

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1
Faculté des Sciences de la Matière
Département de chimie



THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : chimie organique

Présentée Par :

BOUZGHAIA Badra

Thème :

**Étude phytochimique de deux plantes *Cytisus purgans*
et *Centaurea resupinata (tenuifolia)***

Soutenu le : 11/12/2022

Devant le jury :

Président:	BOUZAHER Yacine	Professeur Université Batna-1
Rapporteur:	HARKAT Hassina	Professeur Université Batna-2
Examineurs:	EL KOLLI Meriem	Professeur Université Sétif-1
	ABDESSEMED Dalila	MCA Université Batna-1
	BEN MOUSSA Mohammed Tahar	MCA Hospitalo -Universitaire Batna2
	ARRIF SOUAD	MCA Université Batna-1

Remerciements

Je remercie Tout d'abord ALLAH de m'avoir donné la puissance et la volonté et qui m'a permis de mener à bien cette thèse

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Phytochimie et Synthèse Organique sous la direction du Docteur Hassina Harkat. Professeur au département de pharmacie-Faculté de Médecine Université de Batna 2, je tiens à lui adresser mes plus vifs remerciements pour son aide, sa disponibilité, sa compréhension, sa gentillesse, ses compétences scientifiques et ses judicieux conseils tout le long de ce travail de thèse. Merci pour tout ce que vous nous avez transmis pendant ces années.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur **Yacine Bouzaher** de l'Université de Batna1 pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Je remercie également les membres du jury le Professeur **Meriem ELKOLLI** (Université de Sétif 1), Docteur **Mohammed Tahar Ben Moussa** Maître de conférences A (Université de Batna 2), Docteur **Dalila Abdessemed**, Maître de conférences A et Docteur **Souad Arrif** Maître de conférences A (Université de Batna 1) d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Un grand Merci au Professeur **Patrick Pale** de l'institut de Chimie de l'Université de Strasbourg, pour son aide dans la réalisation des analyses spectrales.

Je remercie également le Professeur **Bachir Oudjehih** du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques pour l'identification botanique des deux espèces étudiées dans cette thèse.

Je remercie tout particulièrement les docteurs **Kafia Oulmi, Safa Chaira et Rima Goudjil** pour leur aide et leurs précieux conseils.

Finalement, je voudrais remercier tous mes collègues du laboratoire et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études.

A mon mari pour sa patience, aide et soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail. Merci infiniment.

A mes enfants.

A mes chers frères : Fateh, youcef, Azou.

A mes chères sœurs: wided, Hanene, Chaima.

Liste des figures

Figure I-1: La médecine dans la chine ancienne.....	5
Figure I-2: La médecine dans l'Inde ancienne.....	6
Figure I-3: La médecine dans l'Égypte ancienne.....	7
Figure I-4: La médecine Arabe.....	8
Figure II-1 Espèce <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>Dufourii</i>	13
Figure II-2 structures des flavonoïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	24
Figure II-3 structures des sesquiterpènes lactones isolés du genre <i>Centaurea</i>	30
Figure II-4 structures des triterpènes isolés du genre <i>Centaurea</i>	32
Figure II-5 structures des lignanes isolés du genre <i>Centaurea</i>	34
Figure II-6 structures des autres composés isolés du genre <i>Centaurea</i>	35
Figure II-7 Espèce <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	41
Figure II-8 structures des flavonoïdes isolés du genre <i>Cytisus</i>	46
Figure II-9 structures des alcaloïdes identifiés du genre <i>Cytisus</i>	48
Figure II-10 structures des composés phénoliques isolés du genre <i>Cytisus</i>	49
Figure II-11 structures des stéroïdes isolés du genre <i>Cytisus</i>	50
Figure II-12 structures des autres composés isolés du genre <i>Cytisus</i>	51
Figure III-1: Schéma d'extraction de la plante <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>Dufourii</i>	65
Figure III-2: Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	66
Figure III-3: Spectre de masse ESI-MS du produit CR1.....	67
Figure III-4: Spectre RMN ¹ H du produit CR1.....	69
Figure III-5: Spectre HSQC du produit CR1.....	70
Figure III-6: spectre RMN ¹³ C du produit CR1.....	71
Figure III-7 : Kaempférol.....	71
Figure III-8 : Spectre COSY H-H de β-glucose du produit CR1.....	72
Figure III-9 : Spectre COSY H-H de α-rhamnose du produit CR1.....	73
Figure III-10 : Spectre HMBC du produit CR1.....	74
Figure III-11: Spectre de masse ESI-MS du produit CR2.....	76
Figure III-12: Spectre RMN ¹ H du produit CR2.....	77
Figure III-13: Structure du Groupement <i>trans-p-coumaroyl</i>	78
Figure III-14: Spectre RMN ¹³ C du produit CR2.....	79
Figure III-15: Spectre COSY H-H du produit CR2.....	80
Figure III-16: Spectre HSQC du produit CR2.....	80
Figure III-17: Spectre HMBC du produit CR2.....	82
Figure III-18: Spectre de masse ESI-MS du produit CR3.....	84
Figure III-19: Spectre RMN ¹ H du produit CR3.....	86

Figure III-20: Spectre RMN ¹³ C du produit CR3.....	87
Figure III-21: Spectres RMN ¹ H des produits CR3 (CD ₃ OD) et CR4 (CD ₃ OD).....	90
Figure III-22: Spectre RMN ¹³ C du produit CR4.....	91
Figure III-23: Spectre RMN ¹ H du produit CR5.....	94
Figure III-24: Spectre RMN ¹³ C du produit CR5.....	95
Figure III-25: Spectre RMN ¹ H du produit CR6.....	98
Figure III-26: Spectre RMN ¹³ C du produit CR6.....	98
Figure III-27 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du produit CR7.....	100
Figure III-28 : Spectre RMN ¹ H du produit CR7.....	101
Figure III-29 : Spectre RMN ¹³ C du produit CR7.....	102
Figure III-30 : Spectre COSY du produit CR7.....	103
Figure III-31 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du produit CR8.....	106
Figure III-32 : Spectre RMN ¹ H du produit CR8.....	107
Figure III-33 : Spectre RMN ¹³ C du produit CR8.....	107
Figure III-34 : Spectre de masse ESI-MS du produit CR9.....	110
Figure III-35 : Spectre RMN ¹ H du produit CR9.....	111
Figure III-36 : Spectre RMN ¹³ C du produit CR9.....	112
Figure III-37 : Spectre COSY du produit CR9.....	113
Figure III- 38 : Spectre HSQC du produit CR9.....	114
Figure III-39 : Spectre HMBC du produit CR9.....	116
Figure III-40 : Corrélations HMBC du produit CR9.....	116
Figure III-41 : Spectre COSY du produit CR9.....	117
Figure III-42 : Spectre HSQC du produit CR9.....	118
Figure III-43 : Spectre de masse ESI-MS du produit CR10.....	121
Figure III-44 : Spectre RMN ¹ H du produit CR10.....	121
Figure III-45 : Spectre HSQC du produit CR10.....	122
Figure III-46 : Spectre RMN ¹³ C du produit CR10.....	123
Figure III-47 : Spectre COSY du produit CR10.....	124
Figure III-48: spectre HMBC du produit CR10.....	125
Figure III-49: Corrélations HMBC du produit CR10.....	125
Figure III-50: Schéma d'extraction de la plante <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	130
Figure III-51: Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Cytisus purgans</i>	131
Figure III-52 : Spectre de masse ESI+ du produit CP1.....	132
Figure III-53: Spectre RMN ¹ H du produit CP1.....	133
Figure III-54: Spectre COSY du produit CP1.....	134
Figure III-55: Spectre RMN ¹³ C du produit CP1.....	134

Figure III-56: Spectre HSQC du produit CP1.....	135
Figure III-57: Spectre HMBC du produit CP1.....	136
Figure III-58: Spectre de masse ESI ⁺ du produit CP2.....	138
Figure III-59: Spectre RMN ¹ H du produit CP2.....	139
Figure III-60: Spectre HSQC du produit CP2.....	140
Figure III-61 : Spectre COSY H-H du produit CP2.....	140
Figure III-62 : spectre RMN ¹³ C du produit CP2.....	141
Figure III-63 : spectre HMBC du produit CP2.....	142
Figure III-64: Spectre de masse ESI ⁺ du produit CP3.....	144
Figure III-65: Spectre RMN ¹ H du produit CP3.....	145
Figure III-66 : spectre RMN ¹³ C du produit CP3.....	146
Figure III-67 : spectre HSQC du produit CP3.....	146
Figure III-68: Spectre HMBC du produit CP3.....	147
Figure III-69: Spectre RMN ¹ H du produit CP4.....	150
Figure III-70: Spectre HMBC du produit CP4.....	150
Figure III-71 : spectre RMN ¹³ C du produit CP4.....	151
Figure III-72: Spectre de masse ESI-MS du produit CP6.....	154
Figure III-73 : spectre RMN ¹ H du produit CP6.....	155
Figure III-74 : spectre RMN ¹³ C du produit CP6.....	155
Figure IV-1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	168
Figure IV-2: Structure de la paroi bactérienne des bactéries Gram positif et Gram négatif.....	171
Figure IV-3: Mécanisme réactionnel du DPPH avec l'antioxydant [29].....	175
Figure IV-4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	179
Figure IV-5: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	180
Figure IV-6: Activité anti-oxydante du standard (acide ascorbique).....	181
Figure IV-7: Activité anti-oxydante de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	181
Figure IV-8: Activité anti-oxydante de l'extrait butanolique de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	182
Figure IV-9: Effets actifs des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i> sur la croissance bactérienne.....	184
Figure IV-10: Effets inactifs des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i> sur la croissance bactérienne.....	184
Figure IV-11 : Activité antifongique des extraits AcOEt n-BuOH de L'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	185
Figure V-1: CCM des composés CR9, CR10.....	196

Figure V-2: CCM des composés CR7, CR8.....	197
Figure V-3: CCM des composés CR4, CR6.....	197
Figure V-4: CCM des composés CR3, CR5.....	198
Figure V-5: CCM du composé CR2.....	198
Figure V-6: CCM du composé CR1.....	199
Figure V-7: CCM du composé CP5.....	203
Figure V-8: CCM des composés CP4 et CP3.....	204
Figure V-9: CCM du composé CP1.....	204
Figure V-10: CCM du composé CP2.....	205
Figure V-11: CCM du composé CP7.....	205
Figure V-12: CCM du composé CP6.....	206

Liste des tableaux

Tableau II -1 les flavonoïdes identifiés du genre <i>Centaurea</i>	14
Tableau II-2 les sesquiterpènes lactones isolées du genre <i>Centaurea</i>	25
Tableau II-3 les triterpènes identifiés du genre <i>Centaurea</i>	30
Tableau II-4 les lignanes identifiés du genre <i>Centaurea</i>	32
Tableau II-5 Autre produits identifiés dans les Centaurées.....	34
Tableau II-6 Activités biologiques de quelques espèces des Centaurées.....	36
Tableau II-7 flavonoïdes identifiés du genre <i>Cytisus</i>	42
Tableau II-8 alcaloïdes identifiés du genre <i>Cytisus</i>	47
Tableau II-9 composés phénoliques identifiés du genre <i>Cytisus</i>	48
Tableau II-10 stéroïdes identifiés du genre <i>Cytisus</i>	50
Tableau II-12 Activités biologiques de quelques espèces du genre <i>Cytisus</i>	52
Tableau III-1 Rendements des extraits organiques.....	66
Tableau III-2 Données du spectre UV du produit CR1.....	68
Tableau III-3: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR1 dans CD ₃ OD.....	75
Tableau III-4: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR2 dans CD ₃ OD.....	82
Tableau III-5: Données du spectre UV du produit CR3.....	85
Tableau III-6: Déplacements chimiques RMN 1H (300 MHz) et 13C (75 MHz) du produit CR3 dans CD ₃ OD.....	88
Tableau III-7: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR4 dans CD ₃ OD.....	92
Tableau III-8: Données du spectre UV du produit CR5.....	93
Tableau III-9: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR5 dans DMSO.....	96
Tableau III-10: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR6 dans CD ₃ OD.....	99
Tableau III-11: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR7 dans CDCl ₃	104
Tableau III-12: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR8 dans CD ₃ OD.....	108
Tableau III-13: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR9 dans CDCl ₃	118
Tableau III-14: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du produit CR10 dans CDCl ₃	126

Tableau III-15 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du produit CP1 dans le CD ₃ OD.....	137
Tableau III-16: Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du produit CP2 dans CD ₃ OD.....	143
Tableau III-17: Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du produit CP3 dans CD ₃ OD.....	148
Tableau III-18 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du produit CP4 dans le CD ₃ OD.....	152
Tableau III-19 : Déplacements chimiques en RMN 1H (300 MHz) et RMN 13C (75 MHz) du produit CP6 dans le CD ₃ OD.....	156
Tableau IV-1 : les souches bactériennes testées et les pathologies qu'elles induisent.....	172
Tableau IV-2 : les souches fongiques testées et les pathologies qu'elles induisent.....	173
Tableau IV-3 : les souches bactériennes testées pour l'espèce <i>C. resupinata</i>	176
Tableau IV-4 : Teneur en polyphénols totaux de la plante <i>Centaurea resupinata</i>	179
Tableau IV-5 : Teneur en flavonoïdes de la plante <i>Centaurea resupinata</i>	180
Tableau IV-6: Activité anti-oxydante des extraits de <i>Centaurea resupinata</i> et antioxydant standard	182
Tableau IV-7: Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	183
Tableau IV-8 : Diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de certaines levures des extraits AcOEt et n-BuOH de L'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	185
Tableau V-1 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i>	196
Tableau V-2 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Cytisus purgans</i>	202

Abréviations

OMe :	Méthoxyl
Glc :	Glucose
Gal :	Galactose
Rha :	Rhamnose
Gluc :	Acide glucuronique
LPO :	Inhibition de la peroxydation lipidique
TBARS :	Substances réactives à l'acid thiobarbiturique
CTA :	Capacité totale antioxydant
CMI :	concentration minimale inhibitrice
FRAP :	Pouvoir réducteur du fer
ICAM-1 :	intercellular adhésion molécules
Na₂SO₄ :	Sulfate de sodium
AcOEt :	Acétate d'éthyle
n-BuOH :	n-Butanol
MeOH :	Méthanol
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CDCl₃ :	Chloroforme deutéré
CD₃OD :	Méthanol deutéré
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CC :	Chromatographie sur colonne
CCE :	Chromatographie sur couche épaisse
SiO₂ :	Gel de silice normale
RP-18 :	Silice greffée en C-18
SM :	Spectrométrie de Masse
ESI	Electrospray Ionisation (ionisation par électrospray)
m/z	Masse/charge d'un ion
uma :	Unité de masse atomique
UV :	Ultra-Violet
nm :	Nanomètre
λ max :	Longueur d'onde maximale
RMN 1H :	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN 13C :	Résonance magnétique nucléaire ducarbone13
HMBC :	Heteronuclear multiple bond correlation

HSQC :	Heteronuclear single quantum correlation
COSY H-H :	Correlation spectroscopy H-H
[α]D:	Pouvoir rotatoire
J:	Constante de couplage exprimée en Hz
δ :	Déplacement chimique en ppm
ppm :	Partie par million
m :	Multiplet
s :	Singulet
sl :	Singulet large
d :	Doublet
dd :	Doublet de doublets
ddd :	Doublet de doublets de doublets
ddt :	Doublet de doublets de triplets
dt	Doublet de triplets
t :	Triplet
quint :	Quintuplet
ax :	Axial
eq :	Equatorial
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
SOD :	Super-oxydes dismutases
GPO :	Glutathion peroxydase
BGP :	Bactéries à Gram positif
BGN :	Bactéries à Gram négatif
ATCC :	American type culturecollection
DPPH :	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle
IC50 :	Concentration inhibitrice à 50%
NCCLS :	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ATB :	Antibiotique
EGA:	Equivalent gramme d'acide galique
EQ :	Equivalent de la quercétine
F :	Fraction

Sommaire

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Médecine populaire et plantes	
Chapitre II : Rappel bibliographique (<i>Centaurea-Cytisus</i>)	
II-1-Position systématique de la famille Asteraceae.....	11
II-1-1-Caractères botaniques des Astéracées.....	11
II-1-2-Présentation du genre <i>Centaurea</i>	12
II-1-3-Intérêt thérapeutiques du genre <i>Centaurea</i>	12
II-1-4-Espèce <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>dufourii</i> (dostal) greuter.....	13
II-1-4-1-Description botanique.....	13
II-1-4-2-Classification botanique.....	13
II-1-5-Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Centaurea</i>	14
II-1-5-1-Flavonoïdes du genre <i>Centaurea</i>	14
II-1-5-2-Sesquiterpènes lactones du genre <i>Centaurea</i>	24
II-1-5-3-Triterpènes du genre <i>Centaurea</i>	30
II-1-5-4-Lignanes du genre <i>Centaurea</i>	32
II-1-5-5-Autre composés du genre <i>Centaurea</i>	34
II-1-6-Activités biologiques du genre <i>Centaurea</i>	35
II-2-Position taxonomique de la famille Fabaceae (Leguminosae).....	39
II-2-1-Caractères botaniques des Fabacées.....	39
II-2-2-Intérêt thérapeutique des Fabacées.....	40
II-2-3-Présentation du genre <i>Cytisus</i>	40
II-2-4-Intérêt thérapeutiques du genre <i>Cytisus</i>	41
II-2-5-Espèce <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	41
II-2-5-1-Description botanique.....	41
II-2-5-2-Classification botanique.....	42
II-2-6-Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Cytisus</i>	42
II-2-6-1-Flavonoïdes.....	42
II-2-6-2-Alcaloïdes.....	47

II-2-6-3-Composés phénoliques.....	48
II-2-6-4-Stéroïdes.....	50
II-2-6-5-Autres composés.....	51
II-2-7-Activités biologiques du genre <i>Cytisus</i>	51
Références.....	53

Travaux personnels

Chapitre III : Investigation chimique

III-1-Investigation chimique de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>dufourii</i>	65
III-1-1-Extraction.....	65
III-1-2-Séparation et purification de l'extrait Acétate d'éthyle	66
III-1-3-Détermination structurale des produits obtenus	67
III-1-3-1-Elucidation structurale du produit CR1.....	67
III-1-3-2-Elucidation structurale du produit CR2.....	76
III-1-3-3- Elucidation structurale du produit CR3.....	84
III-1-3-4-Elucidation structurale du produit CR4.....	89
III-1-3-5- Elucidation structurale du produit CR5.....	92
III-1-3-6-Elucidation structurale du produit CR6.....	97
III-1-3-7-Elucidation structurale du produit CR7.....	100
III-1-3-8-Elucidation structurale du produit CR8.....	105
III-1-3-9-Elucidation structurale du produit CR9.....	110
III-1-3-10-Elucidation structurale du produit CR10.....	120
III-1-4-Conclusion.....	127
III-2- Investigation chimique de l'espèce <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	130
III-2-1-Extraction.....	130
III-2-2- Séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	131
III-2-3- Détermination structurale des produits obtenus	131
III-2-3-1-Elucidation structurale du produit CP1.....	132
III-2-3-2-Elucidation structurale du produit CP2.....	138
III-2-3-3-Elucidation structurale du produit CP3.....	144
III-2-3-4-Elucidation structurale du produit CP4.....	149

III-2-3-5-Elucidation structurale du produit CP5.....	153
III-2-3-6-Elucidation structurale du produit CP6.....	153
III-2-3-7-Elucidation structurale du produit CP7.....	157
III-2-4-Conclusion.....	157
Références.....	160
Chapitre IV : Activités biologiques	
IV-1-Activité anti-oxydante.....	168
IV-1-1-Stress oxydatif.....	168
IV-1-2-Conséquence du Stress oxydatif.....	168
IV-1-3-Anti-oxydants.....	168
IV-1-3-1-Antioxydants enzymatiques.....	169
IV-1-3-2-Antioxydants non enzymatiques.....	169
IV-1-3-3-Conditions d'utilisation des antioxydants.....	169
IV-2-Activité antimicrobienne	170
IV-2-1-Introduction.....	170
IV-2-2-l'activité antibactérienne.....	171
IV-2-2-1-Types de bactéries.....	171
IV-2-2-2-Caractères généraux sur les souches étudiées.....	172
IV-2-3-l'activité antifongique.....	172
IV-2-4-Les Composés antimicrobiens.....	173
IV-3-partie expérimentale.....	174
IV-3-1-Dosage des polyphénols totaux.....	174
IV-3-2-Dosage des flavonoïdes.....	174
IV-3-3-Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	175
IV-3-4-Activité antibactérienne.....	176
IV-3-4-1-Méthode par diffusion sur milieu gélosé (Méthode de disques).....	176
IV-3-5-Activité antifongique.....	178
IV-3-6-Analyse statistique.....	178
IV-4-Resultats et Discussion.....	178
IV-4-1-Dosage des polyphénols totaux.....	178

IV-4-2-Dosage des flavonoïdes.....	179
IV-4-3-Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	181
IV-4-4-Résultats de l'activité antimicrobienne de la plante <i>Centaurea resupinata</i>	183
IV-4-4-1-l'activité antibactérienne.....	183
IV-4-4-2-l'activité antifongique.....	185
IV-4-4-3-Discussion.....	186
IV-5-Conclusion.....	186
Références.....	188
Conclusion générale.....	192

Chapitre V : Partie expérimentale

V-1-Matériel et appareillage.....	194
V-1-1-Récolte des plantes étudiées.....	194
V-1-2-Chimie extractive.....	194
V-1-2-1-Chromatographie sur couche mince et Epaisse (CCM et CCE).....	194
V-1-2-2-Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	194
V-1-3-Chimie structurale.....	194
V-1-3-1-Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	194
V-1-3-2-Spectroscopie de masse (SM).....	194
V-1-3-3-Spectrométrie UV-Visible.....	195
V-1-3-4-Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	195
V-2-Etude de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>dufourii</i>	195
V-2-1-Extraction.....	195
V-2-2-Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	195
V-2-3-Données spectrales et constantes physiques des produits isolés de l'espèce <i>Centaurea resupinata</i> subsp. <i>dufourii</i>	199
V-2-3-1-Composé CR1.....	199
V-2-3-2-Composé CR2.....	200
V-2-3-3-Composé CR3.....	200
V-2-3-4-Composé CR4.....	200
V-2-3-5-Composé CR5.....	200
V-2-3-6-Composé CR6.....	201

V-2-3-7-Composé CR7.....	201
V-2-3-8-Composé CR8.....	201
V-2-3-9-Composé CR9.....	201
V-2-3-10-Composé CR10.....	202
V-3-Etude de l'espèce <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	202
V-3-1-Extraction.....	202
V-3-2-Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	202
V-3-3-Composés isolés de l'espèce <i>Cytisus purgans</i> (L.) Benth.....	206
V-3-3-1-Composé Cp1.....	206
V-3-3-2-Composé Cp2.....	206
V-3-3-3-Composé Cp3.....	207
V-3-3-4-Composé Cp4.....	207
V-3-3-5-Composé CP5.....	207
V-3-3-6-Composé CP6.....	207
V-3-3-7-Composé CP7.....	208

INTRODUCTION GENERALE

A travers les siècles, les plantes ont été considérées comme des usines végétales pour produire un grand nombre de biomolécules ayant un potentiel pharmacologique intéressant [1]. Les plantes médicinales ont toujours prouvé leur efficacité en médecine populaire ce qui leurs confère le premier rang des sources de principes actifs médicamenteux [2]. La valeur thérapeutique des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, en effet leurs propriétés pharmacologiques sont souvent liées aux métabolites secondaires [3].

A nos jours, le traitement par les plantes médicinales est largement préconisé par les thérapeutes ainsi que les organisations de la santé. La valorisation de ces ressources naturelles est devenue une préoccupation principale pour connaître le mode d'action, les principes actifs, et les effets secondaires de la phytothérapie sur la santé humaine [4]. L'évaluation des propriétés antimicrobienne et anti-oxydante des plantes, notamment celles non connues et utilisées dans la médecine populaire est très importante car ces espèces représentent une éventuelle source de composés bioactifs [5].

Sur le plan écogéographique, l'Algérie s'individualise par une diversité de son climat (entre la mer Méditerranée et l'Afrique subsaharienne), son écosystème et sa topographie donnant naissance à un patrimoine floristique naturel considérable. Dans cette flore on note plus de 408 espèces Asteraceae [6] et 337 espèces Fabaceae [7]. Ces deux familles connues pour leurs propriétés phytothérapeutiques et économiques innombrables.

Pour ces raisons, l'objectif de notre étude consiste en la valorisation de deux plantes *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostal) greuter (Asteraceae) et *Cytisus purgans* (L.) Benth (Fabaceae). La recherche bibliographique exhaustive réalisée sur ces deux genres *Centaurea* et *Cytisus* a mis en évidence leurs richesses en substances naturelles particulièrement les flavonoïdes considérées comme marqueur chimiotaxonomique [8, 9].

Ce travail de thèse de doctorat est réparti en deux parties :

La première est un aperçu bibliographique composé de deux chapitres :

- ❖ Dans le premier chapitre, nous présentons l'intérêt des plantes en médecine traditionnelle.
- ❖ Le second chapitre est consacré à la description botanique des familles Asteraceae et Fabaceae. Il expose également les études chimiques antérieures et les activités biologiques relatives aux genres *Centaurea* et *Cytisus*.

Introduction générale

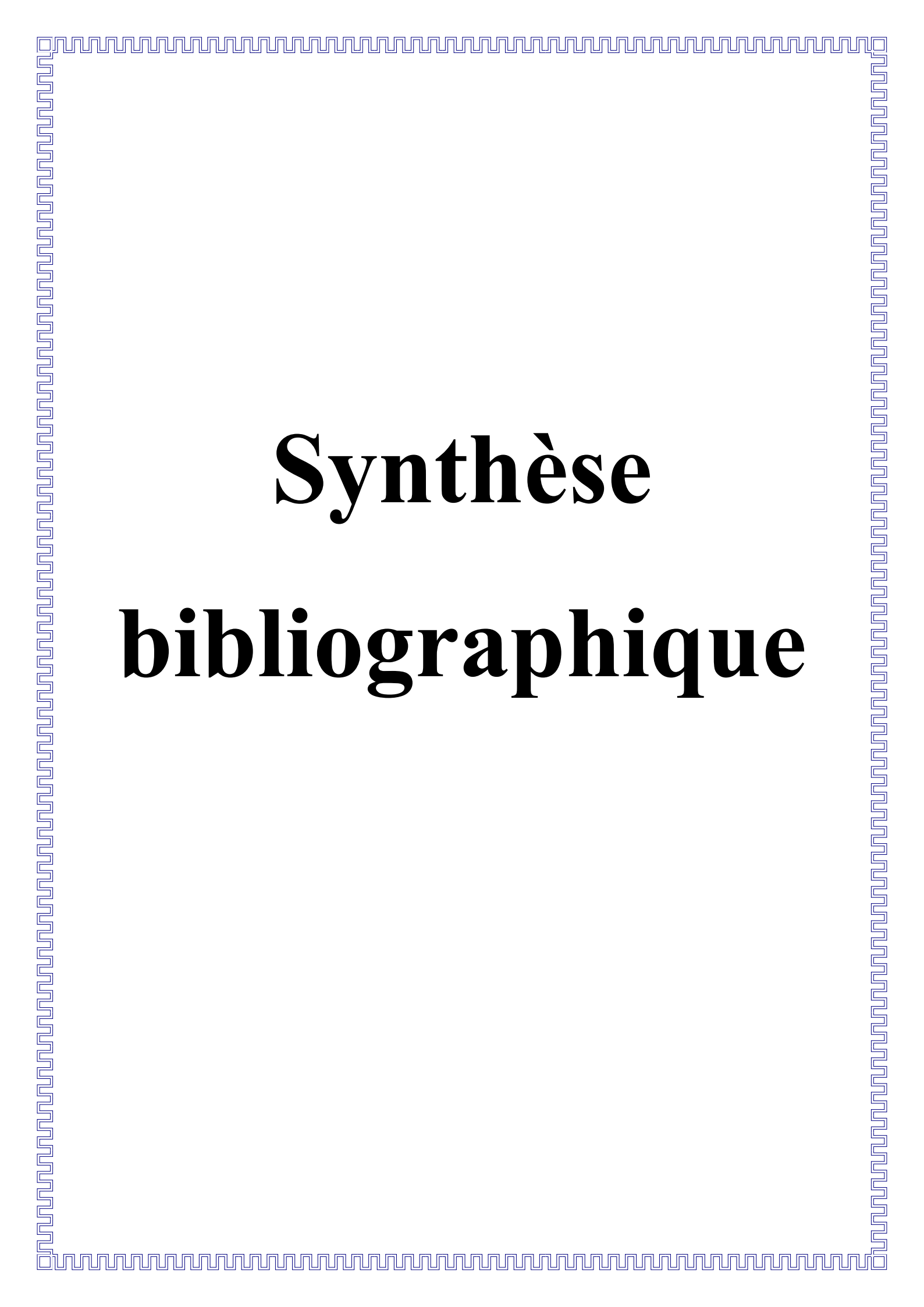
La deuxième partie est dédiée aux travaux personnels incluant trois chapitres:

- ❖ Le troisième chapitre reporte les résultats de l'étude phytochimique effectuée sur les espèces *Centaurea resupinata* et *Cytisus purgans*, en exposant les techniques d'extraction, de séparation et la détermination structurale des produits isolés.
- ❖ Le quatrième chapitre consacré à l'étude *in vitro* des activités anti-oxydante et antimicrobienne, effectuée sur les extraits bruts (acétate d'éthyle et butanolique) des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata*. Il présente également la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes de ces deux extraits.
- ❖ Le dernier chapitre décrit en détails les protocoles chromatographiques, spectroscopiques et biologiques effectués dans le cadre de ce travail.

Une conclusion générale résume les résultats obtenus au cours de ce travail et les perspectives envisagées.

Références

- [1] L,Joudi. *Exploration of medicinal species of Fabaceae, Lamiaceae and Asteraceae families in Ilkhji region, eastern Azerbaijan Province*. Journal of Medicinal Plants Research, 4(11), 1081-1084. **2010**.
- [2] M, Rahmatullah., D,Ferdausi., A,Mollik., R,Jahan. *A survey of medicinal plants used by Kavirajes of Chalna area, Khulna district, Bangladesh*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 7(2). **2010**.
- [3] S,Edrah., F,Alafid., A,Imramovský., K,Altwair. *Phytochemical screening and antibacterial activity of Genista microcephala and Rosmarinus officinalis extracts from Libyan's regions*. Int J Res Ayurveda Pharm, 8(4), 52-56. **2017**.
- [4] B,Benarba., L,Belabid., K,Righi., A,amine Bekkar.Hamimed. *Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria)*. Journal of ethnopharmacology, 175, 626-637. **2015**.
- [5] R,Jamous., S,Zaitoun., A,Husein., I,Qasem. *Screening for biological activities of medicinal plants used in traditional arabic palestinian herbal medicine*. European Journal of Medicinal Plants, 9(1), 1-13. **2015**.
- [6] P,Quezel., S,Santa. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France. **1963**.
- [7] P,Ozenda. *Flore du Sahara*. Deuxième édition du CNRS. Paris, 622p. **1983**.
- [8] G,Xiao., G,LI., L,Chen., Z,Zhang. *Isolation of antioxidants from Psoralea corylifolia fruits using high-speed counter-current chromatography guided by thin layer chromatography-antioxidant autographic assay*. Journal of Chromatography A. 1217, 5470-5476. **2010**.
- [9] A,Nacer., J,Merza., Z,Kabouche., S,Rouati. *Sesquiterpene lactones from Centaurea tougourensis*. Biochemical Systematics and Ecology. 43, 163-165. **2012**.

A decorative border with a repeating geometric pattern of interlocking squares and lines, rendered in a light blue color, frames the entire page.

Synthèse

bibliographique

Chapitre I

Médecine populaire et plantes

Intérêt des plantes en médecine traditionnelle

Depuis la plus haute antiquité, l'homme a trouvé dans les plantes les remèdes pour se soigner et soulager ses maux et par expérience, il a appris à reconnaître les plantes toxiques. Ces connaissances ont été développées avec le temps et transmises oralement de génération en génération [1]. Les premiers écrits remonteraient jusqu'à 5000 avant Jésus Christ, avec notamment la tablette sumérienne de Nippur, qui décrit plus de 250 plantes ainsi que des recettes et modes d'emploi [2].

Les plus anciennes civilisations témoignent du large usage des plantes médicinales en thérapeutique, celles-ci sont toujours considérées comme des sources inépuisables de nouveaux médicaments [3]. Malgré les progrès de la médecine moderne, les plantes médicinales conservent leur popularité pour des raisons historiques et culturelles. Ainsi, dans de nombreux pays en développement, une grande partie de la population satisfait ses besoins en matière de soins de santé grâce aux plantes médicinales. [4].

La médecine chinoise

La médecine traditionnelle chinoise (MTC) est l'un des arts de guérison les plus anciens connus de l'homme [5, 6]. Selon l'Organisation mondiale de la santé et l'institut national de la santé, la MTC est née il y a plus de 3000 ans grâce à l'empereur Shen Nung (environ 2700 avant J.-C.), qui a étudié la valeur médicinale de plusieurs centaines d'herbes. Il est l'auteur du Pen T-Sao, ou Herbe indigène, répertoriant 365 médicaments.

Maintes plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine populaire chinoise, et les praticiens de cette médecine utilisaient souvent des combinaisons de plantes plus tôt qu'une seule plante. La pharmacopée chinoise répertorie environs plus de 8000 ingrédients, dont 800 sont utilisés couramment [7].

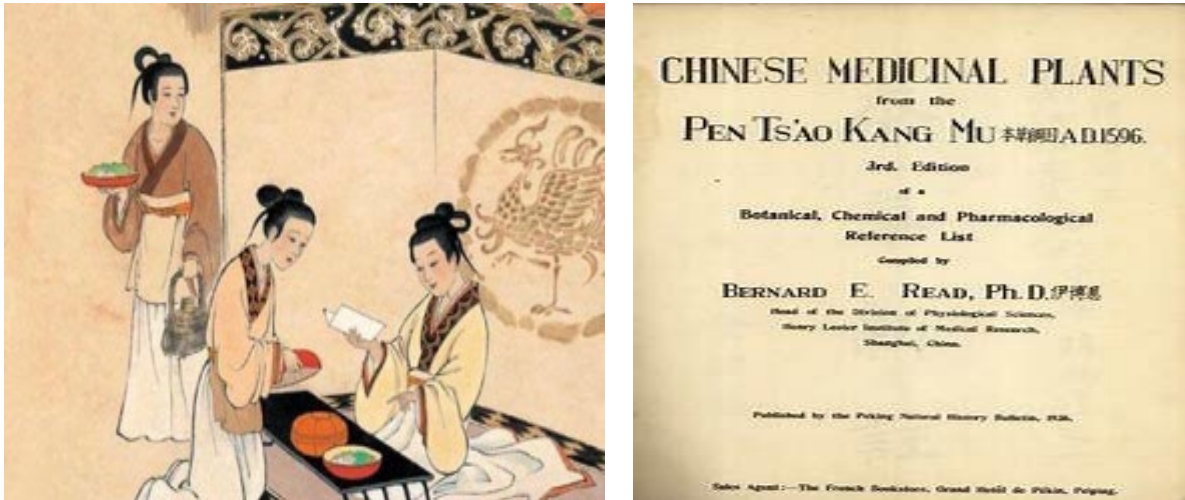


Figure I-1: La médecine dans la chine ancienne [8]

La médecine indienne

L'Inde représente 8 % de la biodiversité mondiale, avec environ 49000 espèces végétales, dont 5150 espèces endémiques [9,10]. La chaîne himalayenne, les Ghâts occidentaux, le nord-est des collines indiennes (Khasi et Mizohills) et les chaînes de montagnes Vindhya et Satpura de la péninsule nord de l'Inde sont la mine d'or des espèces végétales supérieures. La phytothérapie a une importance particulière dans la culture et la médecine traditionnelle de l'Inde [9]. Les médicaments à base de plantes sont toujours à la base du système de soins de santé moderne et sont également reconnus pour leur importance économique [11].

Les concepts et les pratiques des différents systèmes médicaux traditionnels en Inde datent d'environ plusieurs milliers d'années. Bien que différents produits chimiques, minéraux et produits animaux sont utilisés pour préparer des agents curatifs, une grande partie de la population indienne croit encore et reçoit des soins médicaux traditionnels, qui sont basés sur les principes de trois anciens systèmes de médecine indienne codifiés (SMI): Ayurveda (Ayur signifie vie et veda signifie l'étude : l'étude de la vie) Siddha et Unani [12]. Le plus ancien écrit, le Charaka Samhita, remonterait à sept siècles avant Jésus-Christ [13, 14].

On estime que l'Ayurveda utilise 1200 espèces de plantes, tandis que Siddha et Unani incluent respectivement 900 et 700 espèces de plantes dans leurs préparations médicinales [15]. Actuellement, plus de 1,5 million de praticiens de la médecine traditionnelle en Inde utilisent les plantes médicinales à des fins préventives, promotionnelles et curatives [16].

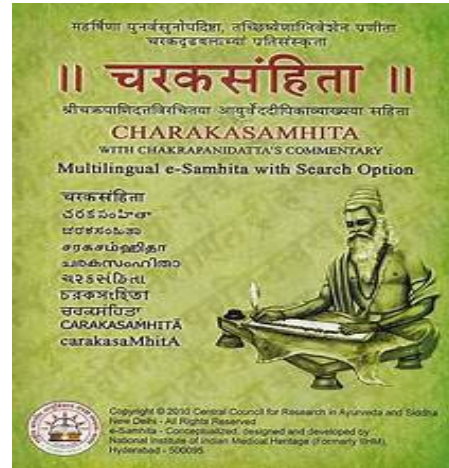


Figure I-2: La médecine dans l'Inde ancienne [17]

✚ La médecine égyptienne

En Égypte antique, le berceau de la médecine et de la pharmacie, les propriétés médicinales des plantes ont été décrites dans le papyrus médical Kahun (1900 av. J.-C.), et le papyrus Edwin Smith (1600 av. J.-C). Parmi les produits naturels fréquemment mentionnés, on trouve le miel utilisé efficacement dans le traitement des plaies, ultérieurement des études cliniques et pharmacologiques confirment ses propriétés osmotiques, décongestionnantes, antiseptiques et antibiotiques [18]. En raison de son effet déshydratant et astringent, le natron (le sel de Basse-Egypte) n'était pas utilisé seulement pour la momification, mais aussi pour plaies exsudatives et éruptions cutanées [19].

De même, les oignons étaient utilisés pour les plaies purulentes, les furoncles et les lésions inflammatoires. En effet, il y a à peine 50 ans, il a été démontré que sa composition chimique en actifs possède des effets bactéricides et fongicides [20].

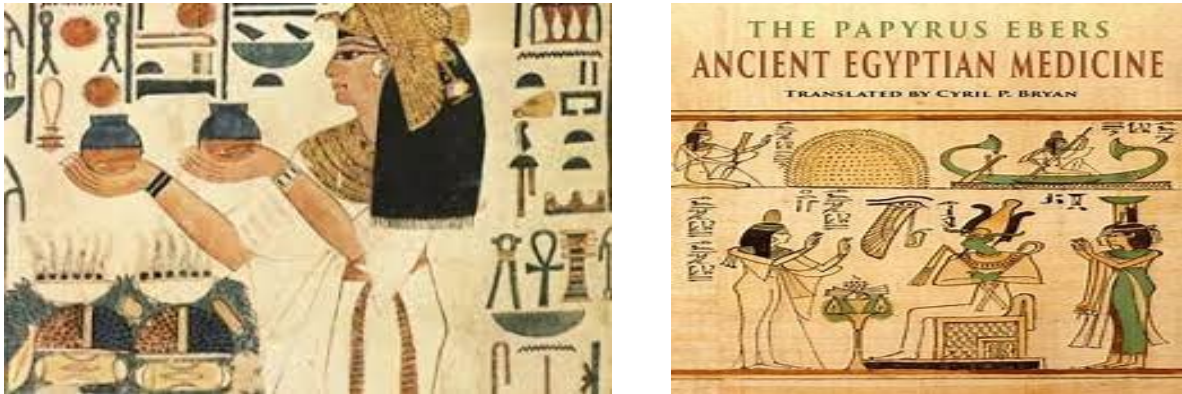


Figure I-3: La médecine dans l'Égypte ancienne [21]

✚ La médecine grecque et romaine

Les scientifiques gréco-romains ont beaucoup contribué à l'évolution de la médecine. On leur doit le terme « Phytothérapie », qui signifie traitement par les plantes. Hippocrate (460-377 av J.-C.) est le pionnier des bases de la médecine scientifique, il est le premier qui a séparé la médecine des concepts irrationnels de la magie. Il établissait une relation entre la forme ou la couleur de la plante, et la maladie qu'elle pouvait guérir. Dans son œuvre le Corpus Hippocraticum, il détaillait plus de 400 remèdes simples à base de plantes [22].

Dioscoride, un médecin qui a vécu au premier siècle de notre ère, a décrit des plantes médicinales, dont certaines comme la belladone, l'ergot, l'opium et le colchique, sont encore utilisées de nos jours. Il est l'auteur du traité « materia medica » considéré comme un manuel de référence dans le domaine de la pharmacologie européenne. Ce document présente la description botanique et les utilisations culinaires et médicinales des plantes [23].

Galien (131-201 av J.-C), considéré comme le père de la pharmacie, a mis au point la science de préparation de médicaments à partir de matières premières végétales et animales, connus sous le nom de "galénique" [24].

✚ La médecine arabe

Les innovations médicales introduites par les médecins arabes (musulmans) sont innombrables notamment, la découverte du système immunitaire et les microorganismes [25, 26]. Ibn Sina a été le premier à séparer la médecine de la science pharmacologique. En ce qui

concerne la phytothérapie, les médecins arabes ont introduit de nombreux nouveaux aspects et amélioré les connaissances sur les herbes et leur efficacité médicales.

Le chimiste Ibn Hayan a pu extraire différents composés anesthésiques à partir d'herbes locales (*Hyoscyamus aureus*, *Opium* et *Cannabis sativa*) pour une anesthésie locale ou générale. En Andalousie, les médecins, botanistes et pharmacologues arabes dirigés par Ibn AlBitar ont pu introduire environ 350 nouvelles espèces végétales comme herbes médicinales pour le traitement des maladies humaines (Ibn AlBitar, 1874).

Abu Al Abbas et d'autres herboristes ont publié plusieurs livres et encyclopédies sur les plantes médicinales, en décrivant les parties de plantes utilisées, la procédure de préparation de chaque remède et la procédure de traitement de certaines maladies [25, 26].



Figure I-4: La médecine Arabe [27]

Références

- [1] M,Kartal. *Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(2), 113-119. **2007**.
- [2] R.M,Kunwar., K.P,Shrestha. *Traditional herbal medicine in Far-west Nepal: a pharmacological appraisal*. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 6(1), 1-18. **2010**.
- [3] A.P,Vishwakarma., A,Vishwe., P,Sahu. *Magical Remedies of Terminalia arjuna ROXB*. *International Journal of Pharmaceutical Archive*, 2, 189-201. **2013**.
- [4] S,Hosseinzadeh., A,Jafarikukhdan., A,Hosseini. *The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635. **2015**.
- [5] T.J,Kaptchuk. *The web that has no weaver: understanding Chinese medicine*. Congdon & Weed. Inc. New York. **1983**.
- [6] M,Li. *The Yellow Emperor's classic of medicine [translation and commentary]*. Boston: Shambhala. . **1995**.
- [7] G,Nestler. *Traditional chinese medicine*. *Medical Clinics*, 86(1), 63-73. **2002**.
- [8]<https://www.contacter-dentiste-de-garde.org/3-branches-de-la-medecine-chinoise-a-decouvrir> [consulté le 2/12/2021].
- [9] K,Ramakrishnappa. *Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity. case studies from India*. **2003**.
- [10] S,Sen. *Toward the integration and advancement of herbal medicine: a focus on traditional Indian medicine*. *Botanics: Targets and Therapy*, 5, 33-44. **2015**.
- [11] S,Sen., R,Chakraborty. *Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context*. *Journal of Herbal medicine*, 1(3-4), 67-75. **2011**.
- [12] B.V,Subbarayappa. *The roots of ancient medicine: an historical outline*. *Journal of biosciences Bangalore*.26(2), 135-143. **2001**.
- [13] V,Yadav., S,Jayalakshmi. *Traditional systems of medicine-Now & Forever*. **2012**.
- [14] B,Ravishankar. *Indian systems of medicine: a brief profile*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(3), 319-337. **2007**.

- [15] S,Kannaiyan. *Diversity, sustainable use and conservation of medicinal plants*. Inaugural address to the International Seminar on Medicinal Plants and Herbal Products, Tirupati, India. **2014**.
- [16] S,Wakdikar. *Global health care challenge: Indian experiences and new prescriptions*. Electronic Journal of Biotechnology, 7(3), 02-03. **2004**.
- [17]<https://bio-et-sante.com/medecine-ayurvedique-comprendre-les-doshas>[consulté le 2/12/2021].
- [18] H.A,Wahdan . *Causes of the antimicrobial activity of honey*. Infection, 26(1), 26-31. **1998**.
- [19] K.S,Kolta. *Die Heilkunde im alten Ägypten: Magie und Ratio in der Krankheitsvorstellung und therapeutischen Praxis*. Franz Steiner Verlag. **2000**.
- [20] F.A,Ramos., Y,Takaishi., M,Shirotori., Y,Kawaguchi., K,Tsuchiya., H,Shibata., T,Higuti. *Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion*. Journal of agricultural and food chemistry, 54(10), 3551-3557. **2006**.
- [21]<https://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/pesehet.html>[consulté le 2/12/2021].
- [22] J,Laskaris. *Nursing mothers in Greek and Roman medicine*. American Journal of Archaeology, 112(3), 459-464. **2008**.
- [23] I,Murad. *Research into the history of the medicine and pharmacology of the Arabs*. Beirut, Lebanon: Dar AlGarb Allislami, (in Arabic). **1991**.
- [24] H.S,Tastaa. *The Arab Sun is Shining on the West*. Translated from German to Arabic in. **1991**.
- [25] A,Shams . *Altadawy Fi Alashaab Kademan wa Hadethan*. Beirut, Lebanon: Dar AlKutum Alelmeah. **1991**.
- [26] L,Munke. *ALTadawy Be Alashab Fi Masr Alkademeh*. Cairo, Egypt: Maktabat Madbouly. **1993**.
- [27] <https://article19.ma/accueil/archives/138763> [consulté le 2/12/2021].

Chapitre II

Rappel bibliographique (*Centaurea-Cytisus*)

II-1-Position systématique de la famille Asteraceae

Les Astéracées appelées autrefois composées constituent une vaste famille de plantes dicotylédones avec environ de 24000 espèces réparties en 1600 genres [1]. En Algérie, on trouve plus de 408 espèces et 109 genres [2]. Ce sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes, parfois des plantes grimpantes ou des épiphytes [3]. La répartition de cette famille est cosmopolite dont la plupart de ces espèces existent dans les régions tempérées, sèches et aussi les régions froide du globe [4, 5, 6].

II-1-1-Caractères botaniques des Astéracées

Les plantes Astéracées sont caractérisées par les feuilles simples alternes, rarement opposées ou verticillées, simples exstipulées [7]. Les fleurs sont hermaphrodites ou unisexuées, mêlées de paillettes ou de bractées, et groupées en capitule composé d'un réceptacle commun. Elles possèdent cinq pétales soudés. Les étamines sont également soudées par leurs filets à la base de la corolle ainsi que leurs anthères à déhiscence longitudinales et introrse [8]. Le calice est absent nul ou assimilé au pappus et la corolle actinomorphe ou zygomorphes avec un tube en général prolongé par un limbe, ou ligule tridentée. Les fruits sont des akènes indéhiscentes et couronnés par le limbe du calice. Les graines sont exalbuminées [9].

La classification botanique de la famille Asteraceae se présente comme suit :

✚ Règne	Plantae
✚ Sous-règne	Tracheobionta
✚ Division	Magnoliophyta
✚ Classe	Magnoliopsida
✚ Sous-classe	Asteridae
✚ Ordre	Asterales
✚ Famille	Asteraceae
✚ Synonyme	Compositae

II-1-2-Présentation du genre *Centaurea*

Les espèces du genre *Centaurea* sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles et vivaces [10], à tiges rigides et pubescentes, les capitules multiflores à fleurs homomorphes ou dimorphes. Les fleurs sont tubulées et leur couleur varie entre le rose, le pourpre, le violet et quelques espèces à fleurs jaunes. L'involucre est composé de nombreuses bractées, chacune terminée par une écaille qui peut être épineuse. Le fruit est un akène élaïosome avec une aigrette assez courte, surtout pour le fruit central [2].

Le genre *Centaurea* est répandu dans le monde entier. Il comprend plus de 500 espèces [11] dont 45 espèces poussant spontanément en Algérie [2].

Plusieurs investigations phytochimiques sur ce genre ont montré une richesse en métabolites secondaires bioactifs notamment les flavonoïdes [12, 13, 14], les sesquiterpènes lactones [15,16,17], les lignanes [18], les phytostérols et les triterpènes [19,20].

II-1-3-Intérêt thérapeutiques du genre *Centaurea*

Les Centaurées sont réputées d'avoir un large éventail d'applications en médecine traditionnelle :

-L'espèce *C. uniflora* est connue chez la population chinoise pour traiter les intoxications et la fièvre [21].

- Plusieurs espèces Centaurées sont recommandées en médecine populaire turque, contre les affections inflammatoires : *C. iberica* pour le traitement des abcès et l'asthme, *C. jacea* et *C. calcitrapa* pour réduire la fièvre [22, 23], *C. pulchella*, *C. virgata* et *C. drabifolia* afin de soulager les douleurs abdominales et les maux d'estomac [24, 25, 26, 27].

-Dans la région de Jakabszállás (Hongrie), la décoction de parties aériennes de *C. sadleriana* est appliquée dans les blessures du bétail (en particulier le mouton) [28].

-En Espagne, l'infusion de *C. aspera*, *C. melitensis* et *C. seridis* var. *maritima* est utilisée pour l'hypoglycémie, *C. ornata* pour traiter les ulcères et les plaies gastriques [29].

II-1-4-Espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostal) greuter

II-1-4-1-Description botanique

Centaurea resupinata subsp. *dufourii* est une plante vivace, avec des tiges courtes, dressées ou décombantes. Les feuilles sont pubescentes-cendrées, variables, non décurrentes sur la tige. Les capitules sont petits (en moyenne: 7-8 mm sur 15), blanchâtres à la base. Les fleurs sont purpurines. Les akènes à aigrette très courte; pubescente et à stries longitudinales généralement bien marquées [2].



Figure II-1: Espèce *Centaurea resupinata* subsp. *Dufourii*

Centaurea resupinata subsp. *dufourii* pousse en l'Algérie, particulièrement dans les hautes montagnes. Elle se rencontre dans la région des Aurès, les Forêts claires et pâturages pierreux d'Oranie, et l'Atlas Saharien (Djebel Amour) [2].

II-1-4-2-Classification botanique

L'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* est classée comme suit [30, 31]:

- **Règne :** Plantae
- **Branche :** Tracheophyta

- **Classe :** Magnoliopsida (Dicotylédones)
- **Ordre :** Asterales
- **Famille :** Asteraceae
- **Genre :** *Centaurea*
- **Espèce :** *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*
- **Synonyme :** *Centaurea tenuifolia* Dufour

II-1-5-Etudes chimiques antérieures sur le genre *Centaurea*

Les espèces centaurées sont réputées par leur composition chimique riche et variée. La recherche bibliographique indique la présence de plusieurs métabolites secondaires, tels que : les lignanes [32], les triterpènes [33], les composés phénoliques [34], les flavonoïdes [13] et les sesquiterpènes lactones [17]. Ces deux derniers types de biomolécules sont les plus rencontrées dans ce genre.

II-1-5-1-Flavonoïdes du genre *Centaurea*

Les études phytochimiques effectuées sur les Centaurées ont conduit à la purification et la caractérisation de plusieurs flavonoïdes, constitués majoritairement de flavones (apigénine, chrysoériol, hispiduline, nepétine, luteoline) et falvonols (kaempferol, quercétine, astragaline, rutine, quercitrine....). Le tableau suivant présente quelques exemples des flavonoïdes isolés de diverses espèces de ce genre.

