitule (2 cm de large sur 3 cm de long), bractées avec 3-7 épines latérales courtes. Les akènes sont jaunes claires, de 3-4 mm, à aigrette aussi longue que le corps. Cette espèce est endémique pour l'Algérie et la Tunisie ^[5].



Figure-III-1: *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. d'après Ozenda

Les systématiciens de la botanique s'accordent à classer cette espèce comme suit :

Règne :	Plantae
Enchainement :	Spermatophyta
Sous tribu :	Angiosperme
Classe:	Dicotyledones
Famille :	Asteraceae
Genre :	<i>Centaurea</i>
Espèce :	<i>C. pubescens</i> Willd. ssp. <i>omphalotricha</i> Batt.

III-2- Extraction

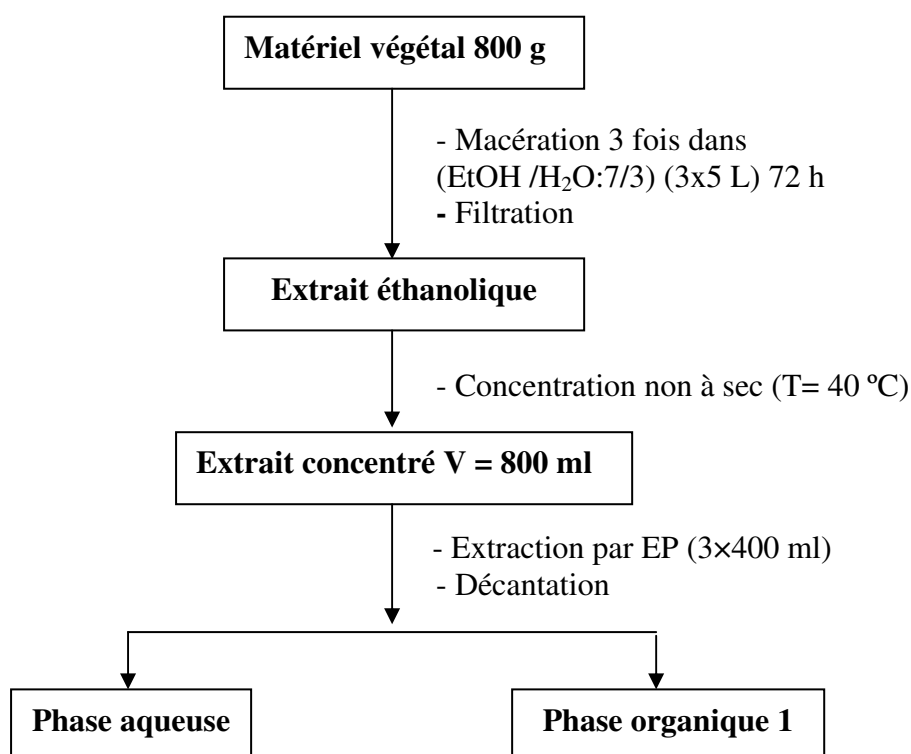
Les parties aériennes de *C. pubescens* ssp. *omphalotricha* sous forme d'une poudre fine (800 g) sont mises à macérer à température ambiante dans un mélange (Ethanol/Eau : 70/30).

Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures. Après concentration non à sec à température de 40 °C, 800 ml de l'extrait aqueux ont été récupérés. Ce dernier subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Les rendements d'extraction sont donnés dans le Tableau 3 suivant.

Tableau 3 : Rendement de l'extraction

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement %
800 g	éther de pétrole	3,10	0,39 %
	dichlorométhane	5,80	0,73 %
	acétate d'éthyle	4,70	0,59 %
	<i>n</i> -butanol	27,64	3,46 %

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure III-2.



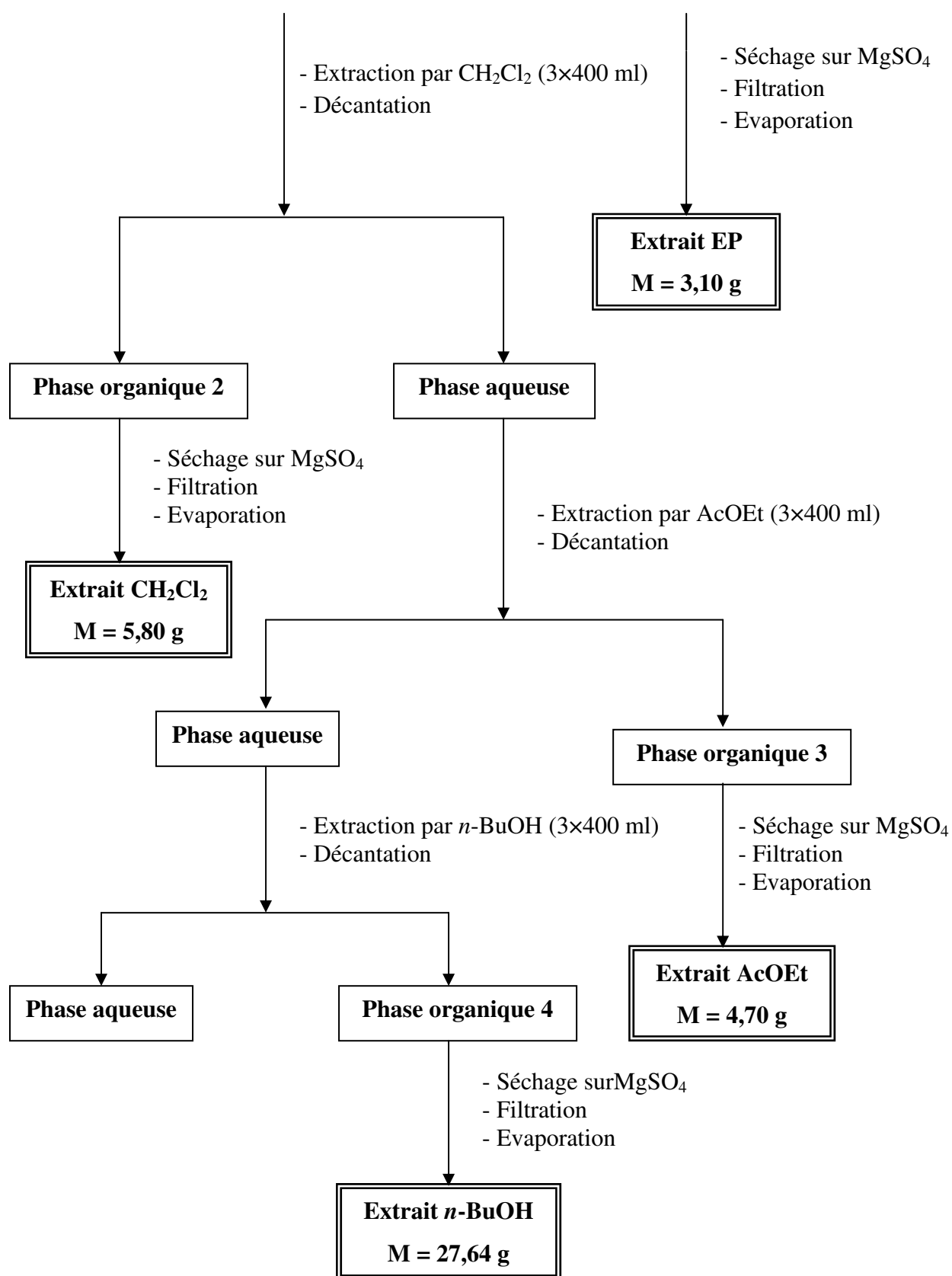


Figure III-2: Schéma général d'extraction des parties aériennes de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

III-3- Purification des composés

Les CCM réalisées sur tous les extraits obtenus et cela dans plusieurs systèmes d'élution révèlent la richesse des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle en produits comparativement aux autres extraits (éther de pétrole et *n*-butanol). Les deux extraits CH₂Cl₂ et AcOEt montrant particulièrement en CCM des taches visibles aux longueurs d'onde 254 et 366 nm se colorent en jaune après révélation à l'acide sulfurique. Le profil CCM de ces extraits est presque identique notamment dans la partie relative aux composés flavonoïdiques. Cependant l'extrait CH₂Cl₂ indique la présence de taches supplémentaires invisibles à l'UV se révélant en différentes couleurs, rose, marron et violet après pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage. La masse de l'extrait CH₂Cl₂ (5,80 g) étant supérieure à celle de l'extrait AcOEt (3,10 g) et sa richesse en composés de différentes natures nous a motivé à s'intéresser à l'investigation chimique de l'extrait dichlorométhane.

L'extrait CH₂Cl₂ est soumis à un fractionnement par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice normale en utilisant des gradients d'élution (EP/AcOEt) et (AcOEt/MeOH) allant de (0 % à 100 %) et (0% à 40%) respectivement. Ce fractionnement grossier permet de séparer les produits contenus dans cet extrait en plusieurs groupes de métabolites secondaires à même de faciliter les opérations ultérieures de purification et d'isolement des produits. Cette étape s'est soldée par l'obtention de 11 fractions.

Les fractions obtenues sont purifiées par les différentes méthodes chromatographiques utilisées au laboratoire :

- Chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale CC
- Chromatographie sur colonne de séphadex LH-20
- Chromatographie sur CCM en phase inverse C-18
- Chromatographie sur plaque préparative CPP en phase normale

L'utilisation en alternance des techniques chromatographiques citées précédemment a conduit à l'isolement de 09 composés (Figure III-3).

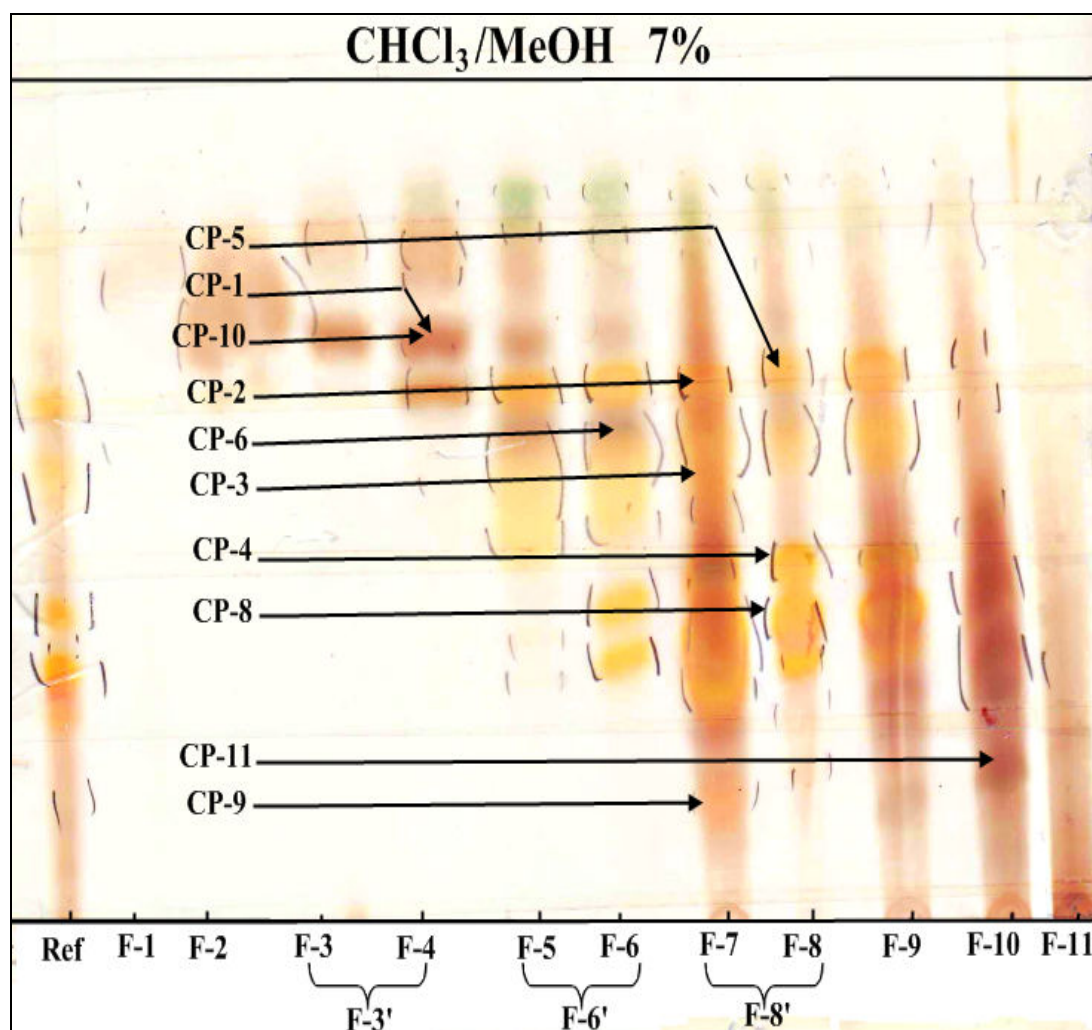


Figure III-3: CCM récapitulative des fractions VLC de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de la plante *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

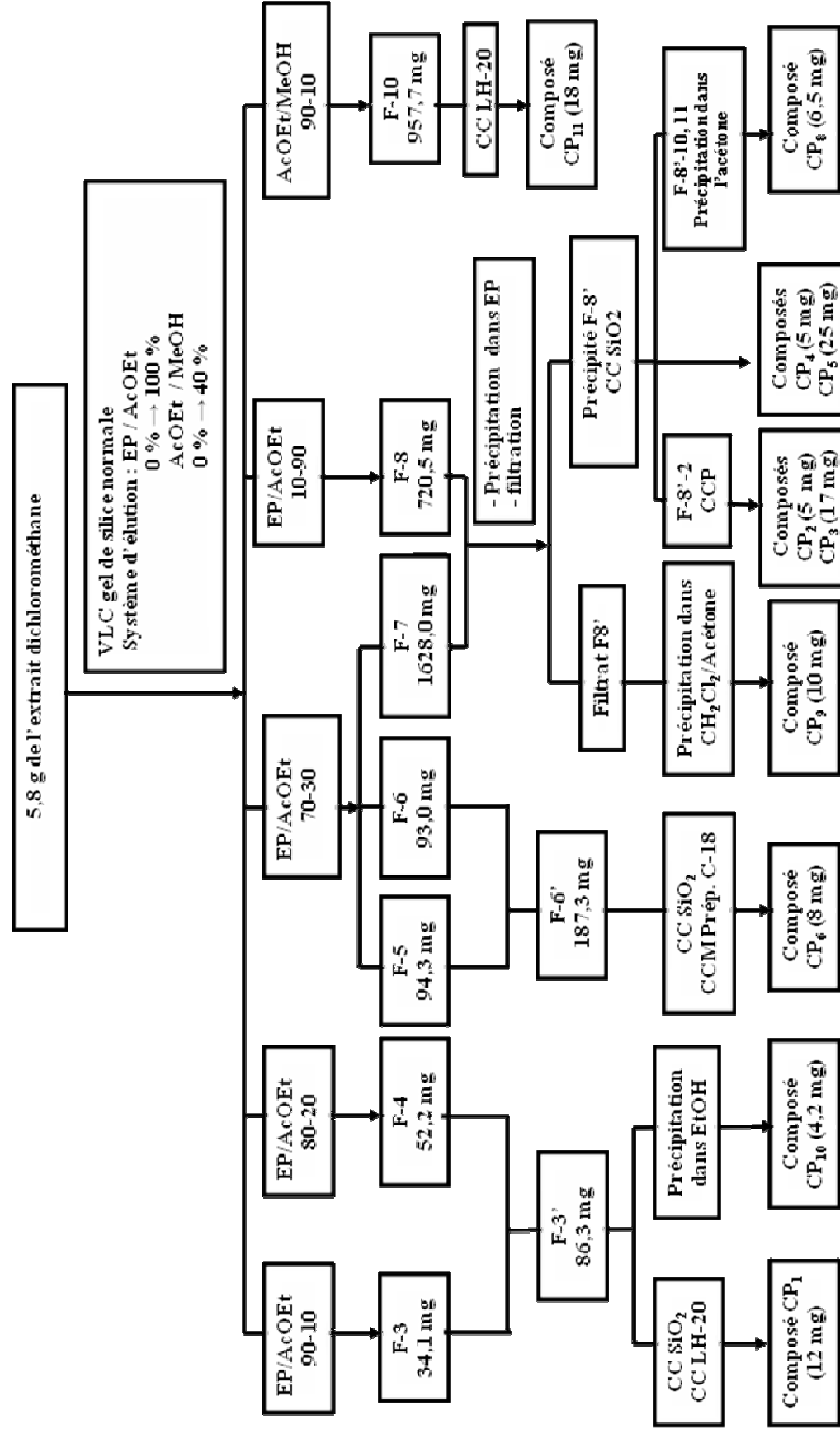
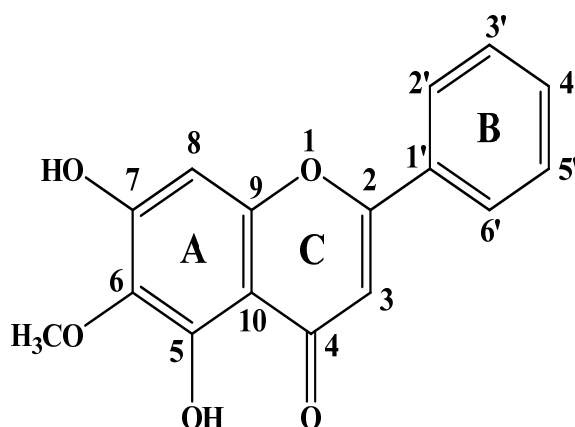


Figure III-4: Isolement des composés de l'extrait dichlorométhane de la plante *Centaurea pubescens*

III-4- Caractérisation des produits obtenus

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone-13, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC), UV, IR, Spectrométrie de masse ESI-MS, par la mesure du pouvoir rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

III-4-1- Elucidation structurale du composé CP₂



5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone (Oroxyline A)

Le composé **CP₂** est le 5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone nommé Oroxyline A. Cette flavone se présente sous forme de cristaux jaunes solubles dans l'acétone. Il a été isolé antérieurement des espèces du genre *Centaurea* : *C. pseudoscabiosa* ^[18] et *Centaurea malacitana* ^[51]. Cette flavone possède des activités biologiques anti-oxydante ^[52], anti-tumorale ^[53] et anti-HIV ^[54].

Le spectre UV enregistré dans le méthanol (Figure III-5) présente deux bandes d'absorption à 270 nm (Bande II) et 322 nm (Bande I) caractérisant un composé flavonique de type flavone.

Le déplacement bathochromique de la bande I (+17 nm) obtenue après addition de AlCl₃ (Figure III-5) comparativement à celle dans le méthanol, confirme la présence d'un OH libre en position C-5 et une substitution OR en C-6. Par ailleurs la bande I étant inférieure à 435 nm, indique l'absence d'hydroxyle en C-8 ^[55] (Tableau 4).

Tableau 4 : Données spectrales UV du composé CP₂

	λ max (nm)	
	Bande II (Cycle A)	Bande I (Cycle B)
MeOH	270	322
MeOH + AlCl ₃	283 (+ 13)	339 (+17)

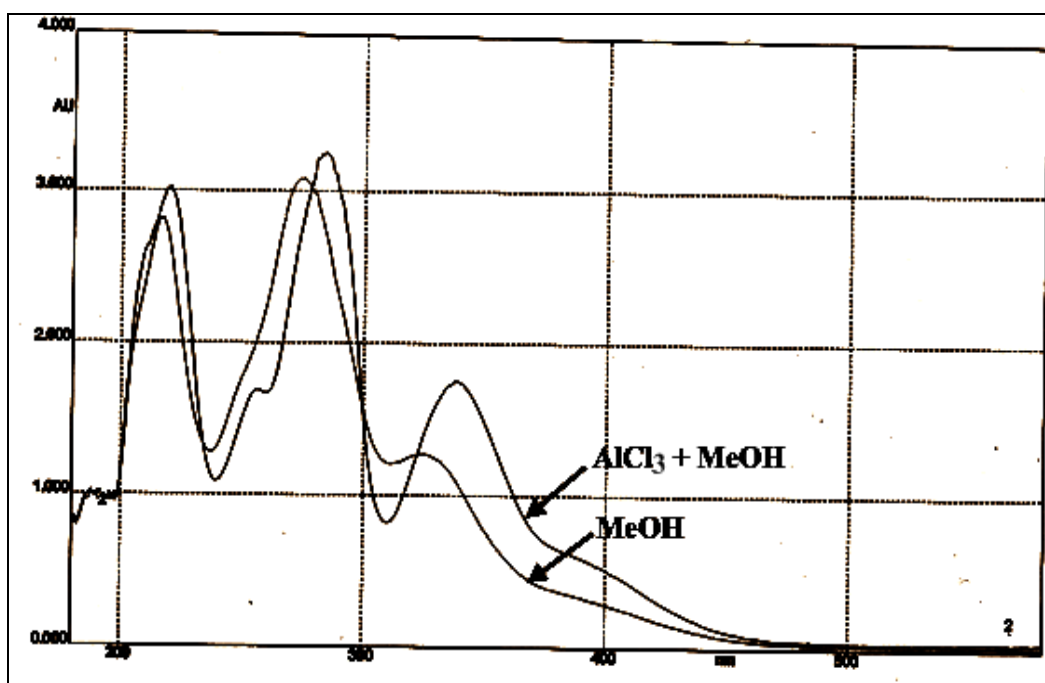


Figure III-5 : Spectres UV du composé CP₂

Le spectre IR du composé CP₂ montre des bandes d'absorption à 3406 cm⁻¹ (hydroxyle) et 1656 cm⁻¹ (carbonyle). D'autres bandes d'absorption apparaissant à 3090 cm⁻¹ (C-H aromatiques) et 1600, 1571 et 1448 cm⁻¹ (C=C) indiquent l'existence d'un système aromatique et de doubles liaisons.

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif (Figure III-6) et en mode négatif (Figure III-7) présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 307,0$ [M+Na]⁺,

590,8 $[2M+Na]^+$ et 282,9 $[M-H]^-$ respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 284 uma et une formule brute en $C_{16}H_{12}O_5$.

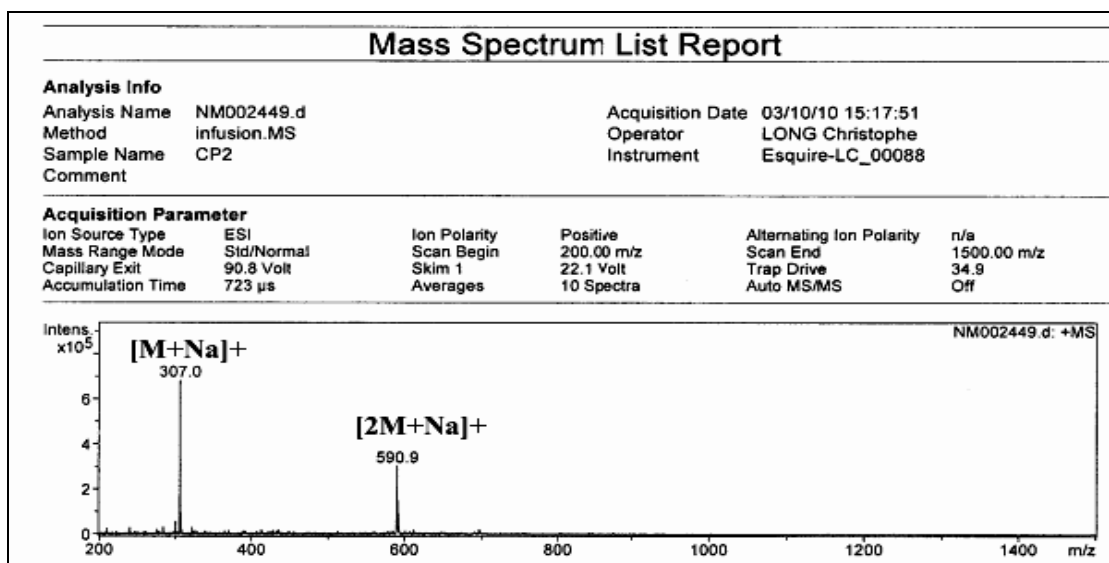


Figure III-6 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP₂

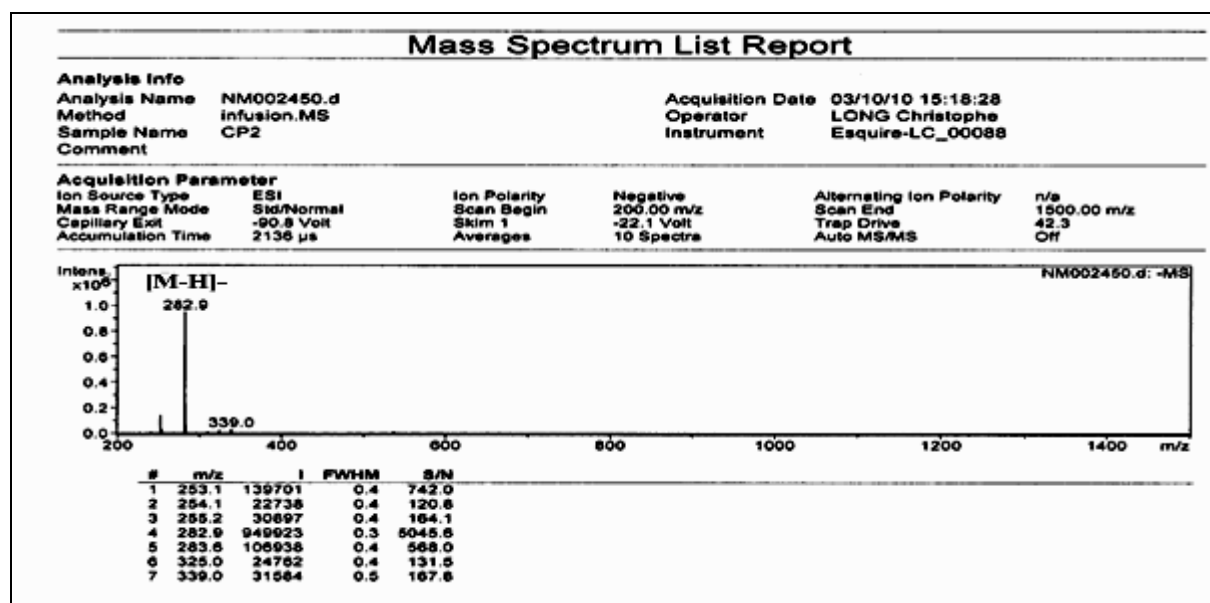


Figure III-7 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₂

Le spectre de masse MS/MS en mode négatif (Figure III-8) de l'ion pseudomoléculaire ($m/z = 282,9$) montre un pic à $m/z = 267,9$, soit une différence de masse de 15 uma indiquant le départ d'un groupement méthyle et suggérant aussi la présence d'un groupement méthoxyle attaché au squelette flavonique.

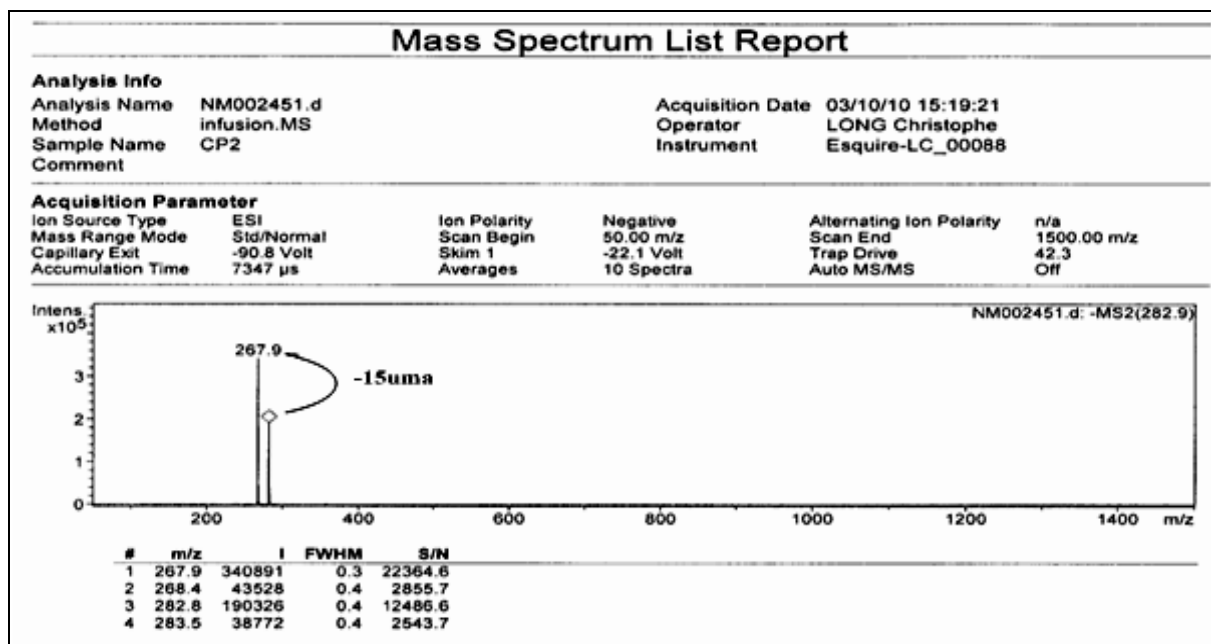


Figure III-8: Spectre MS/MS (mode négatif) du composé CP₂

L'analyse structurale des spectres de RMN ¹H (Figure III-9), HSQC *J*-modulé (Figure III-10) et COSY H-H (Figure III-11) du composé **CP₂** indique :

- deux protons à δ_H 9,16 (*s*) et 13,11 (*s*) ppm ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspondent à deux groupements hydroxyles.
- un méthoxyle à δ_H 3,89 (*s*, 3H) et δ_C 60,8.
- sept protons aromatiques entre 6,67 et 8,07 ppm se répartissant en :
 - un proton à δ_H 6,79 (*s*, 1H) corrélant sur le spectre HSQC avec un carbone résonant à 105,7 ppm.
 - un autre proton à δ_H 6,67 (*s*, 1H) couplant sur le spectre HSQC avec un carbone repéré à δ_C 94,9.
 - cinq protons aromatiques résonant à δ_H 8,07 (*dd*, $J = 8,1; 1,8$ Hz, 2H), 7,58 (*m*, 2H) et 7,61 (*m*, 1H) appartiennent à un même système de spin selon le spectre COSY H-H. Ces protons sont caractéristiques d'un noyau aromatique mono-substitué, ne pouvant être que le cycle B de la flavone.

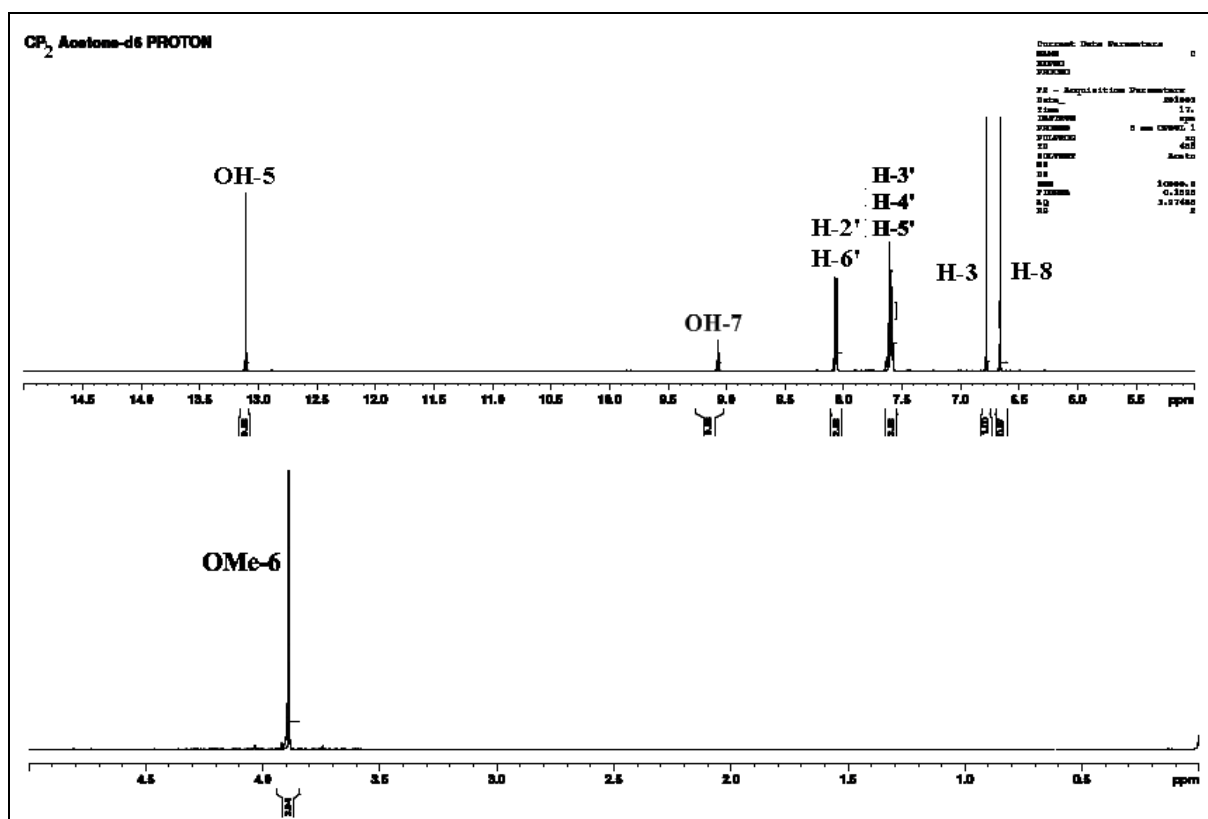


Figure III-9: Spectre RMN ^1H (500 MHz, Acétone) du composé CP₂

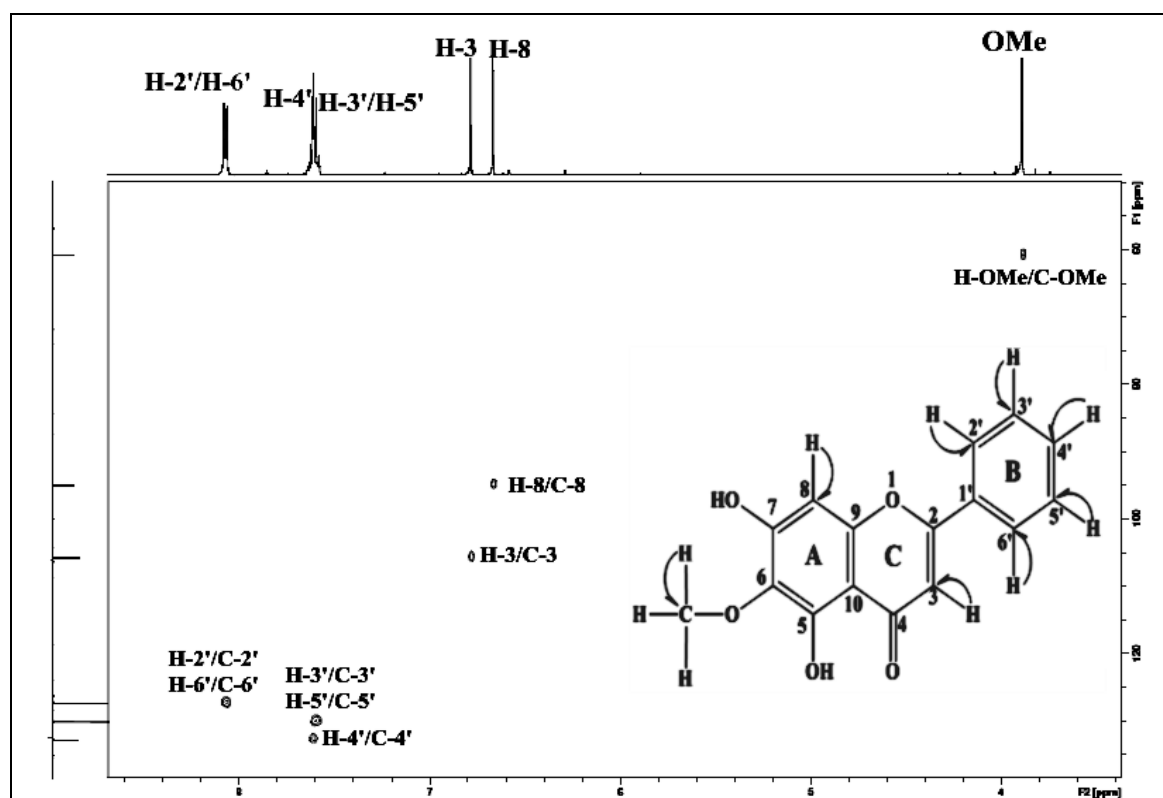


Figure III-10: Spectre HSQC *J*-modulé du composé CP₂

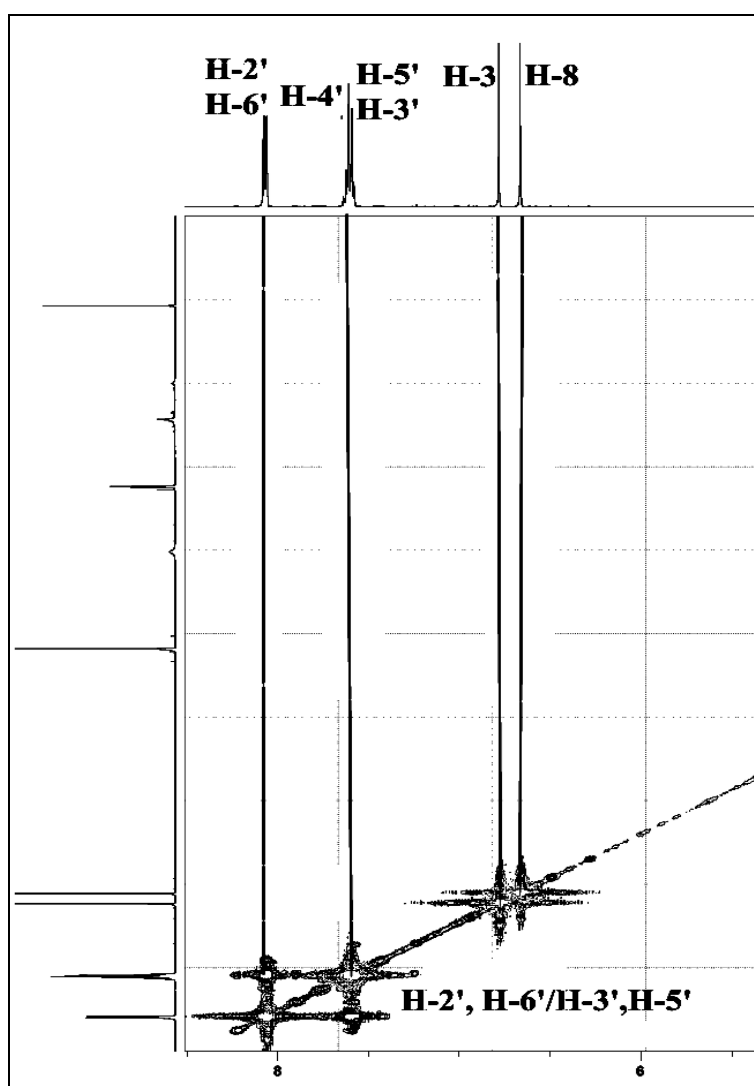


Figure III-11: Partie du spectre COSY H-H (cycle B)

Sur le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure III-12) de **CP₂** sont visualisés 14 signaux correspondant à 16 atomes de carbones :

- 1 carbonyle à 183,8 ppm (C-4).
- 5 carbones aromatiques oxygénés entre 132,4 et 164,9 ppm
- 2 carbones aromatiques quaternaires non oxygénés resonant à 106,1 et 132,4 ppm.
- 7 CH aromatiques entre 94,9 et 132,8 ppm dont deux équivalents à 127,4 ppm et deux autres équivalents à 130,1 ppm.
- 1 méthoxyle détecté à 60,80 ppm.

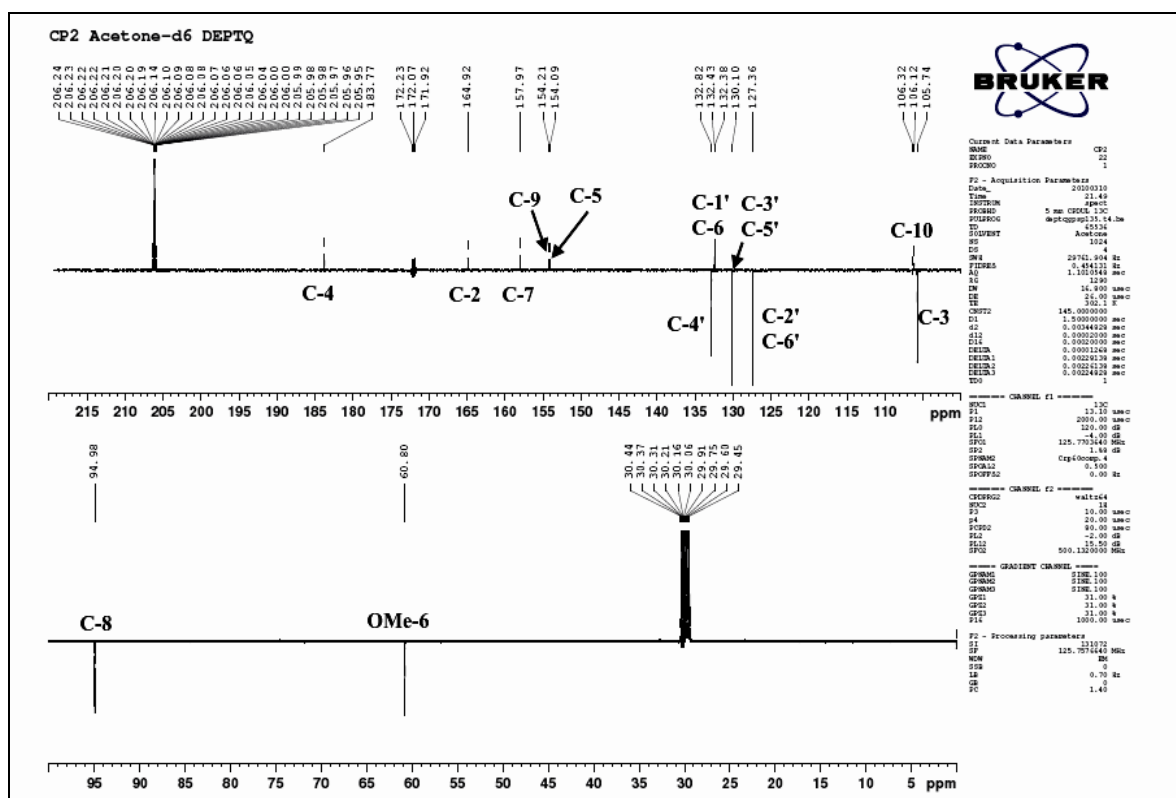


Figure III-12: Spectre RMN ^{13}C J -modulé (125 MHz, Acétone) du composé CP₂

L'analyse structurale du composé CP₂ peut débuter par le signal du proton de l'hydroxyle 5-OH (13,11 ppm) qui corrèle sur le spectre HMBC en 2J avec le carbone C-5 résonant à 154,1 ppm et en 3J avec les carbones aromatiques quaternaires C-10 (δ_{C} 106,1) et C-6 (δ_{C} 132,4) (figure III-13). Ce dernier corrèle avec les protons du groupement méthoxyle repérés à 3,89 ppm, confirmant la substitution de la position C-6 du noyau A par OCH₃, ainsi qu'avec le proton du deuxième groupement hydroxyle lié au carbone C-7. Le déplacement chimique du carbone C-7 est déterminé suite à la corrélation en 2J qu'il présente sur le spectre HMBC avec l'hydroxyle en question 7-OH à 157,9 ppm (Figure III-13).

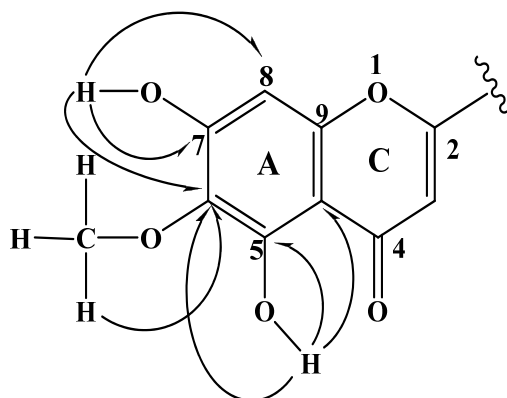


Figure III-13: Corrélations HMBC des substituants du noyau A

Le carbone C-10 présente également des taches de corrélation avec deux protons H-3 et H-8 appartenant à deux systèmes de spin à un proton chacun selon le spectre COSY H-H (Figure III-11) et résonant à 6,79 et 6,67 ppm respectivement. La distinction entre ces deux protons est facile du fait que le carbone C-6 corréle en HMBC avec un de ces deux protons repéré à δ_H 6,67, ne pouvant être que le proton H-8 (Figure III-14). En conséquence, l'autre proton est H-3 (6,79 ppm). Ces deux protons corrélaient sur le spectre HSQC *J*-modulé avec leur carbone à δ_C 94,9 (C-8) et δ_C 105,7 (C-3) et sur le spectre HMBC avec deux carbones C-10 déjà identifié et le carbone du carbonyle (C-4) résonant à 183,8 ppm. Aussi, le proton H-8 corréle en HMBC avec deux carbones oxygénés quaternaires C-7 déjà assigné et C-9 détecté à δ_C 154,2 (Figures III-14 et 15).

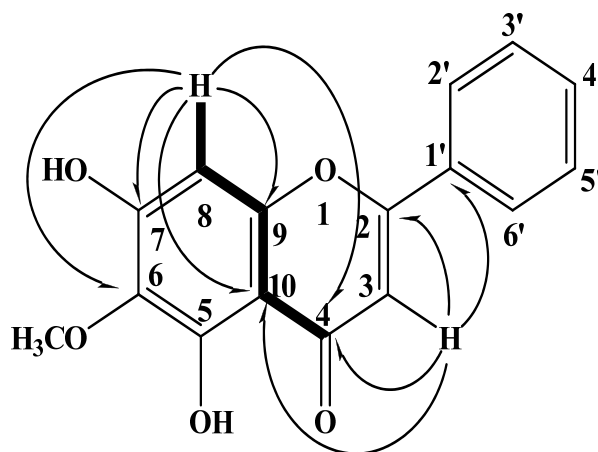


Figure III-14: Corrélations HMBC des protons H-8 et H-3

Le proton oléfinique H-3 (Figures III-14 et 15) appartenant à un système de spin isolé corréle également dans l'expérience HMBC en 2J avec un carbone éthylénique oxygéné résonant à δ_C 164,9 correspondant au carbone C-2 du cycle C et en 3J avec un carbone aromatique quaternaire qui est le C-1' (132,4 ppm) du cycle B de la flavone.

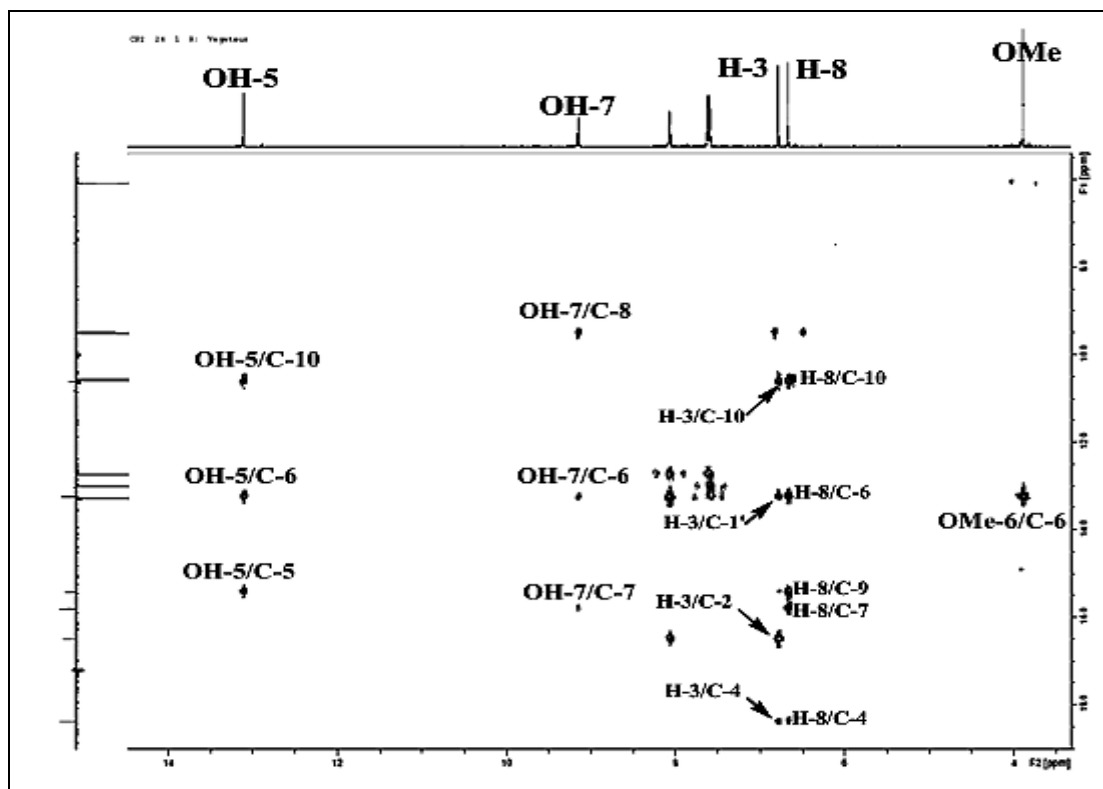


Figure III-15: Spectre HMBC des noyaux A et C

A ce niveau d'analyse, les déplacements chimiques des protons et carbones des noyaux A et C ont été entièrement déterminés.

L'analyse du cycle B de la flavone peut se faire de la même manière en commençant par le signal du carbone oxygéné C-2 identifié précédemment qui corrèle en 3J sur le spectre HMBC (Figure III-16) avec deux protons aromatiques équivalents résonant à 8,07 ppm attribuables aux protons H-2' et H-6'.

