UNIVERSITE DE OUARGLA

Faculté Des Sciences
Et Des Sciences De L'Ingénieur
Département des Sciences Physiques

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Chimie Organique
Option : Chimie Organique Appliquée

Par Mebarka BOUZIANE

Thème

Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante : *Cotula cinerea* de la région de Ouargla

Soutenu Publiquement le : / /2002

Devant le Jury Composé de :

Mr DADAMOUSSA Belkhir	M. Conférences, Univ. Ouargla	Président
Mme BISSATI Samia	Docteur d'état, Univ. Ouargla	Examinatrice
Melle CHANEGRIHA Nadjoua	M. Conférences, Univ. Biskra	Examinatrice
Mr HADJ-MAHAMMED Mahfoud	M. Conférences, Univ. Ouargla	Rapporteur
Mr OULD-EL-HADJ-MED Didi	M.A.C.C, Univ. Ouargla	Co-Rapporteur

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur HADJ-MAHAMMED Mahfoud, Maître de Conférences et de Monsieur OULD-EL-HADJ-MOHAMED Didi, Maître Assistant Chargé de cours à l'Université de Ouargla.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements, mon profond respect et sincères considérations pour leurs orientations, encouragements et leur soutien

Pour faire aboutir ce travail de recherche à son terme.

Je remercie sincèrement Monsieur DADAMOUSSA Belkhir, Maître de Conférences à l'Université de Ouargla pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie également Mme BISSATI Samia, Docteur d'état à l'université de Ouargla et Melle CHANEGRIHA Nadjoua, Maître de Conférences à l'Université de Biskra pour avoir accepté de juger ce mémoire et d'y apporter leur contribution scientifique.

Je tiens à remercier à travers Melle CHANEGRIHA Nadjoua, Monsieur Rolando et son équipe pour nous avoir permis de réaliser les couplages en GC-MS et LC-MS de nos échantillons.

Les remarques et conseils de tous les enseignants de post-graduation de l'université de Ouargla m'ont été d'un très grand réconfort, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond respect et grande considération.

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à tous les Enseignants, Etudiants et travailleurs de l'Université de Ouargla, qui ont contribué de prés ou de loin à ma formation scientifique et professionnelle.

Je ne saurais oublier tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et encouragements : N. Slougui, K.Dehak, , A. Douadi, tous les membres de notre laboratoire et tous les camarades de ma promotion, je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.

Cités en derniers mais les premiers dans mon cœur , Je tiens à exprimer mes meilleurs sentiments d'amour et de respect à mes très chers parents, pour leur patience, compréhension, aide et confiance tout au long de mon éducation et ma longue formation en espérant, leur rendre le peu du grand qu'ils m'ont donne, amour et affection .

Je dédie enfin ce modeste travail à mon mari qui m' a toujours épaulé, ma petite fille pour sa compréhension, malgré son age, et à tous mes frères et sœurs.

SOMMAIRE

Introduction : 1

Chapitre I : Généralités

I. 1. Introduction 3
I. 2. Généralités sur les flavonoides 3
I. 2. 1. Structure des flavonoides 3
I. 2. 2. Les flavonoides dans le règne végétal..... 6
I. 2. 3. Les flavonoides dans la famille des composées 6
I. 2. 4. Intérêts et effets biologiques des flavonoides..... 9
I. 3. Représentation du matériel végétal 10
I. 3. 1. Description botanique de l'espèce..... 10
I. 3. 2. Place dans la systématique..... 10
I. 3. 3. Répartition géographique..... 12
I. 3. 4. La composition chimique..... 12
I. 3. 5. Utilisation de la plante 12

Chapitre II: Méthodes d'obtention

II. 1. Introduction..... 13
II. 2. Echantillonnage..... 13
II. 3. Tests phytochimiques préliminaires..... 14
II. 4. Méthodes d'extraction des flavonoides..... 14
II. 4. 1. Extraction selon la méthode de *LEBRETON*..... 14
II. 4. 2. Extraction par l'éthanol (70 %)..... 15
II. 4. 3. Extraction par le méthanol (70%)..... 15
II. 4. 4. Extraction au soxhlet..... 15
II. 5. Résultats et discussions..... 23
II. 6. Partie expérimentale..... 23

Chapitre III: Analyse par CP et CCM

III. 1. Introduction..... 24
III. 2. Résultats et discussions..... 24
III.2.1.Chromatographie sur papier..... 24
III.2.2.Chromatographie sur couche mince..... 25
III. 3. Conclusion 32
III. 4. Partie expérimentale..... 33

Chapitre IV: Analyse par GC-MS
IV.1. Introduction..... 34
IV.2. Partie expérimentale..... 36
IV.3. Résultats et discussions..... 36
IV.4. Conclusion..... 53

Chapitre V : Analyse par LC-UV et LC-MS
V.1. Introduction..... 54
V.2. Résultats et discussions..... 57
V.3. Conclusion..... 67
V.4. Partie expérimentale..... 67

Chapitre VI: Tests biologiques
VI. 1. Introduction..... 69
VI. 2. Méthodologie de travail..... 69
VI. 2. 1. Recherche de l'activité insecticide..... 69
VI. 2. 2. Test de l'activité anti-bactérienne et antifongique..... 70
VI. 3. Résultats et discussions..... 71
VI. 4. Conclusion : 74
VI. 5. Partie expérimentale..... 75

Conclusion générale..... 76

Bibliographie 77

Annexes : 81

Résumé:

La diversité structurale des composés organiques et les diverses applications qui leurs sont attribuées, confère à leur étude et à leur caractérisation une place de choix dans le monde de la recherche. Par ailleurs, leur répartition dans le règne végétal est lié à divers types de paramètres qui va du climat de la région d'étude à l'organe investi pour une même variété de plante.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes proposés de contribuer à l'élaboration de la composition chimique de la plante *Cotula cinerea qui pousse dans la région de Ouargla. Notons qu'on a rencontré très peu de travaux sur cette plante, dans la littérature. Cette plante appartient à l'une des plus vastes familles du règne végétal : Compositae.*
Elle est considérée comme une plante médicinale au vu de ses applications thérapeutiques, citons entre autres son utilisation contre la diarrhée, la toux ....En outre, elle est utilisée dans l'aromatisation du thé et du lait et aussi comme fourrage pour les animaux.

A cet effet, nous avons réalisé sur cette plante quelques tests de caractérisation de quelques familles de composés tels que les flavonoides, les alcaloïdes et les terpènes.
Les extraits au solvant obtenus sont analysés par différentes techniques chromatographiques seules et couplées à la spectrophotométrie UV-Vis et à la spectrométrie de masse.
Les résultats obtenus, caractérisés par l'identification de plusieurs composés ainsi que les tests biologiques, représentent une première étape d'une étude approfondie qui fera l'objet d'une autre thèse.

Mots clés : Cotula cinerea, Terpènes, Flavonoides, Plantes médicinales, CCM, HPLC, LC-MS, GC-MS, Electrospray

Summary:

The structural diversity of the organic compounds and the various applications, which theirs are allotted, confer on their study and their characterisation a place of choice in the world of research. In addition, their distribution in the vegetable kingdom is related to various types of parameters, which goes from the climate of the area of study to the body invested for the same variety of plant.

Within the framework of this work, we proposed to contribute to the development of the chemical composition of the plant Cotula cinerea that pushes in the area of Ouargla. Let us note that one met very few works on this plant, in the literature. This plant belongs to the one of the vastest families of the vegetable kingdom: Compositae. It's regarded as a medicinal plant within sight of its therapeutic applications, as example its use against the diarrhoea, cough.... In addition, it's used in the amortisation of the tea and of milk and also like forages for the animals.

To this end, we carried out on this plant some tests of characterisation of some families of compounds such as flavonoids, alkaloids and terpenes. The extracts with solvent obtained are analysed by various chromatographic techniques coupled-and no coupled with UV spectrophotometry and the mass spectrometry. The results obtained, characterised by the identification of several compounds as well as the biological tests, represent a first stage of a thorough study which will be the another thesis object.

Key words: Cotula cinerea, Terpenes, Flavonoids, medicinal Plants, TLC, HPLC, LC-MS, GC-MS, and Electrospray

Les abréviations

Les solvants organiques :

$(Et)_2O$ (diethyl ether), MeOH (méthanol), EtOH (éthanol), BuOH (n-butanol), AcOEt (acétate d'éthyle), AcOH (acide acétique).

Les dénominations des extraits :

A°, A, B, LB02, sont les extraits des aglycones obtenus respectivement à partir des tiges, feuilles, fleurs, la plante entière, par la méthodes d'extraction de Lebreton (HCl 2N).
Ac1, Ac2,Ac3, sont les extraits des aglycones obtenus respectivement à partir des tiges, feuilles, fleurs, par la méthodes d'extraction par le méthanol 70%.
C, D, E, MC01, sont les extraits des hétérosides obtenus respectivement à partir des tiges, feuilles, fleurs, la plante entière, par la méthode d'extraction par éthanol 70%.
Bu1, Bu2, Bu3, sont les extraits des hétérosides obtenus respectivement à partir des tiges, feuilles, fleurs, par la méthode d'extraction le méthanol 70%.
LX04 est celui obtenu par le Soxhlet.

Les méthodes d'analyse :

CP : chromatographie sur papier.
CCM : chromatographie sur couches minces.
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
HPLC-UV : chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie UV.
ESI : ionisation electrospray.
LC-MS-ESI : chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse par l'ESI.

Liste des tableaux

N°	titres	Page
1	les plus importantes classes des composés phénoliques dans les plantes.	4
2	les plus importants sous groupes flavoniques.	5
3	quelque flavonoides identifiés dans certaines plantes du règne végétale.	7
4	exemples de flavonoides identifiés dans quelques membres de la famille des composées.	8
5	résultats des tests phytochimiques.	16
6	types d'extraction réalisés.	17
7	les rendements d'extraction par l'éther diethylique (HCl 2N).	22
8	les rendements d'extraction par n-butanol (éthanol 70%).	22
9	les rendements d'extraction par l'acétate d'éthyle et le n-butanol (eau/méthanol).	22
10	Fluorescences des composés flavoniques (sans réactifs).	28
11	résultats de la CCM en mode inverse pour les hétérosides.	28
12	résultats de la CCM en mode inverse pour les aglycones.	29
13	résultats de la CCM en mode normal pour les aglycones.	30
14	résultats de la CCM en mode normal pour les aglycones.	31
15	résultats de l'analyse par GC-MS de l'extrait LX 04.	41
16	résultats de l'analyse par GC-MS de l'extrait LB02.	45
17	résultats de l'analyse par GC-MS de l'extrait MC01.	48

Liste des figures

N°	titre	page
1	La plante *Cotula cinerea*.	11
2	Protocole d'extraction par HCl (2N).	18
3	Protocole d'extraction par éthanol 70%.	19
4	Protocole d'extraction par méthanol 70%.	20
5	Protocole d'extraction au Soxhlet.	21
6	Chromatogrammes (CP) des extraits Ac2 et Bu2.	26
7	Exemple d'un système de couplage GC-MS.	35
8	Chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait LX04.	37
9	Chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait LB02.	38
10	Chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait MC01.	39
11	Spectre de masse du Camphre.	52
12	Schéma de fragmentation du Camphre.	
13	Spectre de masse de la Thujone.	53
14	Schéma de fragmentation de la Thujone.	
15	Spectre de masse du 6-(p-tolyl)-2-methyl-2- heptenol.	54
16	Schéma de fragmentation du 6-(p-tolyl)-2-methyl-2- heptenol.	52
17	Schéma d'une source électrospray.	56
18	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, MS), (I), pour l'extrait Ac2.	58
19	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, MS), (II) , pour l'extrait Ac2.	59
20	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, ESI^+, ESI^-), (I), pour l'extrait D.	60
21	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, ESI^+, ESI^-), (II), pour l'extrait D.	61
22	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, MS), (III) , pour l'extrait Ac2.	62
23	Chromatogramme obtenu par LC-(UV, MS), (III) , pour l'extrait B.	63
24	Spectre de masse du Lutéoline.	65
25	Spectre de masse du Apigenine	65
26	Spectre de masse du quercitine	66
27	Spectre de masse du glycoside (Kaempférol glycosylé)	66
P1	Photo 1 (a, b, c) représentation de l'activité antibactérienne.	72
P2	Photo 2 (a, b) représentation de l'activité antifongique.	73
	Annexes : chromatogrammes et spectres de masse en LC-MS	81

INTRODUCTION

Depuis toujours les plantes médicinales ont constitué la source majeure du médicament, grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, celui-ci produit des molécules variées permettant au plantes de contrôler leur environnement animale et végétale.

Parmi les milliers de molécules organiques produites par ce métabolisme, (polyphénols, terpènes, alcaloïdes, stéroïdes, coumarines,...), l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus, ...)et de corriger ses troubles métaboliques.

Les composés polyphénoliques , terpéniques ont fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques, ce qui a permis l'identification des milliers de structures dans le règne végétal, et en exploitant l'évolution très rapide des techniques d'analyse chimique, en particulier, la chromatographie simple ou couplée aux diverses techniques spectroscopiques. La séparation et la caractérisation structurales de ces substances est devenue de plus en plus aisé.

Parmi les polyphénols, les flavonoïdes, constituent les métabolites secondaires les plus largement distribués dans le monde végétal, leurs diversité structurale et leurs bonne stabilité leur ont conféré des propriétés chimiques et biologiques très importantes.

La majorité du territoire national (le sahara algérien), est cité parmi les zones arides du monde où les conditions climatiques sont très dures pour que des plantes sauvages puissent survivre, mais ces dernières en s'adaptant, elles synthétisent des substances actives qui ne sont pas vitales, mais elles sont d'un grand intérêt pour elles. Ces substances en plus de leur intérêt dans l'organisme de ces plantes, elles rendent ces dernières, plus intéressantes du point de vue composition chimique.

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles des zones arides et plus particulièrement dans la région de Ouargla notamment en terme de plantes médicinales utilisées traditionnellement, nous nous sommes proposés d'élucider la composition chimique de la plante *Cotula cinerea* et de contribuer à la mise en évidence de ses principes actifs.

Ce travail se répartit (expérimentalement) comme suit :

1/ Echantillonnage et extraction (selon divers modes) de ces composés organiques à partir des organes de la plante étudiée: tiges, feuilles, et fleurs.

2/ Tests chimiques préliminaires, mettant en évidence la présence de quelques familles de composés organiques.

3/ Analyse des extraits par Chromatographie sur papier et sur couche mince.

4/ Analyse des extraits par les couplages GC-MS et LC-MS-ESI.

5/ Tests biologiques relatifs aux extraits, sur des micro-organismes et sur des criquets.

CHAPITRE I

GENERALITES

I. 1. Introduction :

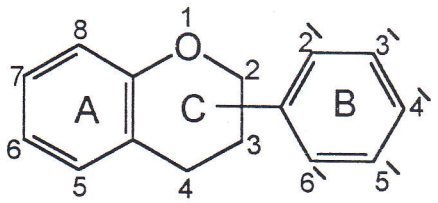
Les polyphénols et les terpènes sont cités parmi les composés les plus importants dans les métabolites secondaires rencontrés dans la nature, ils sont responsables des arômes et des couleurs chez la majorité des végétaux, en plus de la diversité bénéfique de leurs effets biologiques. Actuellement, plus de 8000 structures de polyphénols sont connues, leurs structures comprend un noyau benzénique substitué au moins par un hydroxyle [1]. Le tableau 1 regroupe les plus importantes classes des composés phénoliques dans les plantes.

I. 2. Généralités sur les flavonoïdes :

Au vu de leur importance, nous présentons dans cette partie quelques généralités sur les flavonoïdes, une classe très importante à caractère non volatil présente dans les plantes.

I. 2. 1. Structure des flavonoïdes :

Plus de 4000 composés flavoniques , ont une origine bio synthétique commune [3, 4] et, de ce fait, ils possèdent la même structure de base de 15 atomes de carbone respectant l'enchaînement C_6-C_3-C_6, deux noyaux benzéniques (A) et (B) reliés par une chaîne de 3 carbones, pouvant selon le cas, aboutir à un troisième cycle (C). Cette structure peut être présenter comme suit :



L'état d'oxydation de la chaîne des 3 carbones, la position du noyau benzénique (B) ou encore la nature de la substitution par des groupements OH, OCH_3 et/ou glycosyl, enrichissent la molécule du point de vue diversité structurale, et lui procurent ses particularités.

En se basant sur leurs similitudes chimiques, les flavonoïdes ont été classés en une douzaine de sous groupes [3, 5]. Leurs différentes formes structurales ont été présentées par Harborne [6], alors que les rapports entre ces formes ont été décrit par Markham [7].

Le tableau 2 présente quelques sous groupes flavoniques avec leurs structures de base.

Tableau 1: Les plus importantes classes des composés phénoliques dans les plantes [2]

Nombre de carbone	Structure de base	Classe
6	C_6	Phénols simples, benzoquinones
7	C_6-C_1	Acides phénoliques
8	C_6-C_2	Acetophenone, acide benzoique
9	C_6-C_3	Acide hydroxycinnamic, polypropene, coumarines, isocoumarines.
10	C_6-C_4	Naphtoquinones
13	C_6-C_1-C_6	Xanthones
14	C_6-C_2-C_6	Stilbene,
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoides, isoflavonoides
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignan, neolignan
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoides
n	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$ $(C_6$-$C_3)_n$	Tanins condensés Lignines.

Tableau 2: Les plus importants sous groupes flavoniques.

Sous groupe	Structure	Exemple
Anthocyandines		R=H, Pélargonidol
Chalcones		R=H Isoliquiritigénine
Aurones		Hispidol
Flavones		R=OH Lutéolol
Flavonols		R=H Kaempférol
flavanones		R=H Naringétol
Biflavonoïdes		Hinokiflavone
Isoflavonoïdes		génistéine

I. 2. 2. Les flavonoïdes dans le règne végétale :

Le métabolisme secondaire est une exclusivité du règne végétal. Parmi ses produits les plus largement distribués, on trouve les flavonoïdes, qui sont souvent rencontrés sous leurs formes glycosylées (C-hétérosides, O-hétérosides), dans les vacuoles de la cellule végétale à des concentrations d'environs 1µM[4]. Ils peuvent être aussi à l'état naturel libérés des oses, sous la forme d'aglycones.
Ces composés, à structures chimiques très variées, sont très dispersés au niveau des organes des plantes où ils se trouvent. Par exemples, les Anthocyanes sont plutôt localisés dans les fruits, fleurs et parfois les feuilles, alors que les chalcones sont rencontrés dans les pétales des fleurs [8]. Lorsque les flavonoïdes sont présents au niveau de la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours d'aglycones libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles. Cela concerne surtout des plantes de régions arides ou semi-arides [3].
Des exemples de répartition de quelques flavonoides identifiés dans certaines plantes sont représentés dans le tableau 3.

I.2. 3. Les flavonoïdes dans la famille des composées :

La famille des composées (*compositae = Asterceae)* est une des plus vastes dans le règne végétale. Elle constitue une source importante sur le plan médical, puisque beaucoup de ces plantes sont utilisées pour leurs propriétés curatives en médecine traditionnelle, voir même en thérapeutique moderne [11].
Cette famille se caractérise par la présence de deux classes chimiques très distinctes ; les terpénoïdes (essentiellement les lactones sesquiterpéniques) et les polyacetylènes [12-16].
Par ailleurs, selon Harborne [17], les flavonoïdes constituent une autre classe chimique que les composées renferment.
Plusieurs espèces de cette famille ont montré leur richesse en ces substances naturelles [18], nous citons quelques exemples dans le tableau 4.

Tableau 3: Quelque flavonoïdes identifiés dans certaines plantes du règne végétale.

Plante ou organe	Flavonoïdes identifiés	Références
Oranges	Polymethoxyflavones telles que : Tanérétine, Nobilétine, Sinensétine,…	[4]
Olives vertes	Apigénine, Lutéoline, Quercitine.	[8]
Palmier dattier	Quercitine, Isorhamnétine, Chrysoériol, Taxifoline, Lutéoline, Tricine, plus leurs formes glycosilées.	[9]
Citrons	Apéginine, Lutéoline, chysoériol, quercitine, Isorhamnétine, Limocitine, Limocitlol.	[4]
Pommes	Quercitine, Kaempférol	[2]
Roses	Anthocyanes : 3, 5-diglycosides Cyanidine	[2]
Sureau noir	Rutoside, Isoquercitroside	[3]
Thé vert	Catechine, Quercitine, Kaempférol	[10]

Tableau 4: Exemples de flavonoïdes identifiés dans quelques membres de la famille des composées .

Plante	Flavonoïdes identifiés	référence
Achillea millefolium (L)	Lutéolol, apigénol plus leurs glycoside.	[19, 20]
Anthemis nobilis et A.tinctoria	6-(OH) flavones, 6-(OH) flavonols,…	[21]
Artemisias	Isovitexine, quercitine 5-glucoside, acacetine 7-rutinoside,…	[22, 23]
Chamaemelum nobile(L)	Glycoside de l'apigenol, glucoside de lutéolol,.	[3]
Cotula cinerea	Kaempferitine, quercetrine, flavone-O- et c-glycosides,…	[24]
Matricaria chamomilla (L)	Apigenine 7-glucoside acetylés,…	[25]
Inula britanica	Flavonol glucoside, kaempférol, axillarine.	[26]
Serratula strangulta	3,5,6-trihydroxy, 4'-methoxy-flavone-7-β-D glucoside, 4',7-dimethoxy kaempférol.	[27]

I. 2. 4. Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes :

La diversité structurale très riche de ces métabolites secondaires, est traduite par les intérêts qu'ils présentent et leurs applications aussi variées, dans plusieurs domaines :

Les flavonoïdes contribuent tantôt à la pigmentation des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tel est le cas des chalcones, aurones, flavonols jaunes et des anthocyanosides (rouges, bleus ou violets). Et tantôt à la co-pigmentation, quand ils ne sont pas directement visibles, comme les flavones, les flavonols incolores [2-4, 28].
Leur présence dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assure la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet UVB (280 –320 nm) [3, 29, 30].

Sur le plan thérapeutique, plusieurs activités sont attribuées aux flavonoïdes:

La Tangérétine, la Rutine et l'Hespéridine augmentent la résistance des vaisseaux sanguins et agiraient sur la fluidité du sang. La rutine, la myricétine et le kaempférol, réagissent contre les maladies vasculaires en augmentant la résistance du LDL-cholesterol à l'oxydation [27, 31-33].
La Rutine et la Catéchine réagissent en synergie avec la vitamine C et E autant qu'anti- oxidant dans notre organisme, en participant à la réduction de l'action catalytique de quelques ions métalliques (Fe^{3+}, Al^{3+}), dans la production des radicaux libres, par la formation de chélatants avec eux. [28, 34-36]
La Catéchine, la Quercétine et la chalcone de Quercétine peuvent être utilisées comme traitements préventifs dans le cas d'asthme, cancer [36, 37], et le diosmine comme un diurétique [31].

Par ailleurs, les isoflavones, la flavone et la flavanone sont souvent présentées en tant qu'antifongiques phytoalexines [8, 38].
Les activités anti-inflammatoire, anti-microbienne et analgésique relatives aux flavonoïdes (Rutine, Quercétine, Hespéridine, biflavonoide,..) ont été sujet de plusieurs publications [39, 40, 41]……

Certains flavonoïdes sont impliqués dans les industries alimentaires, la Naringine, par exemple est très recherchée pour son amertume en chocolaterie et pour boissons tonifiantes [4].
Les Anthocyanosides extraits de fruits (framboise, fraises,..) peuvent être utilisés comme additifs alimentaire (E_{163}) dans les confitures et la confiserie, la néohesperidoside de quoi on synthétise la néohesperidine dihydrochalcone (=E_{959}), un édulcorant intense utilisable dans la plupart des produits alimentaires (jus de fruits, cidre,..)[3].

I. 3. Présentation du matériel végétal étudié:

La plante *Cotula cinerea* (syn : *Brocchia cinerea*) appartient à l'une des plus vastes familles du règne végétal, les Composées *(Compositae = Asteraceae)*.
Elle comprend plus de 1000 genres et 15000 espèces, répartis sur tous les continents et dans les milieux les plus divers [42].
Les plantes de cette famille sont parmi les végétaux supérieurs, la plupart d'entre elles renferment une potentialité thérapeutique, voir même économique, très précieuse à titre d'exemple : *Artemisias*, Camomille, Tournesol [31].

Les populations des régions arides et semi arides ont apprécié et valorisé cette richesse naturelle et l'ont explorée en tant que remède à leurs maladies et pour d'autres fins pratiques de leurs vie courante.

Cotula cinerea (figure 1) est citée plante médicinale spontanée [43], très connue par les populations des régions sahariennes, entre autre la région de Ouargla, pour ses applications thérapeutiques et alimentaires (pour animaux).

I. 3. 1. Description botanique de l'espèce :

L'espèce est à feuilles laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leurs parties supérieures en trois à cinq dents obtus. Tiges de 10 à 40 cm, couchées puis redressées, capitules de 6 à 10 mm de diametre, à involucre laineux à fleurs ; toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaunes d'or lorsqu'elles s'ouvrent. Très connue dans tout le sahara, notamment dans les sols un peu sablonneux [44].

I. 3. 2. Place dans la systématique :

Embranchement :	Spermaphytes.
S/ embranchement :	Angiospermes.
Classe :	Dicotylédones.
Ordre :	Astérales.
Famille:	Composées.
Genre :	*Cotula.*
Espèce :	*C.cinerea Del.*

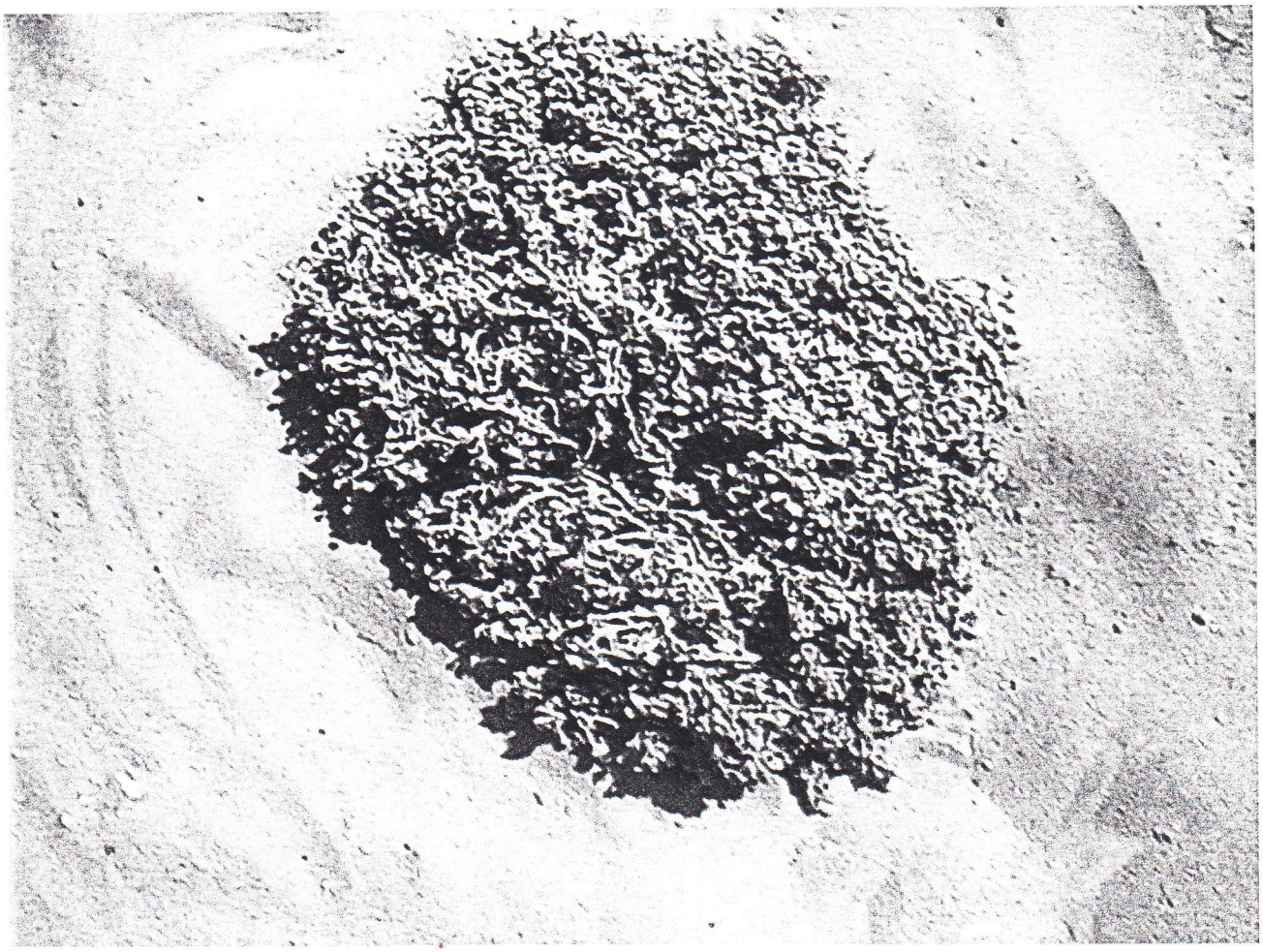


Figure 01 : La plante *Cotula Cinerea*

I. 3. 3. Répartition géographique :

L'espèce *Cotula cinerea* est très rencontrée dans tout le sahara, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés. Dans la région de Ouargla, elle est retrouvée à Oued Zouzfana, Oued M'zab, Bamendil,... [45]. Où elle est connue sous le nom de chouihia (ou parfois chihia).
Cotula cinerea est aussi connue dans les régions sahariennes d'Egypte [24, 46] et du Maroc [47-49]...

I. 3. 4. La composition chimique :

L'espèce *Cotula cinerea* est très riche en sesquiterpènes lactones, sesquiterpènes coumarines et en flavonoïdes [47-49].
Parmi les flavonoïdes isolés à partir de cette plante on peut citer: Kaempféritine, Quercétine, Quercitrine, Kaempférol, Lutéoline, Lutéoline 6-OH-7-O-β -D glucoside, Apigenine 7-O-α-L-rhamnoside, Quercitine3-O-β– glucoside et 5, 3', 4'-trihydroxy - 3,6,7-trimethoxy flavone....[24, 46]
Cette espèce en tant que plante aromatique, son huile essentielle renferme plusieurs composés terpéniques parmi lesquels nous citons, Camphre, α,β – Thujone, camphène, α, β – Pinène,1,8- Cineole, Bornyl acetate [50].

I. 3. 5. Utilisation de la plante :

Les populations de la région de Ouargla et ses environs utilisent *Cotula cinerea* pour plusieurs raisons thérapeutiques :
Elle est utilisée contre la colique, la diarrhée, la toux et aussi pour des applications broncho-pulmonaires.
Par ailleurs, elle est utilisée pour aromatiser le thé et le lait. Elle sert aussi comme nourriture pour leurs animaux.

Parmi les autres activités biologiques attribuées à cette plante, citées dans la littérature, nous trouvons, l'activité anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, anti-bactérienne, fébrifuge et l'activité larvicide des extraits du n-butanol, l'éther diethylique, l'acétate d'éthyle et du chloroforme [47-49, 51, 52].

CHAPITRE II

METHODES D'OBTENTION

II. 1. Introduction :

La mise en évidence de quelques molécules organiques contenues dans la plante *Cotula cinerea,* a été faite initialement, par la réalisation des tests phytochimiques préliminaires selon des procédures et des réactions chimiques spécifiques et connues pour chaque famille de composés chimiques.

En se basant sur les résultats des ces tests qui ont révélé une présence remarquable pour les flavonoïdes, nous avons, dans un premier temps, orienté notre travail sur leur extraction, par la réalisation de plusieurs méthodes, selon des protocoles universellement utilisés dans de telles expériences.