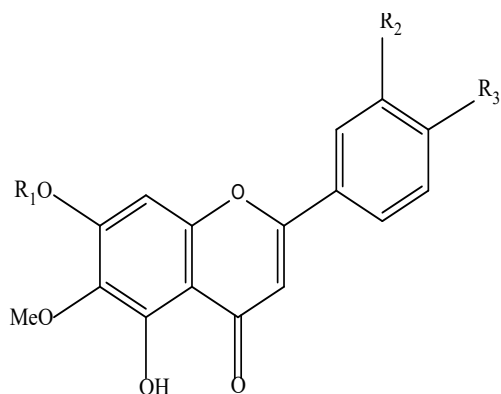
Tableau II -1 : les flavonoïdes identifiés du genre *Centaurea*

Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. cineraria</i> subsp. <i>umbrosa</i>	salviginine (1), 3'-O-méthyleupatorine (2), eupatiline (3), jaceosidine (4)	[35]
<i>C. sphaerocephala</i> L	chrysoériol (5), apigénine (6), nepétine (7), luteoline (8) chrysoériol 7-O-β-glucoside (9), apigétrine (10)	[36] [37]
<i>C. senegalensis</i>	eupatiline (3), jaceosidine (4), centaflavone A (11), centaflavone B (12), 6-méthoxy kaempferol (13), 6-hydroxy kaempferol (14)	[38]
<i>C. furfuracea</i> Coss	hispiduline 7-O-méthylglucuronide (15)	[39]

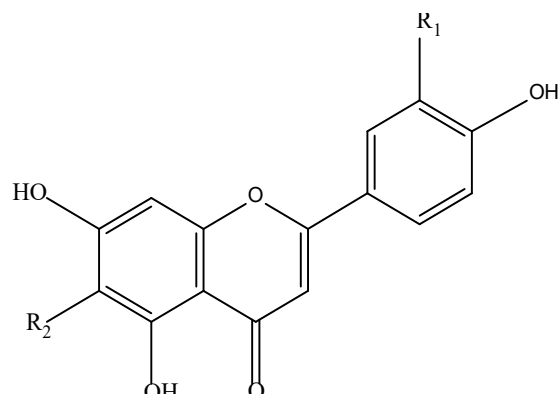
	apigenine-7-O-methylglucuronide (16), apigenine (6), apigetrine (10), hispiduline (17), cirsimaritrine (18), 5,7,4'-trihydroxy-3-methoxyflavone (19), hispiduline-7-O-glucoside (20)	[40]
<i>C. papposa</i>	eupatorine (21)	[41]
<i>C. urvillei</i> DC. <i>subsp. urvillei</i>	apigenine (6), luteoline (8), apigetrine (10), hispiduline-7-O- β -D-methylglucuronopyranoside (15), apigenine-7-O- β -D-methylglucuronopyranoside (16), hispiduline-7-O- β -D-glucopyranoside (20), naringenine-7-O- β -D-glucuronopyranoside (22), eriodictyol-7-O- β -D-glucuronopyranoside (23), 6-hydroxykaempferol-7-O- β -D-glucuronopyranoside (24), hispiduline-7-O- β -D-glucuronopyranoside (25), kaempferol (26)	[42]
<i>C. davidovii</i>	apigenine (6), luteoline (8), scutellareine 6-methyl ether (27), scutellareine 6,4'-dimethyl ethers (28), scutellareine 6,7,4'-trimethyl ethers (29), 6-hydroxyluteoline 6-methyl ether (30), 6-hydroxyluteoline 6,3'-dimethyl ethers (31), isokaempferide (32)	[43]
<i>C. parilica</i>	apigenine (6), scutellareine 6,4'-dimethyl ethers (28), 6-hydroxyluteoline 6-methyl ether (30), 6-hydroxyluteoline 6,3'-dimethyl ethers (31)	[43]
<i>C. stenolepis</i>	6-hydroxyluteoline 6-methyl ether (30), axillarine (33), centaureidine (34)	[43]
<i>C. schischkinii</i>	apigenine (6), astragaline (35), afzeline (36)	[44]
<i>C. jacea</i> L	apigenine (6), hispiduline (17), eupatorine (21), isokaempferide (32), axillarine (33), centaureidine (34), cirsilinol (37), 6-methoxykaempferol 3-methyl ether (38)	[45]
<i>C. aegyptiaca</i> L	apigenine (6), isovitexine (39), vitexine (40), isoquercetine (41), 3-O-methylquercetine (42), quercetine (43)	[46]
<i>C. tougourensis</i>	methyleupatorine (2), eupatiline (3), jaceosidine (4),	[47]

	apigenine (6), 3'-O- nepetine (7), kaempferol (26)	
<i>C. nicaeensis</i> All. var. <i>walliana</i> M	jaceosidine (4), apigenine (6), apigenine-7-O- β -D-methylglucuronopyranoside (16), apigenine 4'-(6''-methylglucuronide) (44), cirsilineol (45)	[48]
<i>C. scoparia</i>	apigetrine (10), centaureidine (34), 3',4'-dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acetoxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)-flavone-3-O- β -D-glucopyranoside (46), 3,3',4'-trihydroxy-(3'',4''-dihydro-3'',4''-dihydroxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)-flavone (47), cynaroside (48), oroxyline A (49), 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone (50), atalantoflavone (51), 5-hydroxy-3',4',8-trimethoxy-2'',2''-dimethylpyrano (5'',6'':6,7)-flavone (52), 3',4',5,8-tetramethoxy-2'',2''-dimethylpyrano (5'',6'':6,7)-flavone (53)	[49]
<i>C. horrida</i>	apigenine (6), apigetrine (10), astragaline (35), afzeline (36), isovitexine (39), vitexine (40), rutine (54), scutellareine 7-O- β -D-glucopyranoside (55), quercitrine (56)	[50]
<i>C. microcarpa</i> Coss. & Dur	nepetine (7), astragaline (35), 7-O- β -D-glucopyranosyl centaureidine (57)	[51]
<i>C. bracteata</i>	nepetine (7), luteoline (8), isokaempferide (32), axillarine (33), centaureidine (34), scutellareine 6-methyl ether (18), axillarine 7-glucoside (58), jaceidine (59), jaceine (60), 6-hydroxyluteoline 6,4'-dimethyl ether (61), centabracteine (62), bracteoside (63)	[52]
<i>C. omphalotricha</i> Coss. & Durieu ex Batt. & Trab	quercetine (43), oroxyline A (49), chrysine (64), tenaxine II (65), 5,7,2'-trihydroxyflavone (66)	[53]
<i>C. pseudoscabiosa</i> subsp.	pinocembrine 7-O- α -arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside (67), chrysine 7-O- β -	[54]

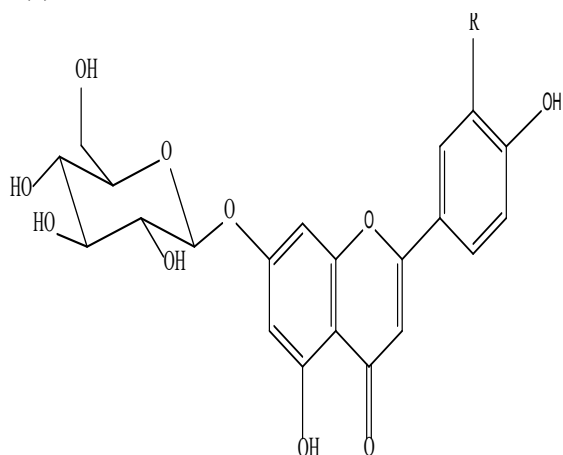
<i>pseudoscabiosa</i>	galactopyranuronoside (68), baicaleine 6-methylether-7-O-β-galactopyranuronoside (69)	
<i>C. orphanidea</i>	apigenine (6), luteoline (8), cirsimaritrine (18), isokaempferide (32)	[55]
<i>C. africana</i>	chrysoeriol (5), jaceidine (59), algerianine (70), 4'-methyl gossypetine (71), centaureine (72)	[56]
<i>C. sulphurea</i>	3'-O-methyl-eupatorine (2), eupatiline (3), jaceosidine (4), nepetine (7), cirsilineol (45)	[57]
<i>C. polyclada</i>	salvigenine (1), 3'-methoxy eupatorine (2), eupatorine (21)	[58]



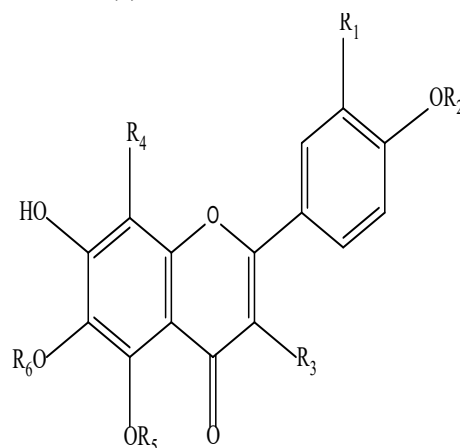
	R ₁	R ₂	R ₃
(1)	Me	H	OMe
(2)	Me	OMe	OMe
(3)	H	OMe	OMe
(4)	H	OMe	OH



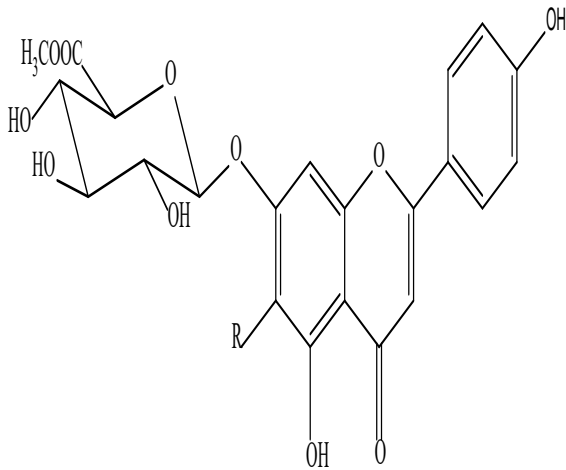
	R ₁	R ₂
(5)	OMe	H
(6)	H	H
(7)	OH	OMe
(8)	OH	H



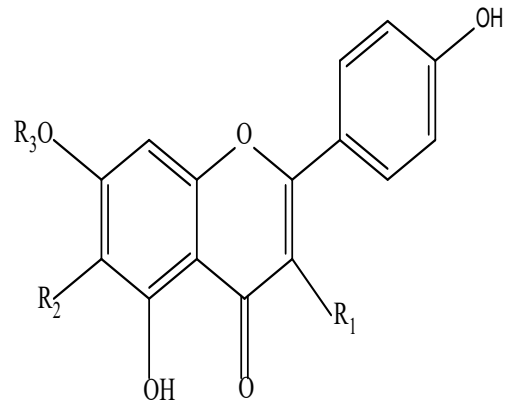
(9)	R
(10)	OMe



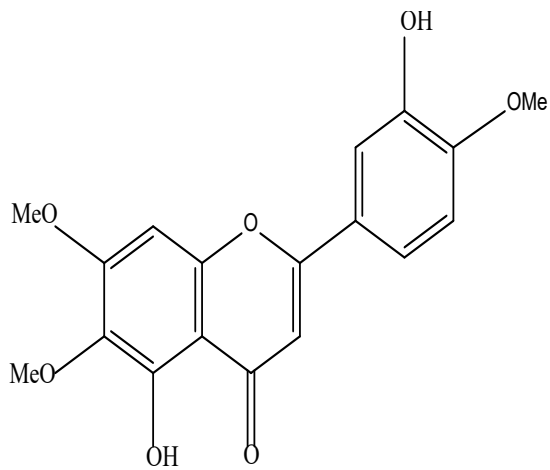
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(11)	H	Me	OMe	OMe	Me
(12)	H	H	OMe	OMe	Me
(13)	H	H	OH	H	H
(14)	H	H	OH	H	H



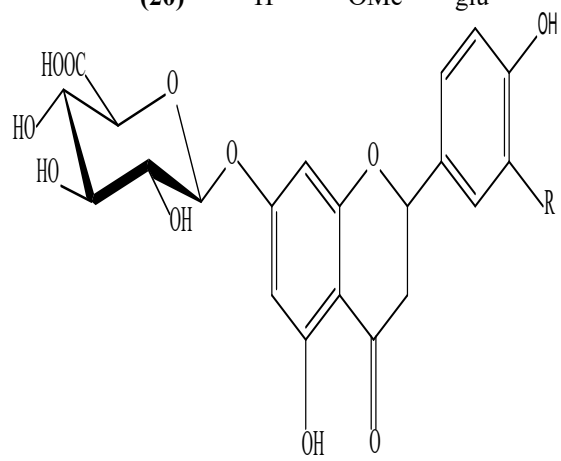
- (15) R
OMe
(16) H



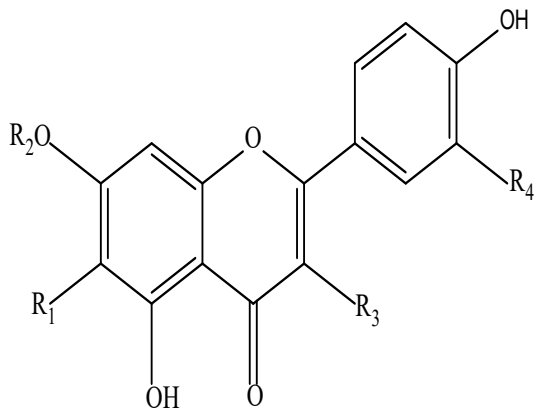
- | | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|------|----------------|----------------|----------------|
| (17) | H | OMe | H |
| (18) | H | OMe | Me |
| (19) | OMe | H | H |
| (20) | H | OMe | glu |



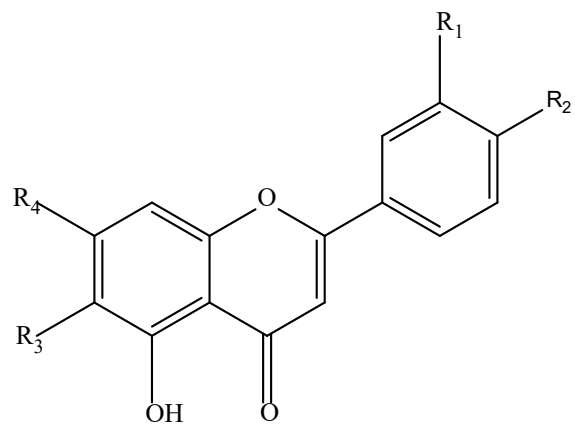
(21)



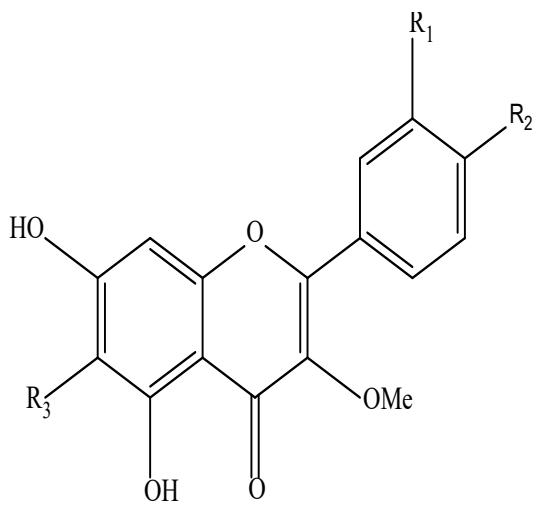
- (22) R
H
(23) OH



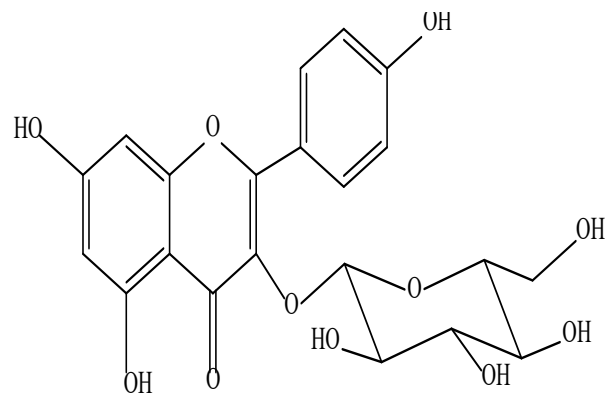
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(24)	OH	β-glucuronide	OH	H
(25)	OMe	β-glucuronide	H	H
(26)	H	H	OH	H



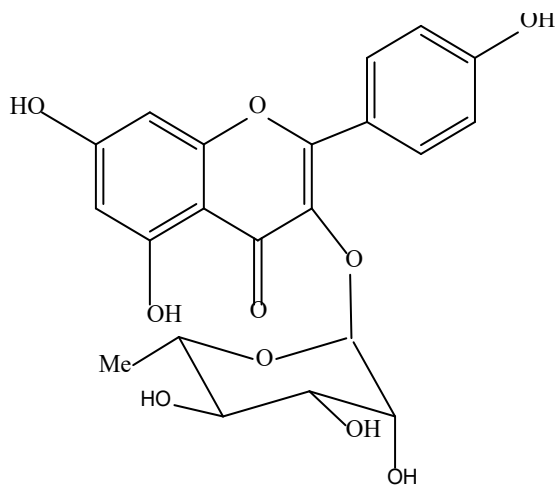
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(27)	H	OH	OMe	OH
(28)	H	OMe	OMe	OH
(29)	H	OMe	OMe	OMe
(30)	OH	OH	OMe	OH
(31)	OMe	OH	OMe	OH



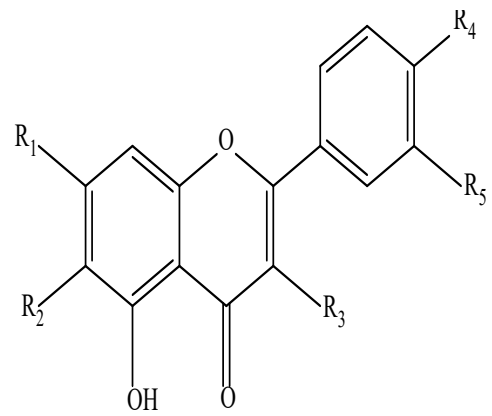
	R ₁	R ₂	R ₃
(32)	H	OH	H
(33)	OH	OH	OMe
(34)	OH	OMe	OMe



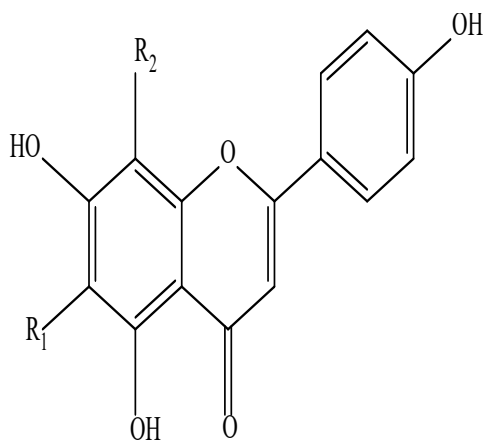
(35)



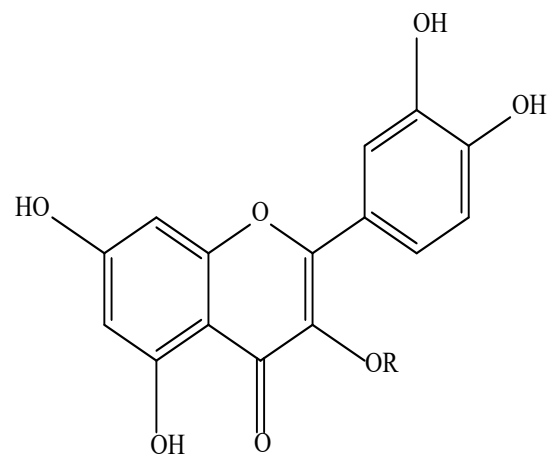
(36)



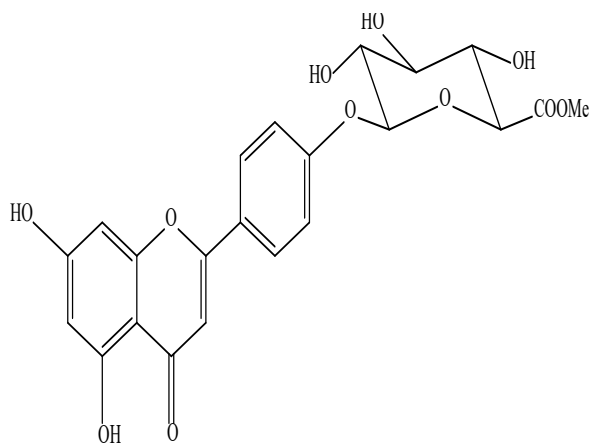
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(37)	OMe	OMe	H	OH	OH
(38)	OH	OMe	OMe	OH	H



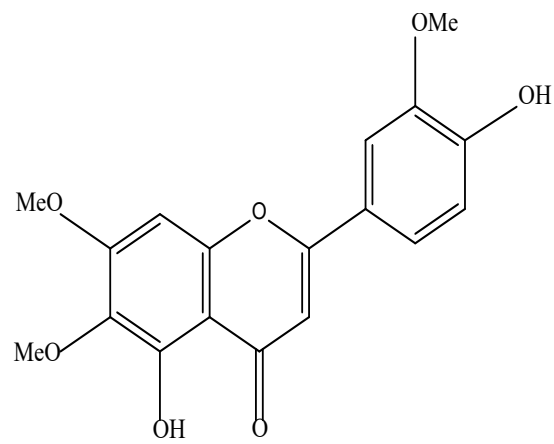
	R ₁	R ₂
(39)	β-glucopyranoside	H
(40)	H	β-D- glucopyranoside



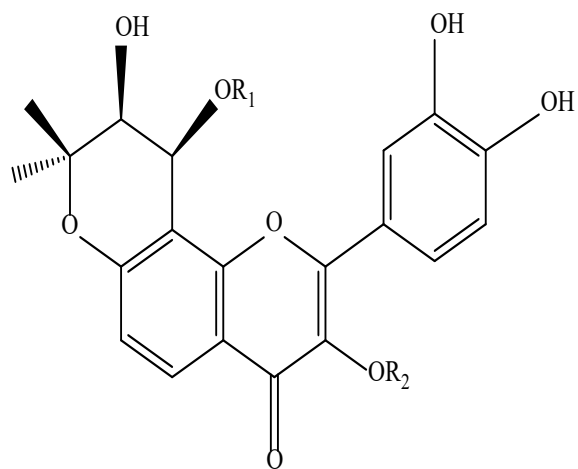
	R
(41)	β-D-glucopyranoside
(42)	Me
(43)	H



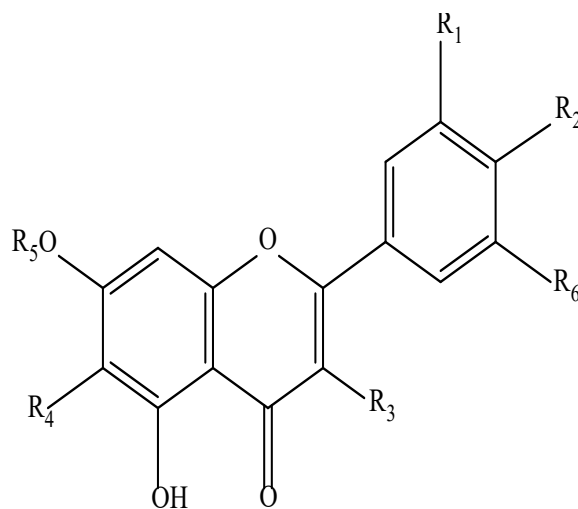
(44)



(45)

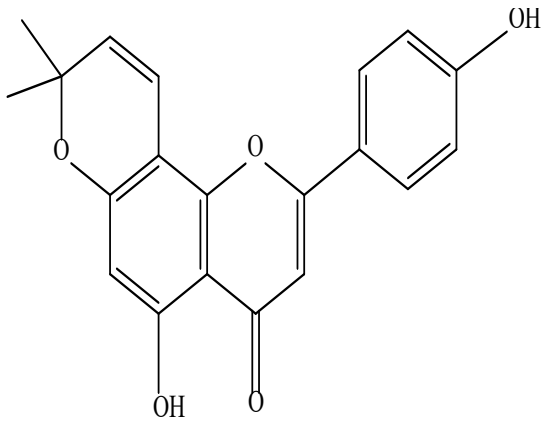


(46) Ac β-D-glucopyranoside

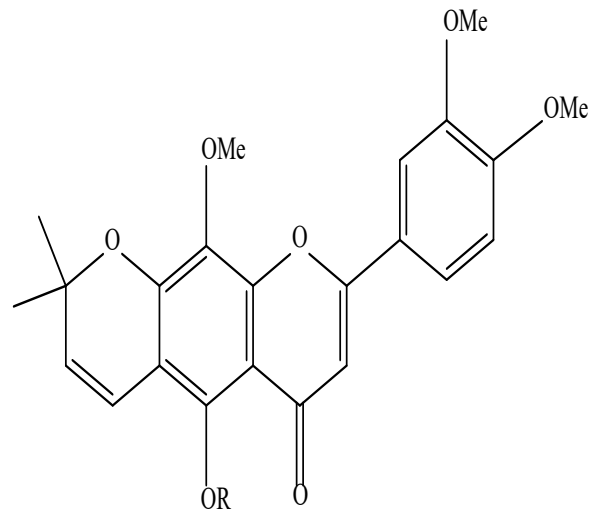


(47) H H

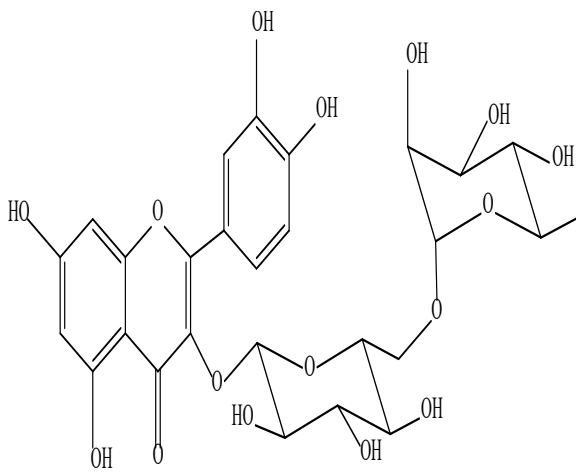
(48) OH OH H H β-D-glucopyranoside H
 (49) H H H OMe H H
 (50) OMe OMe H H H OMe



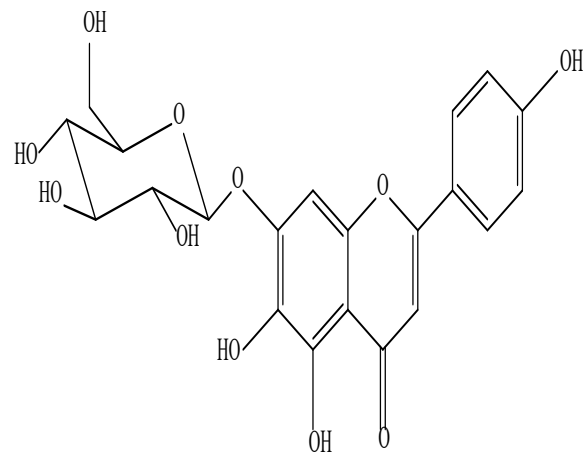
(51)



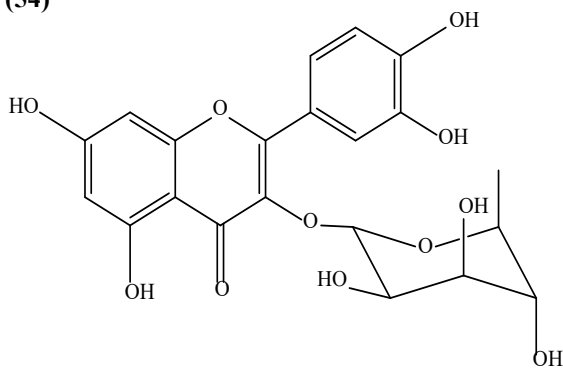
(52) R
(53) H
Me



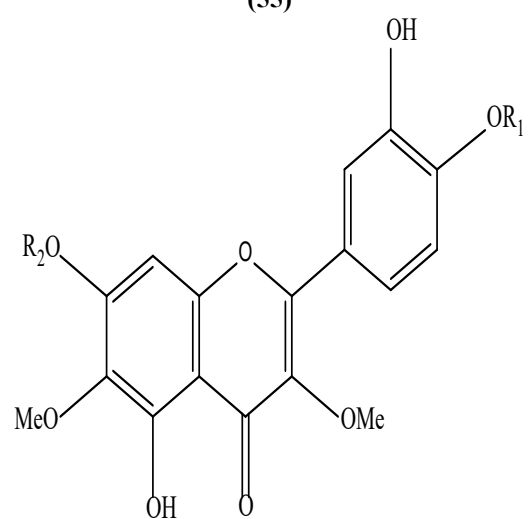
(54)



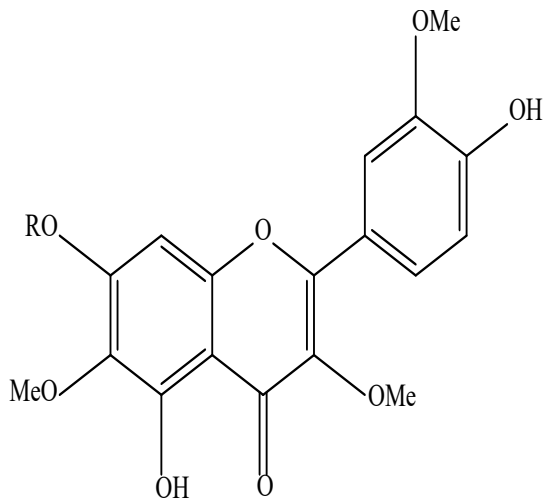
(55)



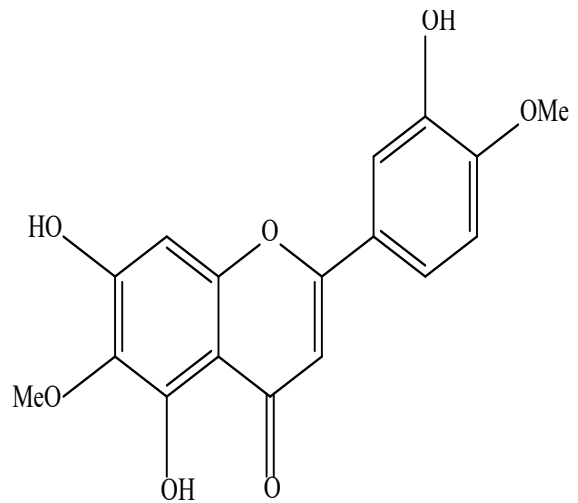
(56)



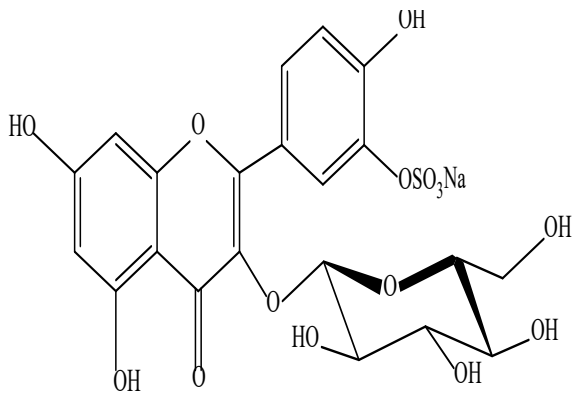
(57) R₁ R₂
Me H
(58) H β-D- glucopyranoside



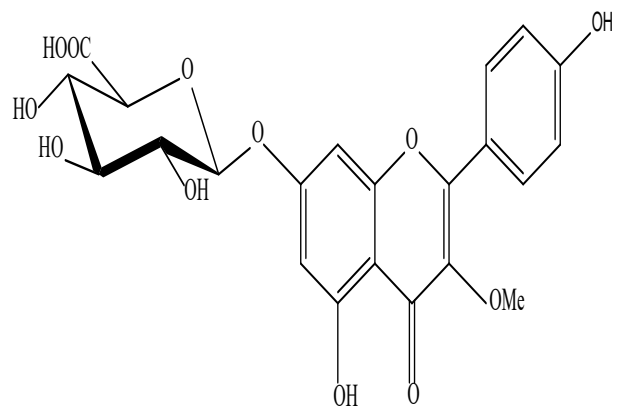
- R
(59) H
(60) β -D- glucopyranoside



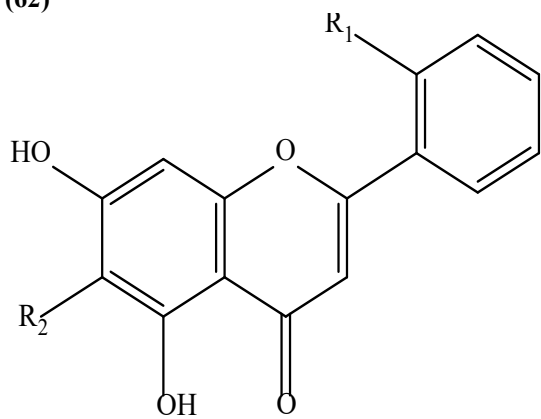
(61)



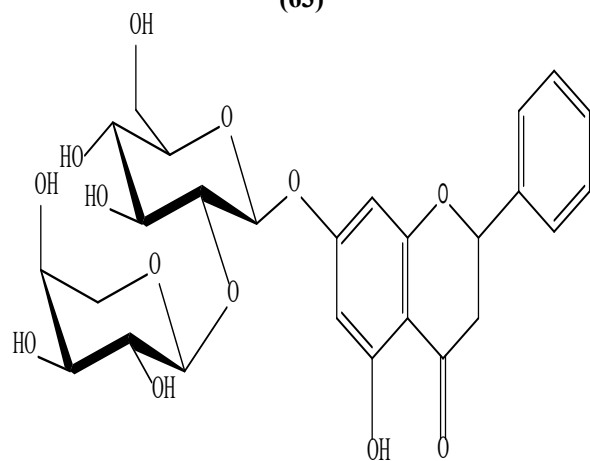
(62)



(63)



- R₁ R₂
(64) H H
(65) OH OMe
(66) OH H



(67)

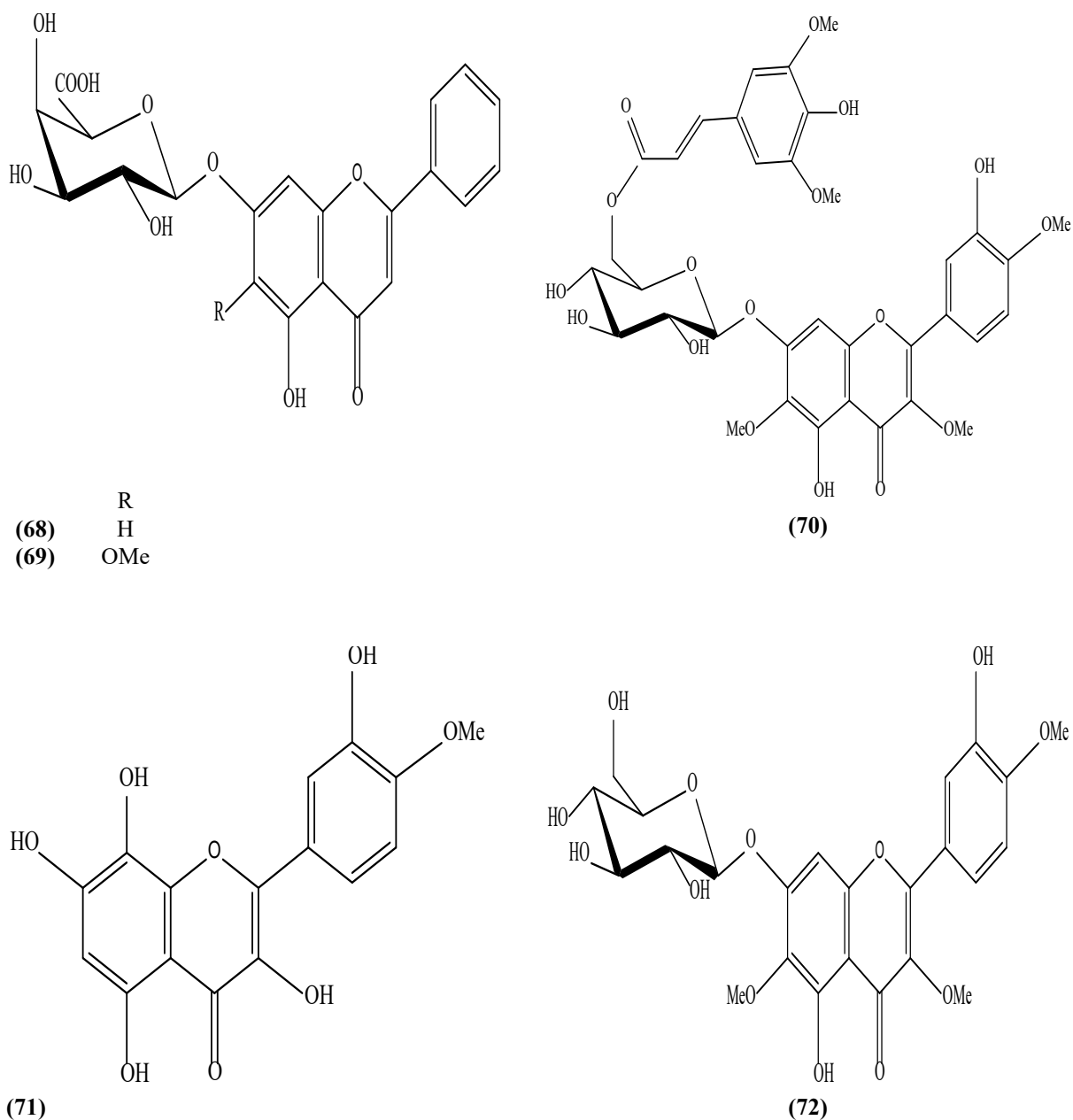


Figure II-2 : structures des flavonoides isolés du genre *Centaurea*

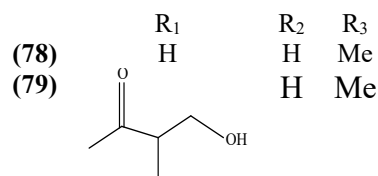
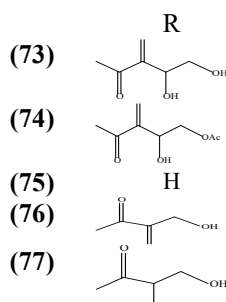
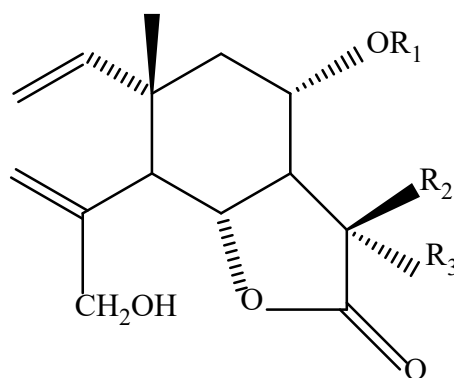
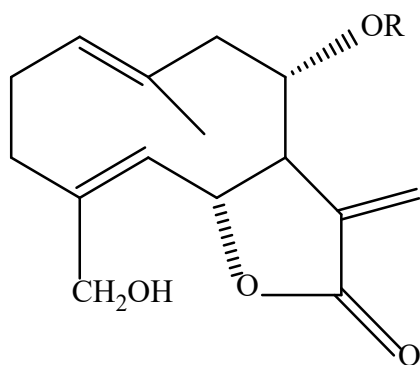
II-1-5-2-Sesquiterpènes lactones du genre *Centaurea*

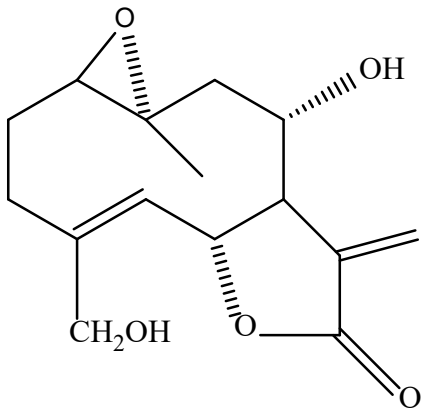
Selon la littérature, les investigations chimiques effectuées sur les Centaurées ont montré la prédominance des lactones sesquitérpeniques de type guaiane et germacrane. Ces substances sont considérées comme des biomolécules (marqueurs) chimio-taxonomiques de ce genre. Le Tableau II-2 résume quelques sesquiterpènes lactones isolées de genre *Centaurea*.

Tableau II-2 : les sesquiterpènes lactones isolées du genre *Centaurea*

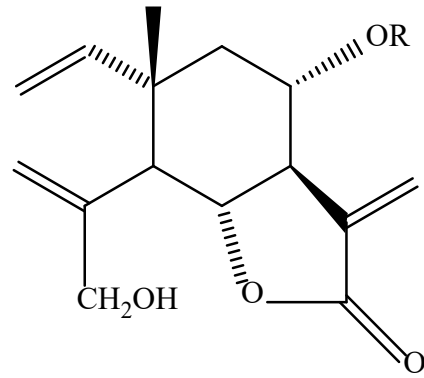
Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. cineraria</i> subsp. <i>umbrosa</i>	cnicine (73), cnicine 4'-O-acetate (74)	[35]
<i>C. melitensis</i>	saloniténolide (75), onopordopicrine (76), arctiopicine (77), mélitensine (78), mélitensine- β -hydroxyisobutyrate (79), 11(13) déhydromélitensine β -hydroxyisobutyrate (80)	[59]
<i>C. sphaerocephala</i> ssp. <i>Sphaerocephala</i>	cnicine (73), cnicine 4'-O-acetate (74), 1(10)-époxy-15-hydroxy-gérmacr-4-en-6,12-olide (81), 11 β , 13-déhydromélitensine (82)	[60]
<i>C. sinaica</i>	amberboine (83), chlorohyssopifoline A (84), sinaicine (85)	[61]
<i>C. papposa</i>	cnicine (73), malacitanolide (86), 8 α -O-(3, 4 dihydroxy-méthylènebutanoyloxy)-dehydromélitensine (87), 8 α -O-(3, 4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-15-oxo-5,7RH, 6 α H eleman- 1, 3,11(13)-trien-6,12-olide (88), 8 α -O-(3, 4- dihydroxy-méthylènebutanoyloxy)-dehydromélitensin méthylester (89)	[62]
<i>C. jacea</i> L	cnicine (73) , cnicine 4'-O-acetate (74)	[63]
<i>C. nicaeensis</i> All. var. <i>walliana</i> M	melitensine (78)	[48]
<i>C. microcarpa</i> Coss. & Dur	hydroxy-11 β ,13-dihydro onopordaldehyde (90)	[51]
<i>C. pullata</i> L	melitensine (78), 11 β ,13-dihydrocnicine (91),11 β ,13-dihydro-19-desoxycnicine (92), 8 α -O-(4-acetoxy-5-hydroxyangeloyl)-11 β ,13-dihydrocnicine (93), 11 β ,13 dihydrosalonitenolide (94) ,8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-	[64]

	11 β ,13-dihydrosonchucarpolide (95), 8 α -O-(4-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide (96), 8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide (97), 8 α -O-(4-hydroxy-2-methylenebutanoyl-oxy)melitensine (98), 8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-onopordaldehyde (99)	
<i>C. orphanidea</i>	cnicine (73), 4'-O-acetylcnicine (74)	[55]
<i>C. polyclada</i>	13-N-proline melitensine (100), 13-N-proline-6 α ,8 α ,15-trihydroxyelema-1,3-dien-12-oic acide (101), 8 α -O-[2'-(hydroxymethyl)-but-2'-enoyl]-6 α ,15-dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oic acide (102), methyl 1 β ,6 α ,8 α -trihydroxy-15-oxoeudesm-11(13)-en-12-oate (103), 6 α ,8 α ,15-trihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oic acide (104), methyl 6 α ,8 α ,15-trihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oate (105)	[58]

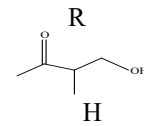




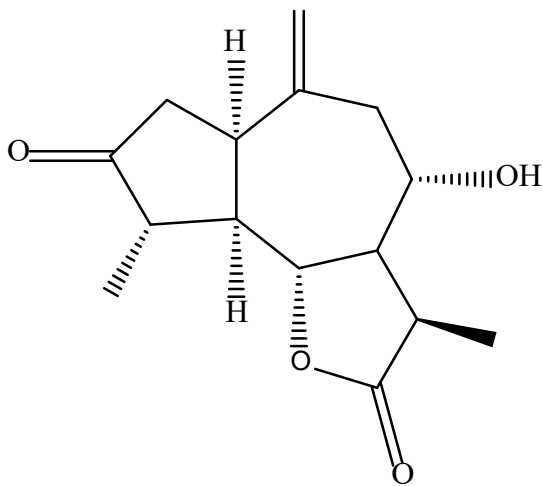
(81)



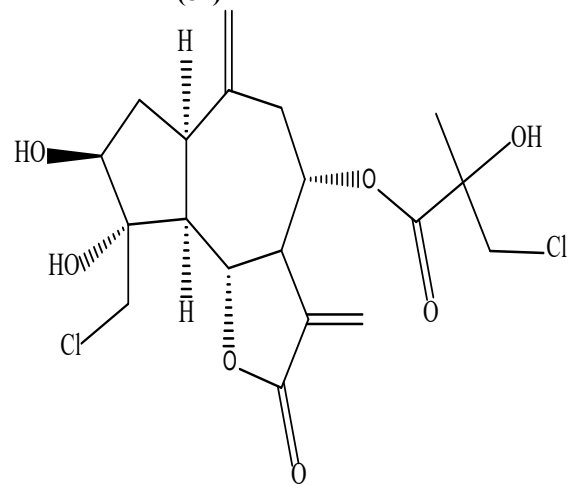
(80)



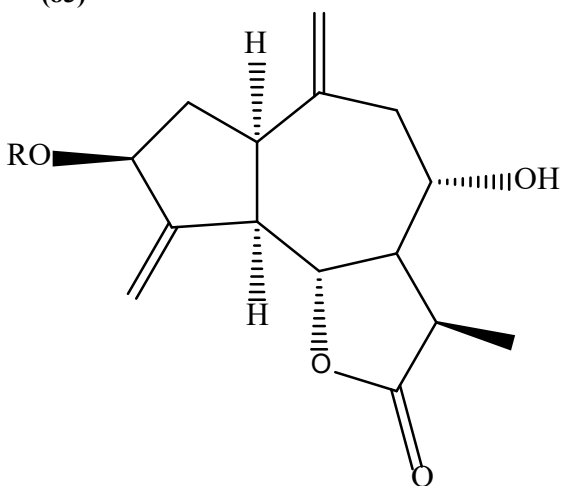
(82)



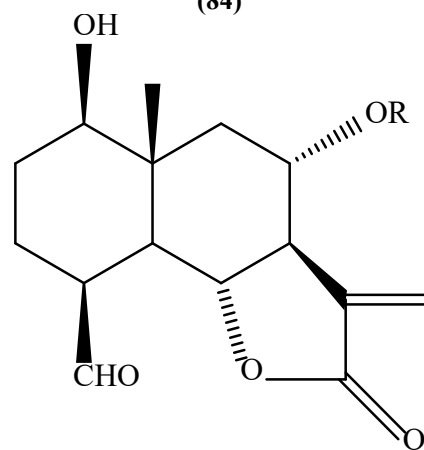
(83)



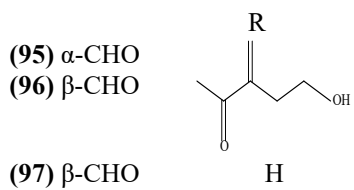
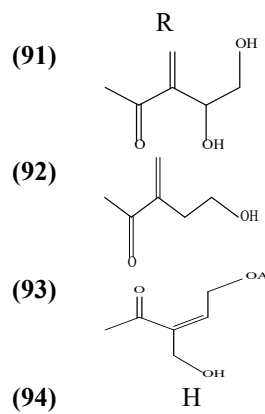
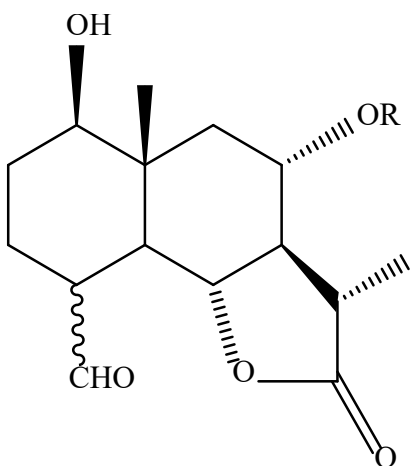
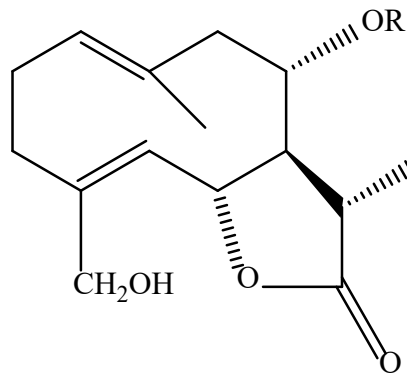
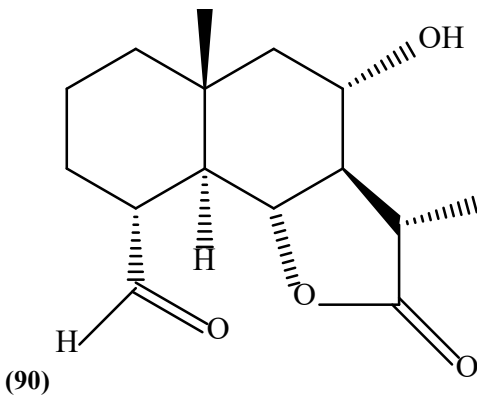
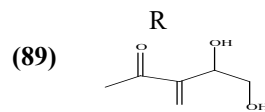
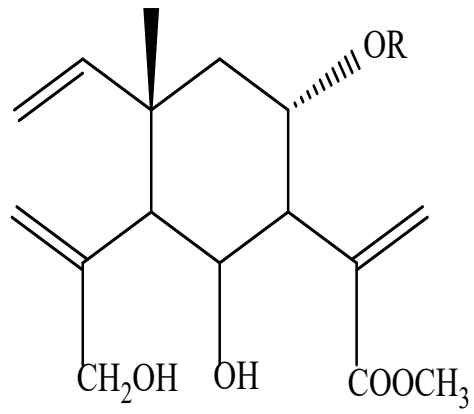
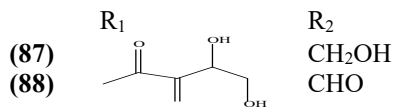
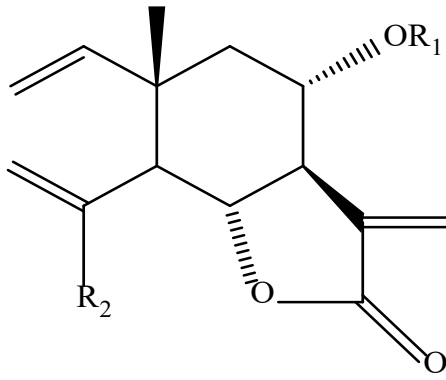
(84)

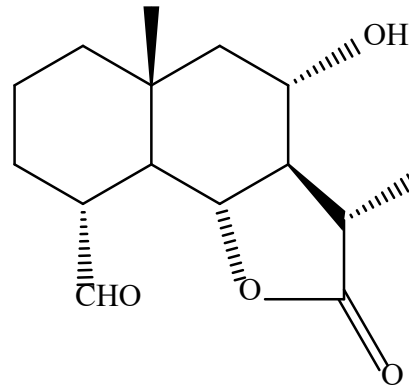
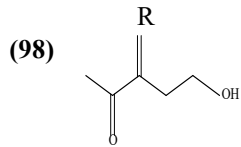
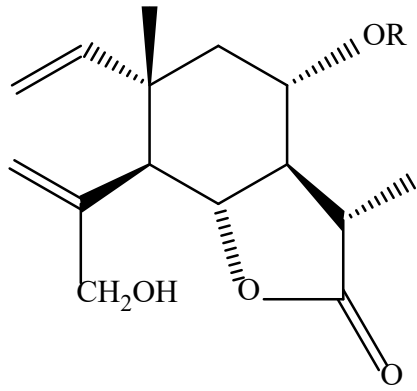


(85) R
Ac

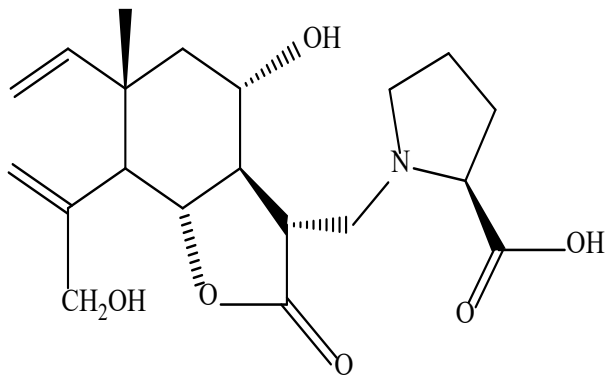


(86) R
OH
OH

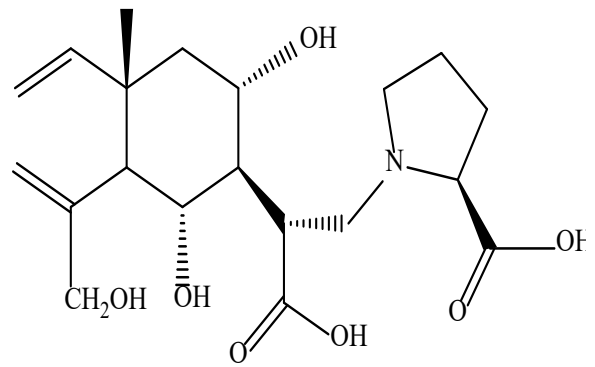




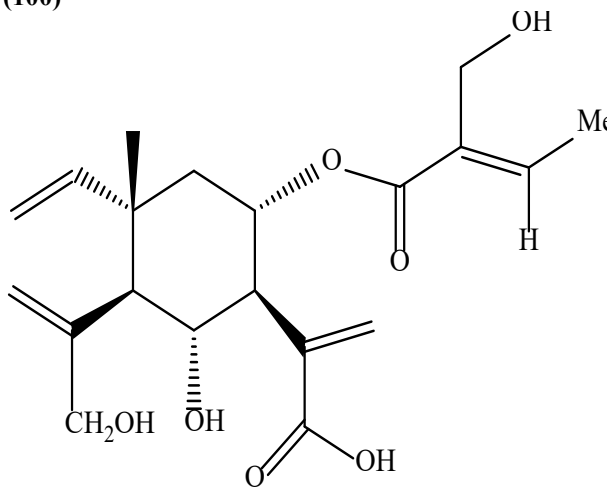
(99)



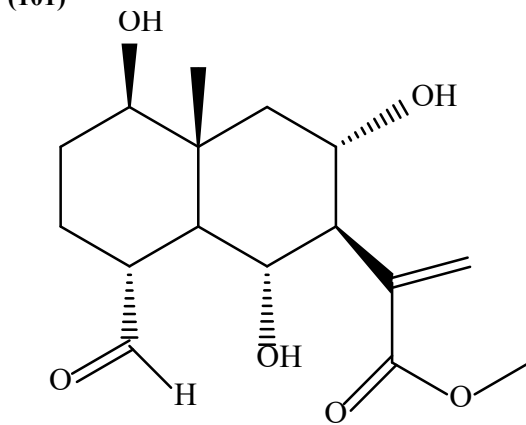
(100)



(101)



(102)



(103)

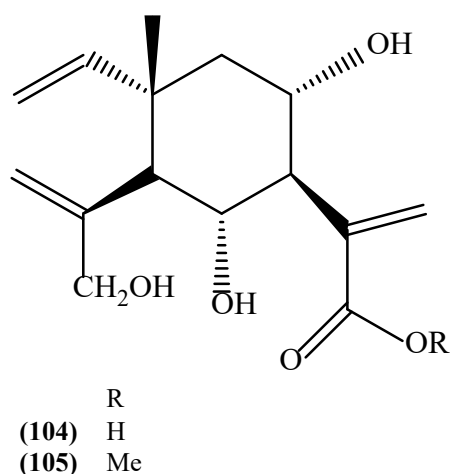


Figure II-3 : structures des sesquiterpènes lactones isolés du genre *Centaurea*

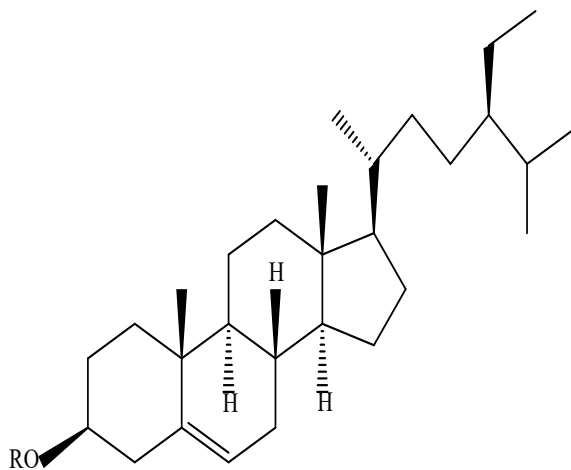
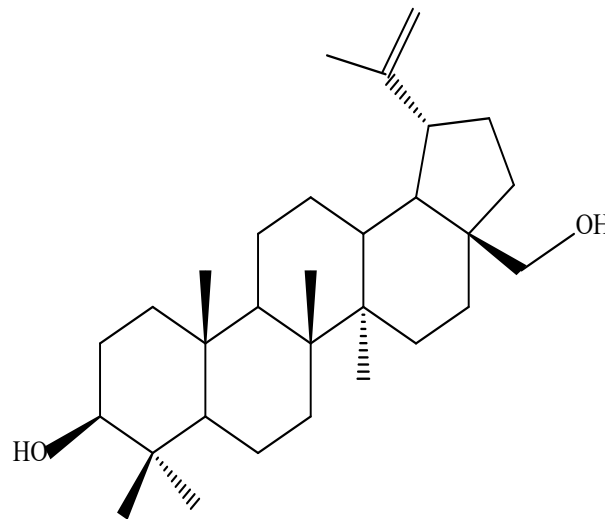
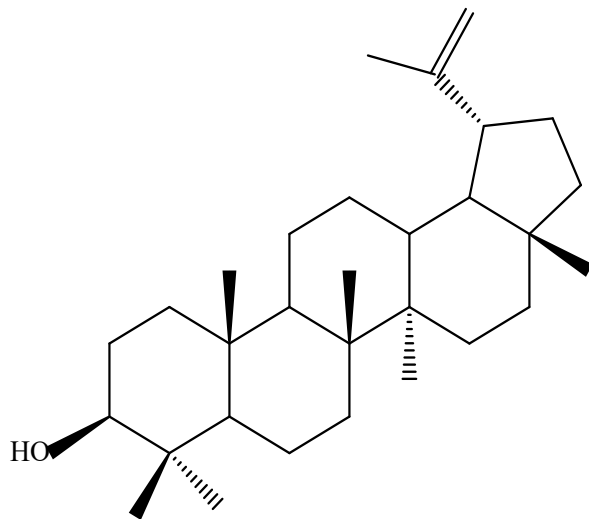
II-1-5-3-Triterpènes du genre *Centaurea*

Les triterpènes sont des substances naturelles constituées principalement par six unités d'isoprène avec des structures cycliques relativement complexes. On les trouve dans les gommés et les résines végétales. Ces métabolites secondaires sont dotés de potentialités hormonales et immumodulantes, ils peuvent inhiber les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose, empêcher le développement d'une résistance à l'insuline et normaliser les taux plasmatiques de glucose et d'insuline [65]. Les investigations chimiques menées sur les plantes Centaurées ont indiqué la présence de ces substances dans de nombreuses espèces. Le tableau II-3 regroupe ces composés naturels isolés du genre *Centaurea*.

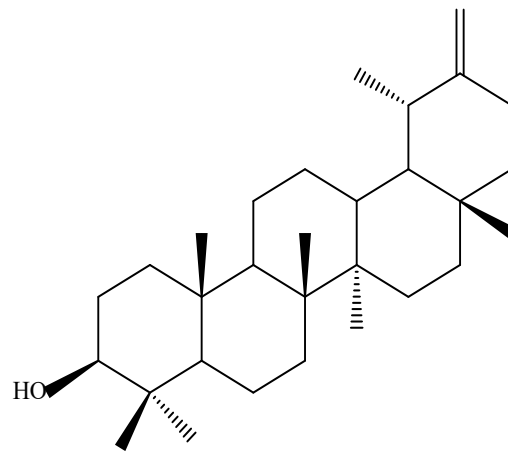
Tableau II-3 : les triterpènes identifiés du genre *Centaurea*

Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. horrida</i>	lupeol (106), betuline (107), daucosterol (108)	[54]
<i>C. microcarpa</i> Coss. & Dur	daucosterol (108), β -sitosterol (109)	[51]
<i>C. bracteata</i>	daucosterol (108)	[52]

<i>C. omphalotricha</i> Coss. & Durieu ex Batt. & Trab	lupeol (106), daucosterol (108), β -sitosterol (109), taraxasterol (110)	[53]
<i>C. africana</i>	daucoesterol (108), β -sitosterol (109), α -Amyrine (111), β -Amyrine (112)	[56]



R
 (108) Glu
 (109) H



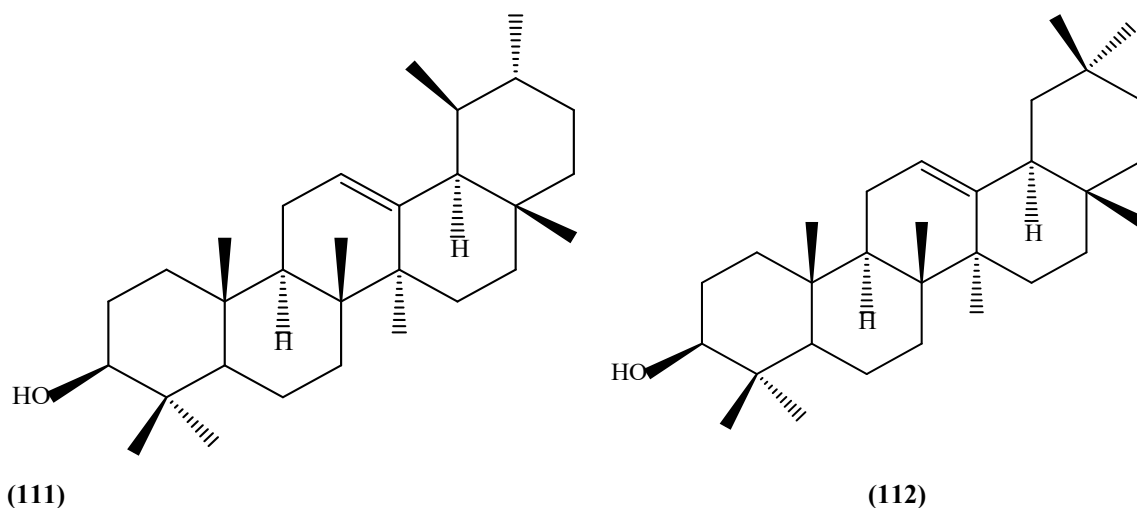


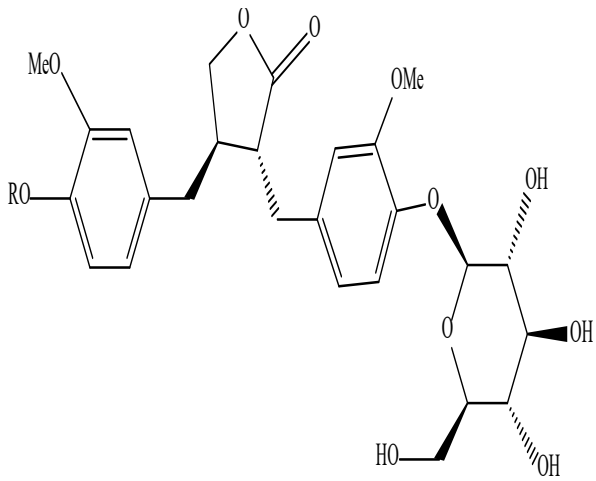
Figure II-4 : structures des triterpènes isolés du genre *Centaurea*

II-1-5-4-Lignanes du genre *Centaurea*

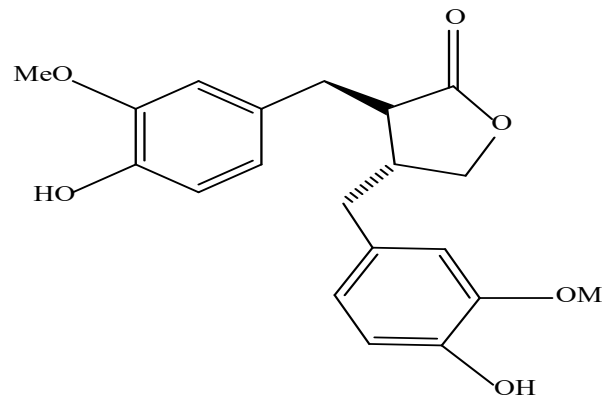
Les lignanes constituent un vaste groupe de polyphénols. Ils s'accumulent généralement dans les racines, les graines et les tissus des plantes ligneuses. La structure de ces composés est obtenue par couplage de deux entités de dérivés du 1-phenylpropane. Plusieurs travaux ont montré l'effet préventif et protectif de ces substances vis-a vis de certains type de cancer hormono-dépendants (prostate,sein) [66]. Plusieurs composés de ce type ont été isolés de nombreuses centaurees, le tableau suivant regroupe quelques lignanes isolés de ces espèces.