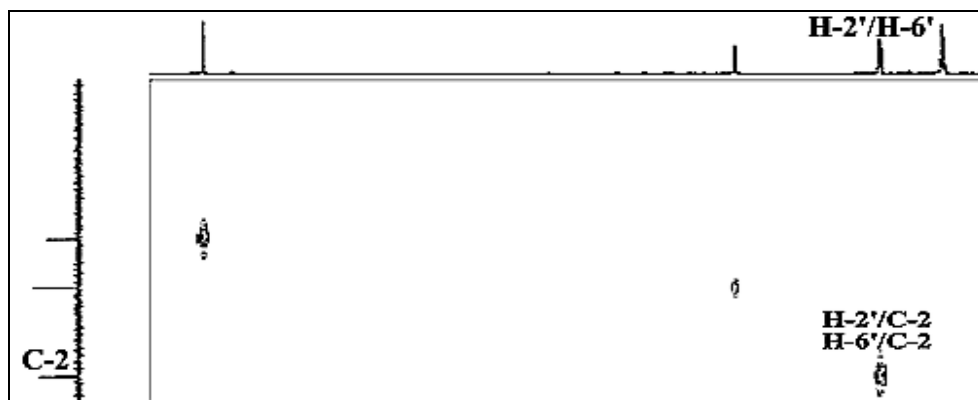


Figure III-16: Partie du spectre HMBC du noyau B

Les carbones des protons H-2' et H-6' sont aisément assignés en tenant compte de leurs taches observées sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-17) à δ_C 127,4 (C-2' et C-6'). Ces protons apparaissant sous forme de doublet de doublets couplent sur le spectre COSY H-H (Figure III-11) avec trois protons aromatiques au regard des constantes de couplage $J = 8,1$ Hz (couplage *ortho*, H-2'/H-3' et H-6'/H-5') et $J = 1,8$ Hz (couplage *méta*, H-2'/H-4' et H-6'/H-4'). Ce qui permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons H-3' et H-5' à 7,58 ppm et H-4' à 7,61 ppm. Leurs carbones résonnent respectivement à 130,1 ppm (C-3' et C-5') et 132,8 ppm (C-4') selon l'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III-17).

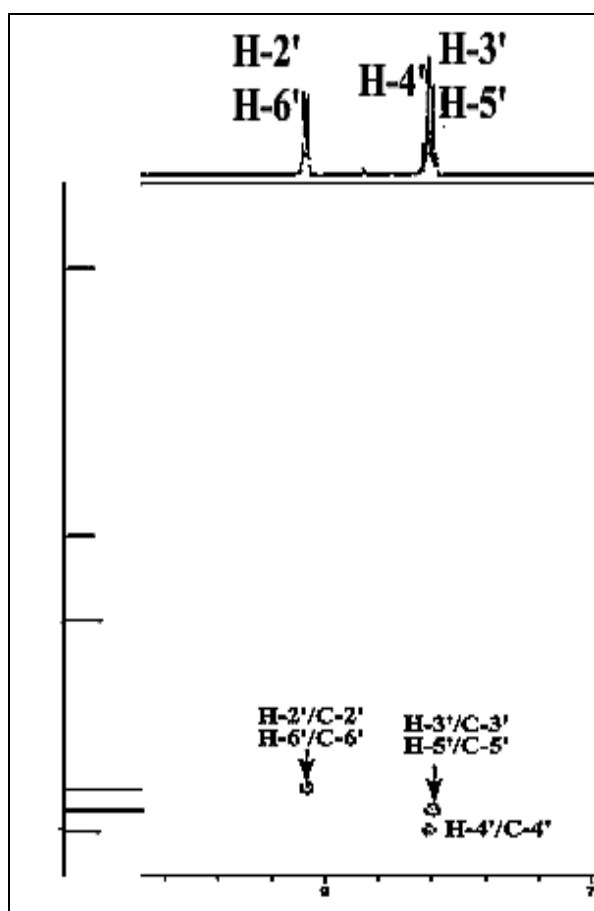


Figure III-17: Partie du spectre HSQC *J*-modulé

En HMBC les protons équivalents H-3' et H-5' corréleront en 3J avec le carbone aromatique quaternaire C-1' assigné précédemment tandis que le proton H-4' présente des taches de corrélations en 2J avec C-3' et C-5' et en 3J avec C-2' et C-6' (figures III-18).

A l'issue de cette analyse tous les protons et carbones du noyau B de cette flavone ont été identifiés.

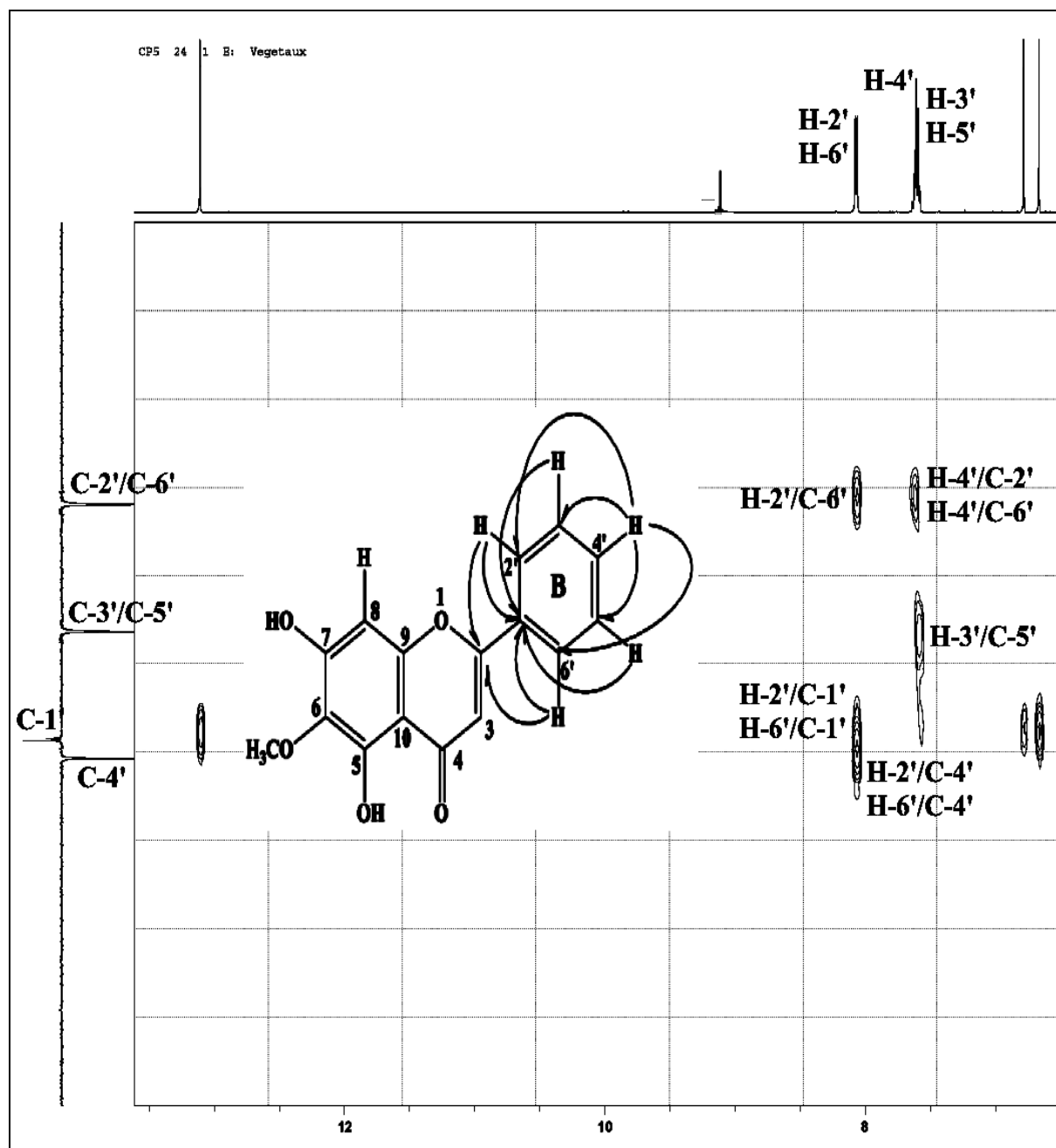


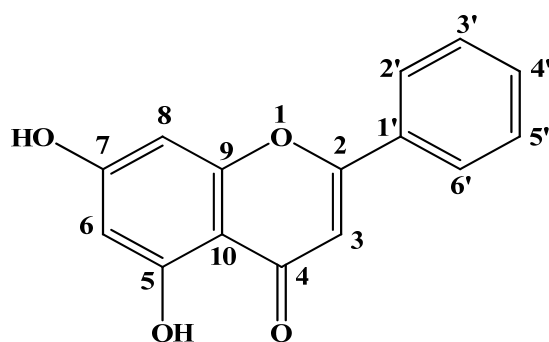
Figure III-18: Spectre HMBC montrant les corrélations du noyau B

L'ensemble de ces données spectroscopique (Tableau 5) nous conduit à proposer sans ambiguïté pour ce composé, la structure moléculaire suivante: 5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone ou Oroxyline A (CP₂).

Tableau 5 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **CP₂** dans l'acétone.

Position	δ_{H}	J (Hz)	Multiplicité	δ_{C}
2	-	-	-	164,9
3	6,79	-	<i>s</i>	105,7
4	-	-	-	183,8
5	-	-	-	154,1
6	-	-	-	132,4
7	-	-	-	157,9
8	6,67	-	<i>s</i>	94,9
9	-	-	-	154,2
10	-	-	-	106,1
1'	-	-	-	132,4
2'	8,07	(8,1 ; 1,8)	<i>dd</i>	127,4
3'	7,58	-	<i>m</i>	130,1
4'	7,61	-	<i>m</i>	132,8
5'	7,58	-	<i>m</i>	130,1
6'	8,07	(8,1 ; 1,8)	<i>dd</i>	127,4
6-OCH ₃	3,89	-	<i>s</i>	60,8
5-OH	13,11	-	<i>s</i>	-
7-OH	9,16	-	<i>s</i>	-

III-4-2- Elucidation structurale du composé CP₃



5,7-dihydroxyflavone (Chrysine)

Il s'agit du 5,7-dihydroxyflavone (CP₃) appelé également Chrysine. Cette flavone a été antérieurement isolée des espèces *C. pseudoscabiosa* ^[18] et *C. scabiosa* ^[56]. Elle est connue pour ses différentes activités biologiques telles que anti-oxydante ^[57], anti-inflammatoire ^[58] et anti-mutagène ^[59].

Le spectre UV du composé CP₃ enregistré dans le méthanol présente deux bandes d'absorption à 269 nm (Bande II) et 350 nm (Bande I), suggérant la présence d'une structure flavonique.

Le déplacement bathochromique de la bande I (+39 nm) lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH + AlCl₃ comparativement à celle observée dans le méthanol atteste que cette flavone porte un groupement hydroxyle libre en position C-5 (Tableau 6).

Tableau 6 : Données spectrales UV du composé CP₃

	λ max (nm)	
	Bande II (Cycle A)	Bande I (Cycle B)
MeOH	269	350
MeOH + AlCl ₃	276 (+7)	389 (+39)

Le spectre IR du composé CP₃ (Figure III-19) révèle des bandes d'absorption à 3406 cm⁻¹ (groupement hydroxyle), 1656 cm⁻¹ (carbonyle), 3090, 1600, 1571 et 1500 cm⁻¹ (système aromatique et doubles liaisons).

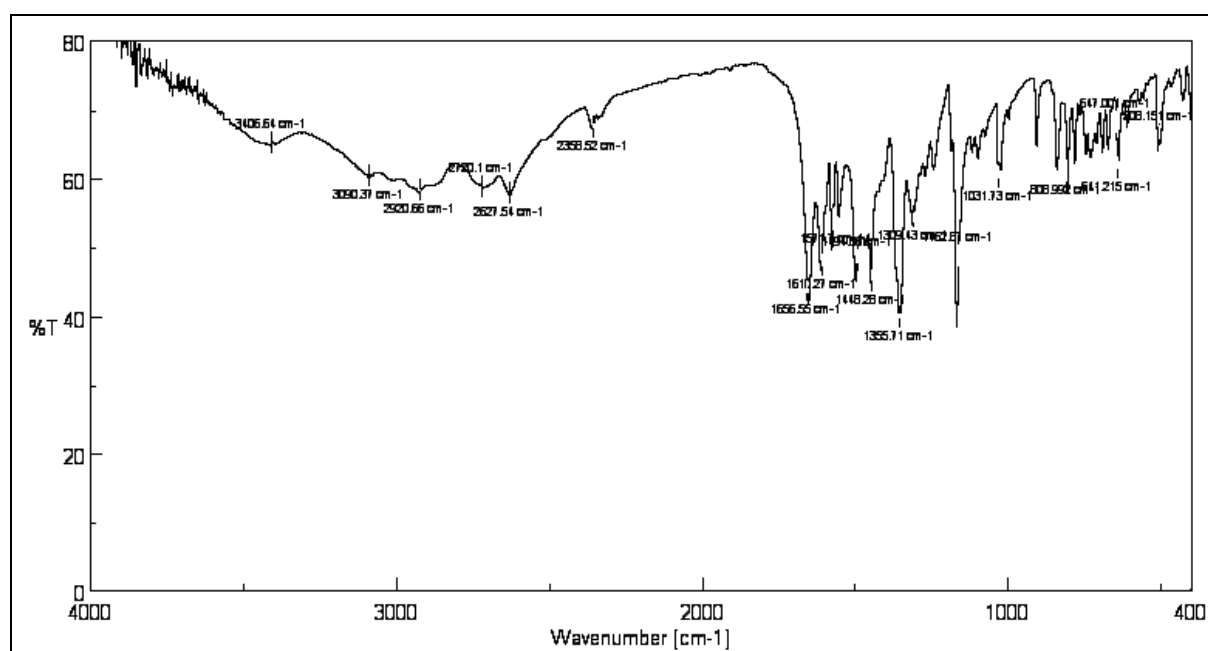


Figure III-19: Spectre IR du composé CP₃

Le spectre de masse electrospray (ESI-MS) du composé CP₃ (Figure III-20), obtenu également sous forme de cristaux jaunes, montre en mode négatif deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 253 [M-H]⁻ et 507 [2M-H]⁻. Ceci correspond à une masse moléculaire de 254 uma et une formule brute en C₁₅H₁₀O₄.

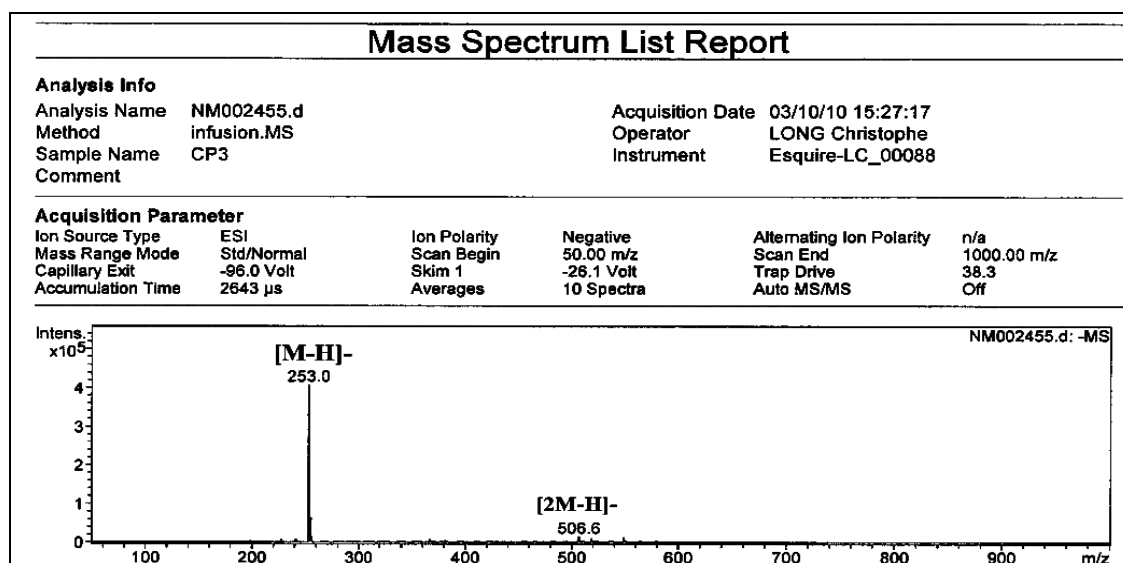


Figure III-20: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₃

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du composé **CP₃** sont presque similaires à ceux du composé précédent **CP₂** déjà identifié (Figure III-21 et 22).

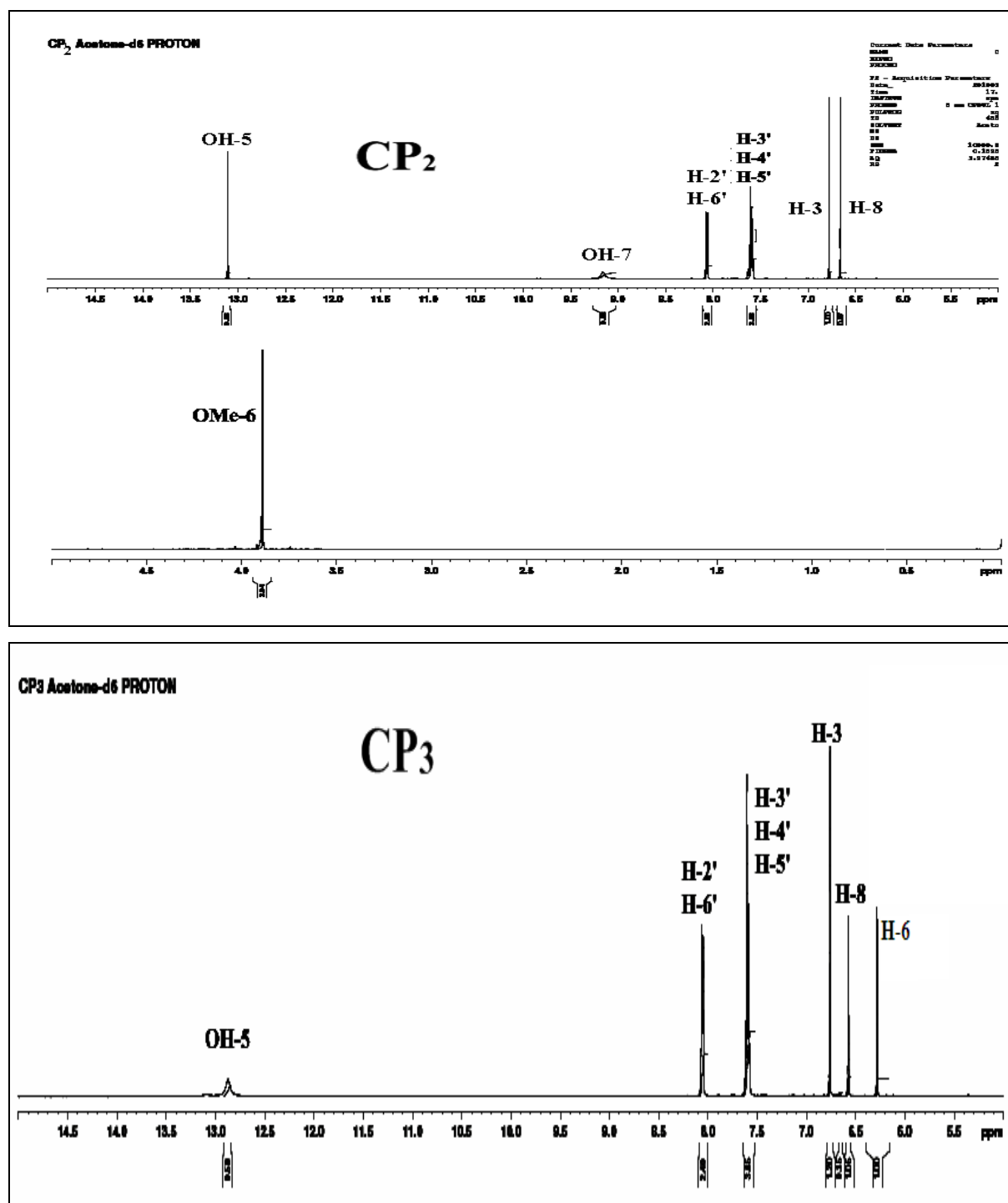


Figure III-21 : Spectres RMN ^1H (500 MHz, Acétone) des composés **CP₂** (haut) et **CP₃** (bas)

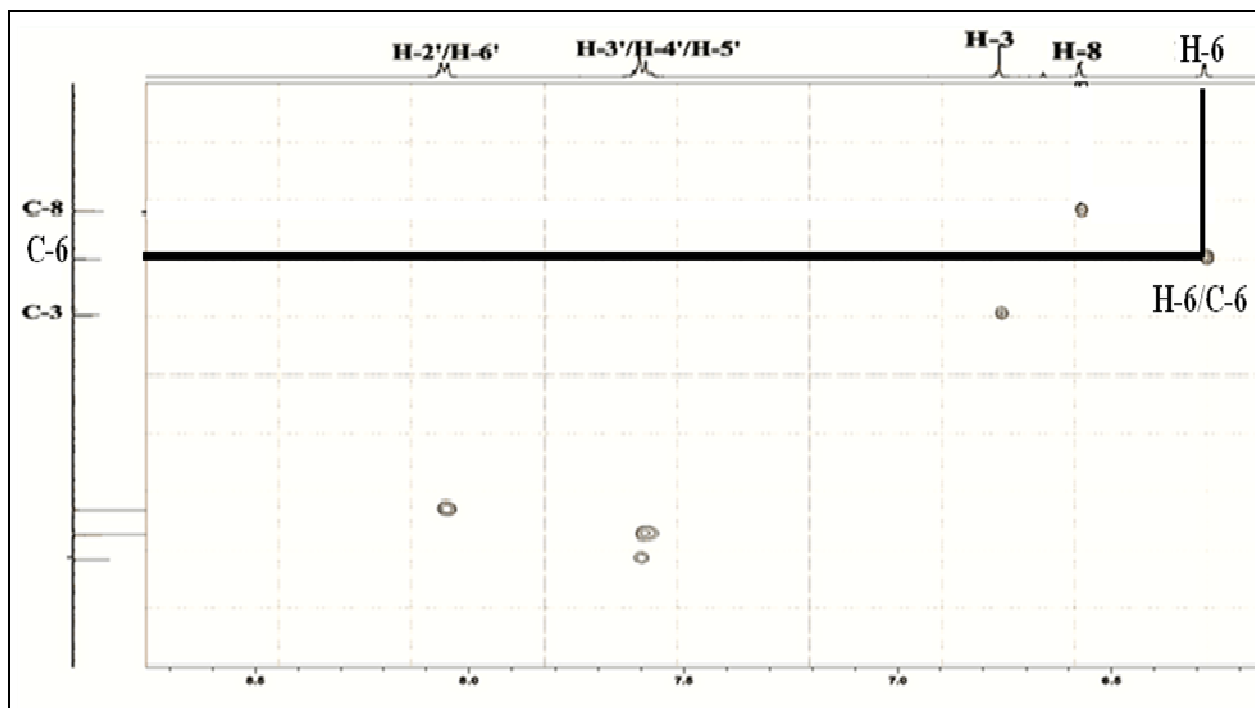


Figure III-23: Spectre HSQC *J*-modulé du composé CP₃

Le spectre COSY H-H du composé CP₃ montre en plus des systèmes de spin observés pour le composé CP₂, un autre système de spin à deux protons qui visualise le couplage entre le proton H-8 (δ_H 6,57, $J = 1,9$ Hz) et un autre proton qui résonne à (δ_H 6,28, $J = 1,9$ Hz) traduisant un couplage *méta* et qui ne peut être que le proton H-6 (Figure III-24 et 25).

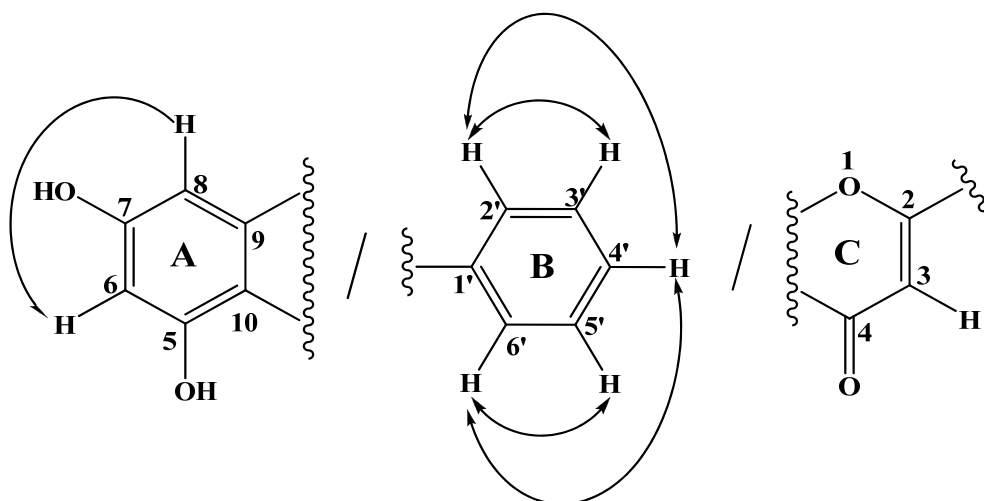


Figure III-24: Corrélations COSY H-H du composé CP₃

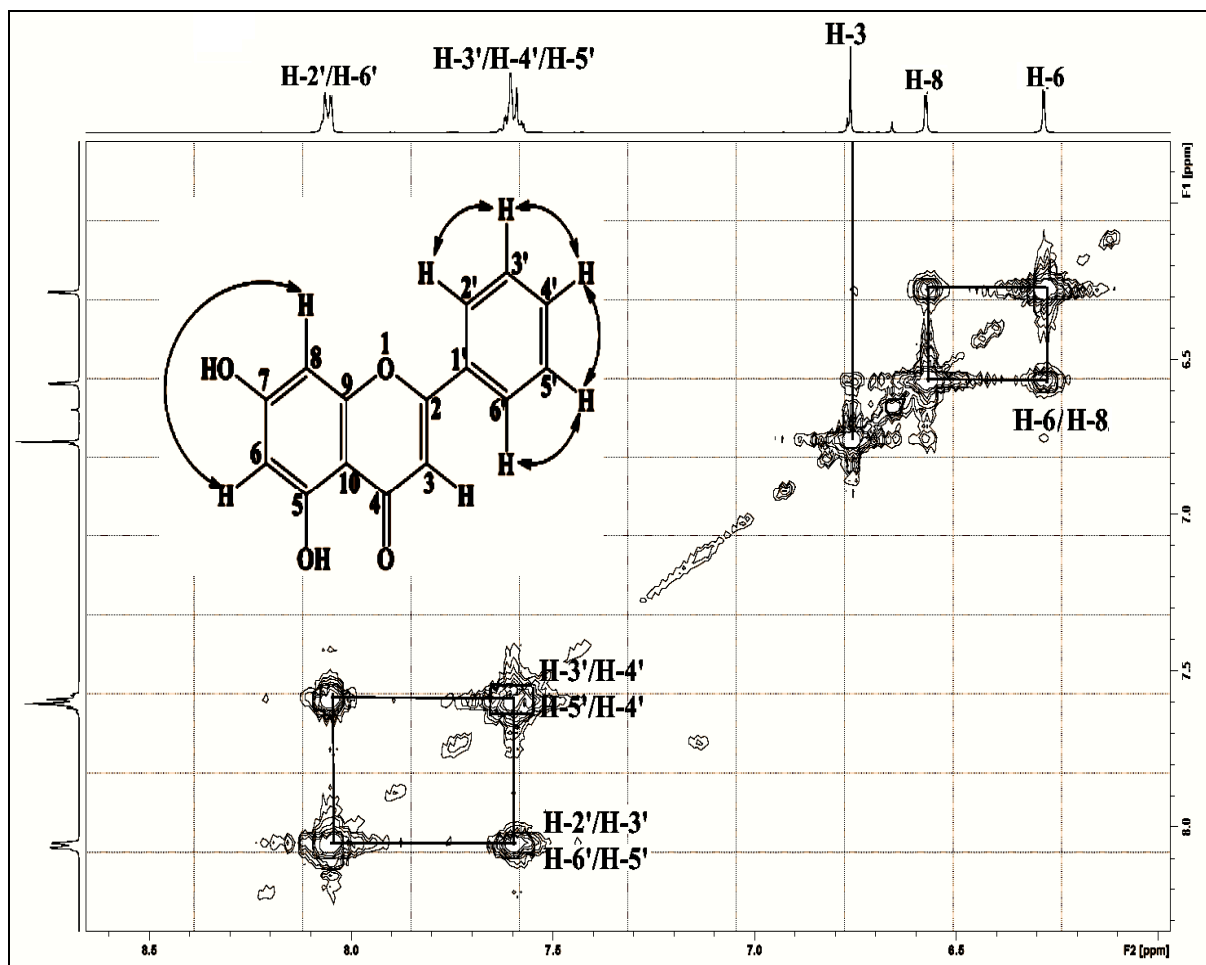


Figure III-25: Spectre COSY ^1H - ^1H du composé CP₃

La position du proton H-6 ($\delta_{\text{H}} = 6,28$) est confirmée également suite à l'analyse du spectre HMBC (Figure III-26) qui montre cinq taches de corrélation en 2J , 3J et 4J avec les carbones résonant à δ_{C} 95,1 (C-8), 105,7 (C-10), 165,9 (C-7), 163,1 (C-5) et 183,1 (C-4). D'autres corrélations sont observées sur le spectre HMBC entre :

- le proton H-8 et les carbones repérés à δ_{C} 100,0 (C-6), 105,7 (C-10) et 159,1 (C-9).
- le proton H-3 et les carbones résonant à δ_{C} 105,7 (C-10), 132,5 (C-1'), 183,1 (C-4) et 164,7 (C-2).
- le carbone C-2 du cycle C et les protons H-2' et H-6' du cycle B détectés à δ_{H} 8,05, leurs carbones déterminés par expérience HSQC J -modulé C-2' et C-6' résonant à 127,4 ppm présentent des corrélations en 2J et 3J avec les protons H-3' et à H-5' observés à 7,58 ppm et H-4' à 7,60 ppm.

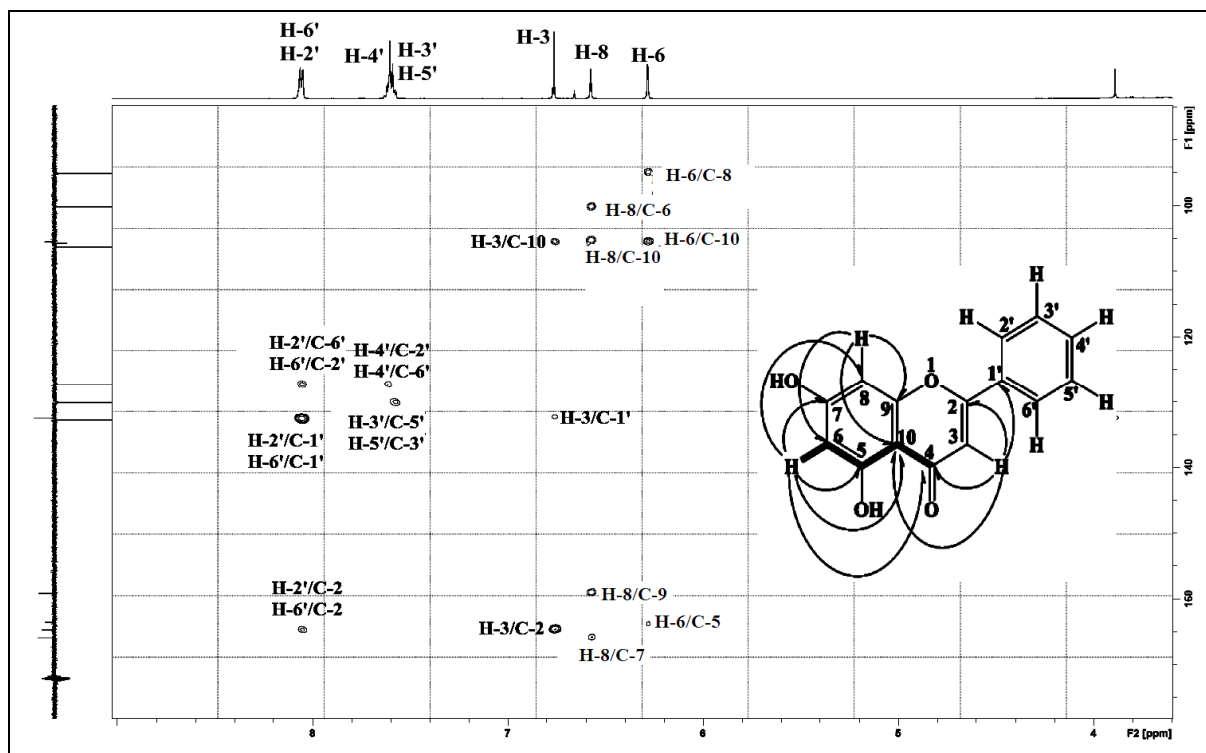


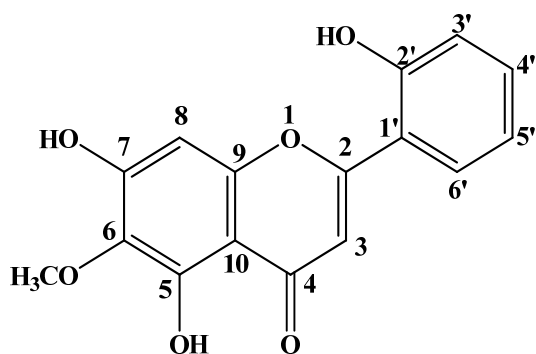
Figure III-26: Spectre HMBC du composé CP₃

Toutes ces données (tableau 7) nous permettent d'attribuer sans équivoque pour ce composé, la structure suivante : 5,7-dihydroxyflavone ou Chryisine (**CP₃**).

Tableau 7: Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **CP₃** dans l'acétone.

Position	δ _H	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ _C
2	-	-	-	164,7
3	6,76	-	<i>s</i>	106,3
4	-	-	-	183,1
5	-	-	-	163,1
6	6,28	1,9	<i>d</i>	100,0
7	-	-	-	165,9
8	6,57	1,9	<i>d</i>	95,1
9	-	-	-	159,1
10	-	-	-	105,7
1'	-	-	-	132,5
2'	8,05	(8,1 ; 1,8)	<i>dd</i>	127,4
3'	7,58	-	<i>m</i>	130,1
4'	7,60	-	<i>m</i>	132,8
5'	7,58	-	<i>m</i>	130,1
6'	8,05	(8,1 ; 1,8)	<i>dd</i>	127,4
OH-5	12,88	-	<i>sl</i>	-

III-4-3- Elucidation structurale du composé CP₄



5,7,2'-trihydroxy-6-méthoxyflavone

Le spectre UV du composé **CP₄** enregistré dans le méthanol (Tableau 8) présente deux bandes d'absorptions à 270 nm (Bande II) et 338 nm (Bande I) caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone.

Un effet bathochromique de la bande I (+ 38 nm) est visualisé sur le spectre UV enregistré dans le milieu MeOH + AlCl₃, comparativement à celui réalisé dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en C-5, ceci se traduit par la formation d'un complexe stable (Figure III-27) entre l'aluminium, la fonction carbonyle et l'hydroxyle en C-5 du cycle A.

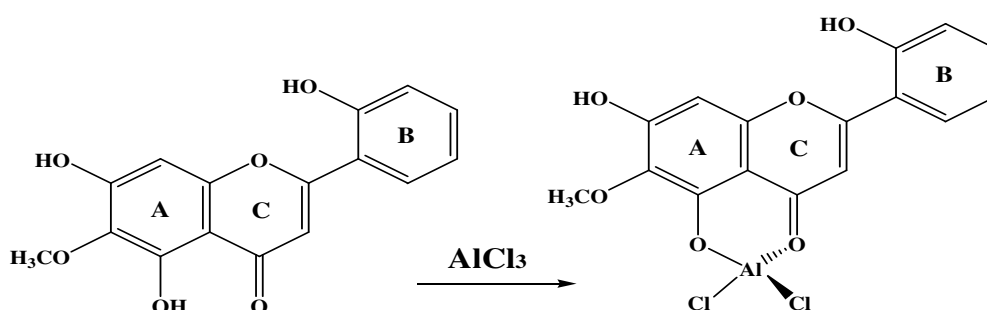


Figure III-27: Formation de complexe AlCl₃-flavone

Tableau 8 : Données spectrales UV du composé **CP₄**

	λ max (nm)	
	Bande II (Cycle A)	Bande I (Cycle B)
MeOH	270	338
MeOH + AlCl ₃	282 (+ 12)	376 (+38)

L'analyse du spectre IR du composé **CP₄** (Figure III-28) obtenu aussi sous forme de cristaux jaunes permet d'observer les bandes d'absorptions suivantes :

- une large bande d'absorption à 3468 cm^{-1} indiquant la présence de groupements hydroxyles.
- une bande d'absorption à 3144 cm^{-1} attribuable aux protons CH du noyau aromatique.
- une bande d'absorption à 1664 cm^{-1} montre l'existence d'un groupement carbonyle (C=O).

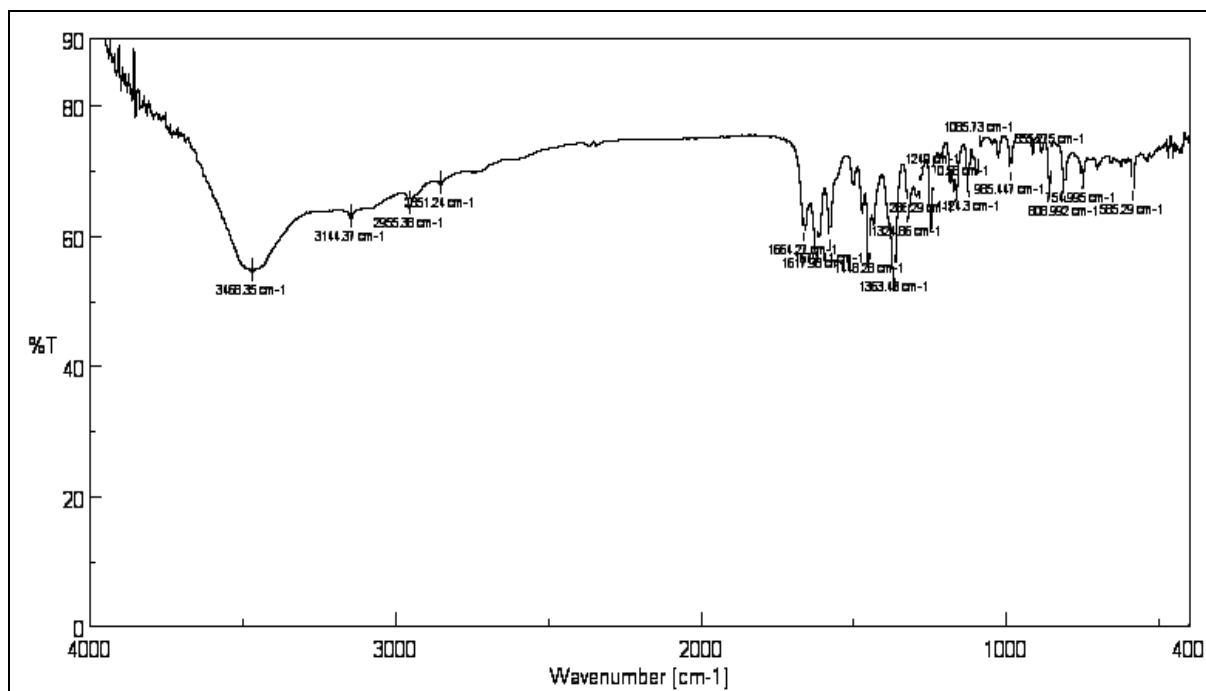


Figure III-28: Spectre IR du composé **CP₄**

Les spectres de masse ESI-MS du composé **CP₄**, enregistré en mode positif (Figure III-29) et en mode négatif (Figure III-30) présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 323$ $[M+Na]^+$, 623 $[2M+Na]^+$, 299 $[M-H]^-$ et 599 $[2M-H]^-$ respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 300 uma et une formule brute en $C_{16}H_{12}O_6$, soit une différence de $+16\text{ uma}$ par rapport au composé **CP₂** déjà identifié.

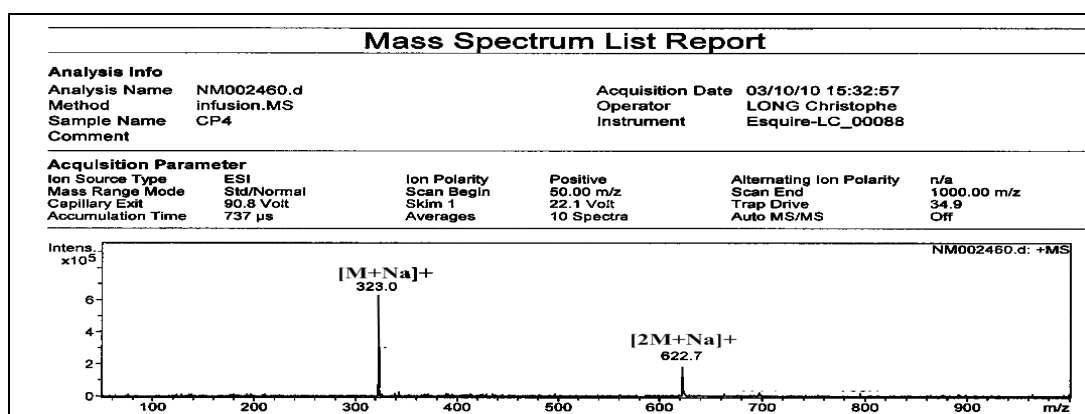


Figure III-29: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **CP₄**

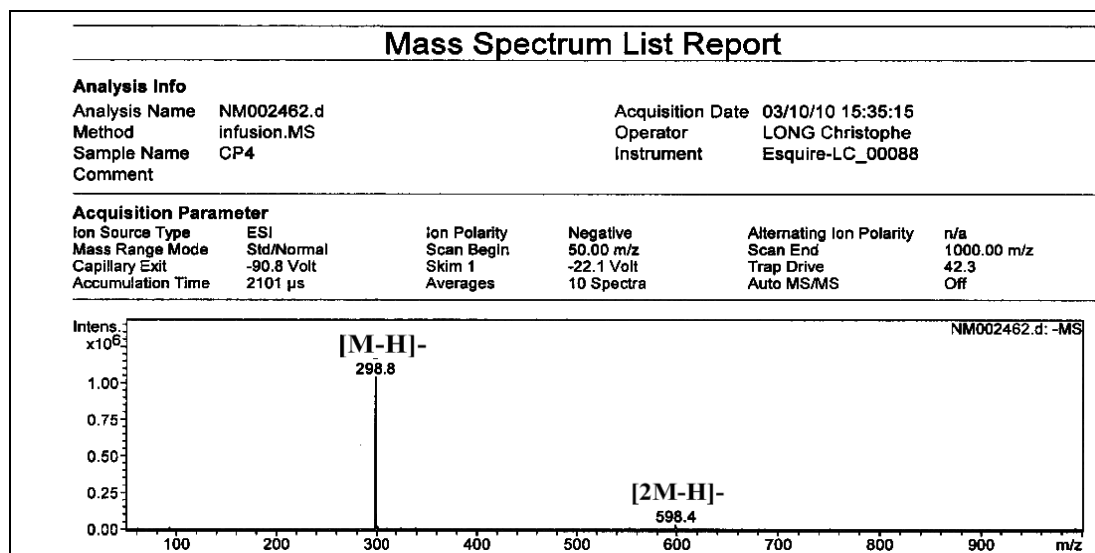


Figure III-30: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₄

Le spectre de masse MS/MS en mode négatif (Figure III-31) de l'ion pseudomoléculaire ($m/z = 298,8$) montre un pic de fragmentation à $m/z = 283,7$ traduisant une différence de 15 uma et indiquant le départ d'un groupement méthyle. Ceci confirme la présence d'un méthoxyle.

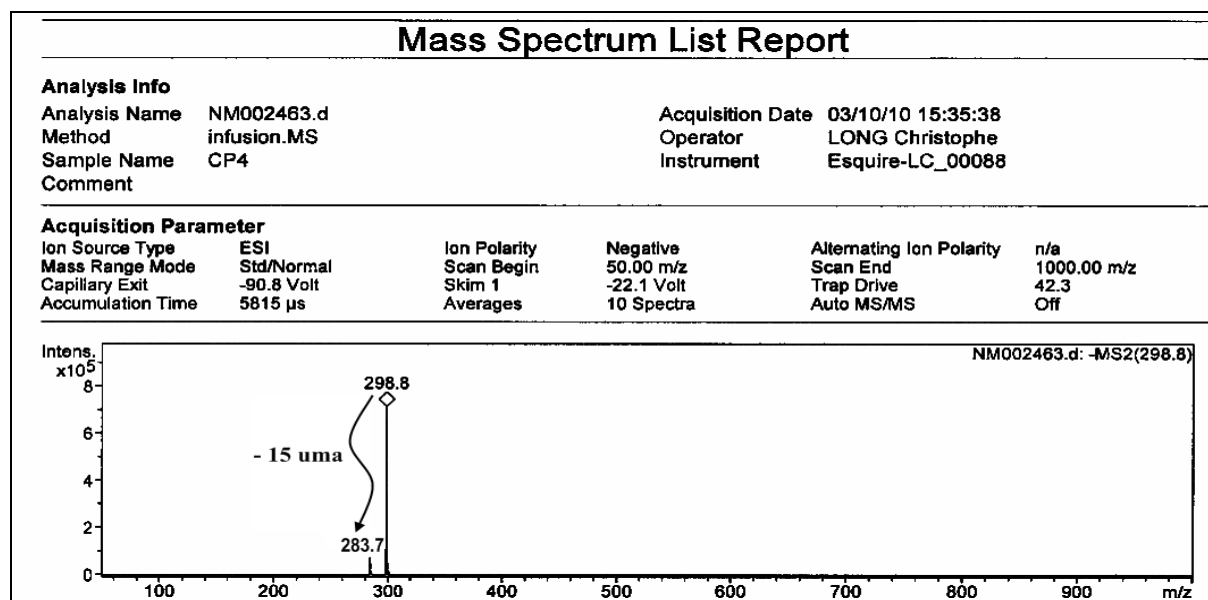


Figure III-31: Spectre MS/MS (mode négatif) du composé CP₄

Le spectre MS/MS en mode négatif (Figure III-32) du pic de l'ion de fragmentation à $m/z = 284$ $[M-H-CH_3]^-$ révèle un pic à $m/z = 166$, soit une différence de 118 uma suggérant

une hydroxylation au niveau du cycle B selon le mécanisme de fragmentation suivant (Figure III-33).

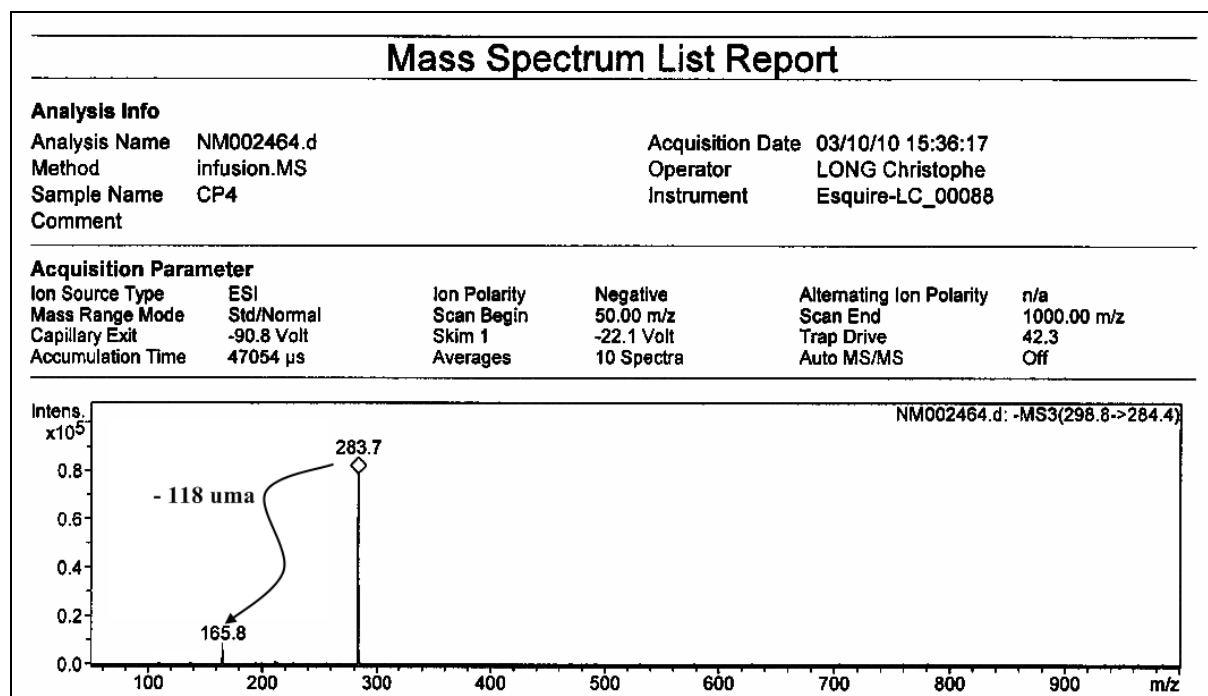


Figure III-32: Spectre MS/MS (mode négatif)

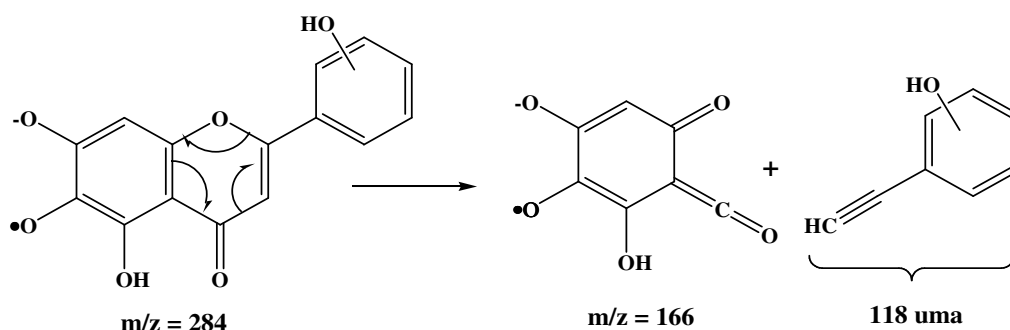


Figure III-33: Mécanisme de fragmentation du composé CP₄

L'analyse des spectres de masse ESI-MS, RMN ^1H , ^{13}C découplé et HMBC du composé **CP₄** indique une similitude structurale avec le composé **CP₂** au niveau des cycles A et C. En effet, le spectre RMN ^1H (Figure III-34) montre les signaux des protons H-3 à δ_{H} 7,21 (s, 1H), H-8 à δ_{H} 6,57 (s, 1H) et les protons du groupement méthoxyle à 3,91 ppm (s, 3H). Le spectre RMN ^{13}C découplé (Figure III-35) révèle la présence de 16 signaux correspondant à 16 atomes de carbones résonant à C-2 (162,2 ppm), C-3 (108,6 ppm), C-4

(183,3 ppm), C-5 (152,5 ppm), 131,4 ppm (C-6), 157,6 ppm (C-7), 93,9 ppm (C-8), 153,5 ppm (C-9) et 104,4 ppm (C-10).