Les méthodes d'extraction de ces principes actifs (flavonoïdes) varient, selon la classe flavonique recherchée, et font appel à une variété de solvants organiques. Les plus employés sont les alcools additionnés d'eau à des pourcentages variables de 20% à 50% selon que la drogue est fraîche ou sèche [3]. Ces mélanges hydro-alcooliques peuvent être utilisés à l'état frais ou chaud, ils sont surtout recommandés pour l'extraction des hétérosides, il est possible de procéder ensuite à des extractions liquide-liquide par des solvants organiques non miscibles à l'eau, tels que l'éther de pétrole, l'hexane, qui éliminent la chlorophylle, les lipides...etc. Pour extraire les génines (les aglycones), on utilise des solvants moyennement ou non polaires parmi lesquels nous citons : $(Et)_2O$, CH_2Cl_2, C_6H_6,...etc. Après avoir détruit les liaisons osidiques, par une hydrolyse acide à chaud par exemple.

$$\text{Glycoside} \xrightarrow[\substack{\text{- Acide.} \\ \text{- Basique.} \\ \text{- Enzymes}}]{\text{hydrolyse}} \text{aglycone} + \text{mono sucre ou plus} \quad [31]$$

II. 2. Echantillonnage:

La récolte du matériel végétal a été réalisée dans l'une des exploitation du Nord-Est de la ville de *Ouargla,* en deux périodes, la première a eu lieu au mois de Mai 2001 et la deuxième au mois de Février 2002 ; (début de printemps, la saison favorable pour la récolte des plantes médicinales [45]).

II. 2. 1. Séchage :

Dans les deux cas le matériel végétal est séché à l'ombre dans un endroit aéré, à la température ambiante, avec un brassage journalier afin d'homogénéiser le séchage. Cette opération a durée dix jours. Une fois cette étape terminée, le matériel végétal est broyé puis stocké dans des bocaux hermétiquement fermés.

Notons que dans le premier cas la plante est exploitée sous sa forme entière. Mais dans l'autre cas, avant de sécher, on a séparé les trois organes aériens : tiges, feuilles, fleurs. Par la suite chaque organe est exploité séparément.

II. 3. Tests phytochimiques préliminaires:

La poudre végétale issue des organes aériens séparés de la plante *Cotula cinerea* ont subi différentes réactions chimiques par l'intermédiaire d'une variété de réactifs, afin de confirmer la présence ou l'absence de certaines familles de composés organiques [53, 54, 38].
Le tableau 5 regroupe les résultats des tests réalisés.

II. 4. Méthodes d'extraction des flavonoïdes :

Sur la base des résultats des tests phytochimiques qui ont révélé la présence des flavonoïdes, différents types d'extraction ont été réalisés dans ce travail et cela dans le but d'isoler le maximum de classes flavoniques.
Quatre méthodes d'extraction universelles ont été réalisées. Initialement appliquées sur la plante entière, et puis sur les trois organes aériens séparés : tiges, feuilles, fleurs, en utilisant des solvants organiques presque appropriés (sélectifs) à chaque classe de composés flavoniques.

II. 4. 1. Extraction selon la méthode de LEBRETON [55]:

02g de la matière végétale sèche à partir de la plante entière et les trois organes séparés (tiges, feuilles, fleurs), ont subit une hydrolyse acide par une solution de HCl (2N) à chaud dans un bain marie pendant 40 min, avec insufflation d'air toutes les 10 min. Après refroidissement, la solution est filtrée, le filtrat est extrait par l'éther diethylique. La phase éthérée est évaporée à sec, le résidu est repris ensuite par un minimum d'éthanol et puis stocké à 4°C dans un flacon bien fermé. Cette phase contient les aglycones.

II. 4. 2. Extraction par l'éthanol (70 %) [55] :

Une macération à froid dans l'éthanol (70 %) est appliquée sur 2.5g de la plante entière et les trois organes choisis précédemment , pendant 48h. Après récupération du filtrat, on ajoute 100ml du mélange hydro-alcoolique (EtOH 70%) au résidu végétal, afin d'extraire le maximum de principes actifs.
Les filtrats réunis sont évaporés sous pression réduite, jusqu'à ce qu'il ne reste dans le ballon que la solution aqueuse, puis on ajoute 100ml d'eau bouillante. La solution laissée pendant une nuit dans un endroit frais, subit une extraction liquide-liquide par le n- butanol (100ml) trois fois, ensuite le solvant est évaporé , sous pression réduite et par la suite le résidu sec sera repris par 5ml de méthanol.

II. 4. 3. Extraction par le mélange eau- méthanol 30/70 (v/v) :

50g de chaque organe (choisi), ont subit une macération de type décoction dans un mélange bouillant eau-méthanol 30/70 (v/v) pendant 36h avec renouvellement de solvant toute les 24h. Les trois extraits sont réunis après une décantation minutieuse, le filtrat est évaporé à 40°C jusqu'à l'élimination totale du méthanol, après on ajoute 150 ml d'eau bouillante au contenu du ballon et on laisse refroidir pendant une nuit dans le réfrigérateur. Cette dernière solution sera filtrée et puis elle va être extraite deux fois ; en premier lieu, une extraction par l'acétate d'éthyle (350 ml) qui vont être évaporés et le résidu sec sera repris par un minimum d'éthanol.
La deuxième extraction est réalisée par le n-butanol (350ml) qui sera évaporé sous pression réduite, le résidu sec est repris par de l'éthanol. Les deux extraits sont conservés dans des flacons bien fermés à 4°C [56].
Seulement dans notre cas, nous avons remplacé l'éthanol 80% par le méthanol 70%.

II. 4. 4. Extraction au Soxhlet :

25g de la poudre issue de la plante (sous sa forme entière) ont été extrait au soxhlet pendant sept (07) heures, en utilisant le chloroforme (CH_3Cl : Peb =61.2°C) comme solvant d'extraction. Après évaporation totale du solvant nous avons ajouté 130ml d'eau chaude au résidu sec. Cette solution laissée au réfrigérateur durant une nuit, a subi une extraction par l'acétate d'éthyle (25ml x 4), l'évaporation à sec de la phase organique a été suivie par la reprise du résidu sec à l'aide de 5ml de MeOH. l'extrait a été conservé dans un flacon hermétiquement fermé dans le réfrigérateur.

Le tableau 6 compile les modes d'extraction utilisés avec les composés organiques (classes flavoniques) ciblés.

Tableau 5: Résultats des tests phytochimiques.

Familles chimiques	Réactifs	Résultats	Présence dans les organes		
			tiges	feuilles	fleurs
Saponosides	Solution aqueuse de la plante	mousse	+	+++	++
Tanins	EtOH (50%) $FeCl_3$	Coloration verte	+	+++	++
Stéroles insaturés et Terpènes	$CHCl_3$ H_2SO_4	Coloration rouge	+	+++	++
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	Précipité blanc-jaunâtre	+	++	+
Flavonoïdes	HCl (1%) - NH_4OH (2N) pH basique - Alcool Amylique - Mg (poudre)	- couleur jaune orangé - la phase alcoolique jaunes - pas de couleur rouge	+	+++	+++
Huiles essentielles	$(Et)_2O$	Réaction positive (Plus l'odeur forte)	++	+++	+++

Tableau 6: Types d'extraction de quelques classes flavoniques réalisés dans ce travail.

Organes	Types d'extraction	Classe flavonique	Extrait
- plante entière - trois organes choisis	Eau- éthanol(30/70) (macération à froid)	C-glycosides O-glycosides	- MC01 - C, D, E
- plante entière - trois organes choisis	-Lebreton (hydrolyse acide)	-Aglycones flavoniques	- LB02 - A°, A, B
- trois organes choisis	Eau- methanol (30/70) macération décoction - par AcOEt - par BuOH	- aglycones, mono-glycosylés, di-O-glycosylés (partiellement) - le reste des O-glycosides, tri-O-glycosides, c-glycosides	- Ac1, Ac2, Ac3 -Bu1, Bu2, Bu3
-plante entière	Soxhlet : -$CHCl_3$ -AcOEt	methoxylés	-LX04

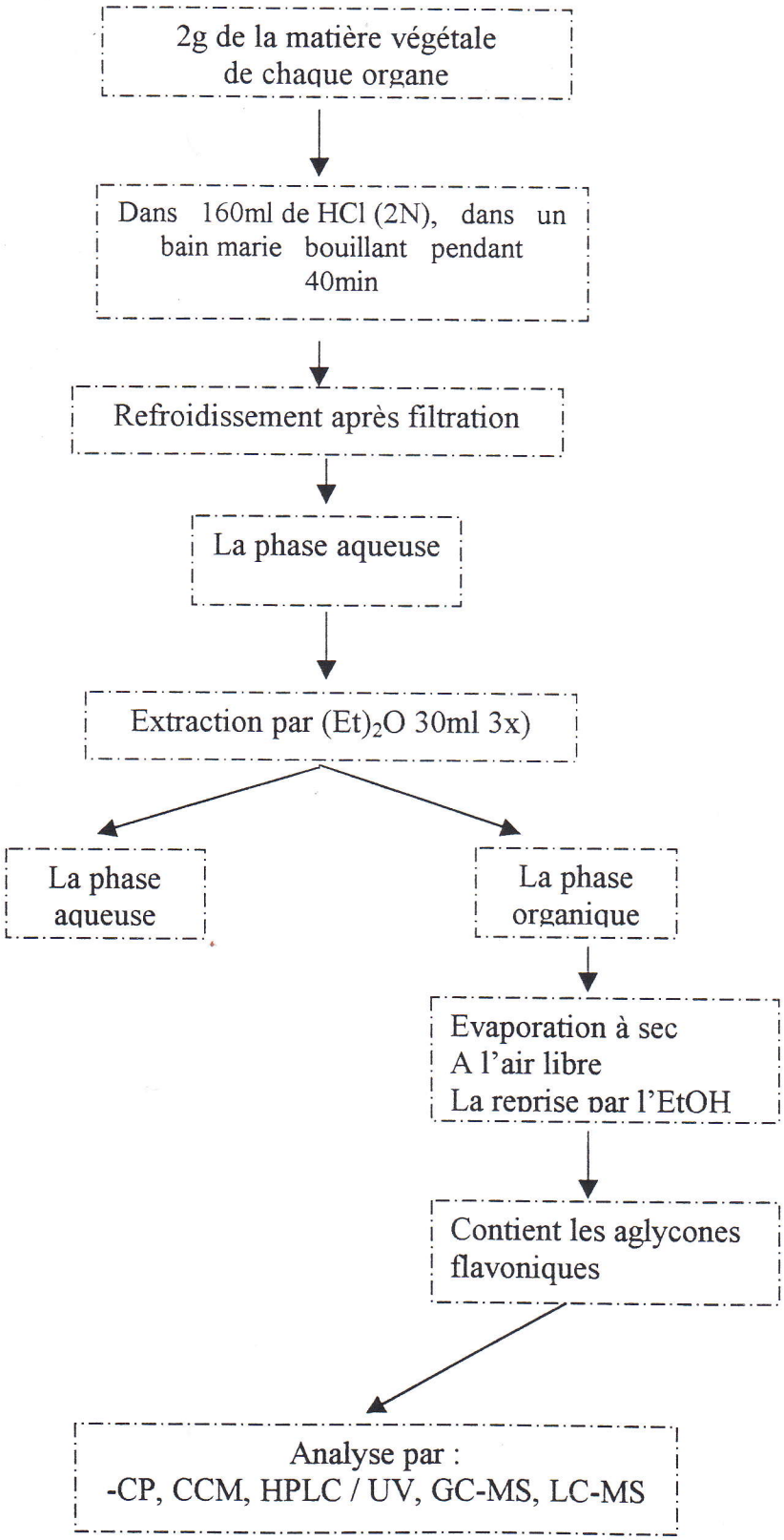


Figure 2: protocole d'extraction par la solution de HCl (2N).

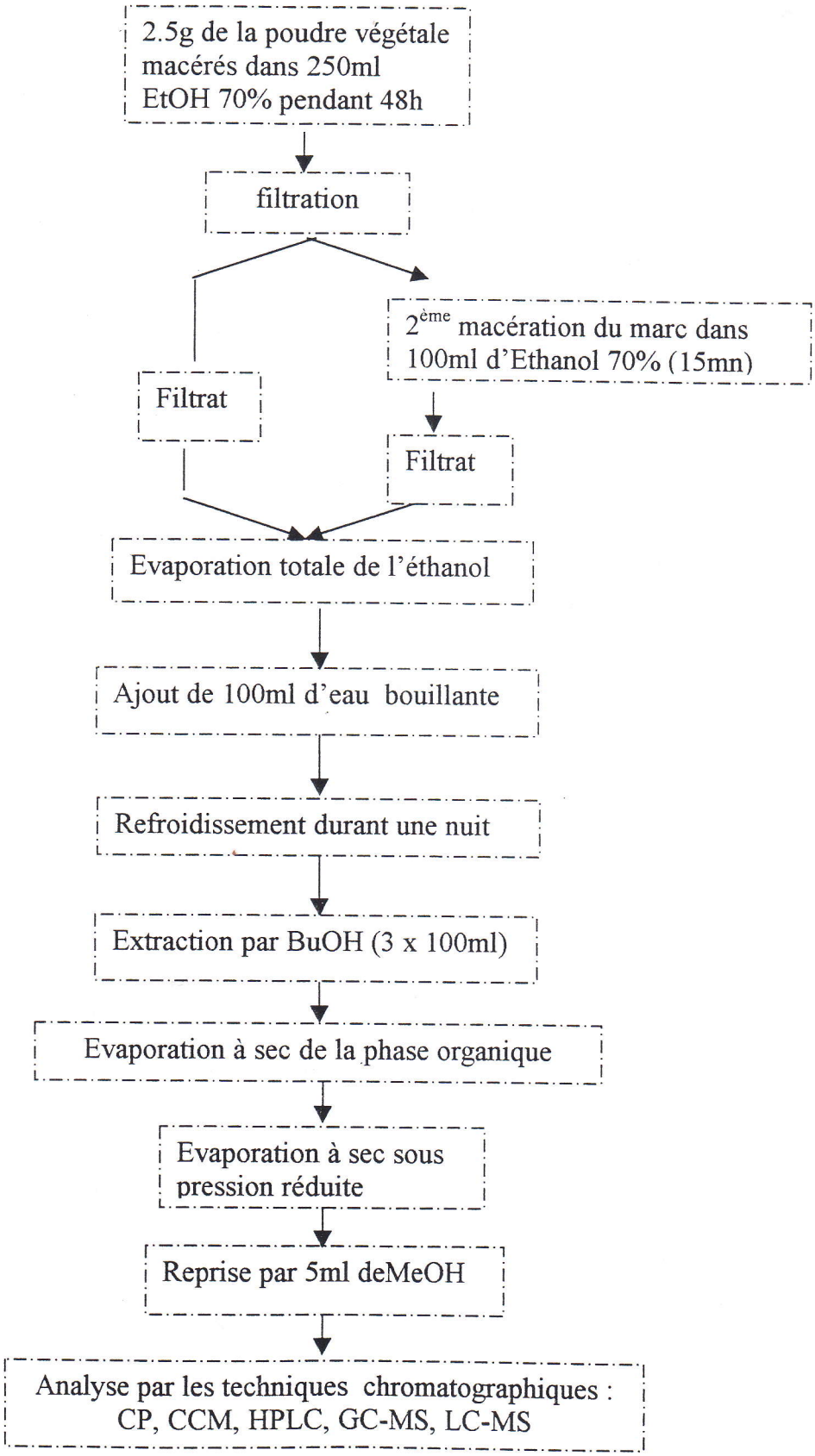


Figure 3 : protocole d'extraction par l'éthanol 70 %.

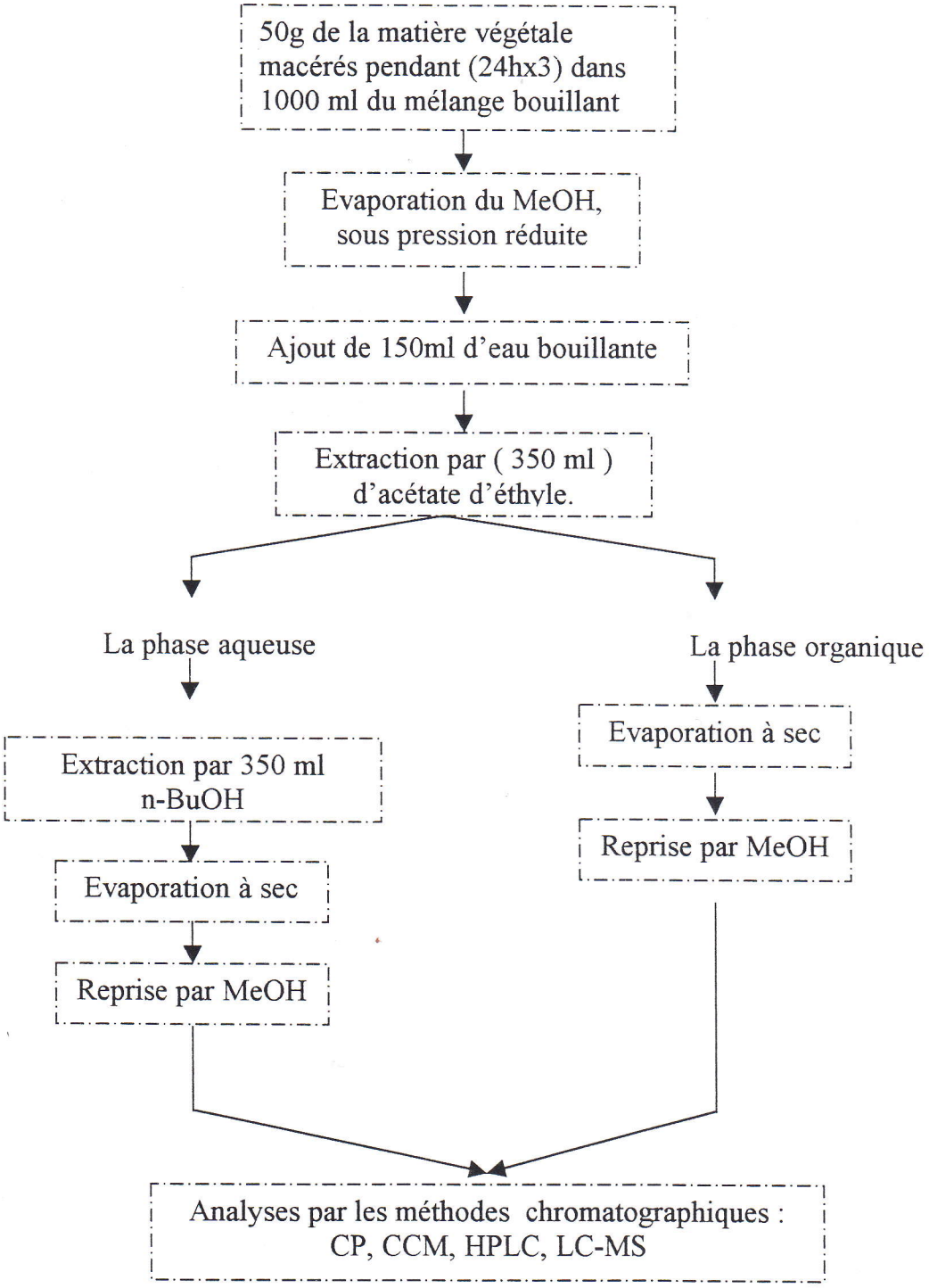


Figure 4 : protocole d'extraction par le mélange Eau /MeOH 30 /70 (v/v).

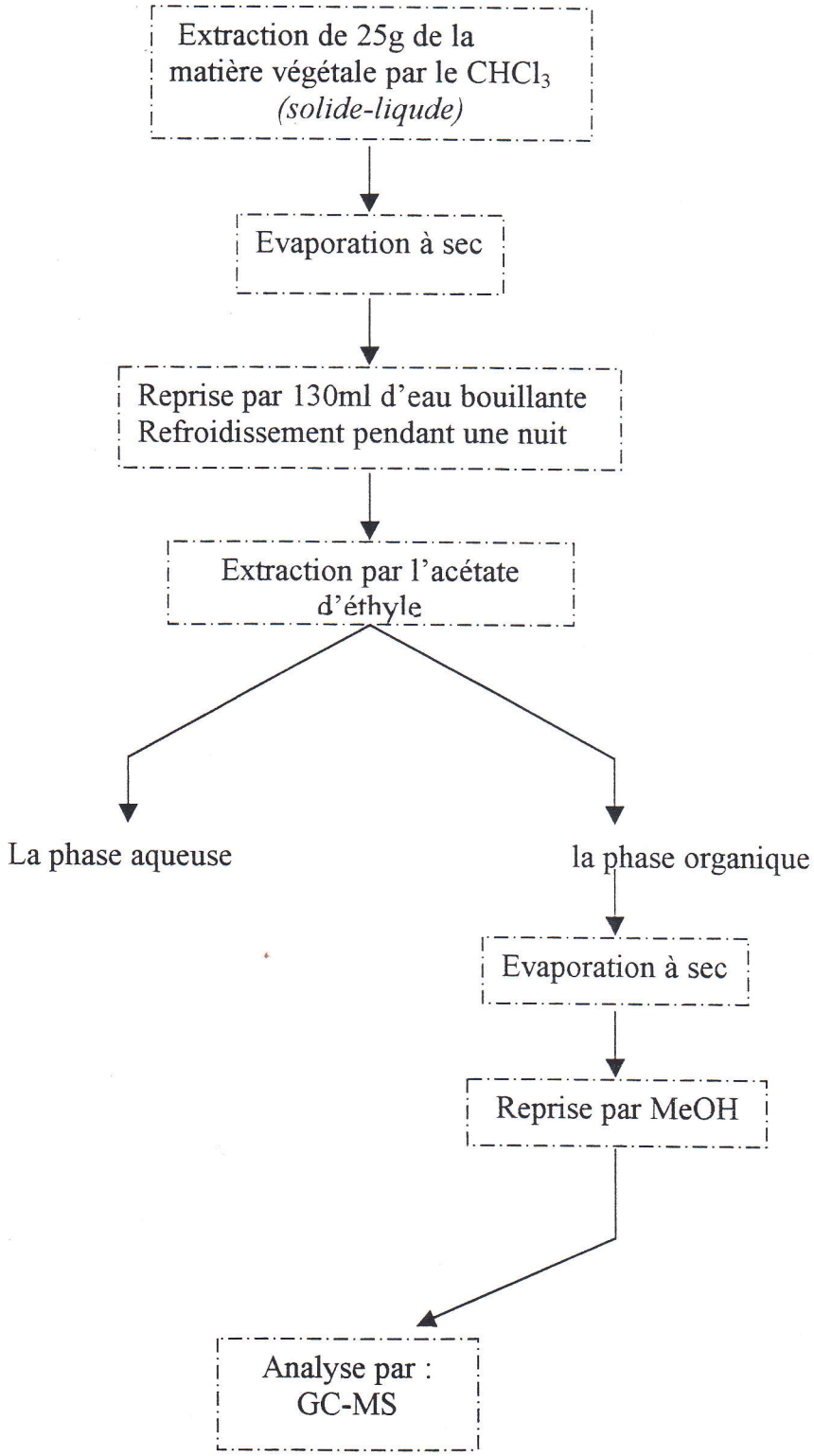


Figure 5 : protocole d'extraction au Soxhlet

Tableau 7: Les rendements d'extraction par l'éther diethylique, en mode d'extraction par HCl (2N).

Organes	Tiges	Feuilles	Fleurs
R%	0.525	2.510	1.710

Tableau 8: Les rendements d'extraction par n- butanol, en mode d'extraction par l'éthanol 70%.

Organes	Tiges	Feuilles	Fleurs
R%	0.071	1.00	0.951

Tableau 9: Les rendements d'extraction par l'acétate d'éthyle et le n-butanol, en mode d'extraction par le mélange eau-méthanol 30-70 (v/v).

Organes	Tiges		Feuilles		Fleurs	
Solvant d'extraction	AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
R%	0.115	1.595	4.66	3.31	1.275	1.155

II. 5. Résultats et discussions :

Les résultats des tests phytochimiques préliminaires ont montré que la plante *Cotula cinerea* de la région de Ouargla : est très riche en principes actifs, d'où la nécessité d'une étude analytique fine afin de les caractériser et donc les mettre en évidence.
Les flavonoïdes ont été facilement décelés par leurs couleurs caractéristiques, ce qui est en accord avec la littérature [24, 47, 49]..., aussi elle contient certains familles chimiques qui ne sont pas présentes dans celles étudiées dans la littérature, tels que les alcaloïdes [48]. Ceci pourrait s'expliquer probablement par les conditions climatiques, la composition du sol, les méthodes d'extraction et les solvants organiques utilisés.

Dans les trois types d'extraction, les feuilles ont donné les rendements les plus élevés par contre les tiges n'ont montré que de faibles rendements.
Enfin, les rendements les plus élevés sont obtenus dans le cas de la dernière méthode d'extraction, et ce, pour tout les organes.
Notons que les rendements sont calculés selon la relation :

$$R\,\% = \frac{m}{m_0} \times 100.$$

Où : m est la masse du résidu sec (ceci pour chaque extraction).
m_0 est la masse du matériel végétal.

II. 6. Partie expérimentale :

Les solvants utilisés pour les différents types d'extraction :

Ethanol, Méthanol, dichloromethane, chloroforme, Butanol, Acétate d'éthyle, diethyl éther, sont de PROLABO.

Le Rota-vapeur type IKA RV 05-ST (JANKE & KUNKEL).

CHAPITRE III

ANALYSE PAR Chromatographies sur papier et couche mince

III. 1. Introduction:

L'isolement des groupements et des molécules flavoniques (aglycones ou hétérosides) est essentiellement réalisés par des méthodes chromatographiques et des solvants appropriés.
Dans cette partie de notre travail nous avons effectué des séparations par deux techniques de routine et simples d'utilisation en l'occurrence la chromatographie sur papier (CP) et la chromatographie sur couche mince (CCM). Ces deux techniques sont considérées comme très pratiques vu l'économie de solvants et d'échantillons réalisés en même temps que l'obtention de plusieurs informations sur la constitution d'un échantillon une fois les conditions opératoires optimisées.

III. 2. Résultats et discussions :

III. 2. 1. Chromatographie sur papier :

Malgré son pouvoir séparateur limité dans le cas des mélanges complexes, la Chromatographie sur papier demeure une technique courante au laboratoire [42].
Cette technique est utilisée dans le cas de séparation des quantités moins importantes, elle peut informer sur les types de composés flavoniques présents.
Dans notre cas , elle est utilisée dans le but d'élucider la carte flavonique contenue dans la plante *Cotula cinerea* dans la région de Ouargla.

Nous avons utilisé le papier Wathman N°1, préalablement imprégné dans l'eau puis séché, comme phase stationnaire. Et pour l'élution les systèmes de solvants organiques suivants.

a- Chromatographie sur papier (CP) mono dimensionnelle :[38]

- $BuOH : H_2O : EtOH : NH_3$ (20 : 15 : 5.75 : 0.5) (v/v)
- $BuOH: AcOH: H_2O$ (13: 1: 6) (v/v)
- CH_2Cl_2: MeOH (95: 5) (v/v)
- $C_2H_4Cl_2$: EtOH (95: 5) (v/v)

Les essais avec ces phases mobiles n'ont pas donné de résultats acceptables, dans notre cas. Pour cette raison nous nous somme orientés vers la chromatographie sur papier bidimensionnelle.

b- Chromatographie sur papier (CP) bidimensionnelle : [24, 56, 57]

- 1er dimension: $BuOH: AcOH: H_2O$ (BWA) 4: 5: 1 (v/v)
- 2ème dimension: AcOH 15% (v/v)

Après développement des chromatogrammes, qui a duré pour la première dimension 150 min et pour la deuxième dimension 45 min, les taches ont été délimitées sous la lumière UV à $\lambda = 254$ nm, $\lambda = 366$ nm.

Les résultats de la Chromatographie sur papier bidimensionnelle, ont été acceptables, dans l'ensemble. Deux exemples sont illustrés sur les chromatogrammes dans la figure 6.

Puisque la répartition des composés polyphénoliques en chromatographie de partage dépend plus du nombre d'hydroxyles phénoliques contenus dans la molécule, on peut dire que les composés présents dans l'extrait Ac2 ne sont pas très polaires, car ils sont peu retenus par la phase stationnaire (très polaire), ils ont plus d'affinité pour la phase organique. Ceci est visible sur le chromatogramme de l'extrait Ac2 dans la première dimension .
Sur la deuxième dimension les composés flavoniques (sur les deux chromatogrammes), se présentent de polarité différentes, du moins polaire pour ceux qui ont été plus retenus par la phase stationnaire, au plus polaire pour ceux qui ont plus d'affinité pour la phase aqueuse acidifiée.

Les couleurs apparues sous la lumière UV, pour presque la majorité des composés révélés, supposent la présence des groupements de molécules représentés sur le tableau 10.

III. 2. 2. Chromatographie sur couche mince:

Les extraits obtenus par les différents modes d'extraction suivis dans notre travail sont analysés par Chromatographie sur couche mince, en mode de polarité de phase s inversées, en utilisant des plaques analytiques commerciales recouvertes de gel de silice greffé par une chaîne carbonée C-18, comme phase stationnaire, et des phases mobiles habituellement utilisées dans des cas similaires : eau–méthanol, eau–acétonitrile [8].

En phase normale les plaques analytiques commerciales utilisées sont recouvertes de gel de silice, l'élution est réalisée par une variété de systèmes de solvants organiques [38, 54, 58].

<u>pour les aglycones :</u>

- CH_2Cl_2 : MeOH
- $C_2H_5Cl_2$: EtOH
- AcOEt: $C_6H_5CH_3$: AcOH
- $C_6H_5CH_3$: AcOEt: HCOOH

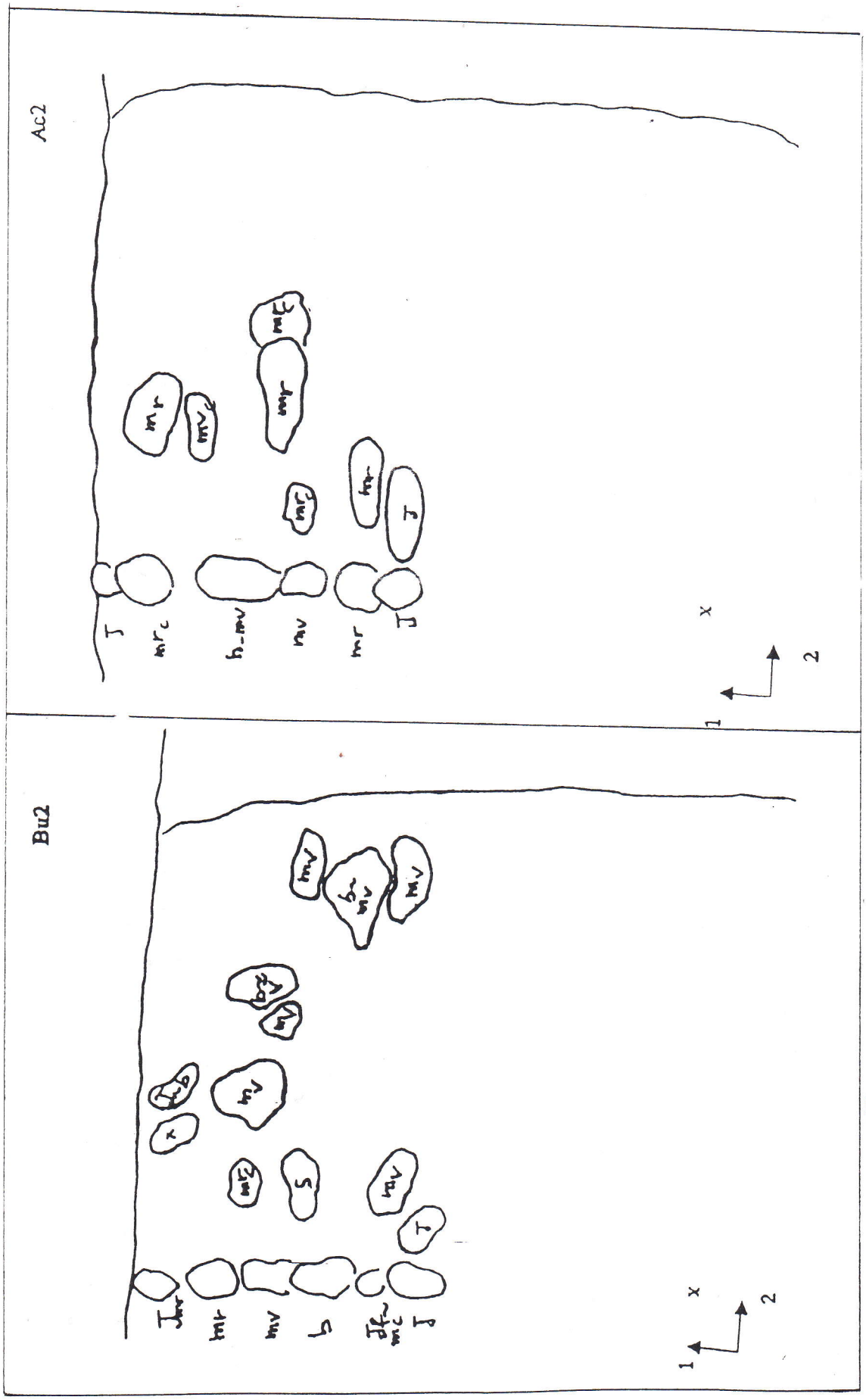


Figure 6 : Chromatogramme des extraits Ac2 et Bu2 obtenu par la CP bidimensionelle.