Tableau II-4 : les lignanes identifiés du genre *Centaurea*

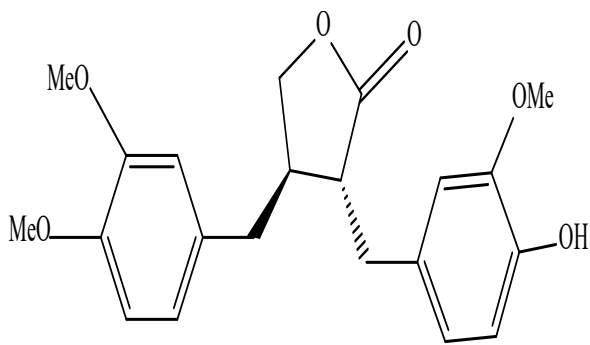
Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. schischkinii</i>	arctiine (113), matairesinoside (114), matairesinol (115), arctigenine (116)	[44]
<i>C. jacea</i> L	trachelogenine (117)	[45]
<i>C. orphanidea</i>	pinoresinol (118), dimethylmatairesinol (119)	[55]
<i>C. polyclada</i>	arctiine (120)	[58]



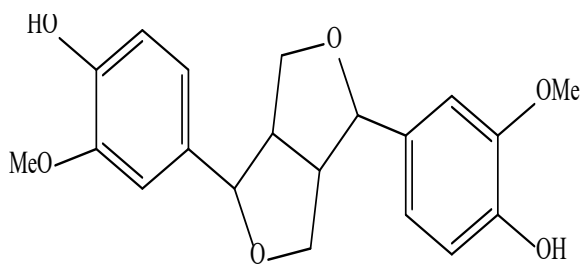
R
 (113) Me
 (114) H



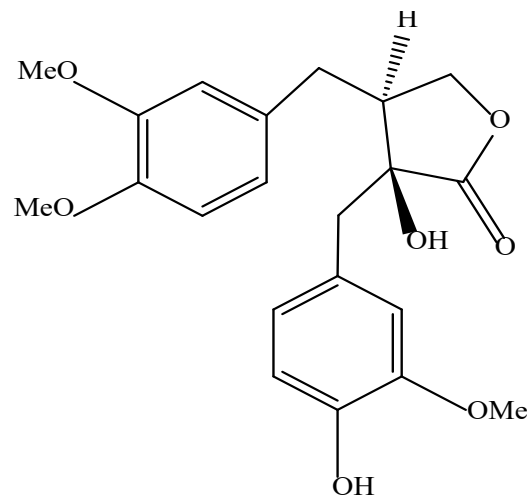
(115)



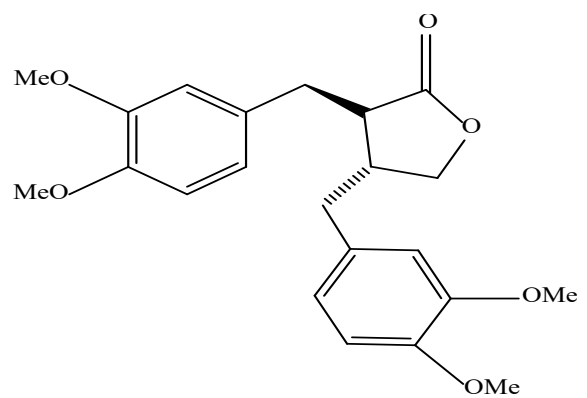
(116)



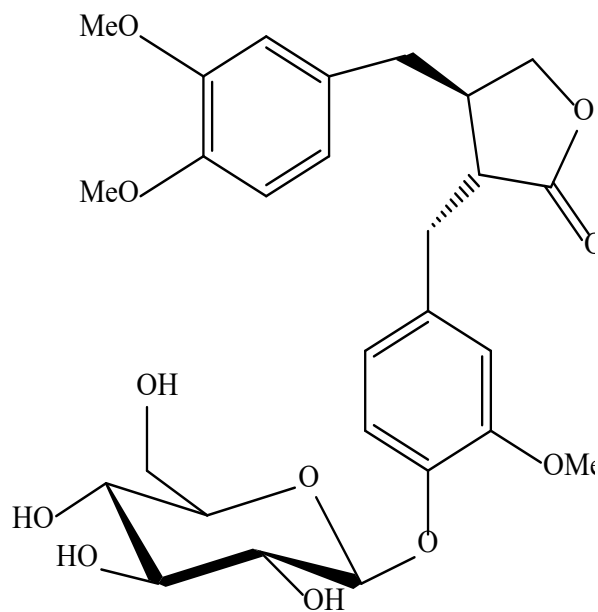
(118)



(117)



(119)



(120)

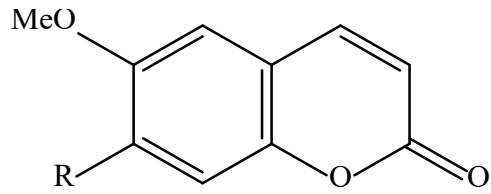
Figure II-5 : structures des lignanes isolés du genre *Centaurea*

II-1-5-5-Autre composés du genre *Centaurea*

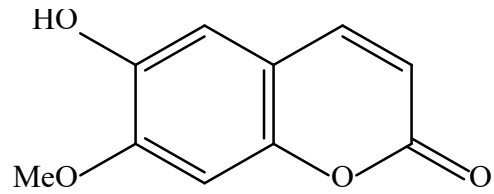
En outre, d'autres métabolites secondaires, ont été isolés du genre *Centaurea* (tableau II-5).

Tableau II-5 : Autre produits identifiés dans les Centaurées

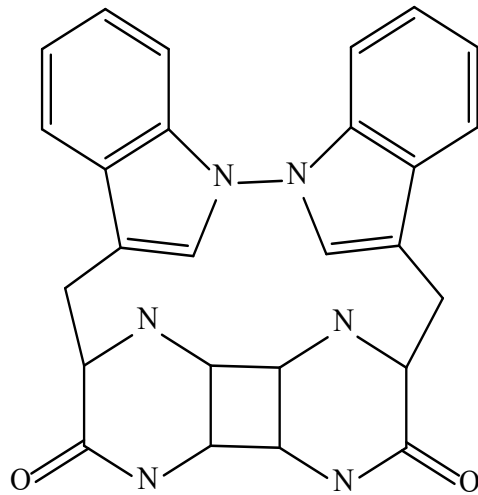
Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. collina</i>	scoparone (121), scopoletine (122)	[67]
<i>C. spruneri</i> Boiss. & Heldr.	scopoletine (122), isoscopolétine (123)	[68]
<i>C. schischkini</i>	schischkiniine (124)	[44]
<i>C. moschata</i>	moschamindole (125)	[69]
<i>C. urvillei</i> DC. subsp. <i>urvillei</i>	arbutine (126), salidroside (127)	[42]



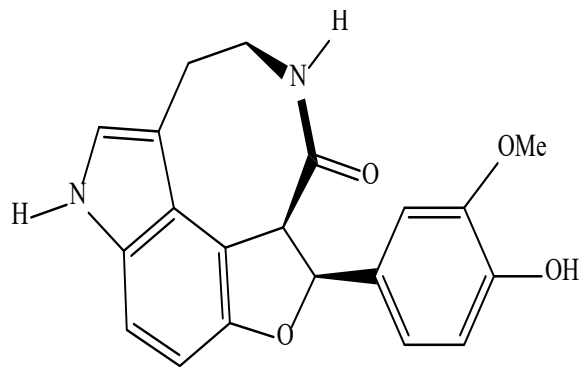
(121) R
OMe
(122) OH



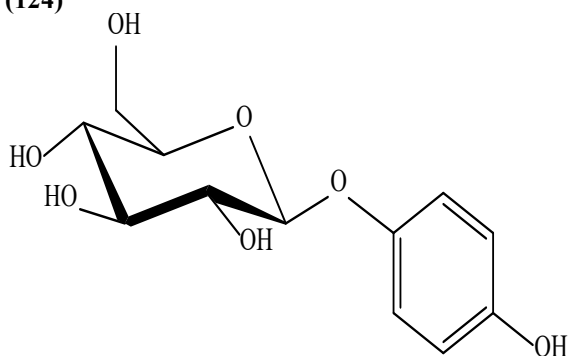
(123)



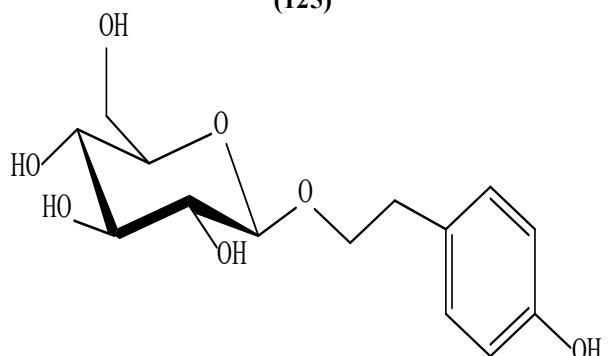
(124)



(125)



(126)



(127)

Figure II-6 : structures des autres composés isolés du genre *Centaurea*

II-1-6- Activités biologiques du genre *Centaurea*

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont connues en médecine populaire pour traiter divers maladies et elles ont montré un large éventail d'effets thérapeutiques, à titre d'exemple nous citons:

- Les parties aériennes de l'espèce *C.ornato* sont utilisées comme dépuratif et cholagogue [70].

- Les racines de l'espèce *C. sinaica* sont utilisées comme antispasmodique, diurétique et antipaludique [71].
- Les thés préparés à partir des parties aériennes de l'espèce *C. Chilensis* sont utilisés pour soulager les douleurs rhumatismales [72].
- L'extrait aqueux des espèces *C. melitensis*, *C. seridis* et *C. aspera* est utilisé comme hypoglycémiant [71].
- *C. pallascens* est utilisée comme agent stomachique en regard de sa saveur amère [73].
- Les parties aériennes de la plante *C. scabiosa* sont employées pour traiter la toux et les démangeaisons [74].
- Les fleurs de *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* sont employées pour réduire les maux d'estomac et les douleurs abdominales [75].

Ces usages en médecine traditionnelle ont été prouvés par des études *in vivo* et *in vitro*. En effet Plusieurs études pharmacologiques réalisées sur les Centaurées montrent que ces plantes présentent des activités biologiques importantes et variées, parmi lesquelles : antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante et anticancéreuse. Ces effets pharmacologiques sont dus aux métabolites secondaires présents chez ces espèces.

Ces différentes propriétés biologiques sont décrites dans le tableau II-6.

Tableau II-6: Activités biologiques de quelques espèces des Centaurées

Activités biologiques	Espèce	Parties étudiées	Model	Ref
anti-oxydante	<i>C. polypodiifolia</i> <i>C. pyrrhoblephara</i> <i>C. antalyense</i>	aériennes (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) DPPH -IC ₅₀ =19.38±2.41 µg/ml - IC ₅₀ =13.97 ±2.81 µg/ml - IC ₅₀ =12.29 ±0.99 µg/ml	[76]
	<i>C. sphaerocephala</i>	aériennes ex BuOH ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) LPO IC ₅₀ =340,94±7,49µg/ml DPPH IC ₅₀ =11,59±0,04µg/ml	[77]
	<i>C. hypoleuca</i> DC	Fleurs (ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) ABTS IC ₅₀ =29.1±0.1 µg/ml DPPH	[78]

			IC ₅₀ =64.8±0.9 µg/ml	
	<i>C. derderiifolia</i>	feuilles et graines (ex CHCl ₃)	(<i>in vitro</i>) DPPH IC ₅₀ =0.76±0.03 µg/ml	[79]
	<i>C. raphanina</i> subsp	feuilles (ex hydro-éthanolique)	(<i>in vitro</i>) Inhibition de l'hémolyse IC ₅₀ =35±2 µg/ml TBARS EC ₅₀ =29± 1 µg/ml	[80]
	<i>C. acaulis</i>	Plante entière (extrait <i>n</i> -BuOH)	(<i>in vitro</i>) DPPH IC ₅₀ = 4.83µg/mL	[81]
	<i>C. cheirolopha</i>	aériennes (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) test de blanchissement du β-carotène inhibition=79.515%	[82]
	<i>C. drabifolia</i> subsp. <i>drabifolia</i>	aériennes (ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) PPM CTA=1.87±0.16mmolTE/g extrait	[83]
	<i>C. montana</i>	graines (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) DPPH IC ₅₀ =2,8×10 ⁻³ mg/mL	[84]
antimicrobienne	<i>C. ptosomipappoides</i> <i>C. odyssei</i> <i>C. ptosomipappa</i> <i>C. amonicola</i> <i>C. kurdica</i>	aériennes (ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) diffusion en puits zone d'inhibition=24 mm	[85]
	<i>C. hypoleuca</i> DC	fleurs (ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) microdilution en milieu liquide CMI=8 µg/mL	[86]
	<i>C. lycopifolia</i>	aériennes (ex aqueux)	(<i>in vitro</i>) microdilution en milieu liquide CMI=0,01-0,02 mg/ml	[83]
	<i>C. diffusa</i>	fleurs (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) microdilution en milieu liquide CMI=200 mg/ml	[87]
	<i>C. aladagensis</i>	aériennes (huile essentielle)	(<i>in vitro</i>) microdilution en milieu liquide CMI=0,11 mg/ml	[88]

	<i>C. pungens</i>	fleurs (ex AcOEt)	(<i>in vitro</i>) microdilution en milieu liquide CMI=40 µg/mL	[89]
	<i>C. sessilis</i> <i>C. armena</i>	Plante entière (huile essentielle)	(<i>in vitro</i>) diffusion en puits zone d'inhibition < 5.5 mm	[90]
anti-inflammatoire	<i>C. iberica</i>	aériennes (ex MeOH)	(<i>in vivo</i>) perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris	[72]
	<i>C. papposa</i>	aériennes (ex : hexane / ether / MeOH 1/1/1)	(<i>in vitro</i>) ICAM-1 (intercellular adhesion molecules) molécules d'adhésion intercellulaire 98% inhibition à 50 µM	[91]
	<i>C. cyanus</i>	fleurs (ex hydro-alcoolique)	(<i>in vivo</i>) œdème de la patte pourcentage d'inhibition 69,93% à 60 mg/ kg	[92]
	<i>C. chilensis</i>	aériennes (ex CHCl ₃)	(<i>in vivo</i>) œdème de la patte 67% à 64 mg/kg	[93]
	<i>C. ainetensis</i>	fleurs (ex aqueux)	(<i>in vivo</i>) œdème de la patte Inhibition considérable	[94]
anticancéreuse	<i>C. kilaea</i>	aériennes (ex CHCl ₃)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ =3,25 µg /mL	[95]
	<i>C. albonitens</i>	aériennes (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) MTT	[96]
	<i>C. bornmuelleri</i> <i>C. huber-morathii</i>	graines (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ = 29.9 g/ml IC ₅₀ =33.0 g/ml	[97]
	<i>C. solstitialis</i>	fleurs (ex EtOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ =63.18 µg/mL	[98]
	<i>C. papposa</i>	aériennes (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ =8.5 ± 0.5 µM	[91]
	<i>C. drabifolia</i> subsp. <i>detonsa</i>	aériennes (ex CHCl ₃)	(<i>in vitro</i>) cellules leucémique (CCRF-CEM) et sa ligne multi résistante CEM/ADR5000. IC ₅₀ =0.47 ± 0.07 µM	[99]
	<i>C. calcitrapa</i> subsp. <i>calcitrapa</i>	feuilles (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ <100 µg/mL	[100]

	<i>C. africana</i>	aériennes (ex EtOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ =26.1 ± 0.5 µM	[56]
	<i>C. montana</i>	graines (ex MeOH)	(<i>in vitro</i>) MTT IC ₅₀ =43,9 µM	[84]

II-2-Position taxonomique de la famille Fabaceae (Leguminosae)

La Leguminosae ou Fabaceae est une des plus grandes familles de plantes à fleurs, après les orchidées (Orchidaceae) et les asters (Asteraceae) [101], avec plus de 745 genres et 19500 espèces [102]. Plusieurs espèces de cette famille présentent un intérêt alimentaire à titre d'exemple la fève, les pois les haricots, et l'huile d'arachide ou soja [103].

Les Fabacées sont des plantes herbacées vivaces ou annuelles, des arbres ou arbustes facilement reconnaissables à leurs fruits et à leurs composés [104]. La famille Fabaceae possède une répartition cosmopolite, se trouvant dans tous les continents. Cette famille est bien représentée dans toutes les régions tempérées et tropicales du monde. Les légumineuses sont diversifiées particulièrement dans les forêts tropicales avec un aspect saisonnièrement sec et des arbustes tempérés soutenus par les climats xériques. La prédilection des légumineuses pour les habitats semi-arides à arides est liée à un métabolisme exigeant en azote [105].

II-2-1-Caractères botaniques des Fabacées

Les fabacées sont caractérisées généralement par des fleurs hermaphrodites irrégulières et une corolle zygomorphe, constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon. Les étamines sont de 5 à 10 et les anthères sont homomorphes ou dimorphes. L'ovaire est composé par un seul carpelle. Les feuilles simples ou composées, alternes et stipulées; parfois plus ou moins complètement transformées en vrilles. Le fruit est généralement une gousse multiséminée [2].

La famille Fabaceae est classée comme suit [106] :

- ✚ Règne : Plantae
- ✚ Embranchement : Spermatophyta
- ✚ Sous embranchement : Angiospermae
- ✚ Classe : Eudicotyledonae
- ✚ Sous-classe : Rosidae
- ✚ Ordre : Eurosidiae I (Fabidées)

✚ Sous-ordre :	Fabales
✚ Famille :	Fabaceae
✚ Synonyme :	Leguminosae

II-2-2-Intérêt thérapeutique des Fabacées

Plusieurs plantes de la famille Fabaceae ont montré un pouvoir pharmacologique important. Elles sont largement indiquées en médecine populaire pour soulager ou traiter divers maladies [107] :

- L'espèce *Cassia fistula* L est employée comme analgésique pour soulager les douleurs des hémorroïdes ainsi que comme laxatif doux contre la fièvre et l'arthrite. La pulpe des fruits de cette espèce possède un caractère inflammatoire, elle est considérée comme purgative.
- *Cassia occidentalis* L est fréquemment préconisée pour soigner la jaunisse, la dermatite ainsi pour induire la fertilité.
- *Clitoria ternatea* L est parfois indiquée pour traiter les problèmes de fertilité, de menstruations et la morsure de serpent.
- La plante *Saraca indica* L est recommandée dans la population indienne pour arrêter le saignement des hémorroïdes. Elle est employée également pour les infections douloureuses, elle soulage la soif excessive et améliore la digestion et l'assimilation.
- En Indonésie l'espèce *Sesbania grandiflora* (L.) Pers est indiquée aux mères allaitantes pour la production de lait maternel ainsi que pour traiter les aphtes buccaux.

II-2-3-Présentation du genre *Cytisus*

Cytisus est l'un des nombreux genres de la tribu Genisteae Le genre *Cytisus* comprend environ 60 espèces. Il se trouve fréquemment dans le bassin méditerranéen, dans les régions de la mer Noire, l'Europe centrale et également le nord de l'Afrique [108].

Les cytises sont généralement des arbustes ou arbrisseaux à feuilles trifoliolées. Les fleurs sont généralement jaunes [2]. Les fruits sont des gousses linéaires ou oblongues contenant de nombreuses graines Le calice gamosépale est bilabié avec dix étamines monadelphes dans un tube non fendu [109].

II-2-4-Intérêt thérapeutiques du genre *Cytisus*

Les plantes du genre *Cytisus* sont employées en médecine populaire comme diurétique, hypnotique, anxiolytique [110, 111], antiparasitaire [112], antidiabétique [113,114], agent hépatoprotecteur, antispasmodique [115].

II-2-5-Espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth

II-2-5-1-Description botanique

L'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth (Figure II-7) est un sous-arbrisseau touffu des hautes montagnes de 30-60 cm. Les Feuilles sont unifoliolées, très rapidement caduques. Les Tiges sont raides et dressées, très denses plus ou moins piquantes à leur sommet. Les fleurs sont jaunes solitaires en grappes courtes et nues. La gousse longue de 20-25 mm, est velue, oblongue, noire à la fin [2].



Figure II-7: Espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth

Cytisus purgans (L.) Benth est répandue dans plusieurs massifs montagneux de la péninsule Ibérique et du Maghreb ainsi que dans le Massif central et les Pyrénées orientales. En Algérie, cette espèce se trouve dans les Pâturages rocaillieux des hautes montagnes des Aurès, Bellezma, les montagnes du Hodna et Djurdjura [2, 116]. Traditionnellement cette espèce est utilisée comme cardiotonique, diurétique et purgative [117].

II-2-5-2-Classification botanique

La classification botanique de cette plante est comme suit [30]:

- ✚ Règne : Plantae
- ✚ Classe : Magnoliopsida
- ✚ Ordre : Fabales
- ✚ Famille : Fabaceae
- ✚ Sous-famille : Faboideae
- ✚ Tribu : Genisteae
- ✚ Genre : *Cytisus*
- ✚ Espèce : *Cytisus purgans* (L.) Benth
- ✚ Synonyme : *Genista purgans* L, *Cytisus oromediterraneus*
- ✚ Nom vernaculaire : Irrhis, Amsgré (Algérie), genêt purgatif (France)

II-2-6- Etudes chimiques antérieures sur le genre *Cytisus*

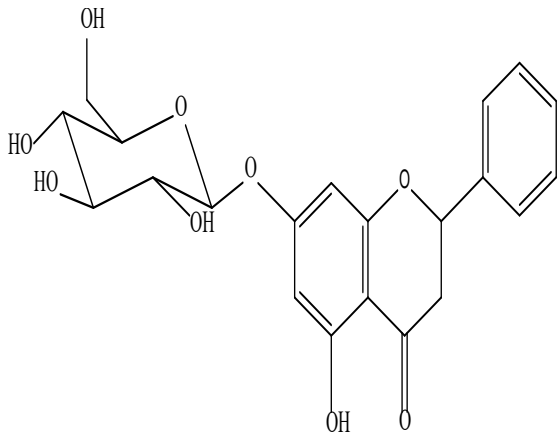
Les investigations phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Cytisus* ont révélé la richesse de ces plantes en métabolites secondaires notamment les substances phénoliques, les stéroïdes, les flavonoïdes et les alcaloïdes.

II-2-6-1-Flavonoïdes

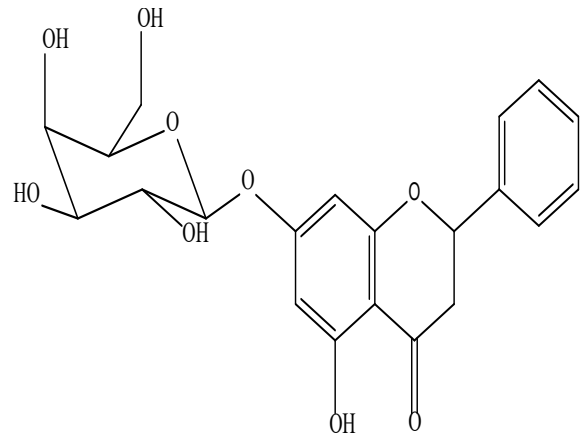
Tableau II-7 : flavonoïdes identifiés du genre *Cytisus*

Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. triflorus</i> l'Her	chrysine (64), chrysine-7-O-β-D-glucopyranoside (128), chrysine 7-O-β-D- galactopyranoside (129), diosmétine (130)	[118]
<i>C. multiflorus</i>	chrysine (64), luteoline-5-O-glucoside (131), cynaroside (48), apigenine (6), apigetrine (10), rutine (54), orientine (132), 2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-luteoline (133), 2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-luteoline (134), 2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-apigenine (135), 2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-apigenine (136), 6''-O-(3-	[108]

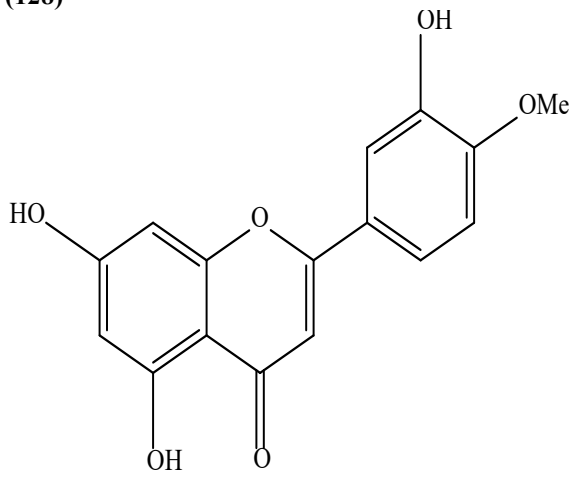
	hydroxy-3-methylglutaroyl)-2''-O-pentosyl-Chexosyl-luteoline (137), 6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-2''-O-pentosyl-C-hexosyl-apigenine (138), chrysine-7-O- β -D-glucopyranoside (128)	
<i>C. villosus</i> Pourr	(3S, 4S)-2',4'-dihydroxy-3'-methoxy-6,7-methylenedioxyisoflavane-4-ol (139), chrysine (64), chrysine -7-O- β -D-glucopyranoside (128), 2''-O- α -L-rhamnosylorientine (140), g�nisteine (141)	[115]
<i>C. scoparius</i>	kaempferol (26), rutine (54), quercetine (43), quercitrine (56), g�nisteine (141), isorhamnetine (142), sarothamnoside (143) chrysine (64), orientine (132), apigenine (6)	[119] [120]
<i>C. albus</i>	daidzine (144), genistine (145) isoquercetine (41), rutine (54), quercitrine (56), quercetine (43), luteoline (8), apigenine (6)	[121] [122]
<i>C. nigricans</i>	ononine (146) isoquercetine (41), rutine (54), quercitrine (56), luteoline (8), Kaempferol (26), apigenine (6)	[123] [122]
<i>C. eriocarpus</i> R. Br	g�nisteine (141)	[124]
<i>C. battundieri</i> Maire, <i>C. welwitschii</i>, <i>C. commutatus</i> (Willk.) Briq, <i>C. proliferus</i> L	g�nisteine (141), daidzeine (147)	[124]
<i>C. purgans</i>	quercetine (43), sarotanoside (148)	[125]



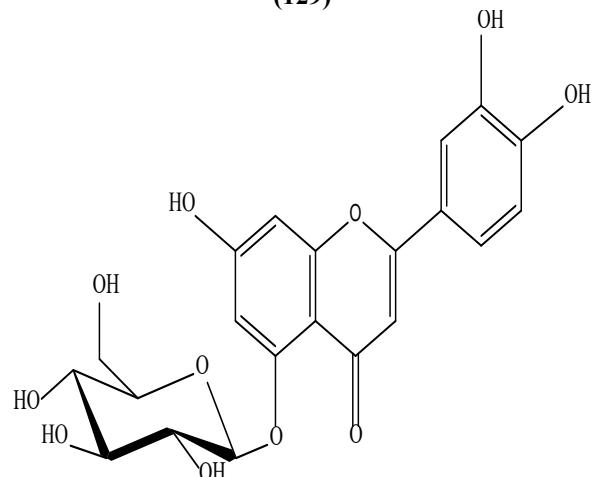
(128)



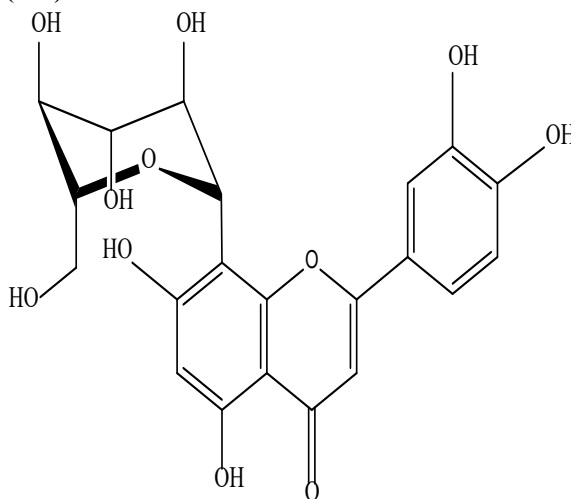
(129)



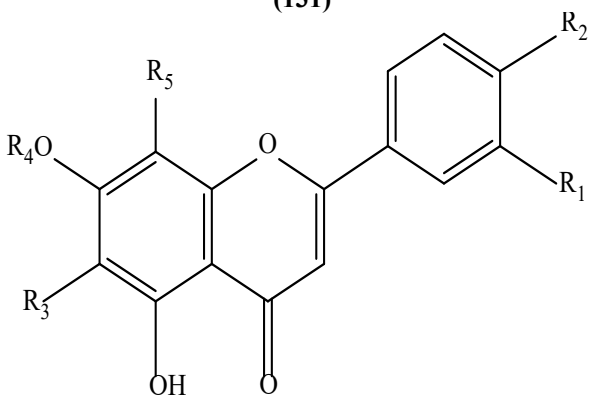
(130)



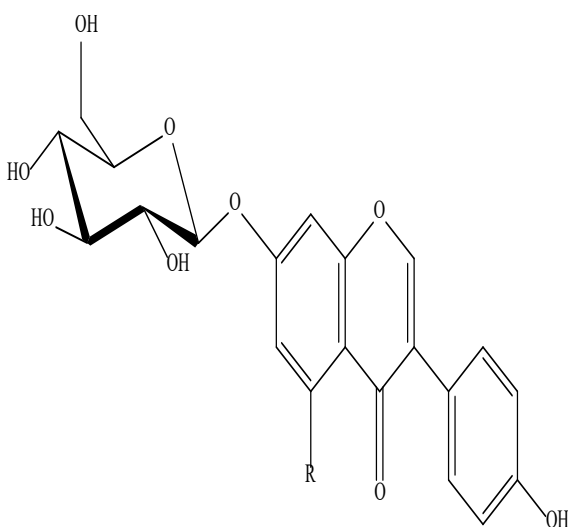
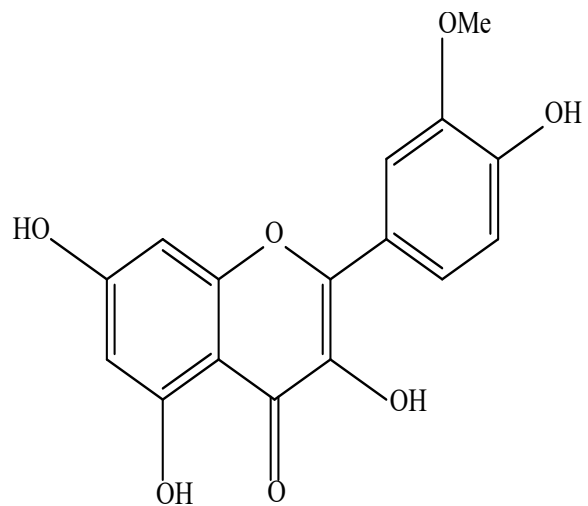
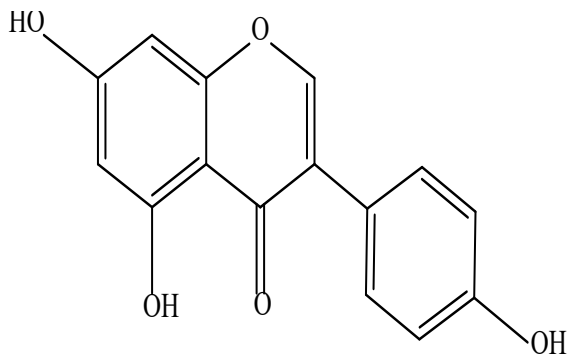
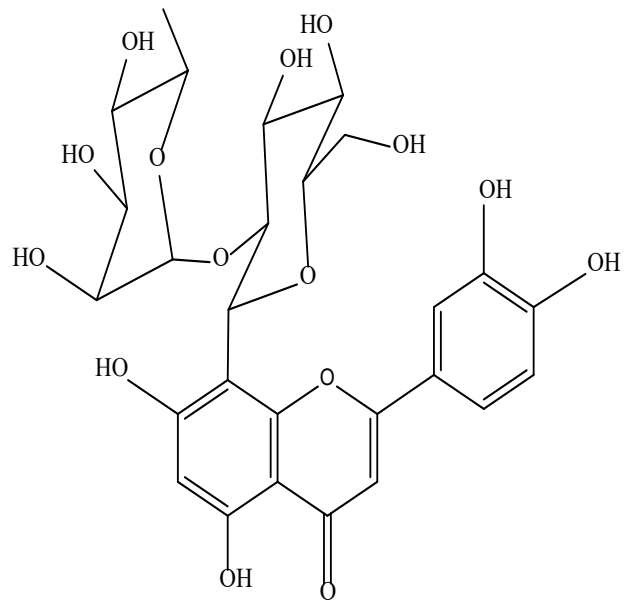
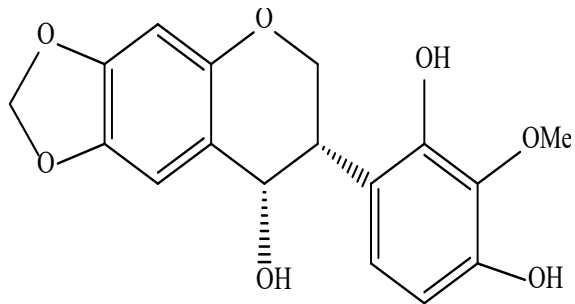
(131)



(132)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(133)	OH	OH	hexose-pentose	H	H
(134)	OH	OH	H	H	hexose-pentose
(135)	H	OH	H	H	hexose-pentose
(136)	H	OH	hexose-pentose	H	H
(137)	OH	OH	H	H	hexose-pentose-(3-hydroxy-3methylglutaroyl)
(138)	H	OH	H	H	hexose-pentose-(3-hydroxy-3methylglutaroyl)



R
H
OH

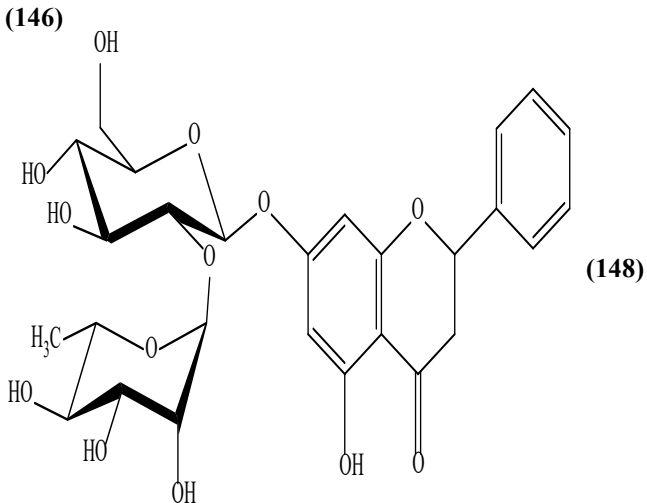
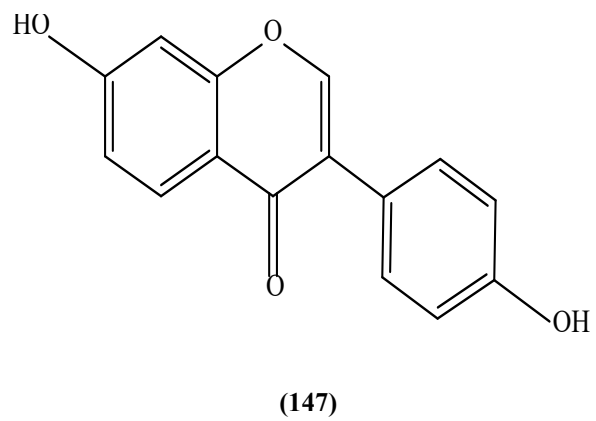
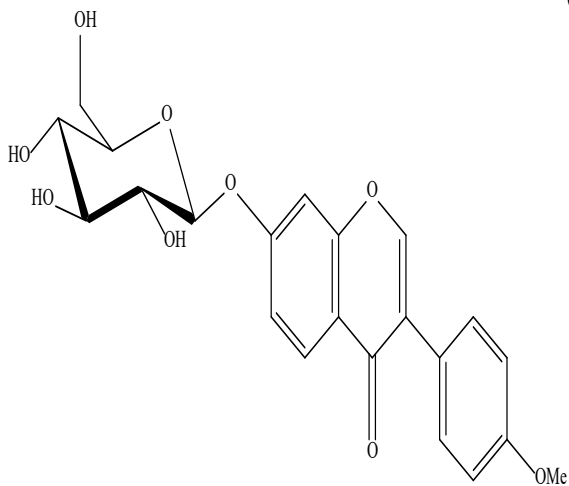
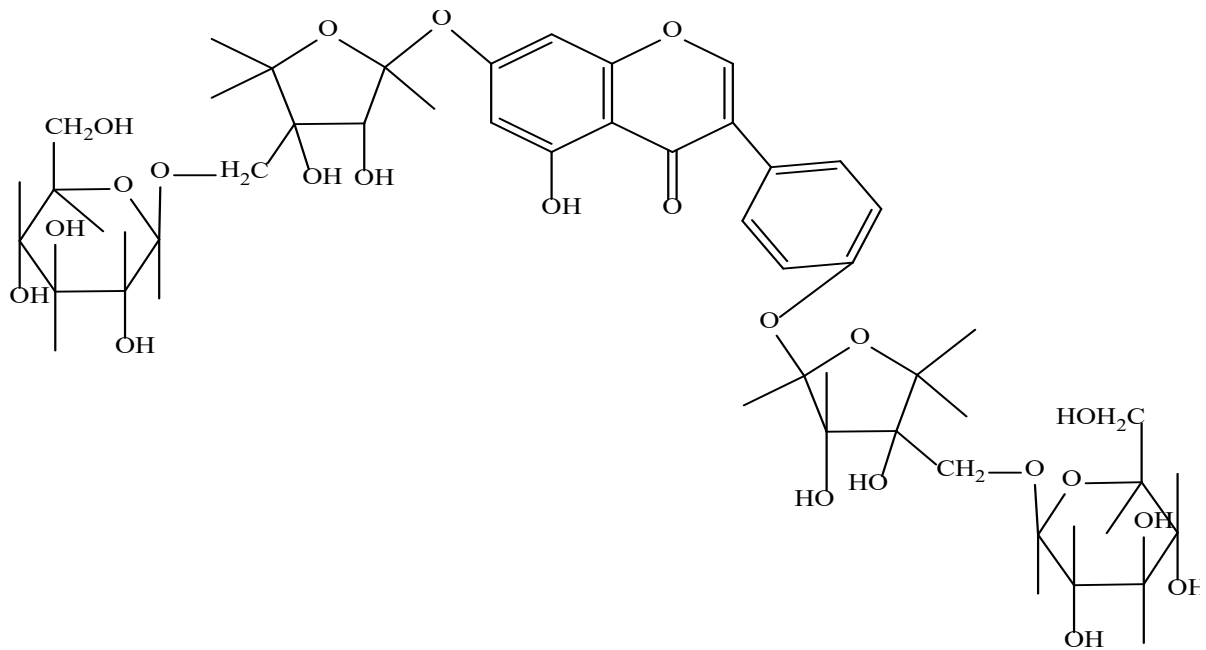
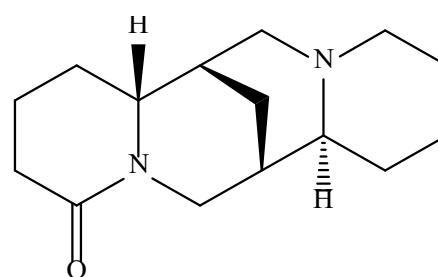
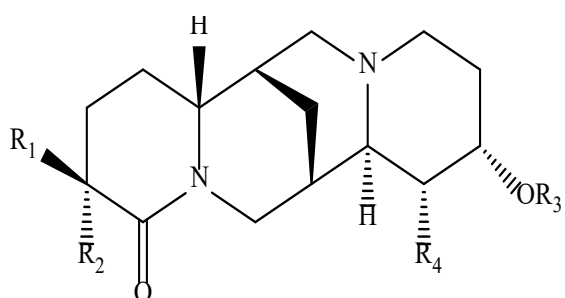


Figure II-8: structures des flavonoides isolés du genre *Cytisus*

II-2-6-2-Alcaloïdes

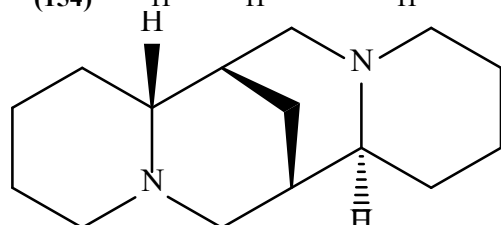
 Tableau II-8 : alcaloïdes identifiés du genre *Cytisus*

Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. scoparius</i>	(-)-3β, 3α-dihydroxylupanine (149), (+)-13α-hydroxylupanine (150), 3α,13α-dihydroxylupanine (151), (-)-3β,13α-diacetoxylupanine (152), 3α,13α - diacetoxylupanine (153), 12β,13α-dihydroxylupanine (154)	[126]
	lupanine (155)	[120]
	sparteine (156), aphylline (157), anagrine (158)	[127]
<i>C. purgans</i>	lupanine (155), sparteine (156)	[125]
<i>C. monspessulanus</i>	(+)-2,3-déhydro-10-oxo-α-iso-sparteine (159), aphyllidine (160)	[128]
<i>C. laburnum</i>	N-méthylcytisine (161), cytisine (162)	[129, 130]

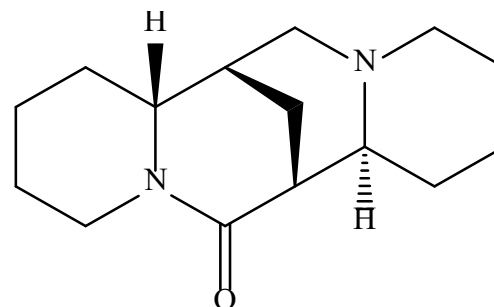


(155)

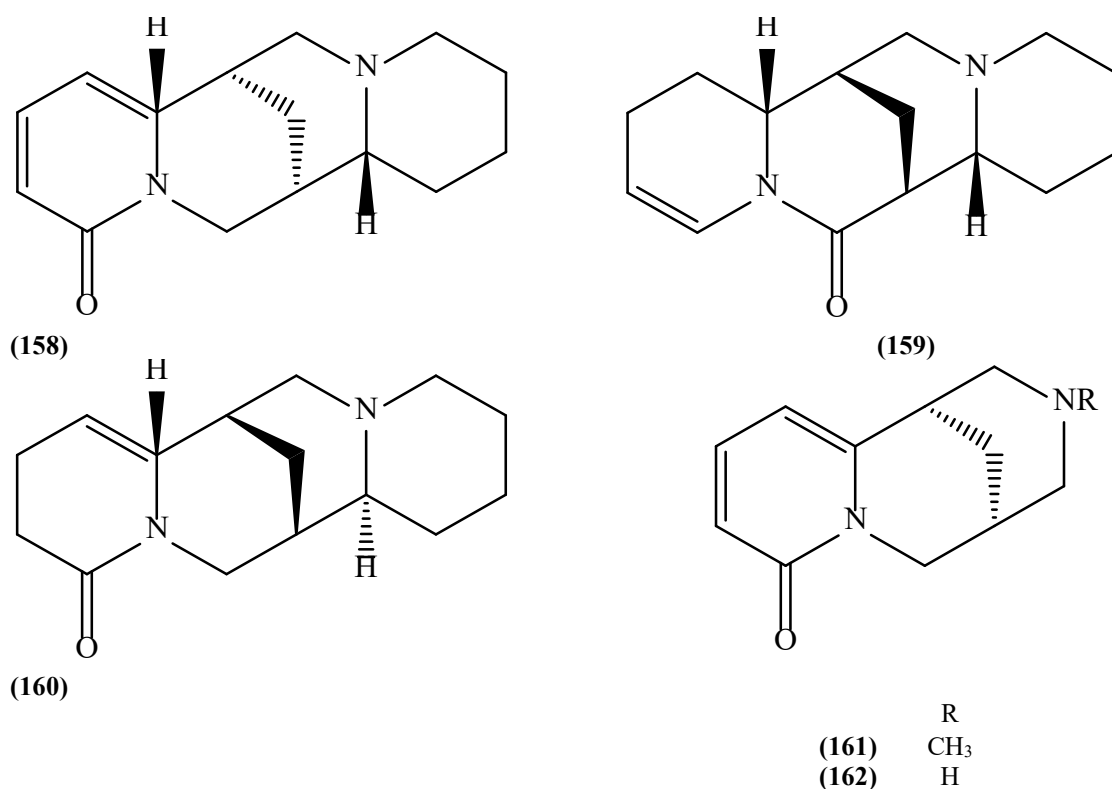
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(149)	OH	H	H	H
(150)	H	H	H	H
(151)	H	OH	H	H
(152)	OAc	H	Ac	H
(153)	H	OAc	Ac	H
(154)	H	H	H	OH



(156)



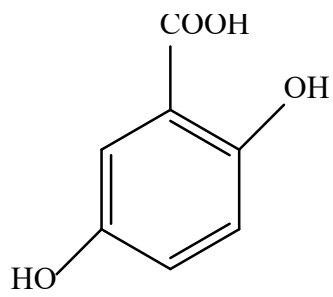
(157)

Figure II-9: structures des alcaloïdes identifiés du genre *Cytisus*

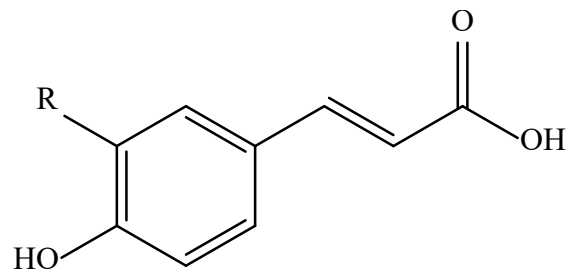
II-2-6-3-Composés phénoliques

Tableau II-9 : composés phénoliques identifiés du genre *Cytisus*

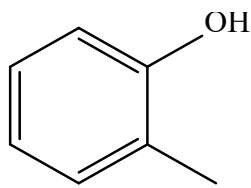
Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. nigricans</i>	acide gentisique (163), acide chlorogénique (125), acide caféique (164), acide p-coumarique (165), acide férulique (166)	[122]
<i>C. albus</i>	acide gentisique (163)	[122]
<i>C. scoparius</i>	o-créosol (167), m-créosol (168), p-créosole (169), gyaïacol (170), phénol (171) tyramine (172), 3-hydroxy tyramine (173)	[131] [126]



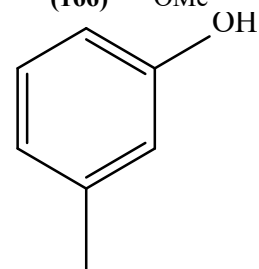
(163)



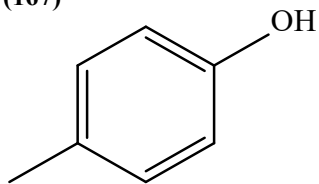
(164) R
(165) OH
(166) H
OMe



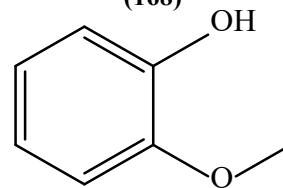
(167)



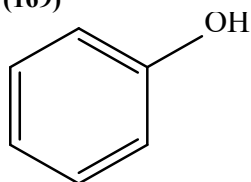
(168)



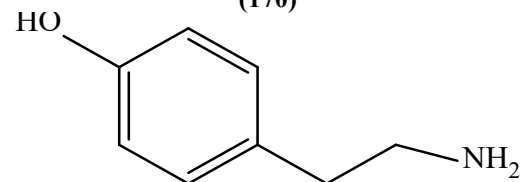
(169)



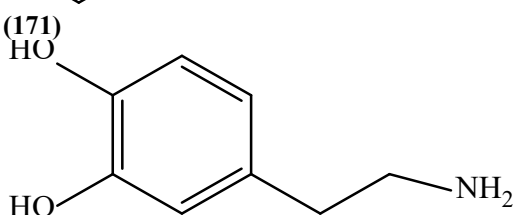
(170)



(171)



(172)



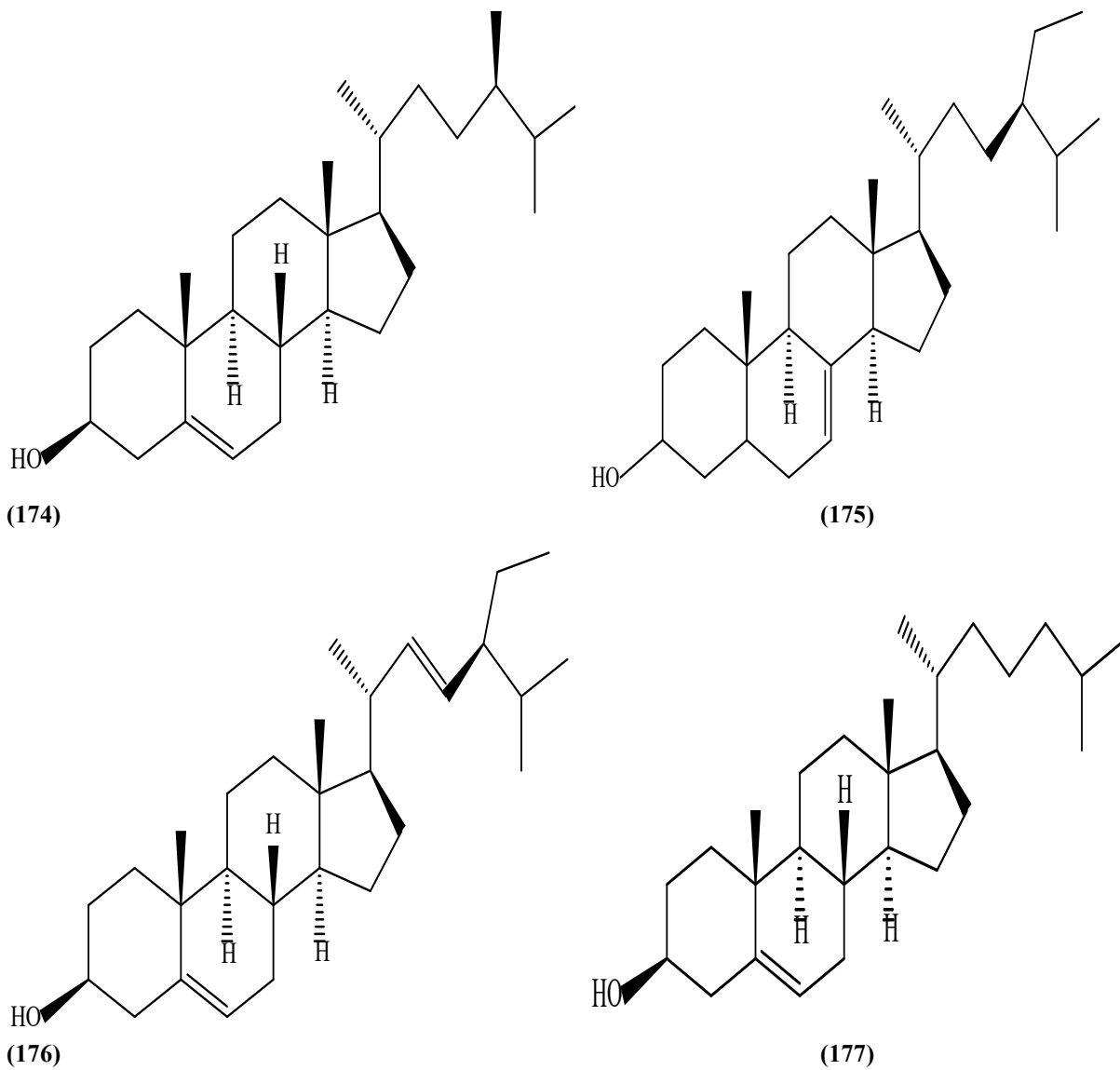
(173)

Figure II-10: structures des composés phénoliques isolés du genre *Cytisus*

II-2-6-4-Stéroïdes

Tableau II-10 : stéroïdes identifiés du genre *Cytisus*

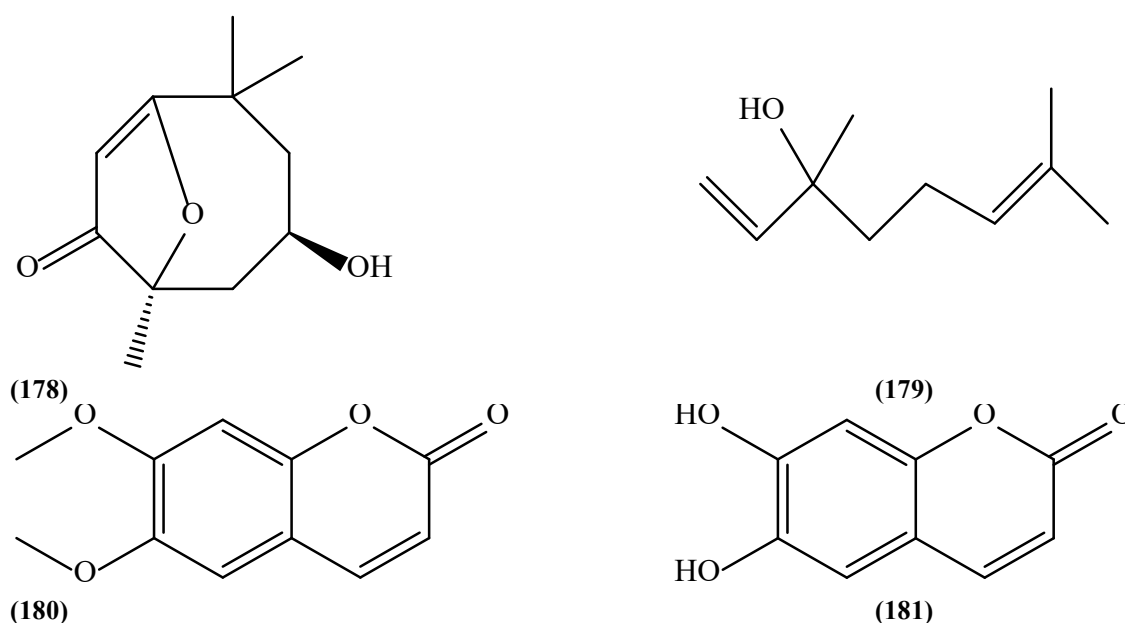
Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. scoparius</i>	β -sitosterol (109), campestérol (174), Stigmast 7-en, 3 β -Sitosterol (175), stigmastérol (176), cholestérol (177)	[132]

Figure II-11: structures des stéroïdes isolés du genre *Cytisus*

II-2-6-5-Autres composés

Tableau II-11 : autres composés détectés dans les espèces *Cytisus*

Plante étudiée	Métabolites isolés	Références
<i>C. villosus</i> Pourr	(4R,6S)-4-hydroxy-2,2,6-triméthyl-9-oxabicyclo [4.2.1] non-1(8)-en-7-one (178)	[115]
<i>C. scoparius</i>	linalool (179), scoparone (180), aesculetine (181)	[131]

Figure II-12: structures des autres composés isolés du genre *Cytisus*II-2-7-Activités biologiques du genre *Cytisus*

L'évaluation biologique des plantes du genre *Cytisus* ont permis de mettre en évidence leur potentiel pharmacologique important notamment les activités antimicrobiennes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

Tableau II-12: Activités biologiques de quelques espèces du genre *Cytisus*

Espèce	Activités pharmacologiques	Parties étudiées	Réf
<i>C. striatus</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) feuilles (ex AcOEt)	[133]
	-anti-oxydante	-(<i>in vitro</i>) fleurs (ex MeOH)	[134]
<i>C. scoparius</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) plante entière (ex AcOEt)	[120]
	-anti-oxydante	-(<i>in vivo</i>) aériennes (ex EtOH) -(<i>in vitro</i>) fleurs (ex MeOH)	[135] [134]
<i>C. triflorus</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex AcOEt) -(<i>in vitro</i>) huiles essentielle des parties aériennes	[118]
	-anti-oxydante	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex AcOEt)	[118]
	-anti-inflammatoire	-(<i>in vivo</i>) feuille (extrait hydro-éthanolique)	[136]
<i>C. villosus</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex AcOEt)	[137]
	-anti-oxydante	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex AcOEt)	[137]
<i>C. nigricans</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex EtOH, AcOEt, acétone)	[138]
	-anti-oxydante	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex EtOH)	[122]
<i>C. capitatus</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex EtOH, AcOEt, acétone)	[138]
<i>C. multiflorus</i>	-anti-oxydante	-(<i>in vivo</i>) aériennes (ex EtOH) -(<i>in vitro</i>) fleurs (ex MeOH)	[139] [134]
	-anti-inflammatoire	-(<i>in vitro</i>) plante entière (ex EtOH)	[140]
	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex MeOH)	[125]
<i>C. purgans</i>	-antimicrobienne	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex MeOH)	[125]
	-anti-oxydante	-(<i>in vitro</i>) aériennes (ex MeOH)	[125]

Références

- [1] V.A,Funk., A,Susann., T.F,Steussy. *Classification of compositae. Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. 2009.
- [2] P,Quezel. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France. 1963.
- [3] R.J,Bayer. *Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL intron and trnL/trnF intergenic spacer*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 242-256. 1998.
- [4] A,Cronquist. *Vascular flora of the southeastern United States: Asteraceae* . UNC Press Books. 2001.
- [5] G,Singh. *Plant Systematics: An Integrated Approach*. Science Publishers. 2004.
- [6] R,Paris. *Précis de matière Médicale*, Tome III. Paris, 397.1971.
- [7] P,Paulian. *guide pour l'Etude de quelque plantes Tropicales*, Ed. Gauthier-Villard, Paris. 1967.
- [8] A,Marouf. *La botanique de A à Z: 1 662 définitions*. Dunod. 2007.
- [9] P,Ozenda. *Flore et végétation du Sahara*, 3ème édition, Ed. CNRS, Paris, France. 1991.
- [10] C,Formisano., D,Rigano., F,Senatore., S,Celik., M,Bruno. *Volatile constituents of aerial parts of three endemic Centaurea species from Turkey: Centaurea amanicola Hub.-Mor., Centaurea consanguinea DC. and Centaurea ptosimopappa Hayek and their antibacterial activities*. Natural product research, 22(10), 833-839. 2008.
- [11] P,Forgo., I,Zupkó., J,Molnár., A,Vasas., G,Dombi. *Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from Centaurea jacea L*. Fitoterapia, 83(5), 921-925. 2012.
- [12] L.P,Christensen. *Flavones and other constituents from Centaurea species*. Phytochemistry, 30(8), 2663-2665. 1991.
- [13] M,Shoeb., M,Jaspars., S.M,MacManus., S,Celik., L,Nahar. *Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of Centaurea gigantea (Asteraceae)*. Journal of Natural Medicines, 61(2), 164-169. 2007.
- [14] G,Mirzahosseini., A,Manayi., M,Khanavi., M,Safavi., A,Salari., A.S,Madjid Ansari. *Bio-guided isolation of Centaurea bruguierana subsp. belangerana cytotoxic components*. Natural product research, 33(11), 1687-1690. 2019.