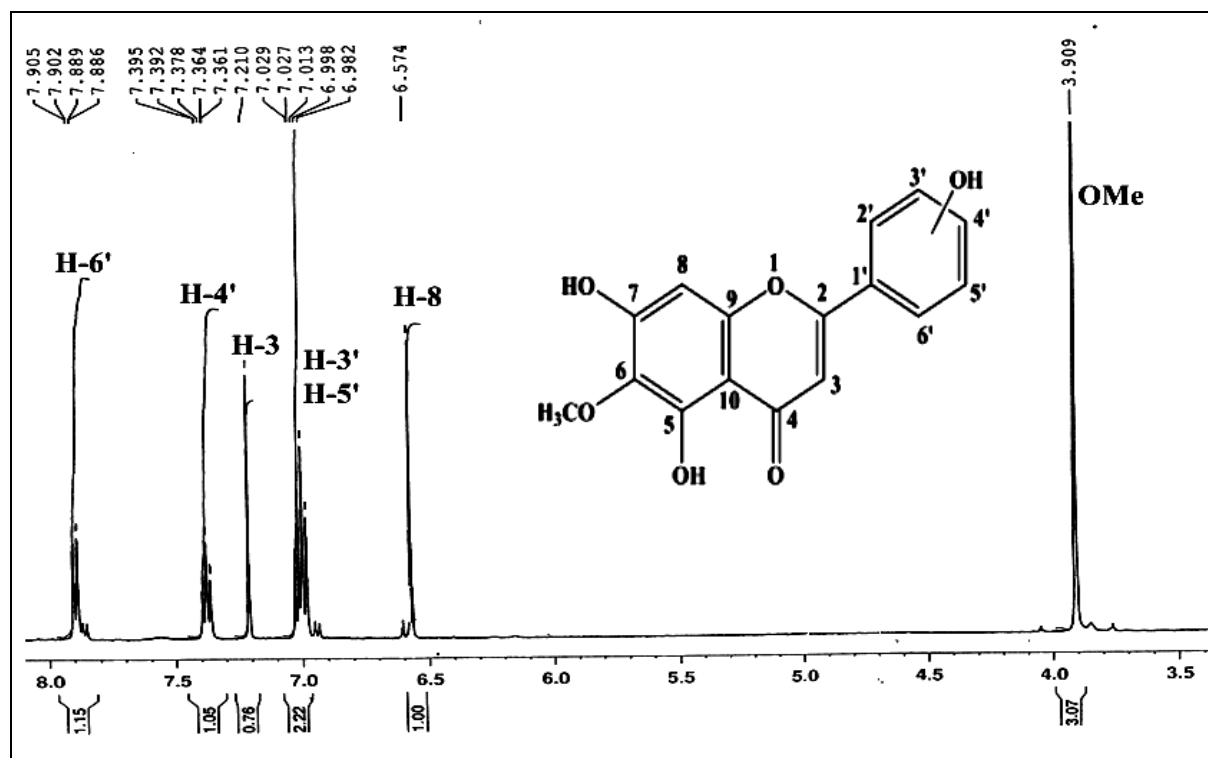


Figure III-34: Spectre RMN ¹H du composé CP₄

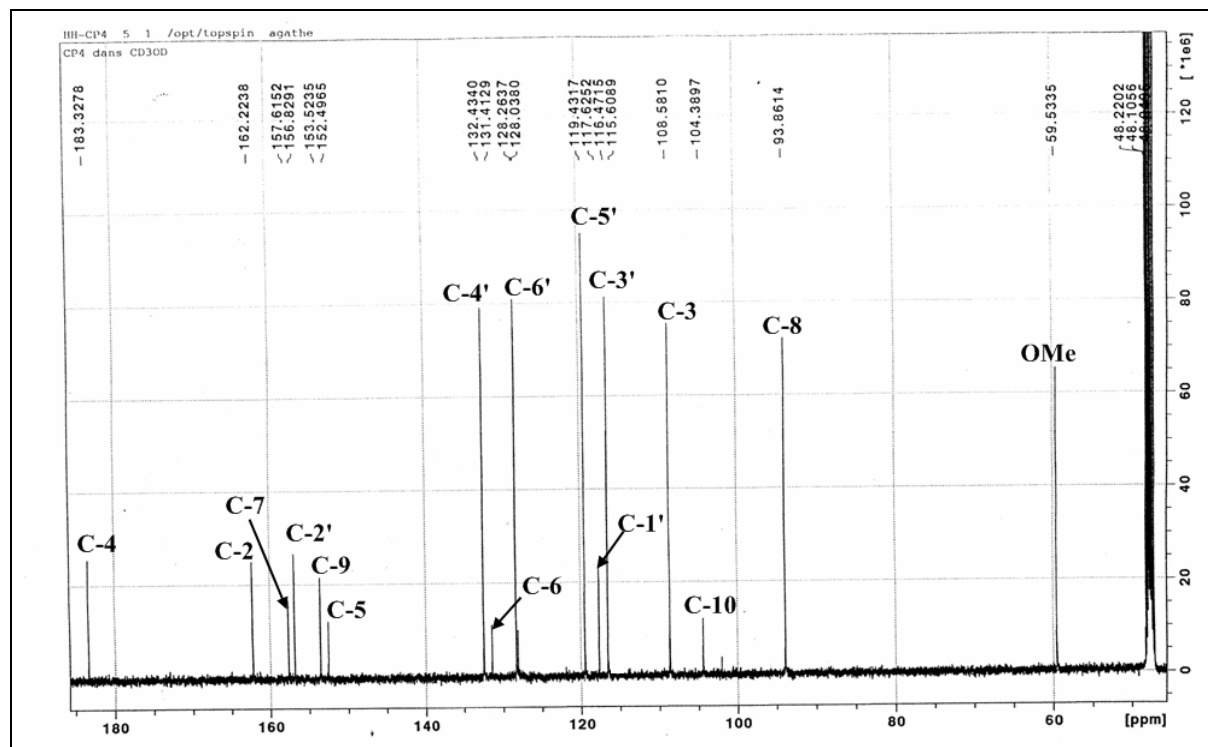
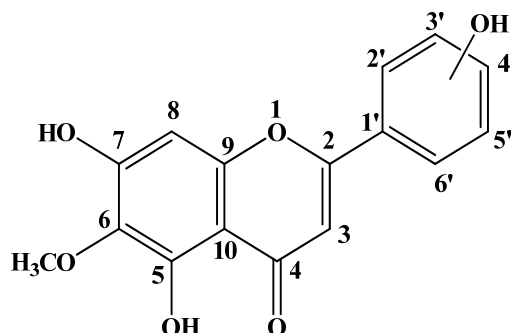


Figure III-35: Spectre RMN ¹³C découplé du composé CP₄

Comme l'analyse du spectre MS/MS (Figure III-33) indique la présence d'un groupement hydroxyle dans le cycle B, il reste à déterminer la position de cette substitution.



Le carbone quaternaire oxygéné C-2 à 162,2 ppm présente sur le spectre HMBC (Figure III-37) une grande tache de corrélation (3J) avec le proton H-6' dont le carbone est repéré à 128,3 ppm selon le spectre HSQC J -modulé. La multiplicité du proton H-6' sous forme de doublet de doublets avec des constantes de couplage 7,9 et 1,5 Hz traduit des couplages *ortho* et *méta* respectivement selon les schémas de substitution suivants.

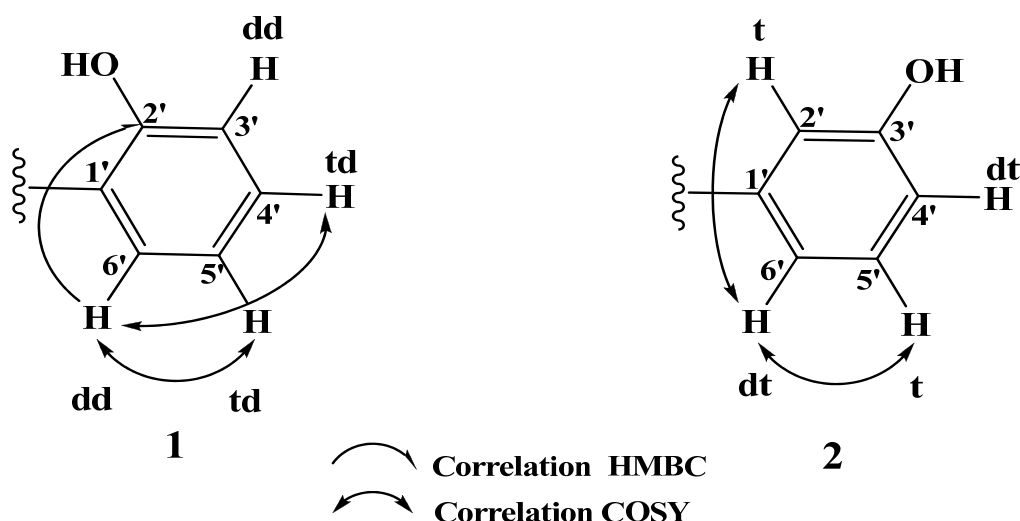


Schéma 1 : *Ortho*-substitution

Schéma 2 : *méta*-substitution

Les autres protons aromatiques du cycle B (Figure III-36) résonant à δ_H 7,38 (*td*, $J = 8,3 ; 1,3$ Hz), δ_H 7,03 (*td*, $J = 8,3 ; 1,3$ Hz), δ_H 6,99 (*dl*, $J = 8,1$ Hz) et δ_H 7,89 (*dd*, $J = 8,3 ; 1,8$ Hz). Les grandes valeurs de constantes de couplage suggèrent que tous les protons du noyau B sont adjacents (4 protons voisins), ce qui permet de placer l'hydroxyle en C-2' correspondant à une *ortho*-substitution.

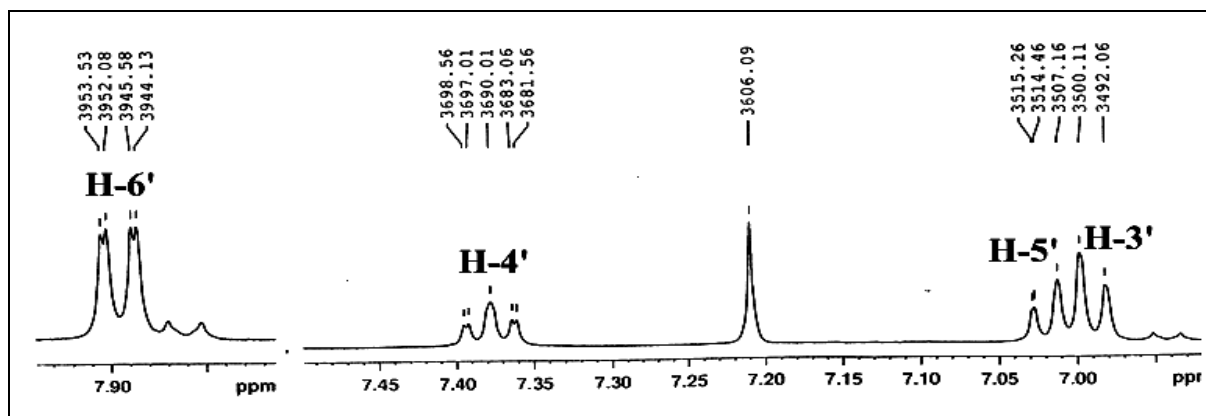


Figure III-36: Etalement du spectre RMN ^1H du composé CP_4

La grande tache de corrélation visualisée en HMBC (Figure III-37) entre le proton H-6' et un carbone oxygéné résonnant à 156,8 ppm traduisant un couplage en 3J qui n'est pas observable dans le cas d'une *méta*-substitution (Schéma 2), confirme que le groupement hydroxyle est lié au carbone C-2' (156,8 ppm). A partir du proton H-6' , il est facile d'assigner les déplacements chimiques des protons H-3' , H-4' et H-5' en analysant le spectre COSY qui montre un système de spin à 4 protons révélant les couplages (Figure III-38) entre $\text{H-6'}/\text{H-5'}$ (7,03 ppm)/ H-4' (7,38 ppm)/ H-3' (6,99 ppm). L'expérience hétéronucléaire directe C-H (HSQC) permet de repérer leurs carbones à δ_{C} 116,5 (C-3'), 132,4 (C-4') et 119,4 (C-5').

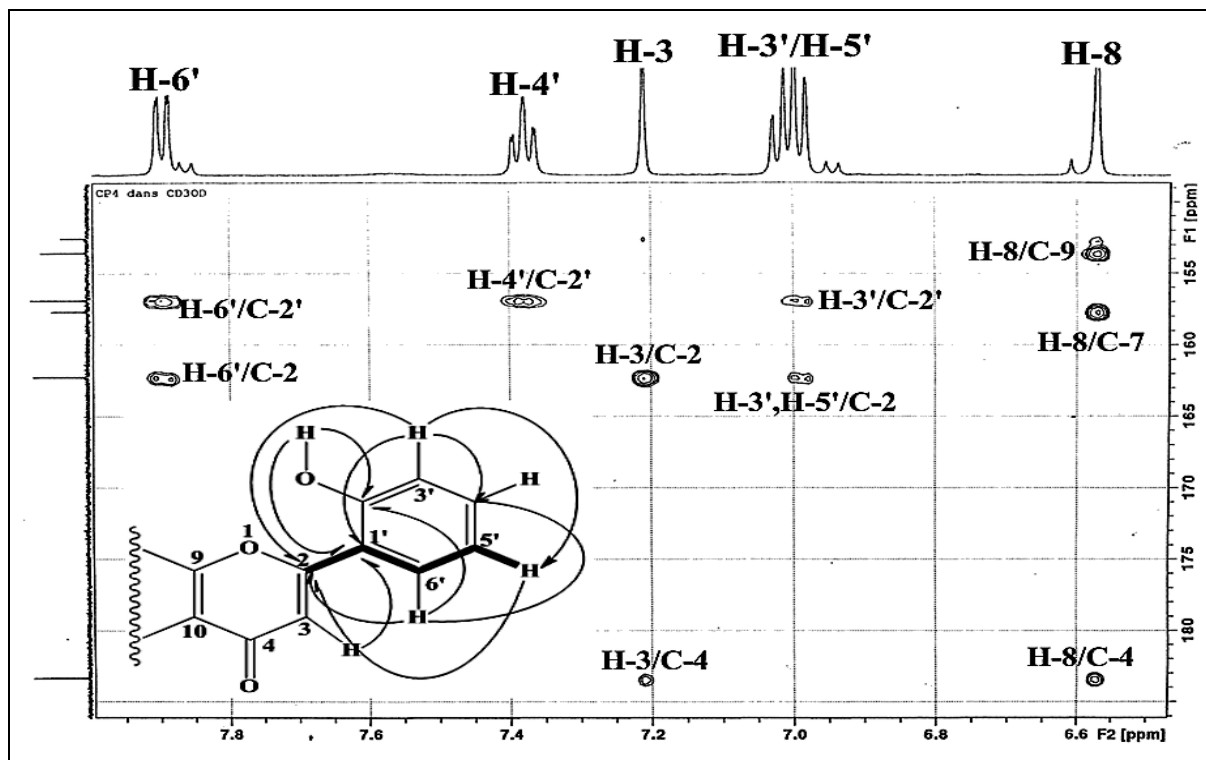


Figure III-37: Spectre HMBC du composé CP_4

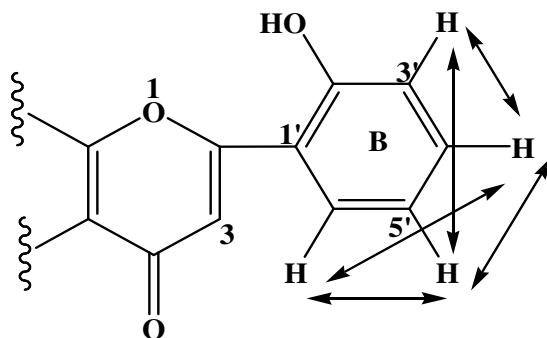


Figure III-38: Corrélations COSY du cycle B

Sur le spectre HMBC (Figure III-39), il est observé en plus les corrélations à longue distance entre :

- H-3' et les carbones C-1' (117,6 ppm), C-4' (132,4 ppm), C-5' (119,4 ppm) et C-2' (156,8 ppm).
- H-4' et les carbones C-2' (156,8 ppm) et C-6' (128,3 ppm).
- H-5' et les carbones C-1' (117,6 ppm) et C-6' (128,3 ppm).

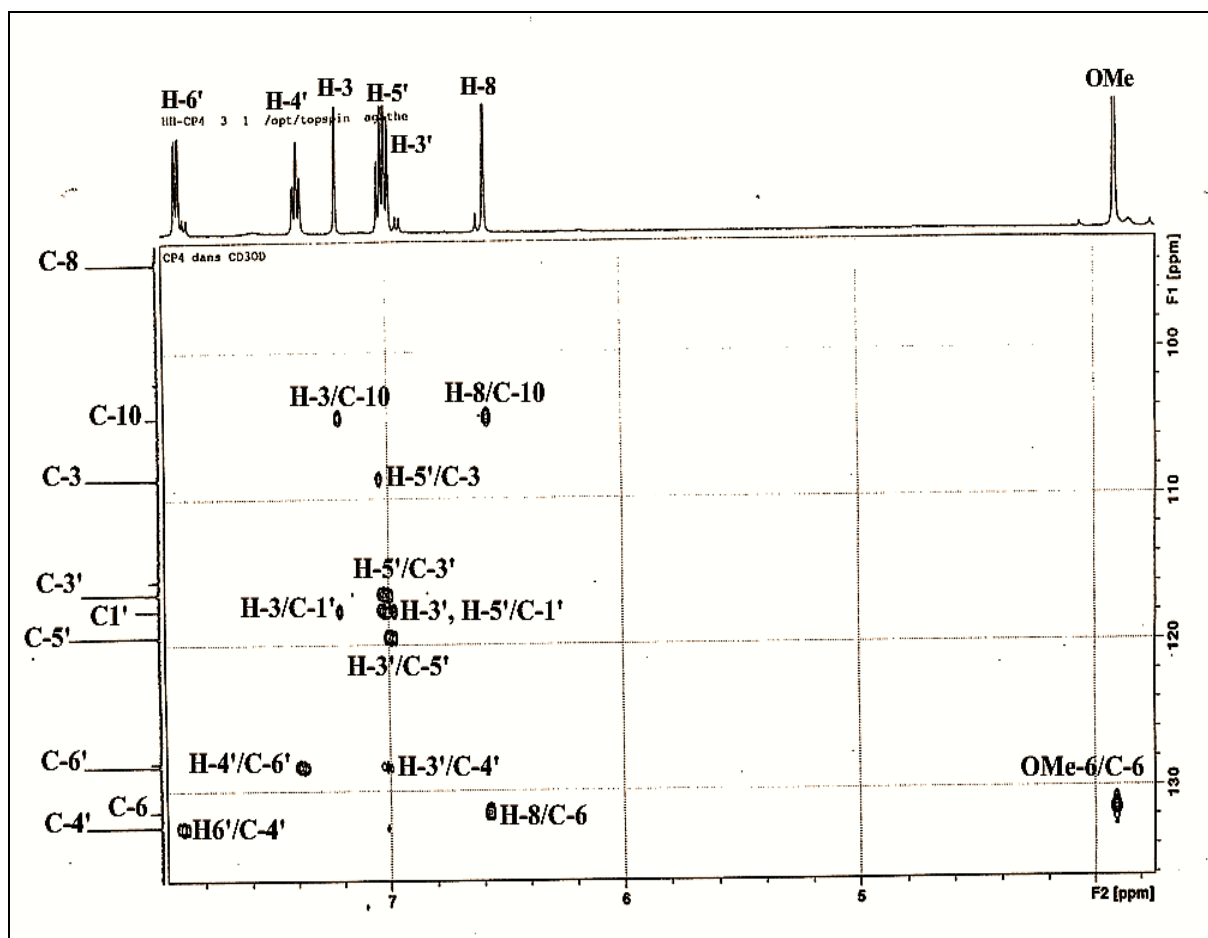


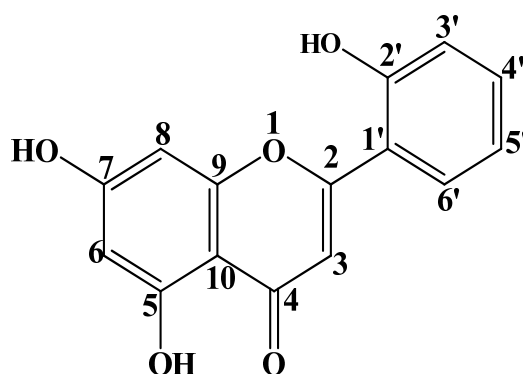
Figure III-39: Partie du spectre HMBC du composé CP₄

Toutes ces données spectroscopiques (Tableau 9) nous permettent de proposer pour le composé **CP₄**, la structure suivante: 5,7,2'-trihydroxy-6-méthoxyflavone nommé Ténaxine II. Ce composé a été identifié antérieurement dans des espèces du genre *Scutellaria* de la famille Asteraceae à savoir *Scutellaria barcalensis* ^[60] et *Scutellaria amoena* ^[61] mais a été isolé pour la première fois dans le genre *Centaurea*.

Tableau 9 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **CP₄** dans CD₃OD.

Position	δ _H	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ _C
2	-	-	-	162,2
3	7,21	-	<i>s</i>	108,6
4	-	-	-	183,3
5	-	-	-	152,5
6	-	-	-	131,4
7	-	-	-	157,6
8	6,57	-	<i>s</i>	93,9
9	-	-	-	153,5
10	-	-	-	104,4
1'	-	-	-	117,6
2'	-	-	-	156,8
3'	6,99	8,3	<i>dl</i>	116,5
4'	7,38	(8,3 ; 1,3)	<i>td</i>	132,4
5'	7,03	(8,3 ; 1,3)	<i>td</i>	119,4
6'	7,89	(8,3 ; 1,3)	<i>dd</i>	128,3
OCH ₃	3,91	-	<i>s</i>	59,5

III-4-4- Elucidation structurale du composé CP₈



5,7,2'-trihydroxyflavone

Le composé **CP₈** est le 5,7,2'-trihydroxyflavone. Cette flavone se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol et se révèle sur CCM en jaune à l'acide sulfurique. Il a été isolé antérieurement des espèces : *Scutellaria strigillosa* ^[62] et *Scutellaria amabilis* ^[63] et il possède les activités biologiques anti-mycobactérienne^[64], anti-tumorale^[65] et anti-oxydante^[66]

Le spectre UV du composé **CP₈** (Figure III-40), enregistré dans le MeOH présente deux bandes d'absorption à 273 nm (Bande II) et 344 nm (Bande I), attestant de la présence d'un squelette flavonique de type flavone. L'addition de AlCl₃ conduit à un déplacement bathochromique de l'ordre de (+ 36 nm) de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le méthanol indiquant ainsi un OH libre en position C-5.

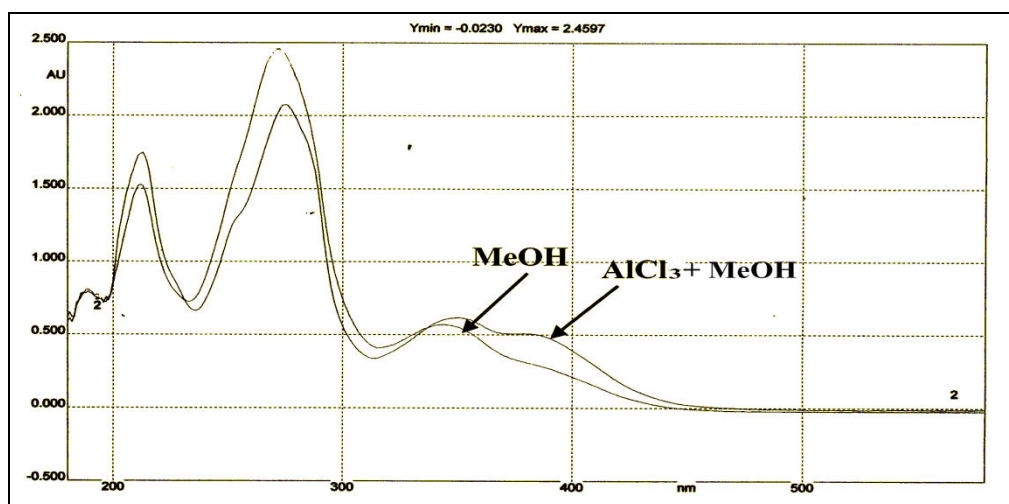


Figure III-40: Spectres UV du composé CP₈

Les spectres de masse ESI-MS enregistrés en mode positif (Figure III-41) et en mode négatif (Figure III-42), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 293$ $[M+Na]^+$, 563 $[2M+Na]^+$, 269 $[M-H]^-$ et 539 $[2M-H]^-$ respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 270 uma et une formule brute en C₁₅H₁₀O₅. La différence de 30 uma par rapport au composé CP₄ (300 uma) indique l'absence du groupement méthoxyle.

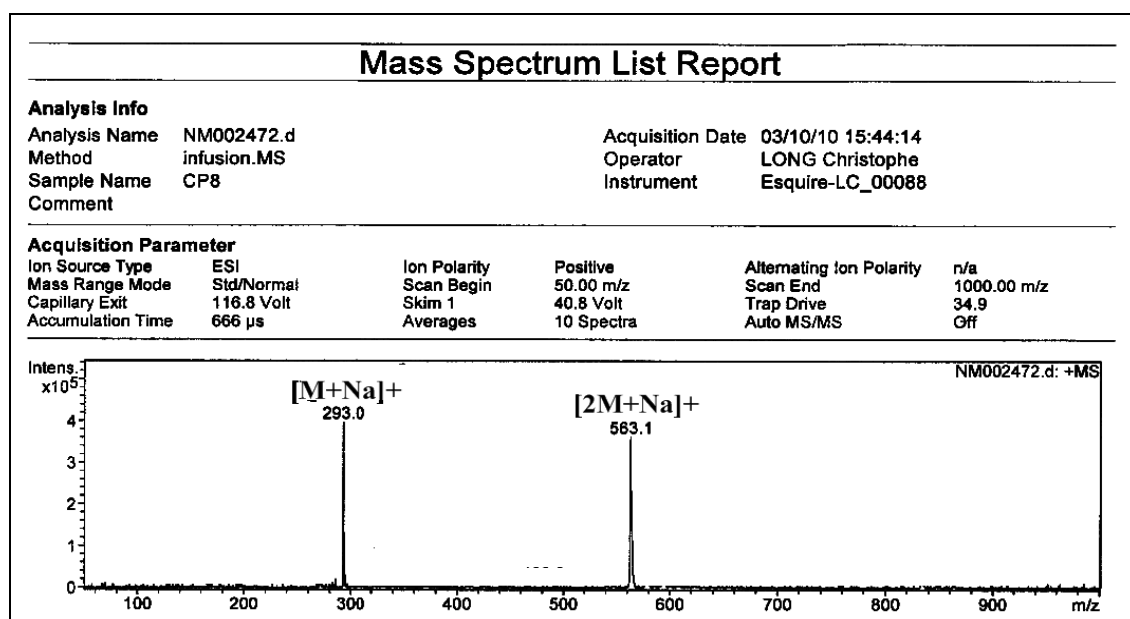


Figure III-41: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP₈

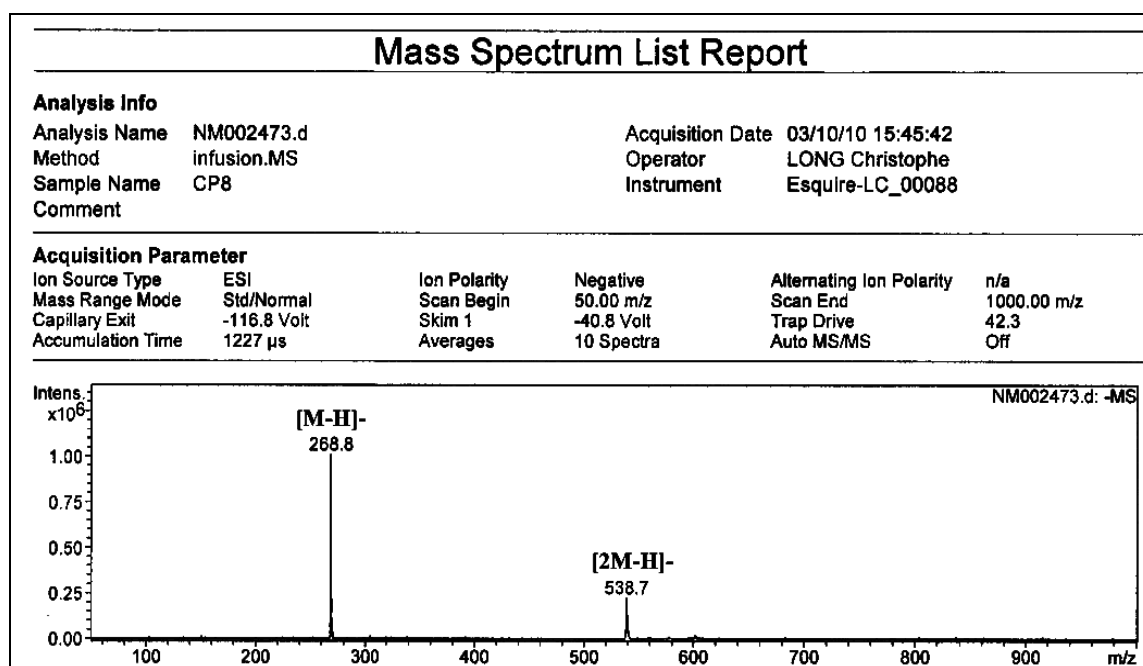


Figure III-42: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₈

Le spectre MS/MS en mode négatif (Figure III-43) de l'ion pseudomoléculaire à $m/z = 269$ montre un pic de fragmentation à $m/z = 151$, soit une différence de 118 uma, indiquant la présence d'un hydroxyle au niveau du cycle B comme il a été signalé dans le composé CP₄.

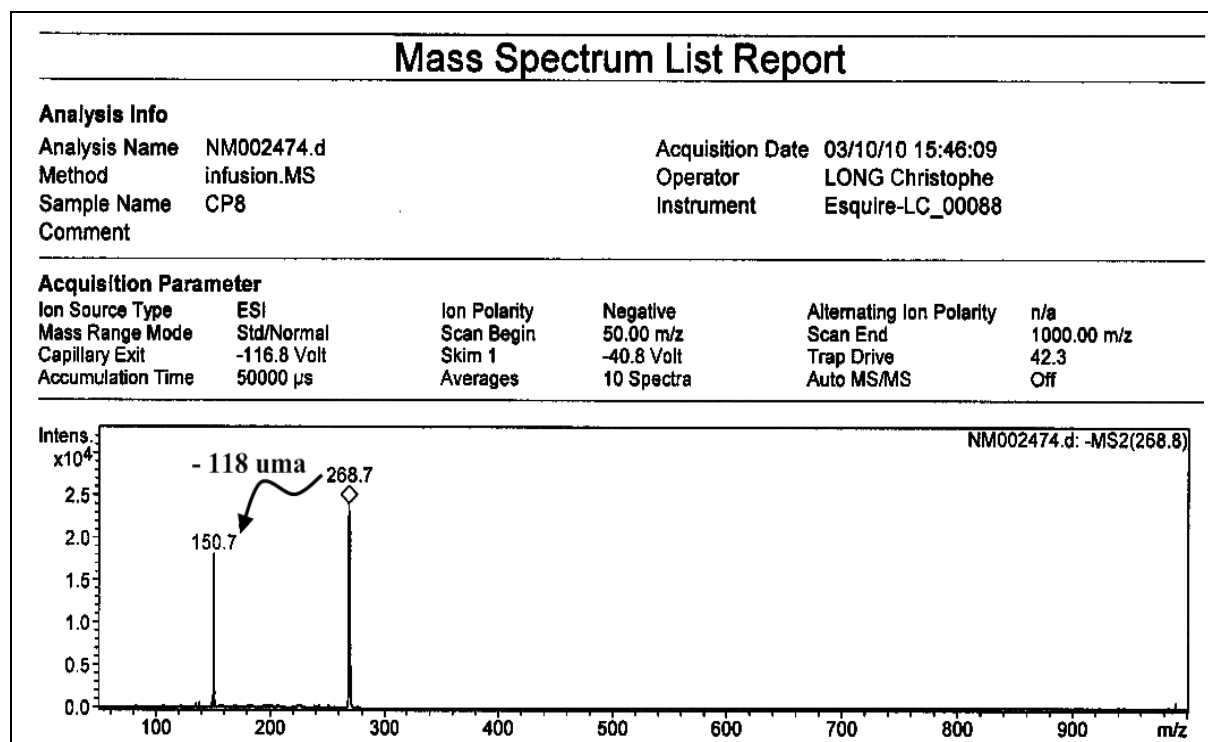


Figure III-43: Spectre MS /MS (mode négatif) du composé CP₈

Le spectre IR du composé CP₈ montre des bandes d'absorption à 3315 cm^{-1} correspondant à un groupement hydroxyle et 1656 cm^{-1} à un carbonyle. D'autres bandes d'absorption apparaissant à 3074, 1617, 1571 et 1500 cm^{-1} montrent l'existence d'un système aromatique.

Le spectre RMN ^1H du composé CP₈ est presque similaire à celui du composé CP₄ (Figure III-44), au niveau des protons aromatiques du cycle B. Comme l'analyse du spectre de masse MS/MS suggère la présence d'un groupement hydroxyle dans le cycle B, celui-ci ne peut être qu'en position C-2'. Cette substitution a été démontrée précédemment lors de l'analyse du spectre RMN ^1H du composé CP₄.

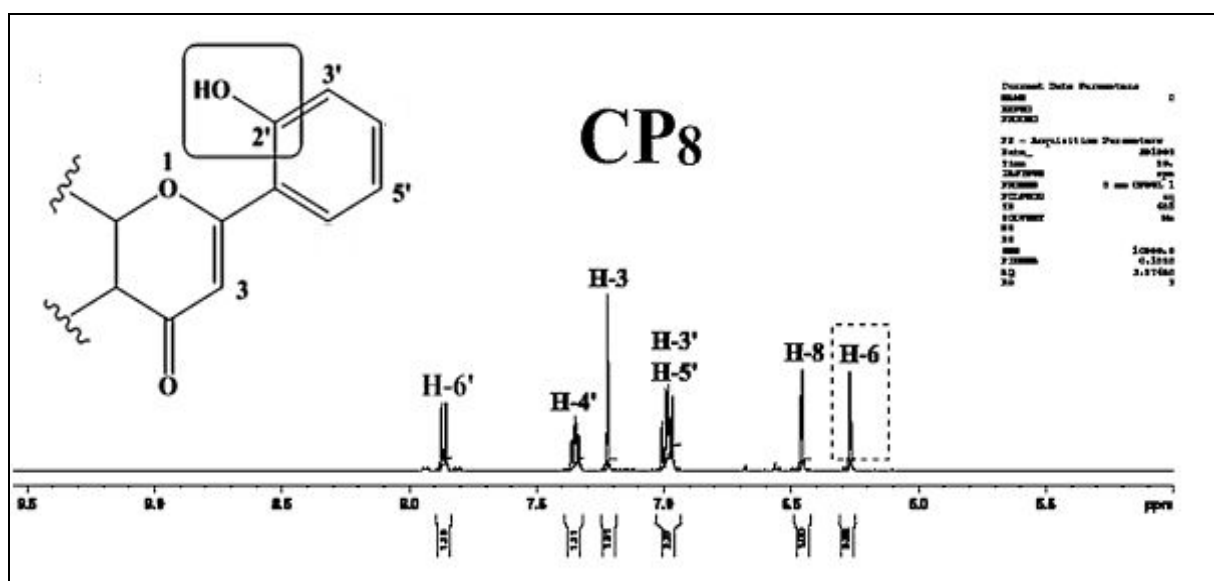
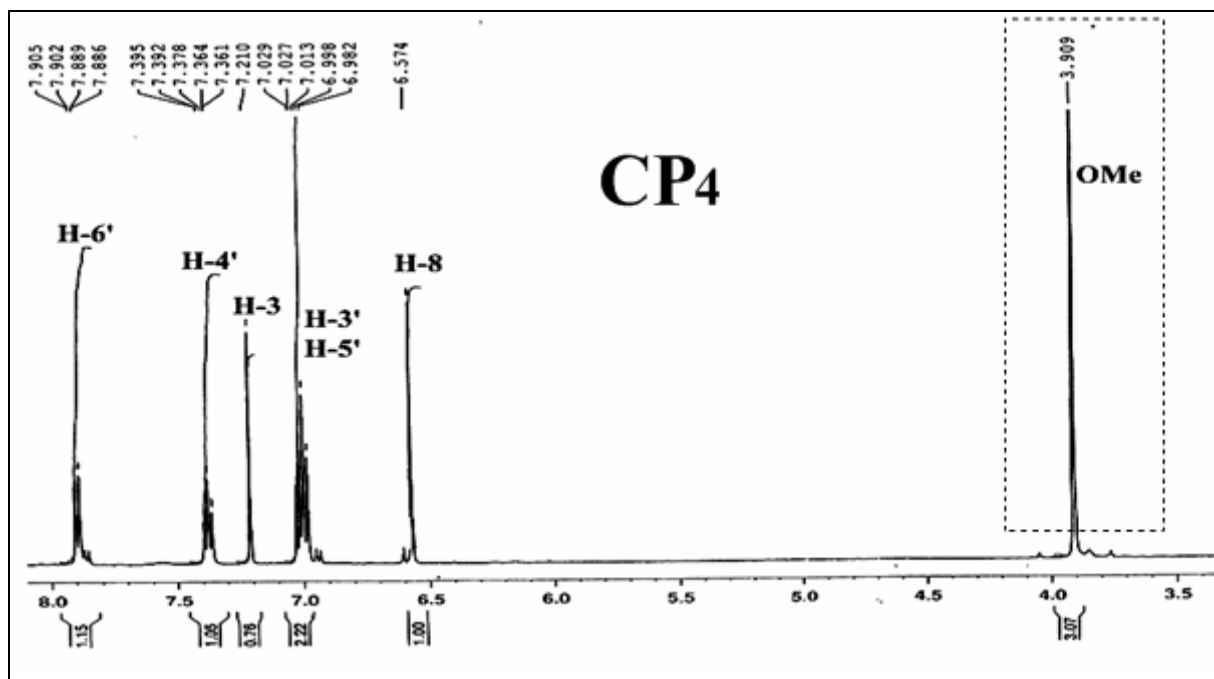


Figure III-44: Spectres RMN ^1H des composés CP_4 (haut) et CP_8 (bas)

La seule différence entre CP_8 et CP_4 reside dans l'apparition d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,27$ sur le spectre RMN ^1H du composé CP_8 et la disparition du signal correspondant au groupement méthoxyle lié au carbone C-6 dans le cas du CP_4 . Il en résulte que ce doublet est attribué impérativement au proton H-6. Ce proton corrèle dans l'expérience COSY (Figure III-45) avec un autre proton à $\delta_{\text{H}} 6,46$ ne pouvant être donc que le proton H-8, au regard de la constante de couplage ($J = 2 \text{ Hz}$) caractéristique d'un couplage de type *métab* (Figure III-46). Aussi, ces deux protons H-6 et H-8 couplent en HSQC (Figure III-47) avec leurs carbones à 99,6 et 94,7 ppm respectivement.

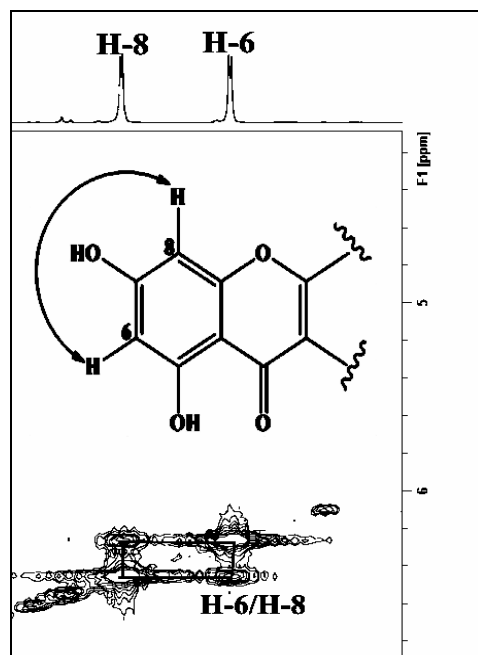


Figure III-45: Partie du spectre COSY

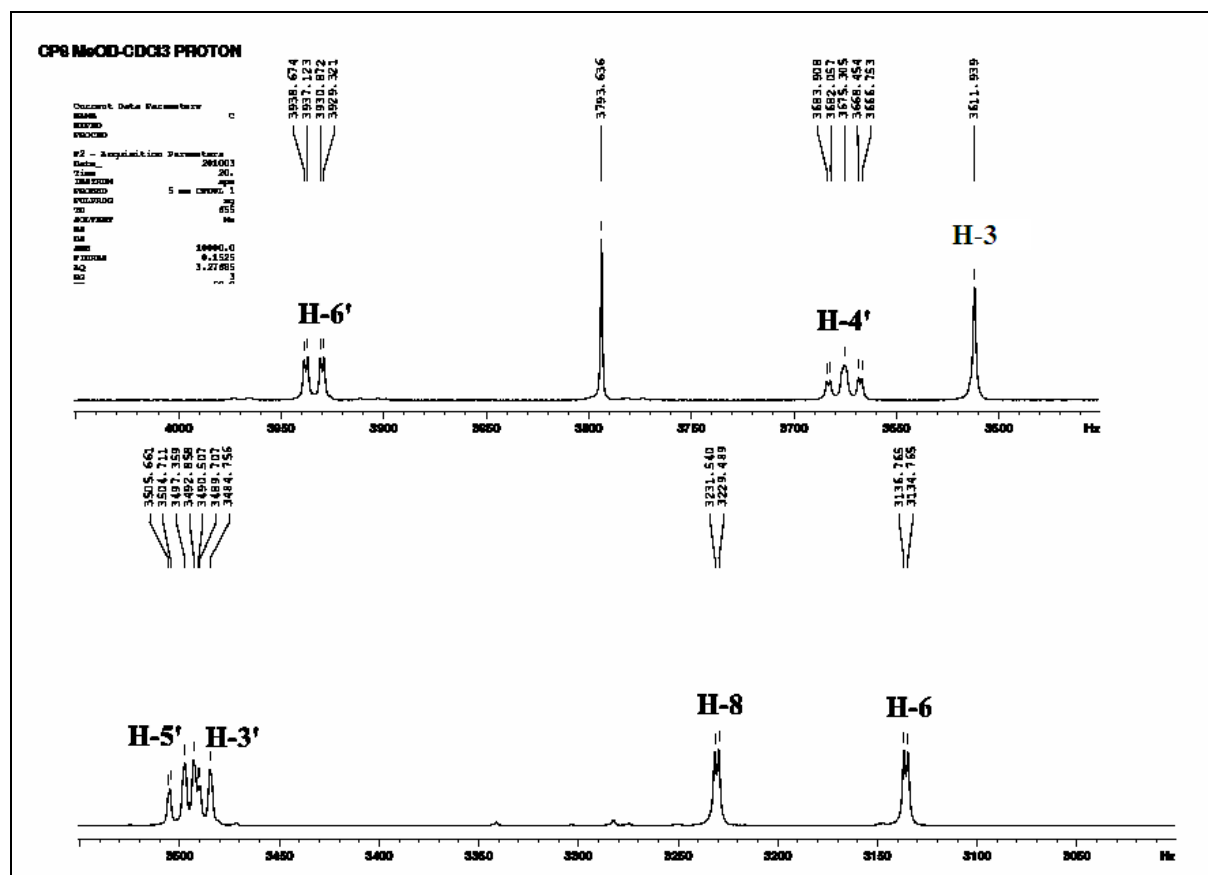


Figure III-46: Etalement du spectre RMN ¹H du composé CP₈

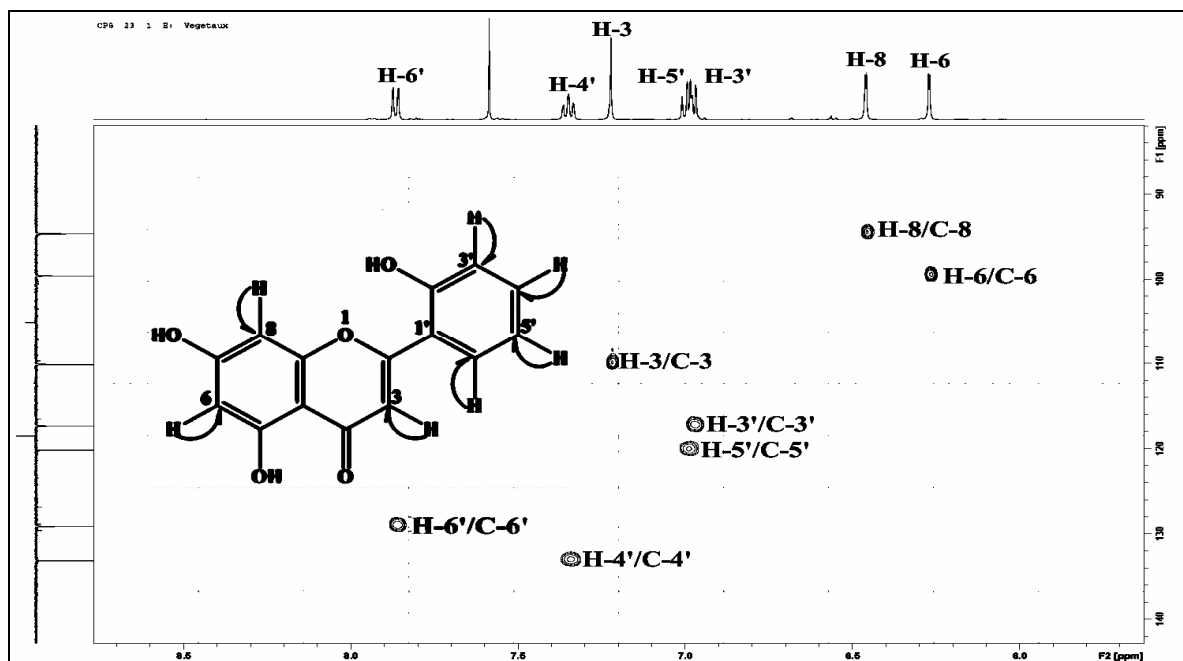


Figure III-47: Spectre HSQC J -modulé du composé CP₈

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure III-48) présente les signaux de 15 atomes de carbone, avec en particulier le signal du groupement carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 183,8$ ppm.

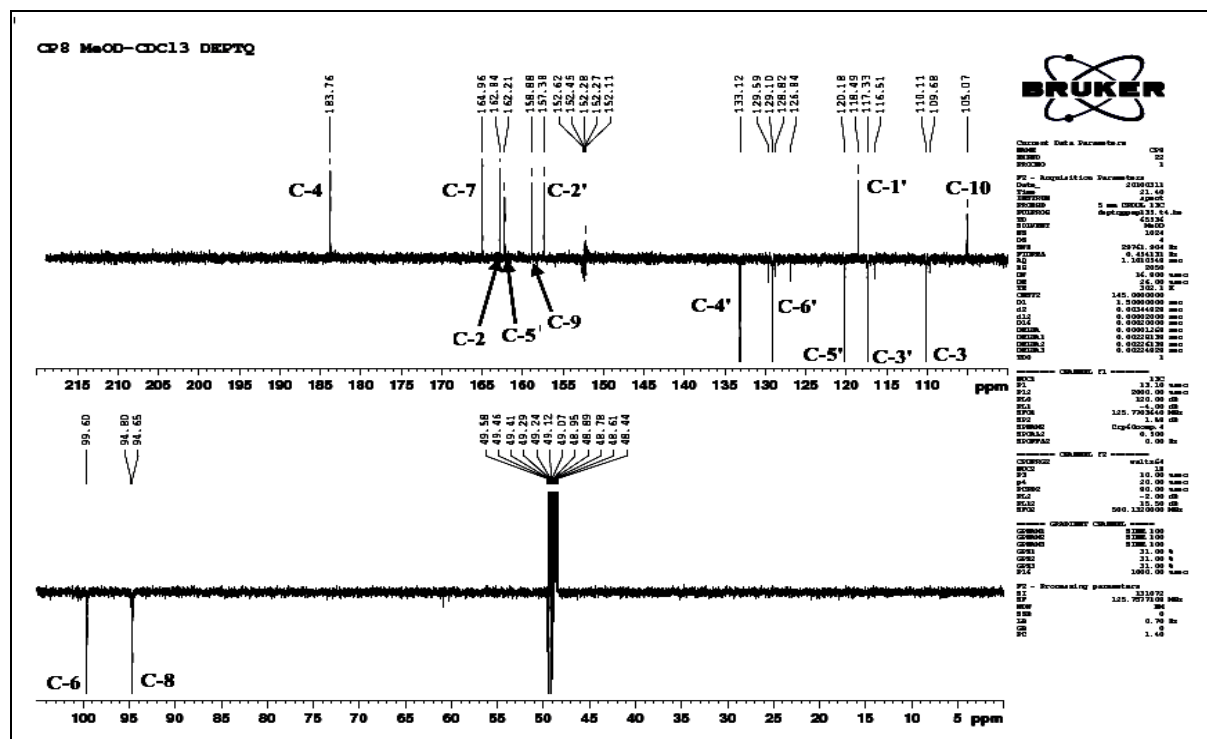


Figure III-48: Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé CP₈

Les déplacements chimiques des carbones de ce composé ont été déterminés en analysant le spectre HMBC. En effet, les corrélations observées (Figure III-49) entre les deux protons H-6 et H-8 et les carbones quaternaires résonant à δ_C 105,1 et 164,9 permettent de les attribuer facilement aux carbones C-10 et C-7 respectivement. En outre, le proton H-6 corrèle avec les carbones résonant à δ_C 162,2 (C-5) et à δ_C 94,7 (C-8) et le proton H-8 couple en 2J , 3J et 4J avec les carbones repérés à δ_C 158,9 (C-9), 99,6 (C-6), et 183,8 (C-4). Les autres corrélations sont représentées dans le spectre ci-dessous (Figure III-49).