Première dimension : n-butanol-eau-acide acétique.

Deuxième dimension : acide acétique 15°/o.

Pour les hétérosides:

- AcOEt : MeOH : H_2O
- n-BuOH : AcOH : H_2O
- $C_6H_5CH_3$: MeOH : $(CH_3)_2O$:H2O
- n-BuOH : H_2O :EtOH : NH_3
- AcOEt: HCOOH: CH_3COOH: H_2O

Les essais avec ces phases mobiles, nous ont permis de faire quelques changements et d'optimiser les conditions qui sont utilisées par la suite.
Après développement des chromatogrammes, avec les conditions cités au-dessus, les taches sont révélées en les exposant à la lumière UV à $\lambda = 254$ nm, $\lambda = 366$nm, et pour compléter la révélation, les plaques sont exposées aux vapeur d'iode.

Après délimitation des taches en utilisant les deux méthodes de révélation (physique et chimique) les résultats des R_f sont portés dans les tableaux 11, 12, 13, 14. Notons que le R_f est le facteur de rétention exprimé par la relation :

$$R_f = \frac{d\ (\text{soluté})}{d'\ (\text{solvant})}$$

où : d est la distance parcourue par un soluté à partir de la ligne de dépôt.
d' est la distance parcourue par l'éluant (solvant) à partir de la ligne de dépôt.

D'après ces résultats, on constate que les fleurs et les feuilles ont presque la même composition, mais les tiges se sont montrés les moins riches en composés flavoniques.

Nous remarquons aussi la présence de deux catégories de substances, une de composés très polaires, car ils sont bien adsorbés sur le gel de silice et l'autre constituée de composés qui ont plus d'affinité pour la phase mobile (ils sont moins polaires). Leur sensibilité élevée au moindre changement de polarité dans la phase mobile et la difficulté dans leur séparation, est dû sans doute aux similitudes dans leurs structures et même leurs caractéristiques physiques assez proches.

La révélation des taches obtenues, sous la lumière UV, a présenté pratiquement les mêmes couleurs que celles obtenues par la chromatographie sur papier.

Tableau 10 : Fluorescence des composés flavoniques (sans réactifs) [59].

Couleur	Jaune(j)	Marron(mr)	Mauve(mv)	Bleue(b)	Verte(v)	Sombre(s)
groupements de composés	Flavonols Aurones (même dans le visible)	Flavones Flavonol-3-glycosylés	isoflavones	Methoxy flavonols	Flavonols sans (OH) à la position (5)	Isoflavones Flavones

Tableau 11 : Résultats de la CCM en mode de polarité de phase inversée pour les hétérosides obtenus par la méthode d'extraction par l'ethanol 70%.

La phase stationnaire: RP-18					
La phase mobile: H_2O /MeOH : 4/6			La phase mobile: H_2O /CH_3CN : 4/7		
N°	Rf feuilles	Rf fleurs	N°	Rf feuilles	Rf fleurs
1	0	0	1	0	0
2	0.13	0.13	2	0.22	0.22
3	0.24	0.24	3	0.29	–
4	0.51	0.51	4	0.40	0.40
5	0.60	–	5	–	0.43
6	0.80	–	6	0.48	–
7	0.85	0.85	7	0.57	0.57
			8	0.59	–
			9	0.65	0.65
			10	0.69	0.69
			11	0.71	0.71
			12	0.91	0.91

Tableau 12: Résultats de la CCM en mode de polarité de phase inversée pour les aglycones obtenus par la méthode d'extraction par HCl (2N).

La phase stationnaire: RP-18					
La phase mobile: H_2O /MeOH /CH_3COOH: 1 /9 /0.5			La phase mobile: H_2O /CH_3CN : 7 /3		
N°	Rf feuilles	Rf fleurs	N°	Rf feuilles	Rf fleurs
1	0.00	0.00	1	0.00	0.00
2	0.11	–	2	0.27	–
3	0.12	0.12	3	0.40	0.40
4	0.60	0.60	4	0.49	0.49
5	0.70	0.70	5	0.64	–
6	0.79	0.79	6	0.71	0.71
7	0.95	0.95	7	0.79	–
			8	0.82	0.82
			9	0.91	0.91

Tableau 13: Résultats de la CCM en mode de phase normale pour les aglycones, obtenus par les méthodes d'extraction par HCl (2N) et le méthanol 70%.

Extrait par $(Et)_2O$					Extrait par AcOEt				
La φ_m $C_6H_5CH_3$/ AcOEt/AcOH: 4.5/6/1					La φ_m $C_6H_5CH_3$/AcOEt/EtOH/AcOH: 5/3/0.5/2				
N°	Rf tiges	Rf feuilles	Rf fleurs	couleur	N°	Rf tiges	Rf feuilles	Rf fleurs	couleur
1	–	0.00	0.00	Jaune	1	–	0.00	0.00	Jaune
2	–	0.05	–	j-claire	2	0.03	0.031	–	*
3	–	0.14	–	*	3	–	0.06	0.06	*
4	–	0.18	–	*	4	–	0.09	0.09	marron-c
5	–	0.25	–	*	5	0.11	0.11	0.11	mauve
6	0.33	0.33	0.33	b-gris	6	–	0.12	0.12	jaune
7	–	0.38	0.38	*	7	–	0.15	0.15	marron
8	–	0.46	0.46	*	8	–	0.17	0.17	j-foncé
9	–	0.57	0.55	*	9	–	0.20	0.20	j-claire
10	–	0.60	–	*	10	0.23	0.23	0.23	*
11	–	0.64	0.64	*	11	–	0.36	0.36	verte (f)
12	0.69	0.69	0.69	bleue	12	–	0.40	0.40	j-vert
13	–	0.75	0.75	b~vert	13	–	0.76	0.76	marron-c
14	–	0.81	0.81	mauve	14	–	0.79	0.79	marron
15	–	0.87	0.87	jaune	15	0.82	0.82	0.82	j-brun
16	–	0.96	0.69	bleue	16	–	0.85	0.85	jaune(f)
					17	–	0.87	0.87	jaune-c

Abréviations :
- (*) pour les taches révélées seulement par l'iode (couleurs brunes).
- Les autres taches sont révélées par les deux méthodes.
- (j) : jaune, (f) : foncé, (b) : bleu, (c) : claire.

Tableau 14 : Résultats de la CCM en mode de polarité de phase normale pour les hétérosides obtenus par les méthodes d'extraction par l'éthanol 70% et le méthanol 70%.

Extrait par n-BuOH (EtOH 70%)					Extrait par n-BuOH (MeOH 70%)				
La phase mobile CH_2Cl_2 / EtOH / H_2O : 8 / 2 / 0.2					La phase mobile AcOEt/ MeOH / H_2O: 8/ 1.5/ 1				
N°	Rf tiges	Rf feuilles	Rf fleurs	couleur	N°	Rf tiges	Rf feuilles	Rf fleurs	Couleur
1	–	0.03	0.03	Jaune	1	–	0.03	0.03	bleue
2	0.07	0.07	0.07	j-gris	2	–	0.05	0.05	mauve
3	–	0.11	0.11	j-orangé	3	0.13	0.13	0.13	*
4	–	0.16	0.16	j-gris	4	0.15	0.15	0.15	*
5	–	0.21	0.21	jaune	5	–	0.27	0.27	verte
6	–	0.24	0.24	*	6	–	0.36	0.36	*
7	–	0.29	0.29	*	7	–	0.41	0.41	jaune
8	–	0.38	0.38	*	8	–	0.51	0.51	*
9	–	0.49	0.49	*	9	–	0.56	0.56	mauve
10	–	0.54	0.54	*	10	0.64	0.64	0.64	jaune
11	0.63	0.63	0.63	*	11	–	0.71	0.71	*
12	0.68	0.68	0.68	bleue	12	–	0.74	0.74	*
13	–	0.71	0.71	b~vert	13	–	0.81	0.81	marron
14	–	0.75	0.75	*	14	–	0.90	0.90	mauve
15	–	0.79	0.79	*					
16	–	0.84	0.84	marron					
17	–	0.87	0.87	marron					
18	–	0.90	0.90	*					
19	0.96	0.96	0.96	rouge-rose					

Abréviations :
- (*) pour les taches révélées seulement par l'iode (couleurs brunes).
- Les autres taches sont révélées par les deux méthodes.
- (j) : jaune, (f) : foncé, (b) : bleu, (c) : claire.

Nous constatons que les séparations obtenues en mode de polarité de phases normales sont plus satisfaisantes que celles obtenues dans l'autre mode de polarité. En comparant les deux séparations des aglycones en mode normal, on peut déduire que la présence de la couleur marron, qui correspond aux flavones et/ou flavonol-3-glycosylés [59], est remarquable dans la composition des extraits par l'AcOEt, alors qu'elle est absente dans celle des extraits par $(Et)_2O$. La révélation de cette couleur parmi les constituants des extraits des hétérosides, nous permet de proposer la présence des flavonol-3-O-glycosylés et des flavones dans la composition flavonique de la plante sujet d'étude.

Par ailleurs, ces résultats confirment la sélectivité des méthodes d'extraction utilisées (tableau 6).

Les taches 12 et 13 dans le deux tableaux 13 et 14 ayant des colorations bleue et bleue~verte sont assimilés aux methoxy-flavonols et/ou flavonols tels que c'est indiqués dans le tableau 10.

III. 3. Conclusion :

Les résultats de la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince ont révélé la présence de plusieurs classes flavoniques (flavonols, flavones, methoxy-flavonols, flavonol-3-O-glycosylés ....) dans la composition chimique de la plante *Cotula cinerea.*

Les feuilles et les fleurs renferment une composition chimique similaire mais plus riche que celle des tiges.

L'optimisation des conditions chromatographiques, en particulier celles de la CCM en mode de polarité de phases inversées, nous a donné une approche pour les conditions à utiliser dans des analyses plus performantes telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

III. 4. Partie expérimentale :

- Les solvants organiques utilisés pour l'elution :
  Butanol, Ethanol, Acétate d'éthyle, acide acétique, dichloromthane, toluène, Acétonitrile, acide formique et le méthanol, sont de PROLABO.

- Pour la chromatographie sur papier, le papier Whatman N°1 a été utilisé.

- Pour la chromatographie sur couche mince, des plaques analytiques commerciales recouvertes de gel de silice (250µm d'épaisseur) et des plaques analytiques commerciales recouvertes de gel de silice greffée par C-18, PF_{254} (de Merck, Germany).

- La révélation est effectuer par deux méthodes : une physique à l'aide d'une lampe UV à deux longueur d'onde : λ =254nm et λ =366nm, et une autre chimique par l'iode.

CHAPITRE IV

ANALYSE PAR GC-MS

IV. 1. Introduction :

La chromtographie en phase gazeuse CPG (ou GC) est une technique d'analyse très répandue, son développement qui n'a pas cessé depuis les années quarante, date des premières applications, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence permise par nombreuses phases stationnaires commerciales et sa rapidité de mise au point des analyses nouvelles [60].

Elle s'applique dans la séparation des composés volatils ou susceptibles de l'être telles, par augmentation de la température, sans décomposition. En effet, elle est utilisée dans les analyses de certains extraits naturels, les analyses environnementales, les industries pharmaceutiques et les contrôles de qualité.

Dans les analyses des mélanges naturels, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), permet l'identification des constituants élués, ou bien à la limite fournit le plus d'informations structurales sur certains d'entre eux [61]. la figure 7 représente un exemple de schéma du système de couplage GC-MS [62].

La GC-MS, en mode d'ionisation impact électronique, est largement utilisée dans les analyses des huiles essentielles, constituées principalement de composés terpéniques, obtenues à partir des plantes aromatiques, elle est devenue presque la technique de base pour leurs études, aussi bien qualitativement que quantitativement, surtout lorsqu'elle est combinée avec des méthodes d'ionisation plus douces et de séparation plus fines.

L'analyse des flavonoides, par cette technique n'est pas très recommandé, vu la non volatilité de ces composés. Mais vu les progrès considérables constatés dans cette technique, combinée aux évolutions importantes de la spectrométrie en tandem, leurs analyses, par cette technique, sont devenue de plus en plus appliquées, et permettent d'obtenir des informations très importantes sur leurs structures et la composition des mélanges qui les renferment [63].

Nous aborderons dans ce chapitre les analyses par GC-MS, en mode d'ionisation impact électronique des extraits : LX04 (extrait au Soxhlet), LB02 (extrait des aglycones à l'éther diethylique), MC01(extrait des hétérosides au n-butanol).
Tous ces extraits sont obtenus à partir de la plante sous sa forme entière.

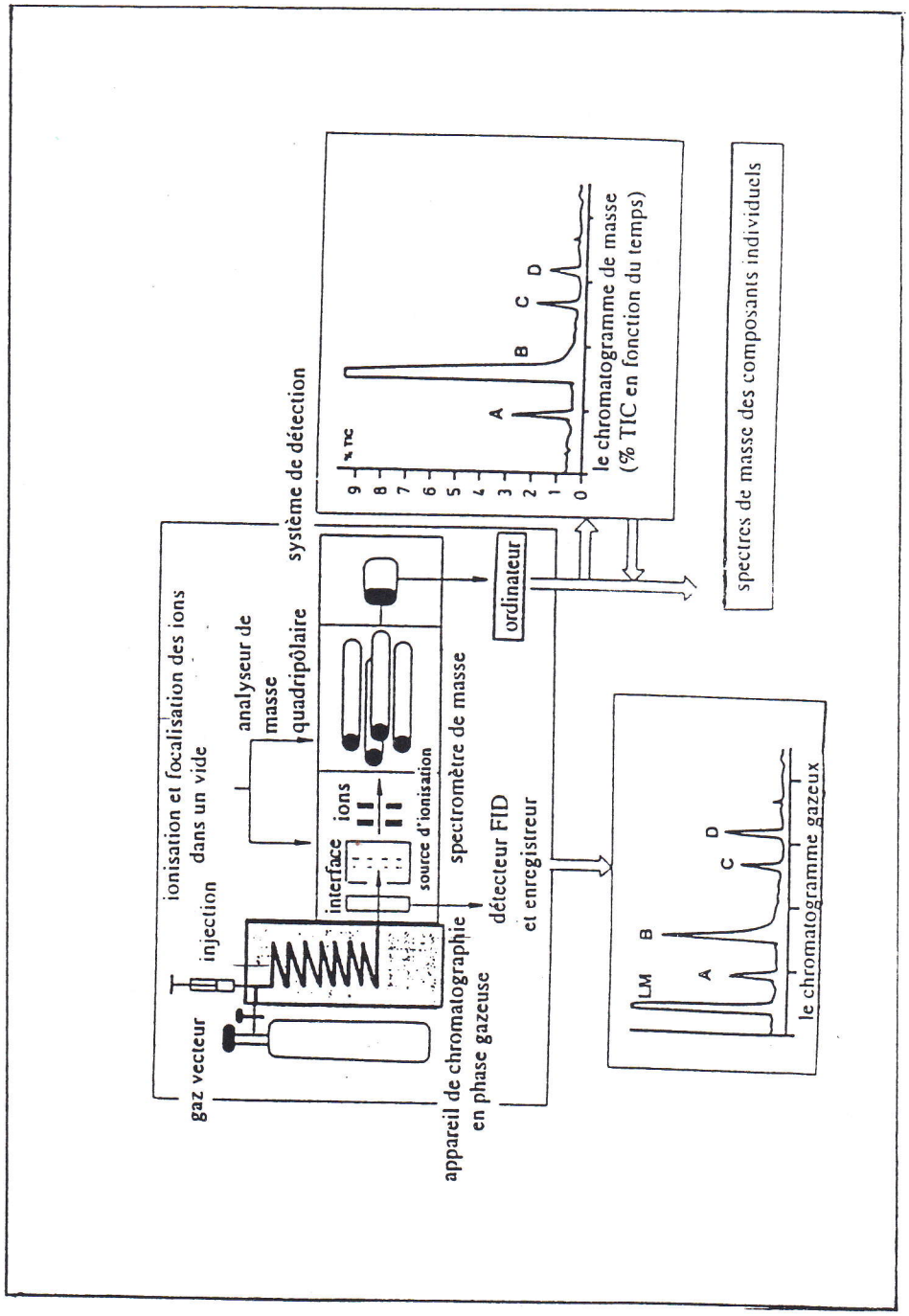


Figure 7 : exemple d'un système de couplage GC-MS

IV. 2. Partie expérimentale :

Dans ces analyses nous avons utilisé les appareils et les conditions chromatographiques suivantes :

- un chromatographe de type 800^{Top} muni d'un injecteur de Ross et une colonne capillaire apolaire EC^{TM-1} (30m x 0.25mm ; 0.25mm).
- un spectromètre de masse : Finnigan MAT, Automass II. Energie d'ionisation 70 eV.
- Température de l'interface: 279° C.
- Température de l'injecteur : 260°C.
- Programmation de température : 100°C pendant 5 min, 8°C/min et enfin 260°C pendant 20 min.
- Le débit : 40ml / min.
- L'identification a été faite en utilisant la bibliothèque NIST.

IV. 3. Résultats et discussions :

Les extraits LX04, LB02, MC01 ont été sujets d'analyse par GC-MS/IE, leurs constituants volatils sont séparés dans une colonne capillaire EC^{TM-1} (phase stationnaire apolaire), en utilisant l'Hélium comme gaz vecteur. Les analyses sont réalisées en programmation de température.

Les figures 8, 9, 10 illustrent les chromatogrammes correspondant aux extraits LX04, LB02, MC01.

Les séparations représentées sur les trois chromatogrammes sont bonnes, et la plus satisfaisante est celle concernant l'extrait LX04.

Le chromatogramme représentant l'extrait LB02 a montré plus de composés élués que celui de l'extrait MC01, mais le plus riche est celui de l'extrait LX04.

Ceci est dû aux méthodes d'extraction et à la nature et la sélectivité des solvants organiques utilisés, où le Soxhlet s'est montré efficace dans l'entraînement d'un nombre important de constituants volatils.

Après dépouillement des spectres de masses obtenus, les identifications des substances éluées ont été faites grâce à la consultation des bibliothèques de spectre et regroupées dans les tableaux 15, 16 et 17.

l'extrait LX04 est riche en composés terpéniques, parmi les quelles nous avons pu identifier **le Camphre**, le constituant majoritaire de l'huile essentielle contenue dans la plante, avec l'α–Thujone, 4-Carvomenthenol, Bornyl acétate, Isocaryophyllène, et 1,3,8-para-menthatriène [50]. En plus d'autres composés qui ne sont pas cités dans la littérature.

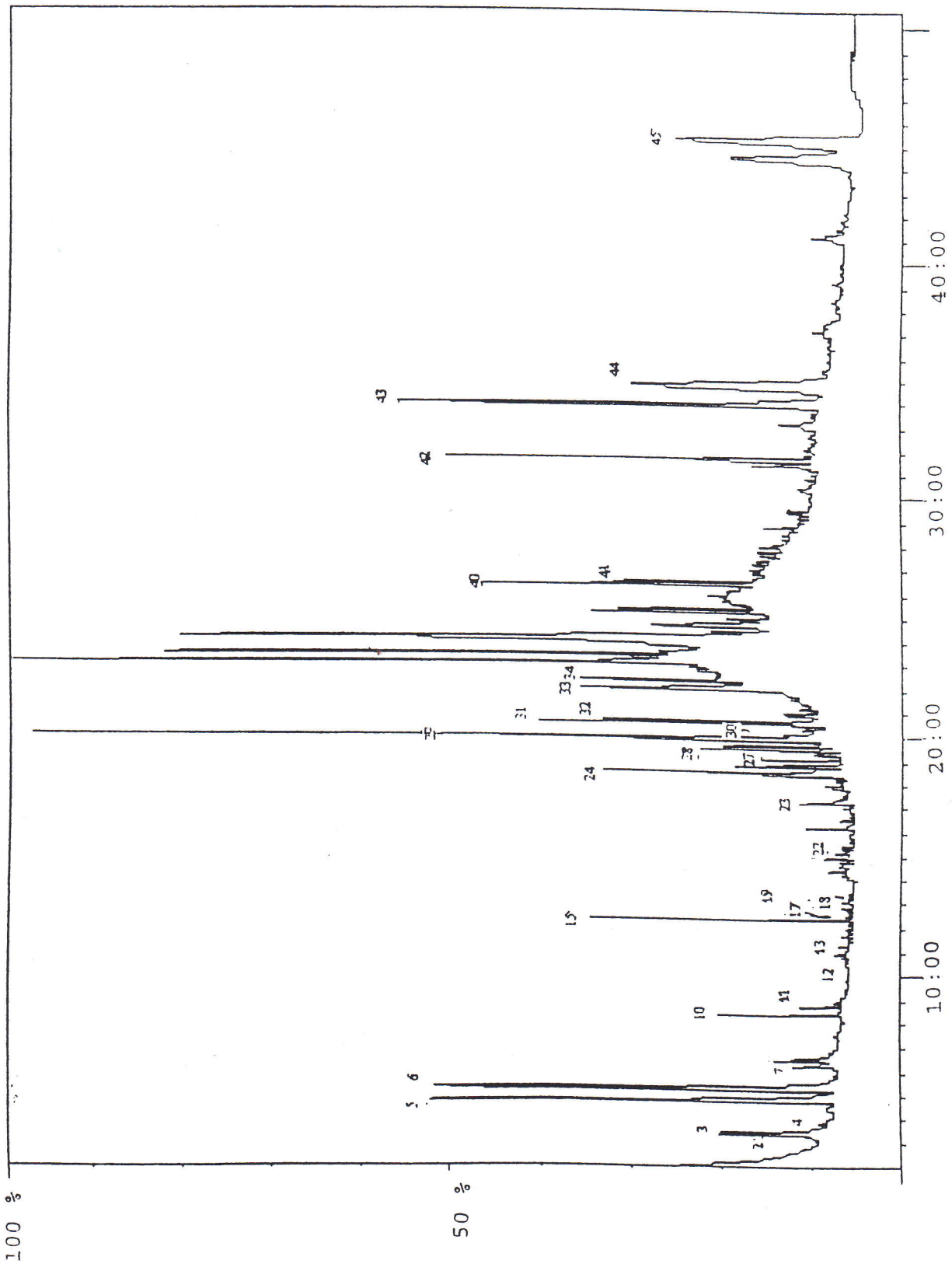


Figure 8 : chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait LX04.

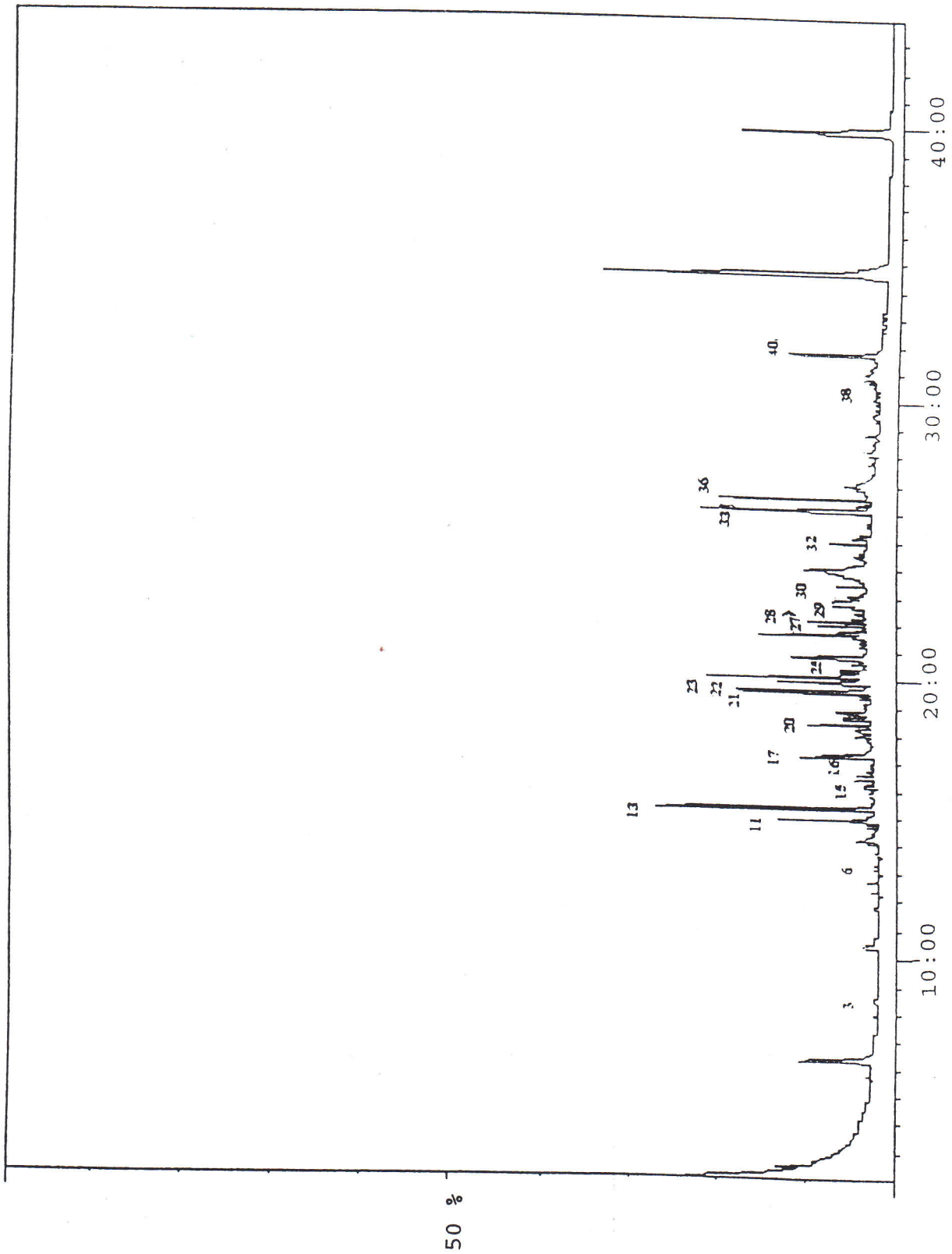


Figure9 : chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait LB02.

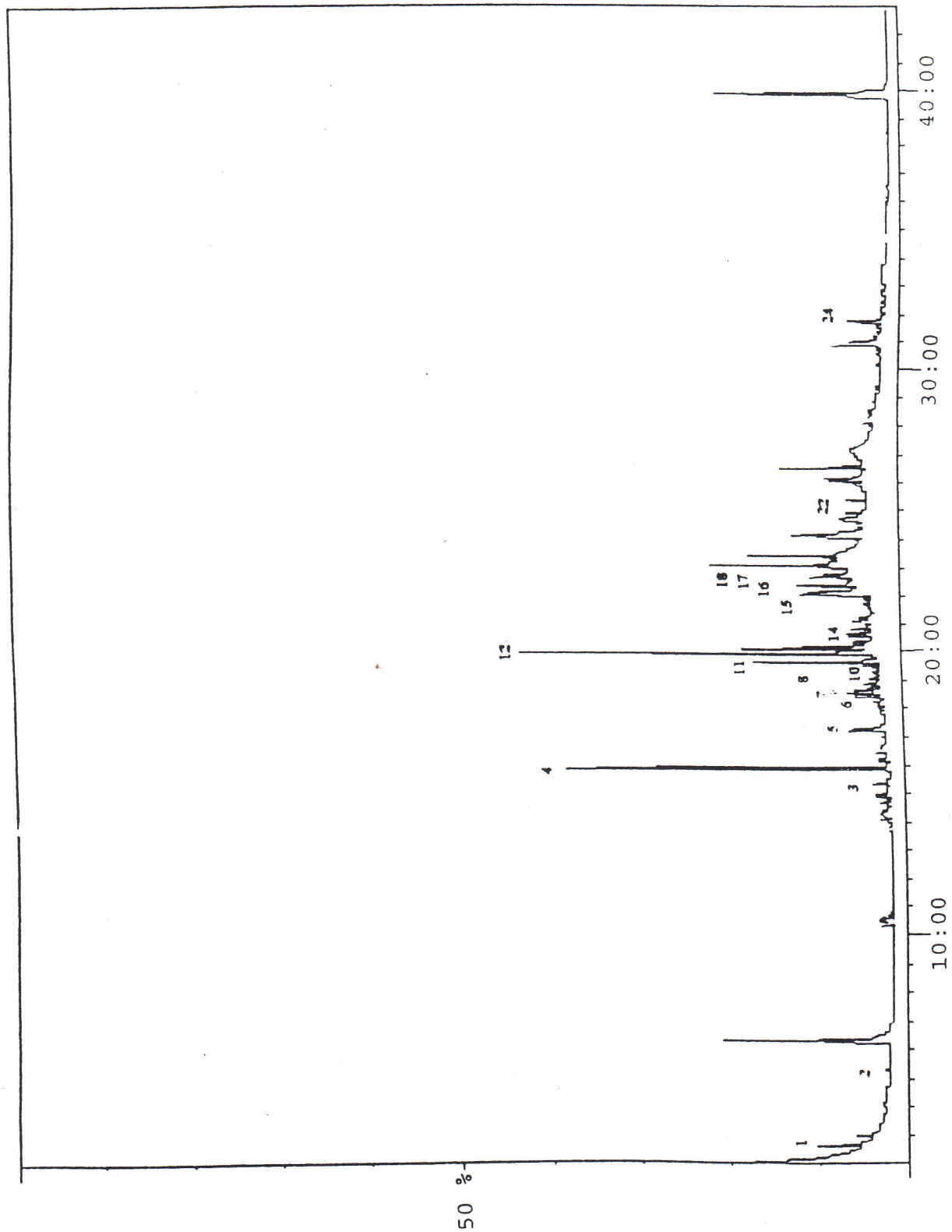


Figure 10 : chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait MC01.

Parmi les autres constituants de cet extrait, nous avons constaté que les esters prédominent, en effet, 08 structures ont été caractérisées dont une lactone, citrate et des esters gras : $C_{18}H_{36}O_2$, $C_{19}H_{30}O_2$, $C_{19}H_{34}O_2$.
Deux des trois acides organiques que nous avons pu identifier, sont des acides gras.
La fonction alcool est aussi présente avec cinq alcools lourds identifiés. parmi lesquels se trouve un stéroïde.
La fonction cétonique s'est présentée dans quatre autres molécules identifiées (soit seule ou avec une autre, éther ou alcool).
De même, des alcanes et des composés insaturés sont présents dans cet extrait.
Enfin les deux Phtalates identifiées proviennent probablement des bouchons en plastique des flacons de conservation des extraits. Ce qui est remarquable aussi, l'oxygène est le seule hétéro atome présent au niveau des composés identifiés.

l'extrait LB02 renferme aussi plusieurs substances organiques, parmi lesquelles nous avons pu identifier: sept esters, dont la fonction se trouve soit seule, comme c'est le cas de: $C_{18}H_{34}O_2$, $C_{19}H_{38}O_2$, $C_{24}H_{48}O_2$. ou bien avec d'autres fonctions (composés poly-fonctionnels), comme dans les cas suivants:

- $C_{20}H_{36}O_4$, $C_{21}H_{38}O_4$, deux fonctions esters dans chacun.
- $C_{14}H_{20}O_9$ un composé qui porte quatre fonctions esters et une fonction aldéhyde.
- $C_{18}H_{26}O_3$, une fonction ester et une fonction éther dans cette molécule.