- [15] E,Koukoulitsa., H,Skaltsa., A,Karioti., C,Demetzos. *Bioactive sesquiterpene lactones from Centaurea species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro*. *Planta Med.* 68(7):649–652. **2002**.
- [16] V,Saroglou., A,Karioti., C,Demetzos., K,Dimas. *Sesquiterpene Lactones from Centaurea spinosa and their antibacterial and cytotoxic activities*. *J Nat Prod.* 68(9):1404–1407. **2005**.
- [17] A,Shakeri., E,Amini., J,Asili., M,Masullo., S,Piacente. *Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from Centaurea behen L. and Rhaponticum repens (L.) Hidalgo*. *Nat Prod Res.* 32(12):1436–1440. **2018**.
- [18] E,Hodaj., O,Tsiftoglou., S,Abazi. *Lignans and indole alkaloids from the seeds of Centaurea vlachorum Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity*. *Nat Prod Res.* 31(10):1195–1200. **2017**.
- [19] S,Serin. *Triterpenes of Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry.*46 (3):545–548. **1997**.
- [20] F,Bulut, F., I,Demirtas., S,Koldas., F,Gul., I,Behcet., T,Ozen. *The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic Centaurea derderiifolia*. *Nat Prod Res:*1–4. **2019**.
- [21] H.X,Wei., W.Y,Gao., Y.K,Tian., Y.K,Guan. *New Eudesmane Sesquiterpene and Thiophene Derivatives from the Roots of Rhaponticum uniflorum*. *Pharmazie* 52, 245–247. **1997**.
- [22] R,Arif., E,Küpelı. *The biological activity of Centaurea L. species*. *G.U.-J.Sci.* 17, 149–164. **2004**.
- [23] E,Yesilada. *Biodiversity in Turkish Folk Medicine*. *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK. pp.119–135. **2002**.
- [24] E,Sezik., E,Yesilada., G,Honda., Y,Takaishi. *Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia*. *J. Ethnopharmacol.* 75, 95–115. **2001**.
- [25] E,Yesilada., I,Gürbüz. *Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity*. *J. Ethnopharmacol.* 66, 289–293. **1999**.
- [26] E,Yeşilada., I,Gürbüz., E,Bedir. *Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis through bioassay-guided fractionation procedures in rats*. *J. Ethnopharmacol.* 95, 213–219. **2004**.

- [27] I,Gurbuz., E,Yesilada. *Evaluation of the antiulcerogenic effect of the sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis ssp. solstitialis by using various in vivo and biochemical techniques.* J. Ethnopharmacol. 112, 284–295. **2007.**
- [28] D,Csupor., G,Blazsó., A,Balogh. *The traditional Hungarian medicinal plant Centaurea sadleriana Janka accelerates wound healing in rats.*J. Ethnopharmacol. 127, 193–195. **2010.**
- [29] M.T,Chucla., M,Lamela., A,Gato. *Centaurea corcubionensis: A Study of its Hypoglycemic Activity in Rats.* Planta Med. 107–109. **1988.**
- [30] Base de données des plantes d'Afrique.
- [31] W,Greuter. *The Euro Med treatment of Cardueae (Compositae) generic concepts and required new names.* Willdenowia, 33(1), 49-61. **2003.**
- [32] M,Shoeb., M.M,Rahman., L,Nahar., A,Delazar., M,Jaspars. *Bioactive lignans from the seeds of Centaurea macrocephala.* Daru, 12(3), 87-93. **2004.**
- [33] S,Serin. *Triterpenes of Centaurea ptosimopappoides.* Phytochemistry, 46(3), 545-548. **1997.**
- [34] R,Seghiri., R,Mekkiou., O,Boumaza., S,Benayache., J,Bermijo. *Phenolic compounds from Centaurea africana.* Chemistry of natural compounds, 42(5), 610-611. **2006.**
- [35] M,Bruno. *Sesquiterpene lactones and flavones from Centaurea cineraria subsp. umbrosa.* Phytochemistry, 27(6), 1873-1875. **1988.**
- [36] A,Bentamene., M,Baz., R,Boucheham., S,Benayache., J,Creche, J. *Flavonoid aglycones from Centaurea sphaerocephala.* Chemistry of Natural Compounds, 44(2), 234-235. **2008.**
- [37] A,Bentamene., R,Boucheham., M,Baz., S,Benayache., J,Creche. *Flavonoid glucosides from Centaurea sphaerocephala.* Chemistry of natural compounds, 46(3), 452-453. **2010.**
- [38] M,Aqil., I.Z,Khan. *Flavonoids from Centaurea senegalensis DC (compositae).* Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 12(2), 177-183. **1998.**
- [39] S,Akkal., F,Benayache., S,Benayache., K,Medjroubi., M,Jay. *A new flavone glycoside from Centaurea furfuracea.* Fitoterapia, 70(4), 368-370. **1999.**

- [40] S,Akkal., F,Benayache., K,Medjroubi., F,Tillequin. *Flavonoids from Centaurea furfuracea (Asteraceae)*. Biochemical systematics and ecology, 31(6), 641-643. **2003**.
- [41] M.E,Grafakou., S,Djeddi., H,Tarek. *Secondary metabolites from the aerial parts of Centaurea papposa (Coss.) Greuter*. Biochemical Systematics and Ecology, 76, 15-22. **2018**.
- [42] D,Gülcemal., O,Alankuş-Çalışkan., C,Karaalp., A.U,Ors. *Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from Centaurea urvillei DC. subsp. urvillei*. Carbohydrate research, 345(17), 2529-2533. **2010**.
- [43] M,Nikolova. *Surface flavonoids of Centaurea stenolepis and the local endemics Centaurea davidovii and C. parilica (Asteraceae, sect. Lepteranthus) from Bulgaria*. Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation, 19(3), 357-360. **2013**.
- [44] M,Shoeb., S,Celik., M,Jaspars., Y,Kumarasamy., S.M,MacManus. *Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of Centaurea schischkinii*. Tetrahedron, 61(38), 9001-9006. **2005**.
- [45] P,Forgo., I,Zupkó., J,Molnár., A,Vasas. *Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from Centaurea jacea L*. Fitoterapia, 83(5), 921-925. **2012**.
- [46] W,Senosy., A,Kamal., S,El-Toumy., E,Gendy. *Phenolic compounds and Hepatoprotective activity of Centaurea aegyptiaca L*. Journal of Advanced Pharmacy Research, 2(2), 123-132. **2018**.
- [47] A,Nacer., A,Bernard., J,Boustie., R,Touzani. *Aglycone flavonoids of Centaurea tougourensis from Algeria*. Chemistry of Natural Compounds, 42(2), 230-231. **2006**.
- [48] L,Hammoud., R,Seghiri., S,Benayache., P,Mosset., A,Lobstein., M,Chaabi., F,León., I,Brouard. *A new flavonoid and other constituents from Centaurea nicaeensis All. var. walliana M*. Natural product research, 26(3), 203-208. **2012**.
- [49] S.A,Ahmed., E.M,Kamel. *Cytotoxic activities of flavonoids from Centaurea scoparia*. The Scientific world journal. **2014**.
- [50] G,Flamini., C,Bulleri. *Secondary constituents from Centaurea horrida and their evolutionary meaning*. Biochemical systematics and ecology, 30(11), 1051-1054. **2002**.

- [51] S,Baatouche., T,Cheriet., D,Sarri., R,Mekkiou., O,Boumaza., S,Benayache., F,Benayache., I,Brouard., *Centaurea microcarpa* Coss. & Dur.(Asteraceae) extracts: New cyanogenic glucoside and other constituents. Natural product research, 33(21), 3070-3076. **2019.**
- [52] G,Flamini., E,Antognoli., I,Morelli. *Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of Centaurea bracteata from Italy.* Phytochemistry, 57(4), 559-564. **2001.**
- [53] S,Mouffok., H,Haba., C,Lavaud., C,Long. *Chemical constituents of Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. Rec. Nat. Prod, 6(3), 292-295. **2012.**
- [54] G,Flamini., M,Pardini., I,Morelli., K,Ertugrul., H,Dural., Y,Bagci. *Flavonoid glycosides from Centaurea pseudoscabiosa subsp. pseudoscabiosa from Turkey.* Phytochemistry, 61(4), 433-437. **2002.**
- [55] C,Gousiadou. *Secondary metabolites from Centaurea orphanidea.* Biochemical systematics and ecology, 31(4), 389-396. **2003.**
- [56] R,Seghiri., O,Boumaza., R,Mekkiou., S,Benayache., P,Mosset., J,Quintana. *A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from Centaurea africana.* Phytochemistry Letters, 2(3), 114-118. **2009.**
- [57] A,Kabouche., Z,Kabouche., R,Touzani. *Flavonoids from Centaurea sulphurea.* Chemistry of Natural Compounds, 46(6), 966-967. **2011.**
- [58] S,Demir., C,Karaalp. *Specialized metabolites from the aerial parts of Centaurea polyclada* DC. Phytochemistry, 143, 12-18. **2017.**
- [59] A.F,Barrero., J.F,Sanchez. *Germacranolides from Centaurea melitensis.* Phytochemistry, 28(7), 1975-1976. **1989.**
- [60] M,Bruno., C,Fazio., S,Passananti., M.P,Paternostro., J.G,Díaz. *Sesquiterpene lactones from Centaurea sphaerocephala ssp.sphaerocephala.* Phytochemistry, 35(5), 1371-1372. **1994.**
- [61] H.S,Al-easa., J,Mann. *Guaianolides from Centaurea sinaica.* Phytochemistry, 29(4), 1324-1325. **1990.**
- [62] M.E,Grafakou., S,Djeddi., H,Tarek. *Secondary metabolites from the aerial parts of Centaurea papposa (Coss.) Greuter.* Biochemical Systematics and Ecology, 76, 15-22. **2018.**

- [63] P,Forgo., I,Zupkó., J,Molnár., A,Vasas., G,Dombi. *Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from Centaurea jacea L.* Fitoterapia, 83(5), 921-925. **2012.**
- [64] S,Djeddi., A,Karioti., M,Sokovic. *A novel sesquiterpene lactone from Centaurea pullata: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties.* Bioorganic & medicinal chemistry, 16(7), 3725-3731. **2008.**
- [65] J.L,Ríos. *Effects of triterpenes on the immune system.* Journal of ethnopharmacology, 128(1), 1-14. **2010.**
- [66] F,Lamblin., C,Hano., O,Fliniaux., F,Mesnard. *Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers.* médecine/sciences, 24(5), 511-520. **2008.**
- [67] I,Fernandez., B,Garcia., F,J,Grancha. *Sesquiterpene lactones, flavonoids and coumarins from Centaurea collina.* Phytochemistry, 28(9), 2405-2407. **1989.**
- [68] A,Ciric., A,Karioti., J,Glamoclija., M,Soković. *Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from Centaurea spruneri Boiss. & Heldr.* Journal of the Serbian Chemical Society, 76(1), 27-34. **2011.**
- [69] Y,Kumarasamy., M.E,Fergusson., L,Nahar. *Bioactivity of moschamindole from Centaurea moschata.* Pharmaceutical Biology, 40(4), 307-310. **2002.**
- [70] E.H,Kolli. *Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires d'espèces du genre Centaurea-activité cytotoxique.* **2013.**
- [71] A,Reyhan., E,Küpeli. *The biological activity of Centaurea L. species.* Gazi University Journal of Science, 17(4), 149-164. **2004.**
- [72] U,Koca., I,P,Süntar., H,Keles., E,Yesilada. *In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of Centaurea iberica Trev. ex Spreng.* Journal of ethnopharmacology, 126(3), 551-556. **2009.**
- [73] E.K,Akkol., R,Arif., F,Ergun. *Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two Centaurea species.* J Ethnopharmacol. 122(2):210–215. **2009.**
- [74] A,Chicca., M,Tebano., B,Adinolfi., K,Ertugrul. *Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of Centaurea deflexa.* European journal of medicinal chemistry, 46(7), 3066-3070. **2011.**

- [75] E,Yesilada., I,Gürbüz., E,Bedir., I,Tatli. *Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis through bioassay-guided fractionation procedures in rats*. Journal of ethnopharmacology, 95(2-3), 213-219. **2004**.
- [76] A,Aktumsek., G,Zengin., G.O,Guler. *Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic Centaurea L. species*. Food and chemical toxicology, 55, 290-296. **2013**.
- [77] A.M,Lahneche., D,Zama. *L'effet protecteur des extraits de la plante Centaurea sphaerocephala L. vis-à-vis de la toxicité induite par l'acide valproïque* (Doctoral dissertation, University Mentouri Constantine). **2018**.
- [78] K,Özcan., T,Acet. *Centaurea hypoleuca DC: Phenolic content, antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibitory activities*. South African Journal of Botany, 127, 313-318. **2019**.
- [79] F,Bulut., I,Demirtas., S,Koldas., F,Gul., L,Behcet. *The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic Centaurea derderiifolia*. Natural Product Research, 35(11), 1919-1922. **2021**.
- [80] S.A,Petropoulos., A,Fernandes., M.I,Dias., C,Pereira., R,Calhelha., N,Tzortzakis., M,Ivanov. *Wild and cultivated Centaurea raphanina subsp. mixta: A valuable source of bioactive compounds*. Antioxidants, 9(4), 314. **2020**.
- [81] R,Ayad. *Phytochemistry and biological activities of algerian Centaurea and related genera*. Studies in Natural Products Chemistry, 63, 357-414. **2019**.
- [82] A,Aktumsek., G,Zengin., G.O,Guler. *Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five Centaurea L. species from Turkey flora*. Food and chemical toxicology, 49(11), 2914-2920. **2011**.
- [83] G,Zengin., D,Zheleva., R,Gevrenova., P,Nedialkov., A,Mocan., A,Ciric., J,Glamoclija. *Identification of phenolic components via LC-MS analysis and biological activities of two Centaurea species: C. drabifolia subsp. drabifolia and C. lycopifolia*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 149, 436-441. **2018**.
- [84] M,Shoeb., S.M,MacManus., M,Jaspars., J,Trevidu. *Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of Centaurea montana (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells*. Tetrahedron, 62(48), 11172-11177. **2006**.
- [85] K,Guven., S,Celik. *Antimicrobial activity of Centaurea. species*. Pharmaceutical Biology, 43(1), 67-71. **2005**.

- [86] K,Ozcan., T,Acet., *Centaurea hypoleuca* DC: Phenolic content, antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibitory activities. South African Journal of Botany, 127, 313-318. **2019**.
- [87] M.I,Skliar., M.S,Toribio. Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. Fitoterapia, 76(7-8), 737-739. **2005**.
- [88] Y.B,Köse., G,Iscan., B,Demirci. Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. Fitoterapia, 78(3), 253-254. **2007**.
- [89] F,Labed., M,Masullo., V,Mirra., F,Nazzaro. Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. Fitoterapia, 133, 51-55. **2019**.
- [90] N,Yayli., A,Yaşar., C,Gulec., A,Usta., S,Kolaylı. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. Phytochemistry, 66(14), 1741-1745. **2005**.
- [91] M.E,Grafakou., C,Barda., J,Heilmann. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory activities of sesquiterpene lactones from *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. Natural Product Research, 1-5. **2021**.
- [92] N,Garbacki., V,Gloaguen., J,Damas., P,Bodart., Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. Journal of Ethnopharmacology, 68(1-3), 235-241. **1999**.
- [93] R.E,Negrete., N,Backhouse., I,Cajigal., C,Delporte. Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. Journal of ethnopharmacology, 40(3), 149-153. **1993**.
- [94] R.S,Talhouk., W,El-Jouni., R,Baalbaki. Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*. Journal of medicinal plants research, 2(2), 024-033. **2007**.
- [95] A,Sen., L,Bitis. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. Pharmaceutical Biology, 55(1), 541-546. **2017**.
- [96] F,Bahmani., S,Esmaeili., D,Bashash. *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 99, 598-607. **2018**.

- [97] S.D,Sarker., M,Shoeb., S,Celik., M,Jaspars., L,Nahar. *Extracts of Centaurea bornmuelleri and Centaurea huber-morathii inhibit the growth of colon cancer cells in vitro*. Advances in Traditional Medicine, 7(4), 336-340. **2007**.
- [98] M,Alper. *The anticancer and anti-inflammatory effects of Centaurea solstitialis extract on human cancer cell lines*. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(3), 273. **2019**.
- [99] C,Formisano., C,Sirignano., D,Rigano., G,Chianese., G,Zengin. *Antiproliferative activity against leukemia cells of sesquiterpene lactones from the Turkish endemic plant Centaurea drabifolia subsp. detonsa*. Fitoterapia, 120, 98-102. **2017**.
- [100] O,Erol-Dayi., M,Pekmez., M,Bona. *Total phenolic contents, antioxidant activities cytotoxicity of three Centaurea species: C. calcitrapa subsp. calcitrapa, C. ptosimopappa, C. spicata*. Free Radicals and Antioxidants, 1(2), 31-36. **2011**.
- [101] J.J,Doyle. *The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context*. Plant physiology, 131(3), 900-910. **2003**.
- [102] M,Wink. *Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae)*. South African Journal of Botany, 89, 164-175. **2013**.
- [103] M.F,Wojciechowski., M.A,Lavin. *phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family*. American journal of botany, 91(11), 1846-1862. **2004**.
- [104] A.H,Rahman. *Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh*. Research in Plant Sciences, 2(1), 6-8. **2014**.
- [105] M.J,Sanderson. *A phylogeny of legumes (Leguminosae)*. American journal of botany. **2004**.
- [106] N,Azani., M,Babineau., C.D,Bailey., H,Banks., A.R,Barbosa. *A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny*. Taxon. 1, 44-77. **2017**.
- [107] M,Rahmatullah., D,Ferdausi., A,Mollik., R,Jahan. *A survey of medicinal plants used by Kavirajes of Chalna area, Khulna district, Bangladesh*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 7(2). **2010**.

- [108] O.R,Pereira., A.M,Silva. *Identification of phenolic constituents of Cytisus multiflorus*. Food Chemistry, 131(2), 652-659. **2012**.
- [109] J.C,Rameau., D,Mansion. *Flore forestière française tome 3, région méditerranéenne*. CNPF-IDF. **2008**.
- [110] J,Nirmal., C.S,Babu. *Evaluation of behavioural and antioxidant activity of Cytisus scoparius Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 8(1), 1-8. **2008**.
- [111] R.K,Siegel. *Herbal intoxication: Psychoactive effects from herbal cigarettes, tea, and capsules*. Jama, 236(5), 473-476. **1976**.
- [112] C,Di Giorgio., F,Delmas., M,Tueni. *Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species*. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 14(2), 157-162. **2008**.
- [113] V,Rebelo. *Chromium in a series of Portuguese plants used in the herbal treatment of diabetes*. Biological trace element research, 62(1), 101-106. **1998**.
- [114] V.R,Castro. *Chromium and zinc in a series of plants used in Portugal in the herbal treatment of non-insulinized diabetes*. Acta alimentaria, 30(4), 333-342. **2001**.
- [115] F,Larit., M.A,Nael., S,Benyahia., M.M,Radwan. *Secondary metabolites from the aerial parts of Cytisus villosus Pourr*. Phytochemistry letters, 24, 1-5. **2018**.
- [116] S,Talavera. *Cytisus purgans auct.(Leguminosae-Papilionoideae) comprises four distinct species*. Botanical Journal of the Linnean Society, 125(4), 331-342. **1997**.
- [117] F,Baba-Aïssa. *Encyclopédie des plantes utiles: Flore Méditerranéenne (Maghreb,Europe méridionale) Substances végétales d'Afrique*. El Maarifa. 471 p. **2011**.
- [118] W,Benabderrahmane., A,Amrani., O,Benaïssa., M,Lores. *Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial properties of ethyl acetate extract obtained from Cytisus triflorus l'Her*. Natural product research, 34(11), 1586-1590. **2020**.
- [119] R,Sundararajan., N.A,Haja., K,Venkatesan., K,Mukherjee., B.P,Saha. *Cytisus scoparius link-A natural antioxidant*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6(1), 1-7. **2006**.

- [120] M,Lores., M,Pájaro. *Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from Cytisus scoparius: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems.* Talanta, 140, 134-142. **2015.**
- [121] D,Hanganu. *Phytochemical analysis of isoflavons from some Fabaceae species extracts.* Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(1), 57-60. **2010.**
- [122] D,Hanganu., L,Filip., N.K,Olah., A,Mocan. *Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity for Cytisus nigricans and Cytisus albus.* Farmacia, 64(6), 863-867. **2016.**
- [123] D,Hanganu., L,Vlase. *LC/MS analysis of isoflavones from Fabaceae species extracts.* Farmacia, 58(2), 177-183. **2010.**
- [124] J.B,Harborne. *Chemosystematics of the leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genisteae.* Phytochemistry 8, 1449-1456. **1969.**
- [125] G,Benaiche. *Extraction, separation and biological activities of some secondary metabolites from the plant Cytisus purgans (Doctoral dissertation, Université de m'sila).* **2016.**
- [126] I,Murakoshi., Y,Yamashita. *(-)-3 β -13 α -dihydroxylupanine from cytisus scoparius.* Phytochemistry, 25(2), 521-524. **1986.**
- [127] G,Gresser., L,Witte. *A survey of quinolizidine alkaloids and phenylethylamine tyramine in Cytisus scoparius (Leguminosae) from different origins.* Zeitschrift für Naturforschung C, 51, 791-801. **1996.**
- [128] K,Nihei., K,Shibata. *(+)-2, 3-Dehydro-10-oxo- α -isosparteine in Uresiphita reversalis larvae fed on Cytisus monspessulanus leaves.* Phytochemistry 61, 987-990. **2002.**
- [129] A,Freer., D,Robins. *Structures of (-)-cytisine and (-)-N-methylcytisine: tricyclic quinolizidine alkaloids.* Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications 43, 1119-1122. **1987.**
- [130] J.J,Prochaska., S,Das. *Cytisine, the world's oldest smoking cessation aid.* Bmj. 347, f5198. **2013.**
- [131] T,Kurihara., M,Kikuchi. *Studies on the constituents of flowers. XIII. The flower components of Cytisus scoparius.* Yakugaku Zasshi. 100, 1054-1057. **1980.**

- [132] R,Sundararajan., R,Koduru. *Cytisus scoparius: A review of ethnomedical, phytochemical and pharmacological information*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 4, 2151-2169. **2014**.
- [133] A.C,Abreu., A,Coqueiro., A.R,Sultan. *Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from Cytisus striatus as antibiotic adjuvants against MRSA*. Scientific Reports, 7(1), 1-16. **2017**.
- [134] J,Pinela., L,Barros. *Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae)*. Food and Chemical Toxicology, 49(11), 2983-2989. **2011**.
- [135] S,Raja., K.N,Ahamed., V,Kumar., K,Mukherjee. *Antioxidant effect of Cytisus scoparius against carbon tetrachloride treated liver injury in rats*. Journal of ethnopharmacology, 109(1), 41-47. **2007**.
- [136] K,Aourahoum., F,Fazouane. *Pharmacological potential of Cytisus triflorus l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent*. Pharma Lett, 7, 104-10. **2015**.
- [137] A,Bouziane., B,Bakchiche., M.I,Dias., L,Barros. *Phenolic Compounds and Bioactivity of Cytisus villosus Pourr*. Molecules, 23(8), 1994. **2018**.
- [138] O,Stefanovic., L,Comic. *Inhibitory effect of Cytisus nigricans L. and Cytisus capitatus Scop. on growth of bacteria*. African Journal of Microbiology Research, 5(27), 4725-4730. **2011**.
- [139] O.R,Pereira., R.I,Macias., M.J,Perez. *Protective effects of phenolic constituents from Cytisus multiflorus, Lamium album L. and Thymus citriodorus on liver cells*. Journal of Functional Foods, 5(3), 1170-1179. **2013**.
- [140] S,Saraiva., O,Pereira., J,Liberal., M,Batista. *Is cytisis multiflorus an antiinflammatory plant*. Natural Products and Related Redox Catalysts: basic research and applications in medicine and agriculture. **2012**.



Travaux personnels

A decorative border with a repeating geometric pattern of interlocking squares and lines, rendered in a light blue color, frames the entire page.

Chapitre III

Investigation chimique

III-1-Investigation chimique de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*

III-1-1-Extraction

500 g des parties aériennes de *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* séchées et broyées ont subi une macération à température ambiante par un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O : 70/30) pendant 48h. Après filtration et concentration, la phase aqueuse obtenue est fractionnée par extraction liquide/liquide de polarité croissante aux solvants : l'hexane, Acétate d'éthyle et n-butanol. Les extraits organiques récupérés sont concentrés sous pression réduite à sec et pesés. Cette opération a permis d'obtenir 3,6 g de l'extrait hexane, 7,8 g de l'extrait d'acétate d'éthyle et 18,7g de l'extrait n-butanol. Le protocole des différentes étapes de l'extraction est regroupé dans le schéma suivant (Figure III-1).

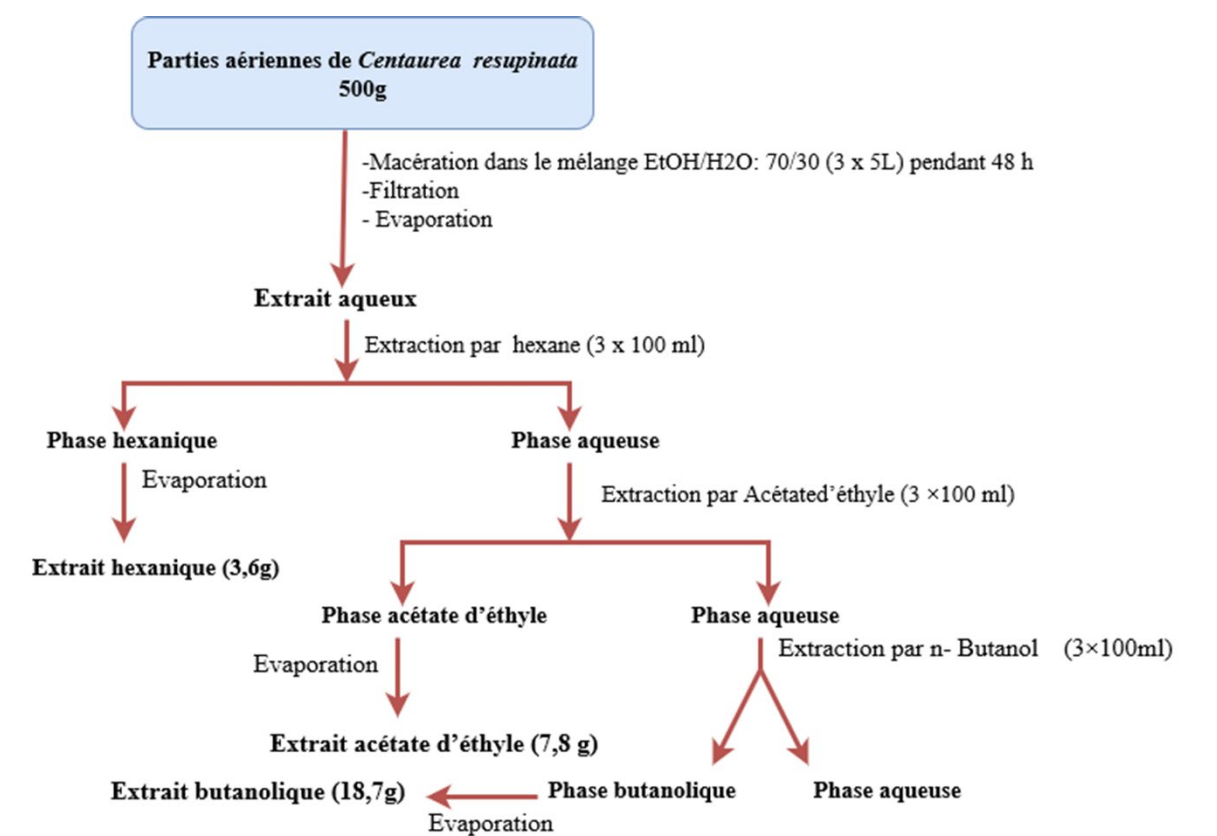


Figure III-1: Schéma d'extraction de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *Dufourii*

Les rendements de cette extraction par rapport à la matière sèche sont rapportés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: Rendements des extraits organiques

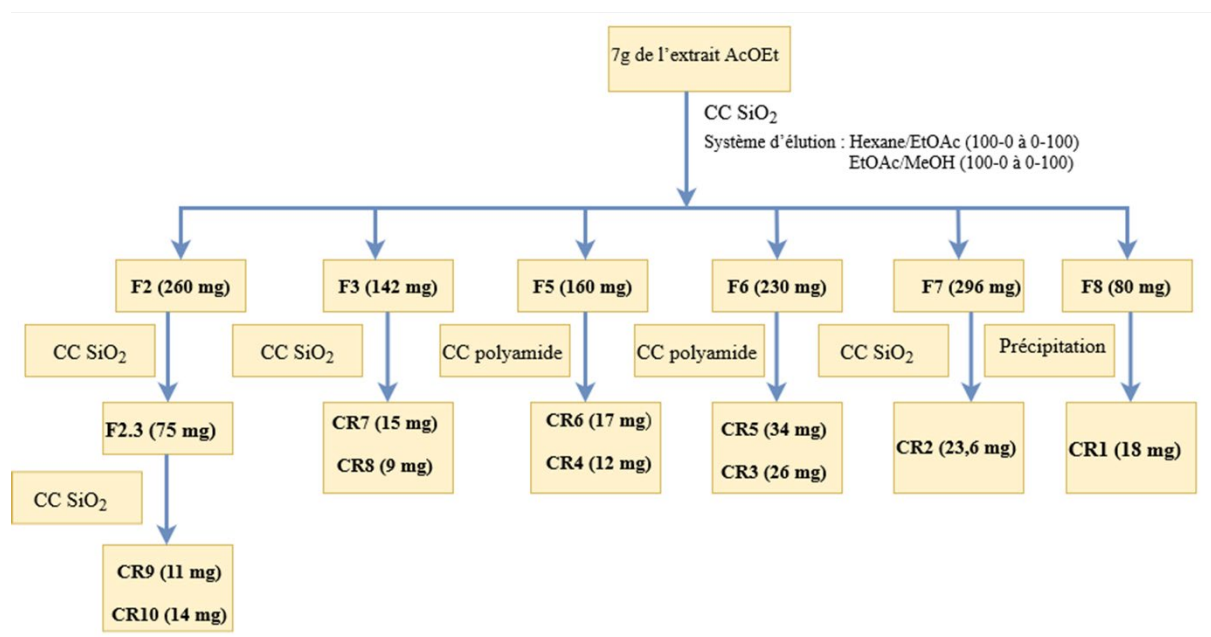
Matière végétale	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
500 g	hexane	3,6	0,72
	Acétate d'éthyle	7,8	1,56
	n-Butanol	18,7	3,74

La chromatographie sur couche mince réalisée sur les trois extraits organiques dans différents systèmes d'éluion, indique après révélation par l'acide sulfurique et chauffage que les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique sont riches en métabolites secondaires par rapport à l'extrait hexanique.

III-1-2-Séparation et purification de l'extrait Acétate d'éthyle

Le fractionnement de 7g d'extrait acétate d'éthyle est effectué sur une colonne de gel de silice en phase normale. Un mélange de gradient : Hexane/EtOAc (100-0 à 0-100) puis EtOAc/MeOH (100-0 à 0-100) est utilisé comme éluant. Ceci a permis d'obtenir 10 fractions majoritaires F1-F10 (Figure III-2).

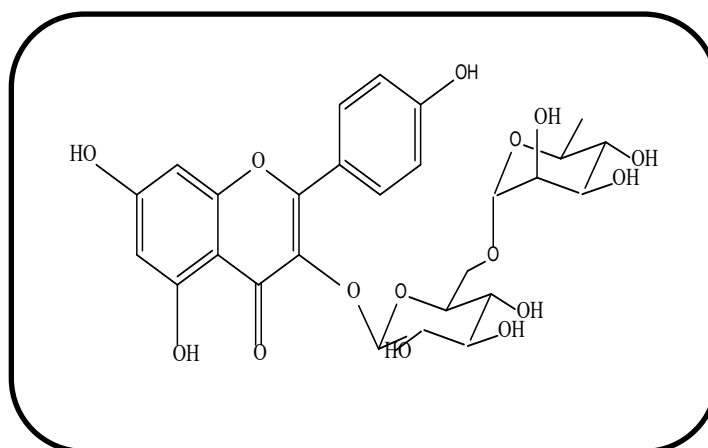
Ces fractions sont purifiées par plusieurs techniques chromatographiques en utilisant différentes phases stationnaires. Dix composés ont été isolés à l'état pur (Figure III-2).

Figure III-2: Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Centaurea resupinata*

III-1-3-Détermination structurale des produits obtenus

L'identification structurale des composés isolés a été caractérisée par l'exploitation des différentes techniques d'analyse spectroscopiques notamment UV, RMN¹H, RMN¹³C, RMN2D (COSY, HSQC et HMBC), spectrométrie de masse, mesure de pouvoir rotatoire ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

III-1-3-1-Elucidation structurale du produit CR1



kaempférol 3-O-(6- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

Le composé **CR1**, isolé sous forme de poudre jaune est visible sous lumière UV à 254 et 366 et donne une coloration jaune avec le révélateur d'acide sulfurique et chauffage. Ceci nous permet de suggérer une structure flavonoïdique pour ce composé.

L'examen du spectre de masse en mode positive du produit CR1 présente un pic d'ion pseudo moléculaire à m/z 617 $[M+Na]^+$ indiquant une masse moléculaire de 594 uma correspondant à une formule brute de $C_{27}H_{30}O_{15}$.

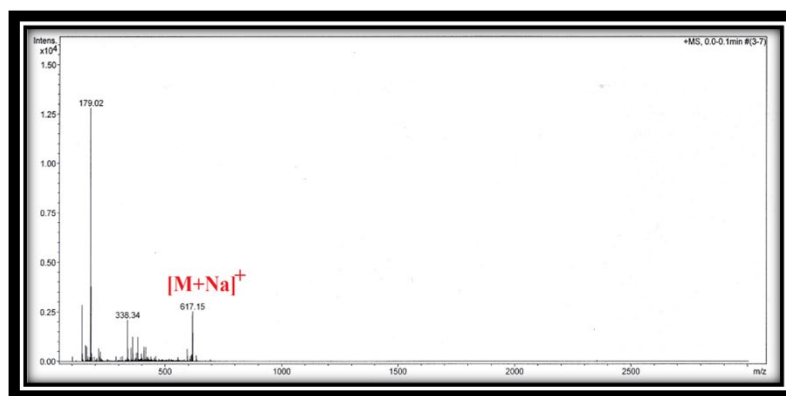


Figure III-3: Spectre de masse ESI-MS du produit CR1

Les données de spectre UV du produit CR1 enregistré dans le méthanol montrent :

- Deux bandes d'absorption à 357 nm (Bande I) et 275 nm (Bande II) indiquant un squelette de type flavonol.
- Un déplacement bathochrome +42 de la bande I, après l'addition de AlCl_3+HCl en regard du spectre enregistré dans le MeOH nm, atteste la substitution du carbone en position 5 par un groupement OH.
- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome +56 nm de la bande I, suggérant la présence d'un OH en position 4'.
- Un déplacement bathochrome +5 nm de la bande II après l'addition de NaOAc indique la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc+ H_3BO_3 révèle l'absence d'un déplacement bathochrome de la bande I par rapport à celle du spectre enregistré dans le MeOH. Ce qui laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau III-2: Données du spectre UV du produit CR1

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	357	275
+NaOAc+H_3BO_3	358	275
+NaOAc	379	280
+NaOH	413	284
+AlCl_3+HCl	399	283
+AlCl_3	402	281

Le spectre RMN ^1H du produit CR1 (Figure III-4) révèle la présence :

- Des protons aromatiques sortant dans la région 6-8,2 ppm.
- Des protons osidiques résonant à 3,25 – 3,83 ppm.
- Deux protons anomériques à δ_{H} 4,52 (d, $J= 1,7$ Hz) et à δ_{H} 5,12 (d, $J= 8$ Hz).

Ces données permettent de déduire clairement que le produit CR1 est un flavonoïde diosidique.

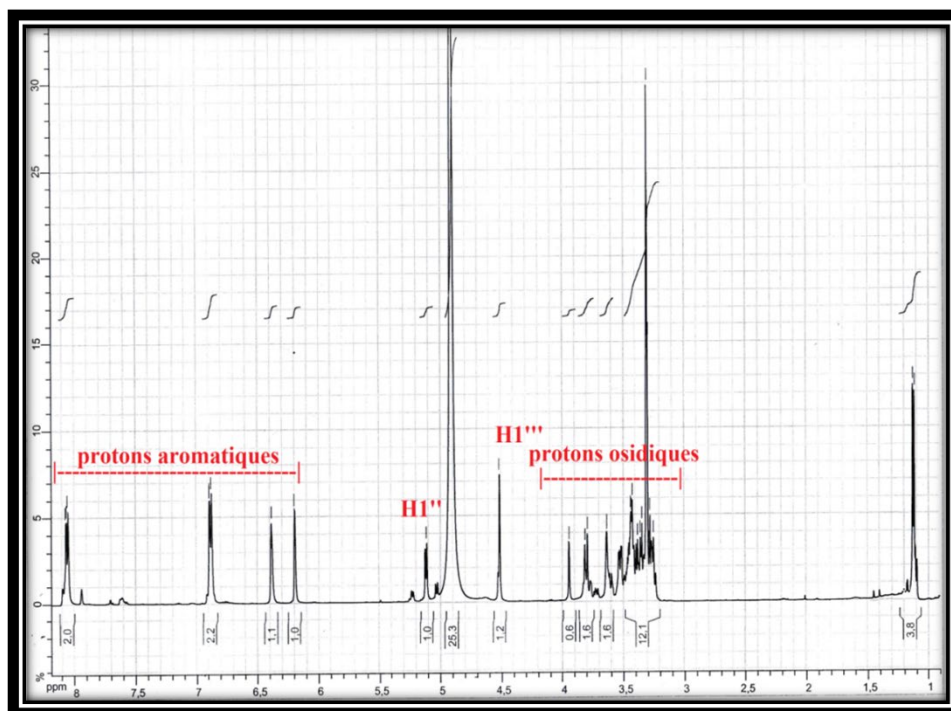


Figure III-4: Spectre RMN ^1H du produit CR1

L'examen du spectre RMN ^1H étalé enregistré dans le méthanol deutéré (Figure III-4) montre:

- Deux signaux doublets d'intégration 2H à δ_{H} 8,06 et δ_{H} 6,89 ($J = 8,5$ Hz) caractéristiques des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement, du noyau B avec une substitution en position para.
- Deux singulets d'intégration 1H à δ_{H} 6,39 et δ_{H} 6,19 ; attribuables aux protons H-8 et H-6 du noyau A respectivement.
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 3H à δ_{H} 1,12 (3H, d, $J=6$ Hz) correspondant à un groupement méthyle. La présence de ce dernier ainsi que la valeur de la constante de couplage du proton anomère à 4,52 ppm (d, $J=1,7$ Hz) indiquent qu'une des deux unités osidiques est un rhamnose.

A partir des protons déjà identifiés par RMN ^1H , l'analyse HSQC (Figure III-5) permet de caractériser les déplacements chimiques des carbones qui les portent. Ils sont localisés à δ_{C} 98,8 (C-6), 93,6(C-8), 131(C-2', C-6'), 114,7 (C-3', C-5'), 103,3 (C-1''), 101 (C-1''') et 16,3 (C-6''').

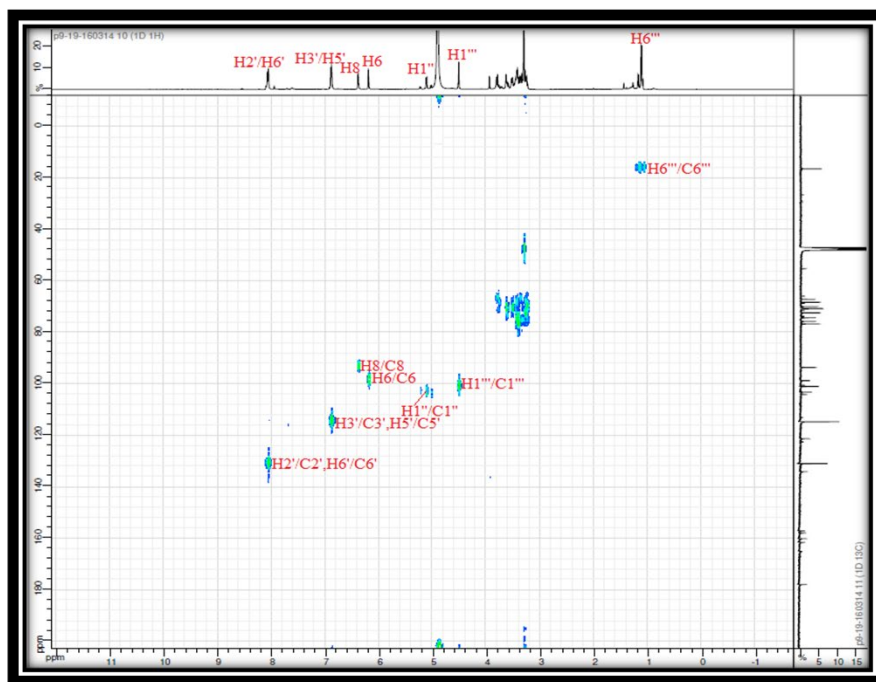


Figure III-5: Spectre HSQC du produit CR1

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-6) de CR1 présente des signaux correspondant aux 27 atomes de carbone répartis comme suit :

- ❖ Un groupement CH_3 (C-6''') à δ_{C} 16,3
- ❖ Un carbonyle (C-4) à δ_{C} 177,9.
- ❖ Six carbones aromatiques oxygénés résonant entre 133 et 166 ppm (C-2, C-3, C-5, C-7, C-9, C-4').
- ❖ Deux carbones aromatiques quaternaires non oxygénés (C-1') et (C-10) résonant à δ_{C} 121,3 et 104,7.
- ❖ Six carbones aromatiques méthines entre 93 et 132 ppm.
- ❖ Onze carbones résonants entre 67 et 104 ppm correspondant aux carbones des deux unités osidiques.

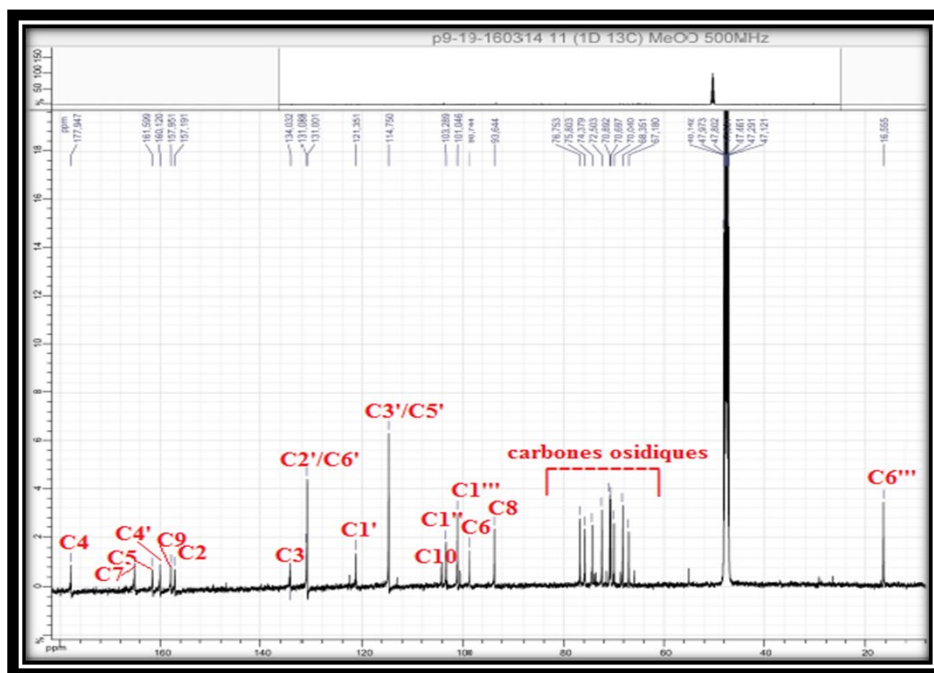


Figure III-6: spectre RMN ^{13}C du produit CR1

Au terme de cette analyse, ces données spectrales permettent l'identification de l'aglycone en tant que kaempférol substitué en C-3 (Figure III-7).

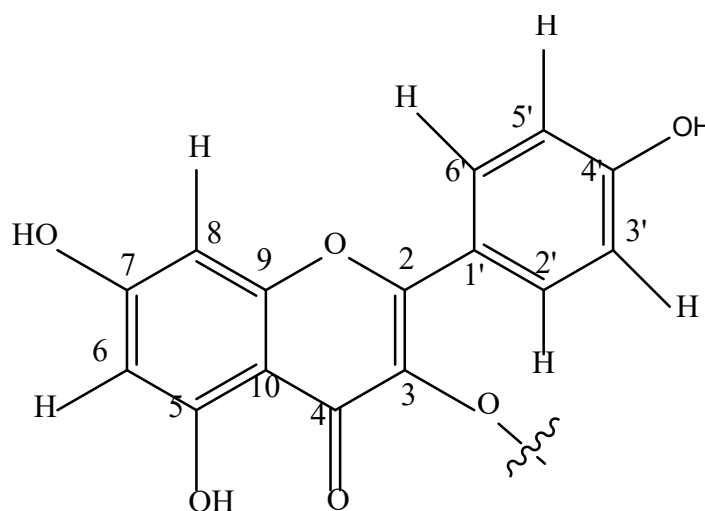


Figure III-7 : Kaempférol

Pour la partie osidique

Le spectre RMN ^1H révèle la présence de dix protons dans la région 3,25-3,83 ppm (Figure III-4) ainsi que deux protons anomériques H-1'' (5,12 ppm, d, $J=8$ Hz) et H-1''' (4,52 ppm, d, $J=1,7$ Hz) ce qui suggère la présence de deux unités osidiques.

Le spectre COSY H-H (Figure III-8) montre un système de spin à sept protons, indiquant la présence d'un hexose. On visualise les couplages suivants :

- ❖ H-1"/H-2" à 3,40 ppm (dd, $J = 8,4 ; 7,5$ Hz).
- ❖ H-2"/H-3" à 3,44 ppm (m).
- ❖ H-3"/H-4" à 3,25 ppm (t, $J = 8,4$ Hz).
- ❖ H-4"/H-5" à 3,36 ppm (m).
- ❖ H-5"/H-6" : H-6"a à 3,83 ppm (d, $J = 11,5$ Hz) et H-6"b à 3,52 ppm (dd, $J = 11,5 ; 5$ Hz).

Les grandes taches de corrélations suggérant de grandes valeurs de constantes de couplages. Ce ci révèle qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 8\text{Hz}$).

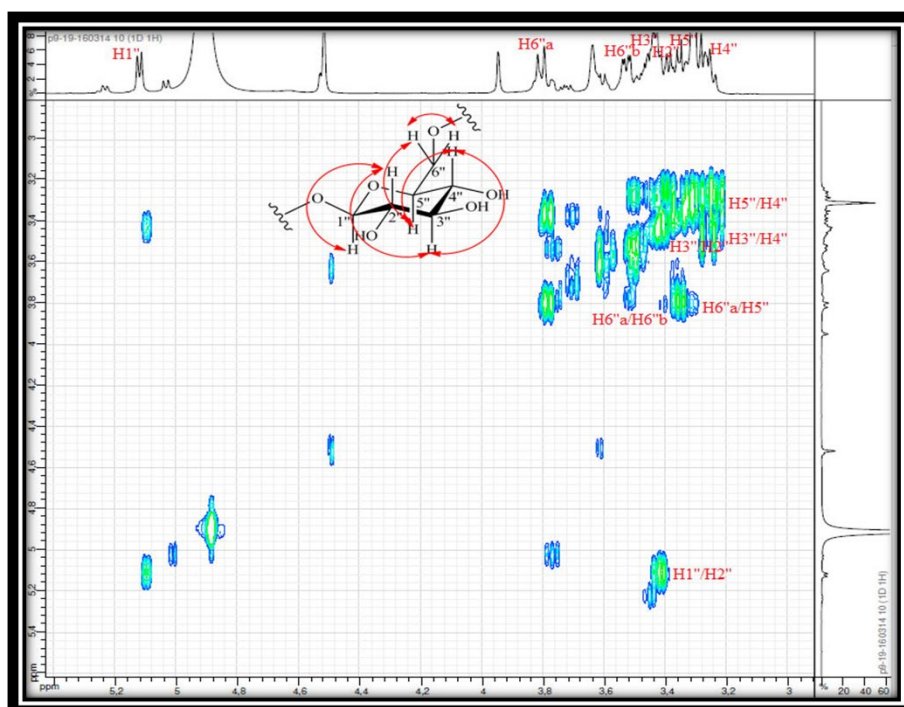


Figure III-8 : Spectre COSY H-H de β -glucose du produit CR1

A partir du deuxième proton anomérique résonant à 4,52 ppm (d, $J = 1,7$ Hz, H-1'''), le spectre COSY H-H (Figure III-9) permet d'observer les corrélations suivantes :

- ❖ H-1'''/ H-2''' à 3,60 ppm (m).
- ❖ H-2'''/ H-3''' à 3,46 ppm (dd, $J = 9,3 ; 1,5$ Hz).
- ❖ H-3'''/ H-4''' à 3,27 ppm (t, $J = 9,3$ Hz).
- ❖ H-4'''/ H-5''' à 3,38 ppm (m).
- ❖ H-5'''/ H-6''' à 1,12 ppm (d, $J = 6$ Hz).

La dernière corrélation avec la valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = 1,7 \text{ Hz}$ permettent d'identifier un α -L-rhamnose.



Figure III-9 : Spectre COSY H-H de α -rhamnose du produit CR1

Le branchement des deux unités osidiques à l'aglycone est établi par analyse du spectre HMBC (Figure III-10). Ce dernier montre une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucose H-1'' ($\delta_{\text{H}} 5,12$) et le carbone C-3 du flavonol ($\delta_{\text{C}} 134,1$), suggérant une glycosylation en position C-3. Le déplacement chimique du carbone C-2 ($\delta_{\text{C}} 157,1$) déblindé confirme bien cette liaison C3-O glucose [1]. L'enchaînement des deux unités osidiques est assigné par la corrélation entre le proton anomérique H-1'' ($\delta_{\text{H}} 4,52$) du rhamnose et le carbone C-6'' ($\delta_{\text{C}} 67,2$) du glucose.

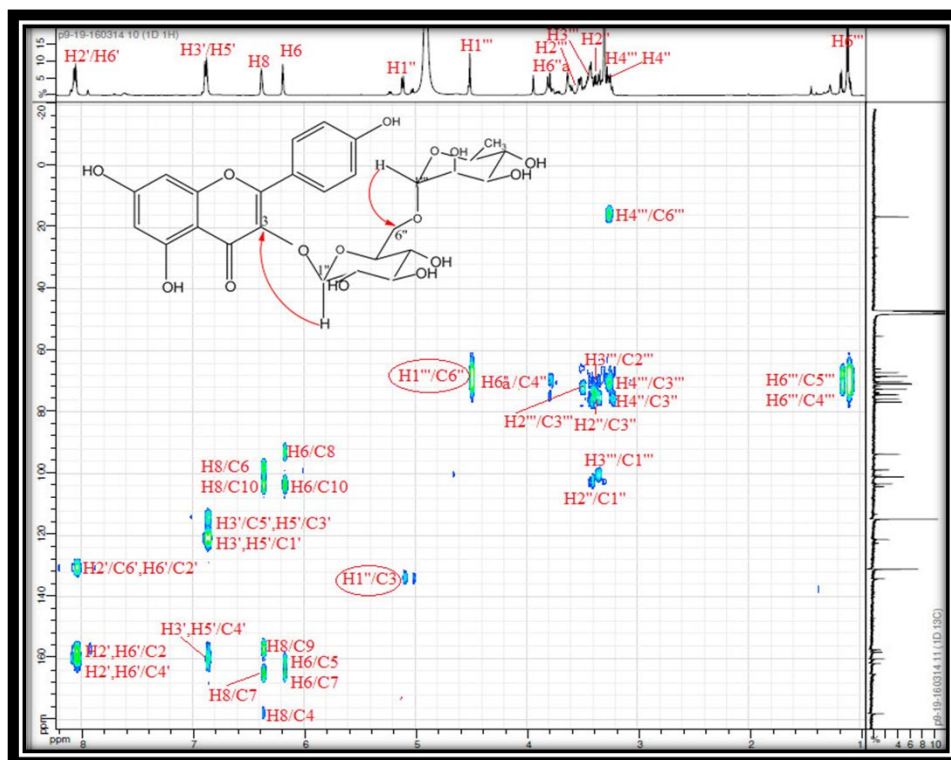
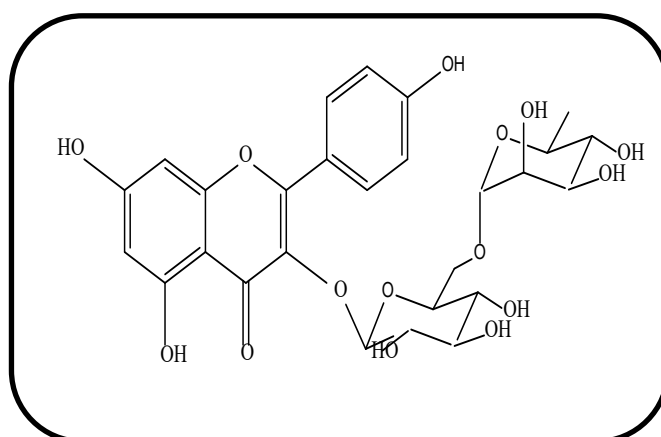


Figure III-10 : Spectre HMBC du produit CR1

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature, on détermine CR1 comme : kaempférol 3-O-(6- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside appelé aussi nicotiflorine. Ce composé a été isolé précédemment des espèces du genre *Centaurea*, telles que : *C. hierapolitana* [2], *C. alexanderina* [3] et *C. lippii* [4]. Ce produit est connu pour ses propriétés antiglycations [5].

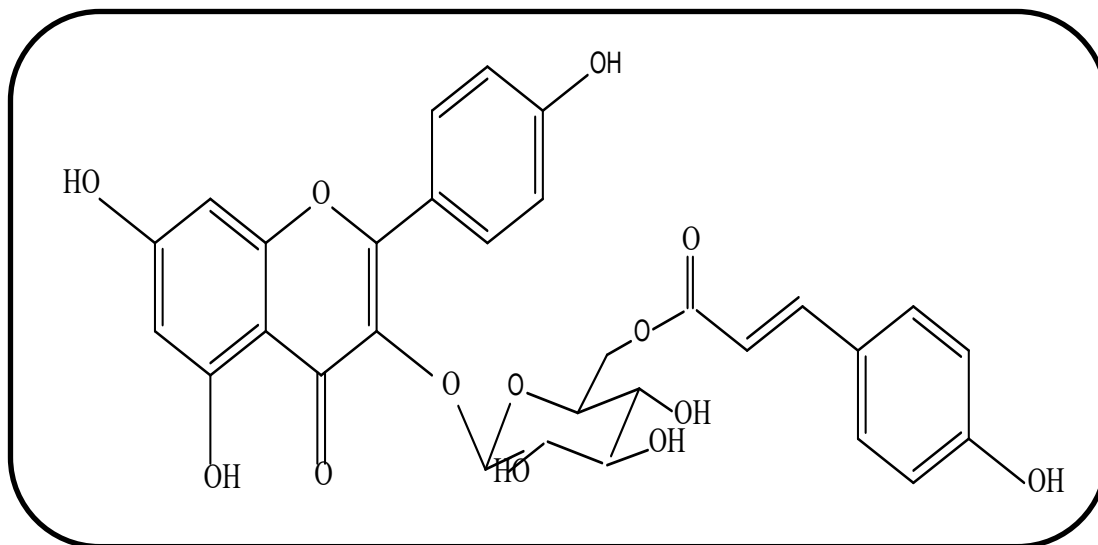


Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III-3.

Tableau III-3: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR1 dans CD_3OD

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	157,1	/	/
3	134,1	/	/
4	177,9	/	/
5	161,6	/	/
6	98,8	6,19	s
7	165,7	/	/
8	93,6	6,39	s
9	157,9	/	/
10	104,7	/	/
1'	121,3	/	/
2'	131	8,06	d ($J = 8,5$)
3'	114,7	6,89	d ($J = 8,5$)
4'	160,1	/	/
5'	114,7	6,89	d ($J = 8,5$)
6'	131	8,06	d ($J = 8,5$)
1''	103,3	5,12	d ($J = 8$)
2''	74,4	3,40	dd ($J = 8,4-7,5$)
3''	75,8	3,44	m
4''	70,9	3,25	t ($J = 8,4$)
5''	76,7	3,36	m
6''	67,2	C ₆ ''a : 3,83 C ₆ ''b : 3,52	d ($J = 11,5$) dd ($J = 11,5 -5,0$)
1'''	101,0	4,52	d ($J = 1,7$)
2'''	70,0	3,60	m
3'''	70,7	3,46	dd ($J = 9,3-1,5$)
4'''	72,5	3,27	t ($J = 9,3$)
5'''	68,3	3,38	m
6'''	16,3	1,12	d ($J = 6$)

III-1-3-2- Elucidation structurale du produit CR2



kaempferol-3-O-[6''-O-(E)-p-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside

Le composé **CR2** est isolé sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV (254 et 366 nm) et donne une coloration jaune après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III-11) du composé **CR2** présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 617 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 594 uma, correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{13}$.

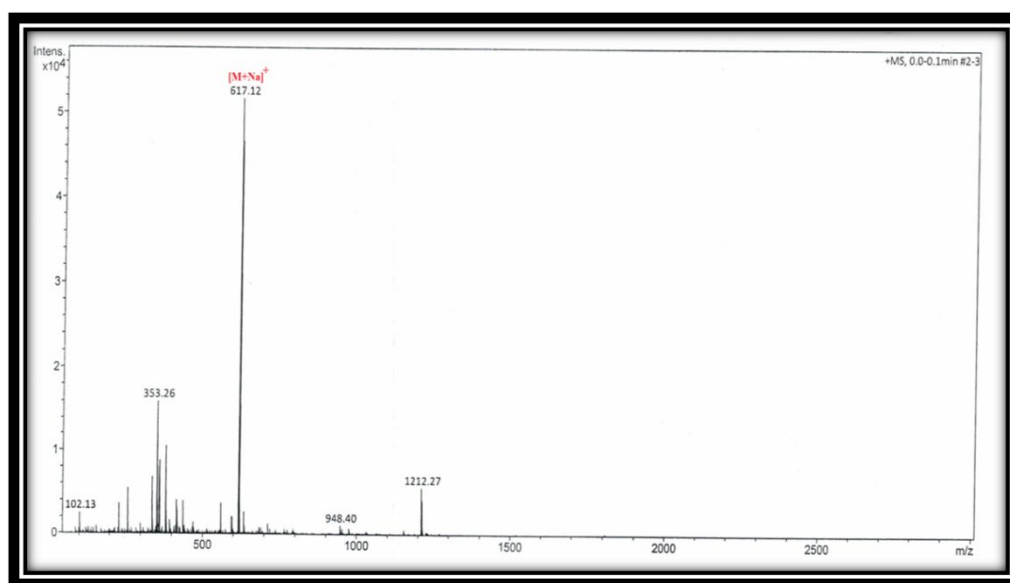


Figure III-11: Spectre de masse ESI-MS du produit CR2

Le spectre RMN ^1H (Figure III-12) du composé CR2 confirme sa nature flavonol en présentant une similitude structurale avec celui du produit CR1. Il montre facilement les signaux caractéristiques du noyau kaempferol glycosylé que l'on peut identifier comme suit:

- Deux doublets à δ_{H} 6,81 et δ_{H} 8,0 ($J = 8,5\text{Hz}$) chacun d'intégration 2H sont attribués respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B *para* oxygéné.
- Deux doublets résonant à 6,13 ppm et 6,30 ppm, d'intégration 1H ($J = 2,0\text{ Hz}$), caractéristique aux deux protons aromatiques H-6 et H -8 respectivement du noyau A *méta* substitué.
- Des signaux se situant entre (3,3 à 4,4 ppm) caractéristiques aux protons osidiques
- Un doublet à δ_{H} 5,25 ($J = 7,5\text{ Hz}$) attribuable au proton anomérique H1". La constante de couplage révèle qu'il est de configuration β .