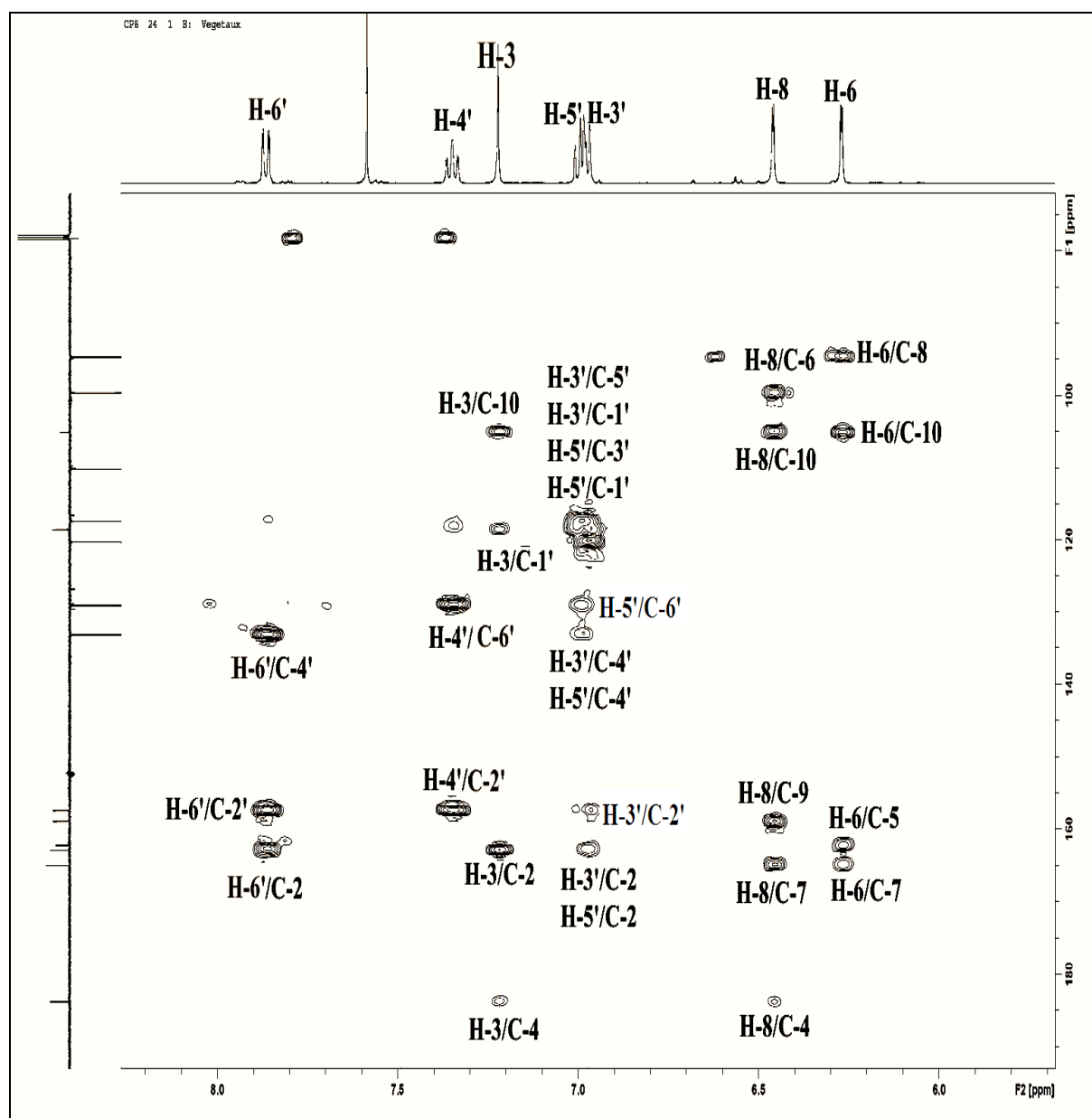


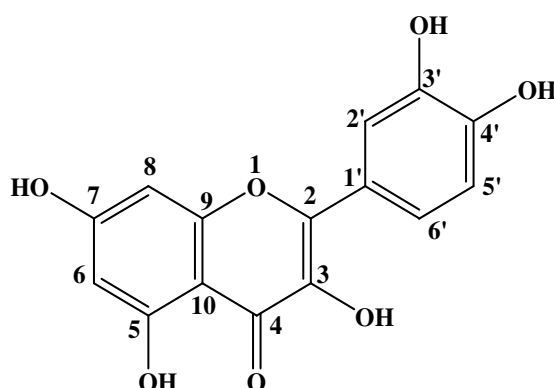
Figure III-49: Spectre HMBC du composé CP₈

Toutes ces données (Tableau 10) nous permettent de proposer sans ambiguïté pour ce composé, la structure suivante: 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP₈**). Il est important de signaler que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Centaurea*.

Tableau 10: Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **CP₈** dans CD₃OD/CDCl₃.

Position	δ _H	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ _C
2	-	-	-	162,8
3	7,22	-	<i>s</i>	110,1
4	-	-	-	183,8
5	-	-	-	162,2
6	6,27	2,0	<i>d</i>	99,6
7	-	-	-	164,9
8	6,46	2,0	<i>d</i>	94,7
9	-	-	-	158,9
10	-	-	-	105,1
1'	-	-	-	118,5
2'	-	-	-	157,4
3'	6,98	8,2	<i>dl</i>	116,5
4'	7,35	(8,2 ; 1,2)	<i>td</i>	133,1
5'	7,01	(8,2 ; 1,2)	<i>td</i>	120,2
6'	7,86	(8,2 ; 1,2)	<i>dd</i>	129,1

III-4-5- Elucidation structurale du composé CP₉



5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol (Quercétine)

L'examen du spectre UV du composé **CP₉** (Figure III-50), enregistré dans le MeOH permet d'observer deux bandes d'absorption à 257 nm (Bande II) et 374 nm (Bande I) indiquant la présence d'un squelette flavonique de type flavonol (OH libre en C-3) ^[67].

L'addition du réactif AlCl₃, conduit à l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 448 nm laissant suggérer la présence d'un flavonol avec au moins trois hydroxyles, dont deux sont *ortho* di-OH sur le cycle B et le troisième en C-5 (Tableau 11) ^[67].

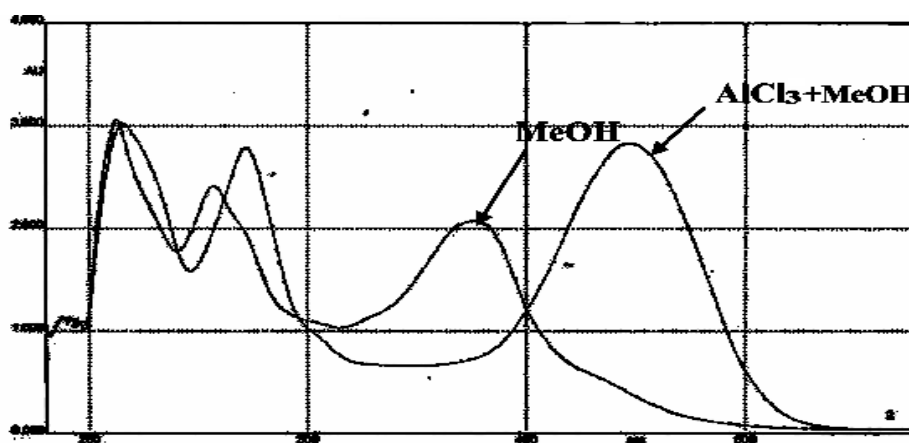


Figure III-50: Spectres UV du composé CP₉

Tableau 11: Données spectrales UV du composé CP₉

	λ max (nm)	
	Bande II (Cycle A)	Bande I (Cycle B)
MeOH	257	374
MeOH + AlCl ₃	272	448

Le spectre de masse ESI-MS du composé **CP₉** (Figure III-51), montre en mode négatif deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 301 $[M-H]^-$ et 603 $[2M-H]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 302 uma et une formule brute en $C_{15}H_{10}O_7$.

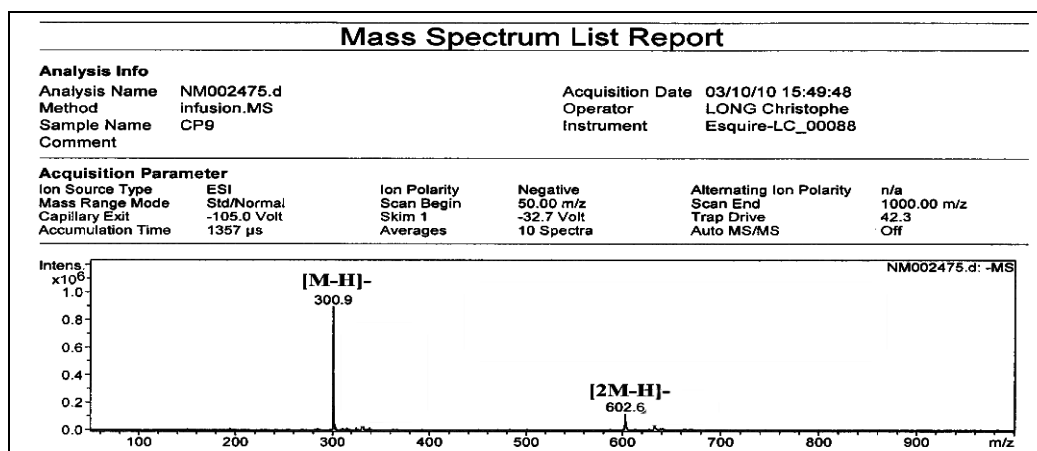


Figure III-51: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₉

Le spectre MS/MS en mode négatif (Figure III-52) de l'ion pseudomoléculaire à $m/z = 301$ montre les pics de fragmentation suivants:

- deux pics de fragmentation à m/z 179 et 151, correspondent respectivement à une rétrocyclisation et perte du CO caractéristiques des flavonols ^[68]. Ces deux fragments confirment la substitution du noyau A par deux groupements hydroxyles (Figure III-53).
- un pic de fragmentation à m/z 257, traduisant une différence de 44 uma, indique le départ d'une molécule de CO_2 (Figure III-53).

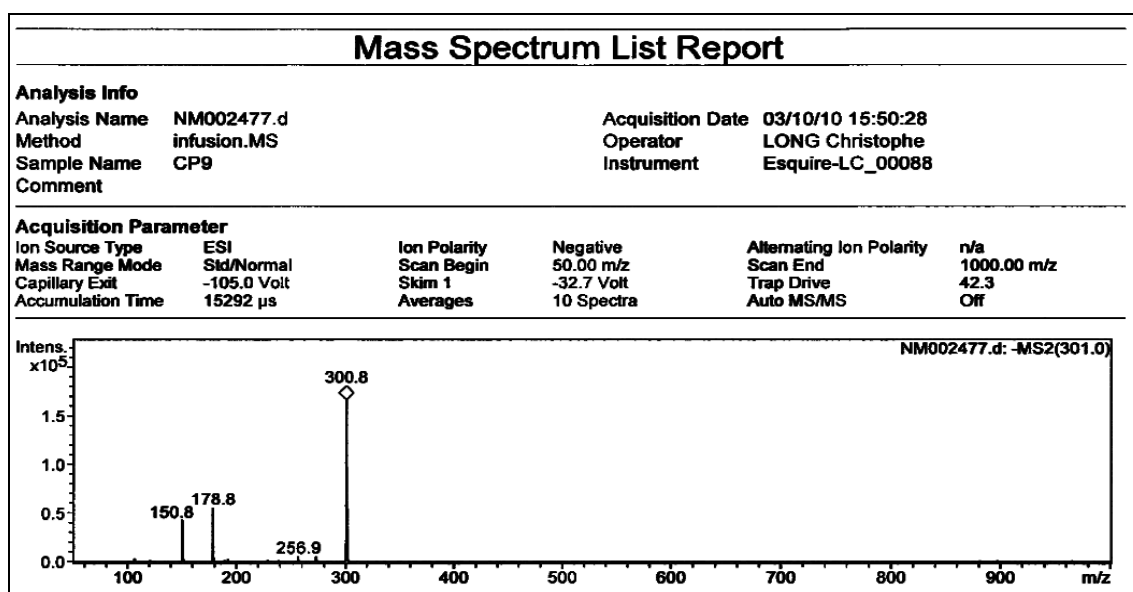


Figure III-52 : Spectre MS/MS (mode négatif) du composé CP₉

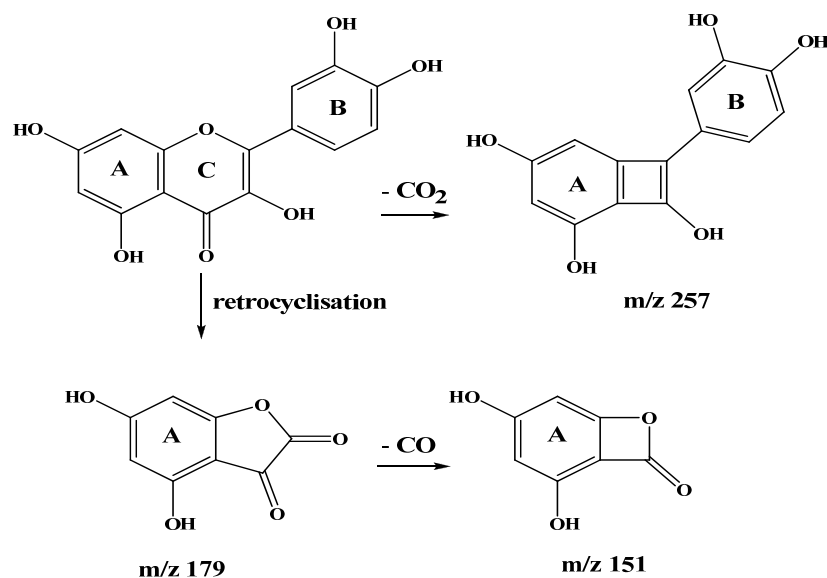


Figure III-53: Fragmentations du composé CP₉

Le spectre IR du composé CP₉, montre des bandes d'absorption à 3500 cm^{-1} (groupements hydroxyles), 1662 cm^{-1} (carbonyle) et 1614 cm^{-1} , 1512 cm^{-1} (cycle aromatique).

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure III-54) permet d'observer quinze signaux se répartissant en cinq carbones aromatiques méthines, sept carbones aromatiques oxygénés, deux carbones quaternaires et un carbonyle.

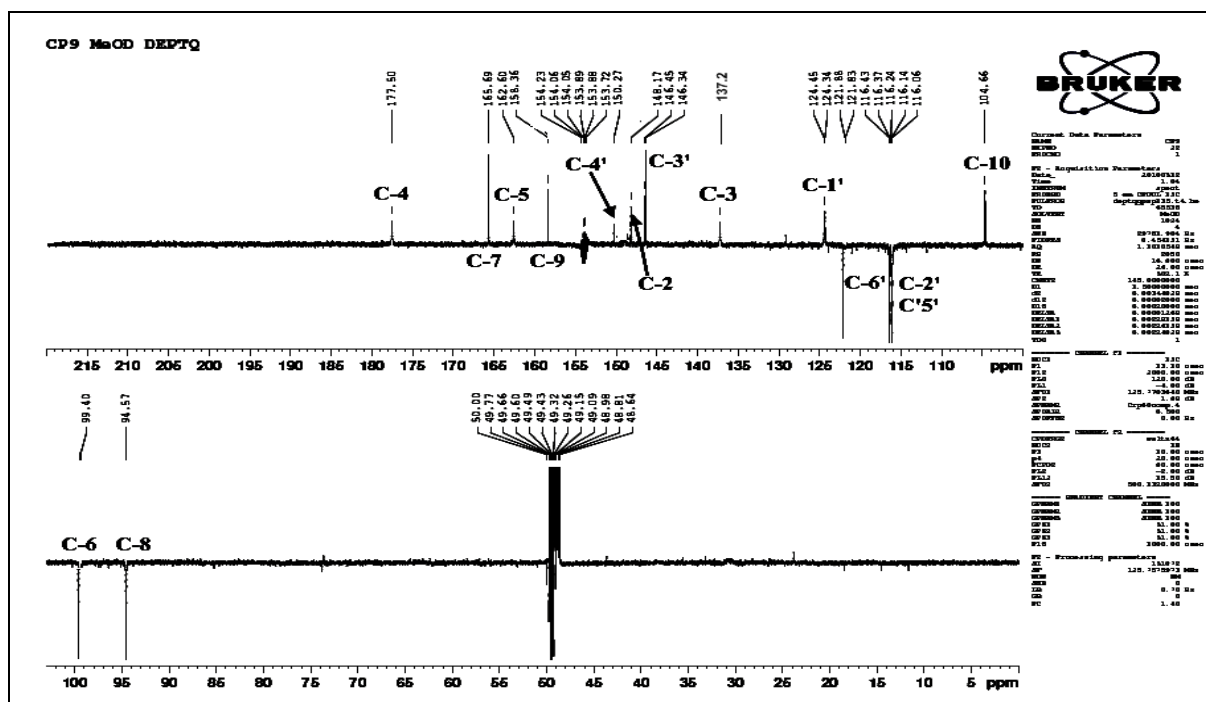


Figure III-54: Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé CP₉

Sur le spectre RMN ^1H (Figure III-55) du composé **CP₉**, il est facile de visualiser deux signaux sous forme de doublet attribuables aux protons H-6 et H-8 du cycle A résonnant à 6,18 et 6,39 ppm respectivement, comme il a été constaté précédemment lors de l'analyse structurale du composé **CP₃**.

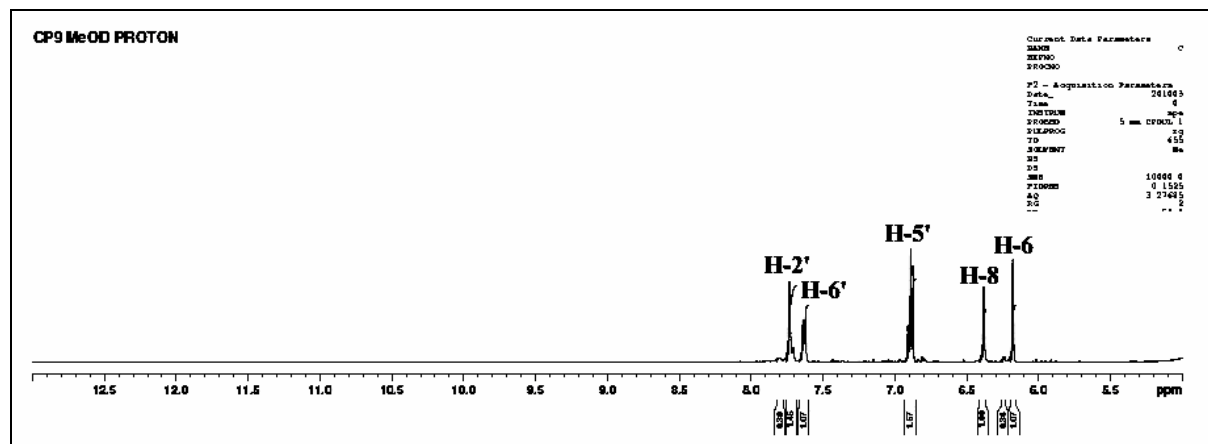


Figure III-55: Spectre RMN ^1H du composé **CP₉**

Les déplacements chimiques des carbones du cycle A sont aisément assignés par analyse des spectres HSQC, HMBC (Figure III-56) et ^{13}C J -modulé et comparaison avec les données spectrales du composé **CP₃** (Tableau 7) et de la littérature. L'absence sur le spectre RMN ^1H du composé **CP₉** d'un signal singulet entre 6,70 et 7,30 ppm (H-3) caractéristique des flavones et l'apparition sur le spectre RMN ^{13}C J -modulé d'un nouveau signal à δ_{C} 137,2 (C-3) confirment la présence d'un groupement hydroxyle en position C-3.

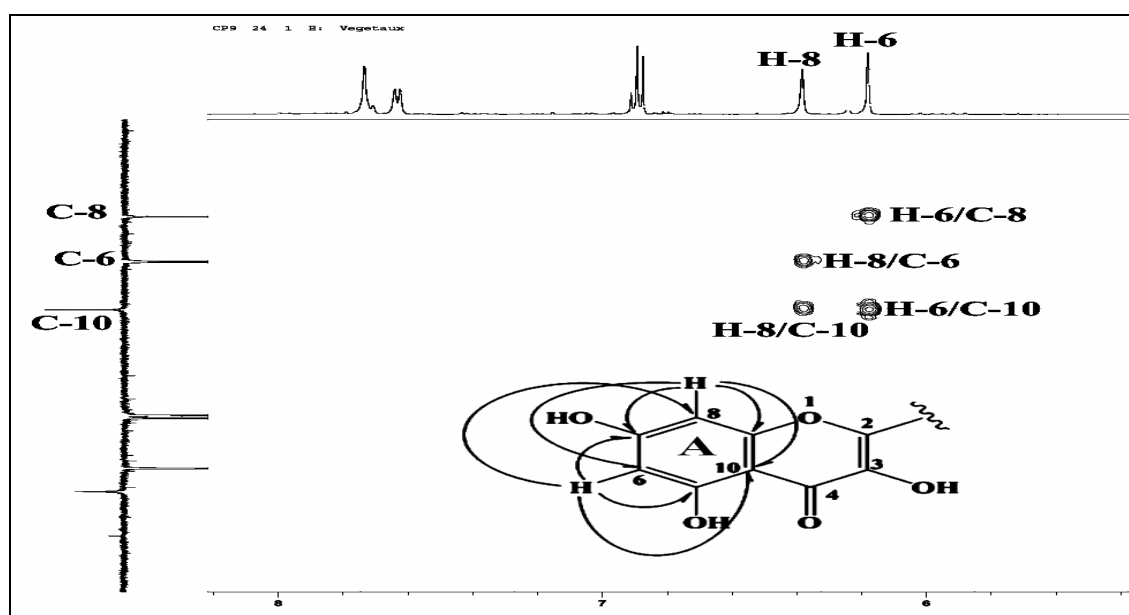


Figure III-56: Spectre HMBC du cycle A

Les protons du cycle B du flavonol sont visualisés sur le spectre RMN ^1H entre 6,70 et 7,90 ppm ^[69]. Sur les spectres RMN ^1H (Figure III-55) et COSY H-H (Figure III-58) du composé **CP₉**, on constate la présence de trois protons aromatiques formant un même système de spin à trois protons de type ABX à δ_{H} 7,74 ppm (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,62 ppm (*dd*, $J = 8,3$ et $2,1$ Hz, H-6') et 6,88 ppm (*d*, $J = 8,3$ Hz, H-5') (Figure III-57).

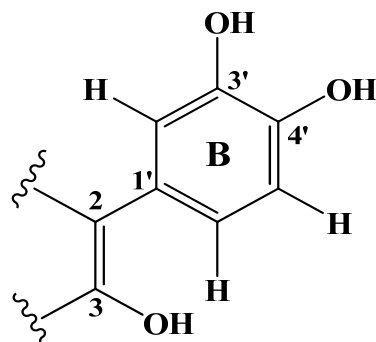


Figure III-57 : Substituants du cycle B du composé **CP₉**

Le spectre COSY montre le système de spin correspondant aux couplages des protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B (Figure III-58). Ces protons corrélient en HSQC avec les carbones C-2' (116,1 ppm), C-5' (116,1 ppm) et C-6' (121,8 ppm).

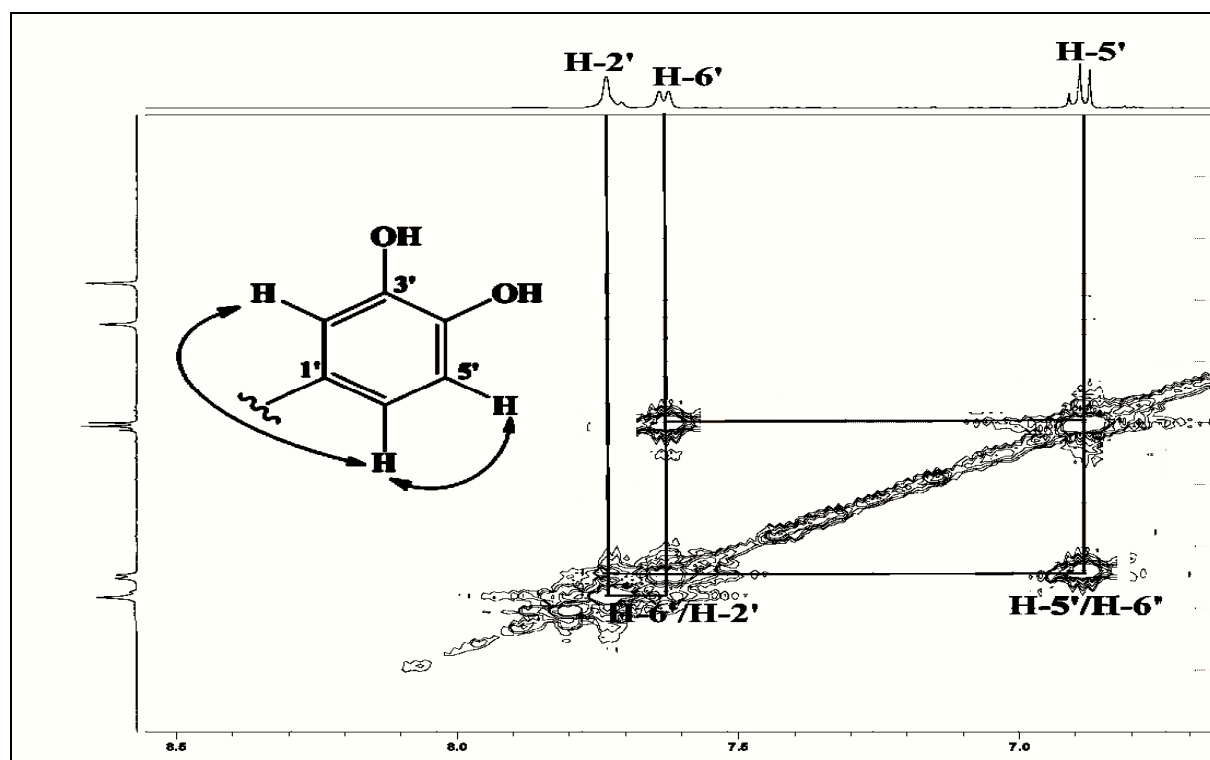


Figure III-58: Spectre COSY du cycle B

L'expérience HMBC (Figure III-59) met en évidence les couplages C-H à longue distance en 2J et 3J entre :

- le proton H-2' et les carbones résonant à δ_C 148,2 (C-2), 121,8 (C-6'), 150,3 (C-4') et 146,3 (C-3'). Le déplacement chimique du carbone C-2 à 148,2 ppm indique également un OH libre en position C-3.
- le proton H-5' et les carbones détectés à δ_C 148,2 (C-2), 124,3 (C-1'), 146,3 (C-3') et 150,3 (C-4').
- le proton H-6' et les carbones repérés à δ_C 116,14 (C-5') et 150,27 (C-4').

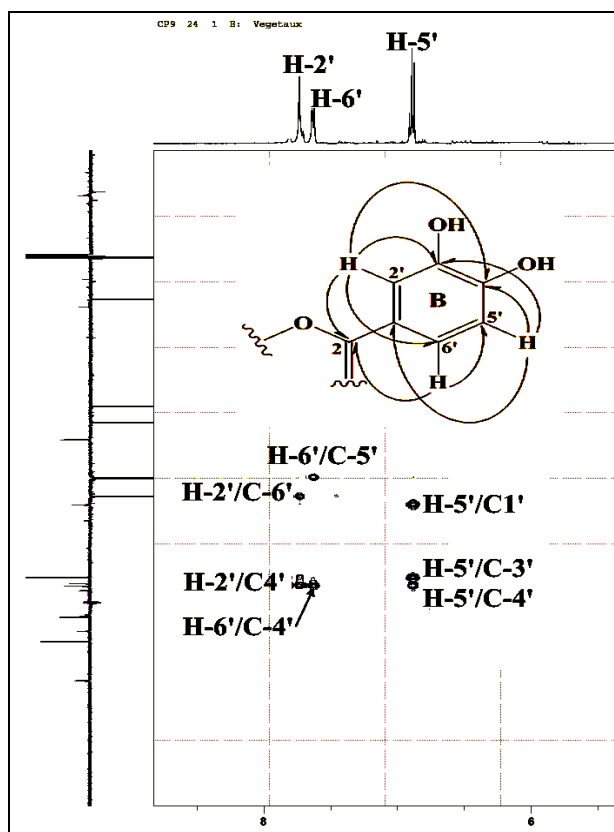


Figure III-59 : Spectre HMBC du cycle B

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau 12, permettent d'identifier ce composé au 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol ou quercétine (**CP₉**), isolé antérieurement des espèces : *C. collina* ^[70], *C. napifolia* ^[71] et *C. chilensis* ^[72]. Ces données sont conformes à celles de la littérature ^[73, 74].

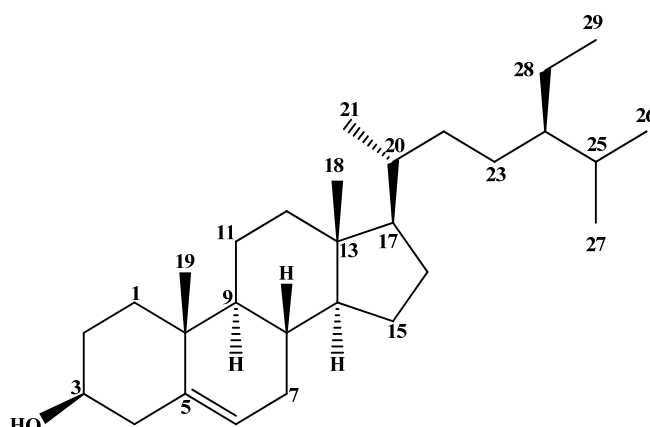
La quercétine est réputée pour être le plus actif des flavonoïdes. Elle a des propriétés biologiques intéressantes anti-oxydantes ^[75], anti-inflammatoires ^[76] et anti-histaminiques (anti-allergiques) ^[77]. Ces activités ont été constatées au cours de nombreuses études *in vitro*

et *in vivo*. La quercétine a aussi des effets positifs sur les capillaires et le système cardiovasculaire ^[78].

Tableau 12 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **CP₉** dans CD₃OD.

Position	δ _H	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ _C
2	-	-	-	148,2
3	-	-	-	137,2
4	-	-	-	177,5
5	-	-	-	162,6
6	6,18	2,0	<i>d</i>	99,4
7	-	-	-	165,7
8	6,39	2,0	<i>d</i>	94,6
9	-	-	-	158,4
10	-	-	-	104,7
1'	-	-	-	124,3
2'	7,74	2,1	<i>d</i>	116,1
3'	-	-	-	146,3
4'	-	-	-	150,3
5'	6,88	8,3	<i>d</i>	116,1
6'	7,62	(8,3 ; 2,1)	<i>dd</i>	121,8

III-4-6- Elucidation structurale du composé CP₆



24-éthylcholest-5-èn-3-ol (β-sitostérol)

Le composé **CP₆** est le 24-éthylcholest-5-èn-3-ol, un stéroïde nommé communément β-sitostérol, se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme, et se colore sur CCM en rose après révélation par l'acide sulfurique et chauffage.

Les spectres de masse du composé **CP₆** obtenues en ionisation par ESI (Electrospray), enregistrés en mode négatif (Figure III-60) et mode positif (Figure III-61), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 413$ $[M-H]^-$ et 437 $[M+Na]^+$ respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 414 uma et une formule brute en C₂₉H₅₀O.

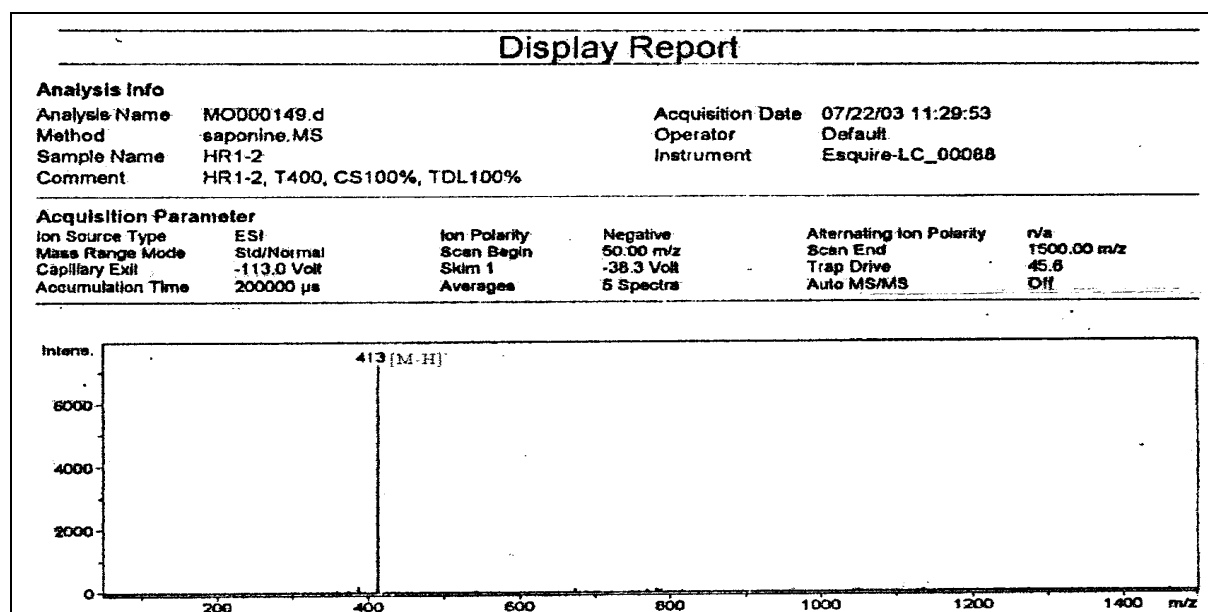


Figure III-60: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₆

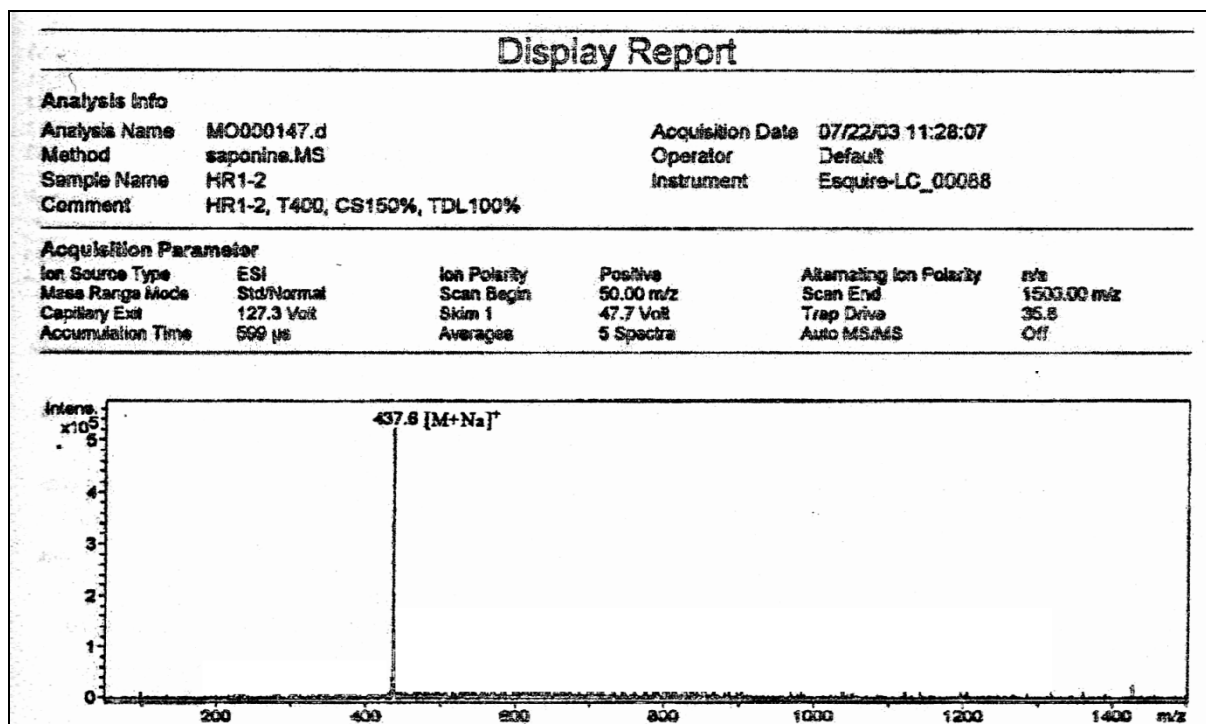


Figure III-61 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP₆

Le spectre MS/MS en mode positif (Figure III-62), du pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z = 437 $[M+Na]^+$ révèle un pic de fragmentation à m/z = 405, soit une différence de 32 uma indiquant le départ des groupements CH₃ et OH, ce qui est largement attendu pour les stérols.

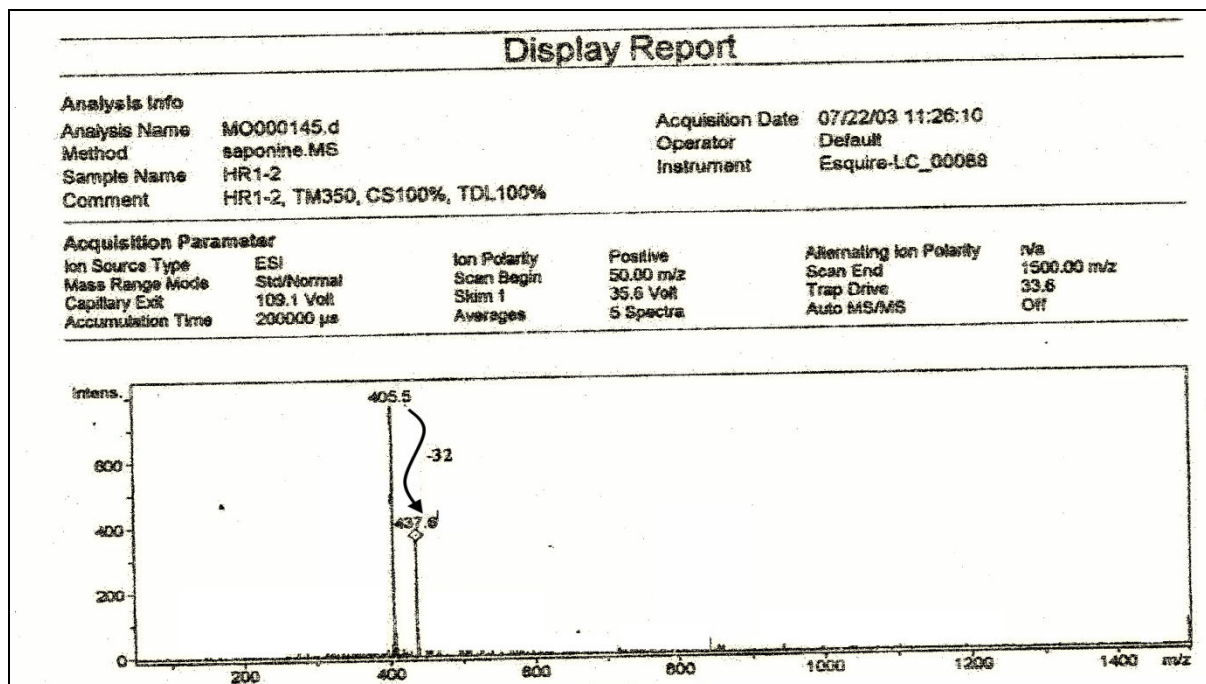


Figure III-62 : Spectre de masse MS/MS (mode positif) du composé CP₆

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III-63), présente 28 signaux correspondant à 29 carbones confirmant ainsi la nature stéroïdique de ce composé avec six méthyles caractéristiques des phytostérols à savoir : H₃-18 (0,74 ppm), H₃-19 (1,06 ppm), H₃-21 (0,93 ppm), H₃-26 (0,88 ppm), H₃-27 (0,87 ppm) et H₃-29 (0,89 ppm). L'expérience HSQC *J*-modulé permet de reconnaître leurs déplacements chimiques à δ_{C} 11,8 (C-18), 19,4 (C-19), 18,8 (C-21), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27) et 12,0 (C-29). Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C permet de visualiser les signaux de deux carbones éthyléniques déblindés à δ_{C} 140,7 (Cq) et 121,7 (CH) correspondant à une double liaison.

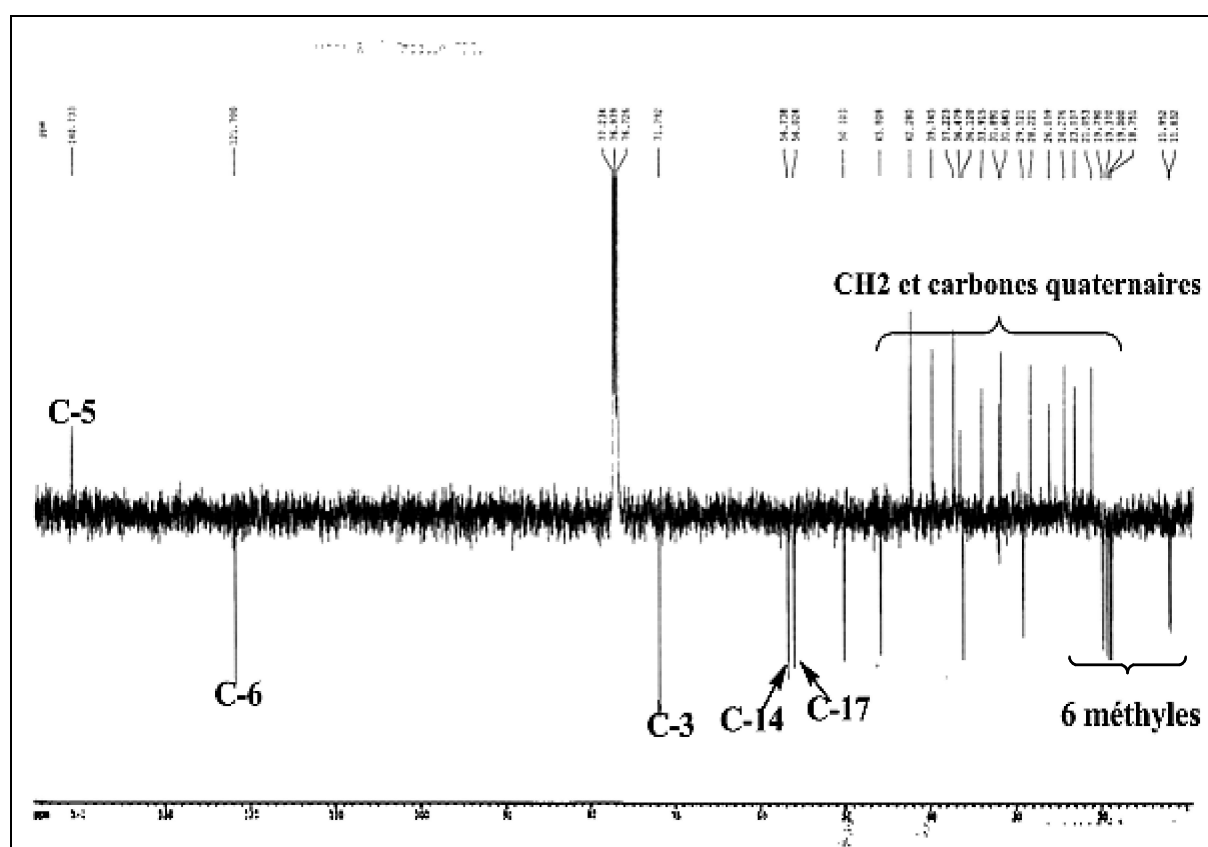


Figure III-63 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé CP₆

En tenant compte de la formule brute C₂₉H₅₀O, le nombre d'insaturation égale à 5 et la présence d'une seule double liaison, on peut suggérer un squelette stéroïdique tétracyclique.

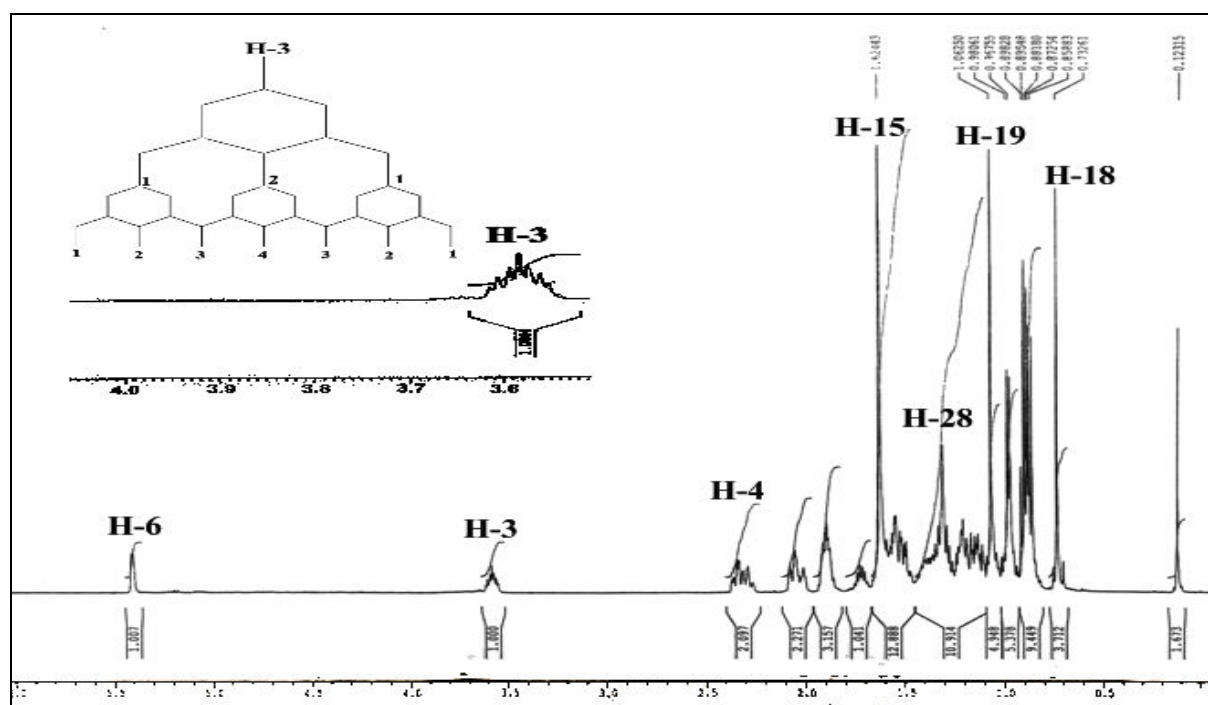


Figure III-64 : Spectre RMN ^1H du composé CP_6

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H (Figure III-64), COSY et HSQC (Figure III-65) du composé CP_6 montre la présence d'un signal sous forme d'un triplet de triplets dont les intensités des pics sont 1:2:3:4:3:2:1, à δ_{H} 3,58 correspondant au proton oxyméthine H-3 caractéristique des stérols. Ce dernier fait partie d'un système de spin à 7 protons selon le spectre COSY incluant les protons $\text{H}_2\text{-1}/\text{H}_2\text{-2}/\text{H-3}/\text{H}_2\text{-4}$, ce qui permet d'attribuer leurs déplacements chimiques 1,90 ppm (H-1a), 1,13 ppm (H-1b), 1,88 ppm (H-2a), 1,56 ppm (H-2b), 2,34 ppm (H-4a) et 2,30 ppm (H-4b). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à δ_{C} 37,2 (C-1), 31,6 (C-2), 71,8 (C-3) et 42,3 (C-4).

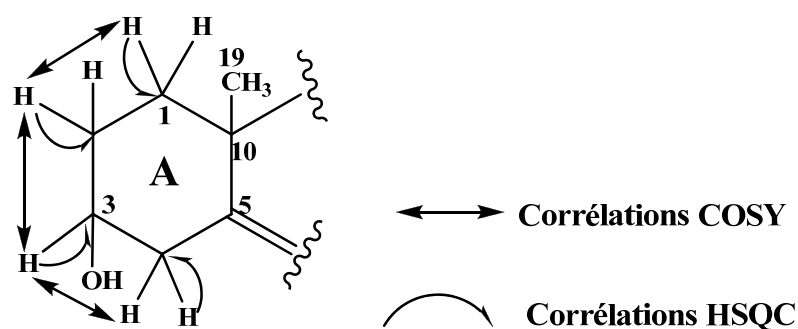


Figure III-65 : Corrélations COSY et HSQC du cycle A

Les grandes valeurs des constantes de couplages entre le proton H-3 et les protons H₂-2 et H₂-4 (*tt*, $J = 11,3$ Hz et $J=5,3$ Hz), traduisant des couplages *trans*-diaxial et *cis*-diéquatorial respectivement entre H-3 et les deux protons H₂-2 et H₂-4 permettant de placer le groupement hydroxyle OH-3 en position β équatoriale (Figure III-66).

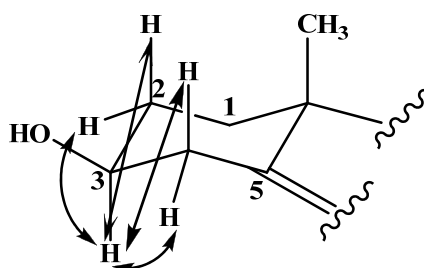


Figure III-66 : Couplages du proton H-3

Les protons H₂-1 et H₂-4 montrent en HMBC (Figure III-67) des corrélations en 2J et 3J avec deux carbones quaternaires résonant à δ_C 140,7 et 36,5 attribuables respectivement aux carbones C-5 (sp^2) et C-10 (sp^3), aussi ces deux protons corréleront en HMBC avec les carbones C-2 et C-3. Les protons H₂-1 couplent avec un carbone méthyle à δ_C 19,4 et δ_H 1,06 indiquant la présence du Me-19 au niveau du carbone C-10. Les protons du Me-19 corréleront en HMBC avec deux carbones C-10 et un carbone méthine à δ_C 50,1 qui ne peut être que le carbone C-9. L'expérience HSQC permet de repérer son proton à δ_H 0,98 (H-9).

A l'issue de cette analyse, les protons et les carbones du cycle A du stérol sont identifiés.

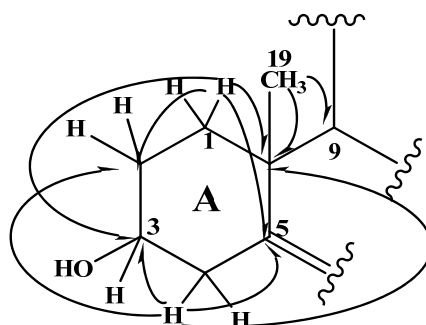


Figure III-67 : Corrélations HMBC du cycle A

Le spectre HMBC (Figure III-68) montre une tache de corrélation entre le proton H-4 et un carbone éthylénique CH résonant à 121,7 ppm ne pouvant être que le carbone C-6. Son proton H-6 est détecté à 5,40 ppm sous forme de doublet de doublets ($J = 5,2$; $2,3$ Hz) par expérience HSQC. Les deux protons H-6 et H-9 corréleront simultanément en HMBC avec deux carbones dont un carbone secondaire CH₂ (C-7) à δ_C 31,9 et l'autre un carbone tertiaire

CH (C-8) à δ_C 31,8. L'expérience HSQC permet d'attribuer leurs protons à 1,50 ppm (H₂-7) et 2,03 ppm (H-8).