Parmi les autres molécules organiques identifiées nous trouvons :
Quatre acides gras $C_9H_{18}O_2$, $C_{16}H_{30}O_2$, $C_{16}H_{32}O_2$, $C_{17}H_{34}O_2$, un alcool lourd ($C_{30}H_{50}O$), une cétone ($C_{21}H_{40}O$), en plus de trois alcanes, quatre phtalates et un composé soufré ($C_{12}H_8O_2S$).

l'extrait MC01 comprend presque les même fonctions dans sa composition volatile, dont les esters sont aussi les plus nombreux, en effet, sept structures ont été identifiées: le 2-butenoate d'hexyle, l' acétate de 1-methyl bicyclo[2,2,1]heptane-2-ol, l' acétate de β-santanol, maleate de diisooctyl, en plus de deux autres esters méthyliques et le $C_{16}H_{30}O_4$.

les acides organiques gras, que nous avons pu mettre en évidence leurs formules, sont : l'acide Stéarique ($C_{18}H_{36}O_2$), l'acide Margarique ($C_{17}H_{34}O_2$) et l'acide pentadecanoïque.

Parmi les composés terpéniques qui se sont présentés dans cet extrait nous citons le **Camphre** et le Dihydrocarvone.
Le seul alcool identifié est le 6-(p-Tolyl) 2-methyle-2-heptenol. Les phtalates identifiées sont probablement de la même source citée précédemment.

Les figures 10, 11 et 12 représentent respectivement les fragmentations proposées pour le camphre,la thujone et le 6-(p-tolyl) 2-methyle-2- heptenol.

Tableau 15: Résultats d'analyse par GC-MS de l'extrait LX04.

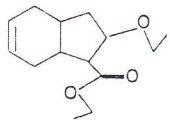
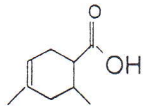
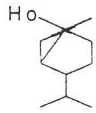
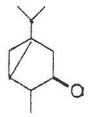
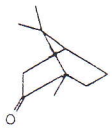
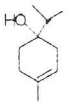
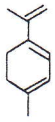
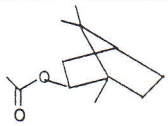
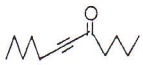
N°	t_R (min)	Principaux fragments	Spectre de référence	Formule brute	Formule développée	N°de Nist
1	2:06	69(100), 51(71), 45(49), 100(45), 119(35), 150(16), 61(11), 131(9).	—	—	—	—
2	3:17	119(100), 69(94), 51(76), 93(66), 100(35), 136(29), 77(20), 107(15), 151(15).	119(100), 69(92), 101(70), 91(70), 118(59), 85(57), 163(55), 79(47).	$C_{14}H_{22}O$ Bicyclo[4,3,0]-trans-(7R,8R,S)ethyl8-ethoxy-non3-ene7-carboxylate		99727
3	3:26	93(100), 108(95), 81(92), 69(80), 111(78), 85(75), 71(65), 55(45), 96(45), 139(43), 154(39), 84(36), 119(27), 51(25), 126(7), 100(10),.	93(100), 108(91), 154(73), 67(65), 81(64), 109(63), 68(28), 69(26), 94(25).	$C_9H_{14}O$ 2,4-dimethyl cyclohex-1_ene-5-carboxylic acide(trans)		215140
4	3:51	93(100), 91(45), 69(40), 136(30), 51(29), 77(22), 119(20), 100(10), 107(7).	93(100), 121(34), 91(31), 77(27), 92(23), 79(16).	$C_{10}H_{18}O$ bicyclo[3,1,0]hexa-2-ol, 2-methyl-5-[1methylethyl]-1 α,2 α -5 α		107163
5	4:45	110(100), 81(75), 95(66), 109(53), 67(40), 68(39), 69(38), 55(24), 152(5).	110(100), 81(88), 95(70), 67(68), 68(58), 69(53), 109(43), 55(32), 70(25).	$C_{10}H_{16}O$ α –thujone		776014
6	5:17	95(100), 81(75), 95(66), 109(53), 67(40), 68(39), 69(38), 55(24), 152(5).	95(100), 81(88), 108(39), 69(39), 55(38), 27(35), 83(33), 109(28).	$C_{10}H_{16}O$ Camphre		151971
7	6:13	71(100), 111(75), 93(70), 86(25), 91(25), 55(20),	71(100), 93(51), 111(49), 55(27), 86(25), 69(23), 67(18).	$C_{10}H_{18}O$ 4-carvomenthenol		157898
8	6:20	71(100), 97(80), 93(60), 111(55), 85(45), 55(40), 67(30), 91(34), 135(30(), 107(26), 125(22), 154(10).	—	–	–	–
9	6:30	97(100), 85(80), 93(67), 59(60), 121(54), 107(50), 55(50), 84(46), 125(36), 71(36), 67(35), 136(35), 150(3).	-	–	–	–
10	8:21	119(100), 91(45), 93(35), 79(26), 105(25), 77(20), 134(15), 121(15).	119(100), 91(74), 134(66), 105(21), 77(21), 92(17), 79(16), 93(16).	$C_{10}H_{14}$ 1,3,8-para-menthatriene.		
11	8:41	95(100), 93(45), 121(44), 136(30), 108(15), 80(11), 69(9), 55(9), 154(5).	95(100), 93(45), 136(39), 121(34), 80(17), 55(15), 108(134), 69(131).	$C_{12}H_{20}O_2$ Bornyl acetate.		249545
12	10:55	109(100), 124(95), 95(71), 71(39), 81(34), 55(29), 132(30), 117(9), 143(8).	109(100), 124(91), 53(62), 55(42), 81(40).	$C_{12}H_{20}O$ 6-Dodecyn-5-one.		267000

Tableau 15 (suite):

13	11:43	93(100)133(86), 109(62), 79(55), 91(50), 120(44), 105(44), 95(40), 81(40), 67(37), 148(20), 161(20), 119(32),	93(100), 69(76), 133(67), 161(56), 79(53), 105(47), 81(41), 107(38).	$C_{15}H_{24}$ Isocaryophyllene.		140072
14	11:54	139(100), 109(85), 92, 91(81), 81, 82(64), 59(40), 121(40), 71(34), 152(19), 163(16), 130(14).	–	–	–	–
15	12:20	69(100), 93(81), 133(31), 120(26), 79(25), 91(25), 81(24), 67(21), 55(16), 107(15), 161(9), 204(2), 148(2).	69(100), 93(69), 94(27), 67(26), 204(25), 109(24), 79(24), 107(18), 161(17).	$C_{15}H_{24}$ 1-methyl,4-(1-methylene, 4-hexenyl, 5-methyl,) Cyclo hexene, (S)		9219
16	12:31	93(100), 121(61), 57(56), 81(49), 136(35), 109(20), 67(14), 152(5).	–	–	–	–
17	12:49	119(100), 57(50), 105(30), 91(30), 79(15), 161(15), 134(14), 77(14), 85(30).	119(100), 105(68), 161(51), 204(26), 91(22), 121(22), 91(22), 120(19),92(18),93(15).	$C_{15}H_{24}$ Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-exahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyle).		9229
18	13:06	111(100), 137(29), 67(16), 124(10), 95(9), 81(8), 152(5).	111(100), 109(43), 137(39), 67(30), 110(21), 59(7).	$C_{11}H_{16}O_2$ 2(4h)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl.		7400
19	13:25	69(100), 93(32), 121(21), 81(21), 107(16), 55(14), 136(11), 163(9), 145(5),173(3).	69(100), 81(30), 93(29), 136(26), 68(26), 67(11), 107(11), 121(10).	$C_{17}H_{28}O_2$ acetate de (2E,6E)-Farnesyl.		164111
20	14:57	112(100), 119(65), 139(42), 84(30), 140(25), 212(21), 213(18), 69(15), 167(15), 93(14), 156(11) 184(6), 128(5).	–	–	–	–
21	15:12	83(100), 95(46), 119(41), 109(34), 55(30), 151(25), 133(25), 67(24), 213(4), 167(5), 193(4), 177(1).	–	–	–	–
22	15:23	157(100), 115(72), 111(16), 129(14), 203(14), 87(11), 139(5).	157(100), 115(47), 203(28), 111(12), 158(11), 87(10), 129(9).	$C_{12}H_{20}O_7$ citrate d'ethyle.		189977
23	17:14	73(100), 60(78), 129(63), 57(60), 55(55), 71(35), 69(34), 83(30), 85(27), 97(26), 87(25), 115(20), 185(18), 228(16), 143(13), 171(6), 199, 157(3).	73(100), 60(92), 55(75), 57(65), 129(38), 69(34), 71(33).	$C_{14}H_{28}O_2$ Acide tetradecanoique.		113060

Tableau 15 (suite):

24	18:24	149(100), 57(31), 71(15), 58(20), 109(11), 95(10), 85(10), 105(10), 150(10), 123(6).	–	–	–	–
25	18:31	95(100), 82(80), 123(60), 55(51), 69(51), 57(45), 81(48), 83(45), 97(42), 109(33), 71(28), 124(26), 124(25), 200(17), 137(7), 157(5), 170(2), 185(2),	–	–	–	–
26	19:05	95(100), 82, 83(99), 123(68), 57(66), 68(63), 109(38), 87(6), 205(2), 278(6).	–	–		–
27	19:14	91(100), 105(60), 131(50), 117(49), 79(45), 77(44), 145(25), 159(24), 202(10), 188(9), 230(9), 215(5), 173(6).	91(100), 105(71), 117(61), 79(47), 77(45), 55(43), 67(37), 131(35).	$C_{19}H_{30}O_2$ Acide 2,5-octadecadiynoate de methyle.		35988
28	19:28	214(100), 115(76), 156(62), 129(50), 102(50), 76(44), 185(31), 87(25), 143(24), 55(24), 171(21), 199(6), 50(25).	214(100), 199(58), 76(57), 171(50), 115(50), 77(46), 158(42), 50(42), 51(41).	$C_{13}H_{10}O_3$ Naphthalendione,2-hydroxy-3-(1-propenyl)-		9971
29	19:58	73(100), 60(74), 55(54), 129(54), 85(35), 97(34), 115(24), 256(23), 213(14), 157(11), 185(9), 143(6), 199(3), 227(2), 171(9).	73(100), 60(78), 57(60), 55(46), 69(35), 71(35), 129(33), 83(25).	$C_{17}H_{34}O_2$ Acide Heptadecanoïque.		73673
30	20:22	88100), 119(95), 101(75), 55(65), 73(52), 113(26), 185(20), 157(19), 133(19), 145(14), 207(14), 256(14), 171(7), 227(5), 241(6), 284(5).	88(100), 101(70), 55(50), 57(40), 69(23), 73(22), 71(19), 70(15).	$C_{18}H_{36}O_2$ Hexadecanoate d'ethyl.		43659
31	20:33	119(100), 132(76), 145(39), 105(36), 95(20), 55(11), 81(10), 157(4), 199(4).	119(100), 132(62), 105(36), 91(35), 93(23), 120(19), 121(18), 117(17).	$C_{15}H_{22}O$ 6-(p-tolyl)-2-methyl-2-heptenol.		141052
32	20:57	95(100), 81(90), 93(66), 67(47), 107(44), 119, 123(42), 55(34), 134(20), 135(10), 161(12), 187(9), 201(2).	95(100), 81(85), 123(66), 67(64), 119(58), 105(38), 91(37), 93(36).	$C_{15}H_{22}O$ 2,2,6-trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2enyl)-hepta-4,6-dien-3-one.		188728
33	21:59	81(100), 67(96), 95(85), 82(70), 96(64), 55(60), 79(46), 109(44), 111(34), 123(19), 136(9), 150(15), 280(10) , 136(9).	81(100), 67(95), 55(86), 68(74), 95(70), 82(67), 54(60), 69(47).	$C_{19}H_{34}O_2$ 9-octadecynoate de methyle.		36329

Tableau 15 (suite):

37	23:27	230(100), 91(99), 119(90), 105(86), 79(64), 53(54), 132(51), 145(36), 67(32), 163(30), 215(24), 201(15), 185(15).	–	–	–	–
38	25:15	57(100), 71(86), 85(76), 99(34), 113(20), 127(11), 141(6), 155(3).	–	–	–	–
39	25:22	106(100), 82(65), 228(61), 57(55), 123(24), 199(25), 157(21), 172(15), 141(10), 288(7).	–	–	–	–
40	26:26	57(100), 71(85), 85(75), 99(31), 113(20), 127(10), 141(5), 155(2).	57(100), 71(80), 85(72), 43(62), 99(26), 41(25), 55(22), 113(20), 127(14), 69(14).	$C_{24}H_{50}$ Tetracosane		195773
41	26:30	149(100), 167(30), 113(16), 71(16), 279(10).	149(100), 57(32), 167(29), 71(21), 70(18), 150(11), 55(10), 113(10).	$C_{24}H_{38}O_4$ Bis(2-ethyl exyl) phthalate.		43511
42	31:44	69(100), 81(69), 95(24), 121(16), 109(14), 136(14), 149(5).	69(100), 81(62), 93(39), 107(27), 55(23), 68(19), 135(18), 67(18).	$C_{30}H_{50}O$ 1,6,10,14,18,22-tetracosahexaen-3-ol,2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, all-E)-		162138
43	33:57	57(100), 71(85), 85(80), 99(35), 113(22), 218(10), 141(6), 169, 203, 239(1).	57(100), 71(81), 85(51), 113(26),127(25), 99(23), 56(18), 55(17), 70(17), 183(17)	$C_{25}H_{52}$ 2,6,10,14,18-pentamethyl-Eicosane,		51794162
44	34:15	218(100), 203(44), 95(30), 69(26), 107(25), 119(25), 135(20), 189(20), 147(10), 175(7).	218(100), 203(26), 219(18), 189(10), 95(9), 69(8), 109(8), 135(7), 81(6), 207(6).	$C_{30}H_{50}O$ .Beta. –Amyrin.		63149
45	45:14	109(100), 97(90), 189(70), 111(80), 81(55), 135(50), 136(30), 468(14), 181(10), 249(10), 218(5), 408(3).	109(100), 95(99), 55(92), 81(91), 69(90), 107(81), 203(72), 438(69).	$C_{33}H_{54}O_3$ 9,19-cyclolanost-23-en-3-ol,25-methoxy, acetate, (323, βE).		49183

Tableau 16: Résultats de la GC-MS pour l'extrait LB02

N°	t_R (min)	Principaux fragments	Spectre de référence	Formule brute	Formule développée	N°de Nist
1	2:31	69(100), 51(82), 106(50), 79(50), 63(46), 77(40), 100(34), 119(20), 131(14), 151(14), 62(14), 169(3).	–	–	–	–
2	5:47	55(100), 56(99), 120(74), 64(4), 140(2).	–	–	–	–
3	8:30	60(100), 73(96), 57(57), 115(40), 129(33), 98(25), 87 (20), 55(21), 83(13), 45(10).	60(100), 73(88), 57(56), 55(29), 129(25), 98(17).	$C_9H_{18}O_2$ Acide Nonanoique.		21748
4	10:22	73(100), 129(65), 143(40), 147(18), 326(14).	–	–	–	–
5	12:20	277(100), 169(99), 149(46), 69(45), 81(44), 519(21) , 551(21), 109(20).	–	–	–	–
6	13:20	57(100), 71(71), 85(55), 99(20), 113(8), 130(5), 149(3), 169(1), 212(2).	55(100), 43(71), 71(60), 85(55), 41(40), 55(24), 56(19), 99(15), 70(12).	$C_{15}H_{32}$ Pentadecane		107761
7	13:41	281(100), 503(99), 73(80), 504(60), 147(46), 415(25), 327(17).	–	–	–	–
8	14:04	219(100), 57(85), 221(36), 111(29), 234(22), 109(22), 179(17), 83(17), 91(16), 123(14), 137(15), 153(10), 165(13), 179(16), 193(7)	–	–	–	–
9	14:13	149(100), 73(90), 60(76), 51(54), 53(51), 129(45), 85(39), 71(34), 69(30), 115(30), 97(21), 101(20), 177(20), 200(9).	–	–	–	–
10	14:15	149(100), 73(22), 60(20), 177(20), 105(14), 93(10), 129 (10)	–	–	–	–
11	14:54	112(100), 139(45), 84(30), 140(26), 138(20), 212(25), 213(22), 167(19), 156(10), 184(9).	112(100), 139(42), 154(41), 55(28), 69(25), 111(17), 136(17).	$C_{14}H_{22}O_3$ 1,5-dispiro[5,5] undec-3-en-2-one,7-isopropyl,-,10dimethyl		155170
12	15:18	99(100), 157(62), 115(39), 83(15), 203(10), 129(9).	99(100), 86(63), 158(60), 157(35), 55(28), 270(11), 113(10), 211(10).	$C_{13}H_{18}O_6$ Trans-1,9,12-trioadispiro [4,2,4,2]tetradecan-2-one, 6-carbomethoxy		153276
13	15:20	115(100), 157(62), 111(30), 203(25), 129(20), 99(15), 87(16), 156(10), 139(9).	115(100), 157(73), 99(65), 73(36), 71(32), 100(31), 184(28), 142(28), 142(24).	$C_{14}H_{20}O_9$ L,Fucose,2,3,4,5-tetra acetate		31234

Tableau 16 (suite):

14	15:53	108(100), 57(90), 81(86), 71(85), 126(76), 80(70), 79(40), 109(35).	–	–	–	–
15	16:11	55(100), 83(70), 97(66), 57(45), 70(45), 84(34), 111(32), 69(62), 127(15), 138(8), 208(5), 168, 190(1).	55(100), 69(64), 236(61), 83(58), 97(52), 84(44), 98(40), 264(40).	$C_{16}H_{30}O$ Acide Z-7-hexadecanoique.		130908
16	16:45	69(100), 97(75), 112(73), 60(25), 155(14), 185(14), 81(12), 125(9), 224(5), 203(4).	69(100), 97(54), 71(48), 112(45), 57(33), 55(32), 113(16), 239(15).	$C_{21}H_{40}O$ 1-cyclopentyle, hexadecanone.		34490
17	17:13	73(100), 60(74), 129(64), 57(60), 55(51), 71(38), 69(34), 85(30), 97(24), 115(21), 185(21), 228(19), 143(11), 171(9), 199(21), 157(2).	73(100), 60(78), 129(69), 57(59), 284(55), 55(52), 71(50), 69(44), 83(40).	$C_{16}H_{32}O_2$ Acide hexadecanoique.		248533
18	17:53	55(100), 83(71), 69(70), 57(61), 71(53), 111(49), 97(46), 112(44), 105(43), (229(40), 180(36), 129(20), 139(16), 140(15), 129(10), 258(5).	–	–	–	–
19	18:11	69(100), 55(99), 102(94), 85(51), 81(42), 228(21), 129(20), 211(13), 115(10), 185(5), 143(5), 242(4), 199(2).	–	–	–	–
20	18:25	149(100), 57(25), 104(12), 243(10), 223(5).	149(100), 263(29), 57(22), 77(15), 104(15), 41(14), 133(11), 76(9), 56(9), 150(8).	$C_{18}H_{26}O_5$ 1,2-benzen dicarboxylic acid, 2-butoxybutyl ester.		35736
21	19:29	74(100), 87(78), 55(20), 143(15), 270(10), 227(7), 101(7), 129(7), 239(4), 185((3), 199(1).	74(100), 87(70), 55(29), 143(16), 57(15), 75(15), 59(14), 69(14).	$C_{21}H_{38}O_4$ 12-acetylox, 9-octadecenoate de methyle.		69958
22	19:38	149(100), 104(16), 223(9), 76(10), 205(6), 121(5), 65(5).		$C_{16}H_{22}O_4$ Butyl,isobuthyl phtalate.		
23	19:57	73(100), 60(75), 57(61), 129(54), 55(51), 71(45), 83(32), 115(24), 256(26), 69 (22), 213(15), 157(10), 185(10), 171(8), 227(2).	73(100), 60(78), 57(60), 55(46), 69(35), 71(35), 71(35), 129(33), 83(25).	$C_{17}H_{34}O_2$ Acide heptadecanoique.		73673
24	20:10	91(100), 134(65), 135(54), 119(45), 107(35), 242(35), 77(25), 65(20), 256(1).	–	–	–	–
25	20:22	88(100), 101(65), 91(23), 134(17), 55(15), 157(10), 242(10), 69(10), 119(10), 284(8), 185,199,213,256(1).	88(100), 101(70), 55(50), 57(40), 69(23), 73(23), 71(19), 70(15).	$C_{18}H_{38}O_2$ Hexadecanoate d'ethyle.		43659
26	21:45	112(100), 55(76), 57(70), 70(69), 83(65), 97(45), 183(20), 201(10), 125(8), 264(6), 157,138(4).	–	–	–	–
27	22:01	74(100), 87(81), 75(25), 55(20), 143(16), 57(16), 143(16), 57(16), 143(16), 97(10), 129,255,298(7).	74(100), 87(76), 75(23), 57(18), 69(17), 55(17), 298(15), 143(15), 83(14).	$C_{19}H_{38}O_2$ 16-methyle heptadecanoate de methyle.		23226

Tableau 16 (suite) :

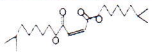
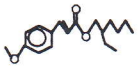
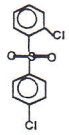
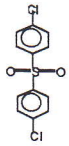
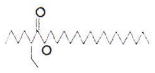
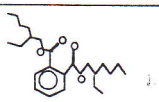
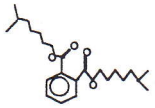
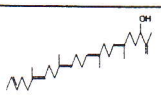
28	22:09	117(100), 57(55), 100(50), 71(45), 70(38), 112(25), 113(30), 99(25), 55(25).	117(100), 57(94), 70 (72), 71(66), 100(58), 55(44), 99(39), 112(36).	$C_{20}H_{36}O_4$ maleate de Diisooctyl.		133262
29	22:14	178(100), 161(55), 134 (22), 133(20), 118(12), 290(7).	178(100), 161(50), 133 (15), 134(14), 179(13), 55(8), 77(8).	$C_{18}H_{26}O_3$ 3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate de 2-ethyle hexyle.		76087
30	22:50	159(100), 11(62), 75(40), 160(35), 71(30), 113(18), 131(15), 286(20), 288(14).	159(100), 286(87), 111(69), 288(62), 75(60), 152(46), 127(41), 99(40), 161 (40).	$C_{12}H_8C_{12}O_2S$ 2,4'-dichloro diphenyl sulphone.		78760
			159(100), 75(81), 111 (73), 161(73), 50(52), 286(45), 288(31), 193 (28), 51(26), 74(25).	$C_{12}H_8C_{12}O_2S$ 1,1'-sulfonyl bis(4-chloro) benzen.		52655
31	24:57	129(100), 56(82), 57(55), 71(40), 112(26), 111(22), 101(20), 285(22), 97(14), 267(10), 241(10), 185(5).	–	–	–	–
32	25:17	57(100), 71(87), 85(78), 97(25), 99(25), 113(15), 127(10), 141(5), 155(4), 168(3), 230(1).	–	–	–	–
33	25:59	145(100), 57(55), 88 (25), 55(24), 69(20), 83(20), (20),127(12), 111(10), 149 (15), 167,224,269,(3),	145(100), 57(77), 55(39), 88(27), 69(25), 83(21), 71(21), 89(21).	$C_{25}H_{48}O_2$ 2-ethyl hexadecanoate d'hexadecyl.		142029
34	26:19	112(100), 57(55), 70(48), 71(45), 83(25), 97(24), 256(12), 239(10), 129(5).	–	–	–	–
35	26:27	71(100), 57(99), 85(90), 99(35), 113(20), 149(10), 127(10).	57(100), 71(80), 58(73), 99(27), 55(22), 113(20), 127(14), 69(14).	$C_{24}H_{50}$ Tetracosane.		195773
36	26:33	149(100), 167(25), 57(24), 71(21), 70(16), 113(15), 279(10).	149(100), 57(32), 167(29), 71(21), 70(18), 150(11), 55(10), 113(10).	$C_{24}H_{38}O_4$ Bis (2-ethylexyl) phthalate		43511
37	28:49	57(100), 71(70), 85(55), 113(41), 131(40), 145(40), 99(35), 55(31), 69(30), 97(30).	–	–	–	–
38	30:07	149(100), 71(32), 127(32),57(28), 293 (22), 69(20), 55(16), 85(17), 167(12).	149(100), 71(38), 57(38), 55(22), 85(21), 69(17), 70(12), 150(10).	$C_{26}H_{42}O_4$ Bis isooctyle phtalate		76115
39	31:40	69(100), 81(65), 149(63), 95(21), 121(16), 55(15), 135(6), 136(16), 137(15), 293(6), 207(2).	69(100), 81(60), 149(51), 55(51), 83(43),57(29).	$C_{30}H_{52}$ 2,6,10,15,19,23-hexamethyl, 2,6,10,14,18-tetracosapentaene		30701
40	31:43	69(100), 81(66), 95(20), 109(12), 121(15), 136(14), 137(13), 123(14), 149(6).	69(100), 81(62), 93(39), 107(27), 55(23), 95(23), 68(19), 135(18), 67(18).	$C_{30}H_{50}O$ 2,6,10,15,19,23-hexamethyl, 1,6,10,14,18,22-tetracosahexaene,3-ol		162138

Tableau 17: Résultats d'analyse par GC-MS de l'extrait MC 01

N°	tr (min)	Principaux fragments	Spectre de référence	Formule brute	Formule développée	N°de nist
1	2:41	69(100), 87(75), 56(40), 100(16), 119(12), 150(6), 45(15), 131, 169(3).	69(100), 87(79), 56(28), 55(17), 84(15).	$C_{10}H_{18}O_2$ 2-butenoat d'hexyle		6638
2	5:18	95(100), 81(60), 108(45), 69(40), 51(25), 83, 183(25), 55(20), 109(30), 152(16), 119(9).	95(100), 81(62), 69(42), 108(41), 152(29), 109(27), 83(27), 67(24), 55(23).	$C_{10}H_{16}O$ camphre		151971
3	15:21	157(100), 115(70), 99(55), 111(15), 203(15), 249(9), 129(9), 57(21).	157(100), 115(61), 127(33), 57(31), 73(22), 55(20), 69(19), 156(17).	$C_{16}H_{30}O_4$ Penta decanoic acid, 3-ethyl-3methyl-,bis(1-methylpropyl) ester		48018
4	15:52	108(100), 81(62), 57(60), 71(57), 126(52), 80(49), 79(27), 109(25), 14(19).	108(100), 81(86), 43(71), 80(68), 93(28), 67(16), 109(13), 79(12).	$C_{10}H_{16}O_2$ Acetate de 1-methyl-Bicyclo[2,2,1]heptan-2-ol.		186014
5	17:13	73(100), 60(75), 129(65), 57(55), 55(51), 85(30), 97(25), 185(21), 115(20), 228(156), 143(12).		$C_{14}H_{28}O_2$ Acide Tetradecanoique.		
6	18:23	149(100), 57(14), 104(10), 223(5), 150(10).	149(100), 57(13), 29(12), 223(10), 150(9), 56(6), 104(5).	$C_{16}H_{22}O_4$ Diisobutyl phtalate		62127
6	18:31	95(100), 68(76), 82(75), 123(62), 81(45), 69(45), 97(40), 109(33), 124(27), 137(9), 149(5).	95(100), 67(78), 68(66), 82(60), 81(54), 41(48), 152(43), 109(39), 69(32), 55(31).	$C_{10}H_{16}O$ Dihydrocarvone		107134
7	18:36	73(100), 60(75), 129(64), 55(52), 57(50), 91(40), 69(33), 97(32), 115(30), 143(24), 242(23), 199(19), 157(11), 185(10), 171(10), 213(4), 228(1).	73(100), 60(87), 43(87), 57(81), 41(73), 55(64), 71(49), 129(46), 69(41), 29(37).	$C_{15}H_{30}O_2$ Acide Pentadecanoique.		221146
8	19:05	95(100), 81(95), 82(90), 123(64), 68(60), 57(52), 55(42), 109(40), 137(10), 278(5), 205(4), 217(2).	–	–	–	–
9	19:28	74(100), 87(85), 143(20), 129(14), 270(10), 101(10), 185(6), 227(10), 171(5), 239, 199, 157(3)	74(100), 87(70), 43(42), 41(33), 55(30), 75(21), 143(19), 57(17), 29(16), 270(15).	$C_{17}H_{34}O_2$ Hexadecanoate de methyle		158970
10	19:37	149(100), 150(10), 104(6), 223(3).	149(100), 150(91), 223(6), 104(5), 76(5), 57(5), 56(3), 205(3).	$C_{16}H_{22}O_4$ Butyle, isobuthyle phtalate		13434
11	19:56	73(100), 60(70), 57(65), 55(60), 129(60), 256(30), 85(35), 83(36), 97(35), 115(25), 213(17).	73(100), 60(78), 43(61), 57(40), 55(46), 69(35), 71(35), 129(33), 83(25).	$C_{17}H_{34}O_2$ Acide margarique		73673

Tableau 17 (suite):

12	20:08	91(100), 134(65), 135(52), 119(45), 107(33), 242(30), 77(22), 65(20).	–	–	–	–
13	20:33	119(100), 132(76), 145(39), 105(35), 123(33), 83(22), 55,95,97,110(20).	119(100), 132(62), 105(36), 91(35), 43(29), 41(27), 93,120(19), 121(18), 117(17).	$C_{15}H_{22}O$ 6-(p-Tolyl)-2-methyl-2-heptenol.		141052
14	21:03	94(100), 93(80), 121(86), 79(54), 111(50), 230(43), 53(22), 107(18), 154(29), 248(8), 202(5).	94(100), 121(76), 93(72), 43(68), 122(59), 202(39), 107(28), 119(28), 95(26), 79(25).	$C_{17}H_{26}O_2$ acetate de-santanol.		132994
15	21:58	81(100), 67(96), 95(90), 96(70), 82(70), 79(55), 109(55), 55(49), 123(22).	81(100), 67(96), 55(87), 95(74), 41(72), 68(67), 54(62), 82(58), 96(53), 43(52).	$C_{19}H_{34}O_2$ 10-octadecynoate de methyl.		36727
16	22:09	117(100), 57(65), 55(46), 71(55), 100(46), 83(40), 132(5).	117(100), 57(94), 70(72), 71(66), 100(58), 41(52), 43(48), 55(44), 99(39), 112(36).	$C_{20}H_{36}O_4$ maleate de Diisooctyl.		133262
17	22:24	73(100), 57(80), 55(70), 60(69), 129(66), 71(53), 69(52), 97(46), 83,85(45), 284(25).	73(100), 60(78), 129(69), 57(59), 43(58), 284(55), 55(52), 71(50), 69(44), 83(40).	$C_{18}H_{36}O_2$ Acide stearique.		248533
18	23:05	121(100), 105(67), 91(45), 69(30), 163(23), 228(18), 211(15), 143(10), 183(5), 245,288(1).	–	–	–	–
19	23:26	230(100), 119(85), 91(83), 107(73), 105(72), 9365), 79(51), 55(41), 133(40), 145(26), 159(23), 215(20), 174(15), 201(14), 187(14).	–	–	–	–
20	24:06	120(100), 91(85), 105(65), 147(28), 226(25), 244(20), 53(18), 201(18), 183(14), 262(10), 165(5).	–	–	–	–
21	25:22	106(100), 288(65), 91(55), 67(25), 199(25), 157(20), 131(20), 172(15).	–	–	–	–
22	25:59	149(100), 167(25), 55(16), 83(15), 249(5).	149(100), 167(31), 55(19), 150(14), 41(11), 83(7), 67(7), 76(5), 249(5), 104(4).	$C_{20}H_{26}O_4$ Dicyclohexyl phtalate		250710
23	26:33	149(100), 167(30), 55(26), 71(21), 113(19), 279(9)	149(100), 57(32), 167(29), 43(21), 71(21), 70(18), 150(12), 55(10) .	$C_{24}H_{38}O_4$ Bis(2-ethyl hexyl) phtalate.		43511
24	31:42	69(100), 81(65), 95(22), 121(16), 149(15), 137(12), 109(11), 55(5).	69(100), 81(62), 93(39), 107(27), 55(23), 68(19), 135(18), 67(18).	$C_{30}H_{50}O$ 2,6,10,15,19,23-hexamethyl, 1,6,10,14,18,22-tetracosahexaene,3-ol		162138