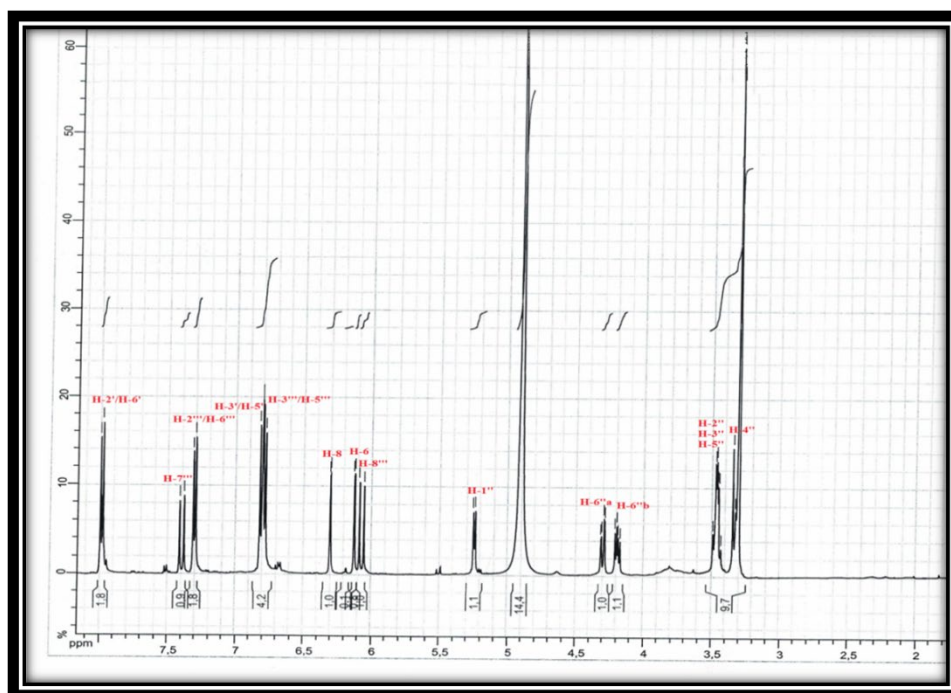


Figure III-12: Spectre RMN ^1H du produit CR2

On observe également sur ce spectre:

- Quatre protons aromatique détectés à 7,30 ppm (H-2''' et H-6''', $J = 8,6\text{ Hz}$) et à 6,79 ppm (H-3''' et H-5''', $J = 8,6\text{ Hz}$) appartenant à un noyau *para*-substitué.
- Deux protons oléfiniques à δ_{H} 6,07 (H-8''', $J = 16\text{ Hz}$) et δ_{H} 7,40 (H-7''', $J = 16\text{ Hz}$). La valeur de constante de couplage traduit une géométrie *trans* de la double liaison.

Ces données ainsi l'observation d'un carbonyle à 167,4 ppm sur le spectre RMN ^{13}C (Figure III-14) permettent de suggérer la présence d'un groupement *trans-p-coumaroyle* (Figure III-13).

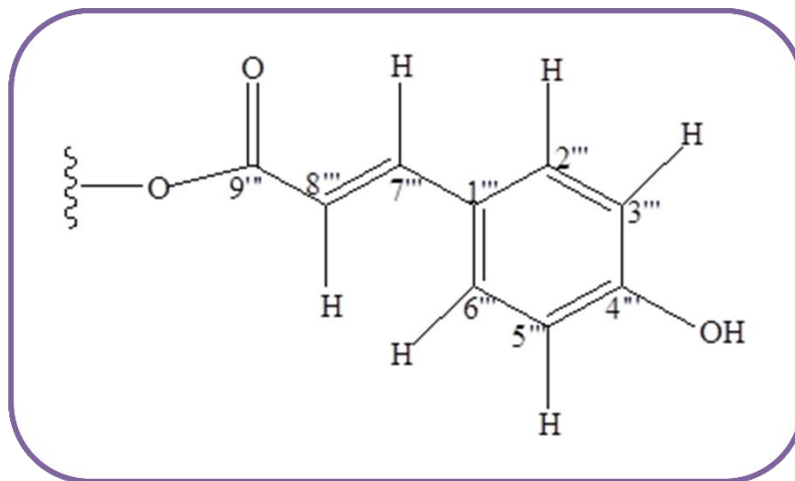


Figure III-13: Structure du Groupement *trans-p-coumaroyle*

Le spectre RMN ^{13}C (Figures III-14) montre 26 signaux correspondant à 30 atomes de carbone, en effet leur répartition est la suivante :

- Deux groupements carbonyle à δ_{C} 178,1 et 167,4 correspondent à C-4 et C-9'''.
- Sept carbones aromatiques oxygénés qui résonnent entre 133-165 ppm.
- Trois carbones aromatiques quaternaires C-1', C-10 et C-1''' résonant à δ_{C} 121,3 et 104,1 et 125,7.
- Dix carbones aromatiques méthines entre 93 et 131 ppm.
- Six carbones d'unité osidique sortant entre 62 et 103 ppm.
- Deux carbones éthyléniques qui résonnent à 113,3 et 145,2 ppm.

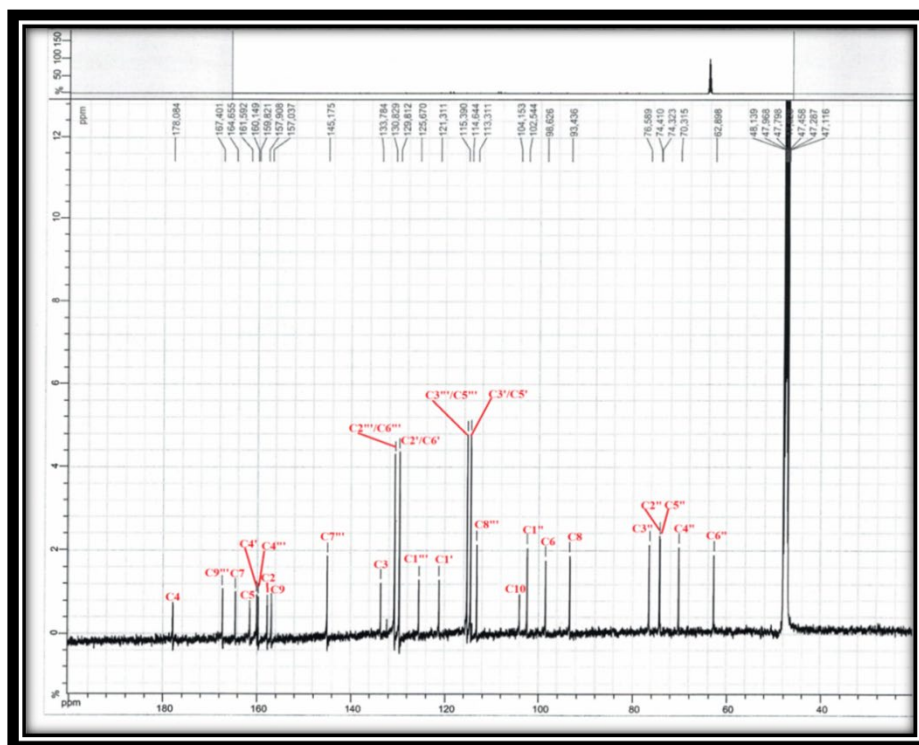


Figure III-14: Spectre RMN ^{13}C du produit CR2

L'analyse combinée des spectres COSY et HSQC (Figures III-15 et III-16) a permis d'identifier les protons osidiques. Partant du proton anomérique H-1" (5,25, d, $J = 7,5$ Hz),

Les autres protons H-2", H-3", H-4", H-5", H-6a", H-6b", sont attribués aux signaux à : (3,46, t, $J = 7,5$ Hz) ; (3,47, m) ; (3,34, t, $J = 6,9$ Hz) ; (3,47, m) ; (4,31, dd, $J = 12 ; 2,5$ Hz) ; (4,19, dd, $J = 12 ; 7$ Hz) respectivement. Les grandes taches de corrélation observées entre ces protons osidiques confirment bien la présence du glucose.

Les carbones correspondants aux protons de ce glucose C-2", C-3", C-4", C-5", C6"a, C-6"b résonnent à δ_{C} 74,4 ; 76,6 ; 70,3 ; 74,3 ; 62,9 ppm respectivement.

Le spectre COSY H-H révèle également des corrélations entre :

-Les protons H-8/H-6 du cycle A.

-Les protons H-2'/H-3' ; H-6'/H-5' du cycle B.

-Les protons H-2'''/H-3''', H-6'''/H-5''' et H7'''/H-8''' du noyau coumaroylé. La grande tache de corrélation entre ces deux derniers protons oléfiniques, confirme bien la géométrie *trans* de la double liaison.

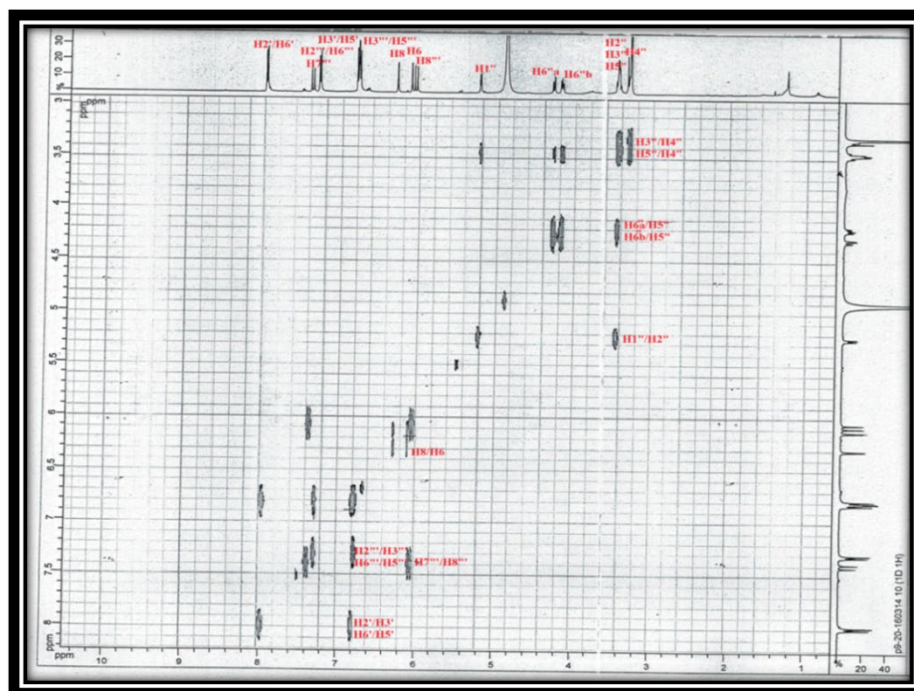


Figure III-15: Spectre COSY H-H du produit CR2

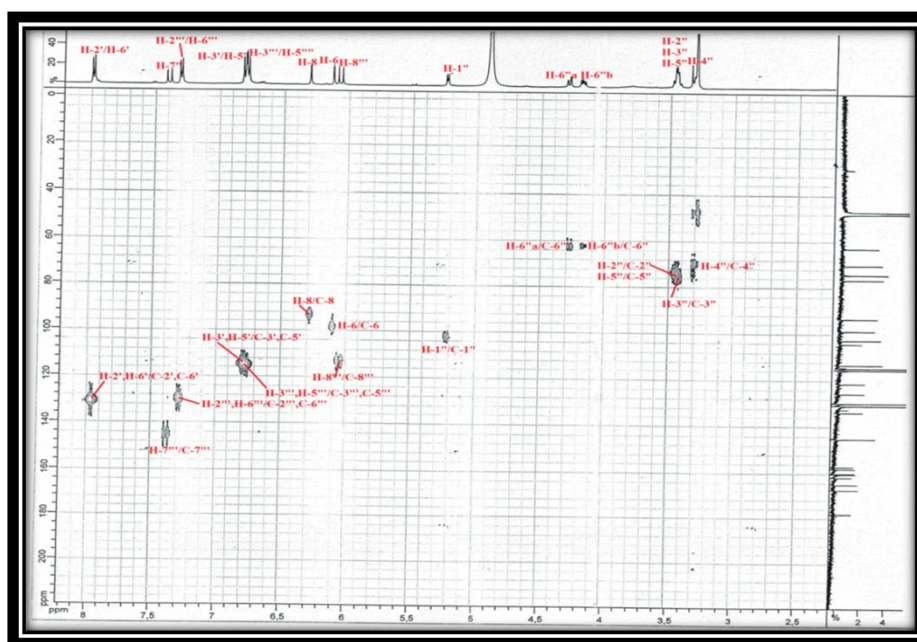


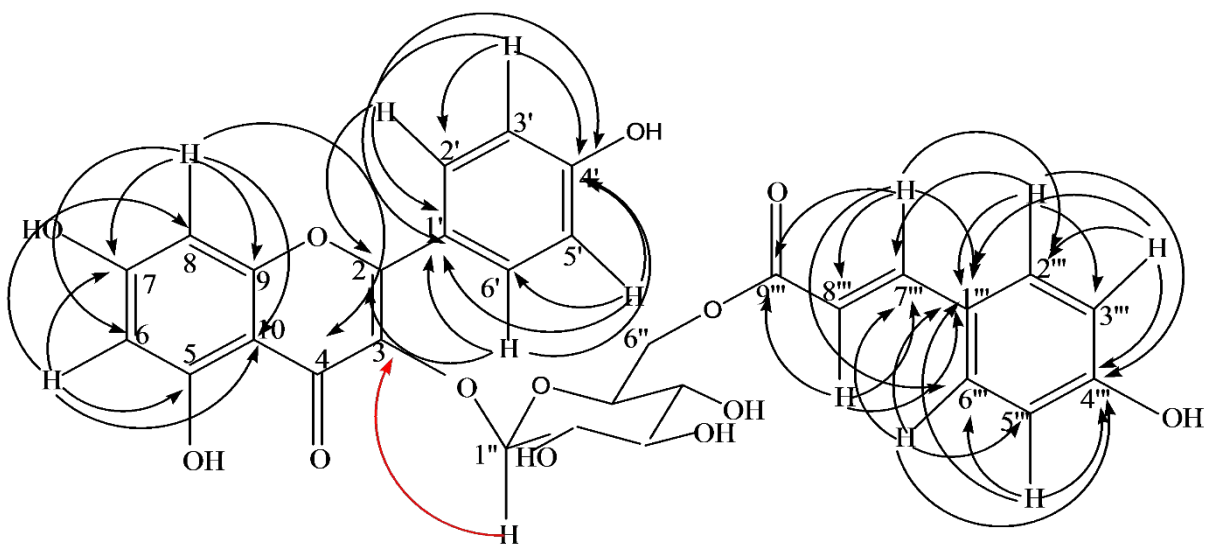
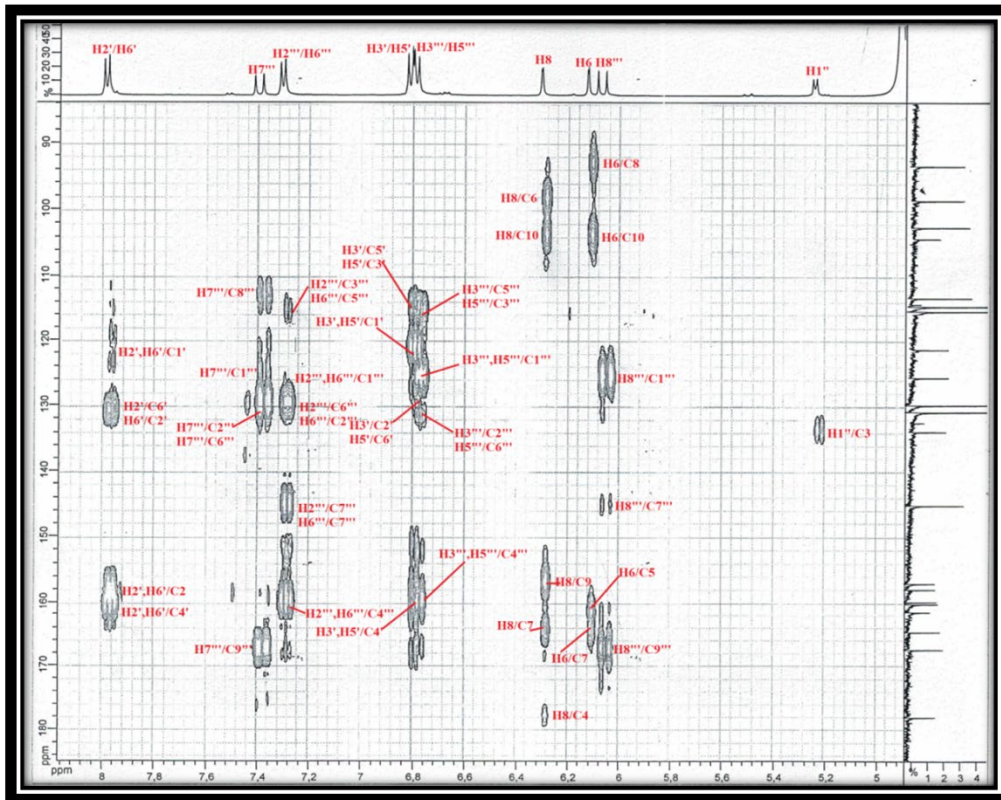
Figure III-16: Spectre HSQC du produit CR2

Le spectre HMBC du composé CR2 (Figure III-17) exhibe des corrélations entre :

-Le proton anomérique H-1'' et le carbone C-3 de la génine résonant à 133,8 ppm, ce qui indique une glycosylation en C-3.

-Les deux protons olefiniques H-7''' et H-8''' et le carbone C-9'' à 167,4 ppm. Ce dernier montre également une autre tâche de corrélation avec les protons osidiques H-6''a et H6''b.

Ceci permis de suggérer une acylation au niveau de C-6'' du glucose par le groupement coumaroyle.



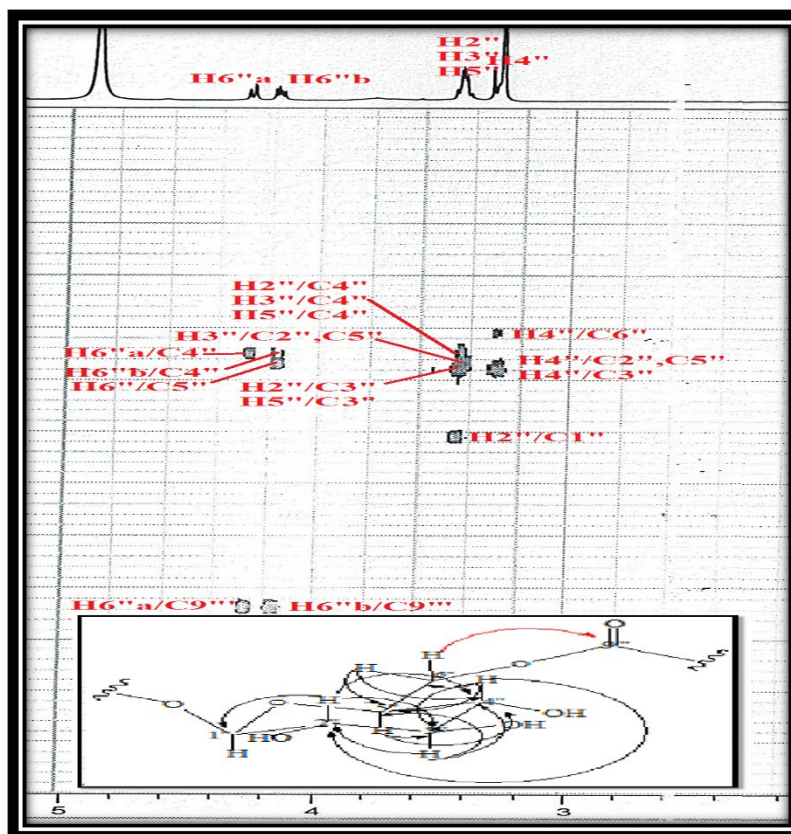


Figure III-17: Spectre HMBC du produit CR2

Toutes ces données spectrales, plus la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -57^0$ ($C = 0,1$, MeOH) et la comparaison avec la littérature, permettent d'identifier le composé CR2 comme étant le kaempferol-3-O-[6''-O-(E)-p-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside, connue sous le nom tiliroside. Ce composé est détecté pour la première fois dans le genre *Centaurea*. Il a été isolé antérieurement des espèces *Helichrysum italicum* (Asteraceae) [6], *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae) [7], *Lychnophora passerina* (Asteraceae) [8]. Le tiliroside est principalement connu pour ses propriétés biologiques anti-inflammatoire et anti-oxydante [6].

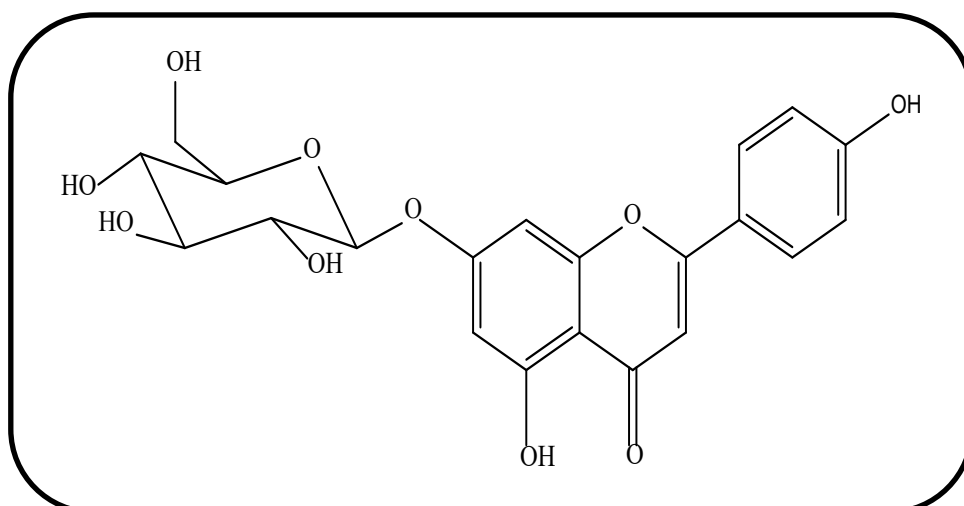
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CR2 sont réunis dans le tableau III-4.

Tableau III-4: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR2 dans CD_3OD

position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	157,9	/	/
3	133,8	/	/

4	178,1	/	/
5	161,6	/	/
6	98,6	6,13	d ($J = 2$)
7	164,6	/	/
8	93,4	6,30	d ($J = 2$)
9	157,0	/	/
10	104,1	/	/
1'	121,3	/	/
2'	129,8	8	d ($J = 8,5$)
3'	114,6	6,81	d ($J = 8,5$)
4'	160,1	/	/
5'	114,6	6,81	d ($J = 8,5$)
6'	129,8	8	d ($J = 8,5$)
1''	102,5	5,25	d ($J = 7,5$)
2''	74,4	3,46	t ($J = 7,5$)
3''	76,6	3,47	m
4''	70,3	3,34	t ($J = 6,9$)
5''	74,3	3,47	m
6''	62,9	H-6'' _a 4,31 H-6'' _b 4,19	dd ($J = 12-2,5$) dd ($J = 12-7$)
1'''	125,7	/	/
2'''	130,8	7,30	d ($J = 8,5$)
3'''	115,4	6,79	d ($J = 8,5$)
4'''	159,8	/	/
5'''	115,4	6,79	d ($J = 8,5$)
6'''	130,8	7,30	d ($J = 8,5$)
7'''	145,2	7,40	d ($J = 16$)
8'''	113,3	6,07	d ($J = 16$)
9'''	167,4	/	/

III-1-3-3- Elucidation structurale du produit CR3



Apigénine-7-O-β-D- glucopyranoside

Le composé **CR3** se présente sous forme de Cristaux jaunes visible à la lumière UV à 254 et 366 nm. Il se colore en jaune après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage ou par les vapeurs d'ammoniac. Ceci suggère une structure flavonoïdique pour ce composé.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif (Figure III-18) révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 455$ $[M+Na]^+$, déterminant une masse moléculaire de 432 uma et une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{10}$.

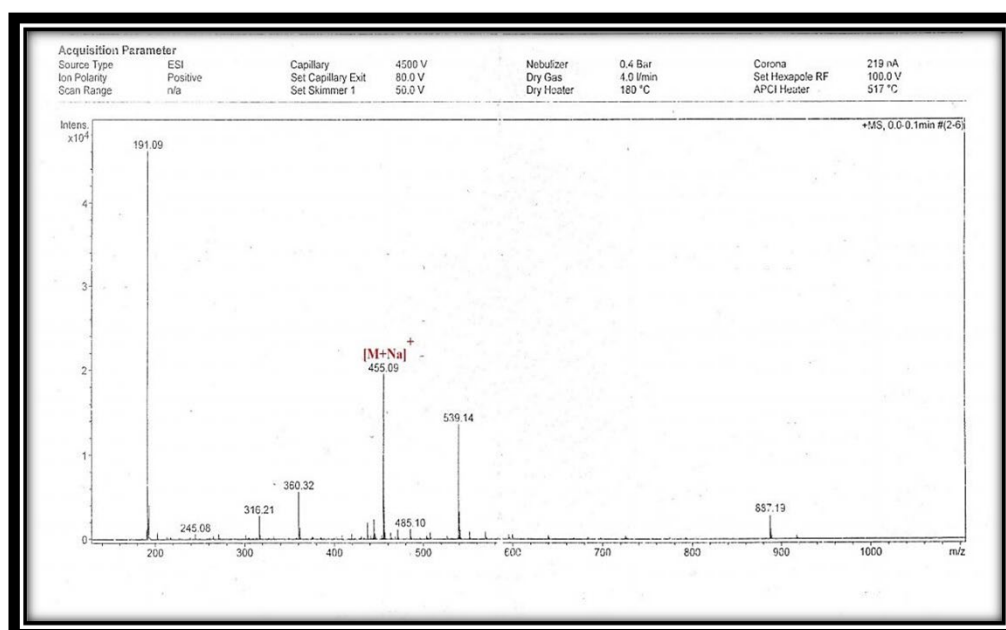


Figure III-18: Spectre de masse ESI-MS du produit CR3

Le spectre UV du composé CR3 enregistré dans le MeOH (tableau III-5) montre:

- Deux bande d'absorption : une bande I à 320 nm et une bande II à 253 nm, orientent vers une structure flavone.
- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome +47 nm de la bande I, indiquant l'existence d'un groupement (-OH) en position 4'.
- L'addition de AlCl₃+HCl induit un déplacement bathochrome +52 nm de la bande I en comparaison avec à celui enregistré dans le méthanol, ce qui révèle la présence d'un groupement (-OH) libre en position 5.
- L'absence du déplacement bathochromique de la bande II après l'ajout de NaOAc en comparaison au spectre enregistré dans MeOH indique l'absence d'un OH libre en position 7.
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande I après l'addition de NaOAc+H₃BO₃ traduit l'absence d'un de système orthodi-OH sur le noyau B.

Tableau III-5: Données du spectre UV du produit CR3

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	320	253
+NaOAc	320	253
+NaOAc+H₃BO₃	320	253
+AlCl₃+HCl	372	271
+AlCl₃	375	269
+NaOH	367	255

Le spectre de RMN ¹H enregistré dans le CD₃OD (Figure III-19) du composé CR3 montre la présence des signaux caractéristiques d'une flavone de type apéginine glycosylée. En effet on observe :

- Deux doublets ($J = 8,7$ Hz), intégrant chacun pour deux protons à 6,93 (H-3' et H-5') et 7,87 ppm (H-2' et H-6').
- Un singulet à 6,65 ppm correspond au proton H-3.
- Un signal sous forme d'un doublet à δ_H 6,47 ($J = 2,4$ Hz) attribuable au proton H-6.
- Un signal sortant sous forme de doublet à δ_H 6,79 ($J = 2,4$ Hz), correspond au proton H-8.

- Un doublet à 5,08 ppm caractéristique d'un proton anomérique. La constante de couplage ($J = 7,2$ Hz) indique la présence d'un sucre de configuration β .
- Deux signaux sous forme de massif à δ_H 3,48 et 3,50, correspondent aux protons H-2'' et H3'' respectivement.
- Deux signaux résonnent à δ_H 3,40 ($J = 8,8$ Hz) et 3,58 ($J = 8,4$ Hz) sous forme de triplet attribuables aux protons H-4'' et H- 5'' respectivement.
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet sortant à δ_H 3,93 ($J = 12,2$ Hz) correspond au proton H-6''a.
- Un double de doublet sortant à δ_H 3,71 ($J = 12,2 ; 7,1$ Hz) attribué au proton H-6''b.

Les grandes valeurs des constantes de couplage des protons osidiques, en plus le doublet du proton anomérique H-1'' à 5,08 ppm ($J = 7,2$ Hz) prouvent la présence d'un glucose de configuration β .

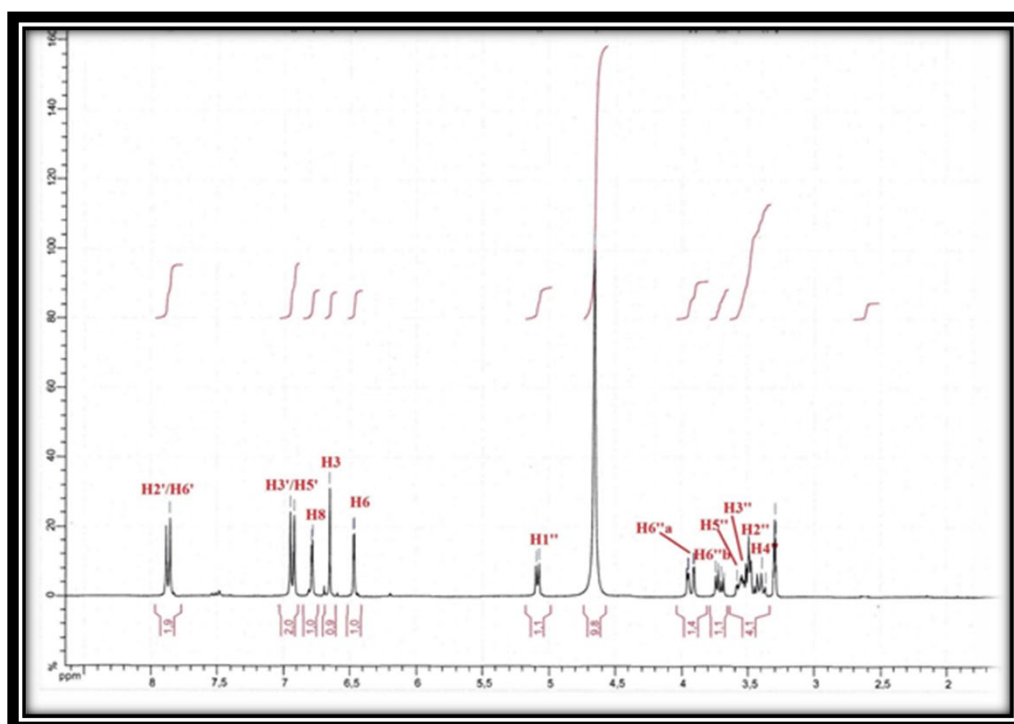


Figure III-19: Spectre RMN ^1H du produit CR3

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-20) montre 21 signaux de carbones repartis en 8 carbones quaternaires et 13 méthines.

Ce spectre confirme la présence du groupement β -D-glucosyle, qui indique un signal du carbone anomérique à δ_C 101,7, un signal d'un carbone méthylène oxygéné (C-6'') à δ_C 62,5 et des signaux de carbones oxyméthines sortant à δ_C 74,9 (C-2''), 77,9 (C-3''), 71,4 (C-4'') et 78,6 (C-5'').

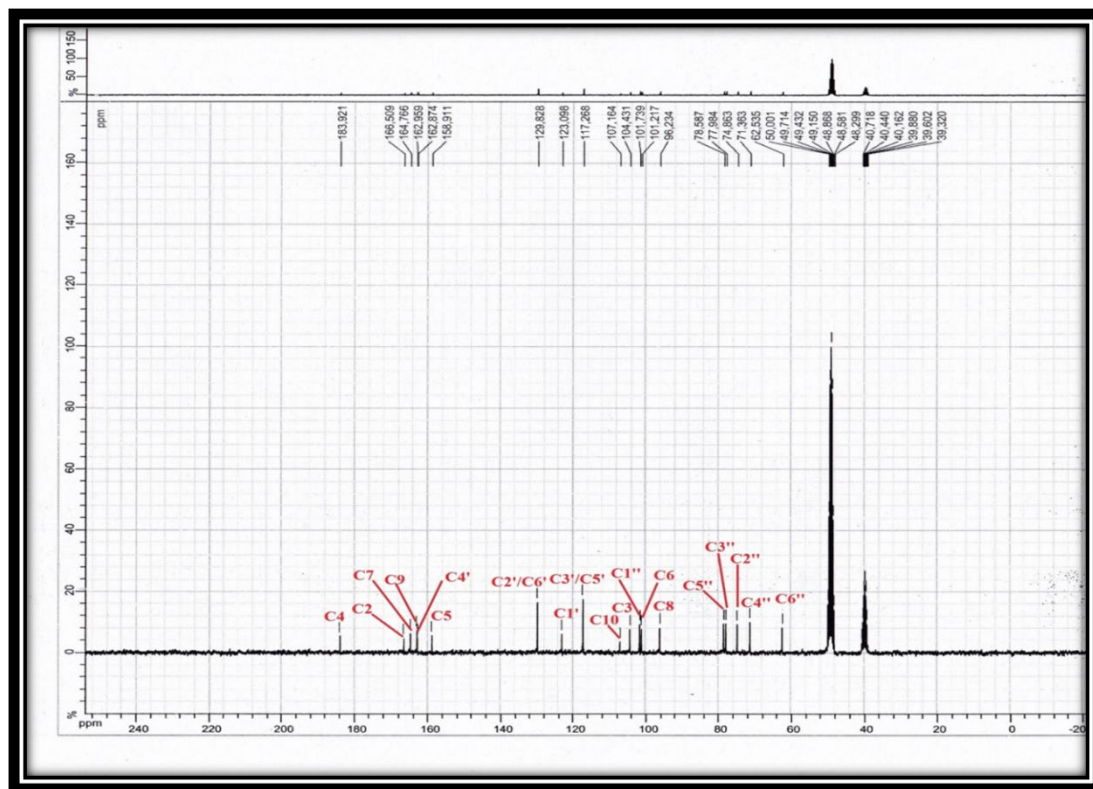
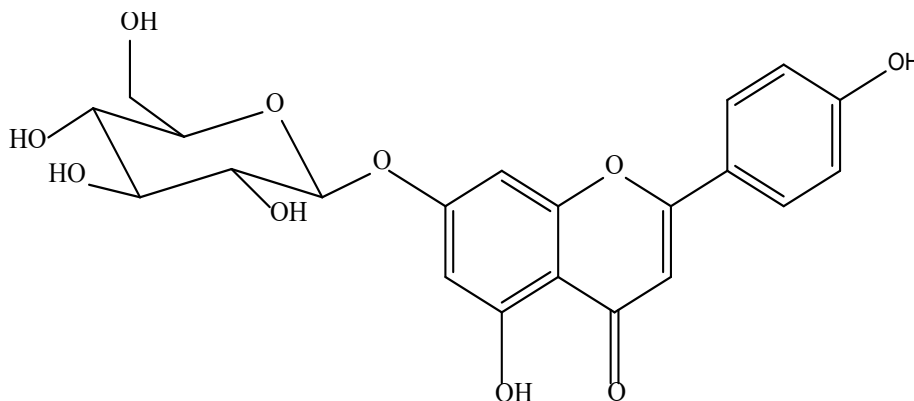


Figure III-20: Spectre RMN ^{13}C du produit CR3

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature permettent de déterminer la structure du composé CR3 : Apigénine-7-O- β -D-glucopyranoside nommé aussi Apigetrine. Les études scientifiques ont été démontrées que l'apigetrine inhibe la neuroinflammation grâce à des propriétés anti-oxydantes et neuroprotectrices [9].



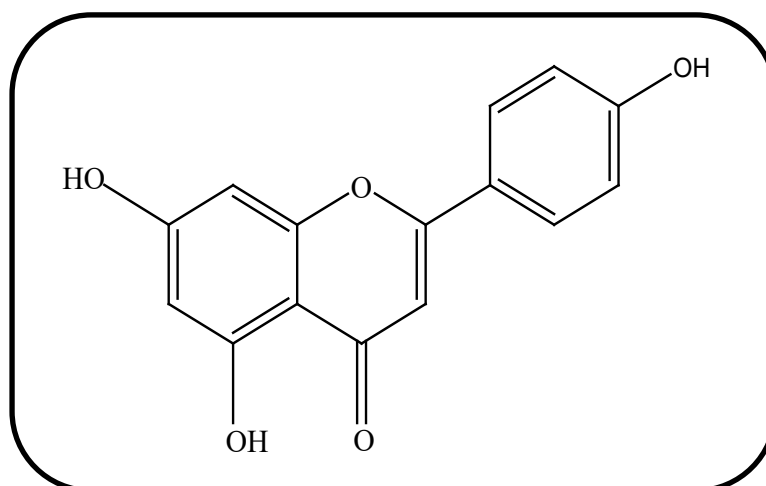
Ce composé a été isolé des espèces du genre *Centaurea*, telles que *C. alexanderina* [3], *C. horrida* [10], *C. scoparia* [11], *C. furfuracea* [12], *C. Sphaerocephala* [13], *C. urvillei* DC. subsp. *Urvillei* [14].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III-6.

Tableau III-6: Déplacements chimiques RMN ^1H (300 MHz) et ^{13}C (75 MHz) du produit CR3 dans CD_3OD

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	166,5	/	/
3	104,4	6,65	s
4	183,9	/	/
5	158,9	/	/
6	101,2	6,47	d ($J = 2,4$)
7	164,8	/	/
8	96,2	6,79	d ($J = 2,4$)
9	162,9	/	/
10	107,2	/	/
1'	123,1	/	/
2'	129,8	7,87	d ($J = 8,7$)
3'	117,3	6,93	d ($J = 8,7$)
4'	162,8	/	/
5'	117,3	6,93	d ($J = 8,7$)
6'	129,8	7,87	d ($J = 8,7$)
1''	101,7	5,08	d ($J = 7,2$)
2''	74,9	3,48	m
3''	77,9	3,50	m
4''	71,4	3,40	t ($J = 8,8$)
5''	78,6	3,58	t ($J = 8,4$)
6''	62,5	$\text{C}_6''\text{a} : 3,93$ $\text{C}_6''\text{b} : 3,71$	d ($J = 12,2$) dd ($J = 12,2-7,1$)

III-1-3-4- Elucidation structurale du produit CR4

**5, 7,4'- trihydroxyflavone**

Le composé **CR4** est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, visible sur CCM à la lumière UV, et montre une coloration jaune après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre RMN ^1H du composé CR4 est presque similaire à celui du composé CR3, La différence principale entre CR4 et CR3 réside dans l'absence du glucose (Figure III-21).

En effet, on observe les protons caractéristiques du noyau apigénine :

- Un signal singulet sortant à δ_{H} 6,60 d'intégration 1H attribué au proton H-3.
- Deux doublets d'intégration 1H pour chacun résonant à δ_{H} 6,21 et 6,46 attribués aux protons H-6 et H-8, respectivement du cycle A.
- Deux doublets d'intégration 2H pour chacun résonant à δ_{H} 6,94 et 7,85 attribués aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6', respectivement du cycle B.

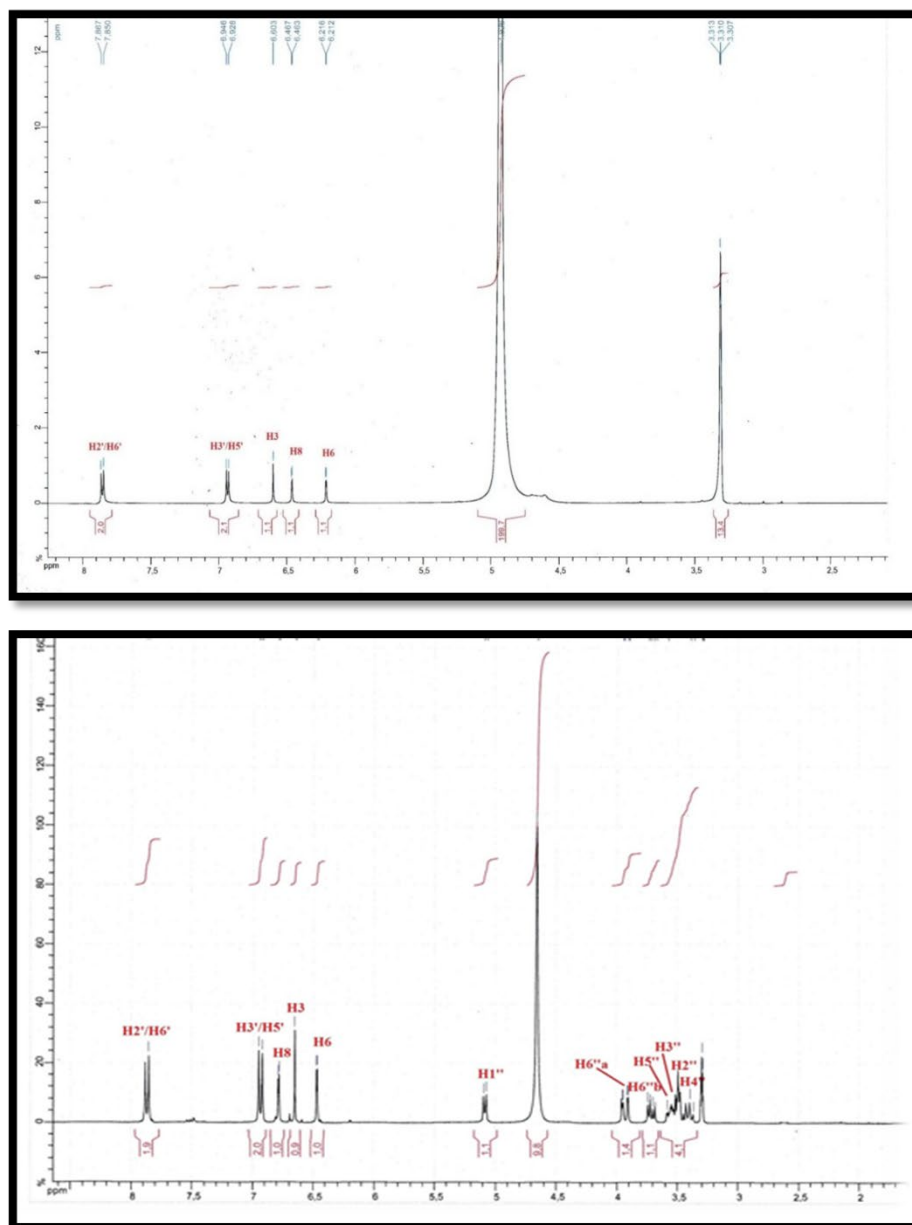


Figure III-21: Spectres RMN ^1H des produits CR3 (CD_3OD) et CR4 (CD_3OD)

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-22) révèle la présence de quinze atomes de carbone :

-Sept groupements CH sont repérés à δ_{C} 102,4 (C-3), 98,8 (C-6), 93,7 (C-8), 128,1 (C-2'/C-6') et 115,7 (C-3'/C-5').

-Huit carbones quaternaires sont repérés à δ_{C} 164,6 (C-2), 182,6 (C-4), 161,8 (C-5), 164,9 (C-7), 158 (C-9), 103,9 (C-10), 121,8 (C-1') et 161,3 (C-4').

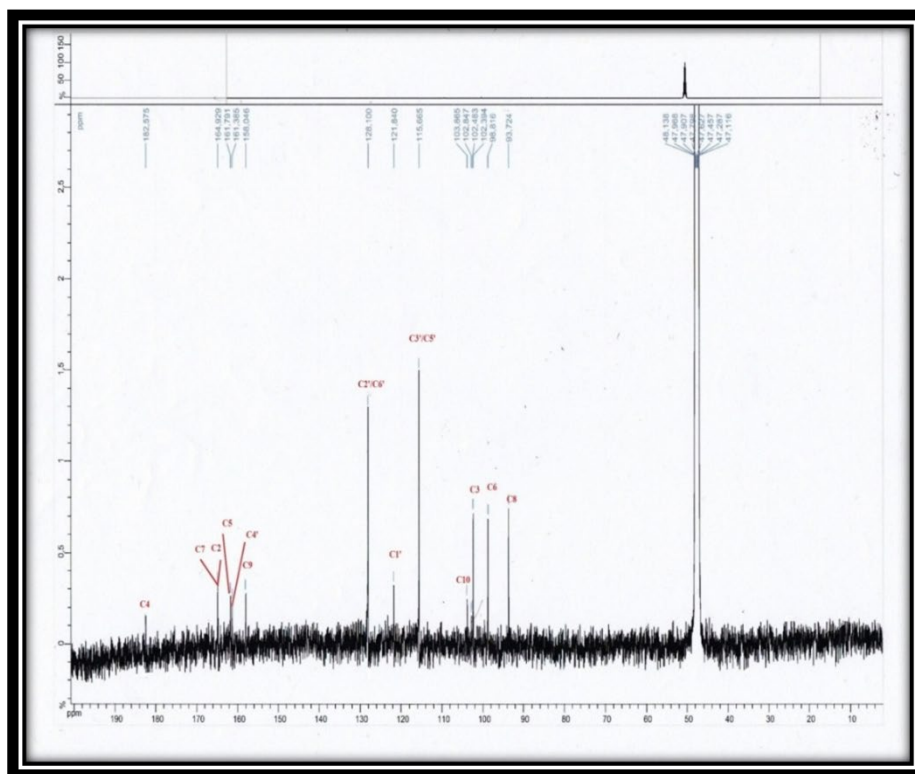


Figure III-22: Spectre RMN ^{13}C du produit CR4

L'ensemble de ces données spectrales, et la comparaison avec la littérature [15,16] permettent d'attribuer le composé CR4 la structure : (5,7,4' trihydroxyflavone) apigénine. Ce composé est connu principalement pour des activités anti-inflammatoire [17] et antivirale [18].

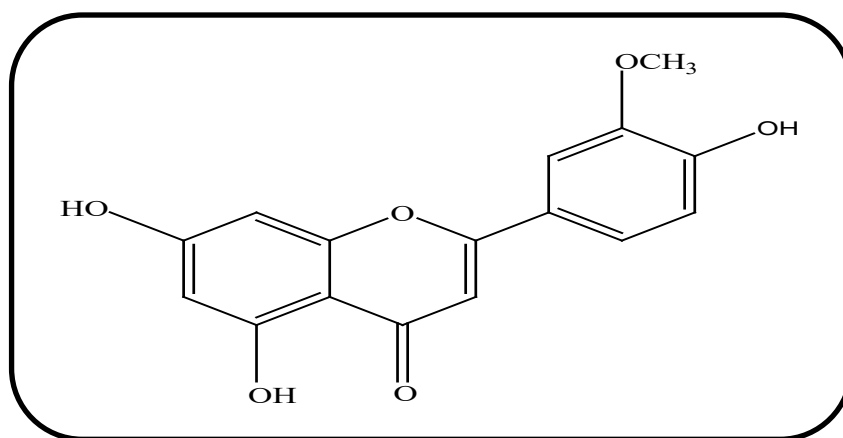
Ce métabolite secondaire est détecté dans plusieurs espèces du genre *Centaurea* telles que : *C. schischkinii* [19], *C. jacea* L [20], *C. aegyptiaca* L [21], *C. aspera* [22], *C. tougourensis* [23], *C. nicaeensis* [24].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CR4 sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III-7: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR4 dans CD_3OD

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	164,6	/	/
3	102,4	6,60	s
4	182,6	/	/
5	161,8	/	/
6	98,8	6,21	d ($J = 2$)
7	164,9	/	/
8	93,7	6,46	d ($J = 2$)
9	158,0	/	/
10	103,9	/	/
1'	121,8	/	/
2'	128,1	7,85	d ($J = 8,8$)
3'	115,7	6,94	d ($J = 8,8$)
4'	161,3	/	/
5'	115,6	6,94	d ($J = 8,8$)
6'	128,1	7,85	d ($J = 8,8$)

III-1-3-5-Elucidation structurale du produit CR5



5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyflavone

Le composé **CR5** a été isolé sous forme de poudre jaune. Il est visible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm), et présente une coloration jaune après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre UV de ce composé (Tableau III-8) enregistré dans le méthanol présente deux bandes d'absorption à 327 nm (Bande I) et 270 nm (Bande II), orientant vers une structure flavonoïde de type flavone. L'addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ provoque un déplacement bathochrome +50 nm de la bande I, ce qui suggère la présence d'un OH en position 5. Le déplacement bathochrome +9 nm de la bande II en présence de NaOAc comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH en position C-7. L'addition de NaOH conduit à un déplacement bathochrome +58 nm de la bande I, ce qui indique la présence d'un OH libre en position C-4'. L'absence du déplacement bathochromique de la bande I après l'ajout de $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ montre l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B.

Tableau III-8: Données du spectre UV du produit CR5

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	327	270
+AlCl₃+HCl	377	286
+NaOAc	355	279
+NaOH	385	281
+NaOAc+H₃BO₃	331	271
+AlCl₃	380	284

Le spectre RMN ^1H (Figure III-23) du produit CR5, enregistré dans DMSO indique la présence des protons caractéristiques d'un aglycone de type lutéoline méthoxylé à savoir :

- Un singulet d'intégration 3H résonnant à δ_{H} 3,59 attestant de la présence d'un méthoxyle.
- Un singulet à δ_{H} 6,60 d'intégration 1H attribué au proton à H-3, ce qui confirme la structure de type flavone.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H repéré à δ_{H} 6,49 avec une constante de couplage $J = 2$ Hz attribuable à H-8.
- Un autre signal sous forme de doublet et d'intégration 1H repéré à δ_{H} 6,19 avec la même constante de couplage ($J = 2$ Hz) accordé au H-6, confirmant l'hydroxylation du noyau A en positions 5 et 7.

- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 6,94 porte une valeur de constante de couplage ($J = 8,8$ Hz), suggérant le couplage ortho attribuable au proton H-5'.
- Un singulet sortant à δ_H 7,55, correspond au proton H-2'.
- Un doublet repéré à δ_H 7,56 ($J = 7,8$ Hz), attribuable au proton H-6'.

Les données des spectres UV ainsi que La multiplicité des protons H2', H6' et H5' confirme la disubstitution du noyau B en position 3' et 4'.

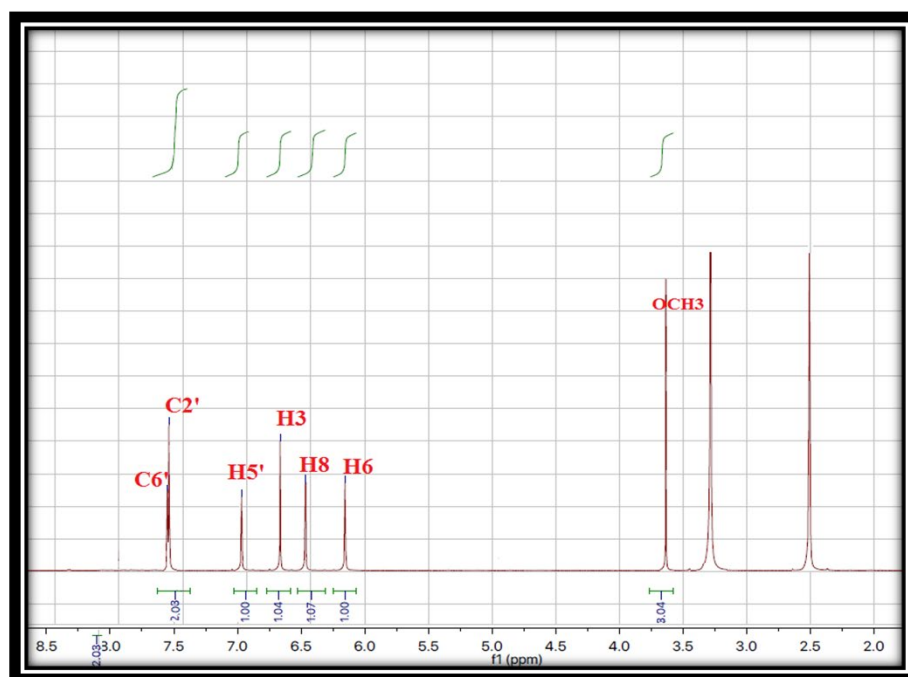


Figure III-23: Spectre RMN ¹H du produit CR5

L'analyse du spectre RMN ¹³C (Figures III-24) ainsi la comparaison avec les données de la littérature [25] ont permis de localiser tous les carbones du composé CR5. Ces carbones, au nombre de seize, sont repartis comme suit:

C-2 à δ_C 164,8 ; C-4 à δ_C 181,7 ; C-1' à δ_C 121,6 ; C-3' à δ_C 150,6 ; C-4' à δ_C 148,2 ; C-5 à δ_C 161,5 ; C-7 à δ_C 163,7 ; C-9 à δ_C 157,4 ; C-10 à δ_C 103,3 ; C-3 à δ_C 103,5 ; C-6 à δ_C 98,8 ; C8 à δ_C 94 ; C-2' à δ_C 110,1 ; C-6' à δ_C 120,4 ; C-5' à δ_C 115,6 ; OCH3 à δ_C 56.

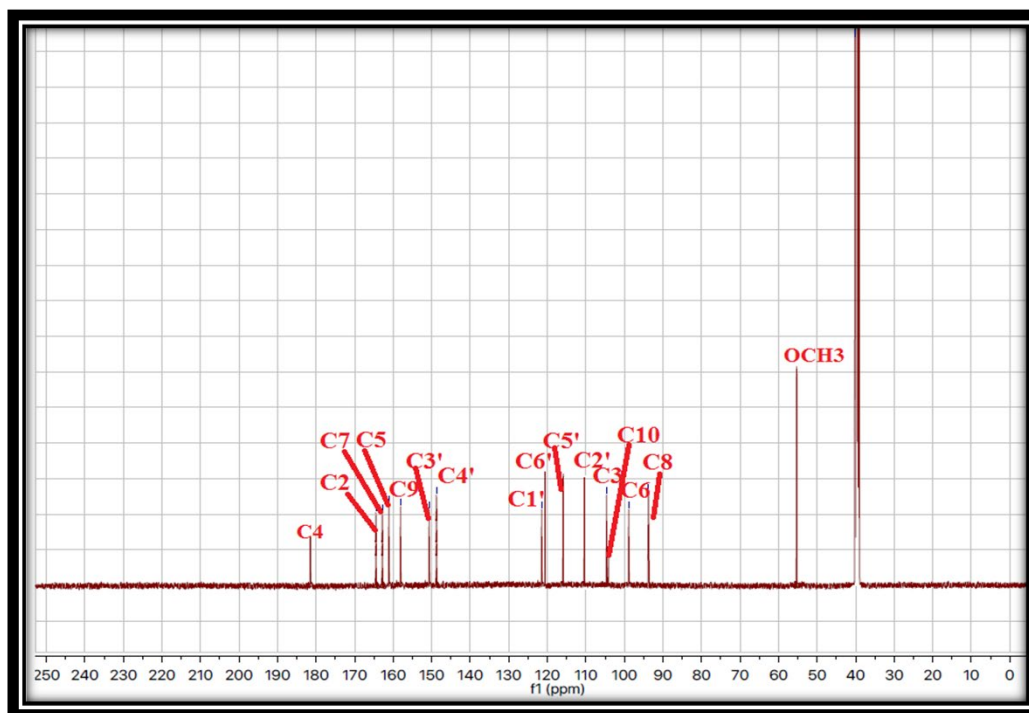
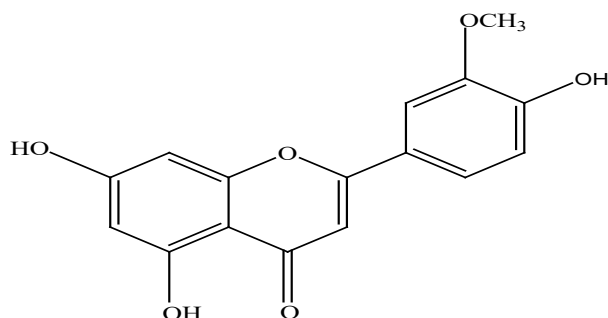


Figure III-24: Spectre RMN ^{13}C du produit CR5

Les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III-10) déterminés par l'analyse des spectres RMN ^1H (Figure III-23) et ^{13}C (Figure III-24), les données spectrales UV (Tableau III-9) et la comparaison avec les données de la littérature [25,26], attestent d'assigner le composé CR5 au 5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyflavone ou 3'-methoxyluteoline connu sous le nom Chrysoériol. Ce métabolite présente des activités biologiques intéressantes : anti-oxydante, anti-inflammatoire [27] et antimicrobienne [25].



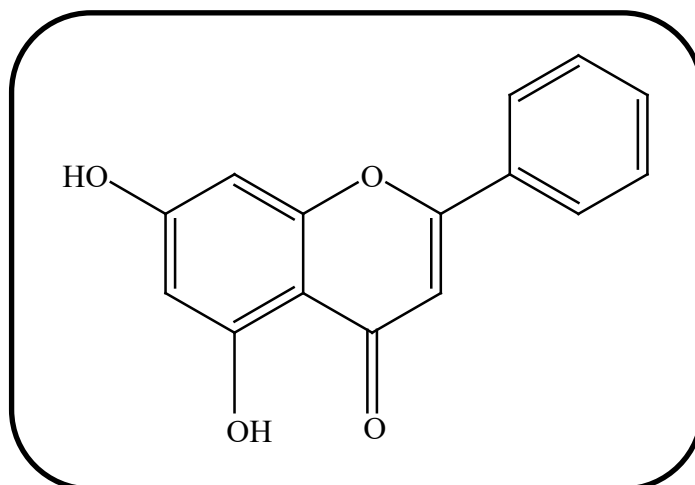
Ce produit a été antérieurement isolé des espèces du genre *Centaurea* telles que *C. sphaerocephala* [28], *C. africana* [29], *C. furfuracea* [12], *C. floccosa* [30].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CR5 sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III-9: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR5 dans DMSO

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	164,8	/	/
3	103,5	6,60	s
4	181,7	/	/
5	161,5	/	/
6	98,8	6,19	d ($J = 2$)
7	163,7	/	/
8	94	6,49	d ($J = 2$)
9	157,4	/	/
10	103,3	/	/
1'	121,6	/	/
2'	110,1	7,55	s
3'	150,6	/	/
4'	148,2	/	/
5'	115,6	6,94	d ($J = 8,8$)
6'	120,4	7,56	d ($J = 7,8$)
OCH₃	56	3,59	s

III-1-3-6-Elucidation structurale du produit CR6



5,7-dihydroxyflavone

Ce composé est obtenu sous forme de Cristaux légèrement jaunes visible en UV. Il se colore en jaune en présence des vapeurs d'ammoniaque. Ceci oriente vers une structure flavonoïque.