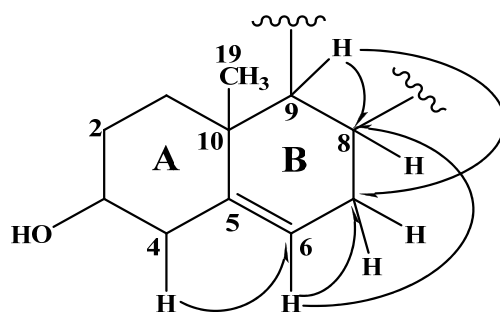


Figure III-68 : Corrélations HMBC du cycle B

Les protons H-6, H₂-7, H-8 et H-9 faisant partie d'un même système de spin selon la carte COSY, permettent de constituer l'enchaînement $=^6\text{CH}-^7\text{CH}_2-^8\text{CH}-^9\text{CH}-$ et de former le cycle B du stérol (Figure III-69).

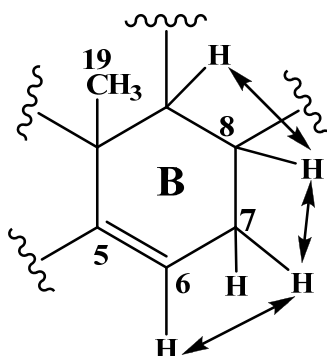


Figure III-69 : Corrélations COSY du cycle B

A partir du proton H-9 (Figure III-70), le spectre COSY montre les couplages H-9/H₂-11 résonant à 1,55 ppm (H-11a) et 1,50 ppm (H-11b) et H₂-11/H₂-12 à 2,06 ppm (H-12a) et 1,21 ppm (H-12b). Leurs carbones sont détectés à 21,1 ppm (C-11) et 39,7 ppm (C-12) par HSQC. Les protons H₂-7, H-9 et H₂-12 couplent en 3J sur le spectre HMBC avec un carbone méthine à 56,7 ppm attribuable au carbone C-14, son proton est localisé par l'expérience HSQC à 1,04 ppm (H-14). Les protons H-14 et H₂-12 corrélient en HMBC avec un carbone quaternaire résonant à 42,3 ppm et un groupement méthyle à 11,8 ppm qui ne peuvent être que les carbones C-13 et C-18 respectivement. Ce qui permet la fermeture du cycle C.

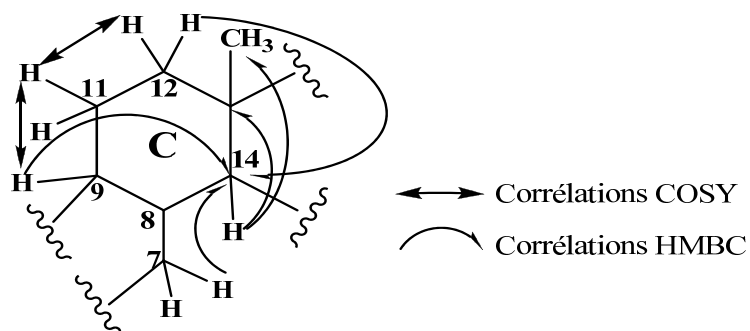


Figure III-70 : Corrélations COSY et HMBC du cycle C

A partir du proton H-14 on observe sur le spectre COSY (Figure III-71) les couplages entre les protons H-14 (1,04 ppm)/H₂-15 (1,63 H-15a; 1,11 H-15b) ppm /H₂-16(1,89 H-16a ; 1,30 H-16b) ppm /H-17 (1,16 ppm). Par ailleurs le spectre HSQC indique leurs carbones à δ_C 24,3 (C-15) 28,2 (C-16) et 56,0 (C-17).

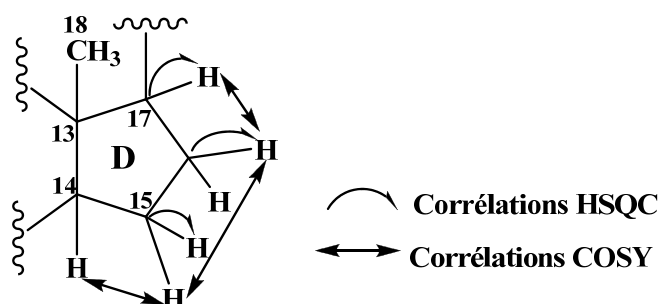


Figure III-71 : Corrélations COSY et HSQC du cycle D

L'expérience HMBC (Figure III-72) montrant des corrélations entre le proton H-17 et les carbones C-12, C-13, C-18, les protons H₂-16 et les carbones C-13 et C-17 conduit à la fermeture du cycle E.

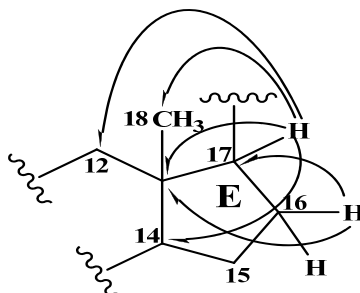


Figure III-72 : Corrélations HMBC du cycle E

A partir du proton H-17 déjà identifié, il est visualisé un système de spin étendu (Figure III-73) montrant les couplages entre les protons: H-17/H-20/H₃-21 et H₂-22/H₂-23/H-24/(H₂-28/H₃-29) et (H-25/H₃-26 et H₃-27). Ce qui permet d'attribuer leurs déplacements chimiques à δ_H 1,40 (H-20), 0,93 (H₃-21), 1,36, 1,07 (H₂-22), 1,21 (H₂-23), 0,97 (H-24), 1,71 (H-25), 0,88 (H₃-26), 0,87 (H₃-27), 1,31 (H₂-28), 0,89 (H₃-29). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à δ_C 36,1 (C-20), 18,8 (C-21), 33,9 (C-22), 26,0 (C-23), 45,8 (C-24), 29,1 (C-25), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27), 23,0 (C-28) et 12,0 (C-29). Ce qui permet de constituer la chaîne latérale en C₁₀H₂₁ observée en générale dans les phytostérols [67].

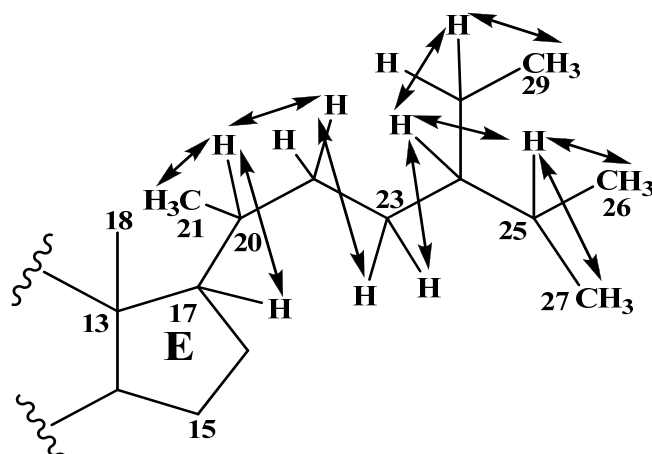


Figure III-73 : Corrélations COSY de la chaîne latérale du composé CP₆

Le spectre HMBC (Figure III-74) présente des corrélations à longue distance C-H en 2J , 3J et 4J relatives à la chaîne latérale entre :

- les protons du groupement Me-21 et les carbones C-17, C-20 et C-22.
- les protons H₂-23 et les carbones C-20, C-22 et C-24.
- le proton H-25 et les carbones C-23, C-24, C-26, C-27 et C-28.
- les protons H₂-28 et les carbones C-24, C-25 et C-29.

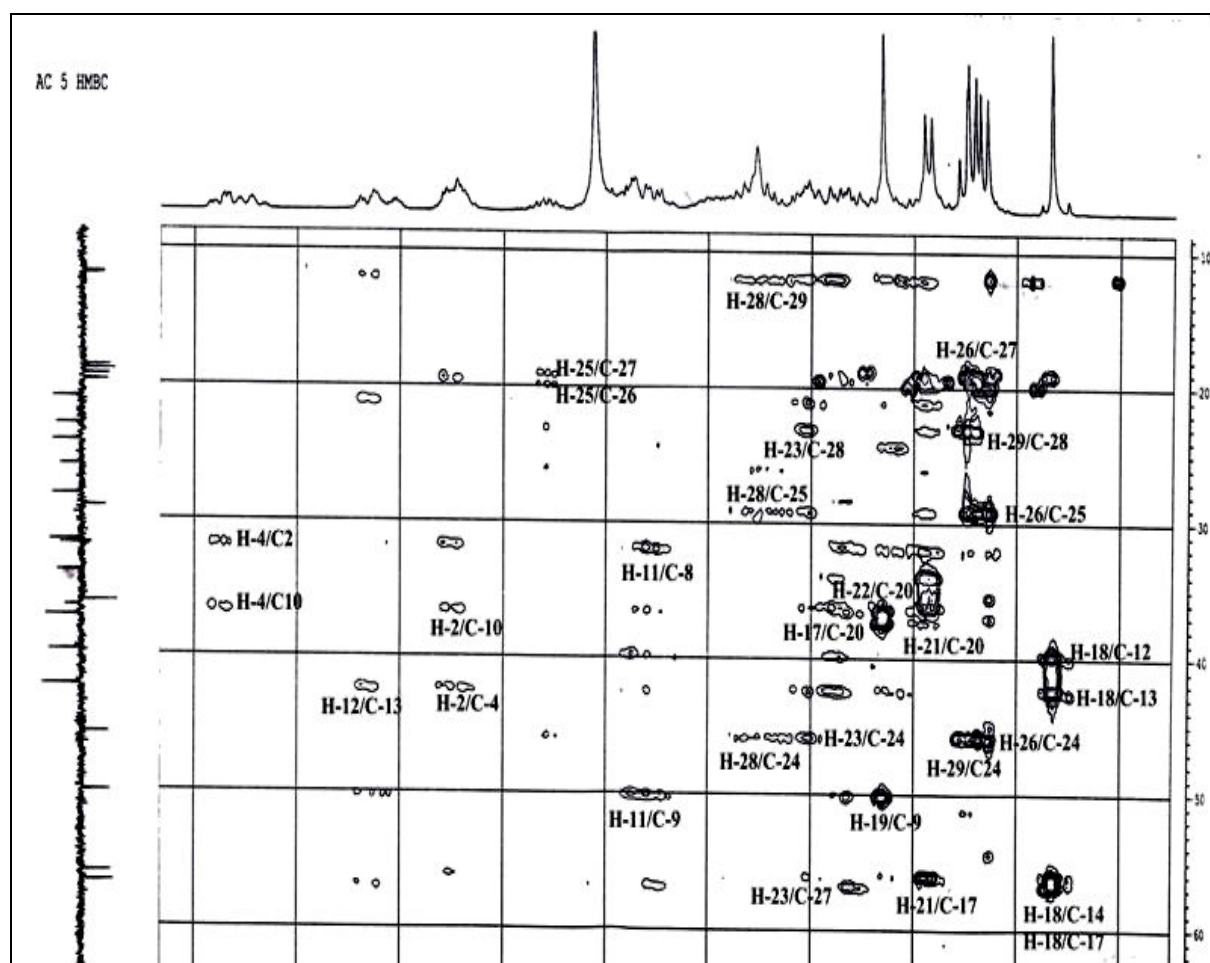


Figure III-74 : Spectre HMBC du composé CP₆

L'ensemble de ces données et la valeur du pouvoir rotatoire de ce composé mesurée dans le chloroforme $[\alpha]_D = -30^\circ$ ($C = 0,80$ g/100 ml), permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé la structure suivante: 24-éthylcholest-5-èn-3-ol ou β -sitostérol (**CP₆**). Ce métabolite secondaire commun à toutes les plantes, a été isolé de plusieurs espèces du genre *Centaurea* : *C. africana* ^[13], *C. nicolai* ^[79] et *C. scabiosa* ^[56]. Ces données sont conformes à celles de la littérature ^[80].

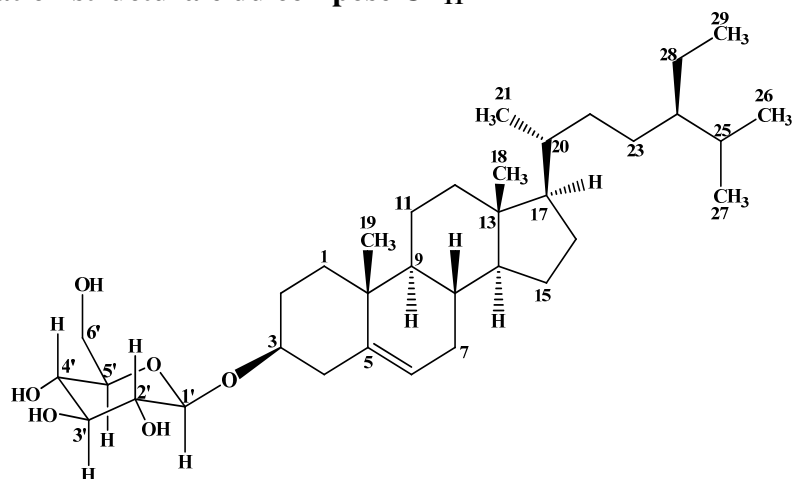
Le β -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés anti-inflammatoire, anti-pyrétique, anti-néoplasique et immuno-modulatrices ^[81].

Le β -sitostérol, seul ou en association avec d'autres phytostérols, diminue les niveaux sanguins du cholestérol. Enfin, plusieurs études montrent l'intérêt du β -sitostérol dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate ^[81].

Tableau 13: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **CP₆** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,90 H-1a <i>m</i> ; 1,13 H-1b <i>m</i>	37,2
2	1,88 H-2a <i>m</i> ; 1,56 H-2b <i>m</i>	31,6
3	3,58 <i>tt</i> 11,3 ; 5,3	71,8
4	2,34 H-4a <i>ddd</i> (13,0; 5,0; 2,0) , 2,30 H-4b <i>td</i> 11,0; 2,0	42,3
5	-	140,7
6	5,40 <i>dd</i> 5,2 ; 2,3	121,7
7	1,50 <i>m</i>	31,9
8	2,03 <i>td</i> 12,1; 2,4	31,8
9	0,98 <i>m</i>	50,1
10	-	36,5
11	1,55 H-11a <i>m</i> ; 1,50 H-11b <i>qd</i> 10,8; 4,6	21,1
12	2,06 H-12a <i>dt</i> 12,8; 3,6 ; 1,21 H-12b <i>m</i>	39,7
13	-	42,3
14	1,04 <i>m</i>	56,7
15	1,63 H-15a <i>m</i> ; 1,11 H-15b <i>tm</i> 11,2	24,3
16	1,89 H-16a <i>m</i> ; 1,30 H-16b <i>m</i>	28,2
17	1,16 <i>t</i> 10,0	56,0
18	0,74 <i>s</i>	11,8
19	1,06 <i>s</i>	19,4
20	1,4 <i>m</i>	36,1
21	0,93 <i>d</i> 6,5	18,8
22	1,36 H-22a <i>m</i> ; 1,07 H-22b <i>m</i>	33,9
23	1,21 <i>m</i>	26,0
24	0,97 <i>m</i>	45,8
25	1,71 <i>m</i>	29,1
26	0,88 <i>d</i> 6,9	19,8
27	0,87 <i>d</i> 6,9	19,0
28	1,31 <i>m</i>	23,0
29	0,89 <i>t</i> 7,4	12,0

III-4-7- Elucidation structurale du composé CP₁₁



β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside

Il s'agit d'une saponine stéroïdique, β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside (CP₁₁) connu sous le nom Daucostérol, isolée antérieurement des espèces suivantes: *C. bracteata* [82], *C. africana* [13]. Ce composé possède des activités biologiques : anti-inflammatoire, anti-pyrétique, anti-néoplasique, [83] et anti-mutagénique [84].

Les spectres de masse du composé CP₁₁ obtenus en ionisation par ESI (Electrospray), enregistrés en mode négatif (Figure III-75) et mode positif (Figure III-76) montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 575$ [M-H]⁻, 1151 [2M-H]⁻, 599 [M+Na]⁺ et 1175 [2M+Na]⁺ respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 576 uma et une formule brute en C₃₅H₆₀O₆.

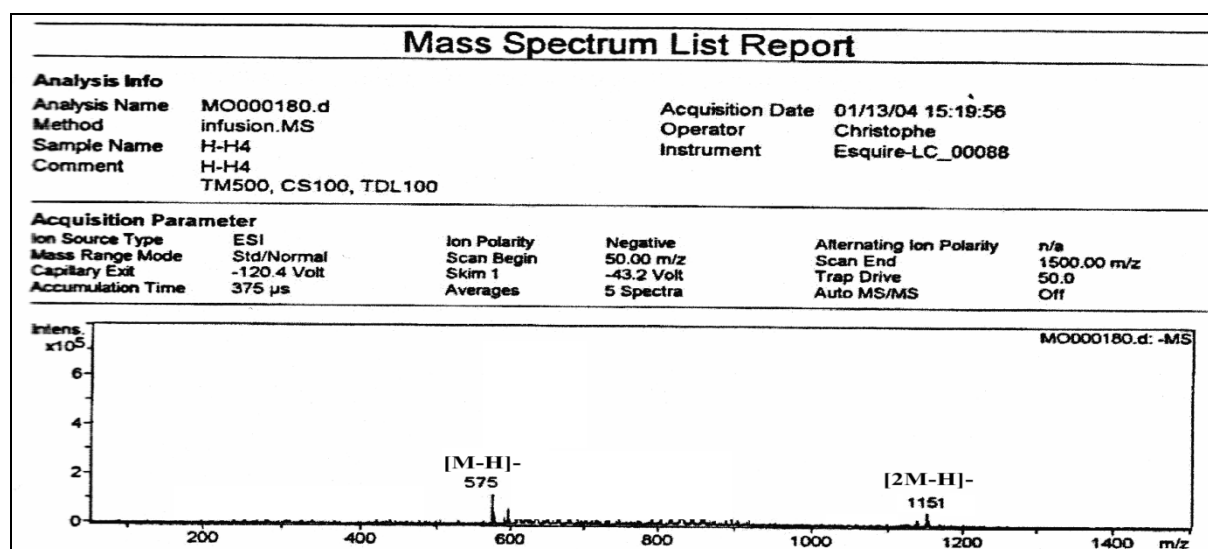


Figure III-75 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP₁₁

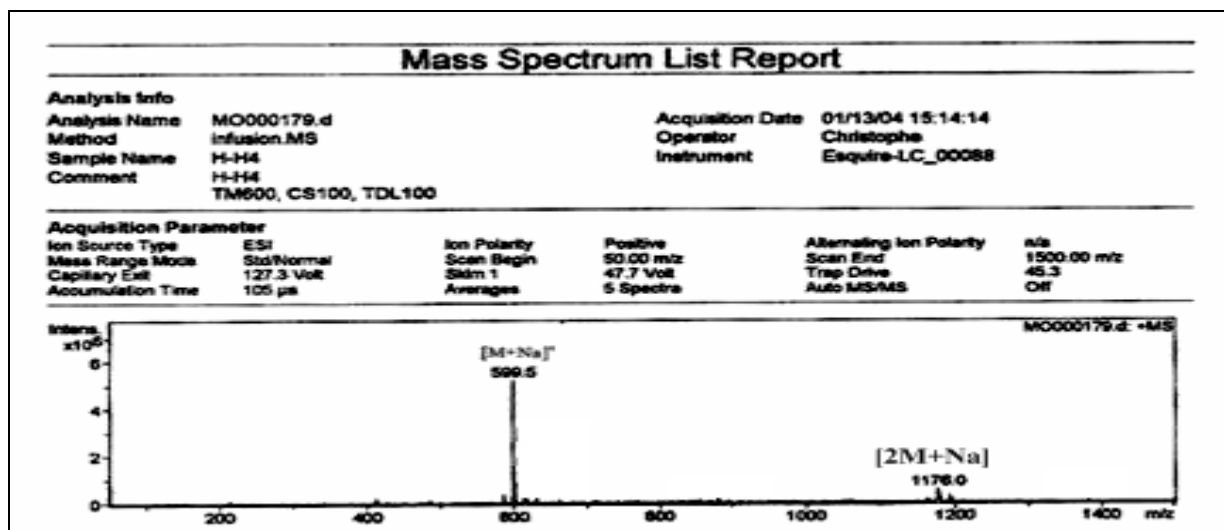


Figure III-76: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP₁₁

Hormis les signaux de protons et carbones (Tableau 13) de la génine stéroïdique (sitostérol) identifiables par comparaison avec le composé précédent CP₆ et les données de la littérature [78], le spectre RMN ¹H (Figure III-77) montre un proton anomérique déblindé résonant à 4,41 ppm sous forme d'un doublet à grande constante de couplage $J_{H1'-H2'} = 7,9$ Hz.

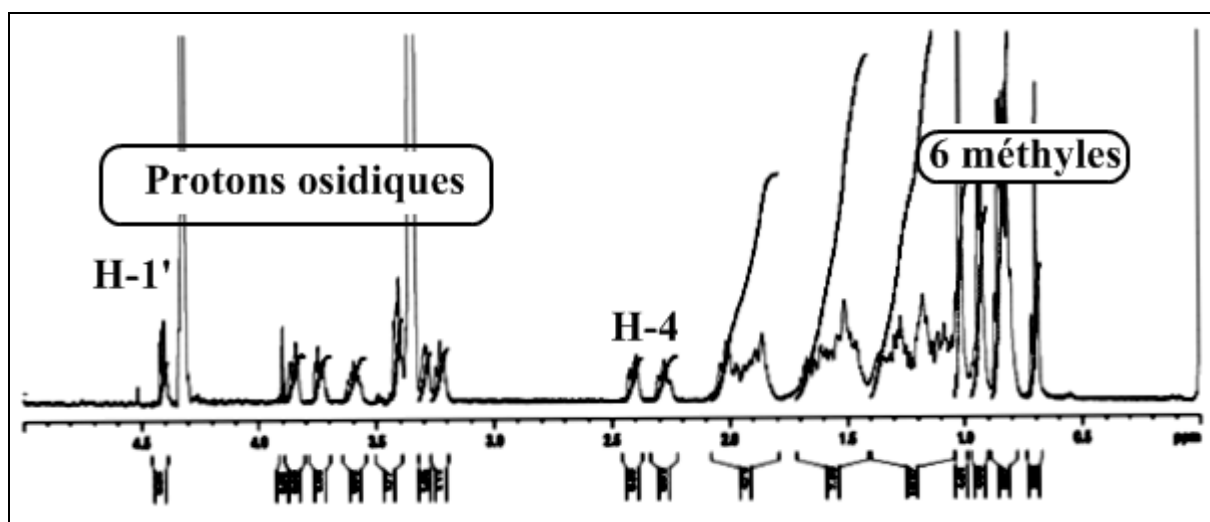


Figure III-77: Spectre RMN ¹H du composé CP₁₁

Le spectre COSY H-H (Figure III-78) permet d'identifier un système de spin à sept protons d'un hexose. En effet et partant du proton anomérique H-1', on relie à travers leurs taches de corrélation les protons H-2' (3,23 ppm), H-3' (3,42 ppm), H-4' (3,42 ppm), H-5' (3,29 ppm) et H-6' (3,84, H-6'a et 3,75 H-6'b). Les grandes valeurs de constantes de couplage

($J_{H1'-H2'} = 7,9$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 7,9$ Hz, $J_{H3'-H4'} = 7,9$ Hz) indiquent que tous les protons sont axiaux. Il s'agit donc d'un glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{H1'-H2'} = 7,9$ Hz.

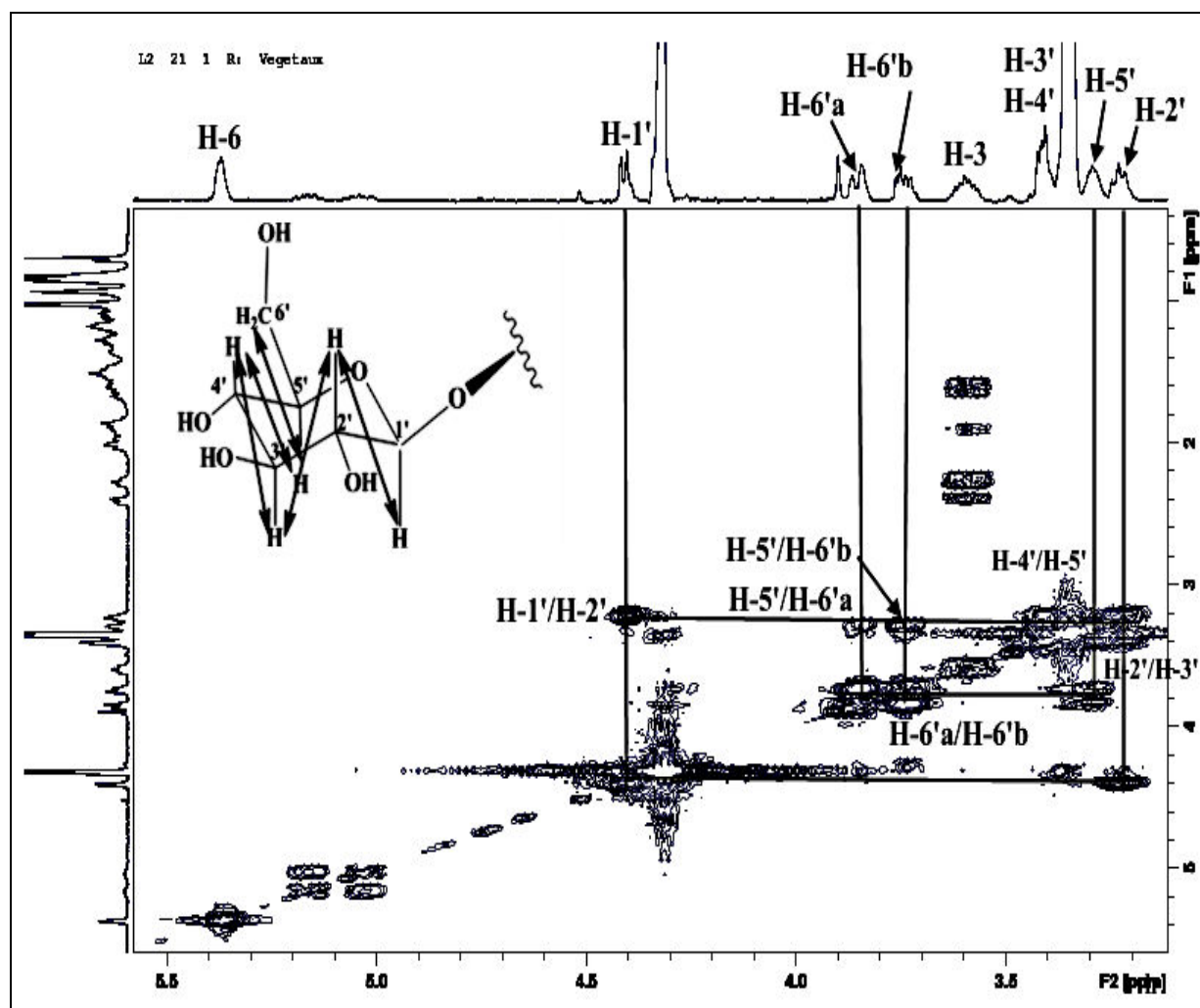


Figure III-78: Spectre COSY (partie glucose)

L'expérience HSQC J -modulé permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose à δ_C 101,5 (C-1'), 74,0 (C-2'), 76,9 (C-3'), 70,7 (C-4'), 76,3 (C-5') et 62,2 (C-6').

La corrélation $^3J_{H-C}$ observée sur le spectre HMBC (Figures III-79 et 80) entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine, montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position C-3.

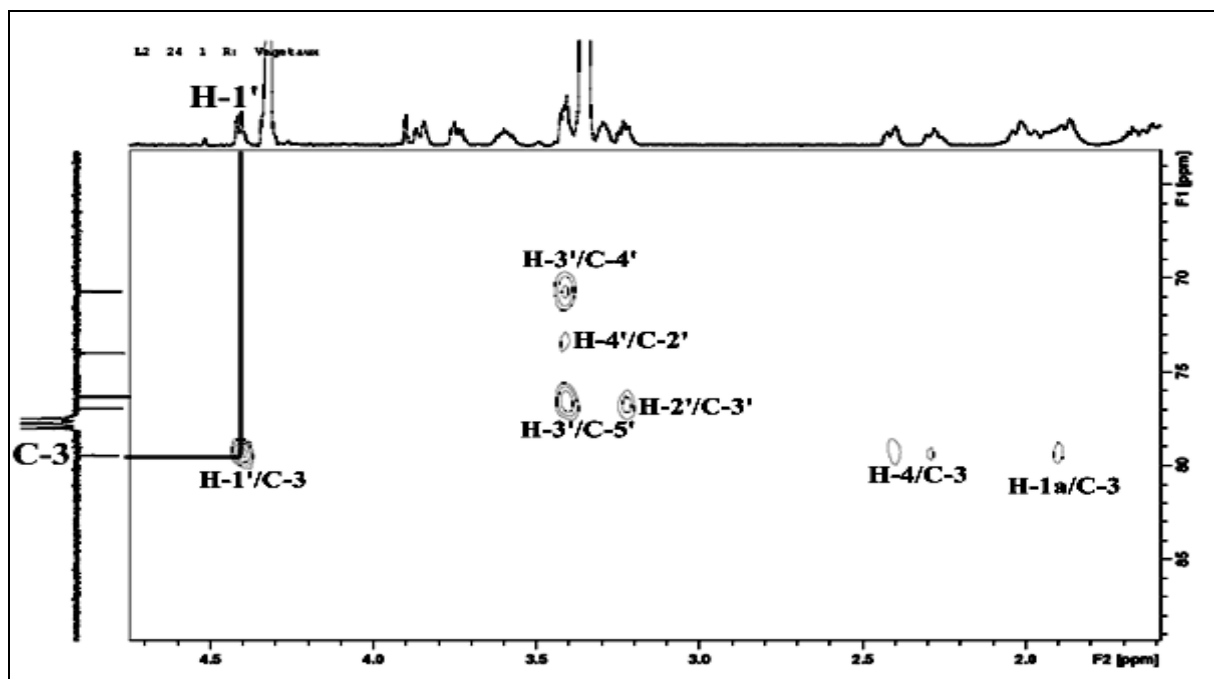


Figure III-79 : Spectre HMBC du composé CP₁₁

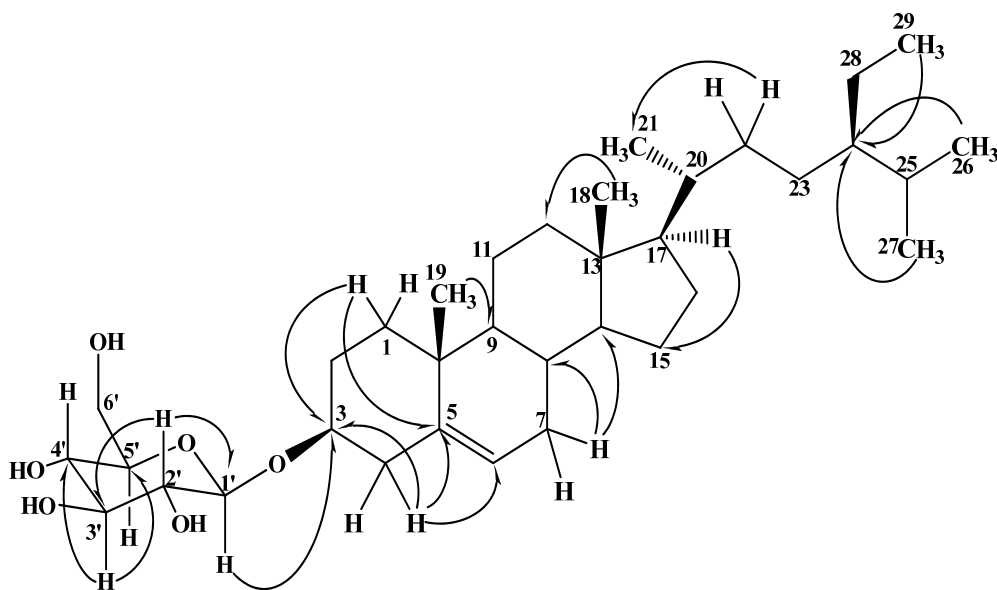


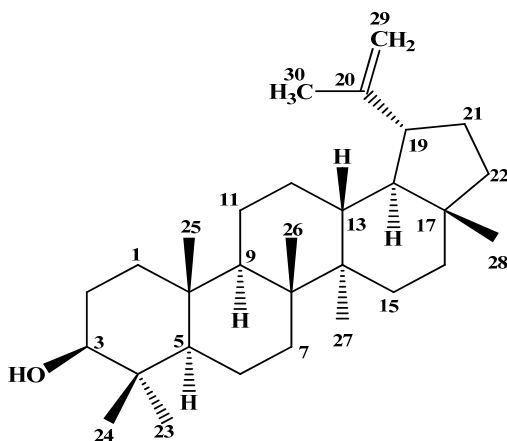
Figure III-80: Principales corrélations HMBC observées pour le composé CP₁₁

L'ensemble de ces données et la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -41,5^\circ$ ($c = 0,4$, MeOH), permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé la structure suivante : β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside (CP₁₁) nommé également Daucostérol.

Tableau 14: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **CP₁₁** dans $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$.

Position	$\delta\text{H } m J \text{ Hz}$	δC
1	1,88 (H-1a) <i>m</i> ; 1,08 (H-1b) <i>m</i>	37,6
2	1,91 (H-2a) <i>m</i> ; 1,62 (H-2b) <i>m</i>	29,9
3	3,59 <i>m</i>	79,5
4	2,42 (H-4a) <i>dm</i> 10 ; 2,28 (H-4b) <i>tl</i> 10	39,0
5	-	140,7
6	5,37 <i>d</i> 5,0	122,4
7	1,47 <i>m</i>	32,3
8	1,97 <i>m</i>	32,3
9	0,96 <i>m</i>	50,6
10	-	37,1
11	1,45 (H-11a) <i>m</i> ; 1,02 (H-11b) <i>m</i>	21,2
12	2,01 (H-12a) <i>m</i> ; 1,17 (H-11b) <i>m</i>	40,8
13	-	42,7
14	1,03 <i>m</i>	57,2
15	1,59 (H-15a) <i>m</i> ; 1,11 (H-15b) <i>m</i>	24,6
16	1,84 (H-16a) <i>m</i> ; 1,29 (H-16b) <i>m</i>	28,6
17	1,14 <i>m</i>	56,4
18	0,70 <i>s</i>	12,1
19	1,03 <i>s</i>	19,5
20	1,37 <i>m</i>	36,5
21	0,95 <i>d</i> 5,1	18,9
22	1,34 (H-22a) <i>m</i> ; 1,04 (H-22b) <i>m</i>	34,3
23	1,19 <i>m</i>	26,4
24	0,93 <i>m</i>	46,2
25	1,68 <i>m</i>	29,5
26	0,94 <i>d</i> 5,3	19,9
27	0,83 <i>d</i> 6,9	19,2
28	1,26 <i>m</i>	23,4
29	0,85 <i>t</i> 7,4	12,3
Glucose		
1'	4,41 <i>d</i> 7,9	101,5
2'	3,23 <i>t</i> 7,9	74,0
3'	3,42 <i>t</i> 7,9	76,9
4'	3,42 <i>m</i>	70,7
5'	3,29 <i>m</i>	76,3
6'	3,84 H-6'a <i>dl</i> 10,0	62,2
	3,75 H-6'b <i>dd</i> 10,0; 5,0	

III-4-8- Elucidation structurale du composé CP₁



Lup-20(29)-èn-3-ol

Le composé **CP₁** est le lup-20(29)-èn-3-ol, un triterpène pentacyclique appartenant à la série lupane, nommé lupéol, se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Ce composé prend une coloration marron après révélation en CCM par l'acide sulfurique et chauffage. Il a été isolé pour la première fois en 1889 de l'espèce *Lupinus luteus*.

Le spectre de masse obtenu par électrospray ESI-MS (Figure III-81) permet d'observer en mode positif deux pics d'ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$ à m/z = 449,4 et 875,3 respectivement, soit une masse moléculaire égale à 426 uma correspondant à une formule brute en C₃₀H₅₀O.

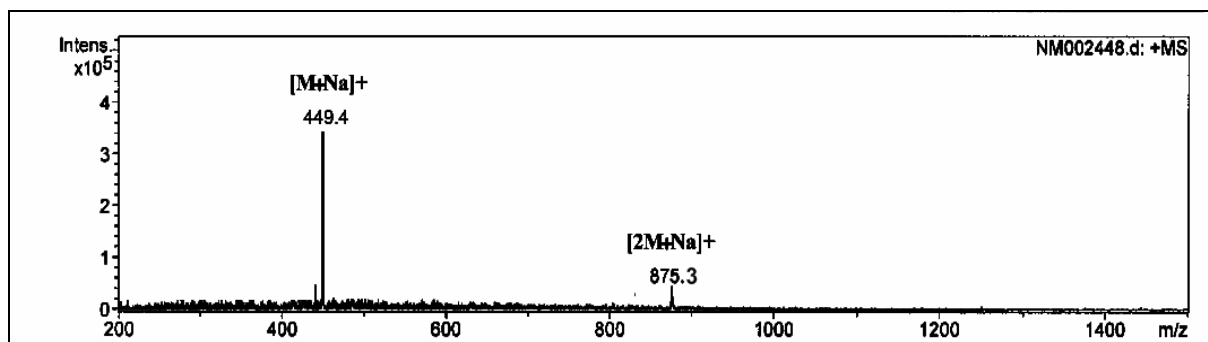


Figure III-81 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé CP₁

La majorité des signaux du spectre RMN ¹H du composé **CP₁** (figure III-82) est observée dans la région des hauts champs attestant de la présence de protons aliphatiques. Parmi ceux-ci, le spectre présente un profil typique de triterpène avec la présence de sept groupements méthyles : six formant des singulets fins chacun résonant à δ_H 0,97 (H₃-23), 0,77 (H₃-24), 0,84 (H₃-25), 1,04 (H₃-26), 0,96 (H₃-27), 0,80 (H₃-28) et un formant un singulet

large à δ_H 1,70 attribuable aux protons H₃-30. Le déblindage de ces derniers indique que le groupement méthyle Me-30 est lié à un carbone insaturé. En plus, le spectre RMN 1H révèle dans la région des champs faibles la présence d'un signal correspondant à un groupement hydroxyméthine à δ_H 3,18 et des signaux de deux protons oléfiniques à δ_H 4,56 et 4,68 ppm.

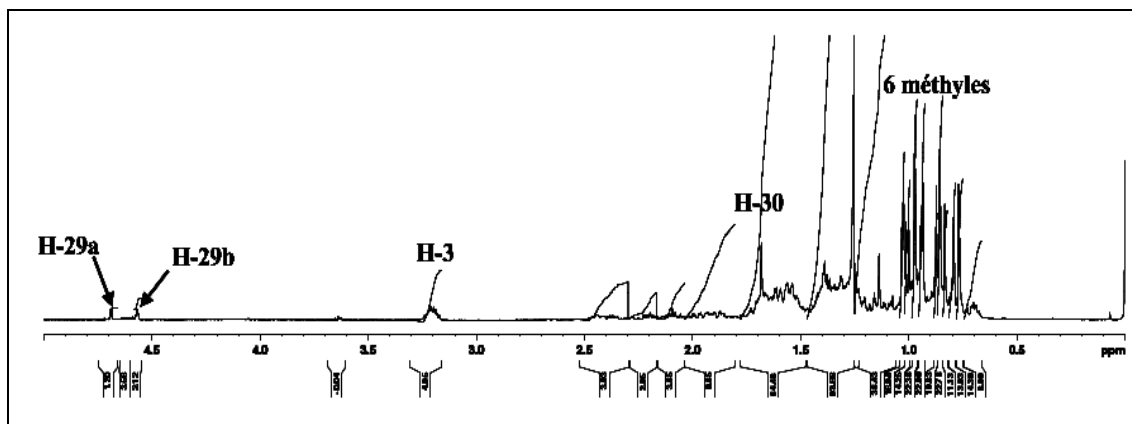


Figure III-82 : Spectre RMN 1H du composé CP₁

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé CP₁ (Figure III-83) montre 30 signaux confirmant la présence d'un squelette triterpénique, avec sept méthyles dont l'expérience HSQC *J*-modulé permet de définir leurs déplacements chimiques à δ_C 28,4 (C-23), 15,6 (C-24), 16,2 (C-25), 16,1 (C-26), 14,8 (C-27), 18,1 (C-28) et 109,5 (C-30). Par ailleurs, il permet d'observer les signaux d'un carbone quaternaire oléfinique à δ_C 151,2 et d'un carbone secondaire oléfinique à δ_C 109,5 (CH₂).

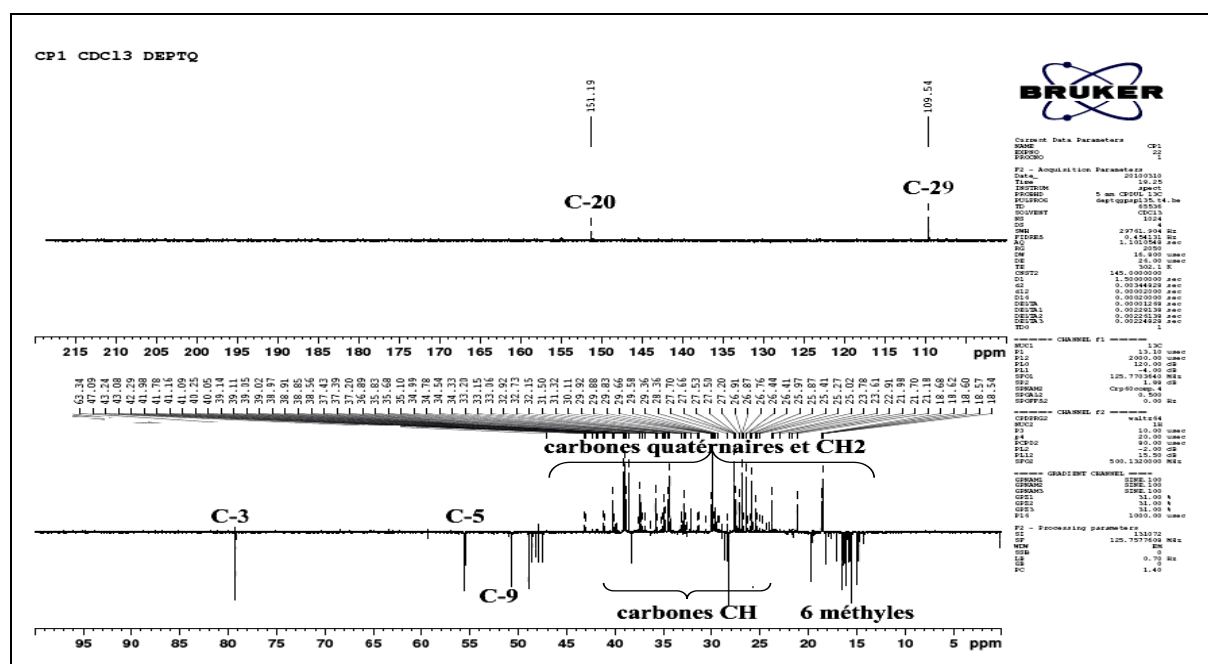


Figure III-83: Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé CP₁

Les déplacements chimiques du groupement méthine CH à (δ_C 79,3/ δ_H 3,18) déduits du spectre HSQC *J*-modulé confirment la présence d'un groupement hydroxyle en C-3. Les signaux d'un autre groupement méthine CH à (δ_C 55,5/ δ_H 0,69) déterminés également à partir de la carte HSQC *J*-modulé (Figure III-84) sont caractéristiques d'un méthine en C-5 d'une *trans*-décالية A/B^[85] observé dans de nombreux composés triterpéniques.

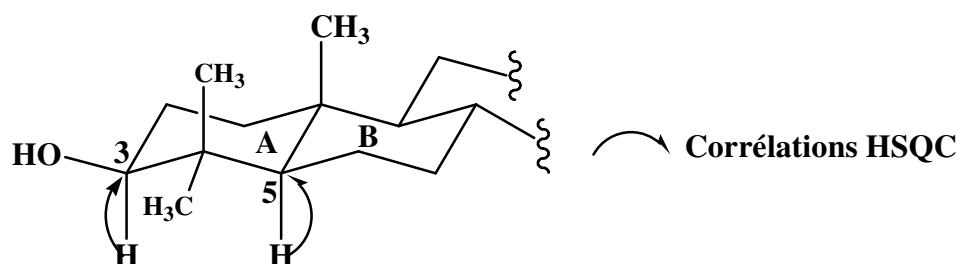


Figure III-84 : *Trans*-décالية A/B

L'identification de la structure du composé **CP₁** repose principalement sur l'examen conjoint des spectres HMBC, COSY H-H et HSQC *J*-modulé. Cette analyse peut débiter à partir du proton H-3 (Figure III-84) résonant à δ_H 3,18 sous forme d'un doublet de doublets ($J = 11,0; 5,3$ Hz) qui corrèle avec les protons H₂-2 à δ_H 1,61 selon l'expérience COSY H-H. Ces deux derniers couplent avec deux protons géminés H-1a et H-1b détectés à 1,64 et 0,94 ppm respectivement. L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'identifier leurs carbonés à δ_C 38,7 (C-1), 27,5 (C-2) et 79,3 (C-3) (Figure III-85).

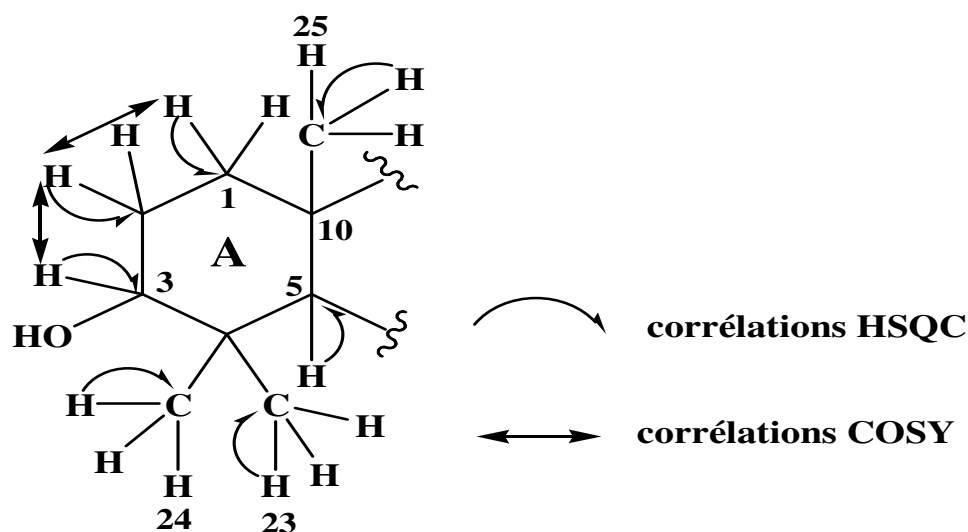


Figure III-85 : Corrélations HSQC et COSY du cycle A

La configuration β -orientée du groupement hydroxyle lie au carbone C-3 est confirmée par le déplacement chimique du C-3 à δ_C 79,3 ppm, alors qu'elle serait proche de 76 ppm dans le cas d'une orientation α ^[85] (Figure III-86).

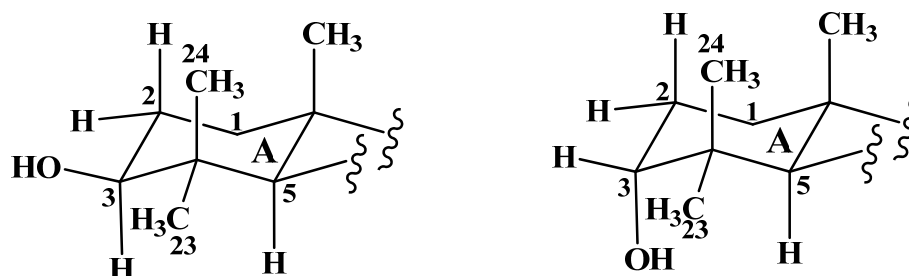


Figure III-86: Configurations β et α du groupement hydroxyle

Le carbone C-3 corrèle en HMBC avec les protons de deux groupements méthyles à 0,97 ppm (*s*, 3H) et 0,77 ppm (*s*, 3H) couplant à leur tour en HSQC avec deux carbones méthyliques Me-23 et Me-24 à 28,4 et 15,6 ppm respectivement. La différence de déplacement chimique de 12,8 ppm permet d'attribuer le Me-23 d'orientation équatoriale à δ_C 28,4/ δ_H 0,97 et le Me-24 axial à δ_C 15,6/ δ_H 0,77. Par ailleurs les protons des groupements méthyles H₃-23 et H₃-24 corréleront en 3J dans le spectre HMBC avec le carbone méthine C-5 à 55,5 ppm identifié précédemment et en 2J avec un carbone quaternaire ne pouvant être que le C-4 à 39,8 ppm. Le carbone C-5 présente sur le spectre HMBC une tache de corrélation avec les protons d'un groupement méthyle à δ_H 0,84 (*s*, 3H) correspondant au groupement méthyle H₃-25. Le déplacement chimique du carbone C-25 est repéré à 16,2 ppm selon l'expérience HSQC. Les protons H₃-25, H-1b et H-5 couplent avec un carbone quaternaire résonant à 37,2 ppm correspondant au carbone C-10 (Figure III-85 et 87).

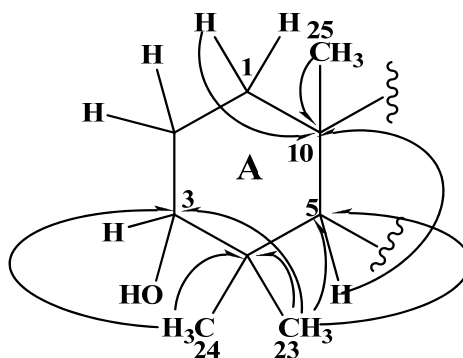


Figure III-87: Corrélations HMBC au niveau du cycle A

A l'issue de cette analyse, les protons et carbones du cycle A du triterpène sont entièrement identifiés.