Tableau 17 (suite):

12	20:08	91(100), 134(65), 135(52), 119(45), 107(33), 242(30), 77(22), 65(20).	–	–	–	–
13	20:33	119(100), 132(76), 145(39), 105(35), 123(33), 83(22), 55,95,97,110(20).	119(100), 132(62), 105(36), 91(35), 43(29), 41(27), 93,120(19), 121(18), 117(17).	$C_{15}H_{22}O$ 6-(p-Tolyl)-2-methyl-2-heptenol.		141052
14	21:03	94(100), 93(80), 121(86), 79(54), 111(50), 230(43), 53(22), 107(18), 154(29), 248(8), 202(5).	94(100), 121(76), 93(72), 43(68), 122(59), 202(39), 107(28), 119(28), 95(26), 79(25).	$C_{17}H_{26}O_2$ acetate de-santanol.		132994
15	21:58	81(100), 67(96), 95(90), 96(70), 82(70), 79(55), 109(55), 55(49), 123(22).	81(100), 67(96), 55(87), 95(74), 41(72), 68(67), 54(62), 82(58), 96(53), 43(52).	$C_{19}H_{34}O_2$ 10-octadecynoate de methyl.		36727
16	22:09	117(100), 57(65), 55(46), 71(55), 100(46), 83(40), 132(5).	117(100), 57(94), 70(72), 71(66), 100(58), 41(52), 43(48), 55(44), 99(39), 112(36).	$C_{20}H_{36}O_4$ maleate de Diisooctyl.		133262
17	22:24	73(100), 57(80), 55(70), 60(69), 129(66), 71(53), 69(52), 97(46), 83,85(45), 284(25).	73(100), 60(78), 129(69), 57(59), 43(58), 284(55), 55(52), 71(50), 69(44), 83(40).	$C_{18}H_{36}O_2$ Acide stearique.		248533
18	23:05	121(100), 105(67), 91(45), 69(30), 163(23), 228(18), 211(15), 143(10), 183(5), 245,288(1).	–	–	–	–
19	23:26	230(100), 119(85), 91(83), 107(73), 105(72), 9365), 79(51), 55(41), 133(40), 145(26), 159(23), 215(20), 174(15), 201(14), 187(14).	–	–	–	–
20	24:06	120(100), 91(85), 105(65), 147(28), 226(25), 244(20), 53(18), 201(18), 183(14), 262(10), 165(5).	–	–	–	–
21	25:22	106(100), 288(65), 91(55), 67(25), 199(25), 157(20), 131(20), 172(15).	–	–	–	–
22	25:59	149(100), 167(25), 55(16), 83(15), 249(5).	149(100), 167(31), 55(19), 150(14), 41(11), 83(7), 67(7), 76(5), 249(5), 104(4).	$C_{20}H_{26}O_4$ Dicyclohexyl phtalate		250710
23	26:33	149(100), 167(30), 55(26), 71(21), 113(19), 279(9)	149(100), 57(32), 167(29), 43(21), 71(21), 70(18), 150(12), 55(10) .	$C_{24}H_{38}O_4$ Bis(2-ethyl hexyl) phtalate.		43511
24	31:42	69(100), 81(65), 95(22), 121(16), 149(15), 137(12), 109(11), 55(5).	69(100), 81(62), 93(39), 107(27), 55(23), 68(19), 135(18), 67(18).	$C_{30}H_{50}O$ 2,6,10,15,19,23-hexamethyl, 1,6,10,14,18,22-tetracosahexaene,3-ol		162138

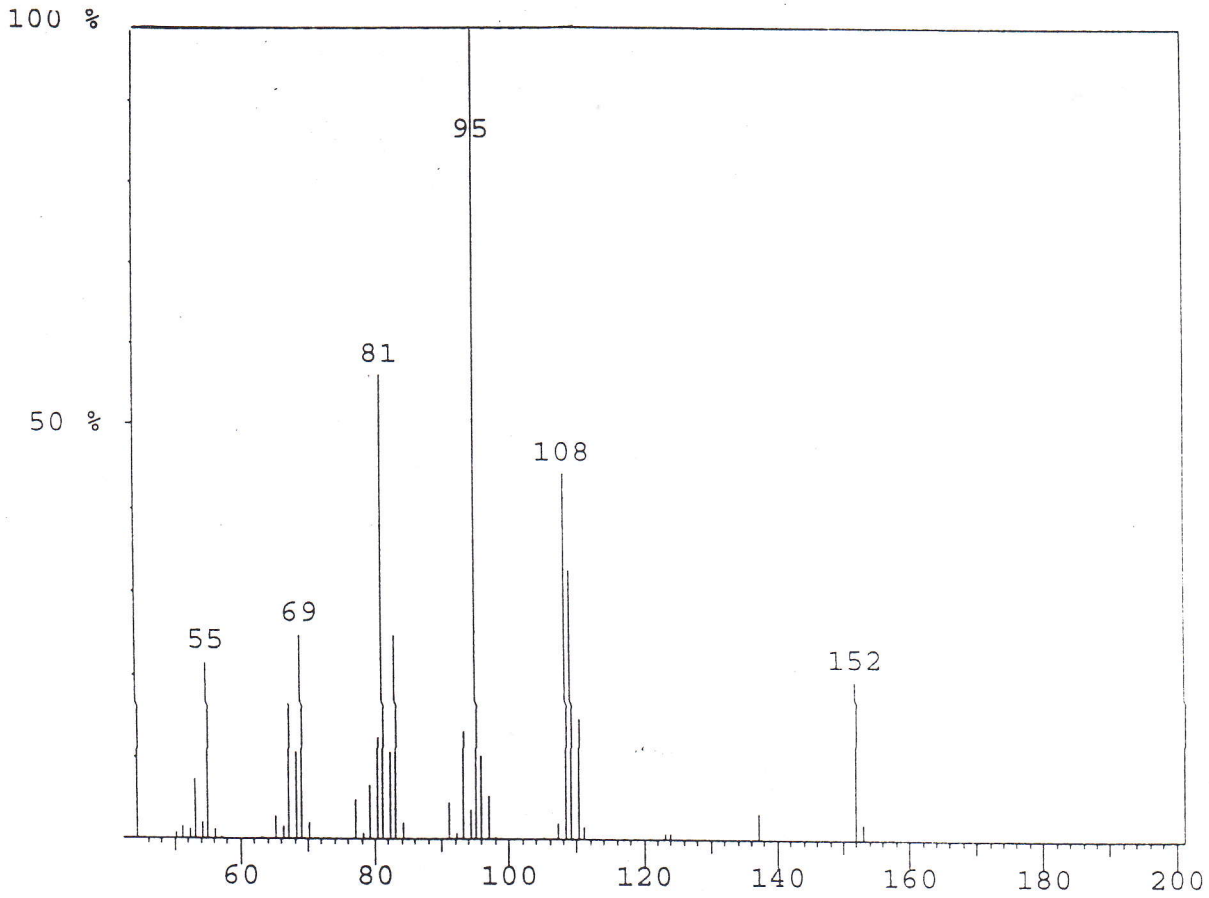


Figure 14 : spectre de masse du **Camphre**.

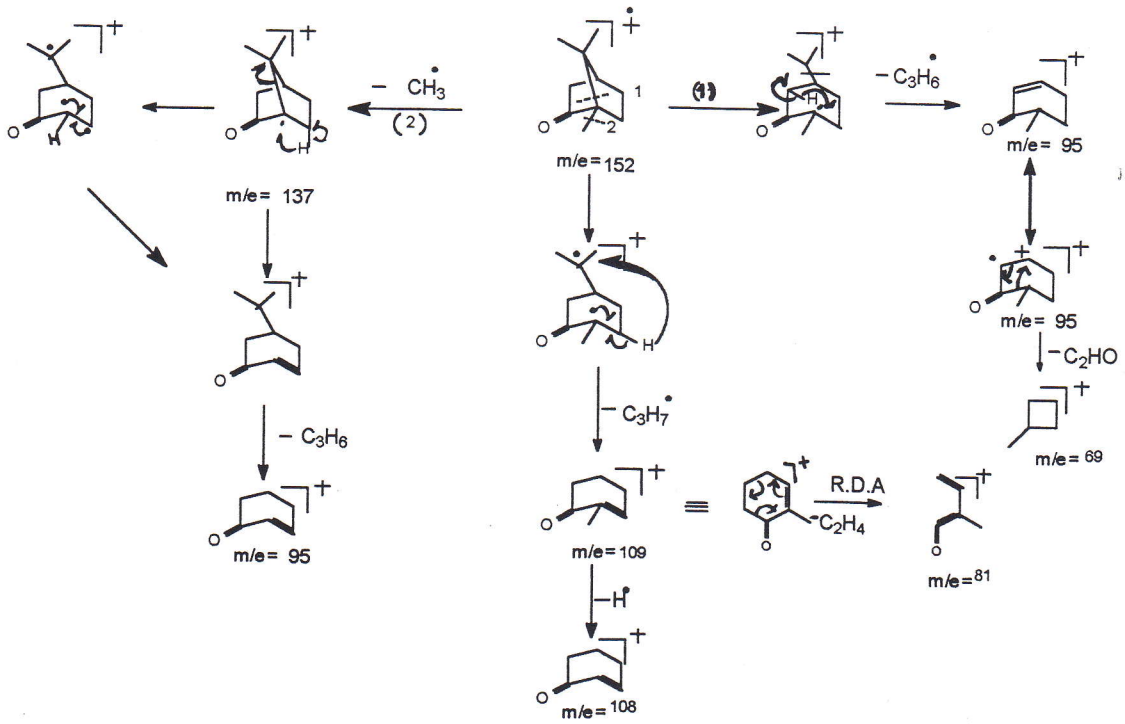


Figure 11 : Schéma de fragmentations proposés pour la molécule du **Camphre**

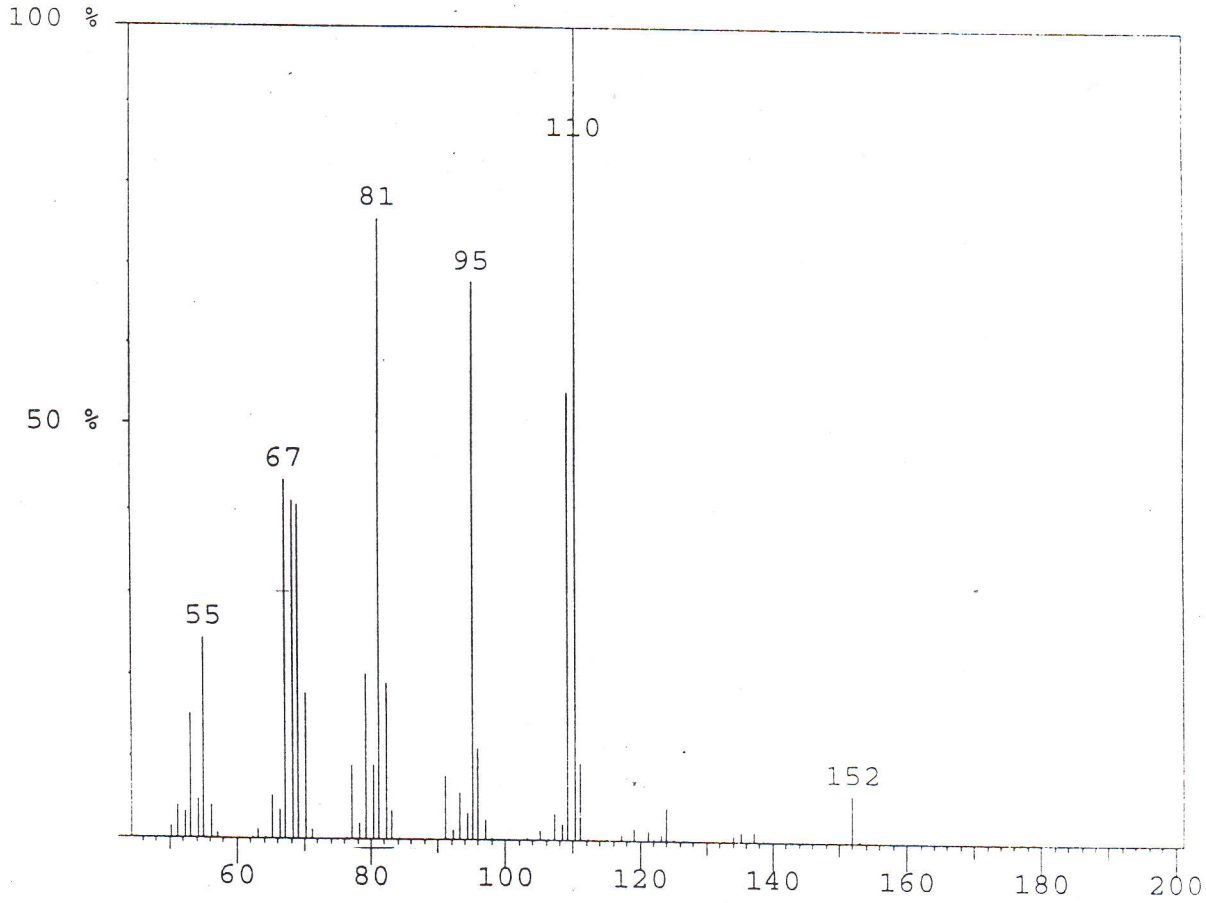


Figure 15 : spectre de masse du **Thujone**.

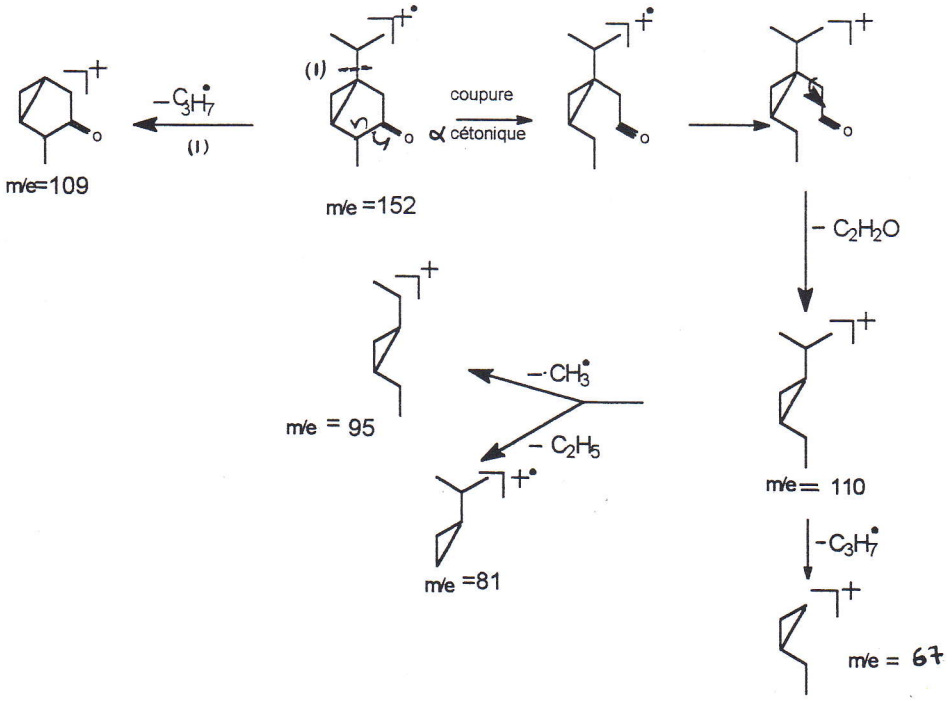


Figure 12 : Schéma de fragmentations proposés pour la molécule du **Thujone**.

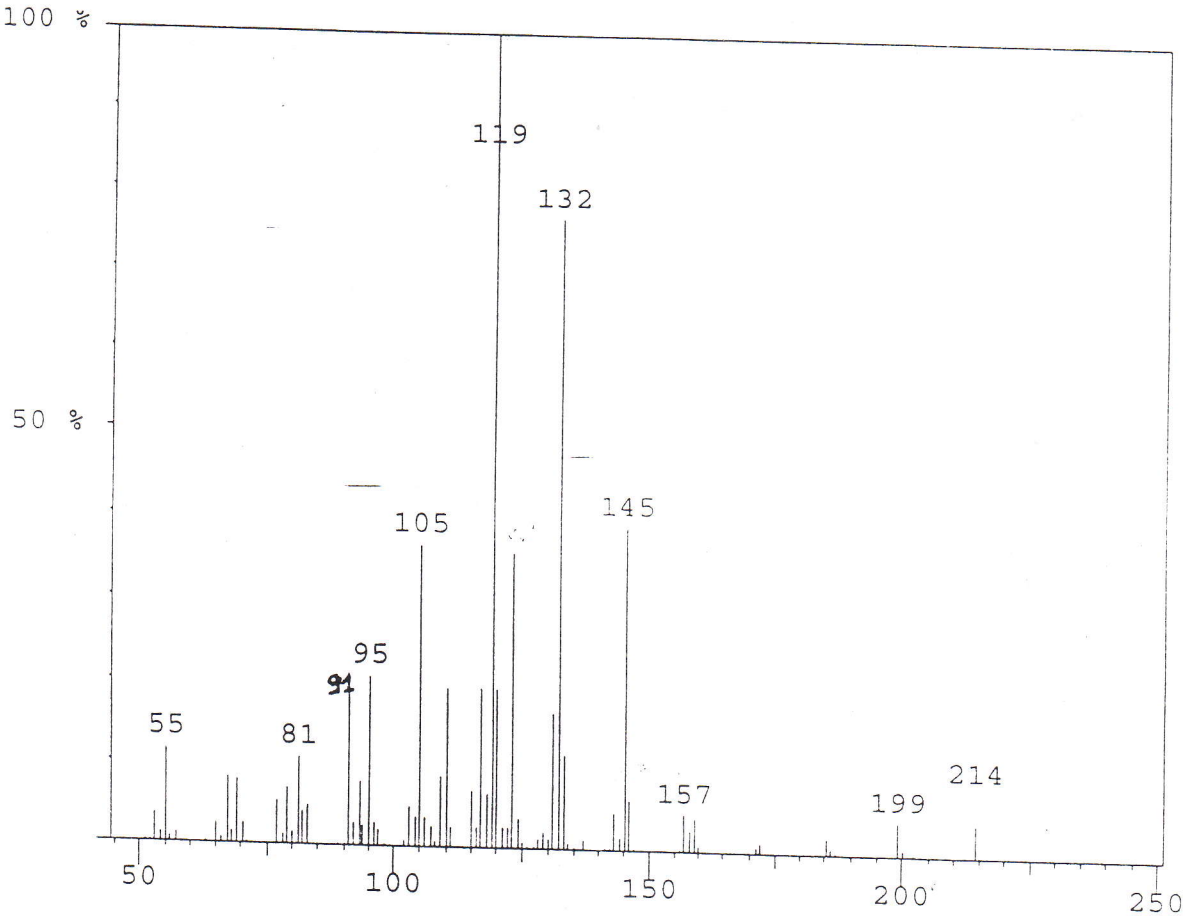


Figure 16 : spectre de masse du 6-(p-Tolyl) 2- methyl-2-heptenol

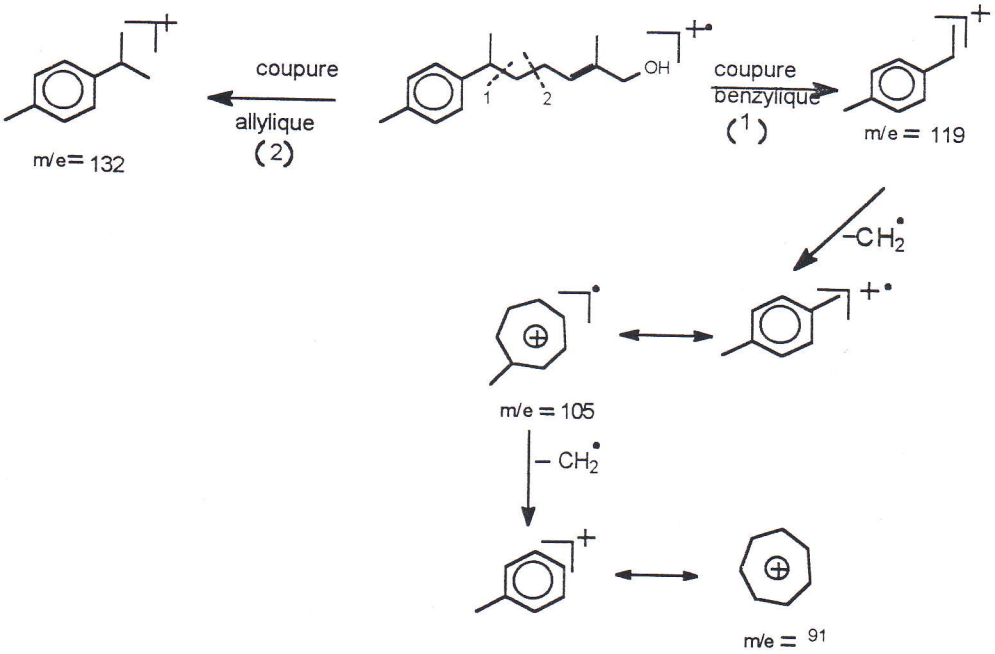


Figure 13 : Schéma de fragmentations proposés pour la molécule du **6-(p-Tolyl) 2-Methyl-2-heptenol** .

IV. 4. Conclusion :

L'analyse par GC-MS des trois extraits a permis l'identification de nombreux composés organiques contenus dans la plante *Cotula cinerea*
Les substances terpéniques, les acides et les esters gras constituent la majorité de ces composés. Parmi les molécules identifiées nous trouvons certaines qui ont confirmé leurs présence dans la composition chimique de la plante *Cotula cinerea*, en se présentant dans deux extraits ou parfois dans les trois extraits aux mêmes temps de rétention.
Comme c'est le cas des composés:

- Le camphre dans l'extraitLX04 et l'extrait MC01.
- L'ester $C_{20}H_{36}O_4$ dans les extraits MC01 et LB02.
- L'alcool $C_{15}H_{22}O$ dans l'extrait LX04 et l'extrait MC01.
- L'acide stéarique, l'acide margarique, les alcools $C_{30}H_{50}O$ et $C_{30}H_{52}O$ se trouvent dans les trois extraits.

Aucun composé flavonique n'a pu être mis en évidence en raison de la non conformité des conditions opératoires de la Chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour ce type de molécules (non volatiles).

Notons aussi que la majorité des composés identifiés (dont les temps de rétention sont soulignés dans les tableaux 15, 16, 17) sont, à notre connaissance, nouveaux.

Par ailleurs d'autres composés restent encore à identifier dans la mesure ou des étalons seraient disponibles et les bibliothèques de spectres de masses mises à jour.

CHAPITRE V

Analyses par LC-UV et LC-MS-ESI

V-1. Introduction :

Actuellement, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP = HPLC) se présente comme la meilleure technique et la plus efficace dans la séparation et l'analyse des extraits naturels complexes, notamment ceux constitués de composés organiques non volatils ou thermodégradables. Cela est dû à son excellente sélectivité, sa haute sensibilité et à sa rapidité..[64]

Les flavonoides, présentant une importante famille de substances naturelles non volatils, sont largement analysés par cette technique, aussi bien quantitativement que qualitativement. [3, 65-67]...

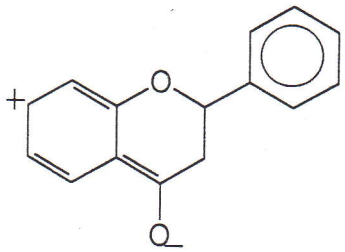
Les deux modes de polarité, de phases normale et inversée, peuvent être utilisés dans les analyses des flavonoides par cette méthode chromatographique, c'est à dire NP-HPLC et RP-HPLC, où leur rétention est prédominée, respectivement, par le phénomène d'adsorption [68].

Les conditions opératoires qui doivent être utilisées varient en fonction de leurs natures. Habituellement, en NP-HPLC, le gel de silice pur est utilisé comme phase stationnaire avec des phases mobiles de polarité moyenne ou faible [69-71]. Où une variété de solvants organiques est impliquée.

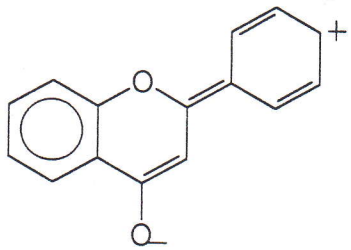
Dans l'autre mode de polarité, les conditions chromatographiques utilisées sont la silice greffée d'une chaîne alkyle C-18 ou C-8, comme phase stationnaire et les éluants eau- méthanol, eau- acetonitrile, parfois acidifiés. Ces conditions semblent être plus utilisées que celles du cas précédent [4, 64]. En effet, la majorité des publications scientifiques les adoptent.[28, 39, 64-66]....
Cela revient probablement à sa simplicité, à son faible coût de revient et à la réduction des dangers et des risques de toxicité relatifs aux solvants organiques.

L'évolution des techniques de détection et d'identification ont permis à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) d'être couplée à la plupart d'entre elles, notamment la spectroscopie UV et la spectrométrie de masse.

Le couplage HPLC-UV/VIS est la méthode de base dans la séparation et l'analyse des flavonoides, cela est interprété par les particularités que présentent ces molécules organiques naturelles dans cette région du champ électromagnétique et plus précisément entre 200nm et 400nm, où ils ont la propriété de présenter deux bandes caractéristiques d'absorption dans leurs spectre UV.
La bande (II) dans la région de 230nm à 285nm, et la bande (I) dans la région de300nm à 400nm.[4, 7], Dû respectivement à une absorption du cycle cinnamoyle et une autre de celui du benzoyle.



Forme limite du benzoyle.



Forme limite du cinnamoyle.

Dans le cadre de notre travail nous avons utilisé ce type de couplage pour l'analyse des échantillons : A, B, Ac2, Ac3, Bu2, Bu3, D.

En l'absence de données et d'étalons de références, l'identification de tels composés organiques dans les mélanges ou extraits naturels, ne peut se faire sans avoir recours aux techniques spectrométriques telles que la spectrométrie de masse[72].
Et pour pouvoir la faire, il faut produire des ions en phase gazeuse, ce qui est aisément réalisable en couplage GC-MS, du fait que les constituants d'un mélange après leurs séparation par GC sont déjà dans l'état gazeux avant d'être introduits dans le spectromètre de masse.

Mais le couplage de la chromatographie liquide (LC) est plus délicat, car la LC est généralement utilisé pour séparer des composés non volatils ou thermodégradables (comme il a été suscité). Le problème est compliqué encore par la nécessité de se débarrasser de la phase mobile, et la plus importante de ces difficultés est celle d'interface et ce, en raison de la grande différence de pression qui existe entre la sortie de la colonne chromatographique et la source du spectromètre de masse.
Par conséquent, il est nécessaire d'établir des méthodes pour faire face à ces problèmes techniques [73].

Actuellement, plusieurs de ces méthodes de couplage (LC-MS) sont réalisables, parmi les quelles nous citons :
La méthode qui utilise l'interface particle Beam (faisceau de particules, PB)[74], et celles dont l'ionisation est réalisée par :

- Bombardement d'atomes accélérés (FAB) [75, 76].
- Le thermospray (TSP)[77].
- Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)[78,79].
- L'electrospray (ESI) (électronébuliseur), et l'ionspray.[80]

Dans notre travail la méthode de couplage LC-MS-ESI en mode d'ionisation positif et négatif, est appliqué sur les même échantillons.

L'électrospay est une technique récente [81-84]. Sa capacité d'analyser des molécules de poids moléculaire très élevé, est un des plus importants avantages qu'elle

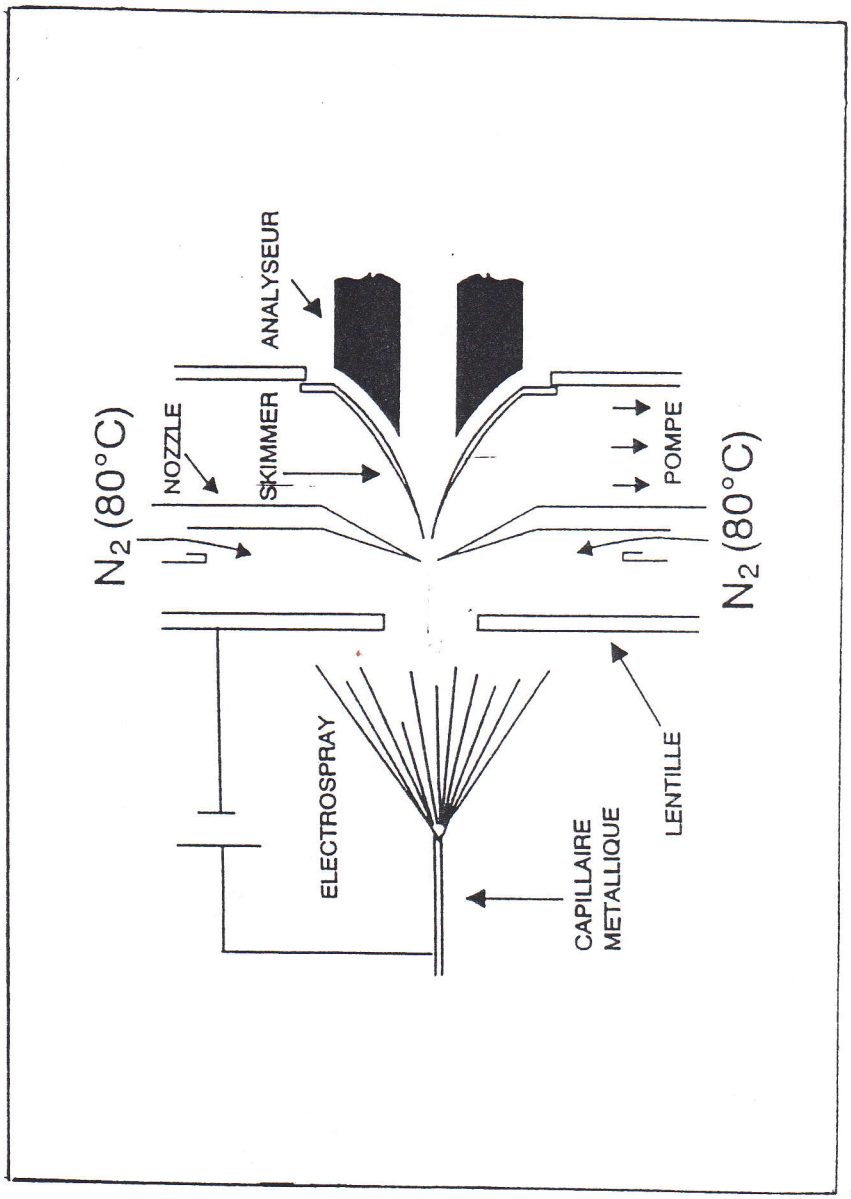


Figure 17 : Schéma d'une source Electrospray.

présente ; en outre, elle peut accepter des débits allant du nl/min à 1ml/min, comme elle est plus dépendante de la concentration que la quantité injectée…
Ce type de couplage est utilisé dans plusieurs domaines de recherches, (biochimie, chimie, analyse des substances naturelles,….). la figure 17 présente le schéma d'une source électrospary [85].

Les flavonoides, en tant que métabolites secondaires de poids moléculaires relativement important, ils sont analysés avec succès par cette technique moderne[86-88]. Ce type d'ionisation doux, en analysant ces substances, montre sur leurs spectre de masse, principalement des ions protonés (positifs) ou déprotonés (négatifs), selon le cas, comme pic de base et avec peu d'ions de fragmentations [89-92].
Mais la masse moléculaire, comme seule information, ne suffit pas pour la détermination structurale, et pour avoir plus d'informations, il s'avère nécessaire de produire plus de fragments, en utilisant cette technique couplée à la spectrométrie de masse en tandem [84, 89, 92-94].