Le spectre RMN ^1H du composé **CR6** (Figure III-25) enregistré dans le méthanol deutéré permet de confirmer la structure flavonoïque. Il présente :

- Un doublet repéré à 6,22 ppm, ($J = 2$ Hz) attribuable au proton H-6.
- Un autre signal sous forme de doublet à 6,48 ppm ($J = 2$ Hz), d'intégration 1H attribuable au proton H-8.
- Un signal singulet sortant à 6,73 ppm caractéristique du proton oléfinique H-3 d'une flavone.
- Un doublet de doublet d'intégration 2H repéré à 7,99 ($J = 8,2-1,9$ Hz) attribuables aux protons H-2'/ H-6' du noyau B.
- Deux signaux massif chacun résonant à 7,58 et 7,56 ppm d'intégration 1H et 2H respectivement attribuables aux protons H-4' et H-3'/H-5'.

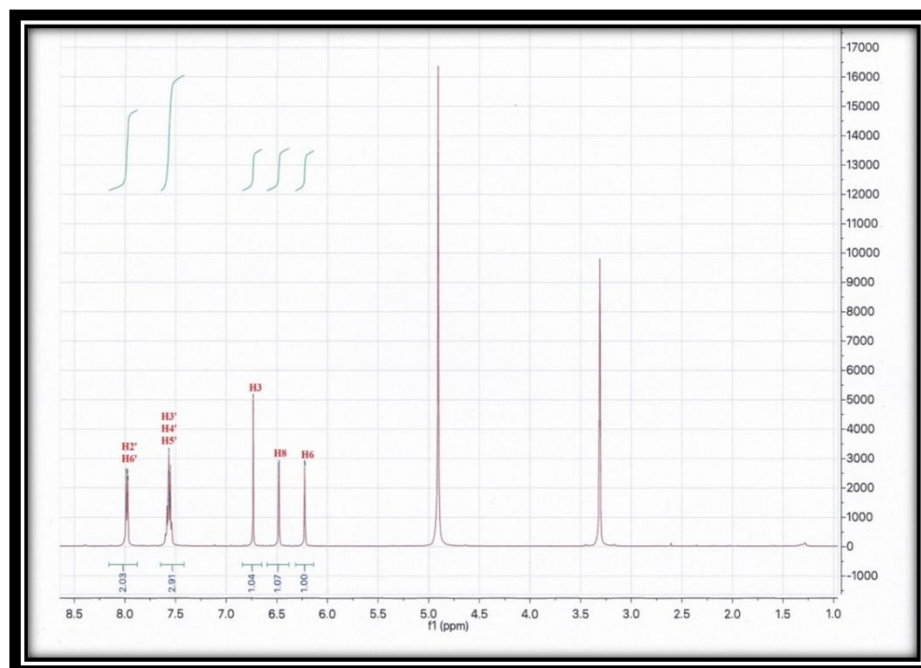


Figure III-25: Spectre RMN ^1H du produit CR6

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Figure III-26) et la comparaison avec les données de la littérature, permettent l'attribution des signaux des atomes de carbones : δ_{C} 164,2 (C-2), 182,5 (C-4), 161,9 (C-5), 164,9 (C-7), 158,1 (C-9), 104,1 (C-10) et 131,1 (C-1'), 104,6 (C-3), 98,9 (C-6), 93,7 (C-8), 131,6 (C-4'), 126 (C-2'/C-6') et 128,8 (C-3'/C-5').

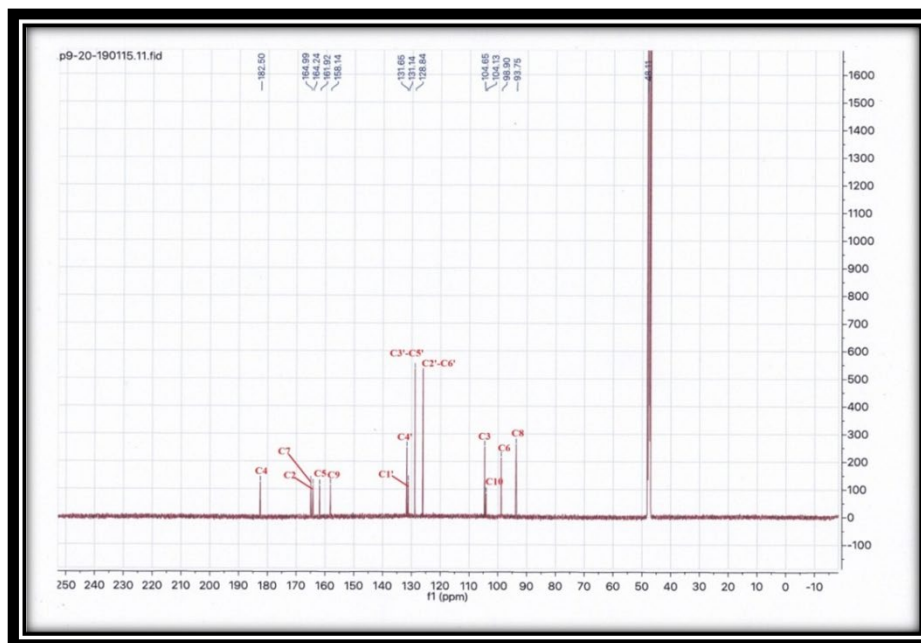


Figure III-26: Spectre RMN ^{13}C du produit CR6

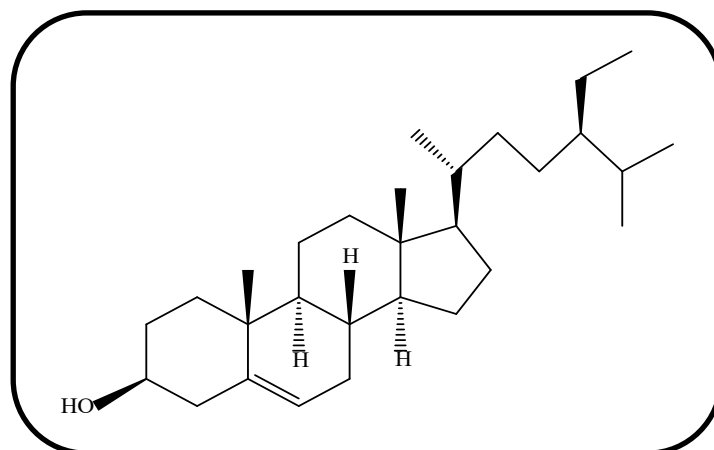
Les données spectroscopiques (Tableau III-11) et la comparaison avec les données bibliographiques permettent d'identifier le composé CR6 comme étant 5,7-dihydroxyflavone (Chrysin). Il est isolé antérieurement des espèces du genre *Centaurea* telles que : *C. ragusina* L [31], *C. omphalotricha* Coss [32], *C. pseudoscabiosa* [33], *C. scabiosa* [34]. Ce composé montre plusieurs activités biologiques anti-oxydante, antidiabétique, antibactérienne [35], anticancéreuse [36] et antitumorale [37].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III-10.

Tableau III-10: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR6 dans CD_3OD

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	164,2	/	/
3	104,6	6,73	s
4	182,5	/	/
5	161,9	/	/
6	98,9	6,22	d ($J = 2$)
7	164,9	/	/
8	93,7	6,48	d ($J = 2$)
9	158,1	/	/
10	104,1	/	/
1'	131,1	/	/
2'	126	7,99	dd ($J = 8,2-1,9$)
3'	128,8	7,56	m
4'	131,6	7,58	m
5'	128,8	7,56	m
6'	126	7,99	dd ($J = 8,2-1,9$)

III-1-3-7-Elucidation structurale du produit CR7



24-éthylcholest-5-èn-3-ol

Le composé **CR7** obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il est invisible à la lumière ultraviolette (254 et 366 nm). Il prend une coloration mauve après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse enregistré en mode positif (Figure III-27), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 437,6 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 414 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{29}H_{50}O$.

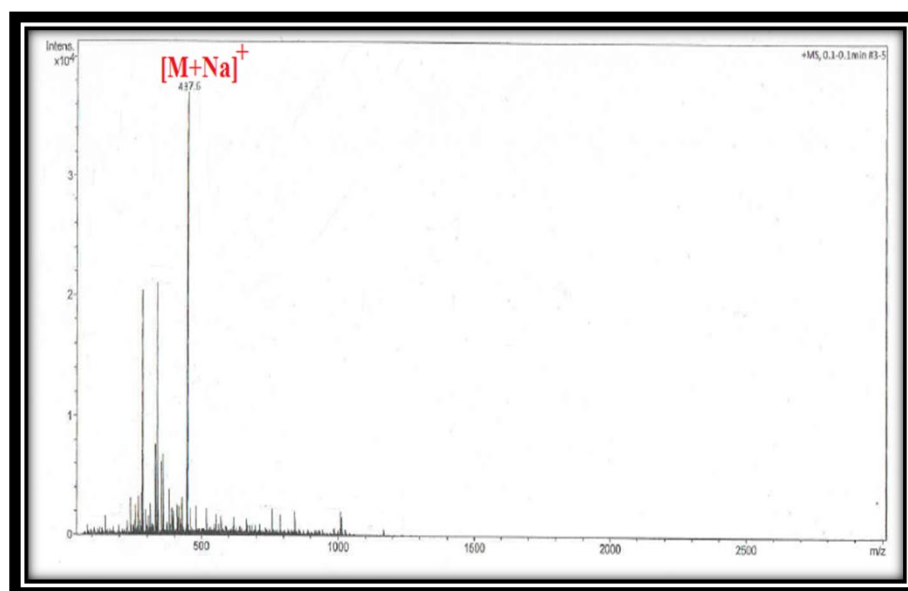


Figure III-27 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du produit CR7

Le spectre RMN¹H du composé CR7 (Figure III-28) présente des signaux caractéristiques d'un phytostérol de type β -sitosterol. En effet, on visualise :

- Six signaux attribuables aux protons des groupements méthyliques résonant à δ_H 0,67(CH-18), 1,01 (CH-19), 0,91 (CH-21), 0,82 (CH-26), 0,80 (CH-27), 0,85 (CH-29).
- Un signal sous forme de doublet de doublet résonant à δ_H 5,34 correspondant au proton oléfinique H-6.
- Un signal sous forme de multiplet à δ_H 3,52 correspondant au proton H-3.

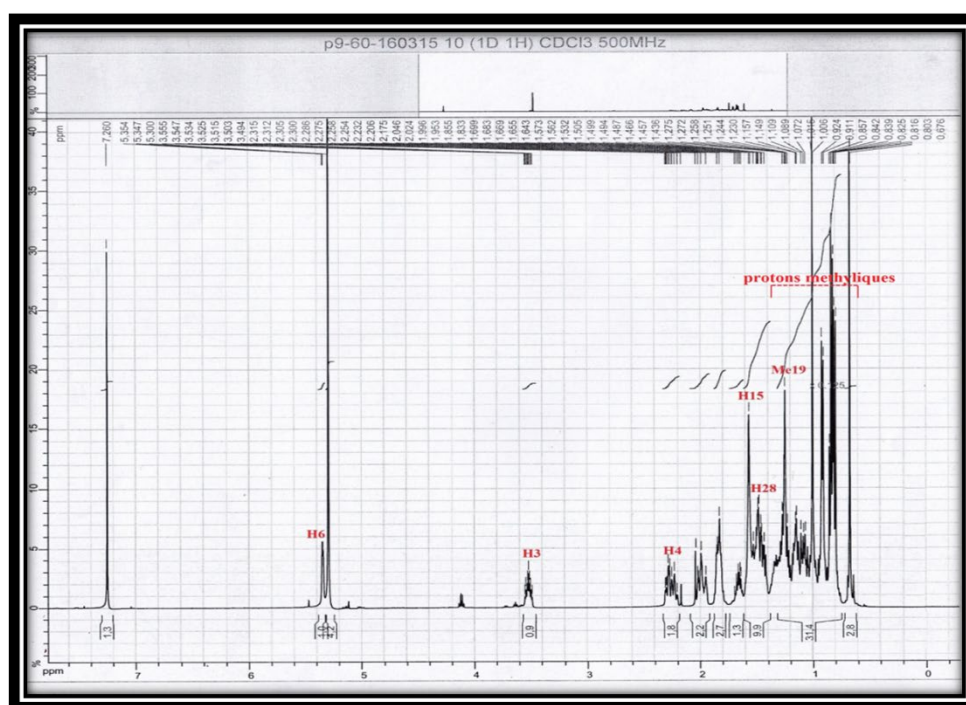


Figure III-28 : Spectre RMN¹H du produit CR7

Le spectre RMN ¹³C (Figure III-29) confirme la structure stéroïdique du composé CR7 par la présence de 28 signaux correspondant à 29 atomes de carbone : six groupements méthyles, six méthines, onze méthylènes, quatre carbones quaternaires et deux carbones éthyléniques dont un méthine C-6 sortant à δ_C 121,8 et un quaternaire C-5 sortant à δ_C 140,8.

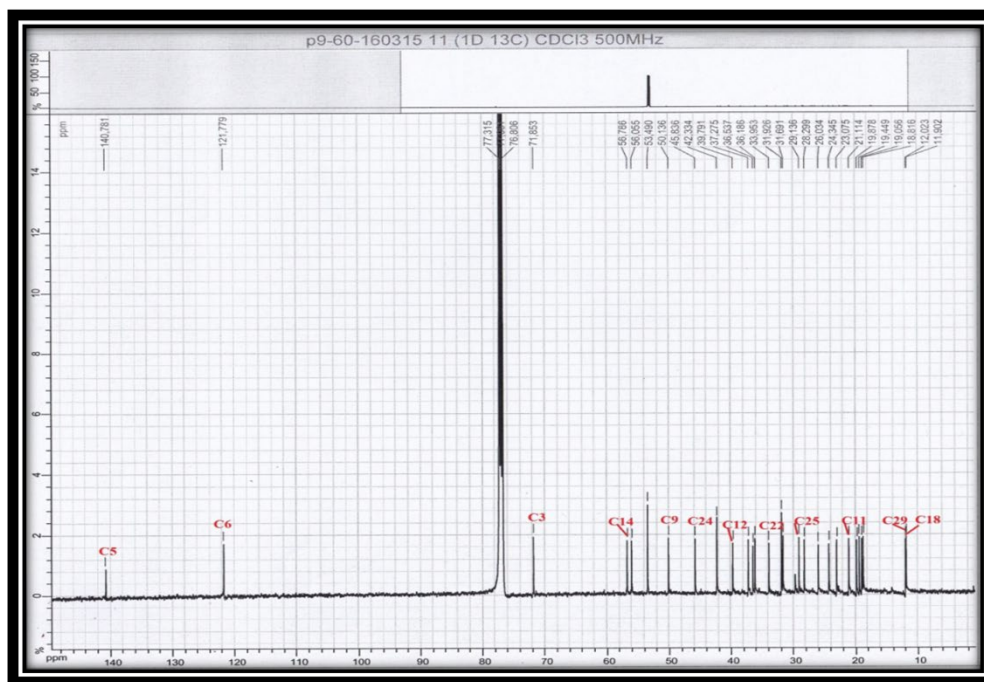


Figure III-29 : Spectre RMN ^{13}C du produit CR7

Le spectre COSY (Figure III-30) présente des corrélations confirmant la nature stéroïdique du composé CR7. En effet on observe les couplages entre :

- H1a (δ_{H} 1,85, m), H1b (δ_{H} 1,15, m) / H2a (δ_{H} 1,82, m), H2b (δ_{H} 1,52, m).
- H-3 (δ_{H} 3,52, m) / H4a (δ_{H} 2,33, ddd, $J = 13; 5; 2$ Hz), H4b (δ_{H} 2,30, tl, $J = 12,35$ Hz).
- H-6 (δ_{H} 5,34, dd, $J = 5,2 ; 2,3$ Hz) / H-7 (δ_{H} 1,50, m).
- H-20 (δ_{H} 1,37, m) / CH3-21 (δ_{H} 0,91, s).
- H-25 (δ_{H} 1,65, m) / CH3-27(δ_{H} 0,80, d, $J = 6,9$ Hz).
- H-28 (δ_{H} 1,25, m) / CH3-29 (δ_{H} 0,85, t, $J = 7,4$ Hz).

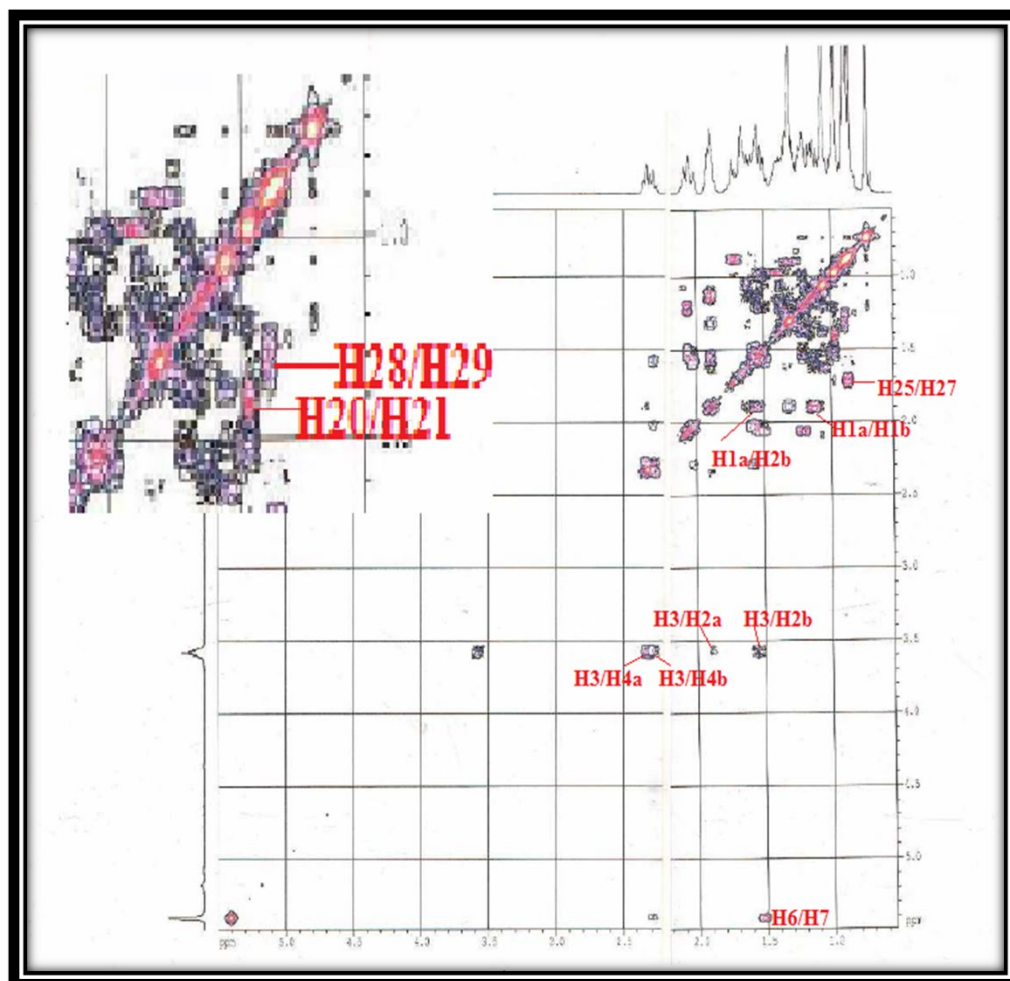


Figure III-30 : Spectre COSY du produit CR7

L'analyse des spectrale et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé CR7 au (24-éthylcholest-5-èn-3-ol) β -sitostérol. Connu dans le règne végétal, ce métabolite secondaire possède des propriétés pharmacologiques importantes anti-inflammatoire [38] et antimicrobienne [39].

Le β -sitostérol a été isolé précédemment de plusieurs espèces du genre *Centaurea* : *C. sadleriana* [40], *C. omphalotricha* [32], *C. africana* [29].

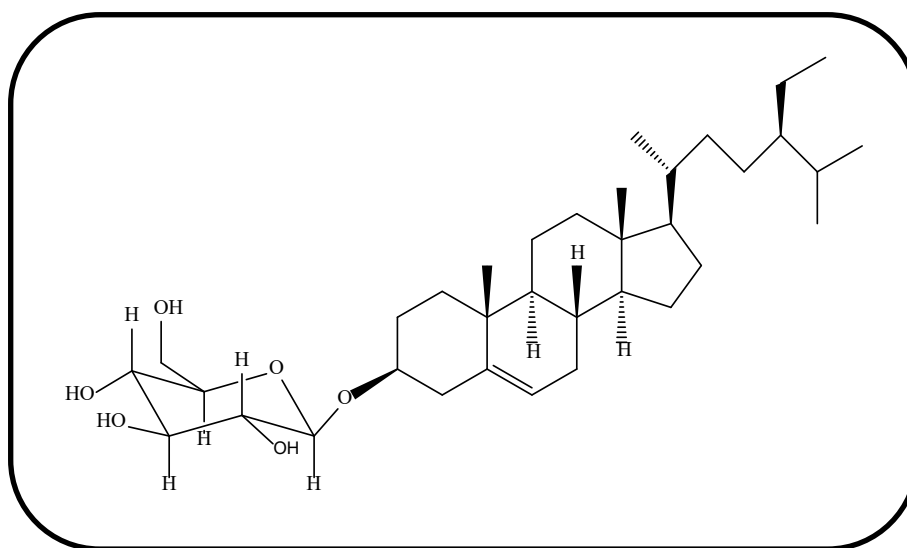
Le tableau (III-11) résume les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C du composé CR7.

Tableau III-11: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR7 dans CDCl_3 .

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
1	37,3	$\text{H}_{1\text{a}}= 1,85$	m
		$\text{H}_{1\text{b}}= 1,15$	m
2	31,7	$\text{H}_{2\text{a}}= 1,82$	m
		$\text{H}_{2\text{b}}= 1,52$	m
3	71,9	3,52	m
4	42,3	$\text{H}_{4\text{a}}= 2,33$	ddd ($J = 13-5-2$)
		$\text{H}_{4\text{b}}= 2,30$	tl ($J = 12,35$)
5	140,8	-	-
6	121,8	5,34	dd ($J = 5,2 - 2,3$)
7	31,9	1,50	m
8	31,9	1,99	m
9	50,1	0,91	m
10	36,5	-	-
11	21,1	$\text{H}_{11\text{a}}= 1,49$	m
		$\text{H}_{11\text{b}}= 1,46$	m
12	39,8	$\text{H}_{12\text{a}}= 2,04$	dt ($J = 12,8-3,6$)
		$\text{H}_{12\text{b}}= 1,15$	m
13	42,3	-	-
14	56,8	0,98	m
15	24,3	$\text{H}_{15\text{a}}= 1,57$	m
		$\text{H}_{15\text{b}}= 1,07$	m
16	28,3	$\text{H}_{16\text{a}}= 1,83$	m
		$\text{H}_{16\text{b}}= 1,25$	m
17	56,1	1,10	m
18	11,9	0,67	s
19	19,5	1,01	s
20	36,2	1,37	m
21	18,8	0,91	s
22	33,9	1,33	m

23	26,0	1,12	m
24	45,8	0,92	s
25	29,1	1,65	m
26	19,9	0,82	d ($J = 6,9$)
27	19,1	0,80	d ($J = 6,9$)
28	23,1	1,25	m
29	12,0	0,85	t ($J = 7,4$)

III-1-3-8- Elucidation structurale du produit CR8



β -sitostéryl 3-O- β -D-glucopyranoside

Le composé **CR8** obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol. Il est invisible à l'UV et se colore en mauve après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage. Son spectre de masse ESI enregistré en modes positif (Figure III-31) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 599,4 [M+Na]^+$, en accord avec une masse moléculaire de 576 uma et une formule brute en $C_{35}H_{60}O_6$.

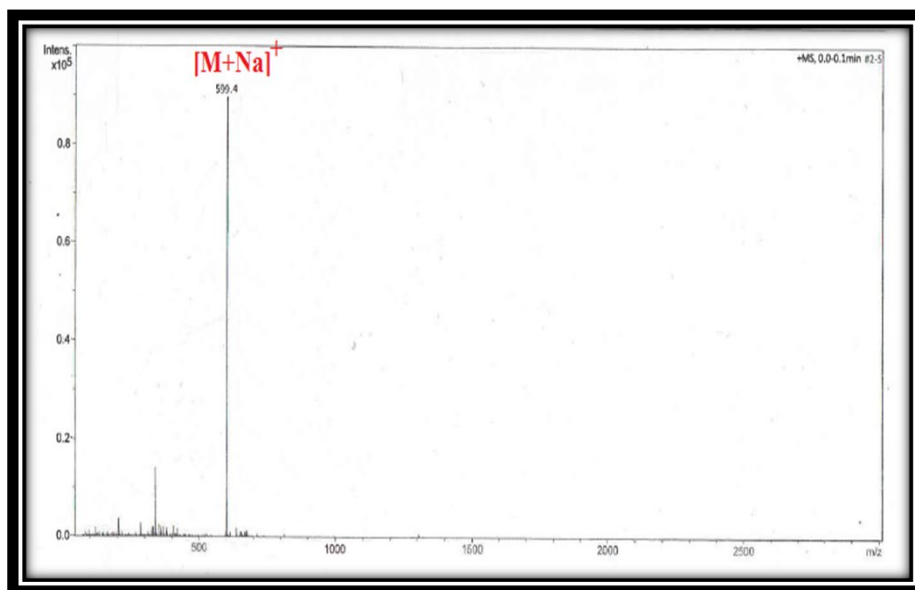


Figure III-31 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du produit CR8

Les spectres RMN¹H (Figures III-32) et RMN ¹³C (Figure III-33) du composé CR8 montrent une grande similitude structurale avec le composé précédent CR7, notamment au niveau de la génine. En effet on observe sur ces spectres les signaux caractéristiques d'un β -sitostérol. A savoir :

- Un groupement oxyméthine CHO-3 résonant à δ_H 3,57 / δ_C 78,7.
- Six groupements méthyliques résonant à δ_H 0,72 (CH3-18) / δ_C 11,3 ; δ_H 1,04 (CH3-19) / δ_C 19,7 ; δ_H 0,94 (CH3-21) / δ_C 18,9; δ_H 0,93 (CH3-26) / δ_C 20,9; δ_H 0,83 (CH3-27) / δ_C 19,4; δ_H 0,86 (CH3-29) / δ_C 11,4.
- Une double liaison à δ_{H6} 5,35 / δ_{C6} 121,7 et δ_{C5} 140,4.

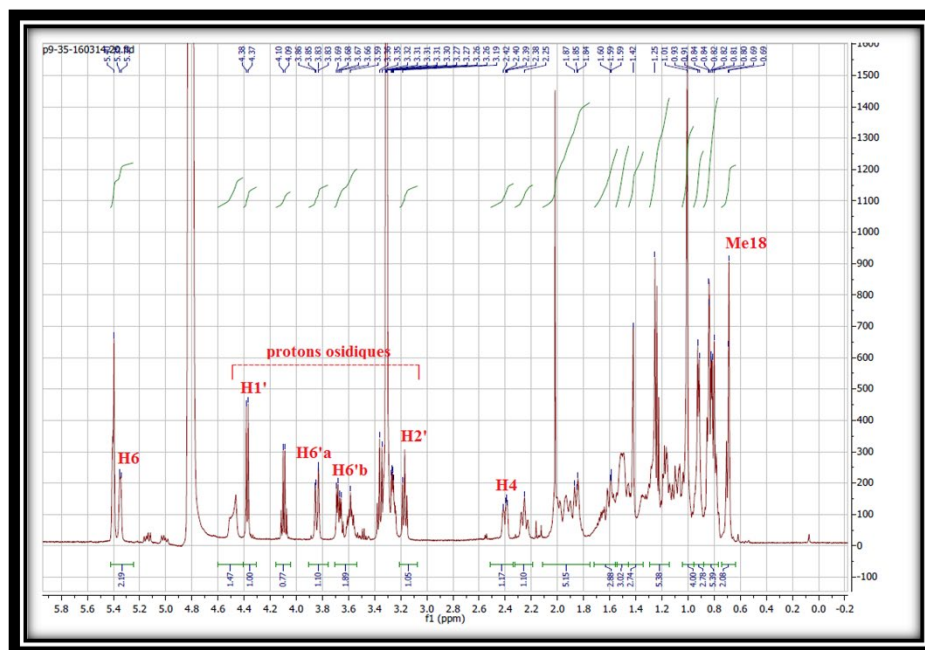


Figure III-32 : Spectre RMN¹H du produit CR8

La différence de masse de l'ordre de 162 uma entre les produits CR7 et CR8 montre la présence d'une unité osidique dans le composé CR8. La comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones osidiques avec les données bibliographiques révèle que ce composé possède un glucose de configuration β .

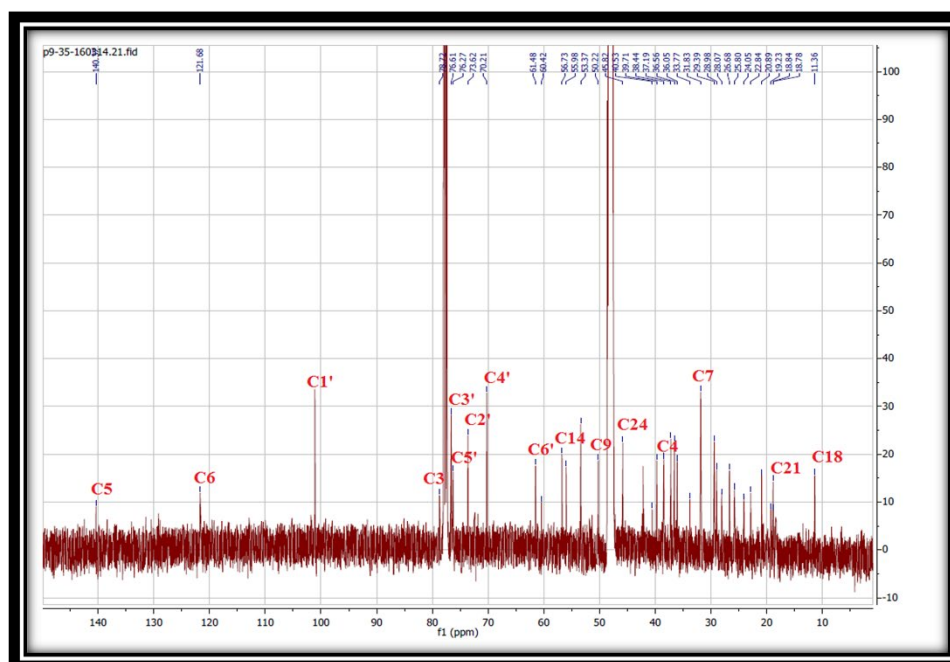


Figure III-33 : Spectre RMN ¹³C du produit CR8

Les données spectrales ainsi que la comparaison avec celles de la littérature permettent d'identifier le composé CR8 comme étant β -sitostéryl-3-O- β -D-glucopyranoside nommé Daucostérol. Il a été isolé antérieurement des espèces du genre *Centaurea* telles que: *C. bracteata* [41], *C. horrida* [10], *C. omphalotricha* [32], *C. Africana* [29]. Le Daucostérol est connu pour son pouvoir anti-inflammatoire et antinéoplasique [42].

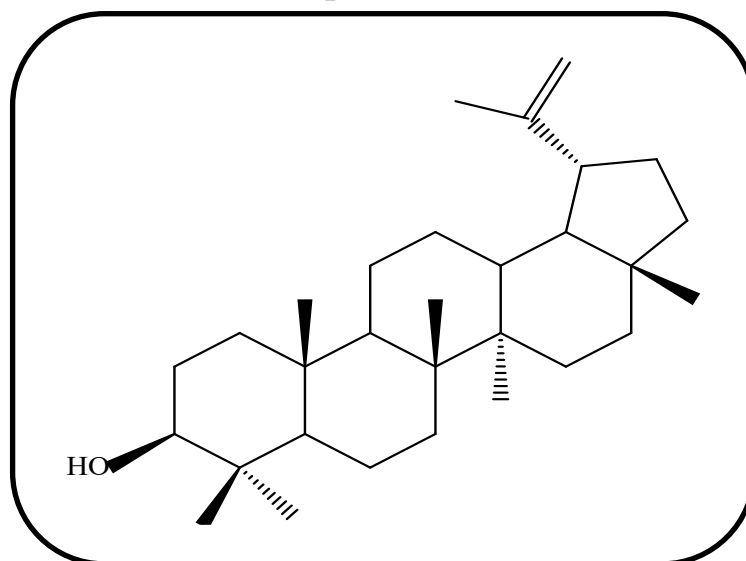
Le tableau (III-12) résume les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C du composé CR8.

Tableau III-12: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR8 dans CD_3OD .

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
1	37,2	a = 1,87	m
		b = 1,07	m
2	29,4	a = 1,90	m
		b = 1,58	m
3	78,7	3,57	m
4	38,5	a = 2,40	ddd ($J = 13-6-3$)
		b = 2,22	td ($J = 13-3$)
5	140,4	-	-
6	121,7	5,35	d ($J = 5,9$)
7	31,8	1,48	m
8	31,9	1,96	m
9	50,2	0,97	m
10	36,6	-	-
11	22,9	a = 1,45	m
		b = 1,02	m
12	39,7	a = 2,01	m
		b = 1,17	m
13	42,2	-	-
14	56,8	1,03	m
15	25,8	a = 1,59	m
		b = 1,11	m

16	28,1	a = 1,84	m
		b = 1,29	m
17	53,4	1,16	m
18	11,3	0,72	s
19	19,7	1,04	s
20	36,1	1,36	m
21	18,9	0,94	d ($J = 6,7$)
22	33,8	a = 1,35	m
		b = 1,05	m
23	26,7	1,19	m
24	45,8	0,93	m
25	28,9	1,66	m
26	20,9	0,93	d ($J = 5,4$)
27	19,4	0,83	d ($J = 6,9$)
28	24,1	1,28	m
29	11,4	0,86	t ($J = 7,5$)
1'	101,1	4,37	d ($J = 8$)
2'	73,6	3,17	t ($J = 8,6$)
3'	77,4	3,36	t ($J = 8,6$)
4'	70,2	3,33	m
5'	76,4	3,26	m
6'	61,5	a = 3,85	dl ($J = 12$)
		b = 3,66	dd ($J = 12-5,4$)

III-1-3-9- Elucidation structurale du produit CR9



lup-20(29)-èn-3-ol

Le composé **CR9** purifié sous forme d'une poudre blanche est soluble dans le chloroforme. Il est invisible sous lampe UV et se colore en orange-marron après révélation de sa CCM avec une solution acide sulfurique et chauffage.

Sa formule brute $C_{30}H_{50}O$ a été déduite à partir du spectre de masse ESI-MS (Figure III-34) enregistré en mode positif. Ce spectre montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 427 identifiable à $[M+H]^+$ et à m/z 444 $[M+NH_4]^+$, soit une masse moléculaire de 426 uma.

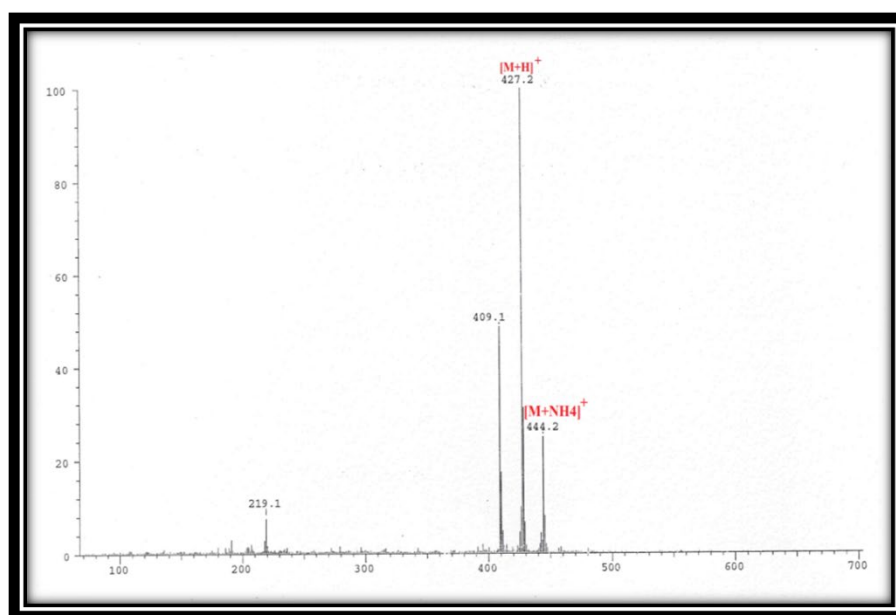


Figure III-34 : Spectre de masse ESI-MS du produit CR9

L'examen du spectre RMN ^1H (Figure III-35) de ce composé montre des signaux des protons aliphatiques dans la région des hauts champs. Ces derniers sont caractéristiques pour un squelette triterpène par la présence de sept singulets attribuables aux groupements méthyles. Ces signaux résonnent à δ_{H} 1,02 (CH-23, s), 0,81 (CH-24, s), 0,86 (CH-25, s), 1,04 (CH-26, s), 0,98 (CH-27, s), 0,83 (CH-28, s) et 1,72 (CH-30, s). Le déblindage du dernier méthyle (CH₃-30) révèle qu'il est lié à un carbone insaturé. On observe également sur ce spectre la présence d'un signal sous forme de multiplet à δ_{H} 3,21 attribuable à un groupement hydroxyméthine (CHO-3) et deux singulets à δ_{H} 4,62 et 4,72 ppm correspondant aux deux protons oléfiniques.

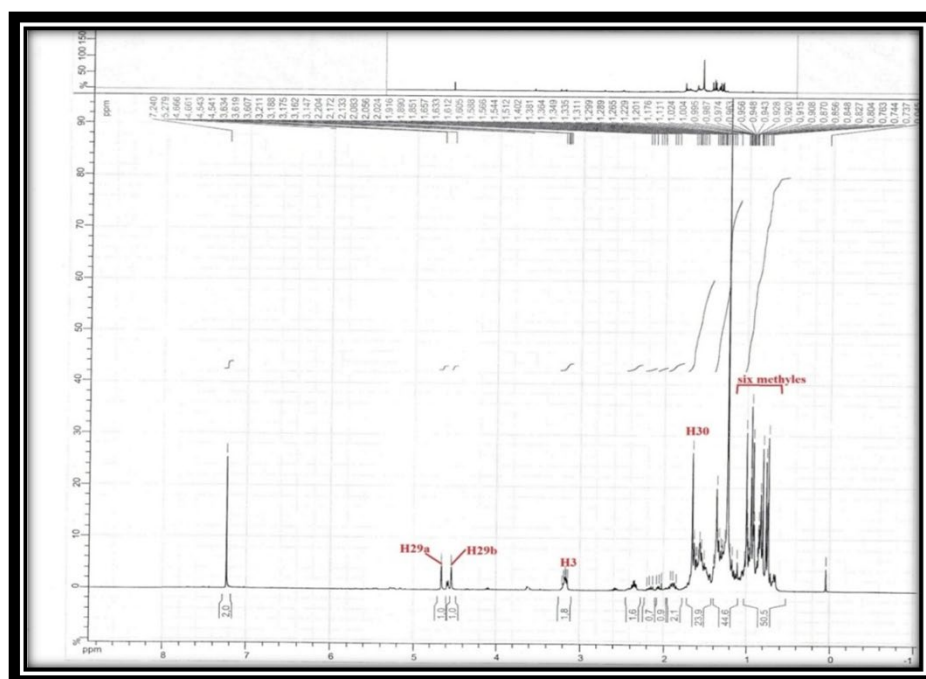


Figure III-35 : Spectre RMN ^1H du produit CR9

Le spectre RMN ^{13}C du composé CR9 (Figure III-36) présente 30 signaux correspondant aux 30 atomes de carbones, ce qui confirme la nature triterpénique de ce produit. On visualise:

- Sept méthyles sortant à δ_{C} 28 (C-23), 15,4 (C-24), 16,2 (C-25), 16 (C-26), 14,6 (C-27), 18 (C-28) et 19,5 (C-30).
- Un carbone oxygéné est détecté à δ_{C} 79,1 attribuable au C-3. Ce déplacement chimique indique une configuration β du groupement hydroxyle lié à ce carbone [43].
- Deux carbones oléfiniques : C-20 quaternaire à δ_{C} 151,2, et C-29 secondaire à δ_{C} 109,4.
- Des carbones résonant entre 18 à 44 ppm attribuables aux groupements CH₂ et C quaternaires.

-Des signaux attribuables aux carbones méthines (CH) entre 38 à 56 ppm.

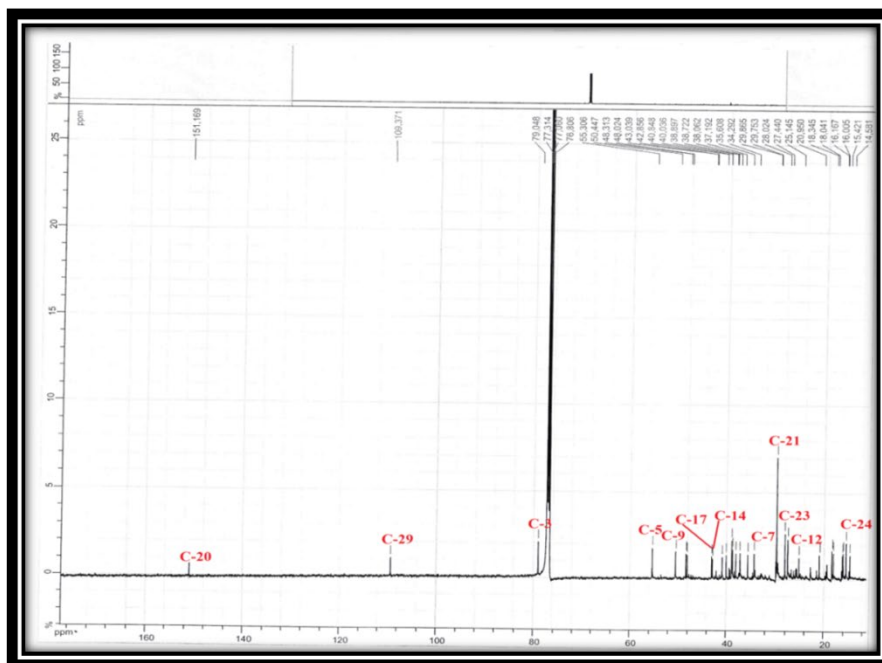


Figure III-36 : Spectre RMN ^{13}C du produit CR9

L'analyse conjointe des spectres, COSY H-H, HSQC et HMBC permet de caractériser tous les carbones et les protons du composé CR9.

Le spectre HSQC (Figure III-38) montre une corrélation entre les deux protons oléfiniques géminés H-29a à 4,72 ppm et H-29b à 4,72 ppm avec le carbone C-29 à 109,4 ppm. Ces deux protons présentent aussi un couplage allylique sur le spectre COSY H-H (Figure III-37) avec les protons du méthyle CH-30. Ce ci révèle la présence d'un groupement isoprényle.

On observe également sur le spectre COSY des taches de corrélations entre :

- Le proton deblindé H-3 à δ_{H} 3,21 avec les protons H-2 à δ_{H} 1,65, ces derniers corrént avec les deux protons H-1a à δ_{H} 1,73 et H-1b à δ_{H} 0,96.
- Le proton H-5 à δ_{H} 0,75 avec deux protons géminés H-6a et H-6b résonant à δ_{H} 1,56 et 1,44 respectivement.
- Le proton H-19 à δ_{H} 2,42 avec le proton H-18 à δ_{H} 1,42.
- Les deux protons H-21a à δ_{H} 1,97 et H-21b à δ_{H} 1,30 avec les protons géminés résonant H-22a à δ_{H} 1,42 et H-22b à δ_{H} 1,24.

A partir des protons identifiés précédemment, l'expérience HSQC (Figure III-38) nous a permis de localiser leurs carbones à δ_c 38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 79,1 (C-3), 55,3 (C-5), 18,3 (C-6), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 29,9 (C-21), 40,0 (C-22), 109,4 (C-29), 19,5 (C-30).

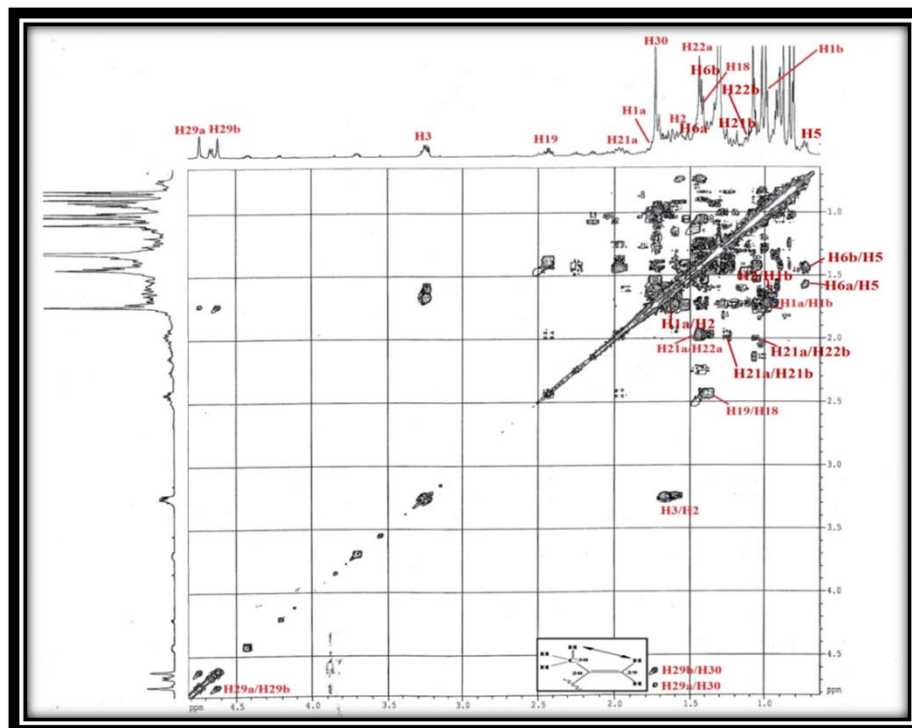
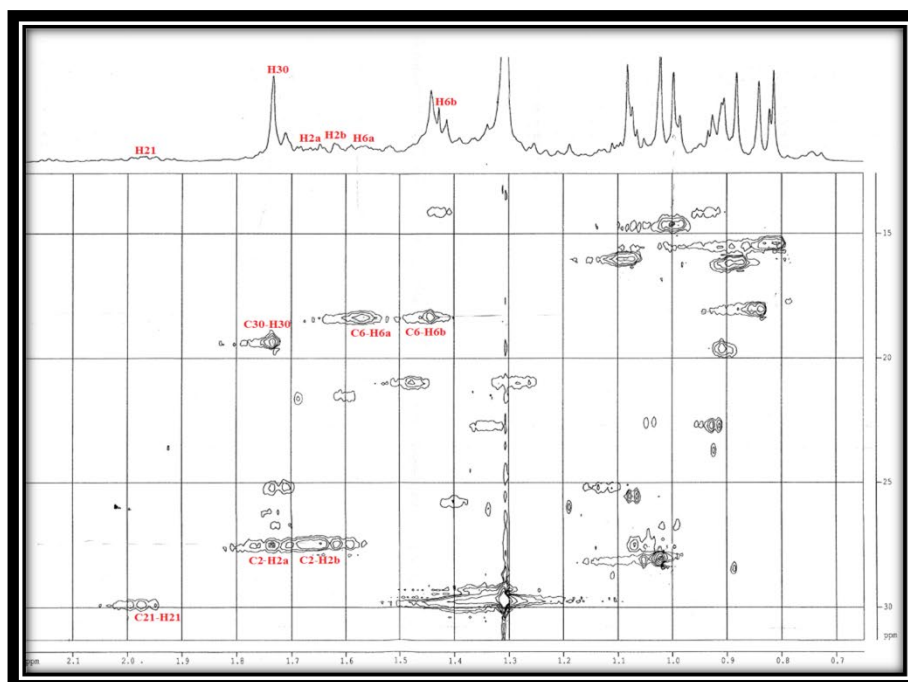


Figure III-37 : Spectre COSY du produit CR9



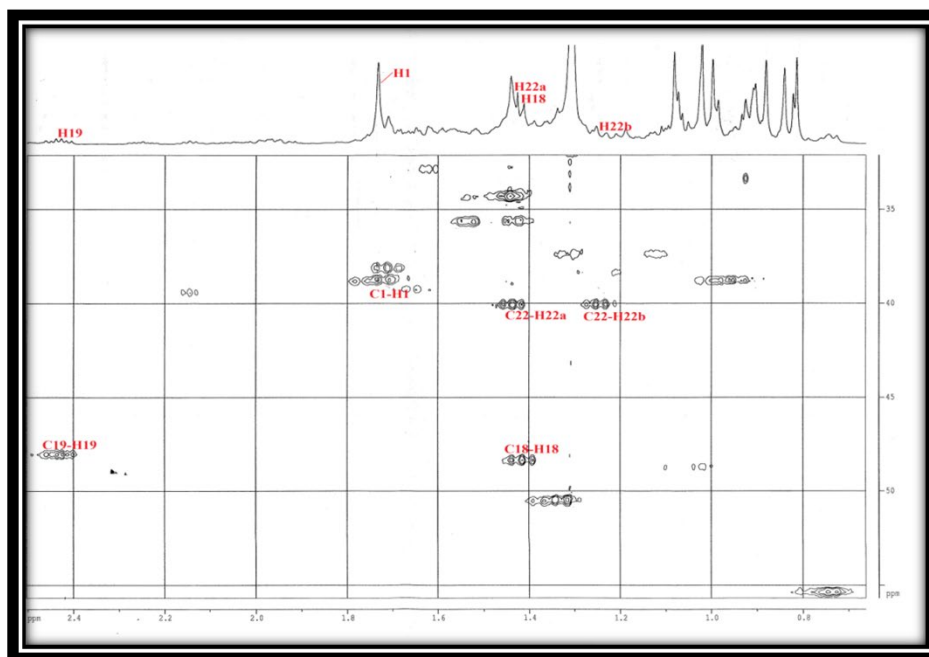


Figure III- 38 : Spectre HSQC du produit CR9

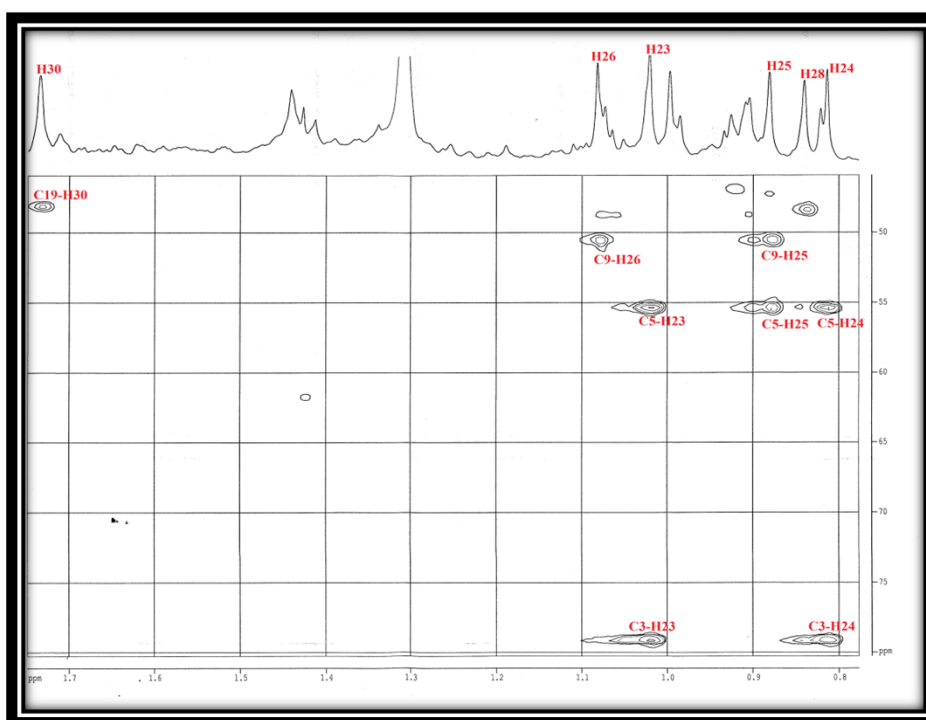
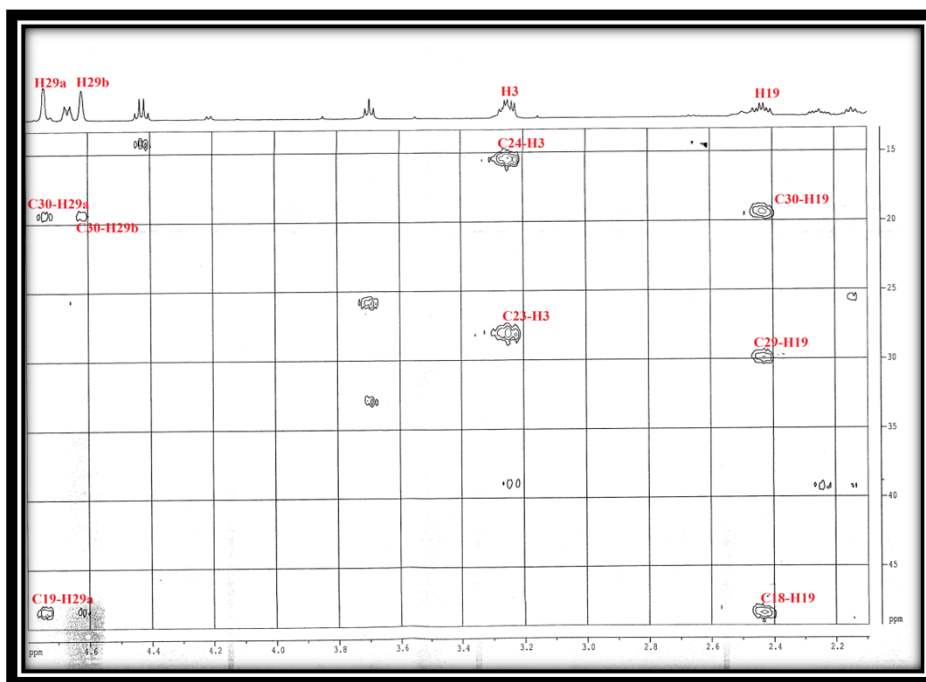
Par ailleurs, l'expérience HMBC (Figure III-39) montre des corrélations entre le carbone C-5 à 55,3 ppm et les protons des groupements méthyles H-25 à δ_H 0,86, H-24 à δ_H 0,81 et H-23 à δ_H 1,02. Les deux derniers protons couplent en HMBC avec le carbone C-3 déjà identifié. Les carbones C-23, C-24 et C-25 sont localisés à δ_c 28, 15,4 et 16,2 respectivement, selon l'expérience HSQC (Figure III-42). Ces déplacements chimiques justifient la position équatoriale du méthyle H-23 et la position axiale pour le méthyle H-24.

En outre, le spectre HMBC permet de visualiser des corrélations entre le carbone C-9 à 50,5 ppm et les protons de groupements méthyles H-25 à δ_H 0,86 et H-26 à δ_H 1,04.

Les derniers protons H-26 montrent également sur ce spectre HMBC (Figure III-39) des taches de corrélation avec les carbones C-7, C-8 et C-14, ces deux carbones C-8 et C-14 couplent avec le méthyle en position 27. Ces mêmes protons H-27 corrélaient avec les carbones C-13 et C-15.

Le carbone C-18 présente sur le spectre HMBC (Figure III-39) une tache de corrélation avec les protons du dernier groupement méthyle H-28.

L'analyse combinée des spectres HSQC (Figure III-42) et HMBC (Figure III-39) nous a permis d'identifier les déplacements chimiques des carbones C-7, C-8, C-13, C-14, C-15, C-26, C-27 et C-28 à 34,3 ; 40,9 ; 38,1 ; 42,9 ; 27,2 ; 16 ; 14,6 et 18 ppm respectivement.



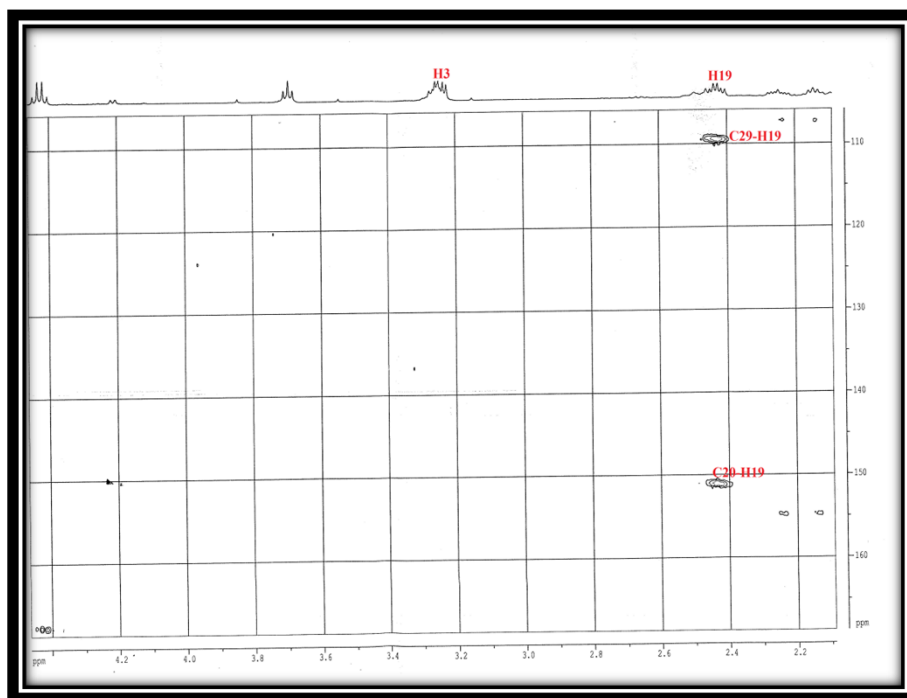


Figure III-39 : Spectre HMBC du produit CR9

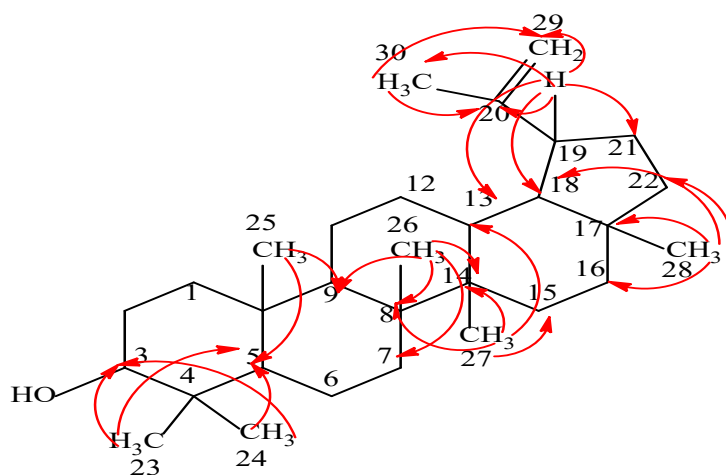


Figure III-40 : Corrélations HMBC du produit CR9

A partir de ce groupement méthyle H-28 trois autres taches de corrélations sont repérées avec un carbone quaternaire C-17 et deux carbones méthylène C-22 et C-16.