Le carbone méthine détecté à 50,9 ppm corrèle dans le spectre HMBC (Figure III-88) en 3J avec deux groupements méthyles à δ_H 0,84 (Me-25) et à δ_H 1,04 (s, 3H, Me-26). Ce carbone ne pouvant être que le C-9. Les protons H₃-26 couplent en HSQC avec leur carbone résonant à 16,1 ppm. Le spectre COSY montrent un système de spin à 5 protons formant l'enchaînement $^5CH-^6CH_2-^7CH_2-$ et permet d'assigner les protons couplés H-6a (1,52 ppm), H-6b (1,39 ppm), et H₂-7 (1,38 ppm) qui corréleront en HSQC avec les carbones résonant à 19,0 ppm (C-6) et 34,2 ppm (C-7). Le proton H-6a couple en HMBC avec un carbone quaternaire résonant à 41,1 attribuable au carbone C-8, ce qui permet alors de fermer le deuxième cycle B du triterpène (Figure III-88).

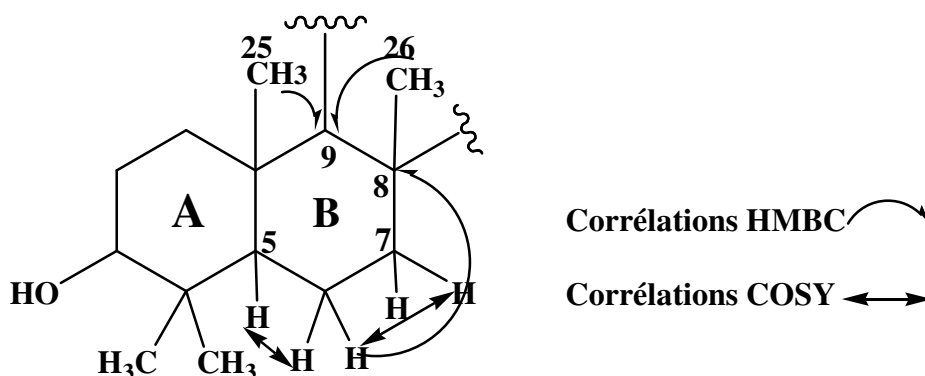


Figure III-88: Corrélations HMBC et COSY observées au niveau du cycle B

Les protons du méthyle Me-26 (Figure III-89) corréleront en HMBC avec C-7, C-8 et C-9 déjà assignés et avec un carbone quaternaire repéré à 42,8 ppm correspondant au carbone C-14. Les carbones C-8 et C-14 présentent des taches de corrélation dans le spectre HMBC avec un groupement méthyle sous forme d'un singulet détecté à 0,96 ppm attribuable aux protons H₃-27. Ces derniers couplent en 3J avec deux carbones résonant à 38,5 ppm (CH) et 27,2 ppm (CH₂) correspondant aux carbones C-13 et C-15 respectivement. Leurs protons sont détectés à 1,62 ppm (H-13), 0,96 ppm (H-15b) et 1,61 ppm (H-15a) selon l'expérience HSQC. A partir du proton H-13, il est observé sur le spectre COSY les couplages scalaires entre les protons: H-13/H₂-12 (1,10; 1,70 ppm)/H₂-11 (1,29; 1,43 ppm)/ H-9. Les protons H₂-12 et H₂-11 couplent en HSQC avec les carbones

C-12 (25,3 ppm) et C-11 (21,2 ppm). En conséquence les déplacements chimiques de tous les protons et carbones du cycle C sont déterminés.

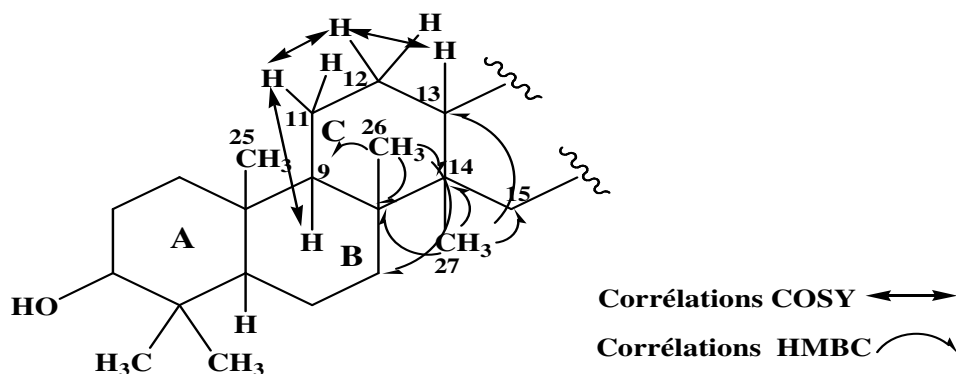


Figure III-89: Corrélations HMBC et COSY du cycle C

En plus, l'analyse structurale des spectres HSQC et COSY du composé **CP₁** indique la présence de deux protons déblindés sous forme de singulet large chacun à δ_H 4,68 et 4,56 attribuables respectivement aux protons géminés H-29a et H-29b, qui couplent sur le spectre HSQC (Figure III-90) avec le même carbone résonant à δ_C 109,5 (C-29) et corrélient aussi dans l'expérience COSY (Figure III-91) en 4J avec les protons H₃-30 (couplage allylique). Ces constatations suggèrent alors la présence d'un groupement isoprényle.

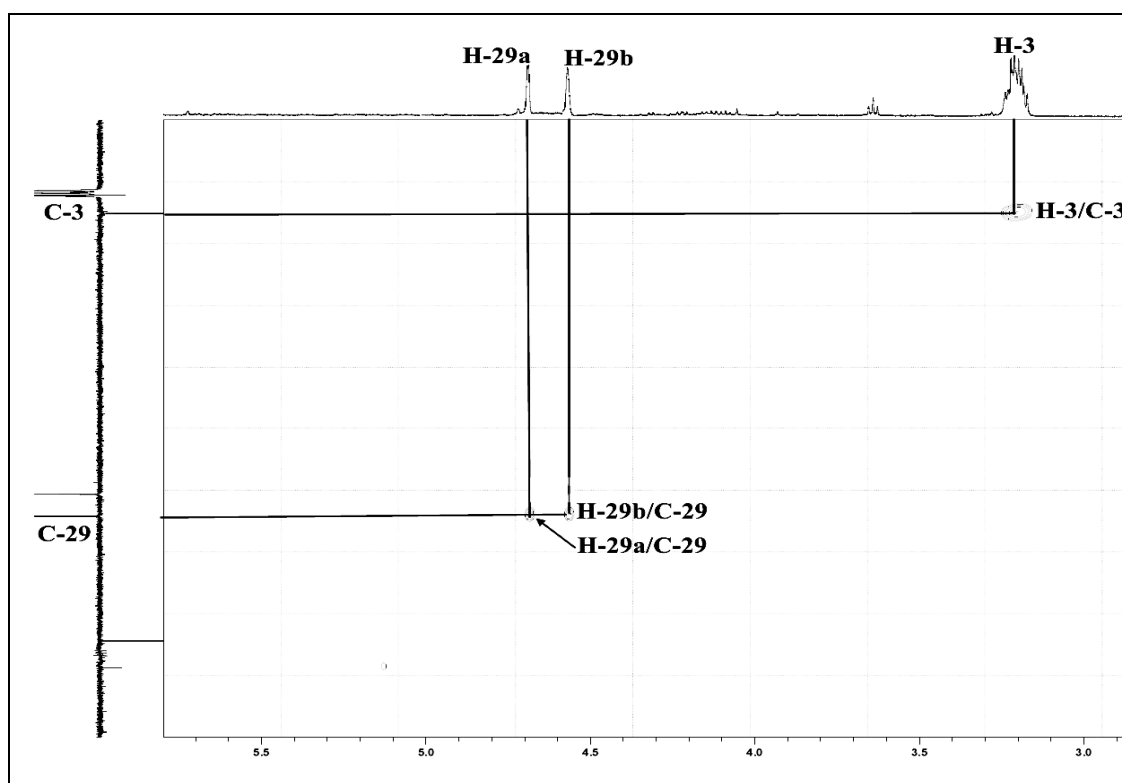


Figure III-90: Partie du spectre HSQC du composé **CP₁**

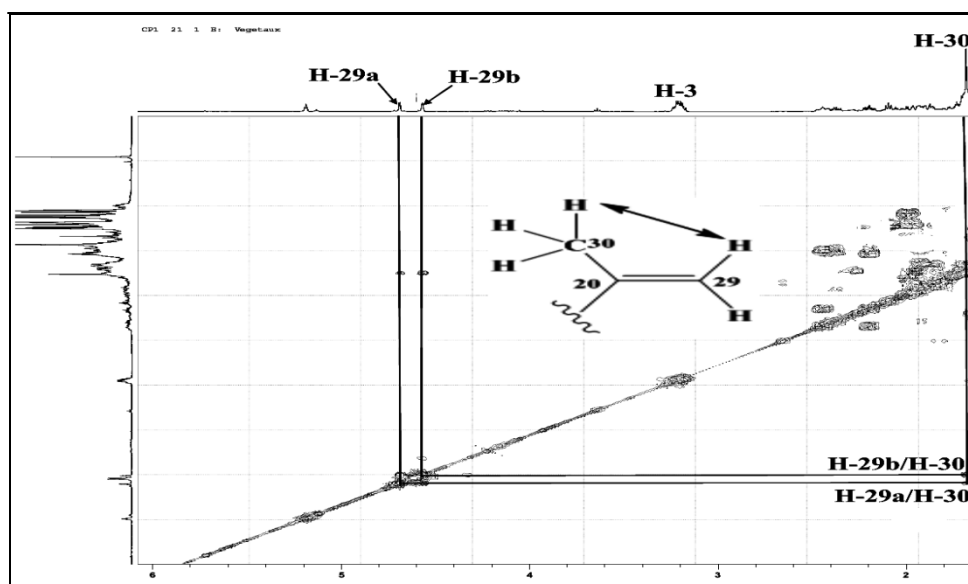


Figure III-91: Partie du spectre COSY du composé CP₁

Les protons H₂-15 assignés précédemment couplent en COSY avec deux protons géminés H₂-16 résonant à 1,48 ppm dont le carbone est repéré à 35,9 ppm (C-16). Ce dernier corrèle en HMBC avec les protons du groupement méthyle H₃-28 à δ_H 0,80/ δ_C 18,1 qui couplent à leur tour avec trois carbones se répartissant en un carbone méthylène C-22 (40,3 ppm) et H₂-22 (1,19 ppm), un carbone quaternaire C-17 (43,2 ppm) et un carbone méthine C-18 (48,5 ppm) et H-18 (1,39 ppm) (Figure III-92). Cette analyse nous permet de former le cycle D du triterpène.

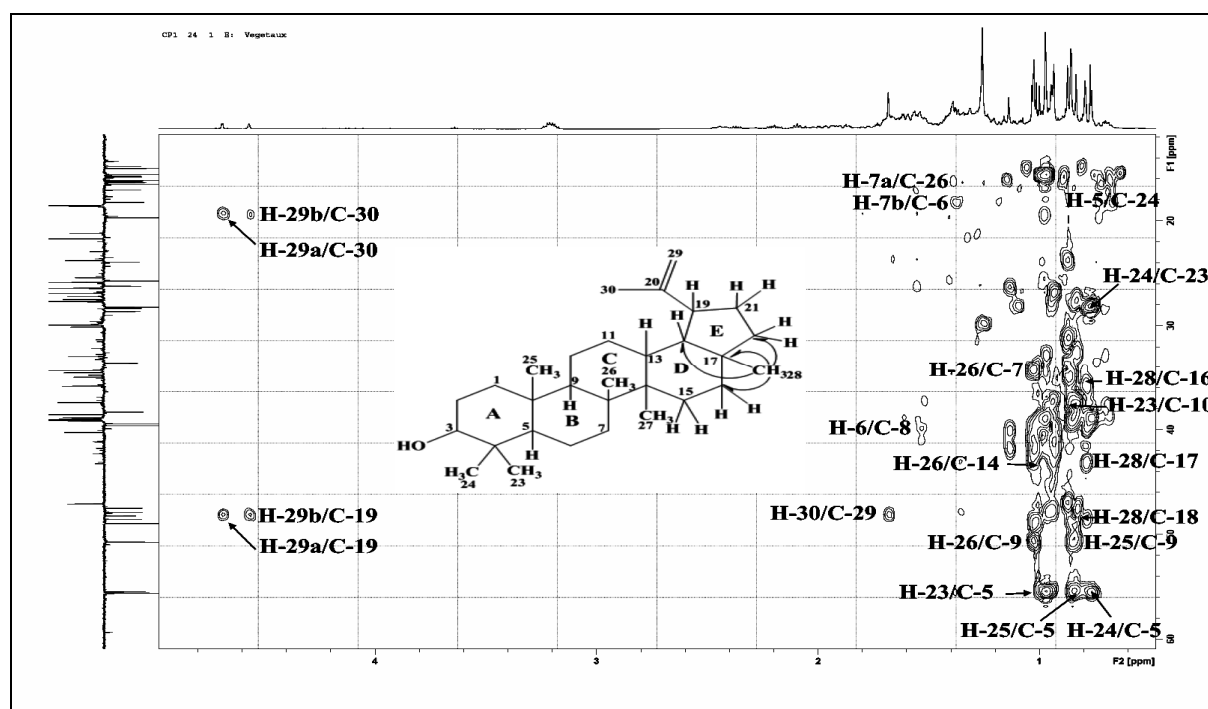


Figure III-92 : Spectre HMBC du composé CP₁

Toutes ces données spectroscopiques permettant de déduire la formule brute du composé **CP₁** en C₃₀H₅₀O indiquent 6 degrés d'insaturations, ce qui nous autorise à émettre l'hypothèse que le composé **CP₁** est un triterpène pentacyclique dont le dernier cycle (cycle E) est à 5 chaînons et est substitué par un groupement isoprényle. Alors, le composé **CP₁** peut donc être de type lupane (groupement isoprényle lié au C-19) ou hopane (groupement isoprényle lié au C-21) (figure III-93) ^[85].

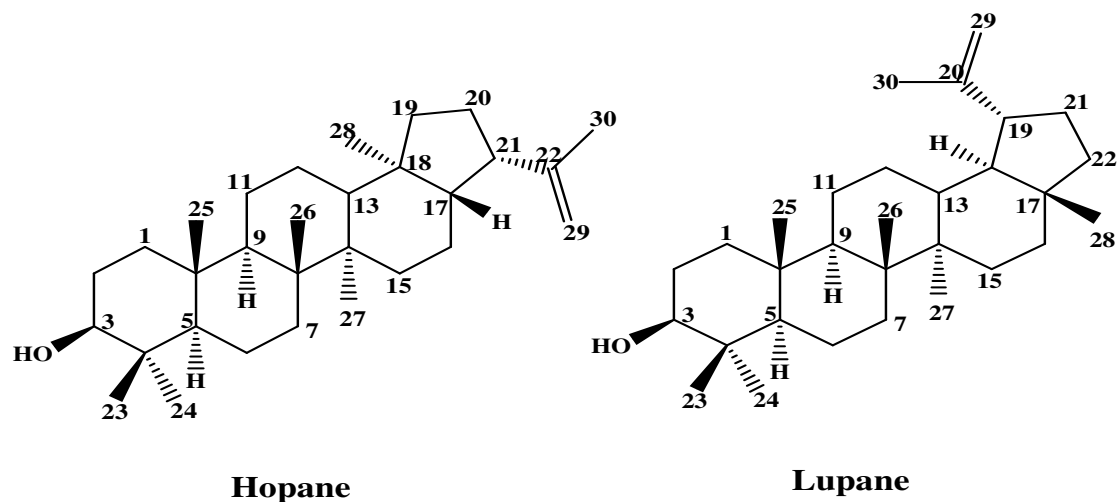


Figure III-93: Squelettes hopane et lupane

En raison de la proximité et de l'orientation de la chaîne latérale du groupement isoprénique dans le squelette lupane, les C-13 et C-27 sont beaucoup plus blindés que dans le squelette hopane ^[85]. Pour le composé **CP₁**, le déplacement chimique du C-13 est de δ_C 38,5 alors qu'on observerait une valeur d'environ 50,0 ppm dans le cas d'un hopane; de la même manière, le Me-27 à δ_C 14,8 dans le composé **CP₁** serait plus déblindé δ_C 18,0 dans une structure de type hopane ^[86,87]. En conséquence le composé **CP₁** est à squelette lupane.

Sur le spectre COSY (Figure III-94), il est visualisé un système de spin constituant l'enchaînement $^{13}\text{CH}-^{18}\text{CH}-^{19}\text{CH}-^{21}\text{CH}_2-^{22}\text{CH}_2-$ qui montre les couplages attendus entre: H-13/H-18/H-19/H₂-21/H₂-22. Ce qui permet d'attribuer leurs déplacements chimiques à δ_H 2,38 (H-19), 1,27 (H₂-21) et 1,19 (H₂-22). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à δ_C 47,8 (C-19) et 30,1 (C-21). Le déplacement chimique du proton H-19 (2,38 ppm) est également caractéristique d'un squelette lupane ^[88].



The chemical structure is a complex polycyclic system, specifically a derivative of octahydronaphthalene. It features a central fused ring system with several substituents. The structure is labeled with numbers 1 through 30, indicating specific carbon atoms. Key features include:

- Ring System:** A complex polycyclic system with multiple fused rings.
- Substituents:**
 - Methyl Groups (H₃C):** Located at positions 10, 11, 13, 14, 16, 18, 20, and 21.
 - Hydroxyl Groups (HO):** Located at positions 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8.
- Numbering:** The structure is numbered 1 through 30, with 1-10 representing the main ring system and 11-21 representing the side chains and substituents.

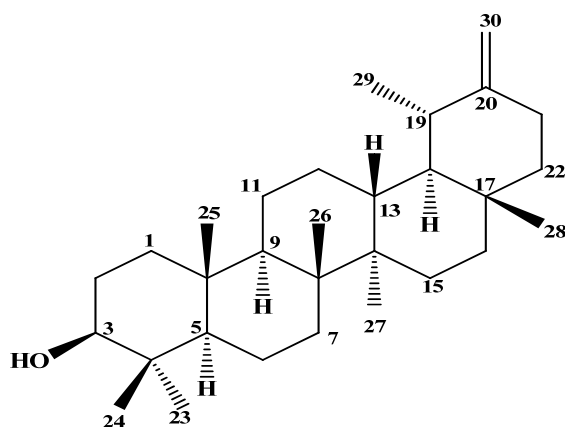
Figure III-95 : Stéréochimie des centres chiraux du composé CP₁

A l'issue de cette analyse ce composé est identifié au lup-20(29)-èn-3-ol nommé lupéol isolé précédemment de *Centaurea horrida* ^[89], *Strobilanthus callosus* ^[90], *Paullinia weinmanniaefolia* ^[91]. Il possède des activités biologiques intéressantes anti-inflammatoire, anti-arthritique ^[90], anti-fongique et anti-malarique ^[92]

Tableau 15 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **CP₁** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,64 <i>m</i> H-1a; 0,94 <i>m</i> H-1b	38,7
2	1,61 <i>m</i>	27,5
3	3,18 <i>dd</i> 11,0 ; 5,3	79,3
4	-	39,8
5	0,69 <i>m</i>	55,5
6	1,52 <i>m</i> H-6a; 1,39 <i>m</i> H-6b	19,0
7	1,38 <i>m</i>	34,2
8	-	41,1
9	1,30 <i>sl</i>	50,9
10	-	37,2
11	1,43 <i>m</i> H-11a; 1,29 <i>m</i> H-11b	21,2
12	1,70 <i>m</i> H-12a; 1,10 <i>m</i> H-12b	25,3
13	1,62 <i>m</i>	38,5
14	-	42,8
15	1,61 <i>m</i> H-15a; 0,96 <i>m</i> H-15b	27,2
16	1,48 <i>m</i>	35,9
17	-	43,2
18	1,39 <i>m</i>	48,5
19	2,38 <i>m</i>	47,8
20	-	151,2
21	1,27 <i>m</i>	30,1
22	1,19 <i>m</i>	40,3
23	0,97 <i>s</i>	28,4
24	0,77 <i>s</i>	15,6
25	0,84 <i>s</i>	16,2
26	1,04 <i>s</i>	16,1
27	0,96 <i>s</i>	14,8
28	0,80 <i>s</i>	18,1
29	4,68 <i>sl</i> H-29a ; 4,56 <i>sl</i> H-29b	109,5
30	1,70 <i>sl</i>	19,8

III-4-9 Elucidation structurale du composé CP₁₀



18 α ,19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol

Le composé **CP₁₀** est le 18 α ,19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol, un triterpène pentacyclique nommé taraxastérol, se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Ce composé prend une coloration violette après révélation en CCM par l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **CP₁₀** (Figure III-96) montre en mode négatif deux pics d'ions pseudomoléculaires [M-H]⁻ et [2M-H]⁻ à m/z = 425,3 et 851,2 respectivement, ce qui donne une masse moléculaire égale à 426 uma correspondant à une formule brute en C₃₀H₅₀O.

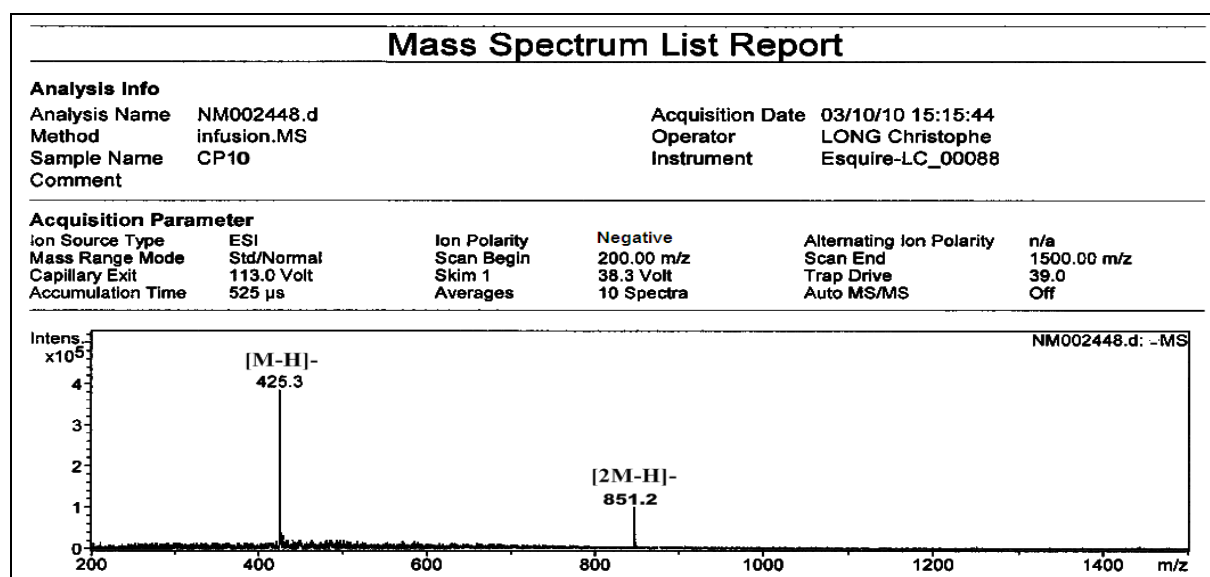


Figure III-96: Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé CP₁₀

Le spectre RMN ^1H (Figure III-97) est presque identique à celui du composé **CP₁** déjà identifié. En effet, on observe dans la région des champs forts les signaux des sept groupements méthyles à δ_{H} 0,98 (H-23), 0,77 (H-24), 0,84 (H-25), 1,02 (H-26), 0,93 (H-27), 0,86 (H-28), 1,01 (H-29) caractéristiques des composés de type triterpène pentacyclique. Dans la zone de résonance deblindée du spectre RMN ^1H , il est repéré le signal du groupement hydroxyméthine à 3,2 ppm (H-3).

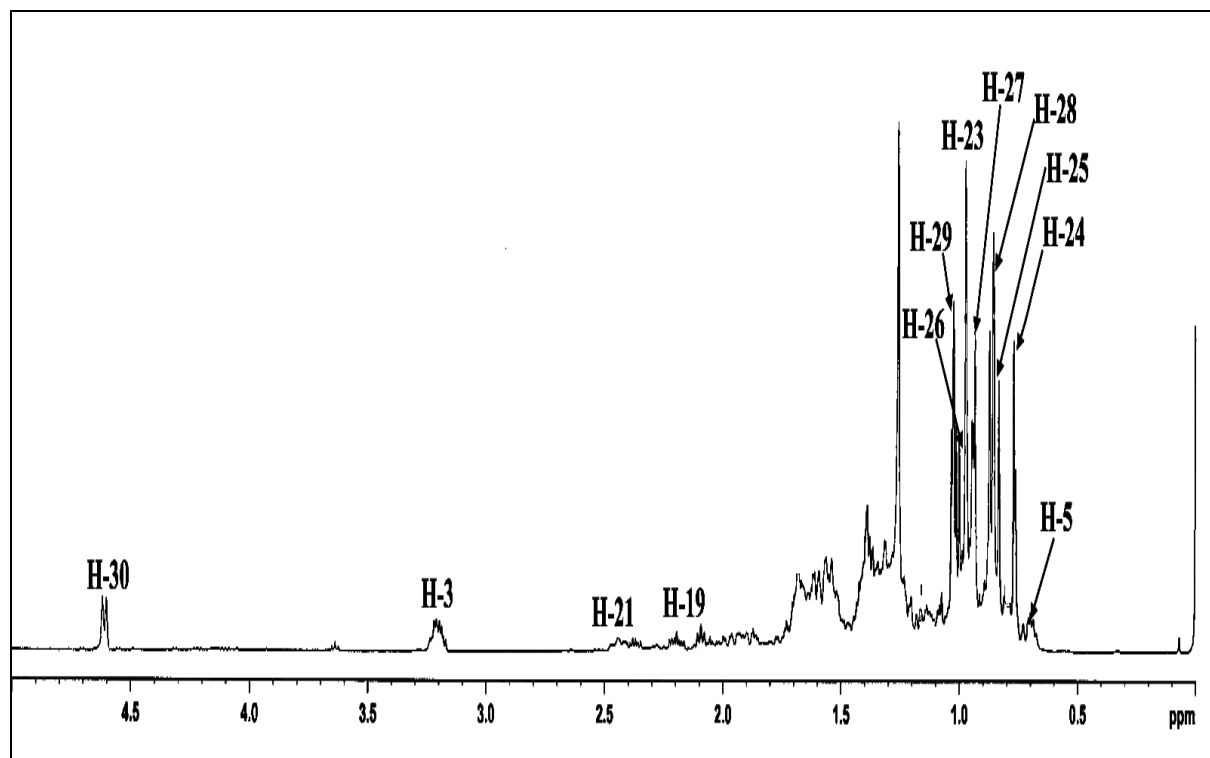


Figure III-97: Spectre RMN ^1H du composé **CP₁₀**

La différence entre les composés **CP₁** et **CP₁₀** concerne la disparition des signaux du groupement isoprényle du composé **CP₁** et l'apparition de deux signaux sous forme de singulet large chacun à 4,60 et 4,62 ppm attribuables aux protons éthyléniques d'un groupement méthylène exocyclique. Le spectre HSQC J -modulé permet de déterminer le déplacement chimique de leur carbone à δ_{C} 107,4 (C-30). Les protons éthyléniques géminés du groupement méthylène corrélient en HMBC (Figure III-98) avec deux carbones dont un CH à δ_{C} 39,6 (C-19) et l'autre un CH_2 à δ_{C} 25,9 (C-21). Leurs protons sont repérés à δ_{H} 2,08 (H-19), 2,43 (H-21a) et 2,19 (H-21b) respectivement selon l'expérience HSQC.

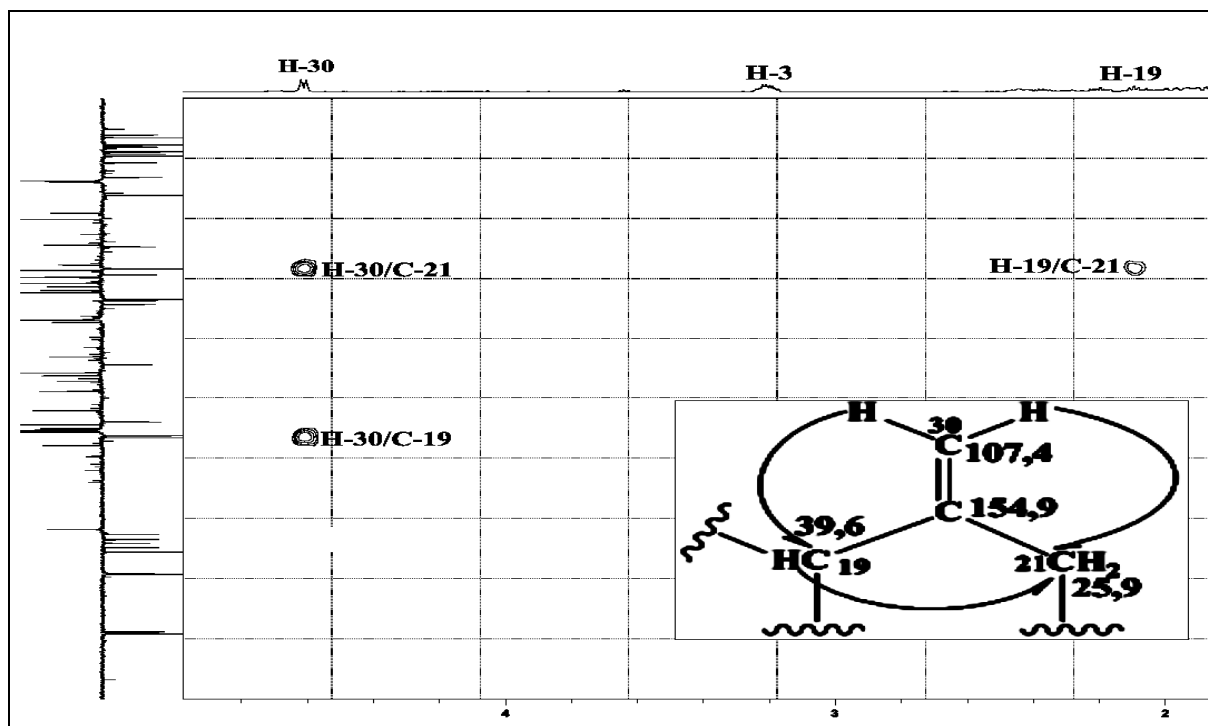


Figure III-98: Corrélations HMBC des protons éthyléniques géminés H-30

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure III-99) indique la présence de 30 signaux se répartissant en 7 méthyles, 11 méthylènes dont 1 CH_2 hybridé sp^2 (107,4 ppm) et 6 carbones quaternaires dont 1 hybridé sp^2 (154,9 ppm) attestant de sa nature tritérpénique. Le nombre d'insaturation égale à 6, suggère aussi la présence d'un triterpène pentacyclique dont le cycle E est à 6 chaînons portant une double liaison exocyclique en position C-20.

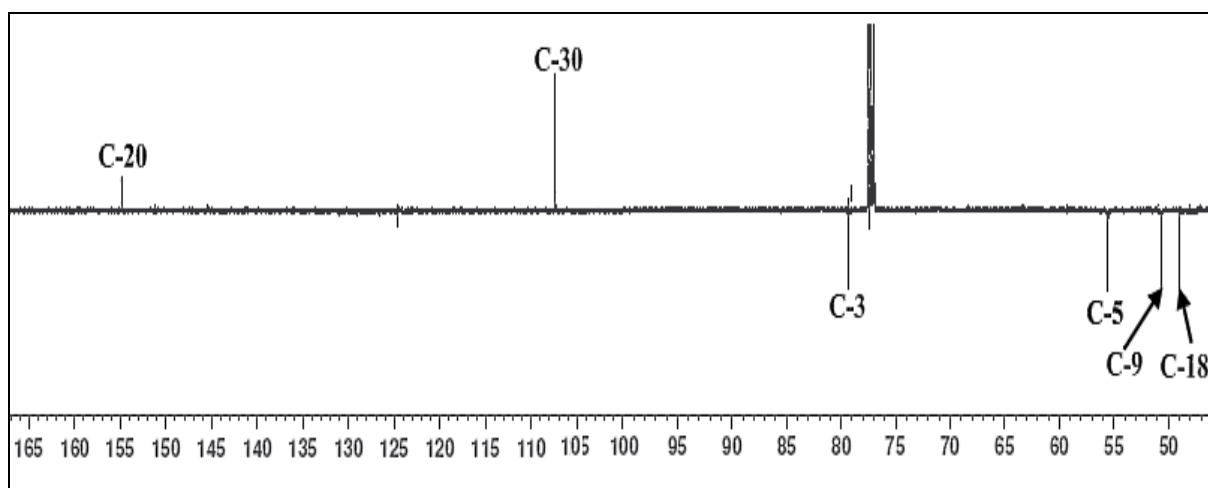


Figure III-99: Partie du spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé CP_{10}

Les protons (H₂-21) couplent en COSY (Figure III-100) avec deux protons résonant à 1,37 ppm (m, H-22). L'expérience HSQC permet d'assigner le déplacement chimique du carbone C-22 à 38,9 ppm. La multiplicité du proton H-19 sous forme de quintuplet avec $J = 6,8$ Hz indique qu'il est couplé avec 4 protons voisins dont 3 du groupement méthyle H₃-29 (δ_H 1,01, d, $J = 7,1$ Hz) et un du groupement méthine H-18 (δ_H 0,96, *m*).

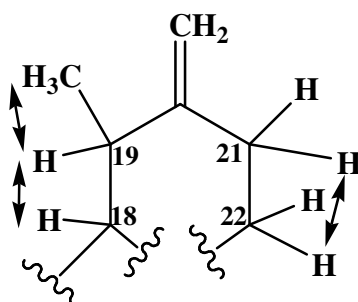


Figure III-100: Corrélations COSY du composé CP₁₀

Les protons H-19 et H₂-21 corrélient en HMBC (Figure III-101) en 3J avec un carbone quaternaire sp³ résonant à 34,5 ppm correspondant au carbone C-17. Ce dernier présente également des corrélations en HMBC avec les protons H-18, H₂-22, H₃-28 (δ_H 0,86, *s*), H-13 (δ_H 1,59, *m*), H₂-15 (δ_H 0,97 et 1,68, *m*) et H₂-16 (δ_H 1,17 et 1,23, *m*). Les déplacements chimiques des carbones correspondant ont été déterminés par analyse du spectre HSQC *J*-modulé à δ_C 48,7 (C-18), 39,2 (C-13), 26,9 (C-15) et 38,3 (C-16).

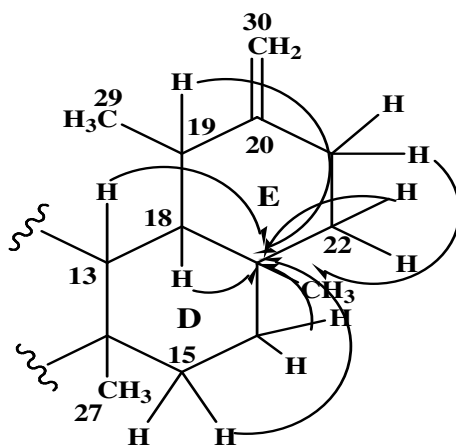


Figure III-101: Corrélations HMBC du composé CP₁₀

L'ensemble de ces données spectroscopiques, en plus de la mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme ($[\alpha]_D = +95^\circ$, $C = 0,36$ g/100 ml) et la comparaison avec les données de la littérature conduisent à élaborer la structure moléculaire, confirmer la

stéréochimie des carbones asymétriques (Figure III-102) et à proposer pour ce composé la structure suivante: 18 α ,19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol (**CP₁₀**) connu sous le nom taraxastérol.

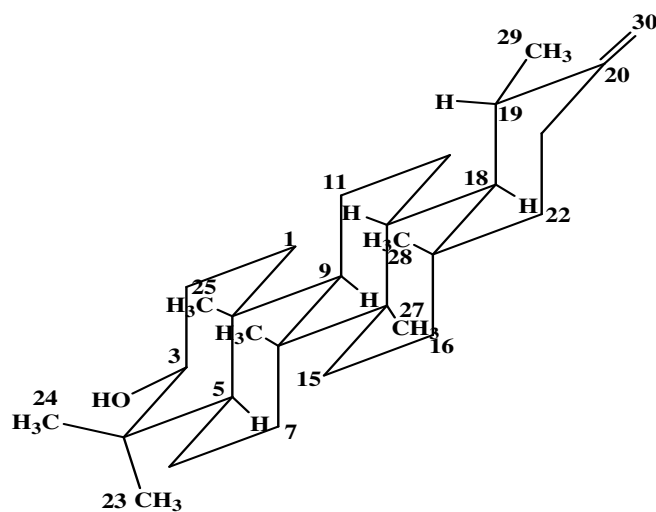


Figure III-102 : Stéréochimie des centres chiraux du composé CP₁₀

Ce composé a été isolé antérieurement des espèces : *Argania spinosa* ^[93], *Millettia versicolor* ^[94] et *Centaurea dimorpha* ^[95], et il possède des activités biologiques: anti-tumorale ^[96], anti-inflammatoire ^[97].

Tableau 16: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **CP₁₀** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,71 <i>m</i> H-1a; 0,96 <i>m</i> H-1b	38,8
2	1,61 <i>m</i>	37,4
3	3,2 <i>m</i>	79,0
4	-	38,9
5	0,70 <i>m</i>	55,5
6	1,53 <i>m</i> H-6a; 1,38 <i>m</i> H-6b	18,5
7	1,39 <i>m</i>	34,2
8	-	40,3
9	1,32 <i>sl</i>	50,5
10	-	37,1
11	1,54 <i>m</i> H-11a; 1,27 <i>m</i> H-11b	21,2
12	1,68 <i>m</i> H-12a; 1,13 <i>m</i> H-12b	26,4
13	1,59 <i>m</i>	39,2
14	-	42,0
15	1,68 <i>m</i> H-15a; 0,97 <i>m</i> H-15b	26,9
16	1,23 <i>m</i> H-16a; 1,17 <i>m</i> H-16b	38,3
17	-	34,5
18	0,96 <i>m</i>	48,7
19	2,08 <i>quintuplet</i> 6,8	39,6
20	-	154,9
21	2,43 <i>m</i> H-21a; 2,19 <i>m</i> H-21b	25,9
22	1,37 <i>m</i>	38,9
23	0,98 <i>s</i>	28,2
24	0,77 <i>s</i>	15,4
25	0,84 <i>s</i>	16,3
26	1,02 <i>s</i>	15,9
27	0,93 <i>s</i>	14,8
28	0,86 <i>s</i>	19,6
29	1,01 <i>d</i> 7,1	25,6
30	4,62 <i>sl</i> H-30a; 4,60 <i>sl</i> H-30b	107,4

CONCLUSION

L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. de la famille Asteraceae, plante endémique à l'Algérie et la Tunisie a abouti à l'isolement de 2 triterpènes pentacycliques, 5 flavonoïdes et 2 stéroïdes. Ces composés ont été obtenus à l'état pur à partir de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. par l'utilisation en alternance des différentes méthodes chromatographiques employées dans notre laboratoire à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaques préparatives de silice normale et greffée en C18 et la chromatographie d'exclusion stérique sur Séphadex.

L'identification des métabolites secondaires isolés dans le cadre de ce travail de recherche est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D (^1H , ^{13}C DEPT et ^{13}C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC), la spectrométrie de masse ESI-MS, l'ultraviolet et l'infrarouge, la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés identifiés appartiennent à trois classes de métabolites secondaires : les flavonoïdes, les triterpènes, et les stéroïdes et se répartissent comme suit :

- quatre flavonoïdes de type flavone : Oroxyline A (**CP₂**), Chrysine (**CP₃**), Ténaxine II (**CP₄**) et 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP₈**).
- un flavonoïde de type flavonol: Quercétine (**CP₉**).
- un triterpène pentacyclique à squelette lupane: Lupéol (**CP₁**).
- un triterpène pentacyclique à squelette ursane: Taraxastérol (**CP₁₀**).
- deux stéroïdes: β -sitostérol (**CP₆**) et Daucostérol (**CP₁₁**).

Cette investigation phytochimique qui a mené à l'identification de 9 biomolécules, à partir de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., se répartissant en 4 triterpénoïdes et 5 flavonoïdes n'a pas permis l'isolement de sesquiterpènes lactones, composés typiques en général du genre *Centaurea*. Ce constat a été relevé par plusieurs études réalisées sur les espèces *Centaurea* à savoir : *C.*

africana, *C. bracteata* et *C. horrida*. Par ailleurs, il est important de mentionner que les deux flavonoïdes de type flavone Ténaxine II (**CP₄**) et 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP₈**) ont été isolés pour la première fois dans le genre *Centaurea*.

Cette étude montre encore une fois la richesse des plantes du genre *Centaurea* en métabolites secondaires de type triterpènes et polyphénols, particulièrement les flavonoïdes considérés comme constituants typiques des plantes du genre *Centaurea* et de la famille Asteraceae.

Chapitre VI

Activités biologiques

IV-1- Introduction

80% de la population mondiale utiliseraient des plantes médicinales pour divers problèmes de santé. Ceci par choix, mais aussi du fait de la pauvreté grandissante de ces populations qui n'ont pas accès aux médicaments modernes à cause de leurs coûts très onéreux ^[98].

Les plantes utilisent différents moyens pour se défendre des agressions de leur environnement que constituent les herbivores, les insectes, les bactéries, les rayons UV. Certains de ces moyens de défense font appel particulièrement à des composés chimiques qui interagissent avec le métabolisme de l'attaquant; étant alors intoxiqué et affecté, ce dernier pourrait être découragé de poursuivre son attaque. Certains de ces composés ont aussi un effet pharmacologique chez l'être humain et peuvent donc servir de remèdes, tout dépendant de la dose utilisée ^[99,100].

La recherche de composés possédant des activités thérapeutiques ne peut toutefois pas être entreprise au hasard compte tenu du très grand nombre d'espèces végétales. Cette démarche doit donc être judicieusement réfléchie et orientée ^[101]. Dans cette optique, l'ethnopharmacologie qui étudie principalement les propriétés pharmacologiques des plantes et les préparations utilisées en médecine traditionnelle permettrait vraisemblablement d'orienter les recherches pour l'isolement et l'identification de composés bioactifs ayant des activités biologiques intéressantes (anti-oxydante, anti-bactérienne, anti-fongique, anti-inflammatoire....etc.) ^[102,103].

Paradoxalement, les grandes corporations pharmaceutiques à travers le monde délaissent peu à peu le domaine de la recherche de nouveaux antibiotiques pour se concentrer davantage sur les maladies chroniques qui promettent des profits intéressants ^[104,105]. La problématique de la résistance aux antibiotiques rappelle cependant qu'il est important de trouver de nouvelles molécules possédant une activité antibactérienne qui agissent sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques actuellement utilisés dans le domaine de la santé publique ^[106]. Les plantes médicinales peuvent être une source intéressante de nouveaux composés antibiotiques permettant éventuellement de faire face à ce problème mondial majeur ^[107].

Le but de notre approche est d'évaluer l'activité anti-radicaux libres par le test DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) et l'activité anti-bactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé des extraits végétaux bruts (EP, CH₂Cl₂, AcOEt et *n*-BuOH) et des produits isolés de la plante *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. L'activité anti-bactérienne a été estimée sur quatre souches bactériennes à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Travaux antérieurs

IV-2- Travaux antérieurs

IV-2-1- Microbiologie

La microbiologie est la science qui étudie les micro-organismes. Ces derniers sont des êtres vivants de petites tailles qui ne peuvent être vus à l'oeil nu (quelques protistes unicellulaires sont visibles à l'oeil). Ils ne peuvent donc être observés qu'à l'aide d'un microscope.

IV-2-2- Bactéries

Les bactéries (*Bacteria*) sont des micro-organismes vivants unicellulaires procaryotes. Elles mesurent quelques micromètres de long (généralement de 0,5 à 5 μm de longueur) et peuvent présenter différentes formes : des formes sphériques (coques), des formes allongées ou en bâtonnets (bacilles) et des formes plus ou moins spiralées (spirilles).

Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes : sol, eau, air, sur les végétaux et les animaux...etc. Cependant, de nombreuses espèces bactériennes sont pathogènes et sont responsables de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis et la tuberculose ^[108].

IV-2-3- Procaryotes

On désigne sous le terme « procaryotes » (du grec *pro* = avant et *caryon* = noyau), l'ensemble des micro-organismes dont la cellule ne possède pas de noyau nucléaire ni d'autres organites (Figure VI-1). Les procaryotes sont subdivisés en deux groupes taxonomiques : les archées et les bactéries ^[109].

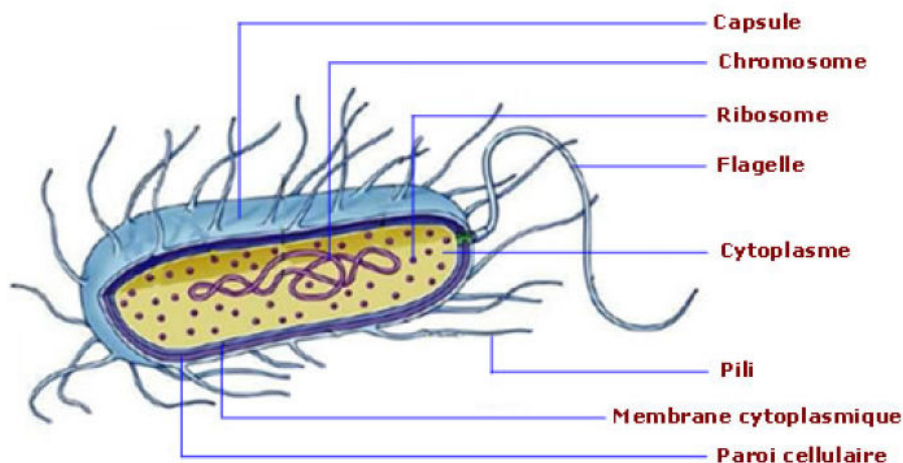


Figure VI-1: Structure d'une cellule procaryote (bactérie)

IV-2-4- Paroi cellulaire

La paroi cellulaire est l'une des caractéristiques importantes des bactéries. Elle donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la pression osmotique du cytoplasme. En fonction de leur paroi cellulaire, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes : les Gram positifs (Gram+) et les Gram négatifs (Gram-). Cette différenciation est basée sur la structure et la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram. Les bactéries à coloration de Gram+ possèdent une paroi cellulaire épaisse alors que les bactéries à coloration de Gram- ont une paroi fine ^[110].

IV-2-5- Types de bactéries

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram positif et Gram négatif) basés sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire ^[111].

IV-2-5-1- Gram négatif

Les bactéries à Gram négatif (Figure VI-2) ont une structure qui s'organise en trois grandes parties, soit, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La membrane externe
- L'espace périplasmique, comportant notamment la paroi
- La membrane plasmique

IV-2-5-2- Gram positif

Les bactéries à Gram positif (Figure IV-2) ont une structure qui s'organise en trois grandes parties (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La couche de peptidoglycane composant la paroi cellulaire
- L'espace périplasmique
- La membrane plasmique

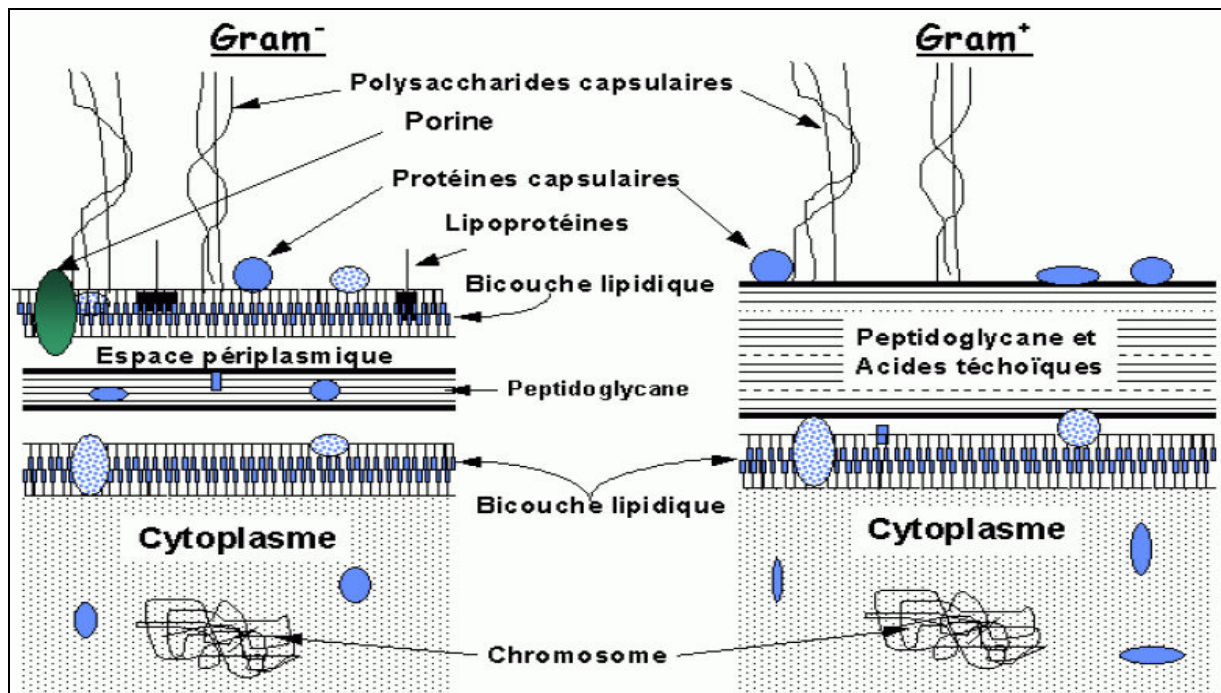


Figure VI-2: Structure de la paroi bactérienne

IV-2-6- Gélose de MUELLER-HINTON (MH)

La gélose de Mueller-Hinton est le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques, ses composants sont ci-après désignés ^[112] :

- Infusion de viande boeuf : 300 g/l
- Bio-Case: 17,5 g/l
- Amidon: 1,5 g/l
- Agar : 17 g/l
- pH : 7,3

IV-2-7- Les antibiotiques

Un antibiotique est défini comme étant tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose, d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires ^[113].

IV-2-8- Activités biologiques des flavonoides

Dans la plupart des plantes, les flavonoides sont considérés comme des pigments polyphénoliques responsables des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreux vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation du sang. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoire, anti-bactérienne et anti-virale, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie. Les flavonoides comme l'héspéridine et la rutine, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

Les relations structures-activités anti-oxydantes des flavonoides et des composés phénoliques en générale ont montré que l'activité anti-oxydante est déterminée par la position et le degré d'hydroxylation du squelette flavonique ^[114] dont des exemples ci-après illustrent l'intensité de l'activité anti-radicaux libres :

- L'effet de l'*ortho*-dihydroxy du cycle B sur l'activité anti-oxydante

La présence de deux hydroxyles en position *ortho* du cycle B augmente l'activité anti-oxydante des flavonoides comparativement à l'hydroxyle en position *méta*, c'est-à-dire une seule hydroxylation, ce qui montre l'importance de la substitution *ortho*-di-OH du cycle B ^[115].