V-2. Résultats et discussions :

Dans un premier temps, les échantillons : Ac2, Ac3, Bu2, Bu3, D, sont analysés par l'HPLC-UV sous les conditions chromatographiques (I) et (II).
Sous les même conditions, ils sont ensuite analysés par la LC-MS-ESI en mode d'ionisation positif. Les chromatogrammes obtenus pour les extraits Ac2 et D, sont représentés sur les figures 18, 19, 20 et 21.

En deuxième lieu, nous avons analysés les échantillons : A, B, Ac2, par l'HPLC-UV sous les conditions chromatographiques (III) en utilisant cette fois la détection UV à barrette de diode calée sur $\lambda = (280+/- 40)$ nm.
Puis, sous les même conditions (III), ces échantillons sont analysés par la LC-MS en utilisant la même méthode d'ionisation, seulement dans ce cas, les deux modes d'ionisation : positif (ES^+) et négatif (ES^-) sont utilisés.

Les figures 22 et 23. représentent les chromatogrammes résultants de la séparation des deux échantillons Ac2 et B par HPLC-UV, avec ceux issus après l'ionisation ES^+ et ES^- pour chacun des extraits analysés.
Les différentes séparations obtenues sont acceptables dans l'ensemble.

Pour les extraits Ac2, Ac3 :

Les séparations obtenues en utilisant le mélange eau-acétonitrile, du point de vue nombre de pics, est meilleure que celle obtenues par le mélange eau-méthanol, mais la résolution dans le dernier cas est plus satisfaisante. En effet, elle a montré deux catégories de composés, la première est constituée de composés qui ont plus d'affinité pour la phase mobile, et l'autre représente ceux très retenues par la phase stationnaire (C-18).

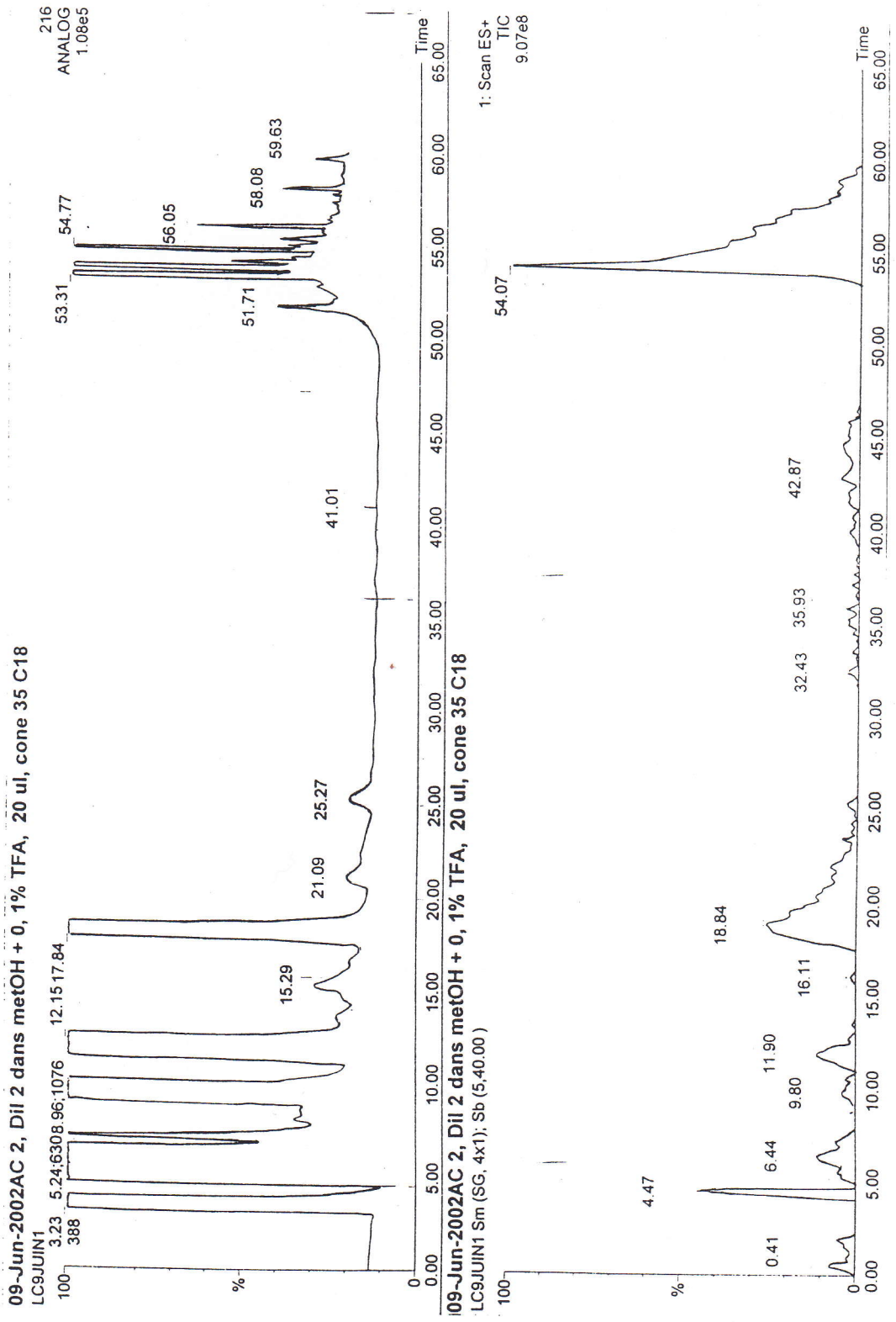


Figure 18 : chromatogramme de l'extrait Ac2 obtenu par couplage LC (UV-MS) en gradient d'élution (I). Phase mobile eau-acétonitrile sur colonne RP-18.

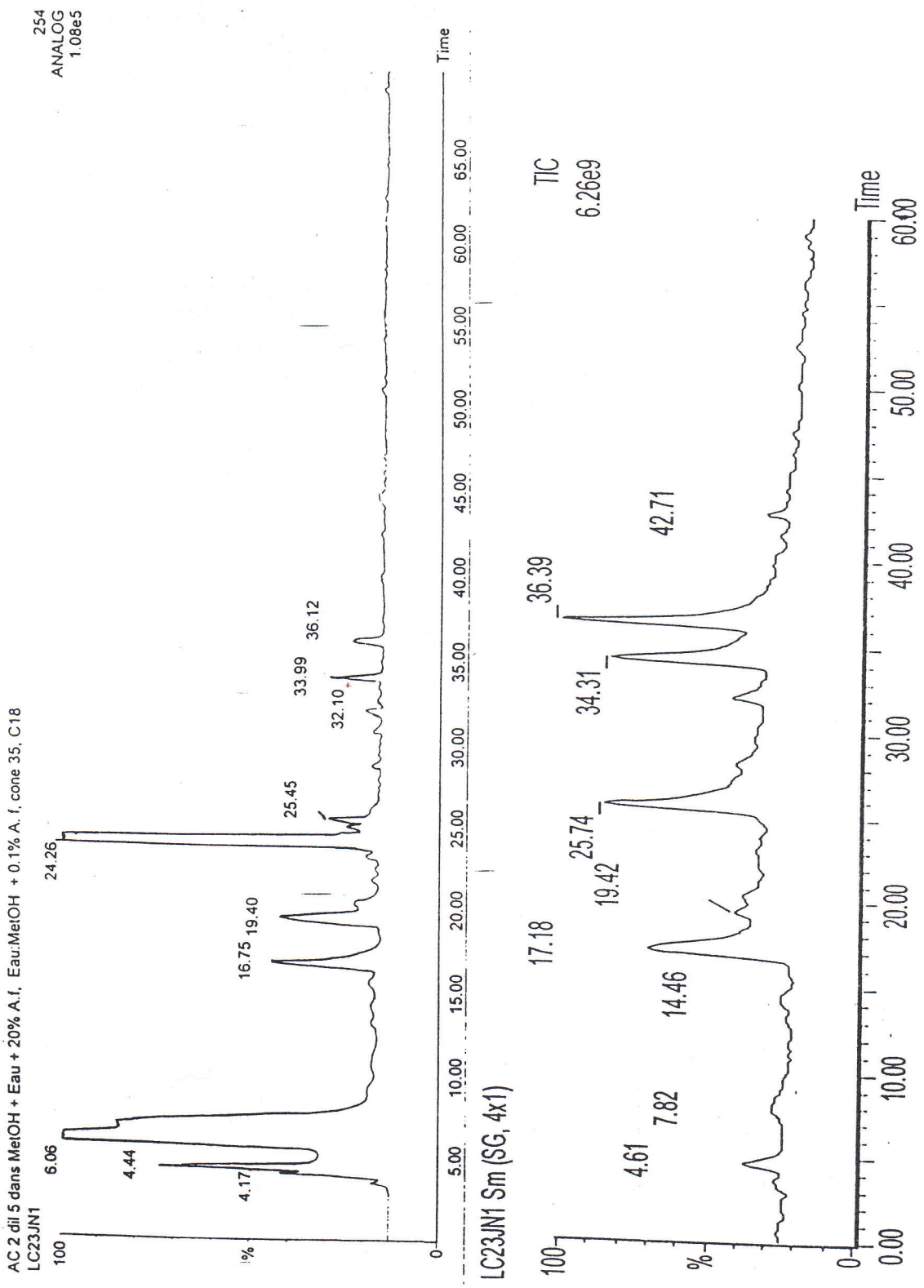


Figure 19 : chromatogramme de l'extrait Ac2 obtenu par couplage LC (UV-MS) en gradient d'élution (II).
Phase mobile eau-methanol sur colonne RP-18.

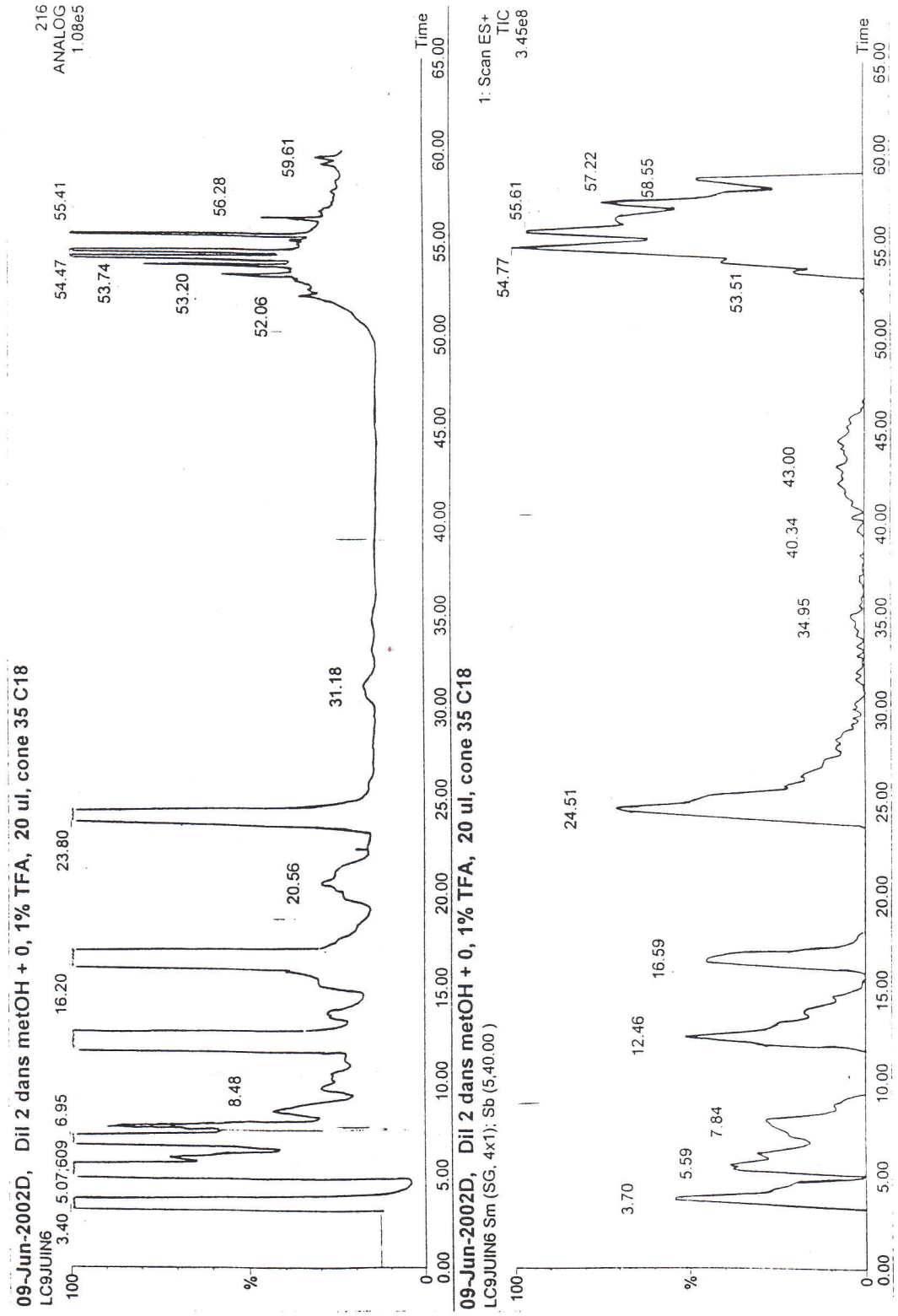


Figure 20 : chromatogramme de l'extrait D obtenu par couplage LC (UV-MS) en gradient d'élution (1). Phase mobile eau-acetonitrile sur colonne RP-18.

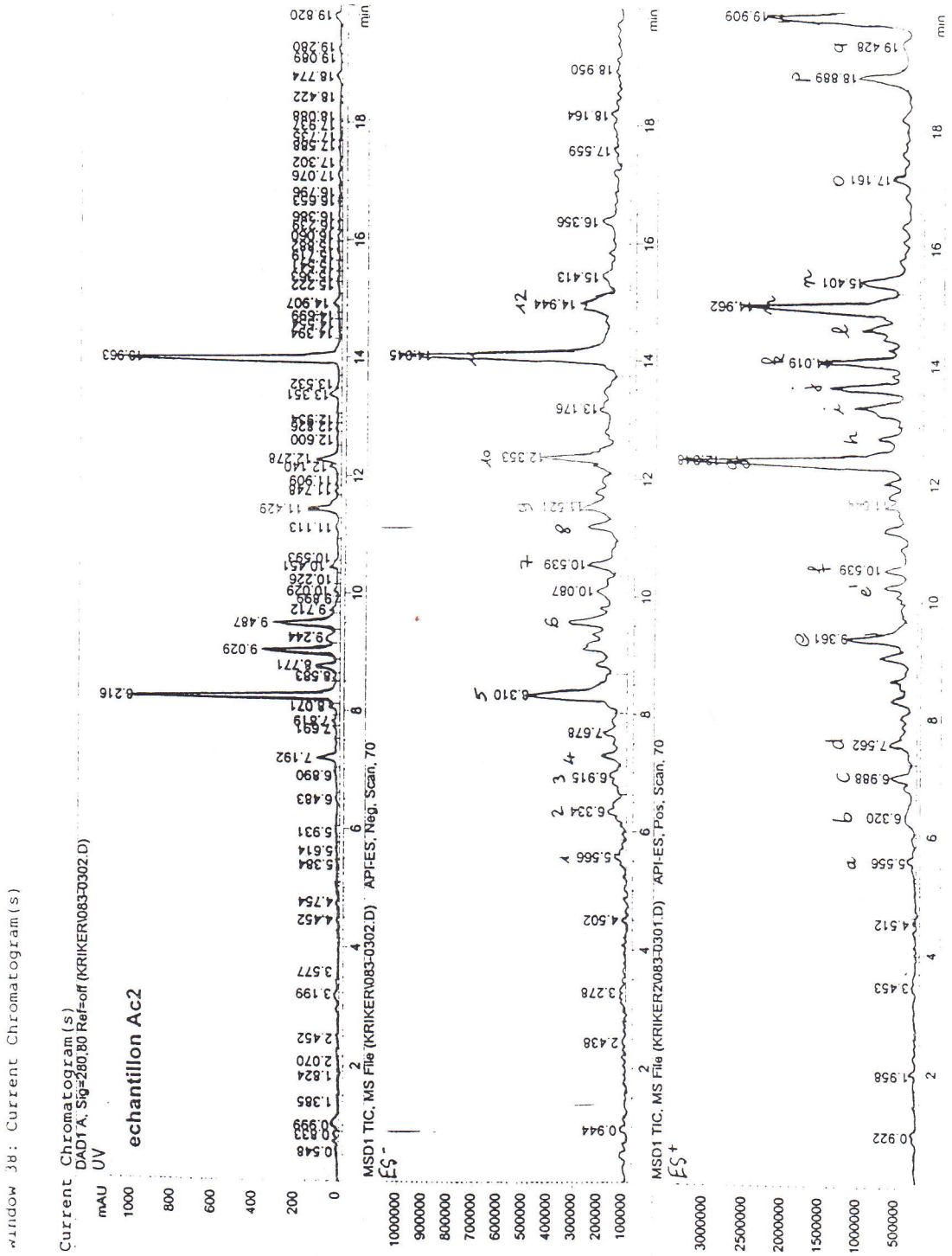


Figure 22 : chromatogramme de l'extrait Ac2 obtenu par couplage LC (UV-MS) en gradient d'élution (HP).
Phase mobile eau-acetonitrile sur colonne RP-18.

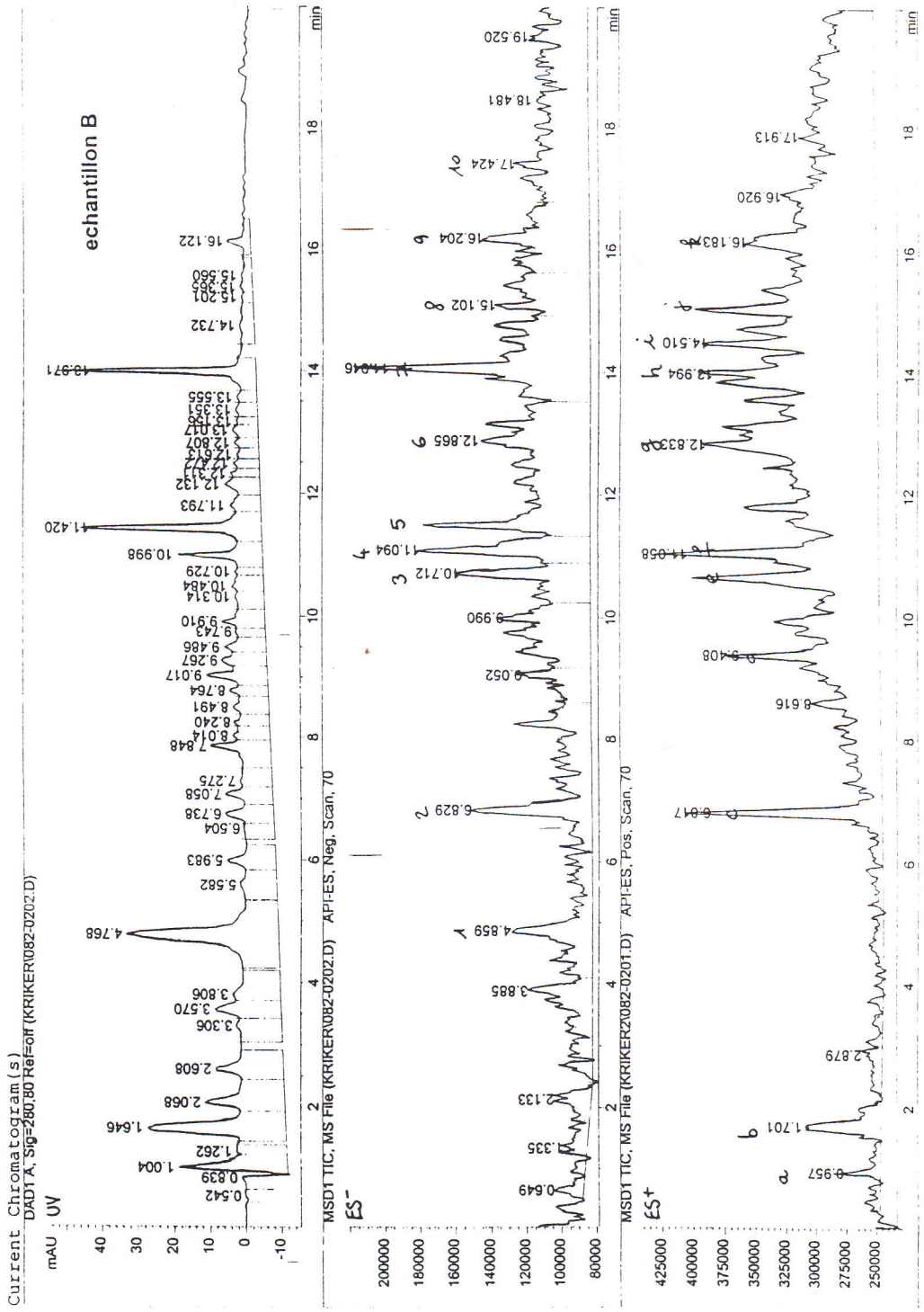


Figure 23 : chromatogramme de l'extrait B obtenu par couplage LC (UV-MS) en gradient d'élution (III).
Phase mobile eau-acetonitrile sur colonne RP-18.

Après l'ionisation des échantillons, les chromatogrammes obtenus sous les conditions (I) et (II) n'ont presque pas changé (L'ESI^+ n'a pas dégradé la séparation par l'HPLC-UV), notamment ceux issus de l'élution sous les conditions chromatographiques (II).

Pour les extraits Bu2, Bu3 :

Les fleurs se sont présentées plus riches en composés séparés et cela sous les conditions (I) et (II).
Malgré le peu de pics apparus sur les chromatogrammes issus de l'analyse HPLC-UV pour ces deux extraits, l'ionisation en mode positif ESI^+ a complètement changé les deux chromatogrammes correspondants par HPLC-UV, en faisant apparaître une densité de pics, surtout sous les conditions (II).

Pour l'extrait D :

Une densité de pics est apparue sur les chromatogrammes obtenus de l'analyse par HPLC-UV, de même, après l'ionisation ESI^+ en utilisant les deux conditions chromatographiques. La phase mobile H_2O / CH_3CN, comme c'est déjà constaté plus haut, a élué deux groupes distincts de constituants, chacun renferme des composés qui sont proches en propriétés chimiques et physiques.

Les conditions III consistent en la détection par UV à barrette de diodes et l'utilisation des deux modes d'ionisation ES^-, ES^+.
L'analyse par HPLC-UV des échantillons A, B, Ac2 a fait apparaître plusieurs constituants.
L'ionisation en mode positif n'a pas dégradé ces séparations, mais elle les a enrichies, notamment après 20 min d'élution ; de même pour l' ES^-, seulement peu de changements sont remarqués. D'après ce résultat, nous avons constaté que l' ES^+ est plus sensible, sous ces conditions.

Plusieurs composés apparaissent dans les trois extraits avec ces couplages LC-MS, parmi lesquels nous citons les composés susceptibles d'être confirmés : la lutéoline, l'apigénine, la quercétine et quelques glycosides. Une illustration du spectre de masse correspondant à chacun de ces composés et à des glycosides, est représentée dans les figures 24, 25, 26 et 27, respectivement.

En comparant les deux extraits A et B issus de la même méthode d'extraction, nous constatons que la composition de l'extrait A (issue des feuilles) est plus riche en constituants, confirmant ainsi les résultas de la chromatographie sur papier et sur couche mince.

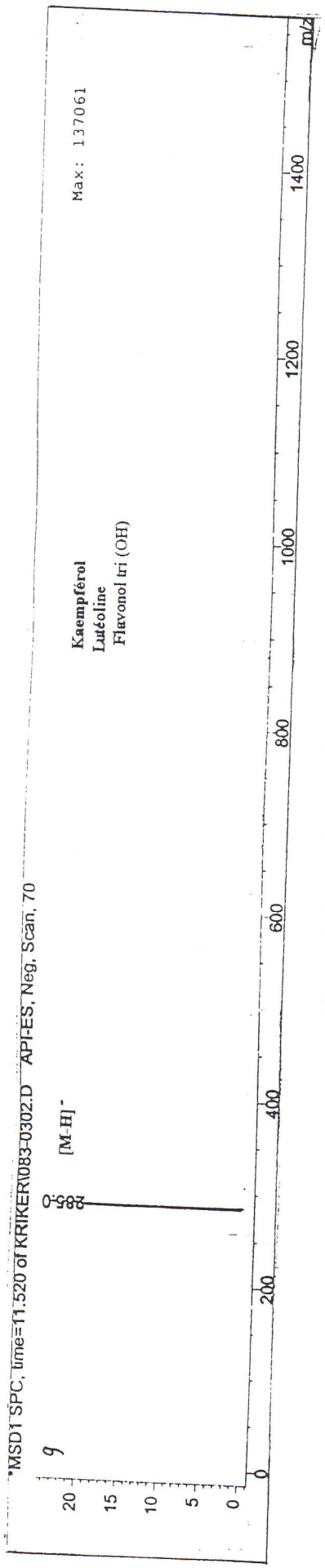


Figure 24 : Spectre de masse du composé proposé.

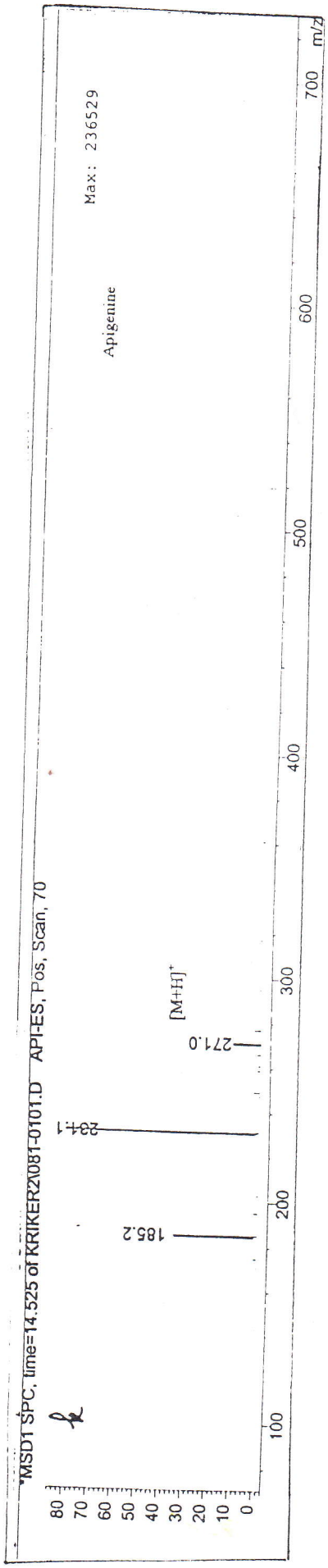


Figure 25(a) : Spectre de masse du composé proposé.

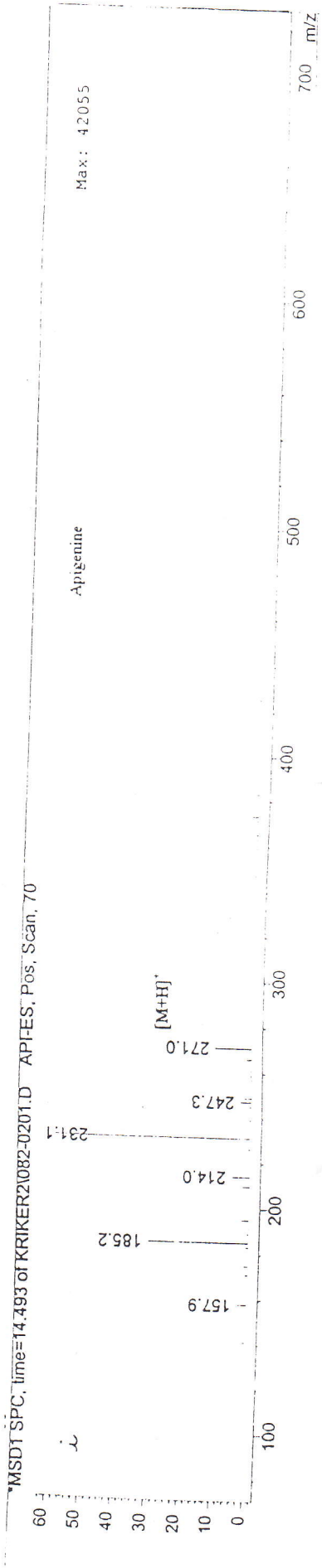


Figure 25(b) : Spectre de masse du composé proposé.

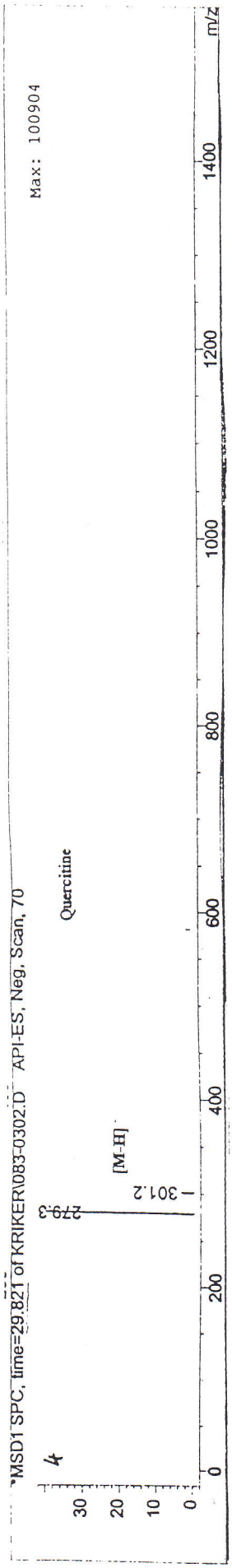


Figure 26 : Spectre de masse du composé proposé.

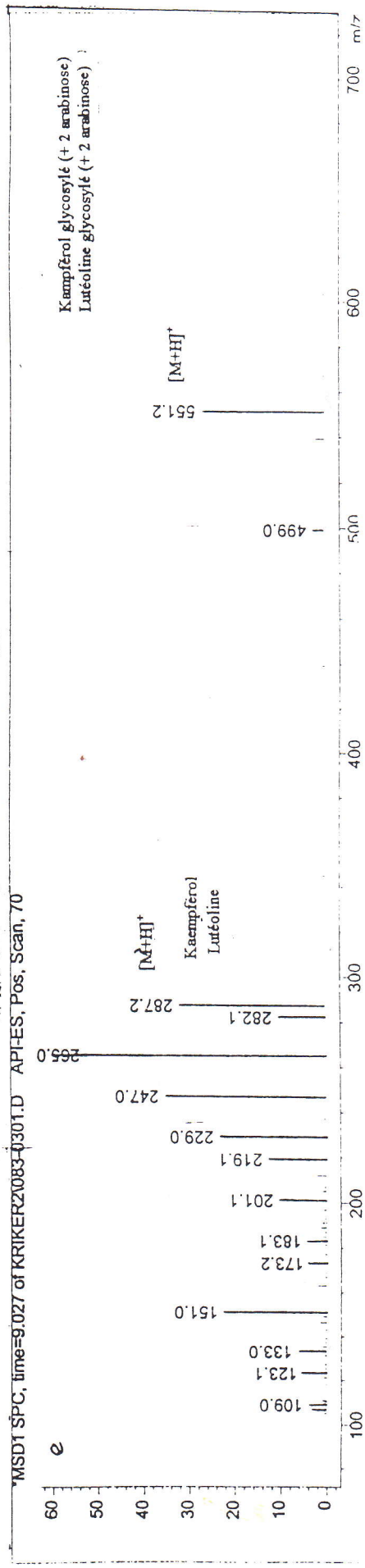


Figure 27(a) : Spectre de masse du composé proposé.