L'examen du spectre COSY (Figure III-41) permet de visualiser des corrélations entre les protons H-16 et H-15, H-13 et H-12, H-12 et H-11, H-11 et H-9. La localisation des déplacements chimiques des carbones à 20,9 ; 25,1 ; 35,6 et 43 ppm est attribuée aux carbones C-11, C-12, C-16 et C-17 respectivement par analyse des spectres HSQC (Figure III-42) et HMBC (Figure III-39).

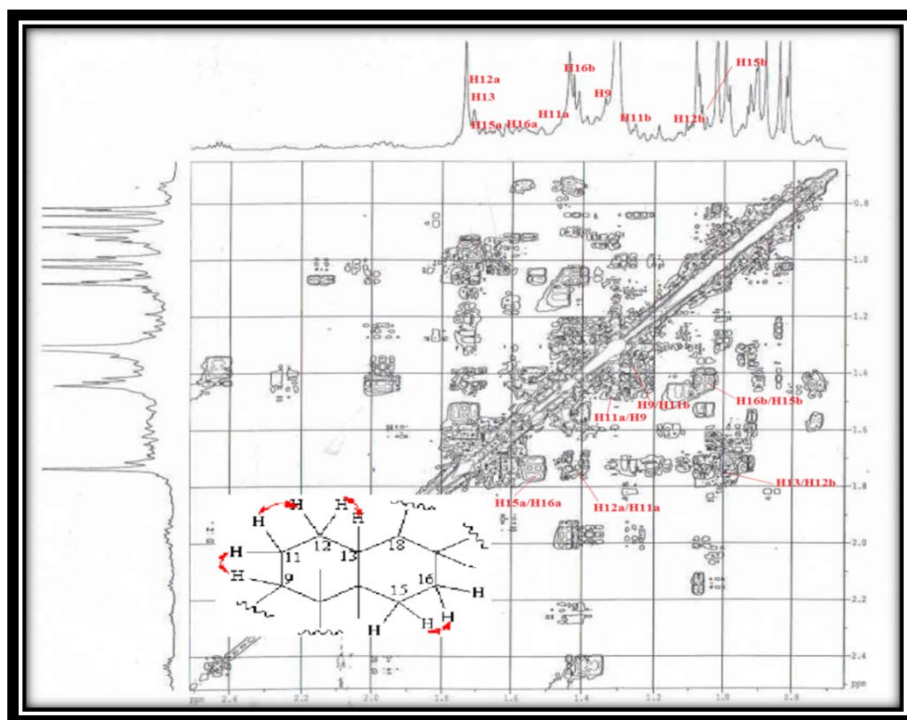
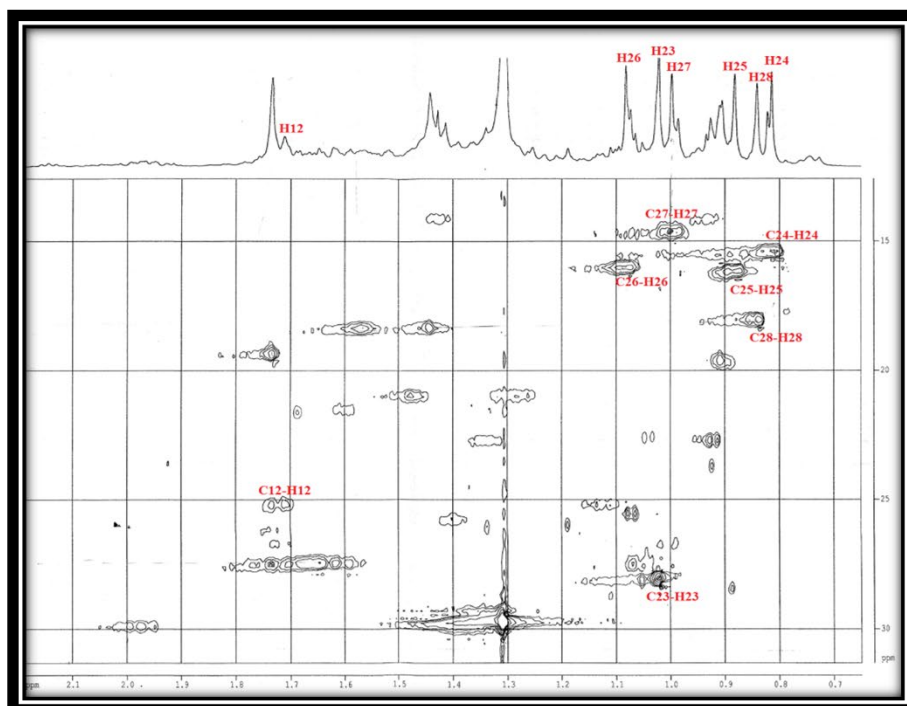


Figure III-41 : Spectre COSY du produit CR9



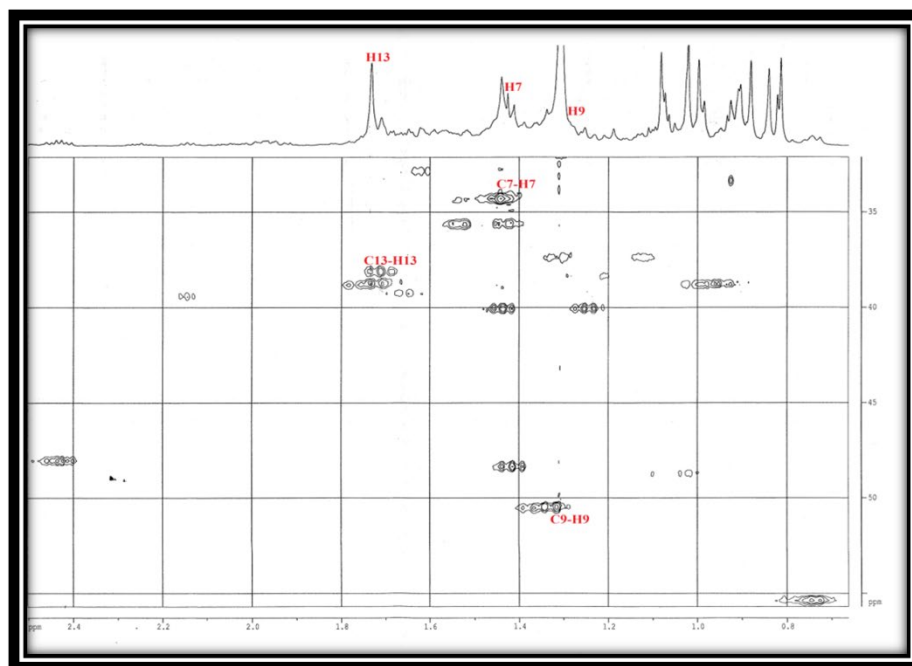


Figure III-42 : Spectre HSQC du produit CR9

Les données spectroscopiques (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC), la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} = +26.4$ ($C = 0.4$, CHCl_3) et la comparaison avec les données de la littérature ont permis d'identifier le produit CR9 au lup-20(29)-èn-3-ol ou lupéol, isolé antérieurement des espèces du genre *Centaurea* telles que : *C. regia* [44], *C. horrida* [10], *C. omphalotricha* [32]. Ce produit a montré des activités antimicrobienne, anti-inflammatoire et antitumoral [45].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CR10 sont rassemblés dans le tableau III-13.

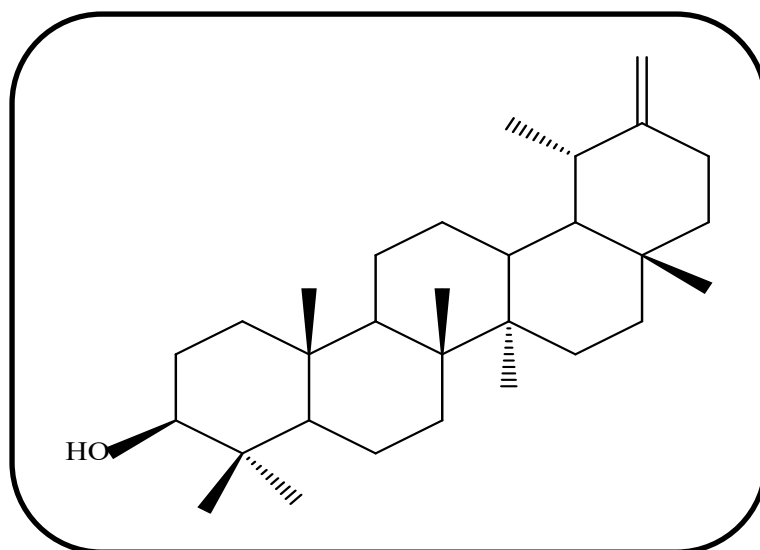
Tableau III-13: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR9 dans CDCl_3 .

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
1	38,7	H _{1a} 1,73	m
		H _{1b} 0,96	m
2	27,4	1,65	m
3	79,1	3,21	m
4	38,9	/	/

5	55,3	0,75	m
6	18,3	H _{6a} 1,56	m
		H _{6b} 1,44	m
7	34,3	1,44	m
8	40,9	/	/
9	50,5	1,35	m
10	37,2	/	/
11	20,9	H _{11a} 1,48	m
		H _{11b} 1,28	m
12	25,1	H _{12a} 1,72	m
		H _{12b} 1,13	m
13	38,1	1,71	m
14	42,9	/	/
15	27,2	H _{15a} 1,65	m
		H _{15b} 1,05	m
16	35,6	H _{16a} 1,53	m
		H _{16b} 1,44	m
17	43,0	/	/
18	48,3	1,42	m
19	48,0	2,42	m
20	151,2	/	/
21	29,9	H _{21a} 1,97	m
		H _{21b} 1,30	m
22	40,0	H _{22a} 1,42	m
		H _{22b} 1,24	m
23	28,0	1,02	s
24	15,4	0,81	s
25	16,2	0,86	s
26	16,0	1,04	s
27	14,6	0,98	s

28	18,0	0,83	s
29	109,4	H _{29a} 4,72	s
		H _{29b} 4,62	s
30	19,5	1,72	s

III-1-3-10- Elucidation structurale du produit CR10



18 α , 19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol

Le produit **CR10** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme, Il est invisible à l'UV et se révèle en mauve par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Son spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif (Figure III-43) présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 427 $[M+H]^+$ et m/z 853 $[2M+H]^+$, en accord avec une masse moléculaire de 426 uma et une formule brute en $C_{30}H_{50}O$.

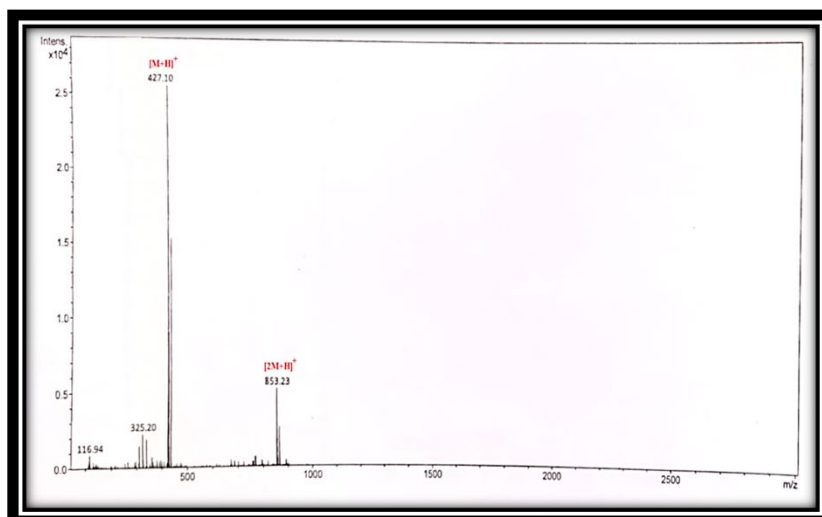


Figure III-43 : Spectre de masse ESI-MS du produit CR10

Le spectre RMN ^1H (Figure III-44) montre sept signaux de groupements méthyles H-23 à δ_{H} 0,78, H-24 à δ_{H} 0,78, H-25 à δ_{H} 0,97, H-26 à δ_{H} 1,1, H-27 à δ_{H} 0,93, H-28 à δ_{H} 0,86, H-29 à δ_{H} 1,27. Ces signaux sont caractéristiques pour les composés triterpéniques à squelette pentacycliques de type Taraxastérol [46].

Le spectre RMN ^1H indique aussi la présence d'un signal déblindé correspond au groupement hydroxyméthine H-3 à δ_{H} 3,22 et des signaux de deux protons sous forme d'un singulet large à δ_{H} 4,50 et 4,52 attribuables aux protons oléfiniques H-30.

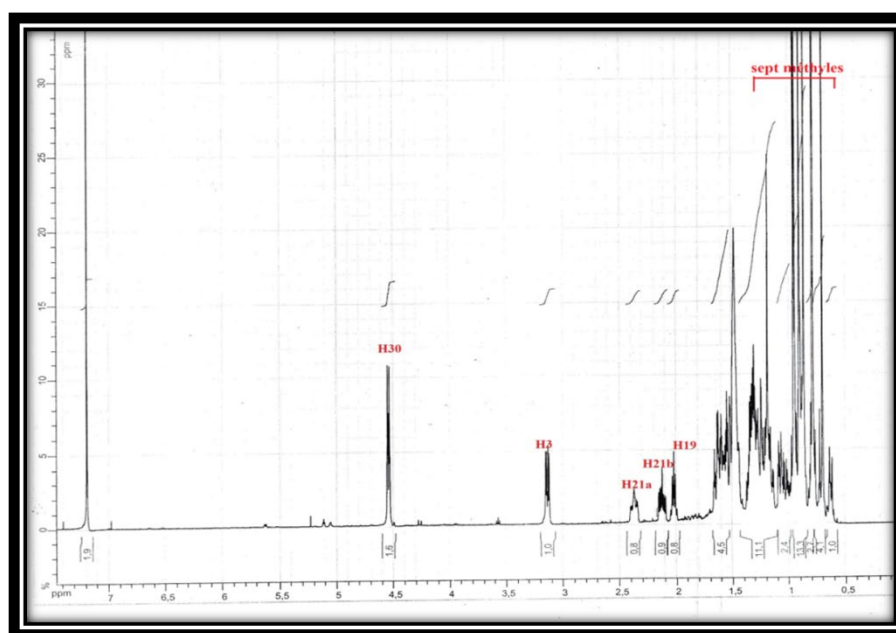


Figure III-44 : Spectre RMN ^1H du produit CR10

Le spectre HSQC (Figure III-45) permet d'identifier les déplacements chimiques des carbones oléfiniques exocycliques C-30 à δ_C 107,3 et C-20 à δ_C 154,7, le carbone oxygéné C-3 à 79 ppm ainsi que les sept carbones méthyliques C-23 à δ_C 28, C-24 à δ_C 15,4, C-25 à δ_C 16,3, C-26 à δ_C 15,9, C-27 à δ_C 14,8, C-28 à δ_C 19,5 et C-29 à δ_C 25,5.

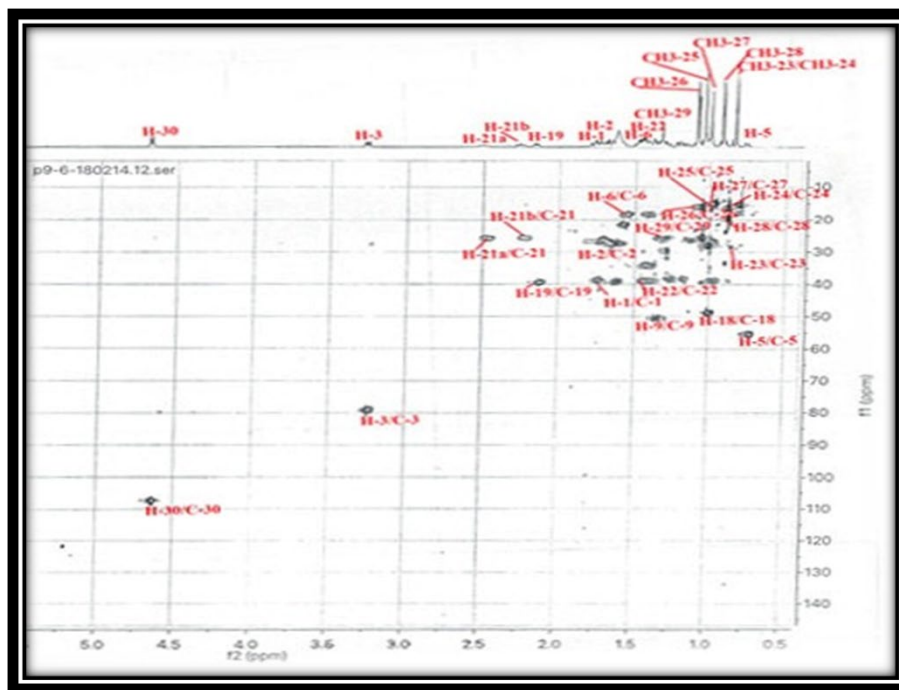


Figure III-45 : Spectre HSQC du produit CR10

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-46) confirme la nature triterpénique de ce composé par la présence de 30 signaux constitués de : sept méthyles, six groupements CH, onze méthylènes, six carbones quaternaires.

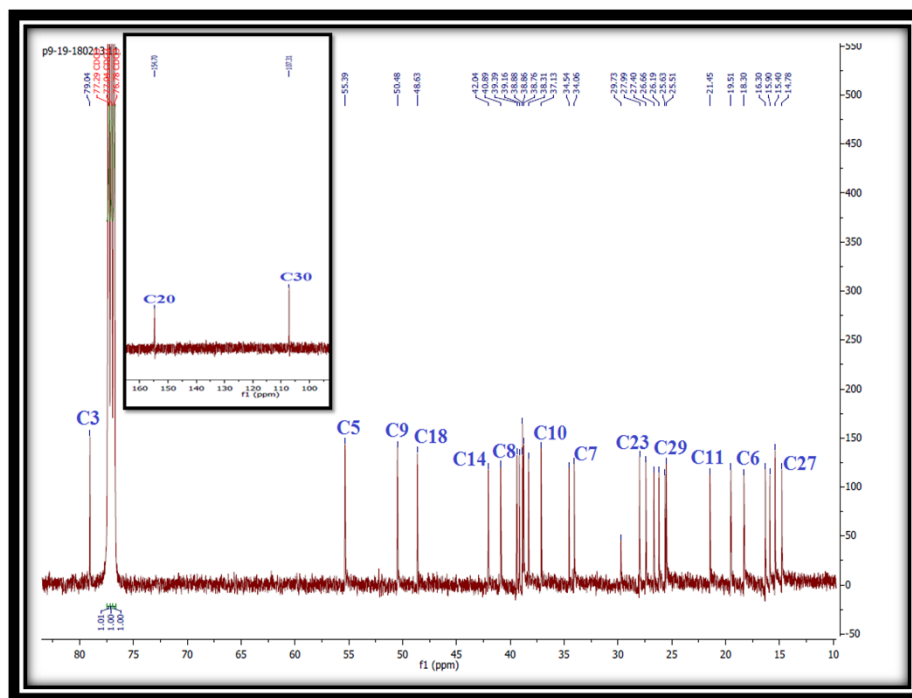


Figure III-46 : Spectre RMN ^{13}C du produit CR10

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-47) permet d'observer une corrélation entre le proton H-3 et les deux protons H-2 à δ_{H} 1,64. Ces protons H-2 corrélient avec les protons H-1 sortant à 1,7 ppm. Ces derniers couplent avec les protons du groupement méthyle H-25. Les déplacements chimiques des carbones C-1 et C-2 sont déterminés par l'analyse du spectre HSQC (Figure III-45) à δ_{C} 38,8 et à δ_{C} 27,4 respectivement.

Le spectre COSY H-H permet de détecter également des corrélations entre :

- Le proton H-5 à δ_{H} 0,72 et le proton H-6 à δ_{H} 1,41.
- Les deux protons H-21a à δ_{H} 2,45 ; H-21b à δ_{H} 2,21 et les protons H-22 δ_{H} 1,37 ; H-30a à δ_{H} 4,52 et H-30b à δ_{H} 4,50.
- Le proton H-19 à δ_{H} 2,08 et le proton du groupement méthine H-18 à δ_{H} 0,96 ainsi que les protons du groupement méthyle H-29 à δ_{H} 1,27. Les corrélations de ces quatre protons (H-18 et CH₃-29) avec le proton H-19 expliquent sa multiplicité sous forme de quintuplet.

A partir de ces protons identifiés, l'analyse du spectre HSQC (Figure III-45) permet de déterminer les déplacements chimiques de leurs carbones : C-5 à δ_{C} 55,4 ; C-6 à δ_{C} 18,3 ; C-18 à δ_{C} 48,6 ; C-19 à δ_{C} 39,4 ; C-21 à δ_{C} 25,6 et C-22 à δ_{C} 38,9.

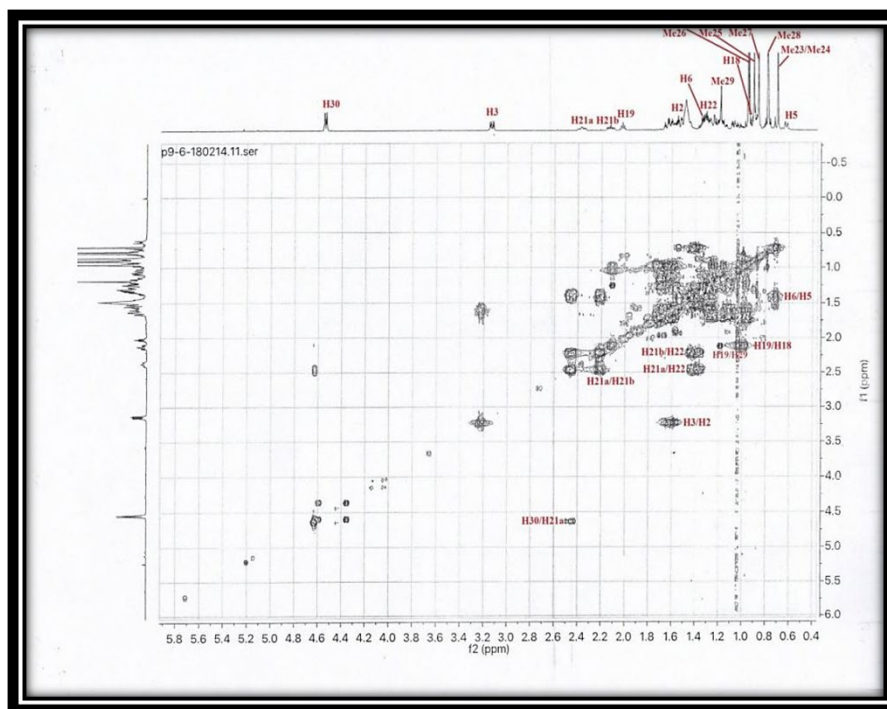


Figure III-47 : Spectre COSY du produit CR10

L'expérience HMBC (Figure III-48, III-49) conduit à localiser les autres carbones à travers les corrélations entre :

- Le proton H-3 et les deux carbones méthyles C-23 et C-24.
- Les protons des groupements méthyle H-23 et H-24 et un carbone quaternaire résonant à 38,9 ppm attribuable au carbone C-4.
- Les protons méthyliques H-25 et les carbones C-1, C-5, C-9 et C-10.
- Les protons du groupement méthyle H-26 et les carbones C-7, C-8, C-9 et C-14.

Les déplacements chimiques de ces carbones sont assignés par l'analyse conjuguée des spectres HSQC (Figure III-45) et HMBC (Figure III-48) : C-7 à 34 ; C-8 à 40,9 ; C-9 à 50,5 ; C-10 à 37,1 et C-14 à 42,1 ppm.

Par ailleurs, l'analyse du spectre HMBC montre les couplages entre :

- Les protons du groupement méthylène H-30 et les carbones C-19 et C-21.
- Le proton H-19 et les carbones C-21 et C-17.

- Le carbone C-17 et les protons H-13 à δ_H 1,58, H-15 à δ_H 1,66, H-16 à δ_H 1,24, H-18 à δ_H 0,96, H-22 et H-28 déjà identifiées.

Les données des spectres HMBC (Figure III-48) et HSQC (Figure III-45) ont permis de déterminer les déplacements chimiques des carbones C-13 à δ_C 39,2, C-15 à δ_C 26,7, C-16 à δ_C 38,3 et C-17 à δ_C 34,6.

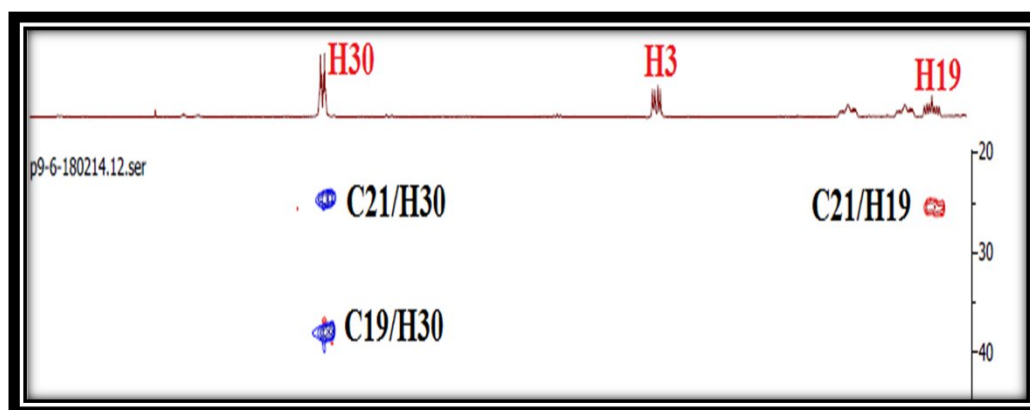


Figure III-48: spectre HMBC du produit CR10

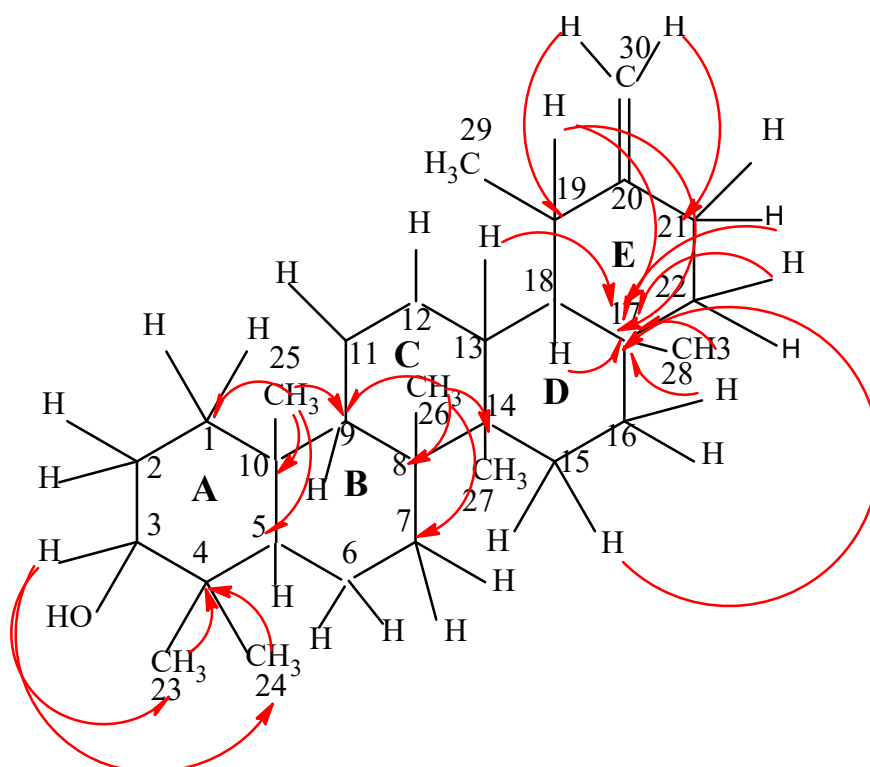
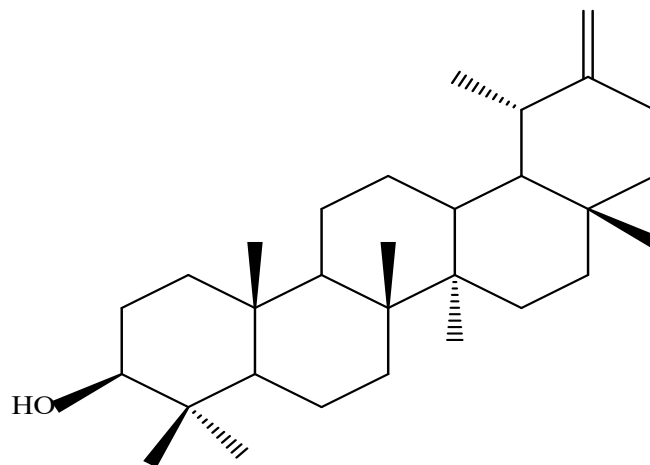


Figure III-49: Corrélations HMBC du produit CR10

La comparaison des données spectroscopiques illustrées dans le tableau (III-14) avec celles de la littérature permet d'élucider le composé CR10 comme étant 18 α , 19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol ou Taraxastérol.



Ce métabolite connu pour ces propriétés anti-inflammatoire [47], anti-allergique et anti-oxydante [48], a été antérieurement isolé des espèces du genre *Centaurea* telles que : *C. kilaea* [49], *C. omphalotricha* [32].

Tableau III-14: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du produit CR10 dans CDCl_3 .

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
1	38,8	1,7	m
2	27,4	1,64	m
3	79,0	3,22	dd ($J = 11,5-4,8$)
4	38,9	/	/
5	55,4	0,72	m
6	18,3	1,41	m
7	34,0	1,38	m
8	40,9	/	/
9	50,5	1,32	m
10	37,1	/	/
11	21,5	1,54	m
12	26,2	1,66	m
13	39,2	1,58	m

14	42,1	/	/
15	26,7	1,66	m
16	38,3	1,24	m
17	34,6	/	/
18	48,6	0,96	m
19	39,4	2,08	quintuplet ($J = 6,9$)
20	154,7	/	/
21	25,6	H _{21a} 2,45	m
		H _{21b} 2,21	m
22	38,9	1,37	m
23	28	0,78	s
24	15,4	0,78	s
25	16,3	0,97	s
26	15,9	1,1	s
27	14,8	0,93	s
28	19,5	0,86	s
29	25,5	1,27	d ($J = 7$)
30	107,3	H _{30a} 4,52	sl
		H _{21b} 4,50	sl

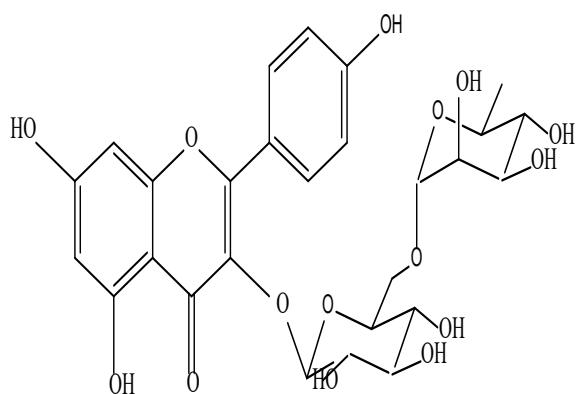
III-1-4- Conclusion

Centaurea resupinata subsp. *dufourii* est une plante de la famille Asteraceae. Cette espèce n'a pas fait l'objet d'aucune étude phytochimique ou biologique antérieure. L'étude phytochimique de l'extrait Acétate d'éthyle des parties aériennes de *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a abouti à l'isolement de dix métabolites secondaires. La détermination structurale des produits isolés a été réalisée par les techniques d'analyse spectroscopiques notamment RMN 1D (¹H et ¹³C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), spectrométrie de masse, UV, mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et par la comparaison avec les données de la littérature.

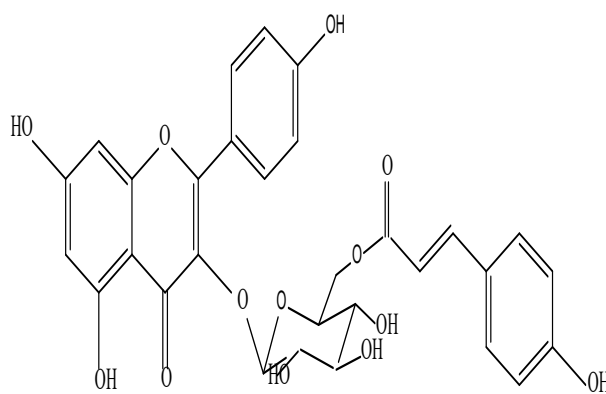
Ces métabolites secondaires se répartissent comme suit:

- Six Flavonoïdes:
 - Nicotiflorine

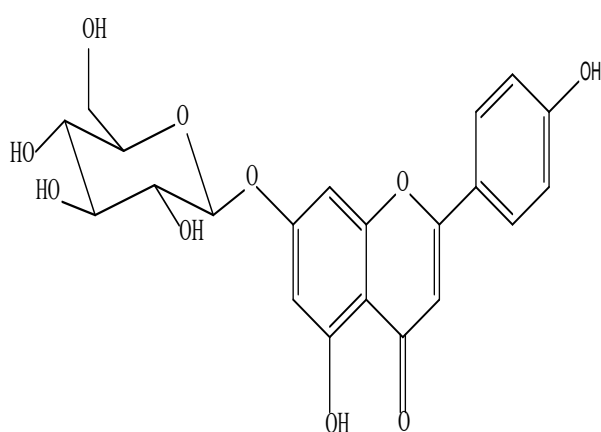
- Tiliroside
- Apigetrine
- Apigénine
- Chrysoériol
- Chrysin
- Deux phytostérols:
 - β -sitostérol
 - Daucostérol
- Deux triterpènes :
 - Lupéol
 - Taraxastérol



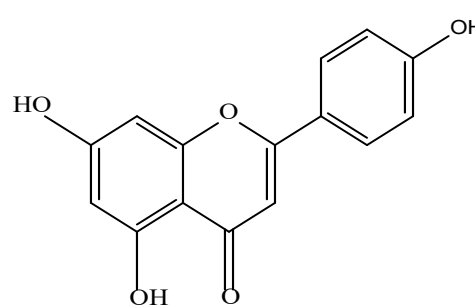
Nicotiflorine



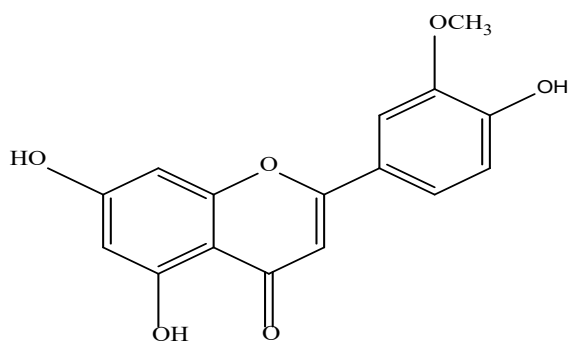
Tiliroside



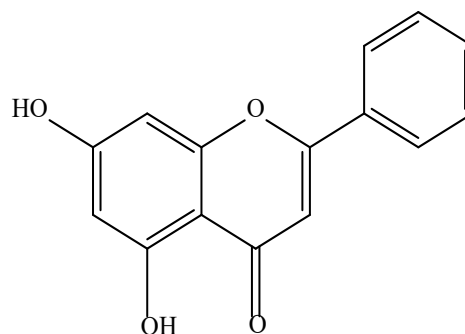
Apigetrine



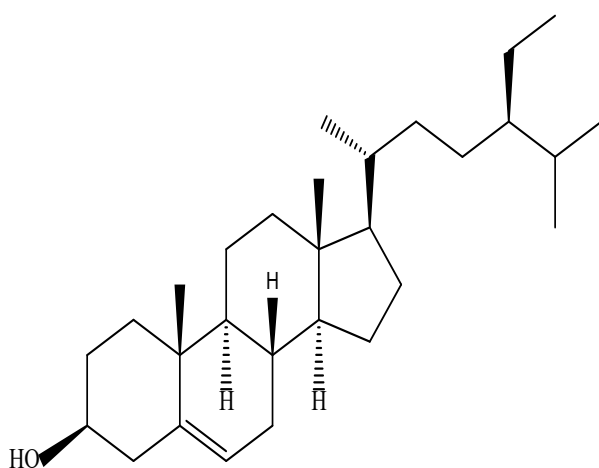
Apigénine



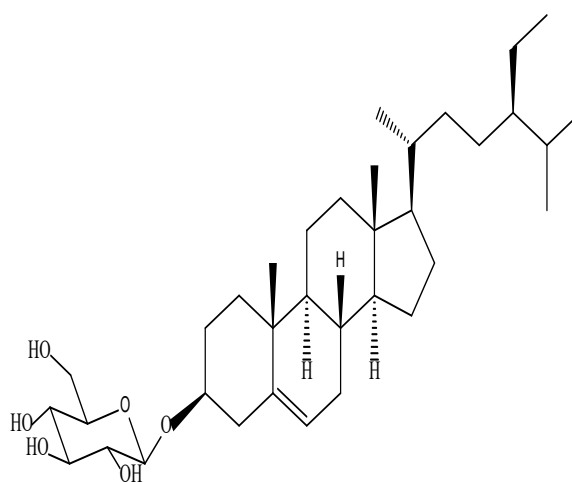
Chrysoériol



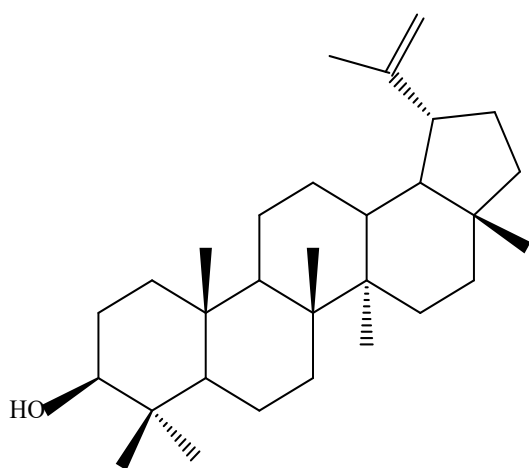
Chrysin



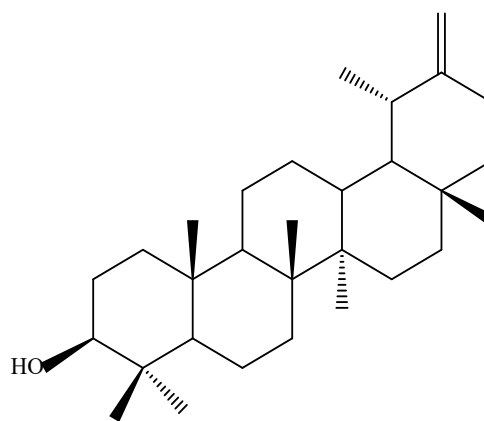
β -sitostérol



Daucostérol



Lupéol



Taraxastérol

III-2- Investigation chimique de l'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth

III-2-1-Extraction

Les parties aériennes (500 g) de la plante *Cytisus purgans* (L.) Benth, séchées et broyées finement, ont subi une triple macération dans un mélange de solvants EtOH-H₂O (70:30) pendant 48 h à température ambiante. La filtration et l'évaporation non à sec ont permis d'obtenir une phase aqueuse, cette dernière est soumise à une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante: hexane (3 x 100 ml), acétate d'éthyle (3 x 100 ml) et n-butanol (3 x 100 ml). Les trois phases organiques obtenues sont séchées puis filtrées et concentrées à sec, conduisant à 2,7 g d'extrait hexanique (CPHE), 6,5 g d'extrait acétate d'éthyle (CPAC) et 11,3 g d'extrait butanolique (CPBU). Le schéma ci-dessous rassemble les différentes étapes de l'extraction (Figure III-50).

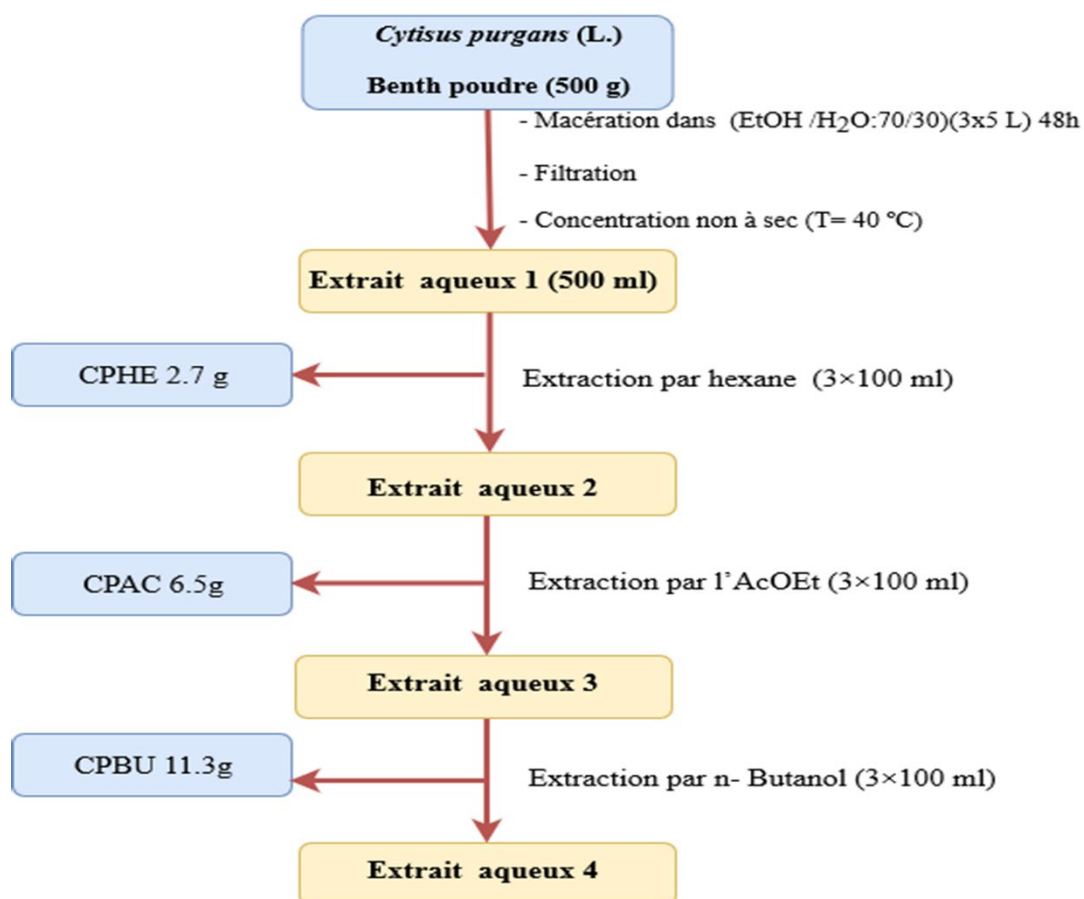


Figure III-50: Schéma d'extraction de la plante *Cytisus purgans* (L.) Benth

III-2-2- Séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle

L'examen des chromatographies sur couches minces CCM des trois extraits obtenus dans différents systèmes d'éluion indique une présence intéressante des métabolites secondaires des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique.

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle (6,0g) a été réalisé par une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion est effectuée par le mélange de solvants suivants : Hexane-AcOEt 100-0 à 0-100 puis AcOEt-MeOH 100-0 à 0-100. Les CCM des fractions collectées sont visualisées sous la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique et chauffage. Ce fractionnement, nous a permis d'obtenir 8 fractions majoritaires. L'utilisation de différentes méthodes chromatographiques a mené à l'isolement de 7 composés pur (Figure III-51).

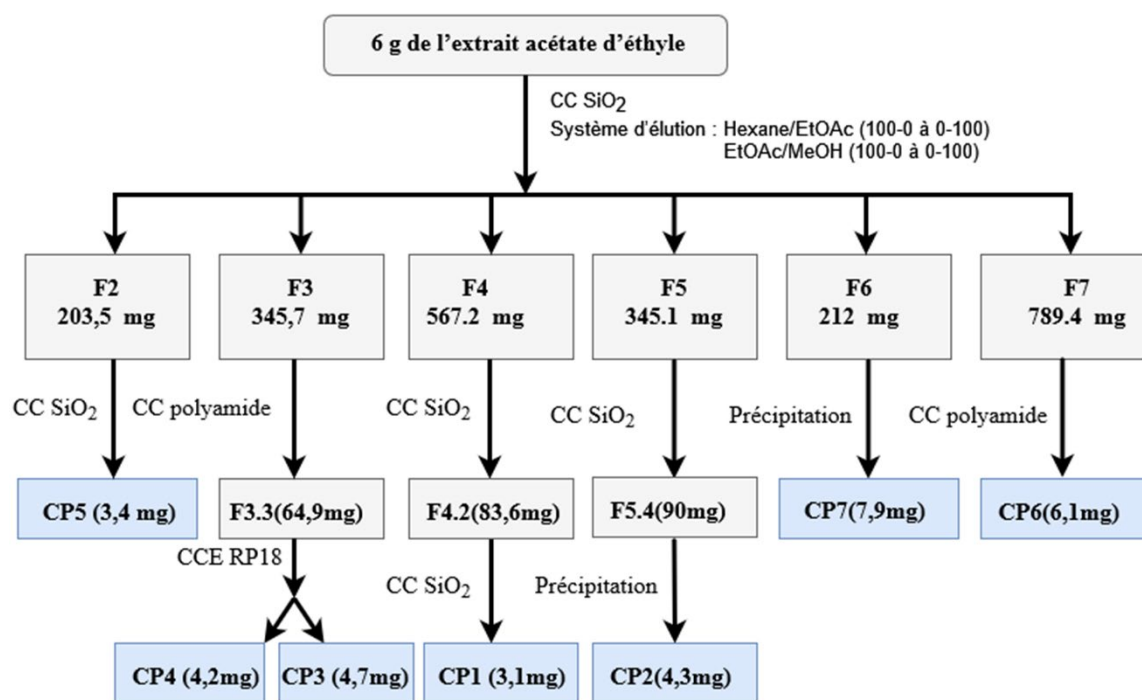
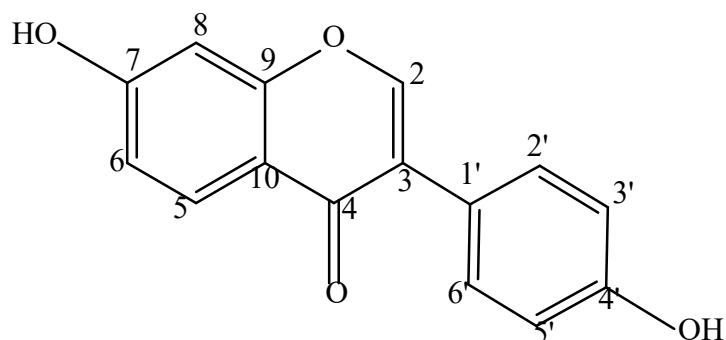


Figure III-51: Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Cytisus purgans*

III-2-3-Détermination structurale des produits obtenus

Les méthodes d'analyse spectroscopiques : RMN 1D (^1H , ^{13}C), RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC), la spectrométrie de masse ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, ont été utilisés pour la détermination structurale des différents produits isolés.

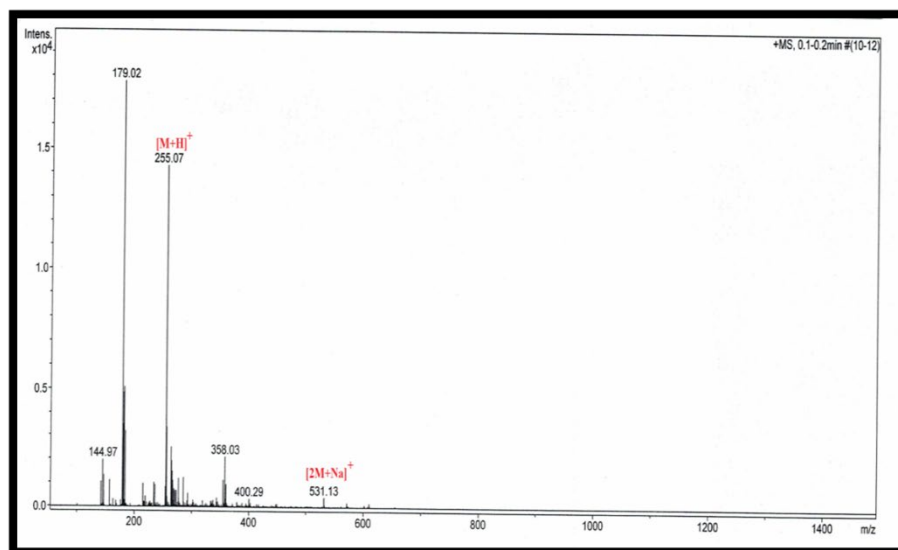
III-2-3-1-Elucidation structurale du produit CP1



4',7-dihydroxyisoflavone

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol, il est visible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en jaune après révélation à l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure III-52) de composé **CP1** indique la présence de deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 255$ $[M+H]^+$ et $m/z = 531$ $[2M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 254 uma et une formule brute en $C_{15}H_{10}O_4$.

Figure III-52 : Spectre de masse ESI⁺ du produit CP1

Le spectre RMN ¹H (Figure III-53) du composé CP1 montre huit protons dans la région des champs faibles. On identifie :

- Deux signaux d'intégration 2H chacun résonant à 6,85 (d, $J = 8.4$ Hz) et 7,35 (d, $J = 8,4$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B substitué en position para.
- Trois signaux résonant à δ_H 8,04 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 6,91 (1H, dd, $J = 2 ; 8,4$ Hz) et 6,82 (1H, d, $J = 2$ Hz), correspondant respectivement aux protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-7.
- Un proton sous forme de singulet résonant à δ_H 8,14, relatif au proton H-2 d'une isoflavone.

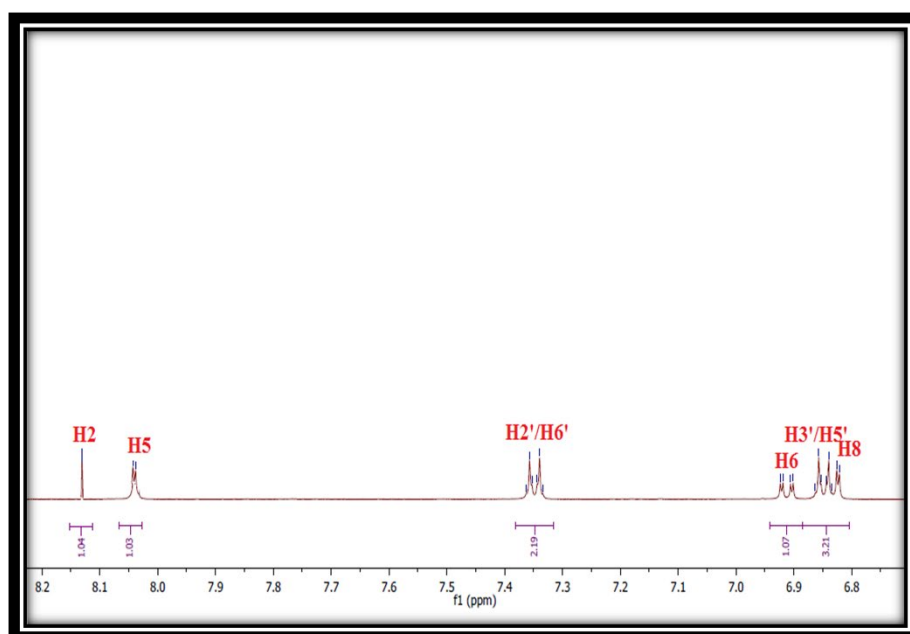


Figure III-53: Spectre RMN ^1H du produit CP1

L'analyse du spectre COSY (Figure III-54) montre des taches de corrélation entre les protons aromatiques H-5/H-6/H-8 et H-2'/H-3', H-6'/H-5' confirmant la présence des systèmes ABX et A_2X_2 pour les cycles A et B respectivement.

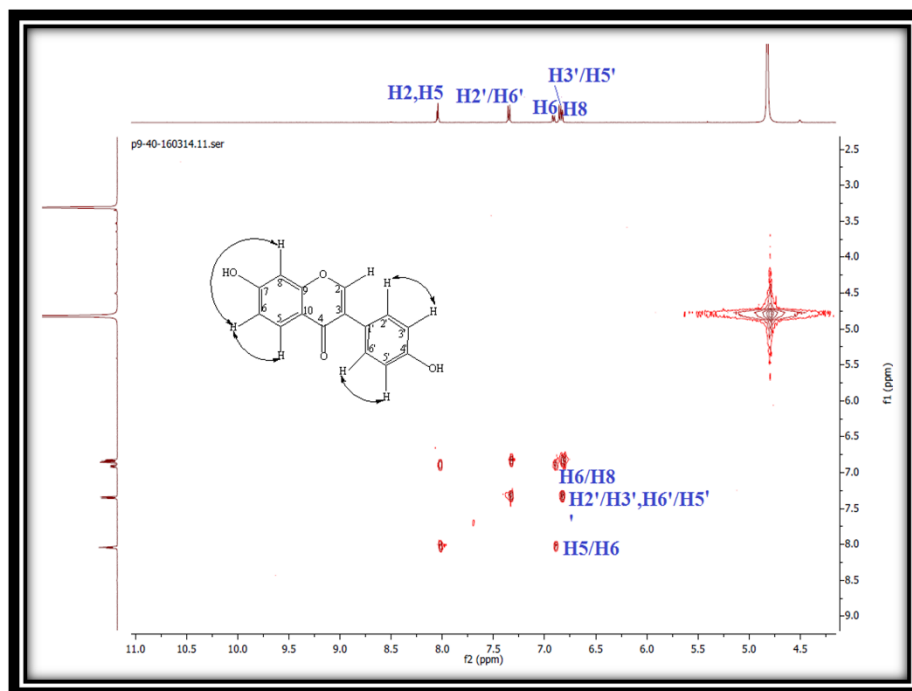


Figure III-54: Spectre COSY du produit CP1

L'attribution des déplacements chimiques des carbones du composé CP1 est assignée par l'analyse combinée des spectres RMN ^{13}C (Figure III-55), HSQC (Figure III-56) et HMBC (Figure III-57).

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Figure III-55) présente 13 signaux relatifs à 15 carbones.

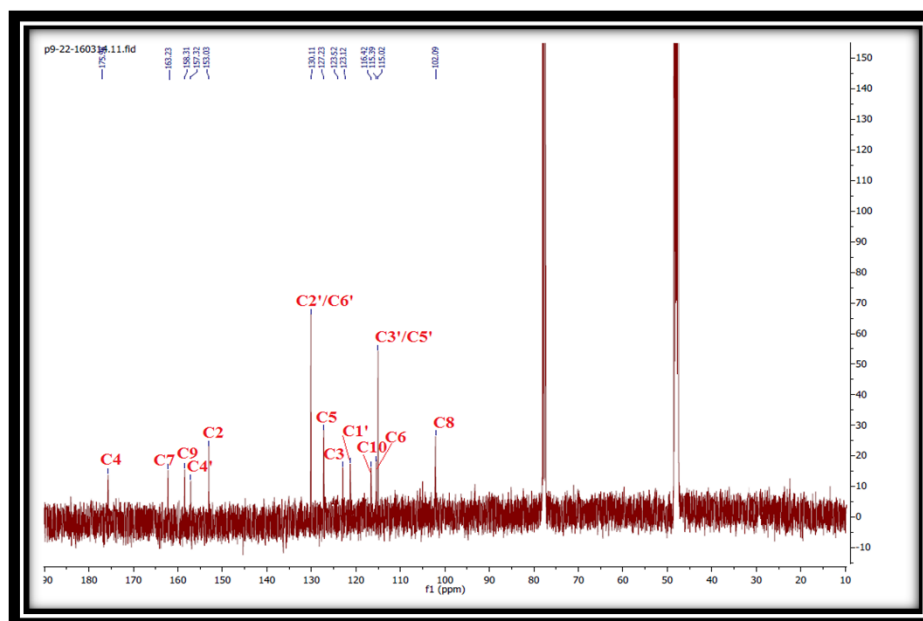


Figure III-55: Spectre RMN ^{13}C du produit CP1

Les carbones qui portent les protons identifiés précédemment sont localisés sur le spectre HSQC (Figure III-56) par les corrélations :

- H-3'/H-5' (δ_H 6,85) / C-3',C-5' (δ_C 115).
- H-2'/H-6' (δ_H 7,35) / C-2',C-6' (δ_C 130,1).
- H-5 (δ_H 8,04) / C-5 (δ_C 127,2).
- H-6 (δ_H 6,91) / C-6 (δ_C 115,3).
- H-8 (δ_H 6,82) / C-8 (δ_C 102,1).
- H-2 (δ_H 8,14) / C-2 (δ_C 153).

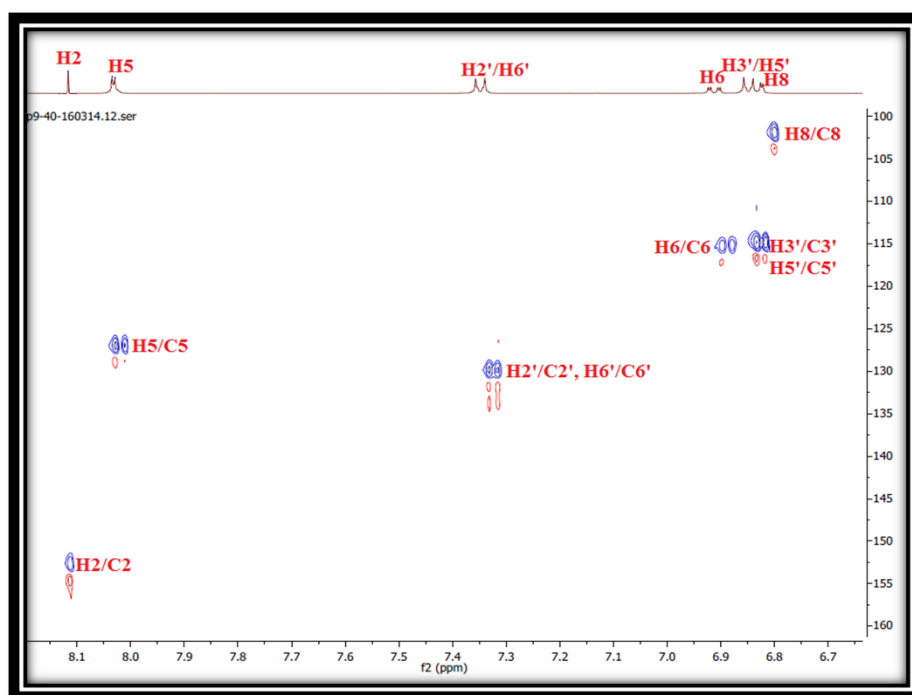


Figure III-56: Spectre HSQC du produit CP1

La nature isoflavonique du produit CP1 est bien confirmée par le déplacement chimique du carbone C-2 à δ_C 153, ainsi que la présence des taches de corrélations en HMBC (Figure III-57) entre le proton H-2 et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 158,3 correspond au carbone C-9. Ce carbone corrèle également avec les protons aromatiques H-5 (8,04 ,1H, d, $J = 8,4$ Hz) et H-8 (6,82 ,1H, d, $J = 2$ Hz).