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité anti-oxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en *ortho* de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la formation d'une liaison hydrogène (Figure VI-3) et de la délocalisation de l'électron non apparié (Figure VI-4) ^[116].

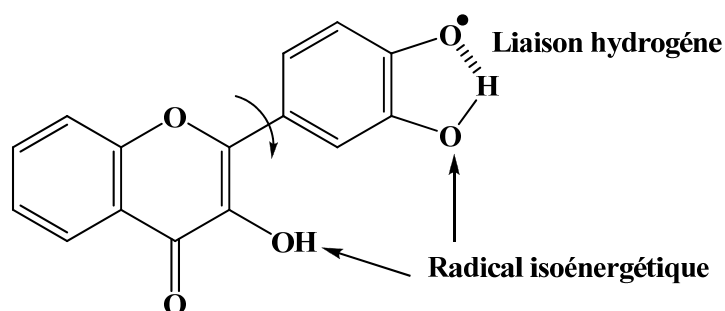


Figure VI-3: Stabilisation du radical phénoxy par formation de liaison hydrogène

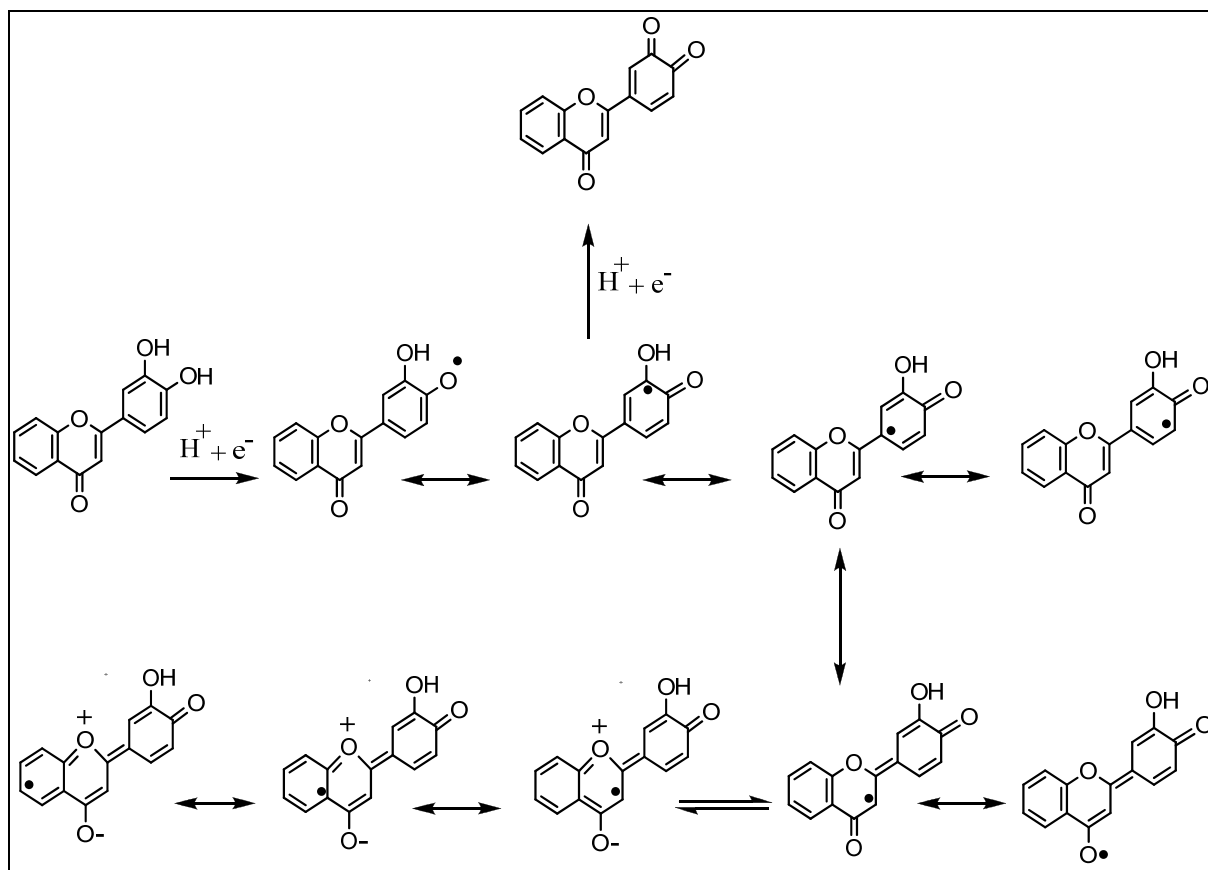


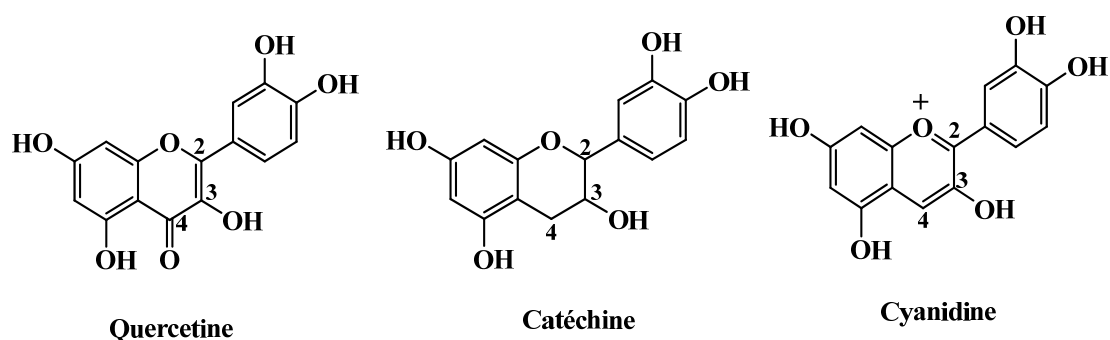
Figure VI-4: Stabilisation du radical phénoxy par délocalisation électronique

- L'effet de la glycosylation et *O*-méthylation sur l'activité anti-oxydante

La glycosylation ou la *O*-méthylation du groupement hydroxyle en position C-7 des flavones et des flavanones diminue l'activité anti-oxydante ^[117].

- L'effet de la double liaison C₂-C₃ et le carbonyle en C-4 sur l'activité anti-oxydante

La présence de la double liaison entre les carbones C-2, C-3 et le carbonyle en C-4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy ^[118] ce qui augmente l'activité anti-oxydante des flavonoides ^[116,117].



- La présence de groupements hydroxyles sur le cycle A

La présence de groupements hydroxyles sur la partie catéchole peut compenser l'absence de la fonction hydroxyle sur le cycle B et permettre le maintien de l'activité antioxydante ^[119].

- La présence de groupements hydroxyles en position 3

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. Donc la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce les propriétés anti-oxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet anti-oxydant dans le cas des isoflavones ^[120, 121].

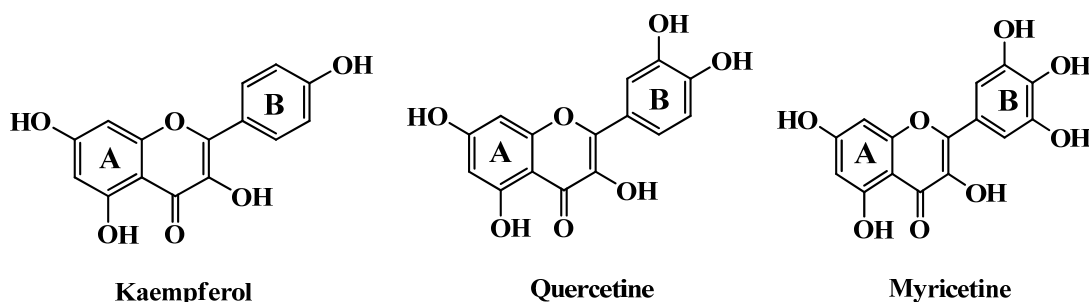
D'autres activités ont été rapportées dans le cas des composés flavonoïdiques et se résument en :

- L'effet du carbonyle des flavonoides sur l'activité anti-bactérienne

Les composés phénoliques ont une action spasmolytique, antibactérienne surtout contre les Gram- dont les groupes C=O réagissent avec les S-H et empêchent la croissance bactérienne, ils ont aussi une activité fongicide parfois vermifuge et cytotoxique ^[122].

- L'effet des hydroxyles sur l'activité protectrice vasculaire

L'étude faite sur trois flavonols (Kaempferol, quercétine et myricétine) montre que l'augmentation du nombre d'hydroxyle au niveau du cycle B conduit à l'élévation de la relaxation vasculaire, de même que la présence des OH en positions C-5 et C-7 influent sur les vaisseaux sanguins ^[41]



IV-2-9- Activités biologiques des triterpènes

Les activités biologiques des triterpènes ont été résumées dans plusieurs articles. Les familles chimiques les plus intéressantes du point de vue de l'activité biologique sont celles à squelette oléanane, ursane et lupane ^[123,124]. Généralement, l'intensité de l'activité biologique ne dépasse pas celle de composés commerciaux déjà en cours d'utilisation pour les pathologies étudiées. Cependant, comme ceux-ci sont généralement très peu toxiques pour les animaux, de grandes quantités peuvent être absorbées sans danger ^[125].

La palette des activités biologiques des terpènes est incroyablement large et comporte par exemple des activités: anti-microbienne (acide fuside), anti-fidant (radermasinis), anti-mycotique (trianthenol), anti-virale (les dérivés de l'acide betulinique), anti-inflammatoire (betuline, lupeol), des effets anti-tumorale (boswellique, pomole), anti-cariées (des acides oleanolique, glycyrrhetique), anti-ulcerienne (acides glycyrrhetique) et anti-HIV (l'acide bétulinique) ^[126,127].

VI-2-10- Mécanisme de l'effet anti-microbien des polyphénols

Le mécanisme de l'effet anti-microbien des composés polyphénolique est très complexe, et implique multiples modes d'actions tels que :

l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien ^[128], dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN ^[129], des protéines des lipides, et la fonction mitochondriale ^[130], ainsi que la formation des complexes avec la paroi ^[131]. Ces processus ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mode d'action. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe ^[132].

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase ^[133]. Une étude récente a montré l'effet bactériostatique de différentes flavanones sur *Staphylococcus aureus* ^[134].

Résultats et Discussion

IV-3- Résultats

IV-3-1- Activité anti-bactérienne

Les résultats de l'activité anti-bactérienne de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. ont montré que les deux souches bactériennes (Gram négatif) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figure VI-5) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figure VI-6) ne présentent aucune zone d'inhibition de croissance. Ceci après les tests effectués sur des bandelettes imprégnées par les différents extraits de la plante *C. pubescens* (EP, AcOEt, CH₂Cl₂ et *n*-BuOH) et le produit CP₈, solubilisés dans l'éthanol.



Produit CP₈



Extrait *n*-BuOH



Extrait CH₂Cl₂



Extrait AcOEt



Extrait EP

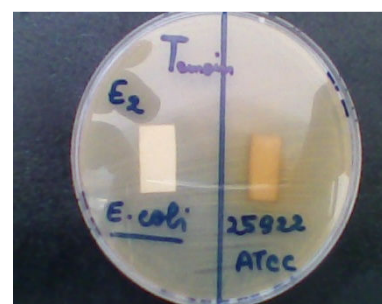
Figure VI-5: Tests anti-bactériens sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Gram-



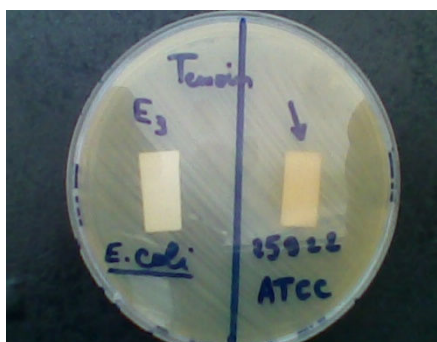
Produit CP₈



Extrait *n*-BuOH



Extrait CH₂Cl₂



Extrait AcOEt



Extrait EP

Figure VI-6: Tests anti-bactériens sur *Escherichia coli* ATCC 25922 Gram-

La souche résistante à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 MRSA (Figure VI-7) montre des zones d'inhibitions chez les extraits CH_2Cl_2 , AcOEt et le composé CP_8 .



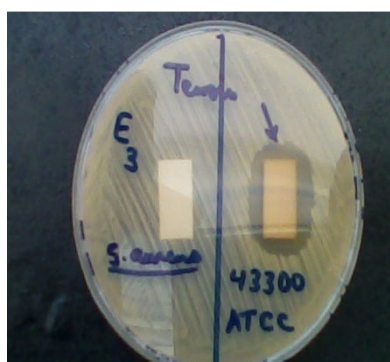
Produit CP_8



Extrait *n*-BuOH



Extrait CH_2Cl_2



Extrait AcOEt



Extrait EP

Figure VI-7: Tests anti-bactériens sur *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) Gram+

La souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figure VI-8) révèle des zones d'inhibitions pour les extraits CH_2Cl_2 et AcOEt et le produit CP_8 .



Produit CP_8



Extrait *n*-BuOH



Extrait CH_2Cl_2



Extrait AcOEt

Figure VI-8: Tests anti-bactériens sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Gram+

La sensibilité aux différents extraits est classifiée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm ; très sensible (++) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm ^[135,136]. Le tableau 17 regroupe les résultats des testes de sensibilité des différentes souches bactériennes aux extraits végétaux et produit pur CP_8 .

Tableau 17: Résultats de l'activité anti-bactérienne de *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

	Gram négatif		Gram positif	
Extraits	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i>
EP	-	-	-	-
ACoEt	-	-	+++	++
CH ₂ Cl ₂	-	-	+++	++
<i>n</i> -BuOH	-	-	-	-
CP ₈	-	-	++	++

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (++) , Extrêmement sensible (+++)

IV-3-2- Activité anti-oxydante

Le teste de l'activité anti-oxydante (Figure VI-9) a été réalisée sur quatre extraits EP, CH₂Cl₂, ACoEt et *n*-BuOH (Figure VI-10) et cinq produits (Figure VI-11) purs isolés de l'extrait CH₂Cl₂ (CP₂, CP₃, CP₄, CP₈ et CP₉). Dans ce test, les composés possédant des activités anti-oxydantes réduisent le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune, le 1,1-diphényl-2-picrylhiazine ^[137].

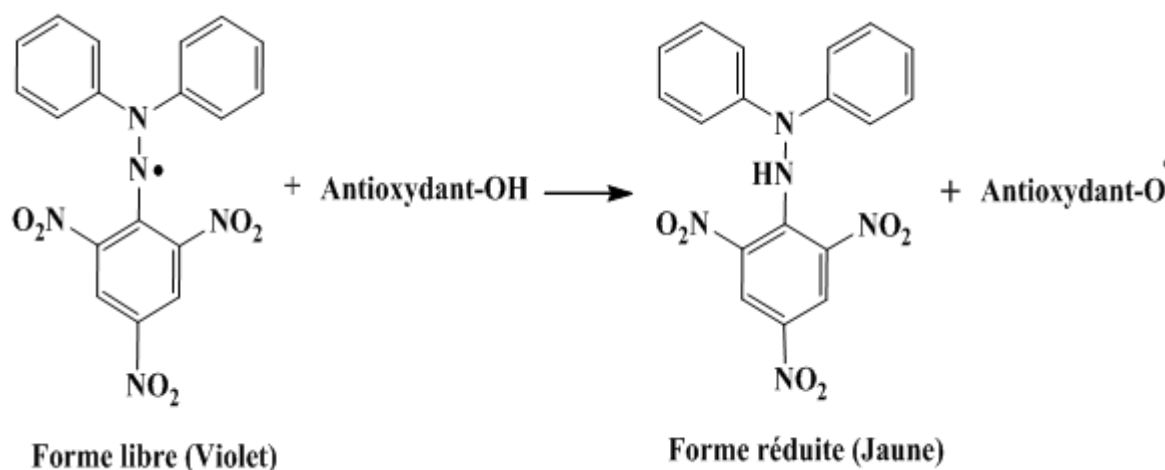


Figure-VI-9: Forme libre et réduite du DPPH

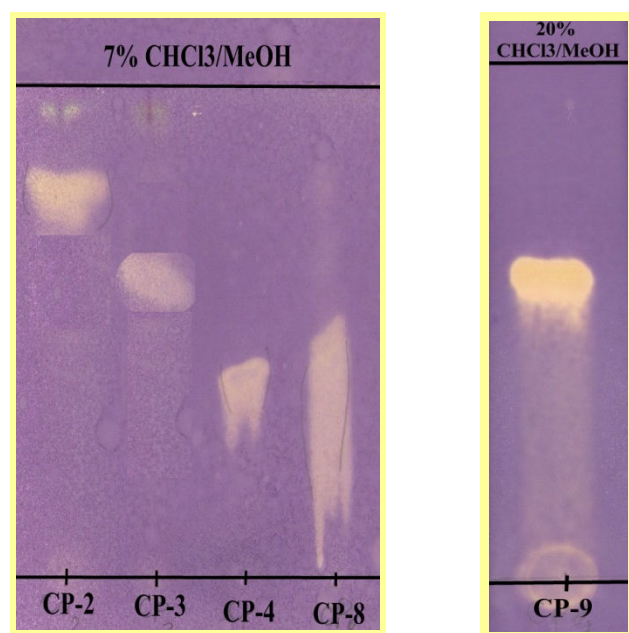


Figure VI-10: Tests de l'activité anti-oxydante des produits CP-2, 3, 4, 8 et 9

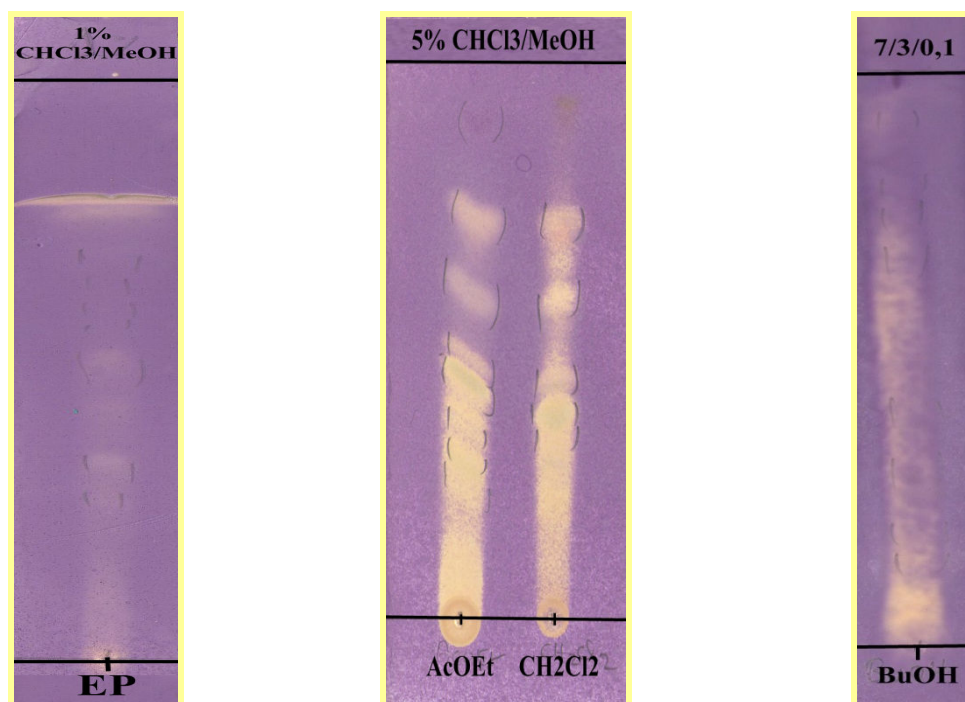


Figure VI-11: Tests de l'activité anti-oxydante des extraits EP, AcOEt, CH₂Cl₂ et *n*-BuOH

IV-3- Discussion

IV-3-1- Activité anti-bactérienne

Pour l'évaluation du potentiel anti-bactérien des extraits végétaux (EP, CH₂Cl₂, AcOEt et *n*-BuOH) et le produit pur CP₈, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elle possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier. Les résultats présentés dans le tableau 17 révèlent que :

Les deux extraits EP et *n*-BuOH ne montrent aucune activité anti-bactérienne sélective vis-à-vis des bactéries à Gram+ (*Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Staphylococcus aureus*) et Gram- (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*)^[138]. La résistance de ces souches aux extraits EP et *n*-BuOH peut être attribuée à l'incapacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar^[139]. Aussi la mauvaise solubilité de l'extrait EP dans l'éthanol pourrait expliquer dans une certaine mesure son action inactive à l'égard des souches testées.

Les extraits AcOEt et CH₂Cl₂ et le produit pur CP₈ manifestent une activité anti-bactérienne à l'égard des souches à Gram+ (*Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Staphylococcus aureus*). Cette activité est due principalement à la présence des flavonoïdes et triterpènes dans ces extraits.

Pour les souches à Gram négatif, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, aucune zone d'inhibition de croissance n'a été constatée autour des bandelettes des extraits AcOEt et CH₂Cl₂, ce qui montre bien la résistance de ces souches aux extraits en question. Cette résistance est due à la différence de structures de la paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif^[140].

L'hypersensibilité des souches *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) aux extraits AcOEt et CH₂Cl₂ et le produit majoritaire CP₈ peut s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH du milieu et la composition chimique des extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe^[130].

Les deux extraits AcOEt et CH₂Cl₂ ont produit des zones d'inhibitions plus grandes que celles obtenues avec le produit CP₈. Ceci est dû à la présence d'autres produits dans les extraits comme la quercétine qui a une activité anti-bactérienne puissante ^[132].

IV-3-2- Activité anti-oxydante

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres ^[141]. Leur intérêt comme anti-oxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires ^[142].

Pratiquement tous les extraits végétaux (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) ont réagi positivement au test anti-radicalaire avec le DPPH. Ceci s'explique par la présence de composés phénoliques dans ces extraits.

Nous remarquons que l'activité la plus élevée est celle des deux extraits AcOEt et CH₂Cl₂. Cette activité est due à la richesse de ces extraits en flavonoïdes, ceci suggère un lien entre l'activité anti-oxydante des extraits testés et leurs constituants chimiques. Ce lien reste conditionner par la structure des flavonoïdes, particulièrement la substitution en groupements hydroxyles des cycles A, B et C dont les flavonoïdes les plus actifs possèdent de 3 à 6 groupements hydroxyles ^[143,144]. La présence de groupement hydroxyle en position 3 renforce davantage les propriétés anti-oxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé ^[120]. Par ailleurs, la glycosylation des flavonoïdes réduit leurs capacités de piéger les radicaux libres ^[145].

Tous les produits purs testés (CP₂, CP₃, CP₄, CP₈ et CP₉) ont montré une activité anti-oxydante due à leur nature flavonique. Par ailleurs le composé CP₉ (quercétine) a présenté une activité anti-oxydante remarquable par rapport aux autres produits qui résulte de la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforçant ainsi son potentiel anti-oxydant ^[120], du nombre d'hydroxyles portés par le squelette flavonique et de l'existence de deux hydroxyles en position *ortho* au niveau du cycle B du flavonoïde.

CONCLUSION

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation en médecine des anti-oxydants et des anti-bactériens naturels. Dans cet ordre d'idée, nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes en vue d'une application éventuelle dans le domaine de la santé publique.

Le travail que nous avons réalisé dans cette partie de notre étude a pour objectifs de déterminer l'activité anti-oxydante et anti-bactérienne des extraits végétaux (EP, CH₂Cl₂, AcOEt et *n*-BuOH) préparés des parties aériennes de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. de la famille Asteraceae d'une part, et d'autre part d'évaluer les activités des biomolécules pures isolées.

Les résultats du test au DPPH ont montré que les extraits (CH₂Cl₂ et AcOEt) présentent une activité anti-oxydante remarquable. Par ailleurs les composés CP₂, CP₃, CP₄ et CP₈ ont signalé une faible activité anti-radicalaire par rapport à la quercétine (CP₉) fortement anti-radicaux libres.

L'activité anti-bactérienne étudiée sur le produit CP₈ et les extraits végétaux (CH₂Cl₂, AcOEt, EP et *n*-BuOH) nous a permis de conclure que :

- Les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Staphylococcus aureus*) sont sensibles au composé CP₈ et aux extraits AcOEt et CH₂Cl₂ riches en métabolites secondaires de type flavonoïdes et triterpénoïdes, et non sensibles aux extraits EP et *n*-BuOH pauvres en composés flavonoïdiques.
- Les souches à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) ne manifestent aucune sensibilité vis-à-vis de tous les extraits (EP, AcOEt, CH₂Cl₂ et *n*-BuOH) et le produit isolé CP₈.

Les résultats de l'activité anti-bactérienne ont montré la résistance des souches à Gram négatif par rapport aux souches à Gram positif à cause de la présence de la membrane externe dans le cas des bactéries à Gram négatif.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Cette étude concerne l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités anti-oxydante et anti-bactérienne de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., plante endémique à l'Algérie et la Tunisie et appartenant à la famille Asteraceae. Cette plante n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique antérieures.

La partie phytochimique réalisée sur l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de l'espèce *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., a permis d'isoler 9 composés naturels appartenant à trois classes de métabolites secondaires que sont les flavonoïdes, triterpénoïdes et stéroïdes, omniprésents dans le genre *Centaurea*. Ces composés se répartissent comme suit :

- quatre flavonoïdes de type flavone.
- un flavonoïde de type flavonol.
- un triterpène pentacyclique à squelette lupane.
- un triterpène pentacyclique à squelette ursane.
- deux stéroïdes dont un glycosylé.

La méthodologie de fractionnement, séparation et purification des métabolites secondaires que renferme l'extrait CH₂Cl₂ a été essentiellement basée sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques à savoir :

- la chromatographie liquide sous vide (VLC).
- la chromatographie sur colonne de gel de silice.
- la chromatographie sur colonne de séphadex.
- la chromatographie sur plaques préparatives de silice normale.
- la chromatographie sur plaques préparatives de silice greffée en C18.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation conjointe de techniques physicochimiques et spectroscopiques comprenant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN monodimensionnelle (¹H, ¹³C DEPT et ¹³C *J*-modulé) et les techniques de corrélations bidimensionnelles (COSY, HSQC et HMBC), la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie infra-rouge (IR) ainsi que la spectrométrie de masse ESI-MS. La mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les

données de la littérature ont été également exploitées pour l'élaboration structurale des biomolécules isolées.

Dans la partie biologique de notre travail, nous avons évalué l'activité anti-bactérienne des divers extraits végétaux (EP, CH₂Cl₂, AcOEt et *n*-BuOH) et de la molécule 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP₈**). Cette évaluation a été effectuée sur quatre souches bactériennes à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (MRSA), par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Un test au DDPH a permis d'établir l'activité anti-oxydante des extraits végétaux et métabolites secondaires isolés. A l'issue de cette étude, il en ressort que les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Staphylococcus aureus*) manifestent une activité vis-à-vis du composé **CP₈** ainsi que les extraits AcOEt et CH₂Cl₂ particulièrement riches en flavonoïdes et triterpénoïdes. Par ailleurs tous les extraits et biomolécules testés ont montré une activité anti-oxydante.

Bien que cette étude ne s'est pas soldée par l'isolement de sesquiterpènes lactones à partir de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de l'espèce *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., extrait renfermant préférentiellement ce type de métabolite selon les données de la littérature, il n'en demeure pas moins que des triterpénoïdes et flavonoïdes ont été identifiés dans cet extrait. Ces derniers sont remarquablement présents dans les plantes du genre *Centaurea*. Cette investigation montre encore une fois la richesse des plantes du genre *Centaurea* en composés triterpéniques et polyphénoliques notamment les flavonoïdes. Ces composés dont l'importance jugée capitale dans les domaines biologique et pharmaceutique n'est plus à démontrer, sont connus comme étant typiques de la famille Asteraceae en général et du genre *Centaurea* en particulier.

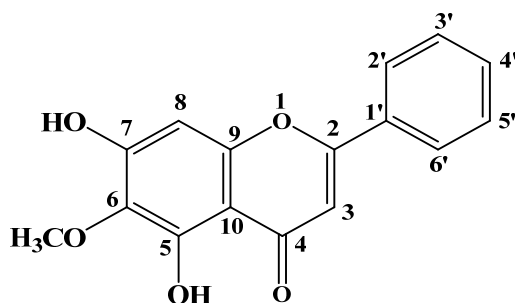
Dans nos perspectives de recherche futures, il est envisagé :

- la poursuite de l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., afin d'isoler d'autres métabolites secondaires au niveau des extraits polaires AcOEt et *n*-butanol.
- l'évaluation de l'activité anti-bactérienne et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de toutes les biomolécules isolées.
- l'étude de l'activité anti-fongique des extraits végétaux et produits purs isolés de la plante en question.

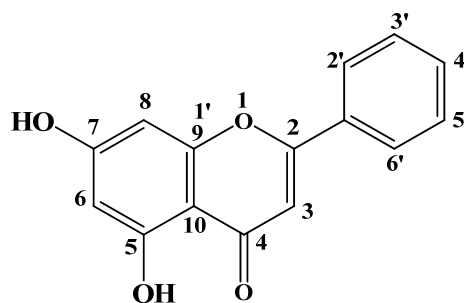
- l'étude de la relation structure-activité des molécules actives.

Les structures des composés isolés de l'extrait CH_2Cl_2 des parties aériennes de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. s'établissent comme suit :

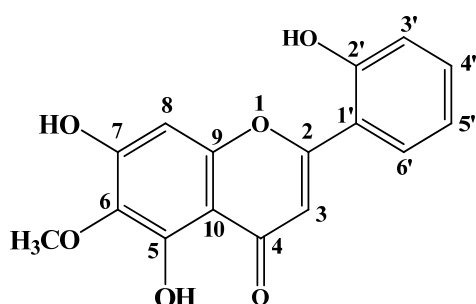
- **Flavone**



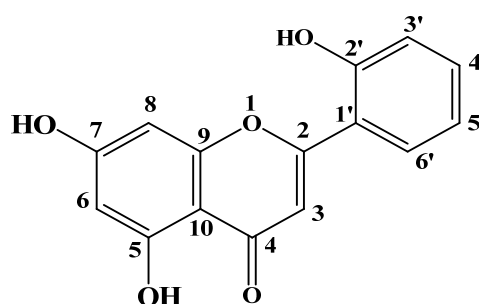
5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone
(CP₂)



5,7-dihydroxyflavone
(CP₃)

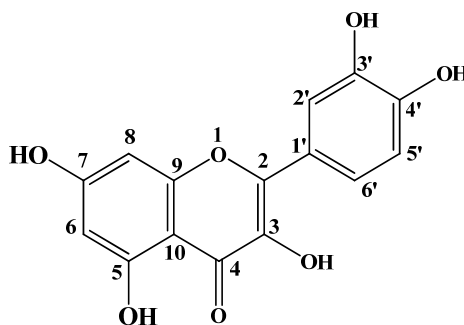


5,7,2'-trihydroxy-6-méthoxyflavone
(CP₄)



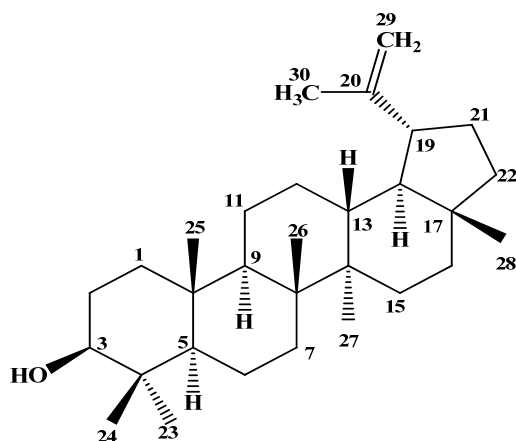
5,7,2'-trihydroxyflavone
(CP₈)

- **Flavonol**

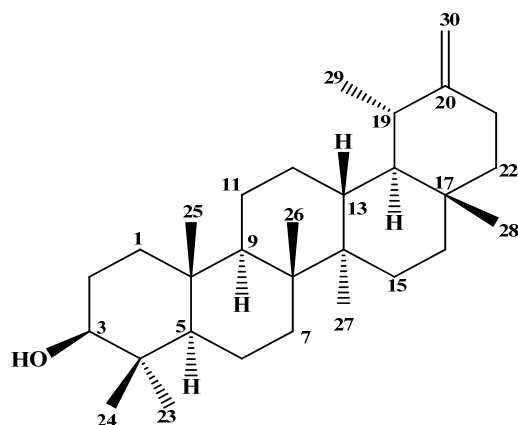


5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol (CP₉)

- Triterpène

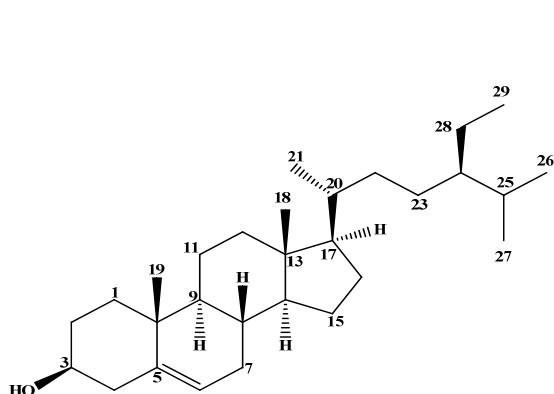


lup-20(29)-èn-3-ol
(CP₁)

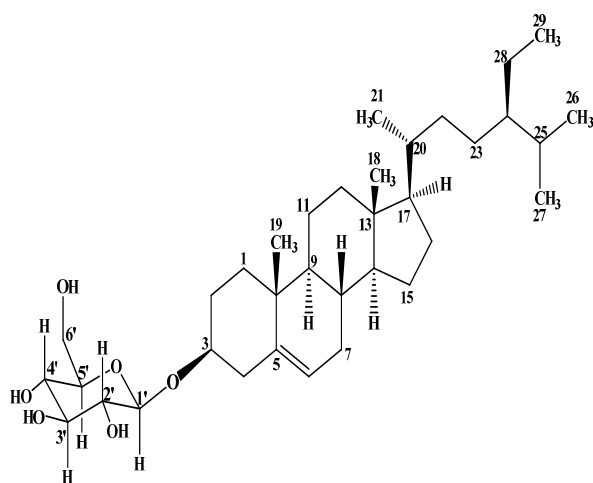


18α,19α-urs-20(30)-èn-3β-ol
(CP₁₀)

- Stéroïde



β-sitostérol
(CP₆)



β-sitostéryl 3β-D-glucopyranoside
(CP₁₁)

Chapitre V

Partie expérimentale

Partie phytochimie:

**Extraction-purification
et données structurales**

V-1- Matériel et appareillage

V-1-1- Récolte de la plante *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

La plante *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. a été récoltée dans la région de Biskra (Sud-Est algérien) au mois de mai 2008. Elle a été identifiée par le professeur Bachir oudjehih département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques de l'université de Batna.

V-1-2- Chimie extractive

V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Ces analyses sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (20 x 20 cm) et en phase inverse sur des plaques d'aluminium RP-18 (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Le révélateur utilisé est 10 % de H₂SO₄, 10 % acide acétique et 80 % eau.

V -1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

V -1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillons à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de la silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillons déposée.

La chromatographie d'exclusion stérique est réalisée sur Séphadex[®] LH-20, en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier. L'élution est effectuée à pression atmosphérique. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

V -1-3- Chimie structurale

V -1-3-1- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil BRUKER Avance DRX-500 du centre de recherche sur les substances naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France). Les Microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les spectres de RMN ¹H et ¹³C sont enregistrés à 500 et 125 MHz respectivement. Le TMS est utilisé comme substance de référence.

V-1-3-2- Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en ESI (Electro-spray ionisation) sur un spectromètre de masse de type Brucker LC-MS/MS type esquire-LC.

V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales, et les caractéristiques optiques des composés. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée.

Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH et AlCl₃ + MeOH sur un spectrophotomètre UVIRON XL du centre de mesure de l'université de Strasbourg (France). Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution.

V-1-3-4- Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres IR ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr, sur un appareil à transformée de fourrier JASCO (FT/IR-4100), du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de l'université de Batna.

V-1-3-5- Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique perkin-Elmer 241 à 20 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm). La cuve employée est de 1 ml et une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

V -1-4- Etude de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

V -1-4-1- Extraction de l'espèce *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

Les parties aériennes de la plante (800 g) sont séchées et broyées finement puis mises à macérer dans un mélange (EtOH/H₂O:70/30). Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures. Après filtration et concentration non à sec à température 40 °C, la phase aqueuse obtenue (800 ml) est extraite 3 fois par l'éther de pétrole (3 x 400 ml), dichlorométhane (3 x 400 ml), acétate d'éthyle (3 x 400 ml), et en dernier le *n*-butanol (3 x 400 ml).

Les quatre phases organiques ainsi obtenues (EP, CH₂Cl₂, AcOEt et *n*-BuOH) sont séchées sur sulfate de magnésium (MgSO₄) anhydre puis filtrées, concentrées à sec sous pression réduite, ce qui a donné 3,10 g de l'extrait éther de pétrole, 5,80 g de l'extrait dichlorométhane, 4,70 g de l'extrait acétate d'éthyle et 27,64 g de l'extrait *n*-butanol.

V -1-4-2- Contrôle chromatographique

Une analyse chromatographique sur couche mince CCM a été réalisée sur les quatre extraits obtenus précédemment, en utilisant le système d'élution (CHCl₃/MeOH). Les profils CCM de ces extraits montrent que les deux extraits CH₂Cl₂ et AcOEt sont presque identiques et riches en produits relativement séparables (Figure V-1).

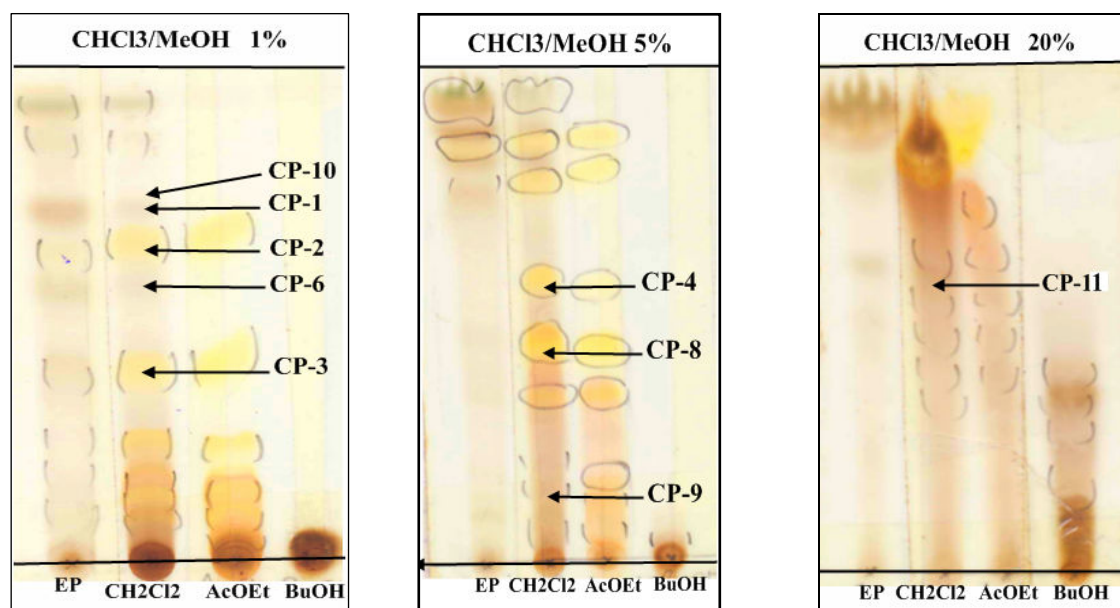


Figure V-1: CCM des extraits bruts de la plante *C. pubescens*

V-1-4-3-Etude de l'extrait CH₂Cl₂ de *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

5,8 g de l'extrait CH₂Cl₂ sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale (58 g) comme phase stationnaire. L'élution est effectuée en premier lieu avec l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (100-0 à 60-40). A l'issue de ce fractionnement primaire, 11 fractions sont recueillies (Tableau 18).

Tableau 18: Fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ de l'espèce *C. pubescens*.

Fractions	Eluant de colonne	Observation sur CCM
1	éther de pétrole éther de pétrole/acétate d'éthyle	Néant
2	99/1	//
3	97/3	//
4	95/5	//
5	//	//
6	93/7	//
7	//	//
8	90/10	//

9	//	//
10	80/20	//
11	80/20	2 taches
12	//	//
13	70/30	//
14	//	3 taches
15	60/40	//
16	50/50	//
17	40/60	4 taches
18	//	//
19	30/70	//
20	//	//
21	20/80	//
22	//	//
23	10/90	//
24	acétate d'éthyle	//
25	//	//
	acétate d'éthyle/Méthanol	
26	99/1	traînée
27	97/3	//
28	95/5	//
29	90/10	//
30	80/20	//
31	70/30	//
32	60/40	//

Ces fractions subissent une chromatographie sur CCM avec les systèmes d'élution suivants : (CHCl₃/MeOH : 99/1) pour les fractions 1 à 16, (97/3) pour les fractions 17 à 26, et (90/10) pour les fractions restantes. Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis révélées à l'acide sulfurique. Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 11 fractions selon le tableau suivant :

Tableau 19: Rassemblement des fractions de l'extrait dichlorométhane.

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
F-1	1	8,9	1 tache
F-2	2-6	43,1	2 taches
F-3	7-8	34,1	3 taches
F-4	9-10	52,2	Plusieurs taches
F-5	11-13	94,3	//
F-6	14	93,0	//
F-7	15-19	1628,0	Plusieurs taches + traînée
F-8	20-22	720,5	//
F-9	23-25	536,5	//
F-10	26-29	957,7	//
F-11	30-32	1560,7	traînée

V-1-4-4-Purification

V-1-4-4-1- Etude de la fraction F-3' = F-3 + F-4

Les deux fractions F-3 et F-4 sont regroupées pour donner F-3' d'une masse égale à 86,3 mg, puis fractionnées sur une colonne de gel de silice SiO₂ 60H (8 g) et éluée avec le chloroforme. Des fractions de 5 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans un mélange de solvants (CHCl₃/MeOH : 99,5-0,5), pour donner 2 fractions (Tableau 20).

Tableau 20: Rassemblement des sous fractions de la fraction F-3'

Sous fractions	fractions	Eluant (colonne)	Poids mg	Observation sur CCM
F-3'-1	3-5	Chloroforme	53,6	Tache + traînée
F-3'-2	6-9	//	14,3	2 taches

La sous fraction F-3'-1 (53,6 mg) purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant le chloroforme, a abouti au composé **CP₁** (12 mg). La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache invisible à 254 nm se révélant en marron à l'acide sulfurique et chauffage (Figure V-2).



Figure V-2: Plaque CCM du produit CP₁

La sous fraction F-3'-2 (14,3 mg) a subi une purification par précipitation dans l'éthanol. Après lavage plusieurs fois par EtOH, le composé **CP₁₀** (4,2 mg) a été isolé à l'état pur. Sa CCM révèle l'existence d'une tache invisible à 254 nm se colorant en violet à l'acide sulfurique et chauffage (Figure V-3).

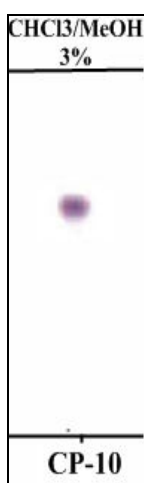


Figure V-3: Plaque CCM du produit CP₁₀

V-1-4-4-2- Etude de la fraction F-6' = F-5 + F-6

Les deux fractions F-5 et F-6 rassemblées en F-6' (187,3 mg) sont purifiées sur une colonne de gel de silice SiO₂ 60H (12 g) et éluée avec CHCl₃/MeOH. Des fractions de 10 ml ont été collectées et réunies selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le (CHCl₃/MeOH : 93/7) pour donner 7 fractions (Tableau 21).

Tableau 21: Rassemblement des sous fractions de la fraction F-6'

Sous fractions	fractions	Eluant (colonne)	Poids mg	Observation sur CCM
F-6'-1	1-6	CHCl ₃	14,3	Tache + traînée
F-6'-2	7	//	10,8	2 taches + traînée
F-6'-3	8-10	//	17,6	2 taches
F-6'-4	11-13	//	25,9	2 taches
F-6'-5	14-19	//	18,9	3 taches
F-6'-6	20-29	//	29,1	3 taches + traînée
		CHCl ₃ /MeOH		
F-6'-7	30-38	1%	47,4	Plusieurs taches

La sous fraction F-6'-4 soumise à une purification sur plaques préparatives de silice en phase inverse RP-18 dans le système d'élution (MeOH/H₂O : 80/20) a conduit au composé **CP₆** (8 mg). La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache invisible à 254 nm se colorant en rose à l'acide sulfurique et chauffage (Figure V-4).

**Figure V-4: Plaque CCM du produit CP₆**

V-1-4-4-3- Etude de la fraction F-8' = F-8 + F-7

Les fractions F-7 et F-8 sont précipitées dans l'éther de pétrole et après filtration on a récupéré (400 mg) d'un précipité jaune F-8' qui est chromatographié sur une colonne de gel de silice en phase normale (15 g). L'élution est effectuée en premier lieu avec CH₂Cl₂ dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétone (100-0 à 90-10). Des fractions de 20 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans un mélange de solvants (CHCl₃/MeOH : 95/5), pour fournir 11 fractions (Tableau 22).

Tableau 22: Rassemblement des sous fractions de la fraction F-8'

Sous fractions	fractions	Eluant (colonne)	Poids mg	Observation sur CCM
F-8'-1	18-46	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ /Acétone	25	1 tache
F-8'-2	47-72	0,5%	52,8	2 taches
F-8'-3	73-94	1%	33,6	2 taches
F-8'-4	95-105	//	30,6	3 taches
F-8'-5	106-116	//	14	3 taches
F-8'-6	117-123	//	35,1	2 taches
F-8'-7	124-128	2%	17,4	3 taches
F-8'-8	129-146	//	30,2	2 taches
F-8'-9	147-180	3%	54,7	2 taches
F-8'-10	181-210	5%	40,3	3 taches
F-8'-11	211-220	10%	50,1	3 taches

La sous fraction F-8'-1 contient un seul produit pur **CP₅** (25 mg). La CCM de ce dernier indique la présence d'une tache visible à 254 nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique.

La sous fraction F-8'-2 (52,8 mg) soumise à une purification sur plaques préparatives de gel de silice normale dans le système d'élution (CHCl₃/MeOH : 95-5) a abouti aux composés **CP₂** (5 mg) et **CP₃** (17 mg). L'examen CCM de chaque produit montre la présence d'une tache visible à 254 nm se colorant en jaune à l'acide sulfurique (FigureV-5).

La sous fraction F-8'-4 (30,6 mg) a subi une purification par précipitation dans le CH₂Cl₂ avec un peu d'acétone. Après lavage plusieurs fois par CH₂Cl₂, le composé **CP₄** (5 mg) a été isolé à l'état pur. Sa CCM révèle l'existence d'une tache visible à 254 nm se colorant en jaune à l'acide sulfurique (FigureV-5).

Les deux sous fractions F-8'-10 et 11 regroupées (90,4 mg) sont soumises à une purification par précipitation dans l'acétone. Après lavage plusieurs fois par le même solvant, on a obtenu le composé **CP₈** (6,5 mg). La CCM de ce dernier montrant une tache visible à 254 nm se révèle en jaune à l'acide sulfurique (FigureV-5).

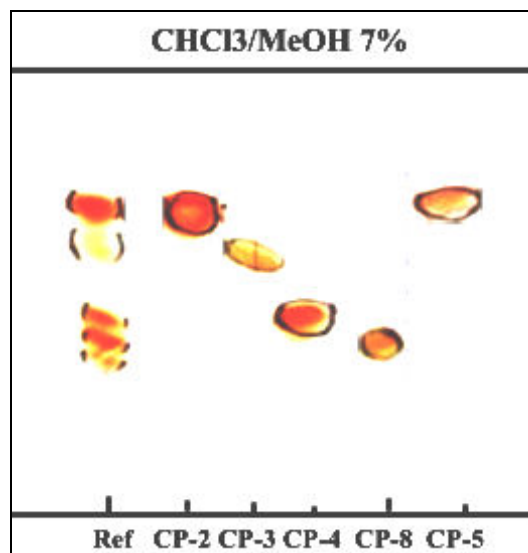


Figure V-5: Plaque CCM des produits CP_{2,3,4,8} et CP₅

Le filtrat des fractions F-7 et F-8 contient un produit majoritaire qui se précipite dans le mélange CH₂Cl₂/Acétone. Après lavage plusieurs fois par le CH₂Cl₂, le composé **CP₉** (10 mg) a été obtenu. La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache visible à 254 nm se révélant en orange à l'acide sulfurique (Figure V-6).



Figure V-6: Plaque CCM du produit CP₉

V-1-4-4-4- Etude de la fraction F-10

La fraction F10 (900 mg) est chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH-20 l'élution est réalisée par le dichlorométhane/méthanol pour donner 6 fractions (Tableau 23).

Tableau 23: Rassemblement des sous fractions de la fraction F-10

Sous fractions	fractions	Eluant (colonne)	Poids mg	Observation sur CCM
F-10-1	1	CH ₂ Cl ₂	241,9	Traînée
F-10-2	2-7	//	176,6	Traînée
F-10-3	8-12	//	90,2	1 tache + traînée
F-10-4	13-26	//	68	Plusieurs taches
		CH ₂ Cl ₂ /MeOH		
F-10-5	27-36	1%	32,2	Plusieurs taches
F-10-6	37-56	3%	94,4	Traînée

Les sous fractions (F-10-4, 5 et 6) sont regroupées (194,7 mg) puis purifiées par précipitation dans l'acétone pour donner le composé **CP₁₁** (18,5 mg). La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache invisible à 254 nm se colorant en rose à l'acide sulfurique et chauffage (Figure V-7).