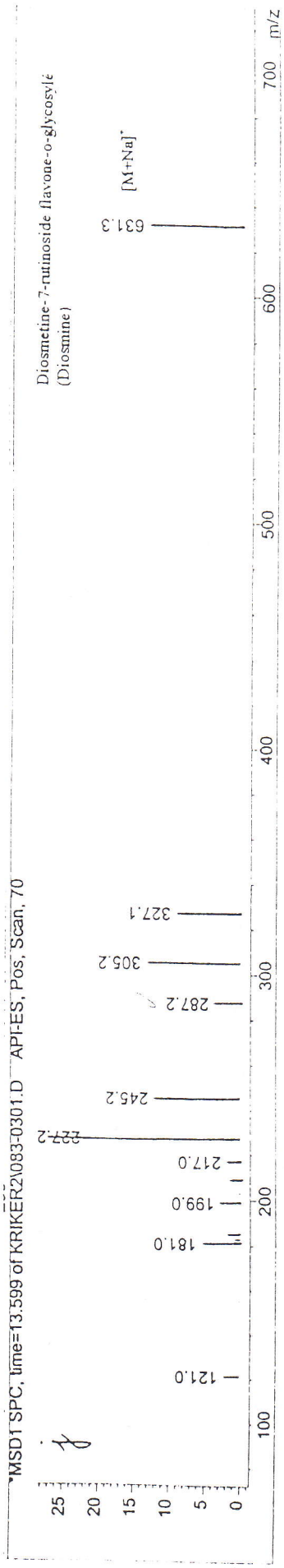


Figure 27(b) : Spectre de masse du composé proposé.

V-3. Conclusion :

La séparation par l'HPLC en utilisant la détection UV, que ce soit simple ou à barrettes de diodes, a présenté une composition très complexe pour les extraits issus des différents organes de la plante, ce qui confirme les résultats obtenus par la chromatographie sur papier et sur couche mince.

Bien que les résultats des séparations des flavonoides présents dans les échantillons analysés par HPLC-UV soient satisfaisants, il s'est avéré un peu difficile de confirmer des identifications pour ces composés en utilisant un seul mode de détection MS avec une technique d'ionisation assez douce. Mais en combinant les différentes techniques et en réalisant par la même occasion des bibliothèques de spectres de masses, on peut aboutir à des résultats d'analyse très performants.

V-4. Partie expérimentale :

Conditions I :
Chromatographe (LC) Hewlett Packard model 1100.
Détection de masse en mode d'ionisation ESI^+ sur la gamme (100-600) et (70-800).
Détection UV à λ=216nm.
Colonne Kromasil 100 A° C18 5 µ (25 x 2.1) mm.
Composition de la phase mobile :
(A) : H_2O + TFA 0.1%
(B) : CH_3CN + TFA 0.1%. avec TFA: TriFluoroacetic acid

gradient d'élution :

temps	débit	A%	B%
0	0.15	62	38
45	0.15	0	100
55	0.15	62	38
60	0.15	62	38.

Condition II
Chromatographe(LC) Hewlett Packard model 1100.
Détection de masse en mode d'ionisation ESI^+ sur la gamme (200-800) et (70-600).
Détection UV à λ=254 nm.
Colonne Kromasil 100 A° C18 5 µ (250 x 5) mm.
Composition de la phase mobile :
(A) : H_2O + HCOOH 0.1%.
(B) : CH_3OH+ HCOOH 0.1%.

gradient d'élution :

temps	débit	A%	B%
0	0.15	50	50
45	0.15	0	100
70	0.15	50	50.

Dans ces deux cas les échantillons sont dilués dans (MeOH + H_2O + HCOOH).

Condition III

Chromatographe(LC) Hewlett 6 Packard model HP 1100.
Détecteur de masse : HP1947B en mode d'ionisation ESI^+ et ESI^- sur la gamme (200-1500).
Détection UV à barrette de diodes calée sur λ = (280 +/- 40) nm.
Colonne Varian Omnispher 3 μ C18 (100 x 2) mm.
Composition de la phase mobile :
(A) : H_2O + HCOOH /p^H = 3.0.
(B) : CH_3CN.

gradient d'élution :

temps	débit	A%	B%
0	0.3	90	10
30	0.3	0	100.

VI. 1. Introduction :

Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent pendant longtemps le principal, voire l'unique recours de la tradition orale pour soigner les pathologies, en même temps que la matière première pour la médecine moderne (la fabrication des remèdes pharmaceutiques) (JEAN et JIRI, 1983). Les plantes peuvent revêtir un intérêt médicinal par leur particularité pharmacologique. Cependant, l'une de ses formes fait appel à l'utilisation de substances acridicides, acridifuges ou antiappétantes contenues dans les plantes pour protéger les cultures (WILP et *al.* 1992 ; LANGEWALD et SCHMUTTER, 1992; TAIL, 1998; YOUSSEF, 1999). C'est dans cet optique qu'une étude de certaines activités biologiques que présente les extraits de la plante *cotula cinerea* tel que, l'activité insecticide, bactéricide, et fongicide [18, 47-49, 51, 52, 89] est menée vis à vis des larves de criquets, des germes totaux pour les bactéries et chez les champignons microscopiques. Les critères d'appréciation sont les taux de mortalité, mais aussi les effets en terme de consommation des plantes traitées pour les insectes; pour les bactéries et les champignons le taux de mortalité est exprimé en fonction du diamètre autour du disque de l'antibiogramme préparé à cet effet. Ainsi, il a été testé les activités antibactérienne, antifongique et insecticide des extraits issus des différentes parties de la plante *Cotula cinerea*.

VI. 2. Méthodologie de travail

VI. 2. 1. Recherche de l'activité insecticide

VI. 2. 1. 1. Matériel biologique

VI. 2. 1. 1. 1. Les insectes utilisés

La présente étude porte sur les larves de quatrième et de cinquième stade de certaines espèces de criquet capturées à la main dans l'exploitation agricole de l'institut d'agronomie de l'université de Ouargla. Le choix des différents stades larvaires est jugé par la facilité de manipulation. Les insectes sont maintenus dans une cage parallélépipédique à support en bois de dimensions 120 x 45 x 35 cm^3. Cette dernière est recouverte d'une toile moustiquaire et comporte une porte coulissante en verre pour permettre les différentes manipulations. Les individus sont soumis à une température de 28°C ± 3°C, un éclairage continu et une humidité relative de 65 à 75%. La nourriture, composée de gazon et de la laitue à l'état frais leur est donnée à volonté. Le renouvellement de la nourriture, le nettoyage de la cage s'effectuent chaque jour. Les tests expérimentaux sont menés sur la laitue. Le choix de cette plante se justifie par sa bonne performance alimentaire du point de vue conversion en matière corporelle chez le criquet.

VI. 2. 1. 1. 2. Les extraits du végétal

Pour la présente étude les extraits préparés à base de la plante *Cotula cinerea* et codifies de la manière suivante à savoir: Ac1, Ac2 et Ac3 pour les extraits d' Acétate d'éthyle issus de la méthode eau-methanol, Bu1, Bu2 et Bu3 pour ceux obtenus par le n-butanol de la même méthode d'extraction, sont utilisés.

VI. 2. 1. 1. 2. Alimentation des insectes

Les insectes sont placés individuellement dans des boites de Pétri en plastique. Ils sont par la suite soumis à un jeun durant 24 heures afin de leur permettre de vider leur tube digestif et de les affamer. Le test consiste à alimenter les larves par des fragments d'une surface déterminée de la plante témoin, la laitue trempée dans l'une des solutions d'extraits de la plante. Au bout de 24 heures, on procède à un nettoyage des boites de Pétri. L'expérimentation est suivie jusqu'à la mortalité totale de tous les individus des lots traités et des témoins, à savoir, cette dernière a duré quinze jours.

VI. 2. 2. Test de l'activité anti- bactérienne et antifongique:

VI. 2. 2. 1. Principe :

La sensibilité ou la résistance des bactéries (germes totaux) et des champignons vis-à-vis des extraits à tester, est observée par la zone d'inhibition au tour d'un antibiogramme préparé à cet effet. Ceci se traduit par le diamètre d'une zone d'inhibition. Plus elle est grande plus l'efficacité est bonne.

VI. 2. 2. 2. Préparation des antibiogrammes

Des disques de diamètre de 1 à 2 cm sont préparés du papier Wathman N°3. La qualité du papier permet une meilleure absorption des extraits. Ces disques sont ensuite divisés en 6 lots en fonction des extraits. Chaque lot est composé de 10 disques de diamètre 1 cm et de 10 disques de diamètre 2 cm. Chacun des lots est plongée dans une solution des extraits et est notée avec une référence de la solution. Les disques ainsi trempés sont séchés dans une étuve à une température de 35 °C $\pm$ 4°C.

VI. 2. 2. 3 Préparation du milieu de culture

Pour la recherche de la flore microbienne, de la gélose nutritive ordinaire est utilisée. Le milieu à base glucose, Agar et extrait de viande (OGA) est utilisé pour la recherche des germes totaux pour les bactéries. Le milieu de composition connue est préparé au laboratoire.

Pour les moisissures, le milieu utilisé est l'oxytetracycline-glucose-agar (OGA) (BOURGEOIS et al., 1980 ; PETRANSXIENE et al., 1981). L' oxytetracycline permet d'inhiber le développement des bactéries et rend favorables aux champignons. C'est un antibiotique n'ayant aucune action sur les moisissures.

Les deux milieux de cultures sont préparés et stérilisés dans un autoclave à 120°C pendant 30 min. pour le milieu à oxytetracycline, l'antibiotique est mis après stérilisation du milieu.

VI. 2. 2. 4. Préparation de l'inoculum

La flore tellurique a servi. Nous avons adopté le principe de la dilution d'un 1g de sable dans 10 ml d'eau distillée stérile. Cette solution a servi à la recherche des bactéries et des moisissures.

VI. 2. 2. 5. Ensemencement et incubation

Deux lots de boite de Pétri sont préparés. Un premier lot N°1 pour les bactéries contenant le milieu OGA et un second lot N°2 pour les champignons contenant le milieu oxytetracycline-glucose-agar. Dans les boites de pétri contenant un milieu nutritif ordinaire, une suspension de germes totaux bactéries est étalée, puis sont placés à l'intérieur les antibiogrammes saturés par les extraits de la plante *cotula cinerea.* Les boites sont par la suite incubées dans une étuve, à une températures de 30°±2°C pendant 72 h. Ce temps est suffisant pour le développement des colonies permettant de voir apparaître les effets antibactériens se manifestant par la distance séparant les colonies les disques.
Il est procédé la même démarche pour l'étude des champignons.

VI. 3. Résultats et discussions :

Au vu des résultats, une légère efficacité inhibitrice des différents extraits de la plante *Cotula cinerea* est perceptible pour les bactéries (photo 1 : a, b et c). Les extraits obtenus par l'acétate d'éthyle sont plus efficaces que ceux obtenus par le n-butanol (les extraits des hétérosides). Où l'extrait des feuilles (Ac2) s'est présenté plus efficace que ceux des autres organes. Selon le degré de concentration certains disques montrent une efficacité dans quelques boites, que l'ont ne retrouve pas dans d'autres. Cela peut être l'œuvre de la nature des germes rencontrés. Chez les bactéries il existe selon la nature chimique de la composition de la paroi deux groupes de bactéries. Les unes appelées gram positifs et les autres gram négatifs. Cette différence de structure de la paroi entraîne chez les catégories une différence de comportement vis-à-vis des substances naturelles. Selon la nature chimique de la substance les uns résistent plus que les autres et vice vers ça. Ainsi un groupe de bactéries est plus sensible que l'autre à l'effet bactéricide des extraits de la partie foliaire de *Cotula cinerea.*

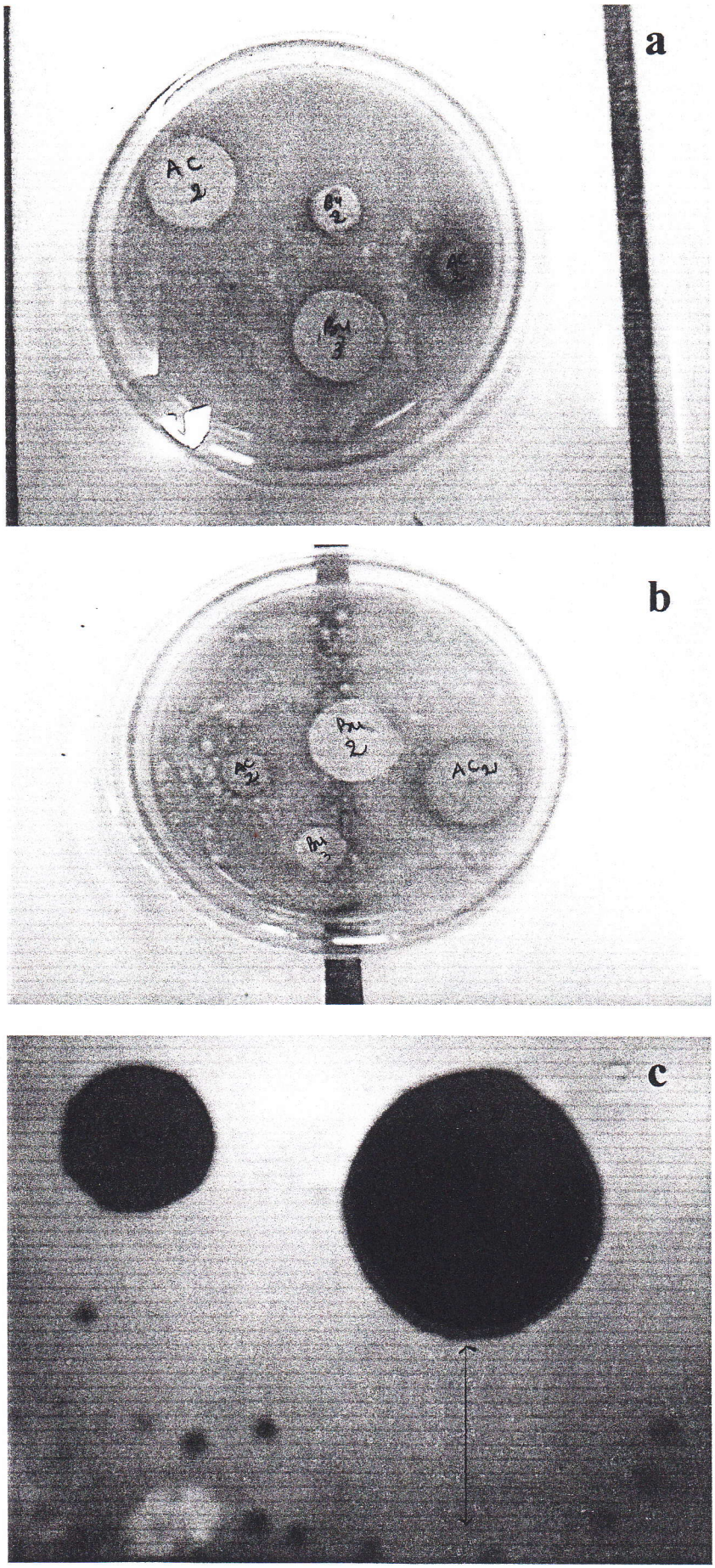
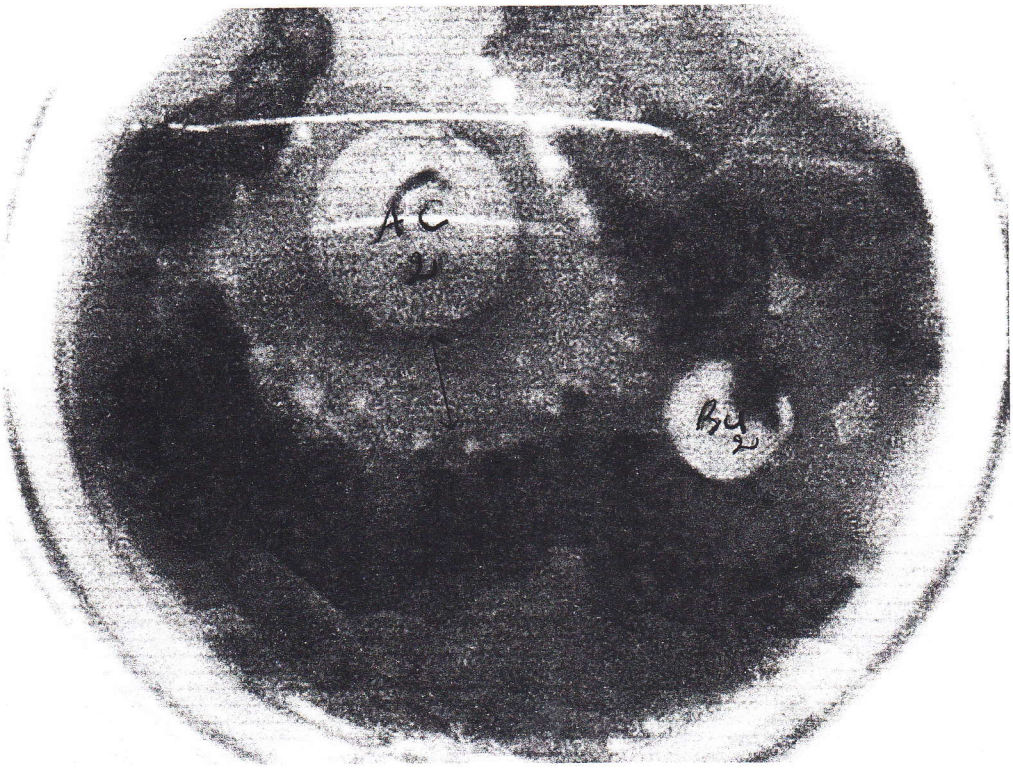


Photo 01 (a, b, c) : Représentation de l'activité antibactérienne



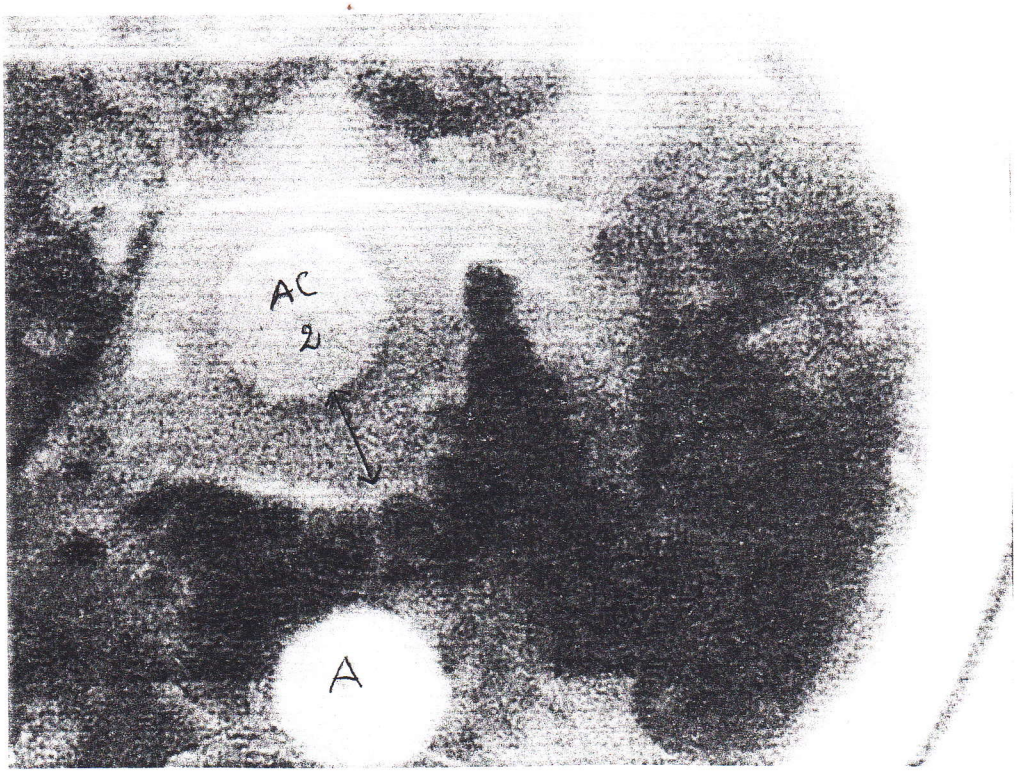


Photo 02 (a , b) : Représentation de l'activité Antifongique

Toutefois, notons que l'action des extraits issus des feuilles par les différents modes d'extraction utilisés dans ce travail, sont nettement perceptible sur la flore bactérienne. Cette action inhibitrice est moins marquée avec les extraits issus des autres organes.

Pour le test de l'activité antifongique, l'absence presque totale des champignons dans les tests anti-bactérien, nous a orienté pour une confirmation de l'efficacité des extraits contre les champignons.

L'observation des boites de pétri du lot N°2, montre que les extraits Ac1, Ac2 et Ac3, présentent une activité antifongique notable. L'extrait Ac2 semble être plus efficace, Photo2 (a et b). Au vu de la photo nous remarquons que le disque autour de l'antibiogramme est nettement perceptible. Aucun développement de moisissures n'a eu lieu dans la zone d'inhibition du disque. Cependant, les extraits Bu1, Bu2 et Bu3, (extraits des hétérosides des trois organes) n'ont présenté aucune efficacité, et les antibiogrammes correspondants ont été envahis par la couche de champignons.
L'augmentation de concentration a augmenté l'effet inhibiteur ce qui est remarqué sur petits antibiogrammes photo 2b.

Parmi les activités biologiques relatives à la plante *cotula cinerea*, son activité insecticide sur les larves des insectes est entreprise sur 37 de criquets (15 adultes et 22 larves de différentes espèces). Au vu des résultats, il est à noter que les adultes ont résisté à ce régime à base de laitue traitée par les extraits. Les extraits n'ont présenté aucun effet toxique sur les adultes des différentes espèces de criquets qui ont continué à vivre. Toutefois, 24h après l'administration de l'extrait, il est décelé 05 morts parmi les larves et 48h après, 12 autres morts. Les autres ont pu sur vivre. Il s'agit de larve de cinquième stade.

VI. 4. conclusion :

Les extraits obtenus des trois organes aériens de *Cotula cinerea* par l'acétate d'éthyle montrent une efficacité biologique sur les organismes vivants utilisés. Il présente une activité anti-bactérienne qui peut être mieux élucider soit en augmentant la concentration de l'extrait dans les anti-biogrammes, ou bien en utilisant un groupe bactérien de gram connu, d'où une étude plus approfondie. L'activité antifongique est perceptible, surtout pour les extraits issus des feuilles.

Les résultats obtenus pour les test biologiques menés pour la plante *Cotula cinerea* laissent apparaître que cette plante présente des vertus thérapeutiques qu'il est nécessaire d'élucider dans un programme de recherche nationale pluridisciplinaire.

VI. 5. Partie Expérimental :

- Les extraits Ac1, Ac2, Ac3, Bu1, Bu2, Bu3 préalablement préparés à partir de la plante, ont été testé pour vérifier leurs action sur les micro organismes et les larves de criquets.
- L'étuve fixé à 30° C.
- Papier wathman N°3 pour préparer les antibiogrammes.
- le milieu à base de glucose, Agar et extrait de viande (OGA) est utilisé pour la recherche des germes totaux pour les bactéries.
- le milieu à base de l'oxytetracycline, glucose et Agar (OGA) est utilisé pour les moisissures.

CONCLUSION

Notre contribution à élucider la composition chimiques de la plante *Cotula cinerea* notamment en principes actifs, nous a permet de tirer quelles que conclusions :

- Les tests phytochimiques préliminaires ont révélé la présence de plusieurs familles de principes actifs tel que les flavonoides.

- Les rendements obtenus par les différentes méthodes d'extraction, ont montré que celle réalisée au mélange eau – méthanol (30 - 70) est la plus efficace, avec les rendements les plus élevés pour les feuilles.

- D'après les résultats de la chromatographie sur papier (CP) et sur couche mince (CCM), nous avons constaté que les feuilles et les fleurs ont presque la même composition, et que les groupement (ou composés) flavoniques les plus abondants sont ceux de couleurs jaunes, marron et mauves qui correspondent respectivement aux flavonols et aurones, flavones et flavonol-3-glycosylés, isoflavones.

- La plante, apparaît riche en composés terpéniques, parmi lesquels nous citons : le camphre, la thujone, qui sont tout les deux des principes actifs très utilisés en thérapeutie. En plus de plusieurs acides et esters gras.

- Des résultats assez satisfaisants, sont obtenus par l'HPLC-MS-ESI dans l'analyse de la composition flavonique de cette plante. Néanmoins, la réalisation d'une banque de donnée spectrale s'avère nécessaire pour l'identification d'un maximum de composés séparés comme c'est le cas pour la GC-MS.

- En ce qui concerne les tests biologiques, l'activité antifongique est la plus discernable dans notre recherche des effets biologiques de la plante *Cotula cinerea*. En plus à une légère activité antibactérienne.

Notons enfin que ce travail nous a permis de maîtriser plusieurs techniques d'analyse de pointe et notre contribution va ouvrir des horizons de recherche très ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides, notamment en terme de mise en évidence des principes actifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. R. G Tarek., Thèse de magister, USTHB Alger, 1989
2. J. B. Harborne., Encyclopedia of plant physiology, New york,1980,329-402.
3. J.Brutneton.,'pharmacognosie phytochimie plantes médicinales', 2ème éd, 1993.
4. M. Hadj Mahammed., thèse de doctorat, USHTB, Alger, 1996.
5. P. Ribereau.Gayon., 'les composés phénoliques des végétaux', éd Dunod, Paris, 1969, 254.
6. J. B. Harborne., 'The flavonoids', éd chapman & Hall, 1988.
7. K. R. Markham., 'Techniques of flavonoids identification', Academic press, London, 1982.
8. K. Dehak., Thèse de magister, Univ. Ouargla, 2001.
9. S. Ouafi., Thèse de magister, USTHB, Alger, 1987.
10. E. Wollenweber., 'Flavones and flavonols', in J.B. Harborne, The flavonoids, advances in research since 1986, éd chapman & Hall, 1995.
11. H. Wagner., 'pharmaceutical and economic use of Compositae', in HeyWood.V.H, J.B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 411-429.
12. V. H. Heywood, J.B. Harborne, B.L Turner., 'the biology and the chemistry of the compositae', academic press, 2 tomes, London, 1977.
13. R. Hegnauer, ., 'the chemistry of the compositae', in Heywood. V. H, J. B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 283-295.
14. W. Herz., 'Sesquiterpènes lactones in the compositae', in Heywood. V. H, J. B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 337-357.
15. T. J. Mabry et F. Bohlmanne., 'Summary of the chemistry of compositae', in Heywood.V.H, J.B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 1097-1104.
16. N. ASorensen., 'Polyacetylenes and conservation of chemical characters in the compositae', in Heywood.V.H, J.B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 385-409.
17. J. B. Harborne., 'Flavonoid profiles in the compositae', in Heywood. V. H, J. B. Harborne, Turner BL, the biology and chemistry of the compositae, academic press, 2 tomes, London, 1977, 359-384.
18. Christine A. Williams, J. Greenham, J. B. Harborne., *Biochemical Systymatics and Ecology*, 2001, 29, 929-945.
19. L. Hofman, D. Fritz, S. Nitz, H. Kollmannsberger, F. Drawert., *Phytochem*, 1992, 31, 537-542.
20. E.Wollenweber, K. M. valant, vetschera, S. Ivancheva, B. Kuzmanov., *Phytochem*, 1987, 26, 181-182.
21. E.Wollenweber, K.Mayer., *Fitoterpia*, 1991, 62, 365-366.
22. N. A. M Saleh, S. I. El Negoumy, M. M. Abouzid, G. Dellamonica,J. Chopin., *Phytochem*, 1985, 24(1), 201-203.
23. E. Wollenweber, K. Mann, K. M. valent-Vetschera., *Fitoterapia*, 1989, 60, 460-463.
24. A. Ahmed. El sayed, N. H. El Negoumy., *J. Nat prod*, 1987, 50, 519-520.

25. R. Kunde, O. Isaac., *Planta Med*, 1979, 37, 124-130.
26. Eun Jung park, Y. Kim, J. Woong., *J. Nat. Prod.*, 2000, 63(1), 34-36.
27. R. C. Robbins., Intrn. Est J. Vit. Nut. Res, 1977,47,373.
28. A. Degenhardt, H. Knapp, P. Winterhalter., *J. Agri food Chem*, 2000, 48, 338-343.
29. K. Ryan, Ewald E. swinny, K. R. Markham., *Phytochem* , 2002, 59, 23-32.
30. J. B Harborne, Christine A.Williams., *Phytochem*, 2000, 55(6), 481-504.
31. م. س. هيكل و ع.ع.عمر الاعشاب الطبية و العطرية كيمياؤها - انتاجها - فوائدها. الطبعة الثانية. منشأة المعارف. 1993.
32. C. V. Dewhally, S.M. Rankin, JRS., *Biochem Pharmac*, 1990, 39, 1743-1750.
33. I. Maita, L. Marcoci, M.T. Droy-Lefaix, L. Parker., *Biochem Pharmac*, 1995, 49, 1649-1655.
34. D. Peyron., *Physiol.Veg*, 1981, 19, 315-326.
35. Zhonchong Gao, K. Huang, Hui bi Xu., *Farmac Research*, 2001, Vol 43, N0 2.
36. A. Bast, GR. Haenen, CJ. Doelman., state of the art, *Am.J.Med*, 1991, 91, 25-135.
37. LS. Greene., *J. Am. Coll Nutr*, 1995, 14, 317-324.
38. K. Benzahi., Thèse de magister, Univ Ouargla, 2001.
39. Teresita Guardia, A. E. Rotelli, A. O. Juarez, Lilian E. Pelzer., *Farmaco II*, 2001, 56(9), 683-687.
40. Jan F. Stevens, Cristobal L. Miranda, Donald R. Buhler., *J. Am. Soc, Brew. chem*, 1998, 56(4), 136-145.
41. C. A. Rodrigues, A. E. Oliveira, F. R. Willain, Cehinel-Filho., *Farmazie*, 2000, 55, 9.
42. A. Benseguni., Thèse de magister, Univ de Constantine, 1989.
43. K.Maizak, R. A. Brac de la perriere, V. Hammiche., 'Pharmacopée traditionnelle : Sahara septentrional', actes du 2eme colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, 1993, 169-181.
44. P. Ozenda., 'Flore et végetation du Sahara', éd Paris, 1993.
45. H. Zabeirou., mémoire d'ingénieur, ITAS, Univ Ouargla, 2001.
46. G.H. Mahran., *Bull.Fac.Farm*, Cairo Univ, 1975, 14(1), 237-246.
47. M.Markouk, H. B. Lazrek, M.Jana., *Fitotherapy research*, 1999, 13(3), 229-230.
48. M. Markouk, A. Radwane, H. B. Lazrek., *Phytochem*, 1997, 55, 86.
49. A. Radwane, M. Markouk, H. B. Lazrek, H. Amarouch, M. Jana., *Ann. Pharm. Fr*, 1998, 56(6), 274-276.
50. G. Fournier., *Planta Med*, 1989, 55(6), 580.
51. M. Larhsini, M. Markouk, J. T. Jaouhari, K. Bekkouche, H. B. Lazrek, M. Jana., *Therapie*, 1999, 54(6),759-761.
52. M. Markouk, H. B. Lazrek, M. Larhsini, K. Bekkouche, M. Jana., *Ann Pharm.Fr*,1998, 56(6), 274-276.
53. R. Mary Latha, T. Geetha, P. Varalakshm., *Gen. Pharma*, 1998, 31(4), 601-606.
54. Y. Moulai., mémoire d'ingénieur, Uni Ouargla, 2000.
55. p. Lebreton., M. Jay, B. Voirin, M. P. Bouchez, *J. Chim Analyt*, 1967, 49, 375-383
56. Y-H. Kuo, S-M. Lee, J-S. Lai., *J. Chin, Chem, Soc.*, 2000, 47, 241-246.
57. S. Benayache., thèse de doctorat, univ de constantine,

58. Zeljan Males et M. Medic-saric., *Acta Pharm*, 1998, 48, 85-92.
59. J.B. Harborne., 'Chromatographie of phenolic compounds', éd. département of botany university of reading, England, 1963, 759-778.
60. F. Rouessac, Annick Rouessac., 'Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes', 3e éd, Masson, Paris, 1997,12.
61. De Hoffmann, Charette, Stroobant., 'Spectrométrie de masse cours et exercices corrigés', 2e éd, Dunod, Paris, 1999, 105.
62. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh., Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique', éd. Masson, Paris, 1997, 318.
63. C. S. Creaser, M. R. Koupai-Abyazani, G. R. Sephenson., *Analyst*, 1992, 117, 1105-1109.
64. H. Kazoka., *J.Chromgr. A*, 2002, 942,1-10.
65. J. Greenham, D. D. Vassiliades, J. B. Harborne, Christine A. Williams., *Phytochem*, 2001, 56,87-91.
66. Ahmed. Gohar., *Phytochem*, 2000, 53, 299-303.
67. H. Bras. De oliveira, T. Nakashima, J.D. de Souza Filho, F.L.Frehse., *J. Braz. Chem. Soc*, 2001, 12(2), 243-246.
68. R. E smith., Ion chromatography, Hüthing, heidel-berg, 1987.
69. H. Small., Ion chromatography, éd. Plenum press, new york, 1989, p170.
70. T. s. stevens, J. C. Davis, H. Small., *Anal. chem*, 1985, 53,1488.
71. J. B. Harborne., *Phytochem*, 1985, 24, 273.
72. M. Hadj-Mahammed, B.Y. Meklati., *Lebensm,Wiss.u. technol*, 1987, 20, 111-114.
73. B. Andrey., 'Liquid chromatography/ Mass Spectrometry', éd, VCH, New York, 1993.
74. R. C. Wiloughby, R. F. Browner., *Anal. Chem*,1984, 56, 2626.
75. R. M. Caprioli, T. Fan, J. S. Cottrell., *Anal. Chem*, 1986, 58, 2949.
76. M. L. Vestal., Mass spectrom, Rev. 2, 1983, 447.
77. D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K.D. Haegele., *Anal. Chem*, 1975, 47, 2369.
78. J. B. French et N. M. Reid., Dynamic Mass Spectrometry, Heyden, London, 1980, 6, 220-233.
79. B. A. Thomsom et J. V. Iribane, P. J. Dziedzic., *Anal. Chem*, 1982, 54, 2219.
80. M. Yamashita et J. B. Fenn., *Phys. Chem*,1988, 88, 467.
81. M. G. Ikonomu, A. T. blades, P. Kebarle ., *Anal. Chem*, 1990, 62, 957.
82. M. Yamashita et J.B. Fenn., *J. Chem. Phys*, 1984, 80, 4451.
83. M. Mann., *org. Mass Spectrom*, 1990, 25, 575.
84. P. Waridel, J. L. Wolfrender, K. Ndjoko, KR. Hobby., *J. Chromatogr. A*, 2001, 926, 29-41.
85. J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith., *Anal. Biochem*, 1989, 179, 404.
86. L.Z. Lin, X.G. He, M. Lindenmaier, J.Yang, M. Cleary., *J. Agric. Food Chem*, 2000, 48, 354.
87. G. K. Poon., *J. Chromatogr A*, 1998, 794, 63.
88. j. Cunniff, P. Tiller, M. Harvey, A. Land., presented at the 45th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, CA, June 1997.
89. Sari Häkkinen, S. Auriola., *J. Chromatgr. A*, 1998, 829, 91-100.
90. M. Chen, F. Song, L. Guo, Z. Liu, S. Liu., *Mass spectrom*, 2002, 16, 264-271.
91. C. W. Huck, C.G. Huber, K-H. Ongania, G K. Bonn., *J. Chromatogr. A*, 2000, 870, 453-462.