Figure V-7: Plaque CCM du produit **CP₁₁**

V-1-5- Composés isolés de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.,

V-1-5-1-Composé CP₂ = CP₅

5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone (Oroxyline A)

Formule brute : C₁₆H₁₂O₅

Poids moléculaire : 284 g.mol⁻¹

Rapport frontal R_f : 0,65 (CHCl₃/MeOH:95/5)

Point de fusion : 219 °C

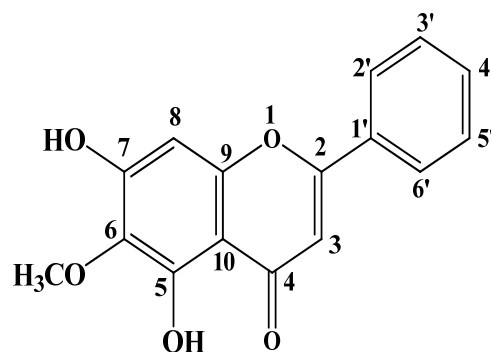
Quantité du produit : 25 mg

Aspect : cristaux jaunes

MS : ESI-MS (mode positif) m/z : 307 [M+Na]⁺
 m/z : 591 [2M+Na]⁺

ESI-MS (mode négatif) m/z : 283 [M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans l'acétone deutérée (Tableau 5, page 55)



V-1-5-2-Composé CP₃

5,7-dihydroxyflavone (Chrysine)

Formule brute : C₁₅H₁₀O₄

Poids moléculaire : 254 g.mol⁻¹

Rapport de frontal R_f : 0,51(CHCl₃/MeOH:95/5)

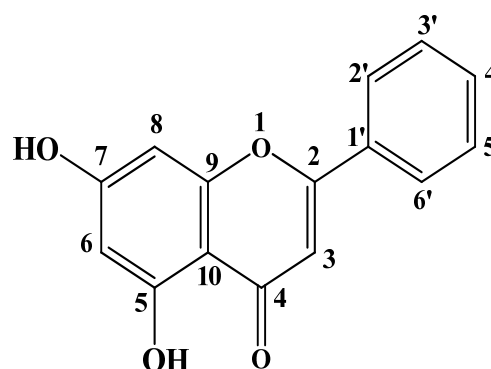
Point de fusion : 206 °C

Quantité du produit : 17 mg

Aspect : cristaux jaunes

MS : ESI-MS (mode négatif) m/z : 253 [M-H]⁻
 m/z : 507 [2M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans l'acétone deutérée (Tableau 7, page 62)



V-1-5-3-Composé CP₄

5,7,2'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (Ténaxine II)

Formule brute : C₁₆H₁₂O₆

Poids moléculaire : 300 g.mol⁻¹

Rapport frontal R_f : 0,64 (CHCl₃/MeOH:93/7)

Point de fusion : 271 °C

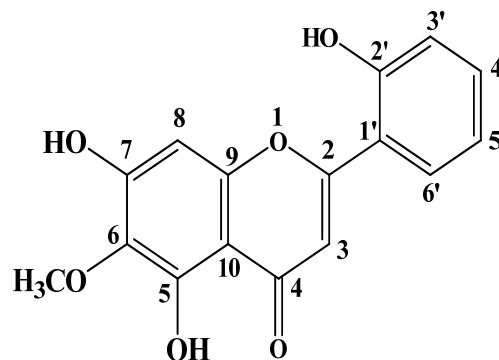
Quantité du produit : 5 mg

Aspect : cristaux jaunes

MS : ESI-MS (mode positif) m/z : 323 [M+Na]⁺
 m/z : 623 [2M+Na]⁺

ESI-MS (mode négatif) m/z : 299 [M-H]⁻
 m/z : 599 [2M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
CD₃OD (Tableau 9, page 71)



V-1-5-4-Composé CP₈

5,7,2'-trihydroxyflavone

Formule brute : C₁₅H₁₀O₅

Poids moléculaire : 270 g.mol⁻¹

Rapport frontal R_f : 0,53 (CHCl₃/MeOH:93/7)

Point de fusion : 258 °C

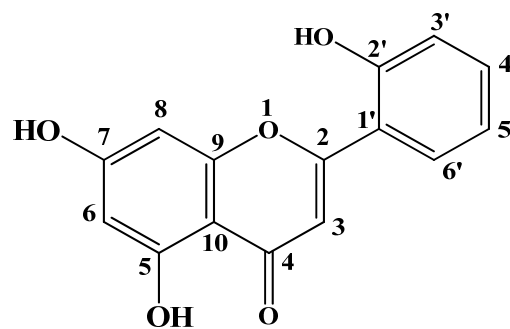
Quantité du produit : 6,5 mg

Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) m/z : 293 [M+Na]⁺
 m/z : 563 [2M+Na]⁺

ESI (mode négatif) m/z : 269 [M-H]⁻
 m/z : 539 [2M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(MeOD-CDCl₃) (Tableau 10, page 79)



V-1-5-5-Composé CP₉

5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol (Quercétine)

Formule brute : C₁₅H₁₀O₇

Poids moléculaire : 302 g.mol⁻¹

Facteur frontale R_f : 0,46 (CHCl₃/MeOH:80/20)

Point de fusion : 316,3 °C

Quantité du produit : 10 mg

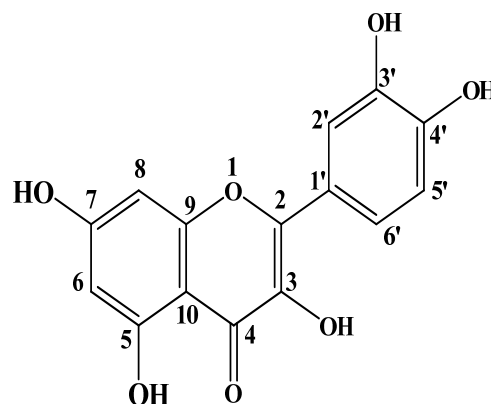
Aspect : poudre jaune

MS : ESI (mode négatif) *m/z* : 301,0 [M-H]⁻

m/z : 603 [2M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans

MeOD (Tableau 12, page 86)



V-1-5-6-Composé CP₆

24-éthylcholest-5-èn-3-ol (β-sitostérol)

Formule brute : C₂₉H₅₀O

Poids moléculaire : 414 g.mol⁻¹

Rapport frontal R_f : 0,55 (CHCl₃/MeOH:97/3)

Point de fusion : 136,4 °C

Pouvoir rotatoire : [α]_D = -30° (C= 0,8, CHCl₃)

Quantité du produit : 8 mg

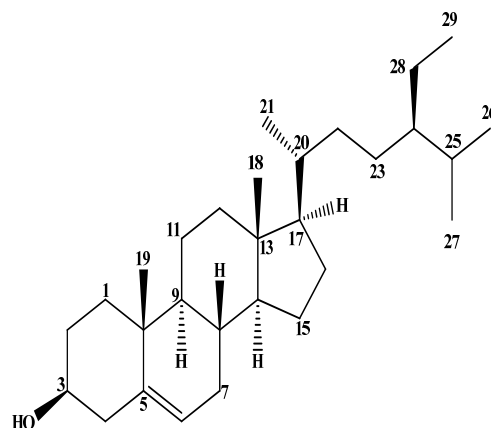
Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 437 [M+Na]⁺

ESI (mode négatif) *m/z* = 413 [M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans

CDCl₃ (Tableau 13, page 96)



V-1-5-7-Composé CP₁₁

β -sitostérol-D (+) glucopyranosyle (Daucostérol)

Formule brute : C₃₅H₆₀O₆

Poids moléculaire : 576 g.mol⁻¹

Rapport frontale R_f : 0,59 (CHCl₃/MeOH: 85/15)

Point de fusion : 285,2 °C

Pouvoir rotatoire : [α]_D = -41,5 (C = 0,4, MeOH)

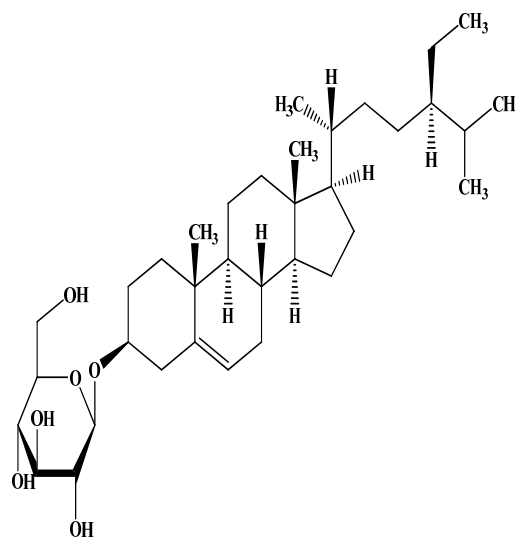
Quantité du produit : 18,5 mg

Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) m/z : 599 [M+Na]⁺
 m/z : 1175 [2M+Na]⁺

ESI (mode négatif) m/z = 575 [M-H]⁻
 m/z = 1151 [2M-H]⁻

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
MeOD-CDCl₃ (Tableau 14, page 101)



V-1-5-8-Composé CP₁

Lup-20(29)-èn-3-ol (Lupéol)

Formule brute : C₃₀H₅₀O

Poids moléculaire : 426 g.mol⁻¹

Facteur frontale R_f : 0,62 (CHCl₃/MeOH:97/3)

Point de fusion : 215-216 °C

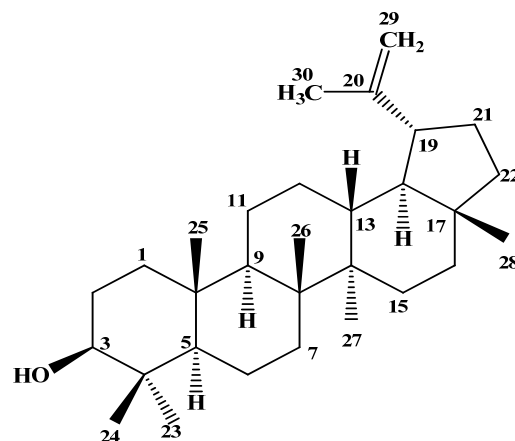
Pouvoir rotatoire : [α]_D +26,4° (C = 0,4, CHCl₃)

Quantité du produit : 12 mg

Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) m/z : 449 [M+Na]⁺
 m/z : 875 [2M+Na]⁺

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
CDCl₃ (Tableau 15, page 111)



V-1-5-9-Composé CP₁₀

18 α , 19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol (Taraxastérol)

Formule brute : C₃₀H₅₀O

Poids moléculaire : 426 g.mol⁻¹

Facteur frontale R_f : 0,62 (CHCl₃/MeOH:97/3)

Point de fusion : 225-226 °C

Pouvoir rotatoire : [α]_D = +95° (C = 0,36, CHCl₃)

Quantité du produit : 4,2 mg

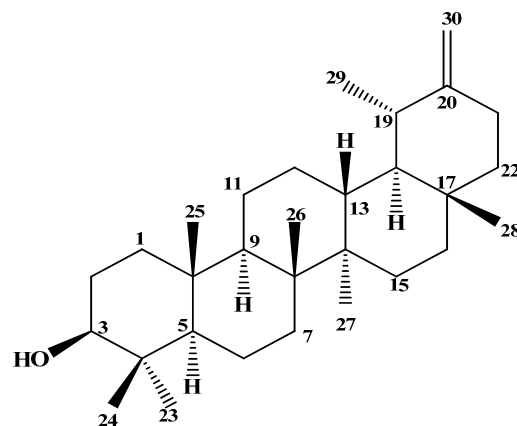
Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) m/z : 425 [M-H]⁺

m/z : 851 [2M-H]⁺

RMN¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans

CDCl₃ (tableau 16, page 117)



Partie biologie:

Activités biologiques

V-2-MATÉRIEL ET MÉTHODE

V-2-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de parties aériennes de la plante *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt.

V-2-2- Activité anti-bactérienne

V-2-2-1-Matériel biologique

V-2-2-1-1- Les germes testés

Le support bactérien utilisé est composé de quatre souches différentes fournies par le laboratoire de bactériologie médicale «EPH Batna». Il s'agit de :

- deux souches bactériennes à Gram négatif: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922.
- deux espèces à Gram positif: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA).

V-2-2-1-2- Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

➤ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un germe aérobie - anaérobie facultatif ^[146], doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*.

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies. ^[147]. C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales ^[146].

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers ^[147]. Cette bactérie est la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaire, elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers.

V-2-2-2- Méthode

V-2-2-2-1-Préparation de l'extrait végétal

V-2-2-2-1-a- Pulvérisation

Les parties aériennes de *Centaurea pubescens ssp omphalotricha* récoltées, découpées en petits morceaux puis séchées à l'abri du soleil à la température du laboratoire (25 à 30 °C) sont rendues en poudre fine à l'aide d'une broyeuse.

V-2-2-2-1-b- Préparation des extraits organiques de *Centaurea pubescens*

La méthode d'extraction de cette plante a été évoquée dans le premier chapitre (Figure III-2). Les extraits obtenus sont solubilisés dans de l'éthanol pour la réalisation des tests en milieux solides, par la méthode de diffusion ^[145].

V-2-2-2-1-c- Tests de l'activité anti-bactérienne

Pour les essais des activités antibactériennes nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu gélosé de Muller Hinton (MH) en boîtes de Petri. Les milieux sont ensemencés par quelques millilitres de l'inoculum (10^6 UFC/ml pour les espèces bactériennes ^[148] de façon à recouvrir toute la surface gélosée. Les boîtes de pétri sont ensuite mises à sécher. A l'aide d'emporte-pièce stérile ont été effectuées des bandelettes de diamètre (1cm x 2cm), qui recevront chacune de la solution à tester (extraits végétaux, produits purs et éthanol comme témoin). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures.

V-2-2-2-1-d-Lecture des résultats

L'activité anti-bactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du puits contenant l'extrait végétal ou le produit à tester. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité

est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix ^[135,136]. est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (+ +), extrêmement sensible (+ + +), celle ayant un diamètre $D < 8 \text{ mm}$, $9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$, $15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$, $D > 20 \text{ mm}$.

V-2-3- Activité anti-oxydante

Dans notre laboratoire, le test chimique employé pour évaluer l'activité antioxydante sur CCM des extraits bruts et produits purs isolés, est basé sur le principe de capture des radicaux libres fournis par le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres (anti-oxydant), sa couleur disparaît.

Au cours du screening général les extraits ont été déposés sur plaque de silicagel 60 F254 avec un support en aluminium. Le développement des plaques a été fait selon les conditions standard des extraits bruts décrites au chapitre III. Les CCM ont été séchées puis révélées avec une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml. En présence de composés antioxydants, le DPPH est réduit en passant du pourpre au jaune ; le temps optimal de réaction est de 30 min.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Norris, S., 1999. La résistance aux antibiotiques. Gouvernement du Canada, Division des sciences et de la technologie.
- [2] Jansen, W. T., Van Der Bruggen, J. T., Verhoef, J., Fluit, A. C., 2006. Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. Drug resistance updates. 9, 123-133.
- [3] Magee, J. T., Pritchard, E. L., Fitzgerald, K. A., Dunstan, F. D., Howard, A. J., 1999. Antibiotic prescribing and antibiotic resistance in community practice: retrospective study. B. M. J. 319, 1239-40.
- [4] Berge, A. C., Atwill, E. R., Sisco, W. M., 2003. Assessing dynamics of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. Prev. Vet. Med. 61, 91-102.
- [5] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [6] Mishio, T., Houma, T., Iwashina, T., 2006. Yellow flavonoids in *Centaurea ruthencia* as flower pigments. Biochemical systematics and ecology. 34, 180-184.
- [7] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Edition; Science et technologie. p 398.
- [8] Bayer, R. J., Starr, J. R., 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences. 85, 242-256.
- [9] Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L., 2006. Flora of north America – Asteraceae. 19, 3-69.
- [10] Usher, G., 1966. A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science, and statistics. Constable & Co Ltd, London.
- [11] Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibis Press.
- [12] Ali, B., Samir, B., Joel, C., Geneviève, P., Jaime, B., Francisco, L., Fadila, B., 2005. A New guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. Biochemical systematics and ecology. 33, 1061-1065.

- [13] Ramdane, S., Ouahiba, B., Ratiba, M., Samir, B., Paul, M., José, Q., Francisco, E., Francisco, L., Jaime, B., Fadila, B., 2009. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry*. 2, 114–118.
- [14] Mohammad, S., Stephen, M., Yashodharan, K., Marcel, J., Lutfun, N., Paul, K., Hossein, N., Satyajit, S., 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*. 67, 2370–2375.
- [15] Kosaku, T., Akiko, O., Shinomi, S., Daisuke, F., Atsuko, T., Yumi, K., Mayumi, Y., Masaaki, S., 2005. Components of protocyanin, a blue pigment from the blue flowers of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry*. 66, 1607–1613.
- [16] Canan, K., Erdal, B., Rahul, P., Sura, B., Ikhlas, K., 2007. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry*. 68, 609–615.
- [17] Ribeiro, N. L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir-Babayev, N., Sarker, S. D., 2002. Flavonoid C-glycosides and a lignan from *Centaurea macrocephala*. *Biochemical systematics and ecology*. 30, 1097–1100.
- [18] Guido, F., Maria, P., Ivano, M., Kuddisi, E., Huseyin, D., Yavuz, B., Mustafa, K., 2002. Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry*. 61, 433–437.
- [19] Sezgin, C., Sergio, R., Antonella, M., Rosa, A., Ismet, U., Wanda, K., Klaudia, M., Maurizio, B., 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*. *Biochemical systematics and ecology*. 34, 349–352.
- [20] Mohammad, S., Stephen, M., Marcel, J., Jioji, T., Lutfun, N., Paul, K., Satyajit, S., 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.
- [21] Satyajit, S., Laurence, D., 1998. Moschamide: An unusual alkaloid from the seeds of *Centaurea moschata*. *Tetrahedron*. 39, 1421–1424.
- [22] Isabel, F., José, P., Esther, P., 1994. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifera*. *Phytochemistry*. 38, 655–657.
- [23] Kamel, M., Fadila, B., Samir, B., Salah, A., Nadra, K., Paul, A., 1997. Guaianolide from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry*. 45, 1449–1451.
- [24] Sevil, O., Sema, S., 1997. Triterpenoides of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry*. 46, 545–548.

- [25] Guido, F., Elena, A., Ivano, M., 2001. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*. 57, 559–564.
- [26] Maurizio, B., Sergio, R., Antonella, M., Rosa, A., Nelly, A., 2005. Guaianolides from *Centaurea babylonica*. *Biochemical systematics and ecology*. 33, 817-825.
- [27] Samah, D., Anastasia, K., Marina, S., Catherine, K., Helen, S., 2008. A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 16, 3725–3731.
- [28] Berrin, O., Ilhan, G., Taner, K., Erdem, Y. 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological research*. 164, 545-552.
- [29] Vlatka, V., Nina, T., Marina, R., Vele, T., Borislav, T., Pedja, J., Petar, M., Slobodan, M., 1999. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. *Phytochemistry* 52, 383-386
- [30] Kamel, M., Fadila, B., Samir, B., Salah, A., Mohamed, K., Francois, T., Elisabeth, S., 1998. Eudesmanolide from *Centaurea granata*. *Phytochemistry*. 49, 2425-2427.
- [31] Maurizio, B., Maria, P., Thomas, G., Werner, H. 1995. Sesquiterpene lactone and other constituents of *Centaurea nicaensis*. *Phytochemistry*. 41, 335-336.
- [32] Diaa, Y., August, F., 1996. Circular dichroism of C-7, C-6 trans-fused guaianolides of *Cenraurea scoparia*. *Phytochemistry*. 41, 1107-1111.
- [33] Antoaneta, T., Milka, T., Svetlana, B., 2007. Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*. *Biochemical systematics and ecology*. 35, 544-548.
- [34] Lhuillier, A., 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* hook. F. Ex. oliver, *Agauria polyphylla* baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* baker (Monimiaceae) & *Embelia concinna* baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Université Toulouse, France.
- [35] Heller, W., Forkmann, G., 1993. Biosynthesis of favonoids. In the flavonoids advances in research since 1986. Harborne J. B. Ed. Chapman & Hall. London.
- [36] Harborne, B., 1988. The flavonoids, advances in research since 1980. Chapman & Hall. London.
- [37] Chebil, L., 2006. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Industries alimentaires. Thèse de Doctorat. Université Nancy, France.

- [38] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65, 337-353.
- [39] Pietta, P., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63, 1035-1042.
- [40] Hollman, P., 2001. Evidence for health benefits of plant phenols. Local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture*. 81, 842-852.
- [41] Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. Y., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., Man, R. K., 2007. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*. 68, 1179–1188.
- [42] Simonsen, J., Ross, W., 1957. *The Terpenes V*. Cambridge Univ. Press, London.
- [43] Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. (3). Techniques et documentation, Paris.
- [44] Dey, P. M., Harborne, J. B., 1991. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 7, Terpenoids. Academic press.
- [45] Manitto, P., 1981. *Biosynthesis of natural products*. John willey & sons. New york. 235.
- [46] Dewick, P. M., 1999. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compound. *Nat. Prod. Rep.* 16, 97-130.
- [47] Mc castill, D., Croteau, R., 1998. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Tibtech*. 16, 348-355.
- [48] Schulte, A. E., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 1999. Microplate enzyme-coupled assays of mevalonate and phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* suspension cultured cells. *Anal. Biochem.* 269, 245-254.
- [49] Bonanno, J. B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M. J., Ilyin, V., Gerchman, S. E., Kycia, H., Studier, F. W., Sali, A., Burley, S. K., 2001. Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12896-12901.
- [50] Sharkey, T. D., Yeh, S., 2001. Isoprene emission from plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 407-436.
- [51] Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., Gravalos, D. G., 1997. Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. *Fitoterapia*. 68, 281-283.

- [52] Ya-Lun, S., Lai, K. L., Yu-Rong, B., Yu, H., Zhen-Yu, C., 2000. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Scutellaria rehderiana*. J. A. C. S. 77, 807–812.
- [53] Yang, H., Yong, Y., Qi-Dong, Y., Wei, L., Hong-Yan, G., Li, Z., Kun, Z., Wei, W., Xiao-Tang, W., Qing-Long, G., 2006. Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in its antitumor activity. Biochemical and biophysical. 351, 521–527.
- [54] Hua-Bin, L., Feng, C., 2005. Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. Chromatography A. 1074, 107–110
- [55] Voirin, B., 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-methoxy-flavones with mono-(4'), di-(3'-4') or tri (3',4'-5')-substituted B rings. Phytochemistry. 22, 2107-2145.
- [56] Tesevic, V., Djokovic, D., Vajs, V., Marin, P., Milosavljevic, S., 1994. Constituents of the roots of plant species *Centaurea scabiosa*. Chemical society. 59, 979-981.
- [57] Sathivelu, J., Senapathy, G. J., Devaraj, R., Namasivayam, N., 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. Journal of pharmacy and pharmacology. 61, 809-17.
- [58] Cho, H., Yun, C., Park, W., Kong, J., Kim, K. S., Park, Y., Lee, S., Kim, B., 2004. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and INOS, by chrysin derivatives. Pharmacological research. 49, 37-43.
- [59] Uhl, M., Ecker, S., Kassie, F., Lhoste, E., Chakraborty, A., Mohn, G., Knasmueller, S., 2003. Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B(a)P) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. Archives of toxicology. 77, 477-484.
- [60] Michael, S. Y., Huena, K., Justin, W. C., Leunga, E., Roland, B., Tze-Fei, W., Hong, X., 2003. Naturally occurring 20-hydroxyl-substituted flavonoids as high-affinity benzodiazepine site ligands. Biochemical pharmacology. 66, 2397–2407.
- [61] Hu, B. H., Liu, Y. L., Zhang, T., Song, W. Z., 1990. Studies on the structure of scuteamoenin from the root of *Scutellaria amoena*. Inst. Med. Plant. 25, 302-306.

- [62] Yukinori, M., Takumi, M. K., Yaguchi., Haruhisa, K., 2006. Studies on the constituents of *Scutellaria* species (XXI). Constituents of the leaves of *Scutellaria strigillosa* Hemsley. J. Nat. Med. 60, 157-158.
- [63] Yukinori, M., Eiji, H., Haruhisa, K., Tsuyoshi, T., 2006. Studies on the constituents of *Scutellaria* species (XXII). Constituents of the roots of *Scutellaria amabilis* Hara. Chem. Pharm. Bull. 54, 435-441.
- [64] Mativandlela, S. P. N., Meyer, J. J. M., Hussein, A. A., Houghton, P. J., Hamilton, C. J., Lall, N., 2008. Activity against mycobacterium smegmatis and M. tuberculosis by extract of South African medicinal plants. Phytotherapy research. 22, 841-845.
- [65] Kijima, T., Iinuma, M., Mizuno, M., Tokuda, H., 1993. Tumor promoter inhibitors containing flavonoids. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 9.
- [66] Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T. 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. Bioorganic & Medicinal chemistry. 15, 1749-1770.
- [67] Seghiri, R., 2006. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*: *C. africana*, *C. niceansis*. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- [68] Fabre, N., Rustan, I., De Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. Journal of the American society for mass spectrometry. 12, 707-715.
- [69] Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B., 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. Berlin.
- [70] Kamanzi, K., Raymond, J., Voirin, B., 1982. Plante Med. Phytother. 16, 30-33.
- [71] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin, F., 2003. Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. Chemistry of natural compounds. 39, 219-220.
- [72] Negrett, R. E., Lator, I., Backhouse, N., Pena, R., Delporte, C., 1988. Plant Med. Phytother. 22, 1-10.
- [73] Servettaz, O., Colombo, M. L., De Bernardi, M., Uberti, E., Vidari, G., Vita-Finzi, P., 1984. Flavonol glycosides from *Dryas octopetala*. Journal of natural products. 47, 809-814.

- [74] Zhuo, C., Yu-Mei, L., Song, Y., Bao-An, S., Guang-Fang, X., Pinaki, S., Lin-Hong J., De-Yu, H., Fang, L., Wei, X., Xia, Z., 2008. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L.) Meeb. Bioorganic & medicinal chemistry. 16, 1337–1344.
- [75] Mc Anlis, G. T., Mc Eneny, J., Pearce, J., Young, I. S., 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. Eur. J. Clin. Nutr. 53, 92-96.
- [76] Tarayre, J. P., Lauressergues, H., 1977. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid anti-inflammatory agents. Arzneimittel forschung. 27, 1144-1149.
- [77] Thornhill, S. M., Kelly, A. M., 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. Altern. Med. Rev. 5, 448-454.
- [78] Janssen, K., Mensink, R. P., Cox, F. J., Harryvan, J. L., Hovenier, R., Hollman, P. C., Katan, M. B., 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. Am. J. Clin. Nutr. 67, 255-262.
- [79] Vlatka, V., Nina, T., Marina, R., Vele, T., Borislav, T., Pedja, J., Petar, M., Slobodan, M., 1999. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. Phytochemistry. 52, 383-386.
- [80] David, W., Robert, A., Norton, C., Mabry, B., 1992. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C] Mevalonates. Phytochemistry. 31, 805-811.
- [81] Dae-Sup, P., Choi, S. Z., Ran, K. K., Mee, L. S., Ro, L. K., Suhkneung, P., 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. Journal of applied pharmacology. 11, 1-4.
- [82] Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., 2001. A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. Phytochemistry. 58, 1229-1233.
- [83] Kun-Young, P., Jung, K. O., Rhee, S. H., Yung, H. C., 2003. Antimutagenic effects of *Doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. Mutation research. 523-524.
- [84] Klippel, K. F., Hiltl, D. M., Schipp, B., 1997. A multicentric placebocontrolled, double-blind clinical trial of β -sitosterol for the treatment of benign prostate hyperplasia. British journal of urology. 80, 427-432.
- [85] Mahato, S. B., Kundu, A. P., 1994. ¹³C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. Phytochemistry. 37, 1517-1575.

- [86] Meselhy, M. R., Aboutabl, E. S. A., 1997. Hopane-type saponins from *Polycarpon succulentum* growing in Egypt. *Phytochemistry*. 44, 925-929.
- [87] Endale, A., Wray, V., Murillo, R., Schmidt, P. C., Merfort, I., 2005. Hopane-type saponins from the seeds of *Glinus lotoides*. *Journal of natural products*. 68, 443-446.
- [88] Culioli, G., Mathe, C., Archier, P., Vieillescazes, C., 2003. A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry*. 62, 537-541.
- [89] Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., 2001. Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochemical systematics and ecology*. 30, 1051-1054.
- [90] Agarwal, R. B., Rangari, R. B., 2003. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of lupeol and 19a-H lupeol isolated from *Strobilanthus callosus* and *Strobilanthus ixiocephala* roots. *Indian journal of pharmacology*. 35, 384-387.
- [91] Graziella, P., Claudino, Juliana, B., Simões Ivo, J. C., Vieira Raimundo, B., Leda, M., 2009. Chemical constituents and lethality of *Paullinia weinmanniaefolia* (Sapindaceae) against *Artemia salina* Leach. *Brazilian journal of pharmacognosy*. 19, 26-28.
- [92] Ankita, W., Pranay, W., Rai, A. K., Kanwal, R., Basavaraja, H. S., 2010. Isolation and modification of pseudohybrid plant (Lupeol). *Pharm. Sci. & Res*. 2, 13-25.
- [93] Charrouf, Z., Guillaume, D., 1998. Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels: A review. *Phytochemistry*. 4, 1-9.
- [94] Ongoka, P. R., Banzouzi, J. T., Poupat, C., Ekouya, A., Ouamba, J., Moudachirou, M., 2008. Steroids isolated from *Millettia versicolor* Baker (Fabaceae). *African journal of biotechnology*. 7, 1727-1730.
- [95] Damak, N., Ghorbel, H., Bahroun, A., Damak, M., Mc Killop, A., Simmonds, M., 2000. Contribution to structural investigation of *Centaurea dimorpha* compounds. *Journal de la société chimique*. 4, 653-658.
- [96] Baba, K., Abe, S., Mizuno, D., 1981. Antitumor activity of hot water extract of dandelion, *Taraxacum officinale* correlation between antitumor activity and timing of administration. 101, 538-543.
- [97] Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T., 1996. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. 43, 1255-1260.

- [98] Farnsworth, N. R., Kass, C. J., 1986. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. *Bulletin de l' OMS*. 66, 159.
- [99] Moerman, D. E., Estabrook, G. F., 2003. Native Americans choice of native species for medicinal use is dependent on plant family: confirmation with meta-significance. *Journal ethnopharmacology*. 87, 51-60.
- [100] Jones, N. P., Arnason, J. T., Abou-Zaid, M., Akpagana, K., Sanchez-Vindas, P., Smith, M. X., 2000. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by first nations peoples of eastern Canada. *Journal of ethnopharmacology*. 73, 191-198
- [101] Cordell, G. A., Shin, Y. G., 1999. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. *Pure and applied chemistry*. 71, 1089-1094
- [102] Colegate, S. M., Molyneux, R. J., 1993. *Bioactive natural products-detection, isolation, and structural determination*. CRC Press, New-York. 528.
- [103] Cox, P. A., 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. In Prance, G. T. *Ethnobotany and the search for new drugs*. Wiley, Chichester [Ciba Foundation Symposium 185]. 25-41.
- [104] Projan, S. J., 2003. Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery?. *Curr. Opin. Microbiol*. 6, 427-430.
- [105] Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., Edwards, J. E. J., 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis*. 38, 1279-86.
- [106] Brown, E. D., Wright, G. D., 2005. New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chemical reviews*. American chemical society. 105, 759–774.
- [107] Shah, A., Cross, R.F., Palombo, E. A., 2004. Identification of the antibacterial component of an ethanolic extract of the Australian medicinal plant, *Eremophila duttoni*. *Phytotherapy Research*. 18, 615-618.
- [108] Hahn, M. W., Lunsdorf, H., Wu. Q., Schauer, M., Hofle, M. G., Boenigk, J., Stadtler, P., 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 1442-1451.
- [109] Leyral, G., Vierling, E., 2007. *Microbiologie et toxicologie des aliments*. Biosciences et techniques. 27-29.

- [110] Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H., Setlow, P., 2000. Resistance of bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol.* 64, 548–72.
- [111] Corvec, S., 2009. Anatomie fonctionnelle bactérienne. La paroi bactérienne. Laboratoire de bactériologie, UFR de médecine, Nantes. p 32.
- [112] Mueller, J. H., Hinton, J., 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48, 330-333.
- [113] Nevot, P., Phillipon, A., Paul, G., 1979. Agents antibactériens: antibiotiques, anti-biomimétiques, in pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique. Expansion scientifique Française, 1^{ère} ed. Tome 2, 1223-1234.
- [114] Igor, L. B., 2002. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo* Lam. (Rutaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie, Bamako, Mali.
- [115] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
- [116] Anthoni, J., 2007. Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes. Thèse de Doctorat. Université MC Gill, Canada.
- [117] Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L., 1997. Antioxydant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749-760.
- [118] Manach, C., Regerat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., Remesy, C., 1996. Bioavailabilité, métabolisme et impact physiologique de 4-oxo-flavonoïdes. *Nutrition research.* 16, 517-544.
- [119] Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., Trinajstić, N., 2007. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry.* 14, 827-845.
- [120] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. 13, 572.
- [121] Van, A. S., Van, D. B. D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Vanbennekom, W. P. V., Van, W. J. F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol.* 20, 331-342.
- [122] Luhata, P., 2004. L'étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea*. Thèse de Doctorat. Université de Lubumbashi, République démocratique du Congo.
- [123] Mahato, S., Nandy, A. K., Roy, G., 1992. Triterpenoids. *Phytochemistry*, 31, 2199-2249.

- [124] Mahato, S., Sucharita, S., 1997. Advances in triterpenoids research, 1990-1994, *Phytochemistry*. 44, 1185-1236.
- [125] Pezzuto, J. M., 1995. Natural product cancer chemopreventive agents, *Phytochemistry of medicinal plant*, Plenum press, New York, 19-45.
- [126] Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S., Lee, K. H., 1994. Anti-aids agents. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of natural products*. 57, 243-247.
- [127] Miles, D. H., Kokpol, U., Zalkow, L. H., Steindel, S. J., Nabors, J. B., 1974. Tumor inhibitors I: Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of pharmaceutical sciences*. 63, 613-615.
- [128] Milane, H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat. Strasbourg, France.
- [129] Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., Sun, X., 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*. 81, 686-692.
- [130] Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., Pohlman, F. W., 2006. The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*. 73, 413-421.
- [131] Gangoué piéboji, J., 2007. Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Liège, France.
- [132] Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Corke, H., 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J. Food microbiology*. 117, 112-119.
- [133] Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., Barrett, J. F., 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 3, 225-230.
- [134] Sato, M., Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S., Iinuma, M., 1995. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res*. 9, 509-12.

- [135] Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S. I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of food science and technology*. 36, 679-684.
- [136] Duraffourd, C. D., Hervicourt, L., Lapraz, J. C., 1990. *Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Eléments thérapeutiques synergiques*. 2^{ème} Edition. Masson (Paris). 87.
- [137] Sanchez-Moreno, C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International journal of food science and technology*. 8, 121-137.
- [138] Guesmi, A., Boudabous, A., 2006. Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des régions arides*. 224-230.
- [139] Hayouni, E. A, Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*. 105, 1126-1134.
- [140] Ali Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M. R., Faidi, Y. R., Salem, K., Al Nuri, M., 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*. 60, 265-271.
- [141] Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools. Thèse de Doctorat. Université de Limoges, France.
- [142] Mekiou, R. 2004. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Genista* (Fabaceae): *G. saharae*, *G. fero*. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri Constantine, Algérie.
- [143] Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V., 2007. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. 12, 593-606.
- [144] Li, J., Jiang, Y., 2007. Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity. *Molecules*. 12, 745-758.
- [145] Hmamouchi, J., 2002. Contribution à l'étude chimique et antimicrobienne de 94 plantes médicinales marocaines et valorisation pharmacologique d'*Origanum compactum* (Beneth.). thèse de doctorat. Université mohamed V-Souissi rabat, Maroc.

- [146] Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., 2000. Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. Ellipses (Ed.) Paris, 602.
- [147] Nauciel, C., 2000. Bactériologie médicale. Masson (Ed.).Paris, 276.
- [148] Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Choutet, P., Courvalin, P., Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Goldstein, F., Jarvalier, V., LeclercQ, R., Nicolas-Chanoine, M. H., Philipon, A., Quentin, C., Rouveix, B., Sirot, J., Soussy, C. J., 2006. Communiqué du comité français de l'antibiogramme. Société française de microbiologie.

LISTE DES FIGURES

Figure I-1	Taxonomie des Asteraceae.....	5
Figure II-1	Structure de base des flavonoïdes.....	27
Figure II-2	Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine.....	28
Figure II-3	Schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales classes des flavonoïdes.....	29
Figure II-4	Les diverses classes de flavonoïdes.....	30
Figure II-5	Formation du squalène.....	36
Figure II-6	Schéma de biogenèse des triterpènes tétra- et pentacycliques.....	37
Figure-III-1	<i>Centaurea pubescens</i> Willd.ssp d'après Ozenda.....	38
Figure III-2	Schéma général d'extraction des parties aériennes de <i>C. pubescens</i>	40
Figure III-3	CCM récapitulative des fractions VLC de l'extrait dichlorométhane de la plante <i>centaurea pubescens</i>	42
Figure III-4	Isolement des composés de l'extrait dichlorométhane de la plante <i>Centaurea pubescens</i>	43
Figure III-5	Spectre UV du composé CP ₂	45
Figure III-6	Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP ₂	46
Figure III-7	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₂	46
Figure III-8	Spectre MS /MS (mode négatif) du composé CP ₂	47
Figure III-9	Spectre RMN ¹ H (500 MHz, Acétone) du composé CP ₂	48
Figure III-10	Spectre HSQC du composé CP ₂	48
Figure III-11	Partie du spectre COSY du cycle B.....	49
Figure III-12	Spectre RMN ¹³ C J-modulé (125 MHz, Acétone) du composé CP ₂ ...	50
Figure III-13	Corrélations HMBC des substituants du noyau A.....	50
Figure III-14	Corrélations HMBC des protons H-8 et H-3.....	51
Figure III-15	Spectre HMBC des noyaux A et C.....	52
Figure III-16	Spectre HMBC du noyau B.....	52
Figure III-17	Partie du spectre HSQC.....	53
Figure III-18	Spectre HMBC du noyau B.....	54
Figure III-19	Spectre IR du composé CP ₃	57

Figure III-20	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₃	57
Figure III-21	Spectre RMN ¹ H (500 MHz, Acétone) des composés CP ₂ (haut) et CP ₃ (bas).....	58
Figure III-22	Spectres RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé (125 MHz, Acétone) des composés CP ₂ (haut) et CP ₃ (bas).....	59
Figure III-23	Spectre HSQC du composé CP ₃	60
Figure III-24	Corrélations COSY du composé CP ₃	60
Figure III-25	Spectre COSY ¹ H- ¹ H du composé CP ₃	61
Figure III-26	Spectre HMBC du composé CP ₃	62
Figure III-27	Formation de complexe AlCl ₃ -flavone.....	63
Figure III-28	Spectre IR du composé CP ₄	64
Figure III-29	Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP ₄	64
Figure III-30	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₄	65
Figure III-31	Spectre MS /MS (mode négatif) du composé CP ₄	65
Figure III-32	Spectre MS /MS (mode négatif).....	66
Figure III-33	Mécanisme de fragmentation du composé CP ₄	66
Figure III-34	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₄	67
Figure III-35	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₄	67
Figure III-36	Etalement du spectre RMN ¹ H du composé CP ₄	69
Figure III-37	Spectre HMBC du composé CP ₄	69
Figure III-38	Corrélations COSY du cycle B.....	70
Figure III-39	Partie du spectre HMBC du composé CP ₄	70
Figure III-40	Spectre UV du composé CP ₈	72
Figure III-41	Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP ₈	73
Figure III-42	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₈	73
Figure III-43	Spectre MS /MS (mode négatif) du composé CP ₈	74
Figure III-44	Spectres RMN ¹ H des composés CP ₄ (haut) et CP ₈ (bas).....	75
Figure III-45	partie du spectre COSY.....	76
Figure III-46	Etalement du spectre RMN ¹ H du composé CP ₈	76
Figure III-47	Spectre HSQC du composé CP ₈	77
Figure III-48	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₈	77
Figure III-49	Spectre HMBC du composé CP ₈	78
Figure III-50	Spectre UV du composé CP ₉	80

Figure III-51	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₉	81
Figure III-52	Spectre MS/MS (mode négatif) du composé CP ₉	81
Figure III-53	Fragmentations du composé CP ₉	82
Figure III-54	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₉	82
Figure III-55	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₉	83
Figure III-56	Spectre HMBC du cycle A.....	83
Figure III-57	Substituant du cycle B du composé CP ₉	84
Figure III-58	Spectre COSY du cycle B.....	84
Figure III-59	Spectre HMBC du cycle B.....	85
Figure III-60	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₆	87
Figure III-61	Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP ₆	88
Figure III-62	Spectre de masse MS/MS (mode positif) du composé CP ₆	88
Figure III-63	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₆	89
Figure III-64	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₆	90
Figure III-65	Corrélations COSY et HSQC du cycle A.....	90
Figure III-66	Couplages du proton H-3.....	91
Figure III-67	Corrélations HMBC du cycle A.....	91
Figure III-68	Corrélations HMBC du cycle B.....	92
Figure III-69	Corrélations COSY du cycle B.....	92
Figure III-70	Corrélations COSY et HMBC du cycle C.....	93
Figure III-71	Corrélation COSY et HSQC du cycle D.....	93
Figure III-72	Corrélations HMBC du cycle E.....	93
Figure III-73	Corrélations COSY de la chaîne latérale du composé CP ₆	94
Figure III-74	Spectre HMBC du composé CP ₆	95
Figure III-75	Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé CP ₁₁	97
Figure III-76	Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé CP ₁₁	98
Figure III-77	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₁₁	98
Figure III-78	Spectre COSY du glucose.....	99
Figure III-79	Spectre HMBC du composé CP ₁₁	100
Figure III-80	Principales corrélations HMBC observées pour le composé CP ₁₁	100
Figure III-81	Spectre de masse ESI (mode positif) du composé CP ₁	102
Figure III-82	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₁	103
Figure III-83	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₁	103

Figure III-84	<i>trans</i> -décaldne A/B.....	104
Figure III-85	Corrélations HSQC et COSY du cycle A.....	104
Figure III-86	Configuration β du groupement hydroxyle.....	105
Figure III-87	Corrélations HMBC au niveau du cycle A.....	105
Figure III-88	Corrélations HMBC et COSY observées au niveau du cycle B.....	106
Figure III-89	Corrélations HMBC et COSY du cycle C.....	107
Figure III-90	Partie du spectre HSQC du composé CP ₁	107
Figure III-91	Partie du spectre COSY du composé CP ₁	108
Figure III-92	Spectre HMBC du composé CP ₁	108
Figure III-93	Squelettes hopène et lupène.....	109
Figure III-94	Corrélations COSY des cycles D et E.....	110
Figure III-95	Stéréochimie des centres chiraux du composé CP ₁	110
Figure III-96	Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé CP ₁₀	112
Figure III-97	Spectre RMN ¹ H du composé CP ₁₀	113
Figure III-98	Corrélations HMBC des protons éthylénique gémines H-30.....	114
Figure III-99	Partie du spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé CP ₁₀	114
Figure III-100	Corrélations COSY du composé CP ₁₀	115
Figure III-101	Corrélations HMBC du composé CP ₁₀	115
Figure III-102	Stéréochimie des centres chiraux du composé CP ₁₀	116
Figure VI-1	Structure d'une cellule procaryote (bactérie).....	122
Figure VI-2	Structure de la paroi bactérienne.....	124
Figure VI-3	Stabilisation du radical phénoxy par formation de liaison hydrogène..	125
Figure VI-4	Stabilisation du radical phénoxy par délocalisation électronique.....	126
Figure VI-5	Testes anti-bactériennes sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853..	129
Figure VI-6	Testes anti-bactériennes sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Gram ⁻)...	130
Figure VI-7	Testes anti-bactérienne sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA).....	130
Figure VI-8	Testes anti-bactériennes sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923....	131
Figure VI-9	Forme libre et réduite du DPPH.....	132
Figure VI-10	Testes d'activités anti-oxydante des produits CP-2, 3, 4, 8 et 9.....	133
Figure IV-11	Testes d'activités anti-oxydante des extraits EP, AcOEt, CH ₂ Cl ₂ et BuOH.....	133
Figure V-1	CCM des extraits bruts de la plante <i>C. pubescens</i>	144

Figure V-2	Plaque CCM du produit CP ₁	147
Figure V-3	Plaque CCM du produit CP ₁₀	147
Figure V-4	Plaque CCM du produit CP ₆	148
Figure V-5	Plaque CCM des produits CP _{2, 3, 4, 8} et CP ₅	150
Figure V-6	Plaque CCM du produit CP ₉	150
Figure V-7	Plaque CCM du produit CP ₁₁	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Espèces du genre <i>Centaurea</i>	6
Tableau 2	Composés isolés du genre <i>Centaurea</i>	7
Tableau 3	Rendement de l'extraction... ..	39
Tableau 4	Données spectrales UV du composé CP ₂	45
Tableau 5	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₂ dans l'acétone.....	55
Tableau 6	Données spectrales UV du composé CP ₃	56
Tableau 7	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₃ dans l'acétone.....	62
Tableau 8	Données spectrales UV du composé CP ₄	63
Tableau 9	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₄ dans CD ₃ OD.....	71
Tableau 10	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₈ dans Me-OD/CDCl ₃	79
Tableau 11	Données spectrales UV du composé CP ₉	80
Tableau 12	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₉ dans Me-OH.....	86
Tableau 13	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₆ dans CDCl ₃	96
Tableau 14	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₁₁ dans CDCl ₃ + MeOD.....	101
Tableau 15	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₁ dans CDCl ₃	115
Tableau 16	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) de CP ₁₀ dans CDCl ₃	117
Tableau 17	Résultats de l'activité anti-bactérienne du <i>Centaurea pubescens</i>	132
Tableau 18	Fractionnement de l'extrait CH ₂ Cl ₂ de l'espèce <i>C. pubescens</i>	144
Tableau 19	Rassemblage des fractions de l'extrait dichlorométhane.....	146
Tableau 20	Rassemblage des sous fractions de la fraction F-3'.....	146
Tableau 21	Rassemblage des sous fractions de la fraction F-6'.....	148
Tableau 22	Rassemblage des sous fractions de la fraction F-8'.....	149
Tableau 23	Rassemblage des sous fractions de la fraction F-10.....	151

ملخص

هذا العمل يعتمد على الدراسة الفيتو كيميائية لنبات *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *Omphalotricha* Batt. من عائلة Asreraceae و ذلك تقييم العمل التثبيطي للبكتيريا و النشاط المضاد للتأكسد للمستخلصات الخامة و المركبات المعزولة.

انطلاقا من مستخلص ثنائي كلوروميثان المستخرج من الجزء الهوائي لنبات *C. pubescens* تم عزل تسعة مركبات ايضية ثانوية منها خمسة فلافونويدات، اثنان من الستيرويدات و اثنان من ثلاثي التربينات خماسية الحلقة.

إن عزل و تحديد بنية المركبات المستخرجة يعتمد على استعمال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (CC, VLC, TLC, LH-20) و كذلك بواسطة استخدام طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين المغناطيسي بجميع أنواعها، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و تحت الحمراء، و مطيافية الكتلة و حساب زاوية التدوير النوعي و المقارنة مع الدراسات السابقة .

لقد تم تقييم النشاط المثبط للبكتيريا على اربعة سلالات بكتيرية *Pseudomonas*, *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) *aeruginosa* عن طريق الانتشار في الوسط الصلب كما تم تقييم النشاط المضاد للتأكسد على المستخلصات الخامة، *acétate éther de pétrole*, *dichlorométhane*, *n-butanol d'éthyle* و المركبات المعزولة عن طريق اختبار DPPH.

الكلمات المفتاحية :

فيتوكيمياء, *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., فلافونويدات , ثلاثي التربينات, الرنين المغناطيسي, مطيافية الكتلة, النشاط المثبط للبكتيريا, النشاط المضاد للتأكسد

Abstract

This work has focused on the phytochemical study of the species *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. belonging to the *Asteraceae* family, as well as the evaluation of the anti-bacterial and anti-oxidant activities on the crude extracts and isolated compounds.

From the dichloromethane extract of aerial parts of the species *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. nine secondary metabolites were identified including five flavonoïdes, two steroids and two pentacyclic triterpenes.

The isolation and structure determination of isolated compounds were based on the different chromatographic methods (CC, TLC, LH-20 and VLC), also by physicochemical and spectroscopic technics, such as 1D and 2D NMR (^1H , ^{13}C , *J*-modulated, COSY H-H, HSQC *J*-modulated and HMBC) by mass spectrometry ESI (electrospray ionization), and measurement of rotatory power and comparison with literature data.

The anti-bacterial activity was evaluated on crude extracts (petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol) and compound 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP₈**) against four bacterial strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the diffusion in agar. The anti-bacterial activity of the isolated compound 5,7,2'-trihydroxyflavone **CP₈** and crudes AcOEt and CH_2Cl_2 extracts against Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* (MRSA) were reported. The anti-oxidant activity was estimated on the extracts and the isolated products by the DPPH test.

Keywords: Phytochemistry, *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., Flavonoïdes, Triterpenes, NMR 1D and 2D, Mass spectroscopy, Anti-bacterial activity, Anti-oxidant activity.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. de la famille Asteraceae, ainsi que l'évaluation de l'activité anti-bactérienne et anti-oxydante des extraits végétaux et biomolécules isolées. Cette plante endémique à l'Algérie et la Tunisie, n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique antérieures.

Le fractionnement, la séparation et la purification des biomolécules à partir de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de l'espèce *C. pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt. ont été réalisés par l'utilisation en alternance de diverses méthodes chromatographiques appliquées dans notre laboratoire à savoir :

- la chromatographie liquide sous vide (VLC) de gel de silice.
- la chromatographie sur colonne de gel de silice, polyamide, séphadex.....etc.
- la chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice en phase normale et de gel de silice greffée en C₁₈ en phase inverse.

La détermination structurale des composés isolés est basée sur l'utilisation combinée des différentes techniques physicochimiques et spectroscopiques telles que la RMN 1D et 2D (¹H, ¹³C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC), la spectrométrie de masse ESI (Electrospray ionisation) et la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature. Les biomolécules isolées ont été identifiées aux :

- 4 flavones : Oroxyline A (**CP**₂), Chrysine (**CP**₃), Ténaxine II (**CP**₄) et 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP**₈).
- 1 flavonol : Quercétine (**CP**₉).
- 2 triterpènes pentacycliques à squelette lupane et ursane : Lupéol (**CP**₁) et Taraxastérol (**CP**₁₀) respectivement.
- 2 stéroïdes : β-sitostérol (**CP**₆) et Daucostérol (**CP**₁₁).

L'activité anti-bactérienne des extraits végétaux (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) et la molécule 5,7,2'-trihydroxyflavone (**CP**₈) a été évaluée sur quatre souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) par le biais de la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les souches à Gram positif *Staphylococcus aureu* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ont manifesté une activité à l'égard du composé 5,7,2'-trihydroxyflavone **CP**₈ et les deux extraits AcOEt et CH₂Cl₂. Tous les extraits végétaux et biomolécules isolées ont montré une activité anti-oxydante par le test au DPPH.

Mots clés: Phytochimie, *Centaurea pubescens* Willd. ssp. *omphalotricha* Batt., Flavonoïdes, Triterpènes, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse, Activité anti-bactérienne, Activité anti-oxydante.