92. U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth., *J. Chromatogr. A*, 1998, 799, 101-110.
93. A. Raffaelli, G. Moneti, V. Mercati, E. Toja., *J. Chromatogr. A*, 1997, 777, 223-231.
94. M. Careri, A. Mangia, M. Musci., *J. Chromatogr. A*, 1998, 794, 263-297.
95. M. Markouk, K. Bekkouche, M. Larhsini, M. Bousaid, H.B. Lazrek, M. Jana., *Ethnopharmacology*, 2000, 73, 293-297.
96. EAN V. et JIRI S., 1983 - Plantes médicinales. 250 illustrations en couleurs. Ed. Larousse, Paris, 319 p.
97. WILPS H., NASSEH O., KRALL S., SALISSOU G. B., 1992 -Les effets d'inhibiteurs de croissance et de biocides végétaux sur les larves de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). *Rev Sahel PV Info,* N°45, pp 5-19.
98. LANGEWLD.J. et SCHMUTTERER H., 1992 - Effets du traitement à l'huile de neem sur la phase du criquet pèlerin, pp 143-145 in LOMER C J et PRIOR C. *La lutte biologique contre les acridiens.* CAB International, Wallingford, 400 p.
99. TAIL G., 1998 - Action de quelques substrats alimentaires sur quelques, *acrididae*). Efficacité entomopathogène *de Pseudomonas fluorescens (Pseudomonasaceae*) sur quelques aspects physiologiques du criquet pèlerin. Thèse magister, Sci agro, INA, El harrach-Alger, 190 p.
100. YOUSSEF O.A., 1999- Régime alimentaire de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (*Acrididae, Cyrtacanthacridinae)* en phase solitaire dans les conditions naturelles de la marre d'Akjoujt (Mauritanie). Cycle biologique sur *Scorprerus vermiculatus (Fabaceae*) et essai d'efficacité de *Melia azedarach* L.(*Meliaceae*) sur les L_5 et les imagos de cet acridien. Mém. Ing. Agro., Inst. nat. f. sup./ agro. Sahar., Ouargla, Algérie, 66 p.
101. BOURGEOIS C. M., LEVEAU J. V., 1980. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro. Alimentairès. Ed. Apria, Paris, v.3, pp. 157. PETRANSXIENE D. et LAPIED P., 1981. Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, analyses et test. Ed. Lavoisier, Paris, 228 p.130-

ANNEXES

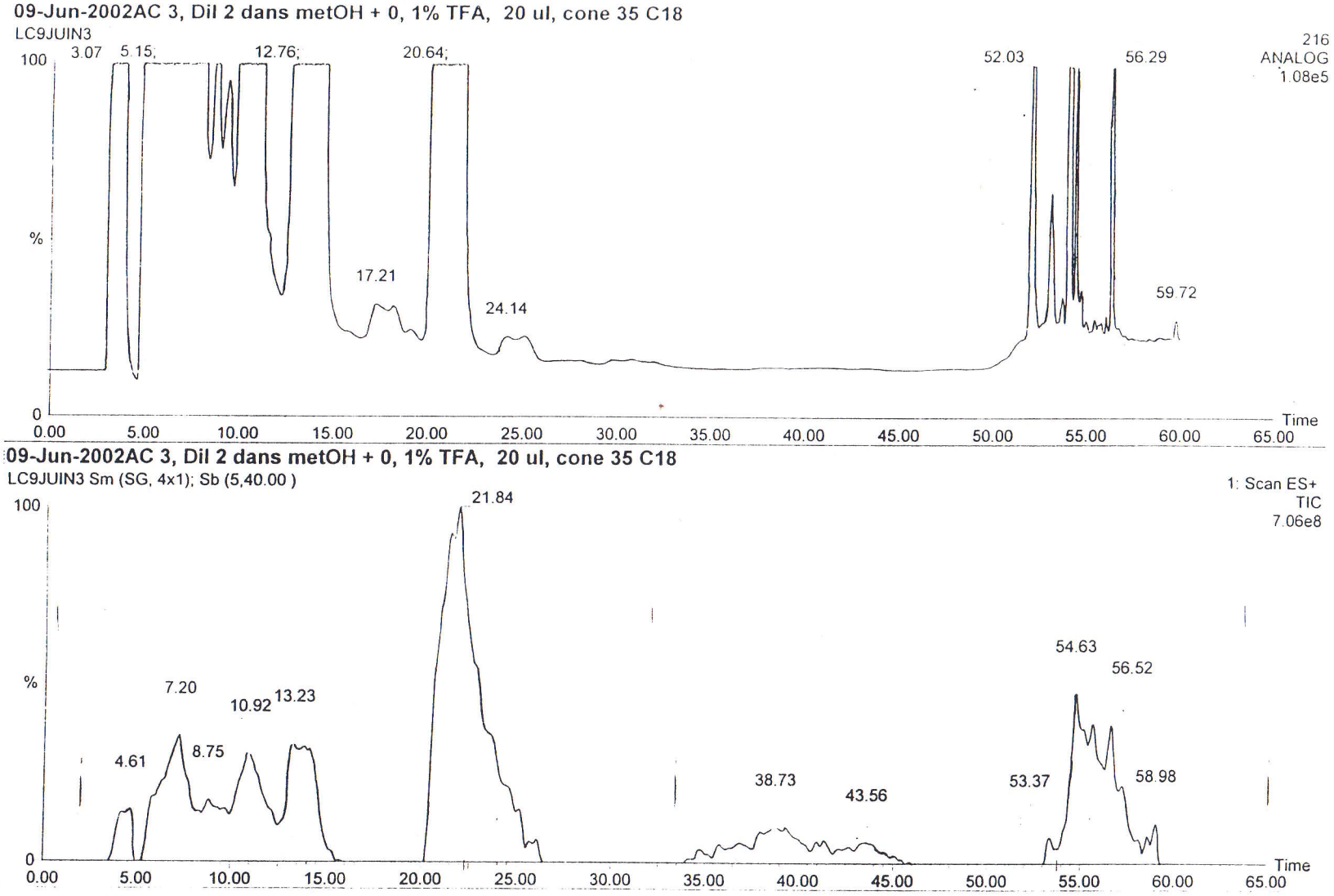


Figure 1 : Chromatogramme de l'extrait Ac3 obtenu par couplage LC (UV, MS) en gradient d'élution (I). Phase mobile : eau-acetonitrile sur colonne RP-18.

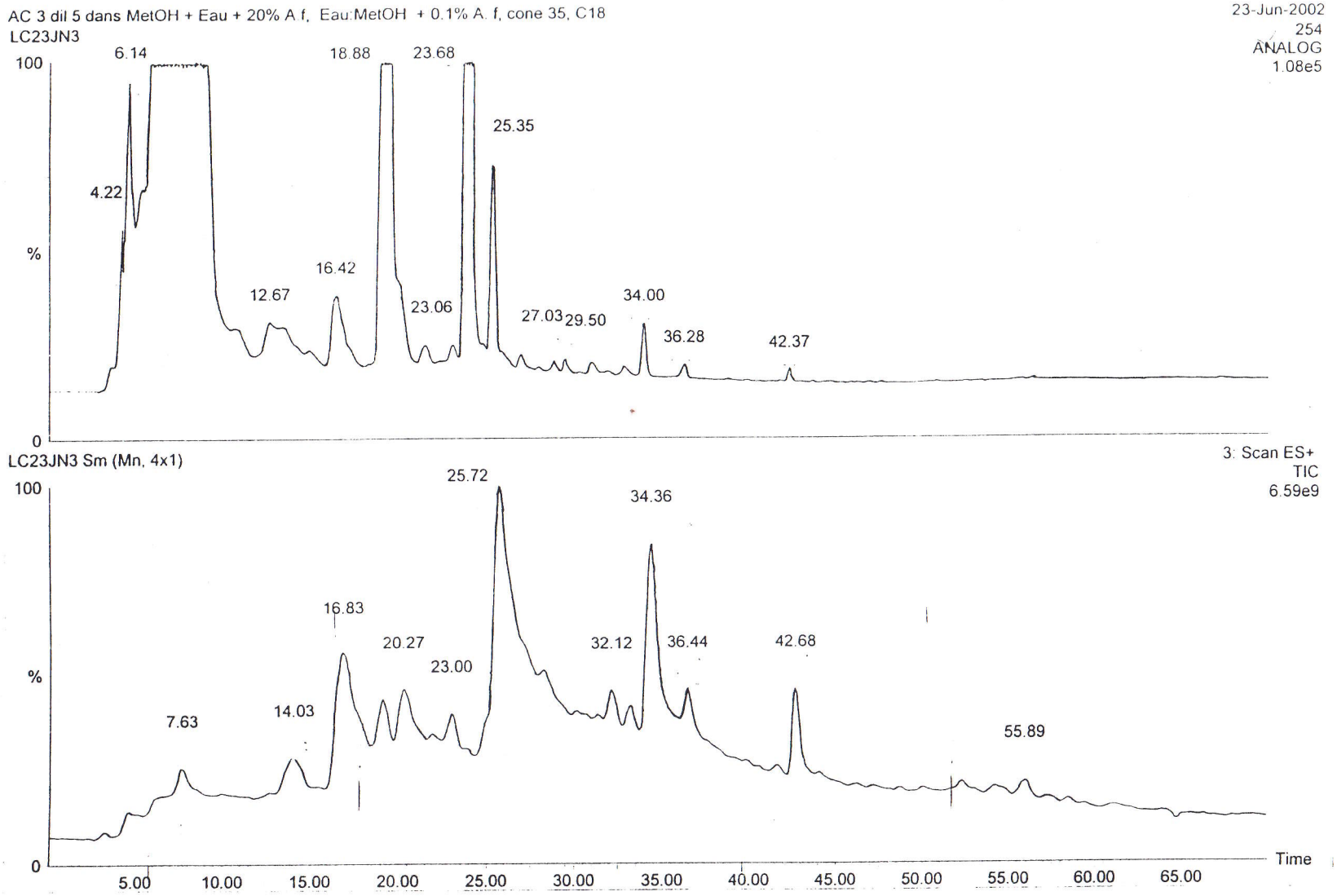


Figure 2: Chromatogramme de l'extrait Ac3 obtenu par couplage LC (UV, MS) en gradient d'élution (II). Phase mobile : eau-methanol sur colonne RP-18.

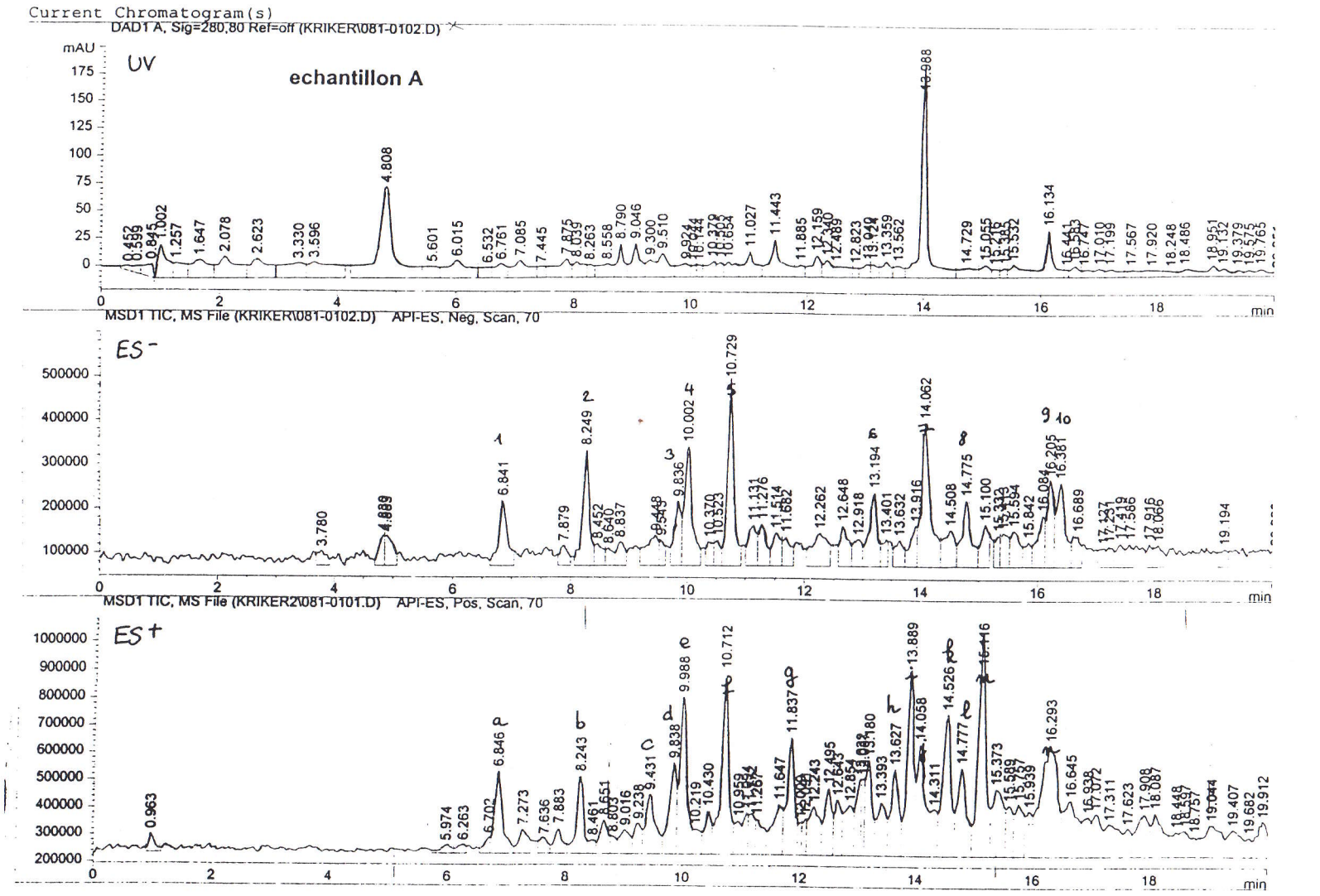
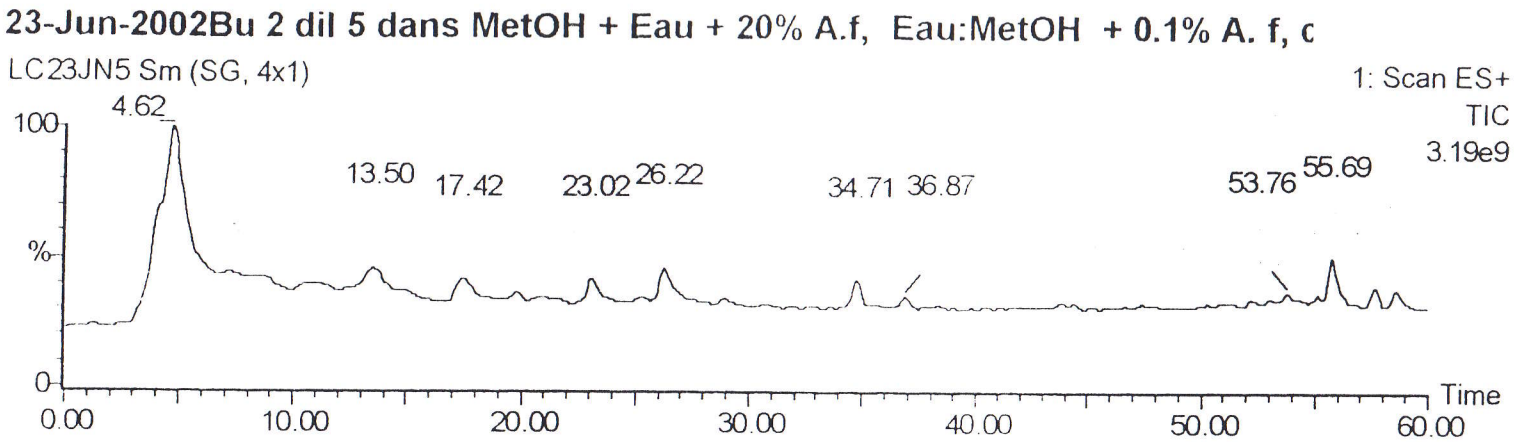


Figure 3: Chromatogramme de l'extrait A obtenu par couplage LC (UV, MS) en gradient d'élution (III). Phase mobile : eau-acétonitrile sur colonne RP-18.



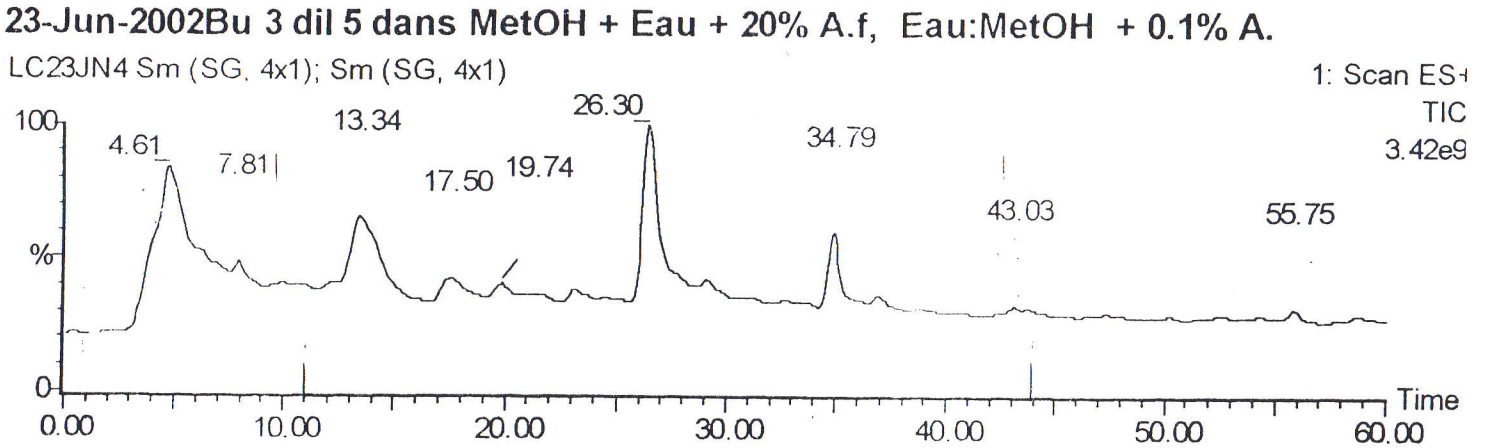


Figure 4: Chromatogrammes de l'extrait Bu2 et Bu3 obtenus par couplage LC-MS en gradient d'élution (II). Phase mobile : eau-methanol sur colonne RP-18.

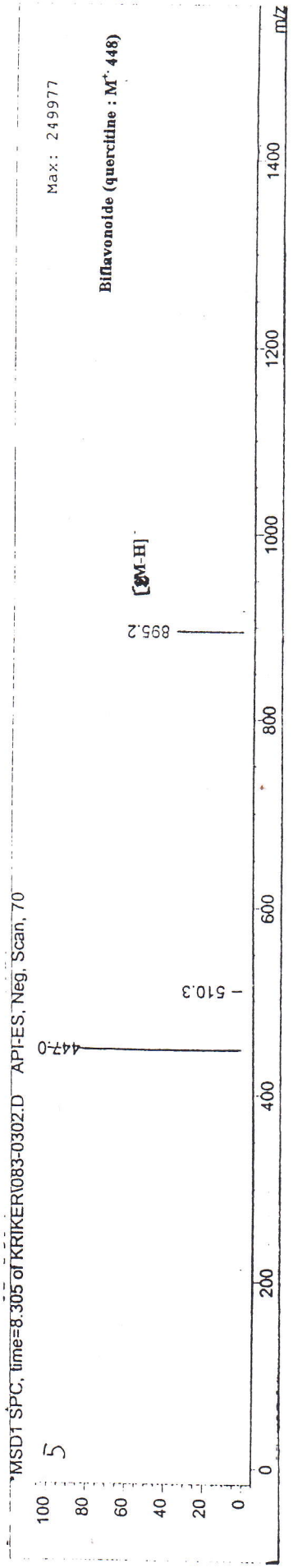


Figure 5 : Spectre de masse du composé proposé.

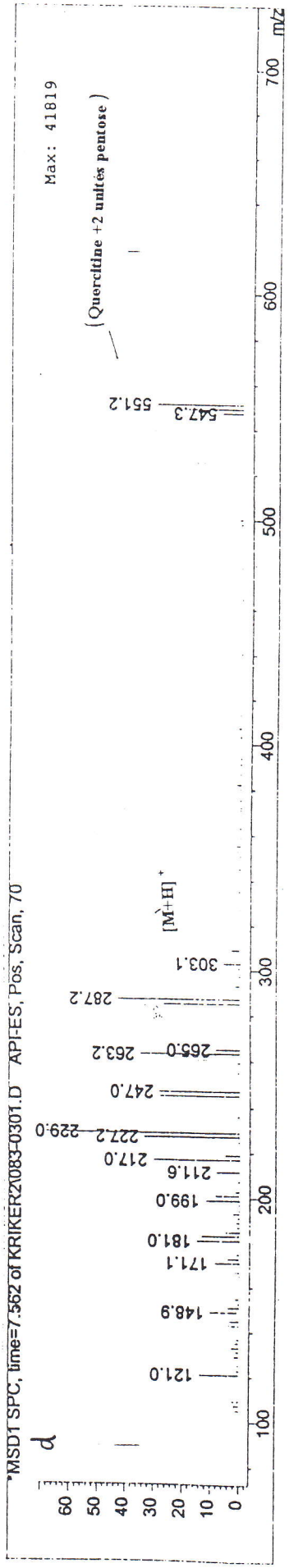


Figure 6 : Spectre de masse du composé proposé

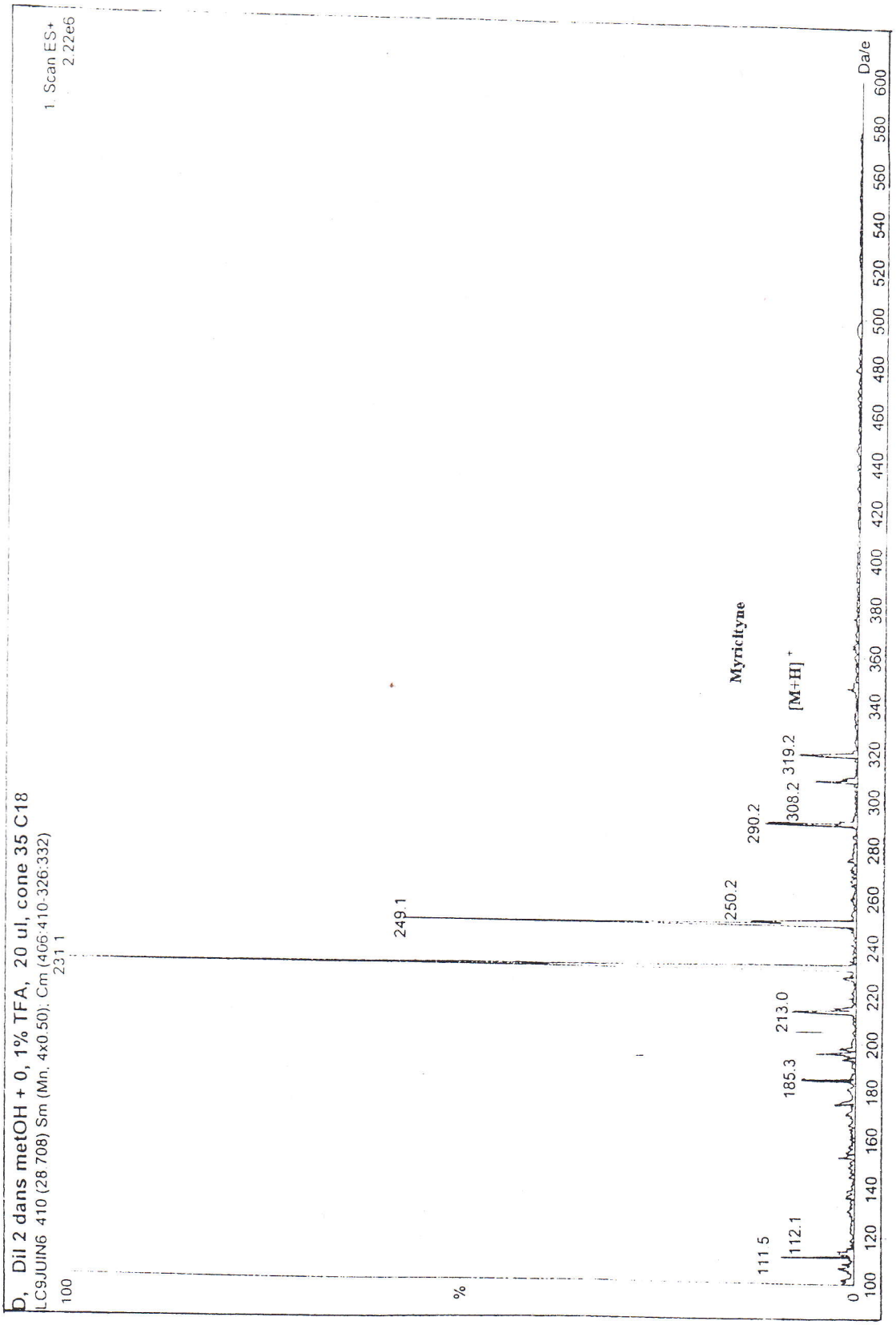


Figure 7 : Spectre de masse du composé proposé.

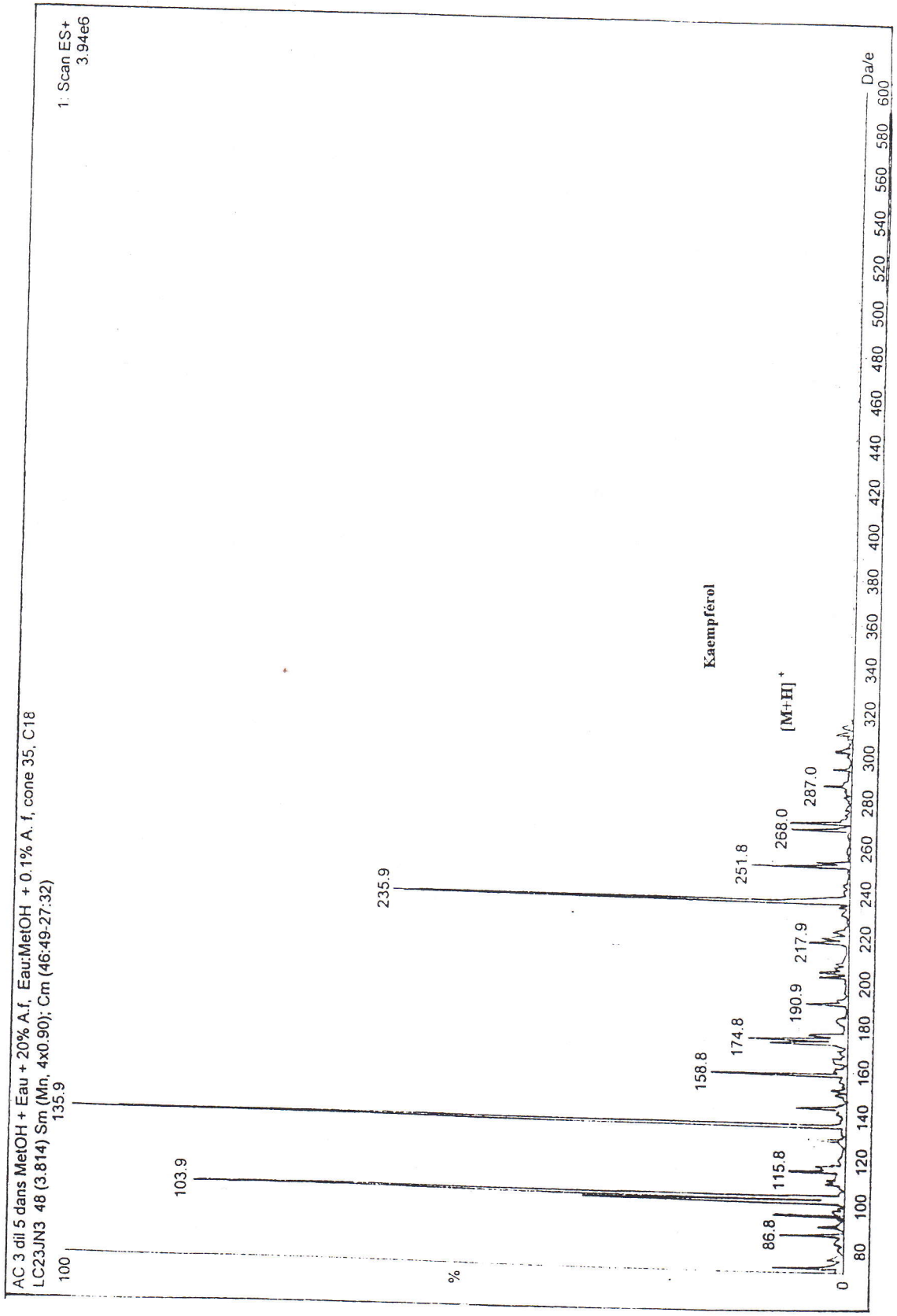


Figure 8 : Spectre de masse du composé proposé.