En plus, ce spectre HMBC indique des corrélations entre le proton H-2 et les carbones quaternaires C-4 à δ_C 175,9, C-1' à δ_C 123,1 et C-3 à δ_C 123,5. Ce dernier carbone corrèle avec les deux protons H-2' et H-6' à δ_H 7,35. D'autres corrélations sont observés entre :

- Le carbone C-1' et les protons H-3' et H-5' à δ_H 6,85.
- Le proton H-5 à δ_H 8,04 avec deux carbones C-4 à δ_C 175,9 et un autre carbone quaternaire oxygéné à δ_C 163,2, attribué au carbone C-7.

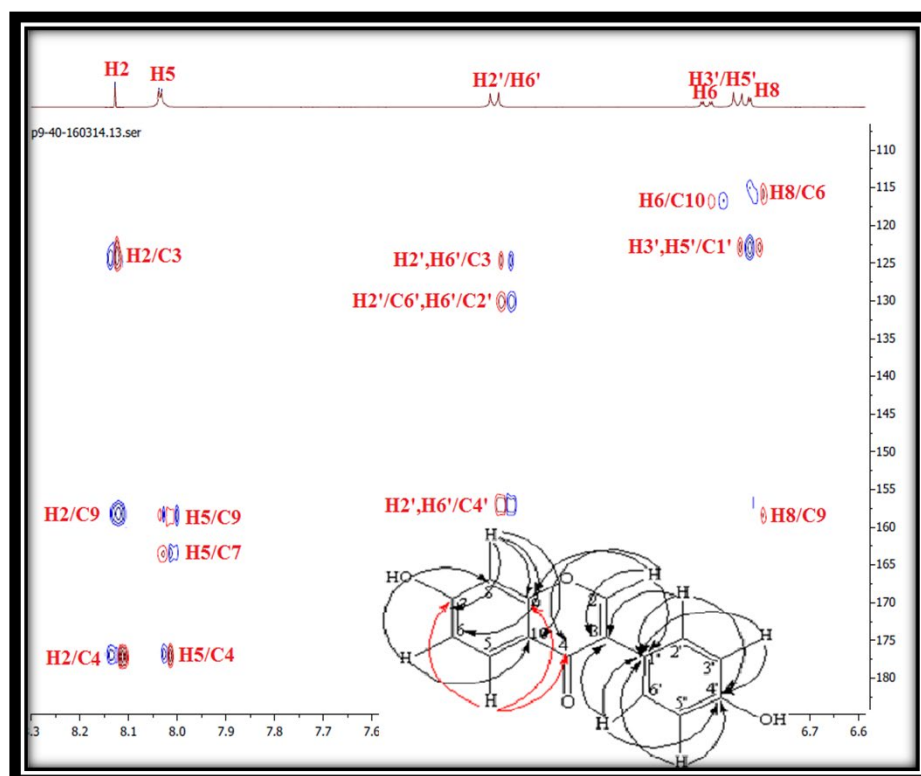


Figure III-57: Spectre HMBC du produit CP1

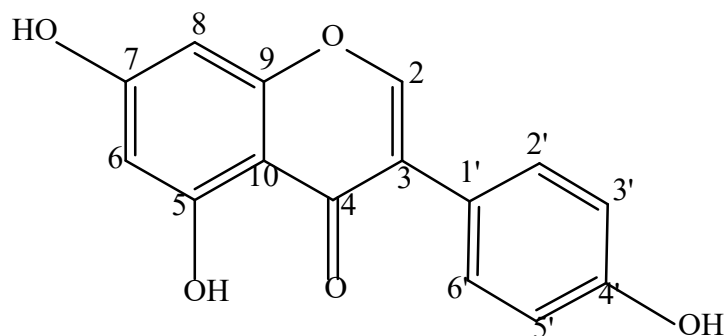
A la lumière de ces données spectrales et la comparaison avec les données de la littérature, le composé CP1 est identifié comme étant: 4',7-dihydroxyisoflavone appelé également Daidzeine. Ce métabolite présente des propriétés pharmacologiques antimicrobiennes, anticancéreuses [50] et anti-oxydantes [51]. Il a été trouvé antérieurement dans les espèces du genre *Cytisus* telles que : *C. battundieri* Maire, *C. welwitschii*, *C. commutatus* (Willk.) Briq, *C. proliferus* L [52].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CP1 sont réunis dans le tableau suivant :

Tableau III-15 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du produit CP1 dans le CD_3OD .

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	153,0	8,14	s
3	123,5	/	/
4	175,9	/	/
5	127,2	8,04	d ($J = 8,4$)
6	115,3	6,91	dd ($J = 2-8,4$)
7	163,2	/	/
8	102,1	6,82	d ($J = 2$)
9	158,3	/	/
10	116,4	/	/
1'	123,1	/	/
2'	130,1	7,35	d ($J = 8,4$)
3'	115,0	6,85	d ($J = 8,4$)
4'	157,3	/	/
5'	115,0	6,85	d ($J = 8,4$)
6'	130,1	7,35	d ($J = 8,4$)

III-2-3-2-Elucidation structurale du produit CP2



4', 5, 7-trihydroxyisoflavone

Le composé **CP2** est purifié sous forme poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible à l'UV, sa couleur jaune obtenue après analyse CCM et révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage plaide pour un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI⁺ (Figures III-58) du composé CP2 donne deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 271$ [M+H]⁺ et $m/z = 541$ [2M+H]⁺ suggérant une masse moléculaire de 270 uma correspondant une formule brute en C₁₅H₁₀O₅.

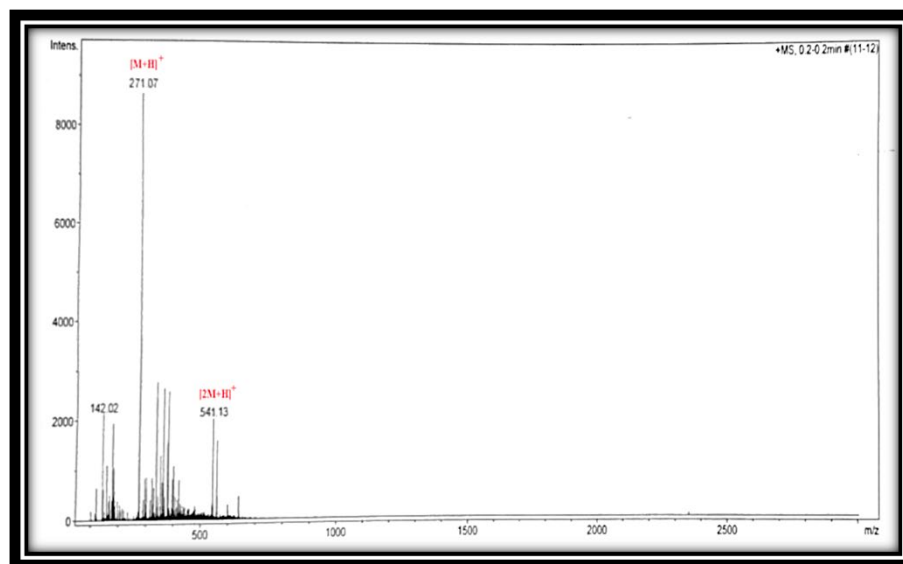


Figure III-58: Spectre de masse ESI⁺ du produit CP2

Le profil du spectre RMN ¹H (Figures III-59) de ce composé est proche de celui du composé CP1 identifié précédemment, la seule différence entre ces deux composés est l'absence du signal du proton H-5 à δ_H 8,04. On observe sur ce spectre :

- Un signal sortant à δ_H 7,84 (1H, s) caractéristique du proton en position 2 du noyau isoflavone.
- Deux signaux repérés à δ_H 6,82 (2H, d, $J=8,5$ HZ) et 7,32 (2H, d, $J=8,5$ HZ) correspondant aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' respectivement.
- Deux signaux résonant à δ_H 6,37 (1H, d, $J=2$ HZ) et 6,41 (1H, d, $J=2$ HZ) attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.

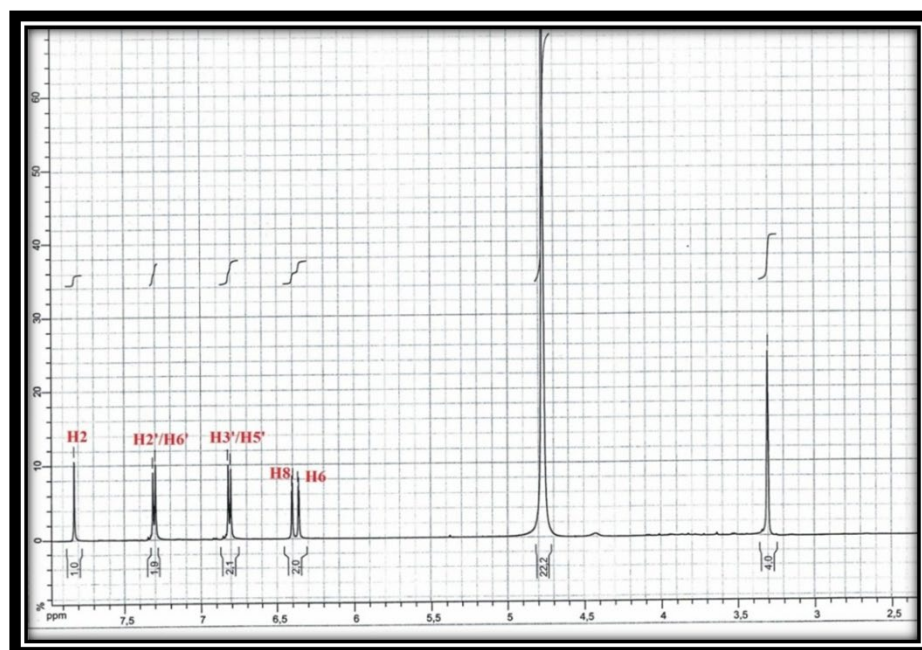


Figure III-59: Spectre RMN 1H du produit CP2

Les corrélations de ces protons sur le spectre HSQC (Figures III-60) ont permis de visualiser les déplacements chimiques de leurs carbones à δ_C 152,9 (C-2), 98,3 (C-6) ; 93,1 (C-8) ; 114,9 (C-3', C-5') ; 130,3 (C-2', C-6').

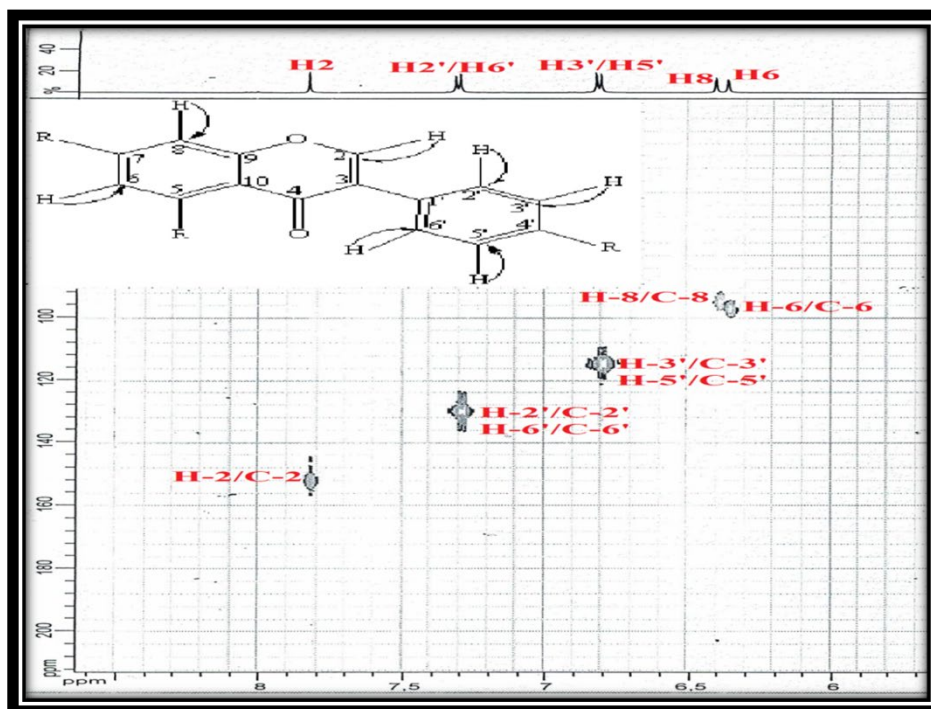


Figure III-60: Spectre HSQC du produit CP2

L'analyse du spectre COSY (Figure III-61) permet d'observer les corrélations entre les protons aromatiques : H-6/H-8 du cycle A et H-2'/H-3', H-6'/H-5' du cycle B.

La multiplicité du proton H-6 (d, $J = 2$ Hz), ainsi que le déplacement du carbone C-5 à δ_C 162,6 indiquent la substitution du proton H-5 par un groupement hydroxyle. Ceci est bien confirmé par l'absence du couplage H-5/H-6 sur le spectre COSY (Figure III-61).

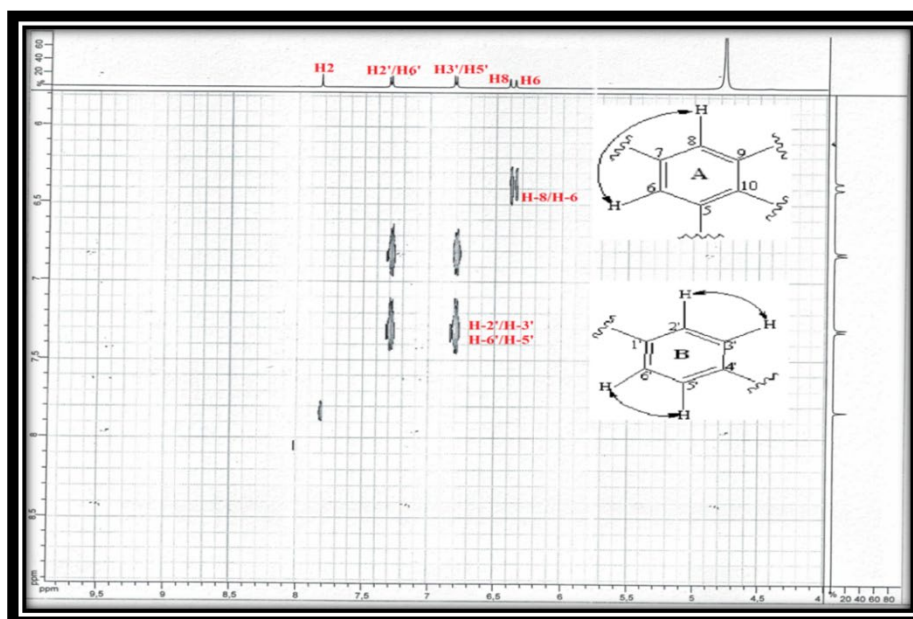


Figure III-61 : Spectre COSY H-H du produit CP2

Le spectre RMN¹³C (Figure III-62) montre 13 signaux relatifs aux 15 atomes de carbones, avec des déplacements chimiques similaires aux carbones du composé CP1 sauf pour le carbone C-5 oxygéné dans le composé CP2.

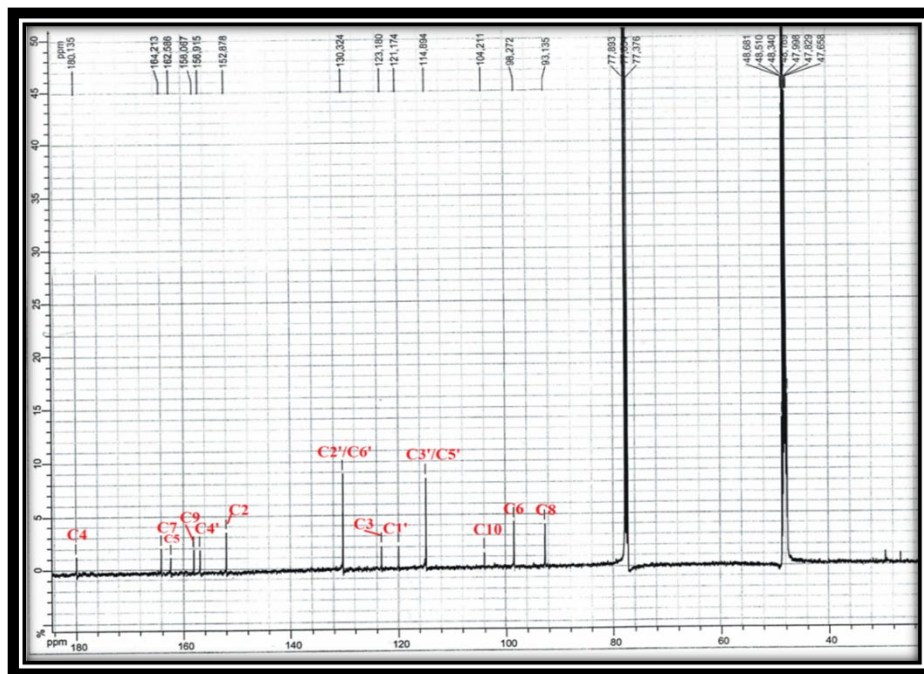


Figure III-62 : spectre RMN ¹³C du produit CP2

L'expérience HMBC (Figure III-63) permet de visualiser les corrélations suivantes entre :

- Le carbone aromatique quaternaire résonnant à 121,2 ppm et les protons H-3'/ H-5' et H-2 localisés à 6,82 et 7,84 ppm, ce carbone ne peut être que C-1'.
- Le carbone quaternaire sortant à δ_C 123,2 et les protons H-2 et H-2'/ H-6' repérés à 7,32 ppm, ce carbone est attribué au C-3.
- Le carbone quaternaire oxygéné C-9 détecté à 158,1 ppm et le proton H-2.
- Le carbone quaternaire C-4' sortant à 156,9 ppm et les protons aromatiques du cycle B : H3'/ H5' et H2'/H6'.
- Le carbone aromatique oxygéné C-7 sortant à 164,2 ppm et le proton H-8.

On outre, des corrélations sont observées sur le spectre HMBC entre le proton aromatique H-6 à δ_H 6,37 et les carbones C-8 (δ_C 93,1), C-10 (δ_C 104,2) et C-5 (δ_C 162,6).

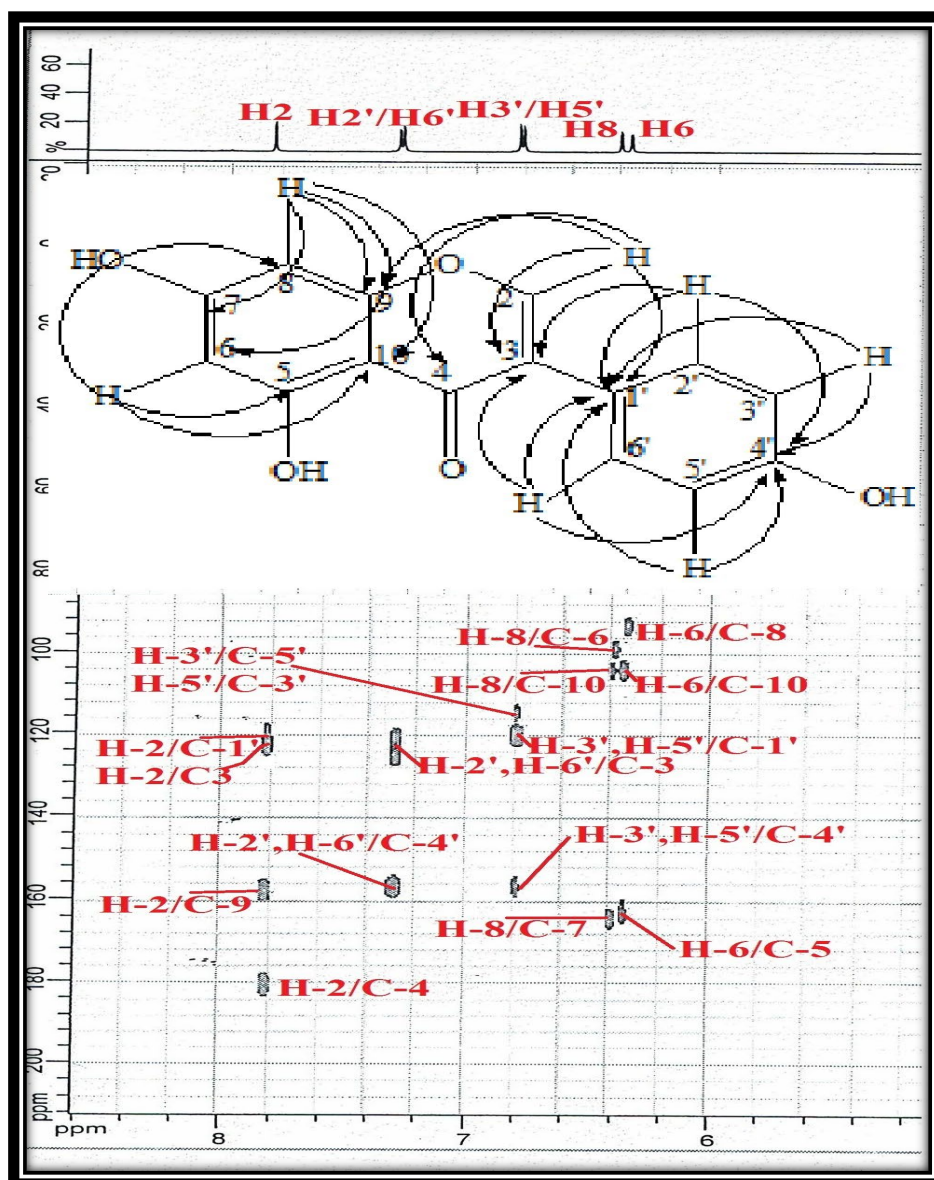
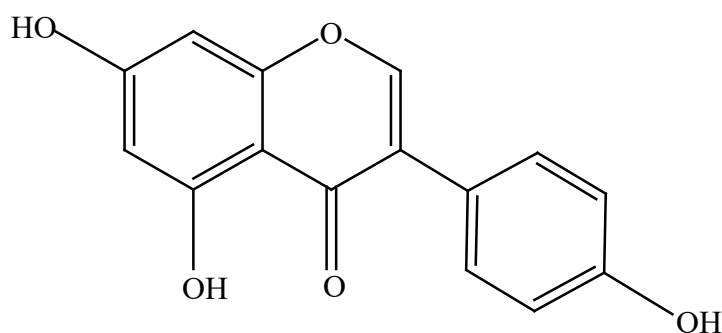


Figure III-63 : spectre HMBC du produit CP2

L'ensemble de ces données spectroscopiques ainsi que la comparaison avec les données bibliographiques permettent d'identifier le composé CP2 au 4',5,7 trihydroxyisoflavone, connu sous le nom de Génistéine.



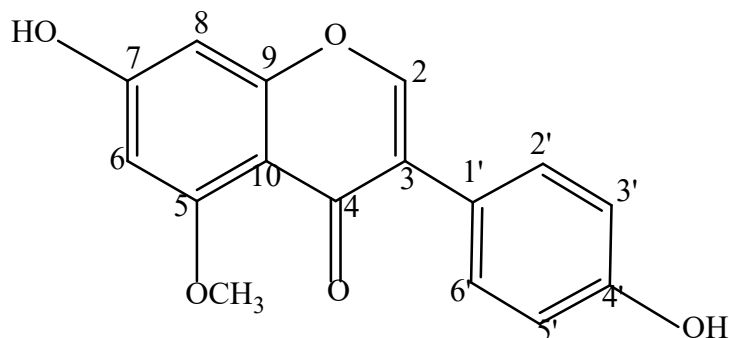
Ce composé a été purifié de plusieurs espèces du genre *Cytisus* telles que : *C. villosus* Pourr [53], *C. scoparius* [54], *C. battundieri* Maire, *C. welwitschii*, *C. commutatus* (Willk.) Briq, *C. proliferus* L, *C. eriocarpus* R. Br [52]. Plusieurs études biologiques ont révélé que la Génistéine possède des activités anticancéreuse, anti-oxydante, antimicrobienne [55] et anti-inflammatoire [56].

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau III-16.

Tableau III-16: Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du produit CP2 dans CD₃OD.

position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	Multiplicité, J(Hz)
2	152,9	7,84	s
3	123,2	/	/
4	180,1	/	/
5	162,6	/	/
6	98,3	6,37	d (J=2)
7	164,2	/	/
8	93,1	6,41	d (J=2)
9	158,1	/	/
10	104,2	/	/
1'	121,2	/	/
2'	130,3	7,32	d (J=8,5)
3'	114,9	6,82	d (J=8,5)
4'	156,9	/	/
5'	114,9	6,82	d (J=8,5)
6'	130,3	7,32	d (J=8,5)

III-2-3-3-Elucidation structurale du produit CP3



7, 4' dihydroxy-5-méthoxyisoflavone

Le composé **CP3** est obtenu sous forme d'une poudre blanche visible sous l'UV. Il se colore en jaune après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

Le spectre de masse établi en ESI⁺ (Figure III-64) présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 285 identifiable à [M+H]⁺ et à m/z 591 identifiable à [2M+Na]⁺, en accord avec une masse moléculaire de 284 uma et une formule brute C₁₆H₁₂O₅.

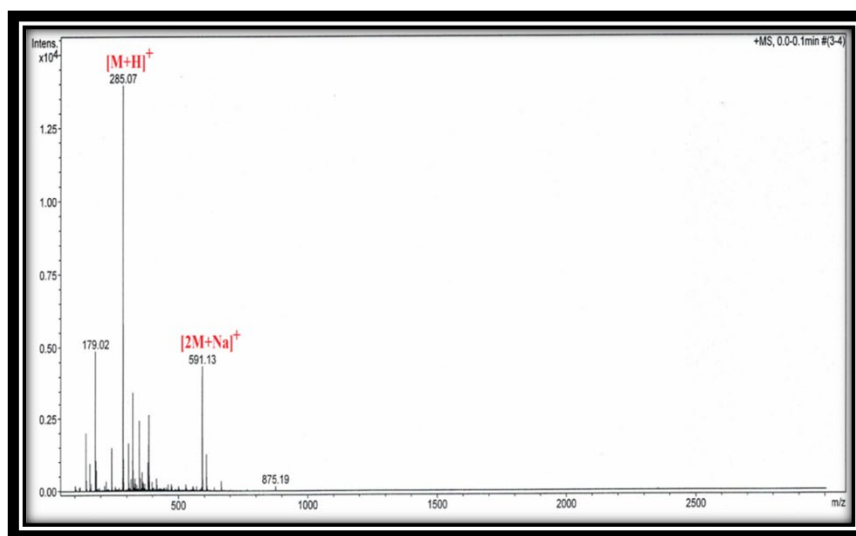


Figure III-64: Spectre de masse ESI⁺ du produit CP3

Les spectres RMN ¹H (Figure III-65), RMN ¹³C (Figure III-66) HMBC (Figure III-68) du composé CP3 présentent une grande ressemblance avec ceux du produit CP2. L'unique différence entre ces deux composés est la présence d'un groupement méthoxyle à δ_H 3,90 (s, 3H)/ δ_C 55,9 Ce dernier est bien confirmé par la différence de 14 uma entre les masses moléculaires des composés CP2 et CP3.

L'examen du spectre RMN¹H permet de visualiser les signaux du squelette génistéine suivants :

- Un signal sous forme de singlet d'intégration 1H détecté à δ_H 7,96 caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- Deux signaux sous forme de doublets d'intégration 2H chacun localisés à $\delta_H = 6.84$ et 7.35 ppm ($J = 8,8$ Hz) correspondant aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement.
- Un singlet repéré à $\delta_H = 6,43$ ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-6 et H8 suggérant la disubstitution du noyau A.

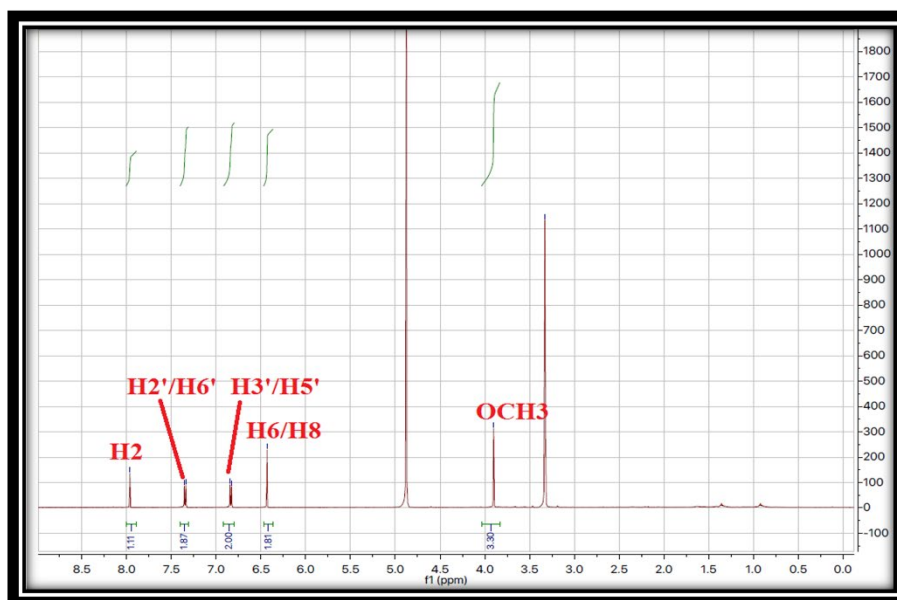


Figure III-65: Spectre RMN ¹H du produit CP3

L'étude combinée des spectres RMN ¹³C (Figure III-66) et HSQC (Figure III-67) permet d'attribuer tous les signaux des carbones du composé CP3 correspondant à :

C-2 à δ_C 151,1 ; C-3 à δ_C 125,5 ; C-4 à δ_C 174,9 ; C-5 à δ_C 161,6 ; C-6 à δ_C 96,2 ; C-7 à δ_C 162,9 ; C-8 à δ_C 94,8 ; C-9 à δ_C 160,1 ; C-10 à δ_C 107,8 ; C-1' à δ_C 123,1 ; C- 2'/C-6' à δ_C 130,2 ; C- 3'/C-5' à δ_C 114,6 ; C-4' à δ_C 157,1 et OCH₃ à δ_C 55,9.

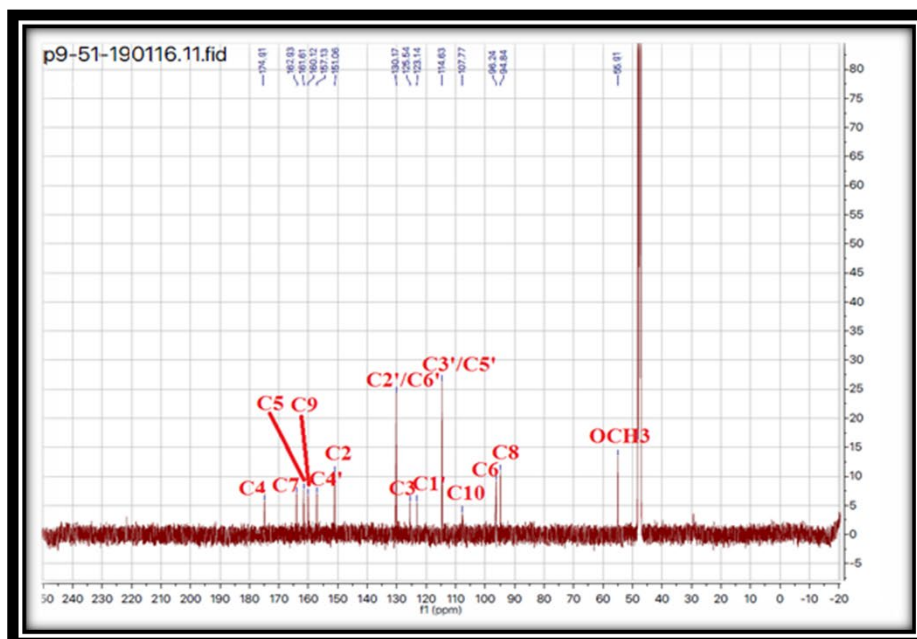


Figure III-66 : spectre RMN ^{13}C du produit CP3

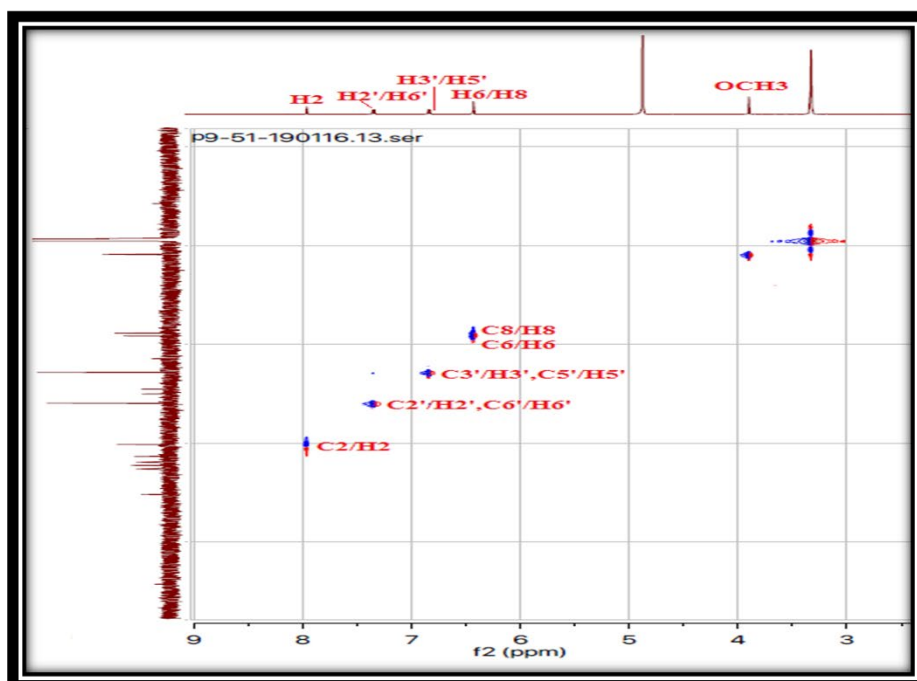


Figure III-67 : spectre HSQC du produit CP3

L'analyse du spectre HMBC (Figure III-68) permet de visualiser les corrélations au niveau des noyaux A, B et C. Une tache de corrélation observée sur ce spectre entre les protons OCH₃ à δ_{H} 3,90 et le carbone C-5 à δ_{C} 161,6 indique que ce groupement est localisé en position C-5.

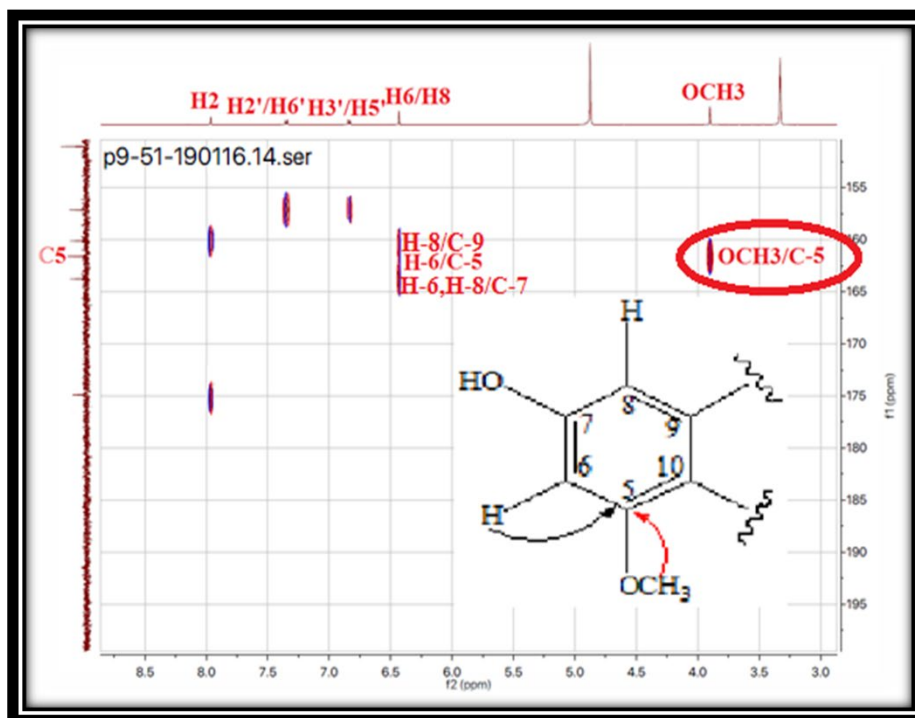
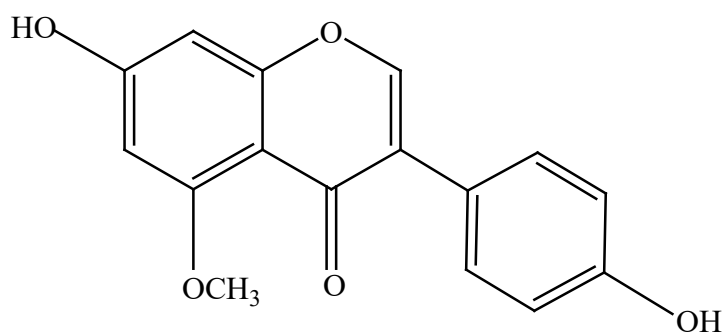


Figure III-68: Spectre HMBC du produit CP3

Toutes ces analyses spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [57, 58] permettent de déterminer le composé CP3 comme: 7, 4' dihydroxy-5-méthoxyisoflavone connu sous le nom Isoprunétine.



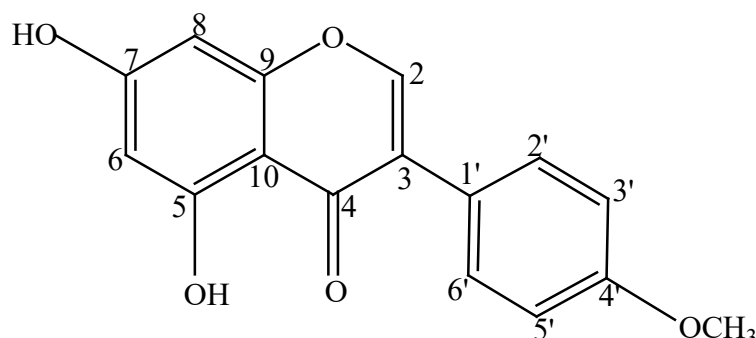
Ce composé est isolé antérieurement des espèces de la famille Fabaceae : *Genista tricuspidata* [59], *Genista aspalathoides* [55], *Genista microcephala* [60], *Phaseolus coccineus* [61]. Il est détecté pour la première fois dans le genre *Cytisus*.

Tous les déplacements chimiques des protons et des carbones sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau III-17: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du produit CP3 dans CD_3OD .

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	151,1	7,96	s
3	125,5	/	/
4	174,9	/	/
5	161,6	/	/
6	96,2	6,43	s
7	162,9	/	/
8	94,8	6,43	s
9	160,1	/	/
10	107,8	/	/
1'	123,1	/	/
2'	130,2	7,35	d ($J=8,8$)
3'	114,6	6,84	d ($J=8,8$)
4'	157,1	/	/
5'	114,6	6,84	d ($J=8,8$)
6'	130,2	7,35	d ($J=8,8$)
OCH₃	55,9	3,90	s

III-2-3-4-Elucidation structurale du produit CP4

**5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone**

Ce composé est nommé 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone. Il est purifié sous forme des aiguilles incolores visible en UV à 254 et 366 nm, se colore en jaune après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage.

La comparaison des spectres RMN ^1H des deux composés CP3 et CP4 (Figure III-65 et III-69) apparaissent totalement identiques par la présence de :

- Un singulet déblindé d'intégration 1H à δ_{H} 7,98 attribuable à H-2, caractérisant la structure isoflavone.
- Un singulet à δ_{H} 6,42 ppm d'intégration 2H correspondant aux protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A substitué en positions 5 et 7.
- Deux doublets d'intégration 2H à δ_{H} 6,82 ($J = 8,8$ Hz) et δ_{H} 7,33 ($J = 8,8$ Hz) attribuables aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant que le cycle B est substitué en position 4'.
- Un signal sortant à δ_{H} 3,88 sous forme de singulet d'intégration 3H attribuable à un groupement méthoxyle.

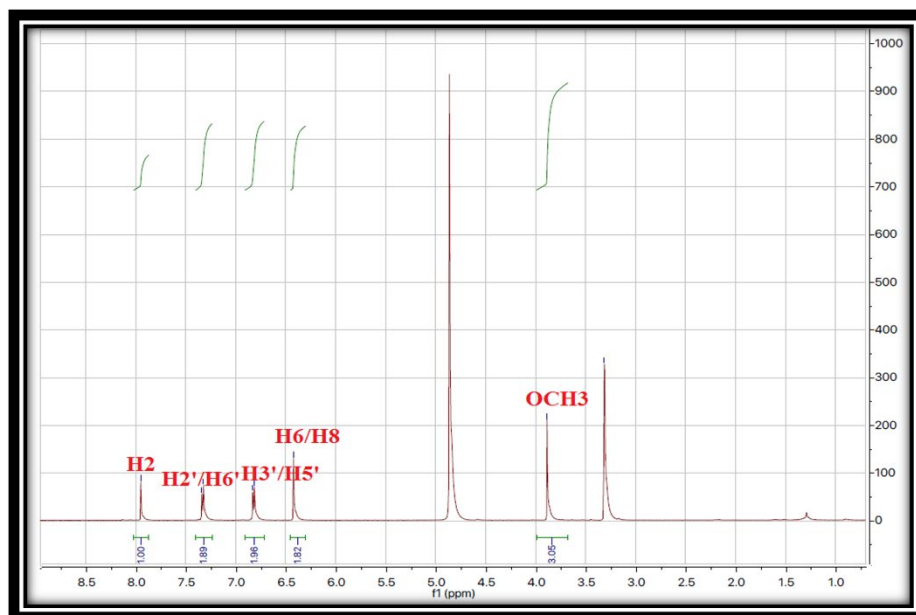


Figure III-69: Spectre RMN ^1H du produit CP4

L'analyse du spectre HMBC (Figure III-70) permet de localiser le branchement du groupement méthoxyle sur l'isoflavone par la présence d'une tache de corrélation entre ce groupement à δ_{H} 3,88 et le carbone quaternaire C-4' à δ_{C} 161,1. Ce dernier couple également avec les protons H3', H5' et H2', H6'.

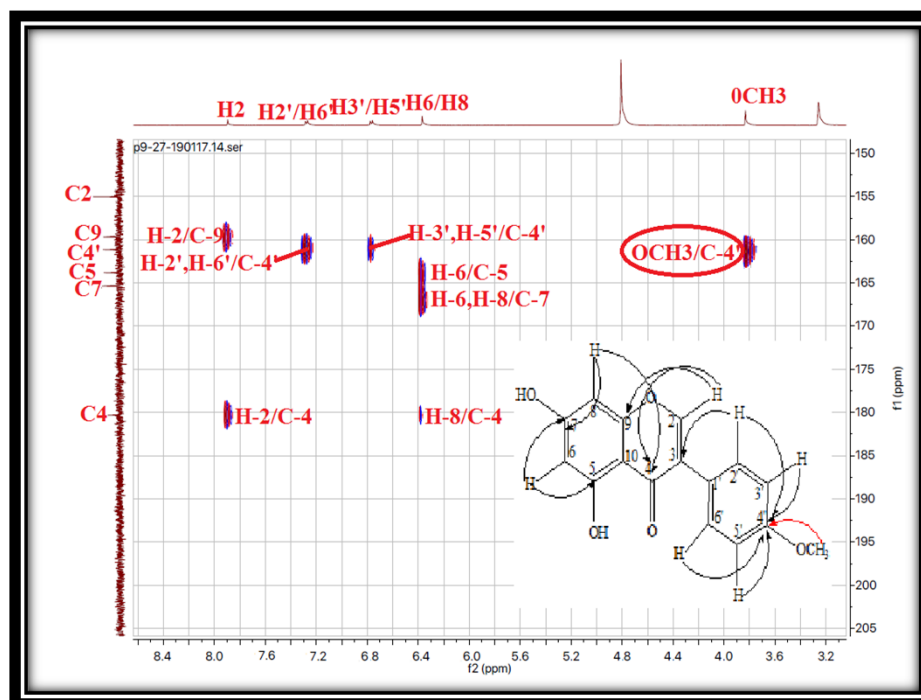


Figure III-70: Spectre HMBC du produit CP4

L'analyse similitude des spectres HSQC et HMBC permet de localiser les déplacements chimiques de tous les carbones du composé CP4 (Figure III-71).

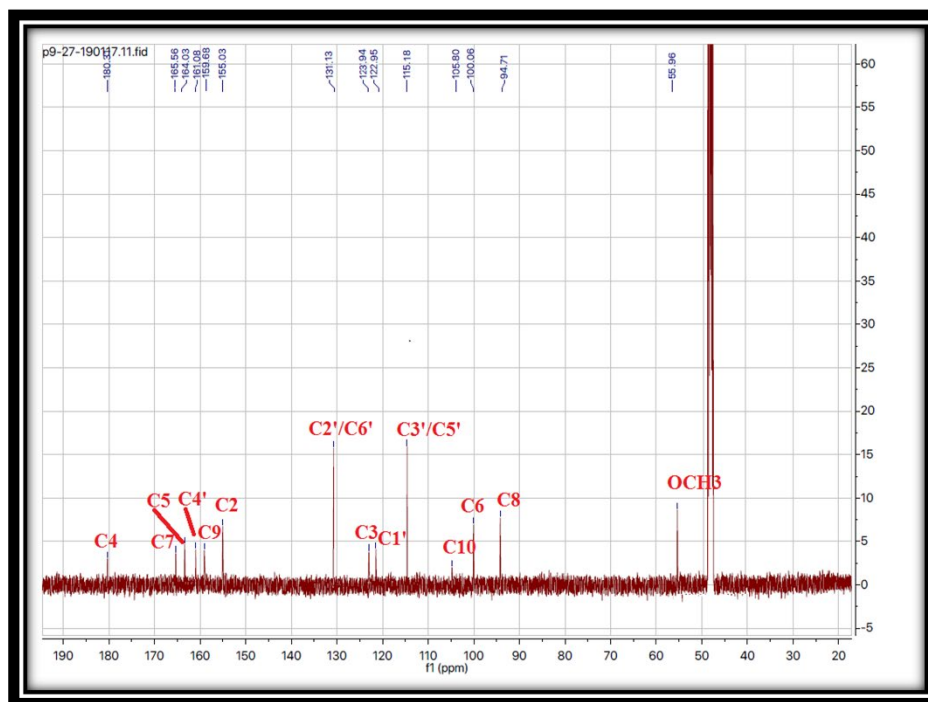
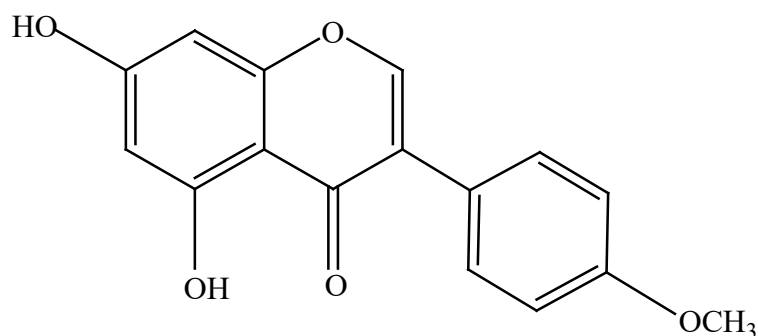


Figure III-71 : spectre RMN ^{13}C du produit CP4

Les données spectroscopiques illustrées dans le tableau III-19 et la comparaison avec celles de la littérature [62] nous conduit à déterminer le composé CP4 la structure suivante: 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone ou Biochanine A.



Ce composé a été isolé précédemment des espèces de la famille Fabaceae : *Dalbergia olivari* [63], *Dalbergia boehmii* Taub [64], *Genista tinctoria* [65], *Genista tridentata* L [66]. La Biochanine A est citée pour la première fois dans le genre *Cytisus*. Ce produit est connu pour

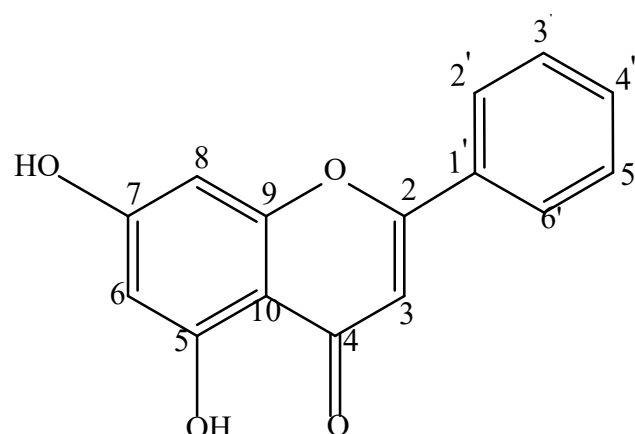
des activités biologiques : anti-inflammatoire [67], antibactérienne [68], anticancéreuse et anti-oxydante [69].

Tous les déplacements chimiques des protons et des carbones sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau III-18 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du produit CP4 dans le CD_3OD .

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
2	155,0	7,98	s
3	123,9	/	/
4	180,3	/	/
5	164,0	/	/
6	100,1	6,42	s
7	165,6	/	/
8	94,7	6,42	s
9	159,7	/	/
10	105,8	/	/
1'	122,9	/	/
2'	131,1	7,33	d ($J=8,8$)
3'	115,2	6,82	d ($J=8,8$)
4'	161,1	/	/
5'	115,2	6,82	d ($J=8,8$)
6'	131,1	7,33	d ($J=8,8$)
OCH₃	55,9	3,88	s

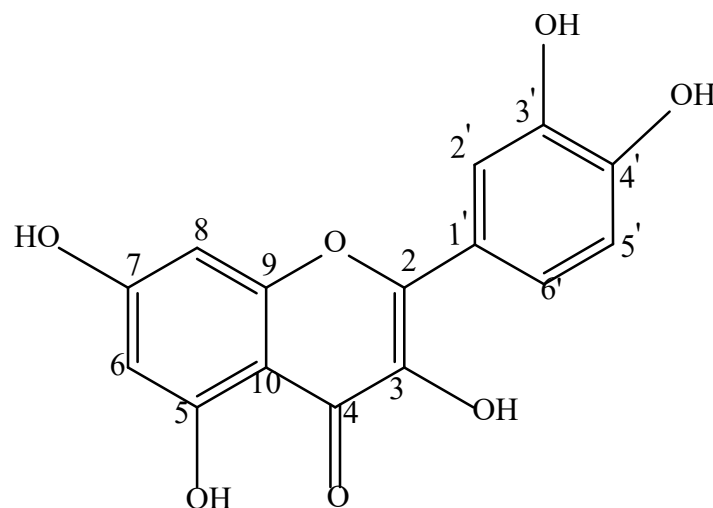
III-2-3-5-Elucidation structurale du produit CP5



Chrysin

Les données spectrales du composé **CP5** RMN ^1H et RMN ^{13}C sont totalement identiques avec celles du composé CR6 (Chrysin) purifié de la première plante. Ce métabolite a été détecté antérieurement dans plusieurs espèces du genre *Cytisus* telles que : *C. triflorus* l'Her [70], *C. multiflorus* [71], *C. villosus* Pourr [72].

III-2-3-6-Elucidation structurale du produit CP6



5, 7, 3', 4'-tétrahydroxyflavonol

Le composé **CP6** a été purifié sous forme d'une poudre jaune. Il est visible à la lumière UV à 254 et 366 nm, Sa CCM se colore en jaune après révélation d'une solution acide et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III-72) de ce produit exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 325$ $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 302 uma et une formule brute en $C_{15}H_{10}O_7$.

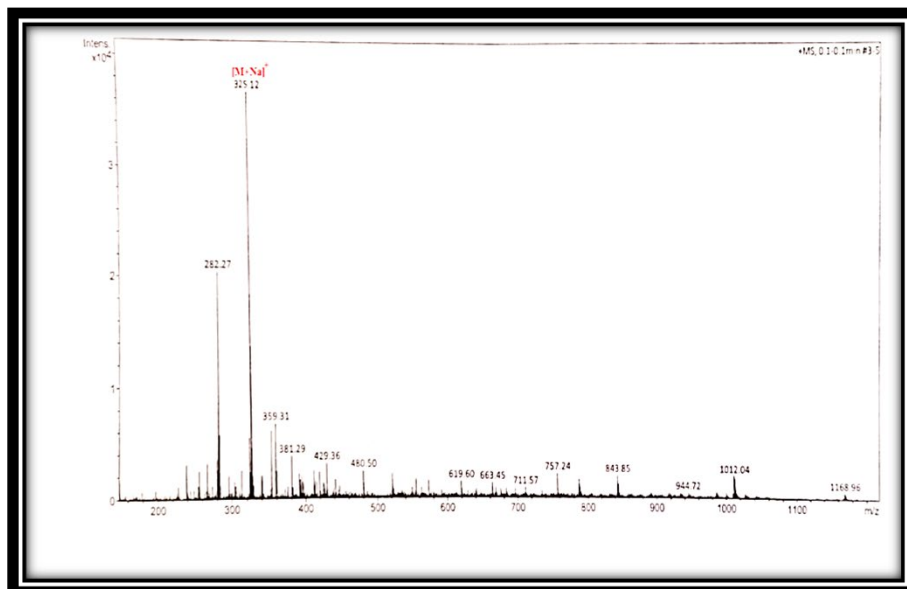


Figure III-72: Spectre de masse ESI-MS du produit CP6

Le spectre RMN 1H enregistré dans le méthanol (Figure III-73) montre la nature flavonoïdique du composé CP6, il présente deux signaux à δ_H 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz) et 6,36 (d, $J = 2,1$ Hz), attribués respectivement aux protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A substitué en positions C-5 et C-7.

Ce spectre permet d'observer également trois signaux à δ_H 6,90 (d, $J = 8,4$ Hz), 7,59 (dd, $J = 8,4 ; 2,1$ Hz) et 7,64 (d, $J = 2,1$ Hz) attribués respectivement aux protons H-5', H-6' et H-2' suggérant la présence d'un cycle B trisubstitué en positions C-1', C-3', C-4'.

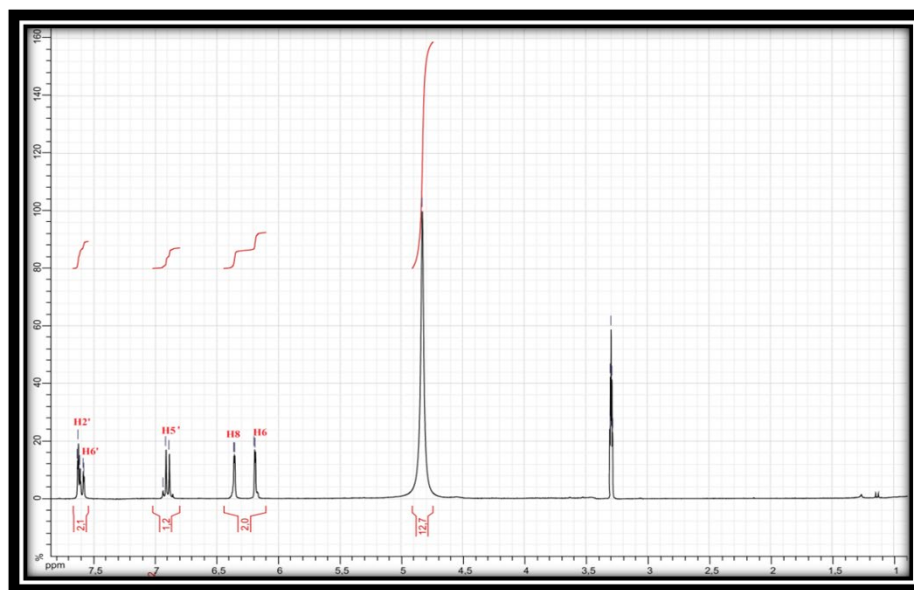


Figure III-73 : spectre RMN ^1H du produit CP6

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-74) montre 15 atomes de carbone répartis en:

- Dix carbones quaternaires résonants à δ_{C} 161,4 (C-5), 166,1 (C-7), 158,7 (C-9), 103,8 (C-10), 176,9 (C-4), 136,5 (C-3), 148,1 (C-2), 123,2 (C-1'), 146,6 (C-3'), 150,0 (C-4').
- Cinq CH aromatiques résonants à δ_{C} 100,0 (C-6), 94,9 (C-8), 116,6 (C-2'), 117,2 (C-5'), 121,1 (C-6').

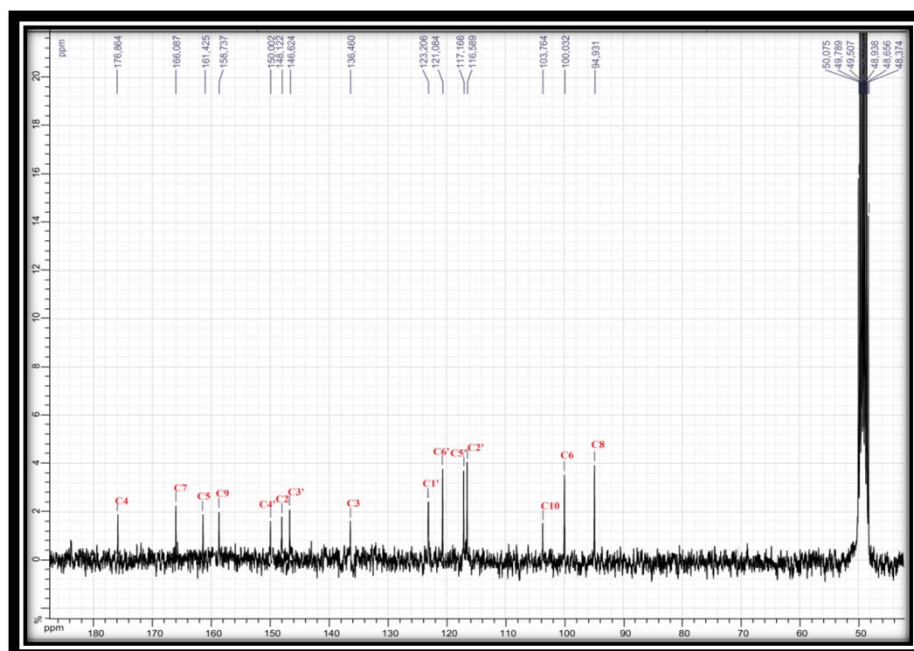


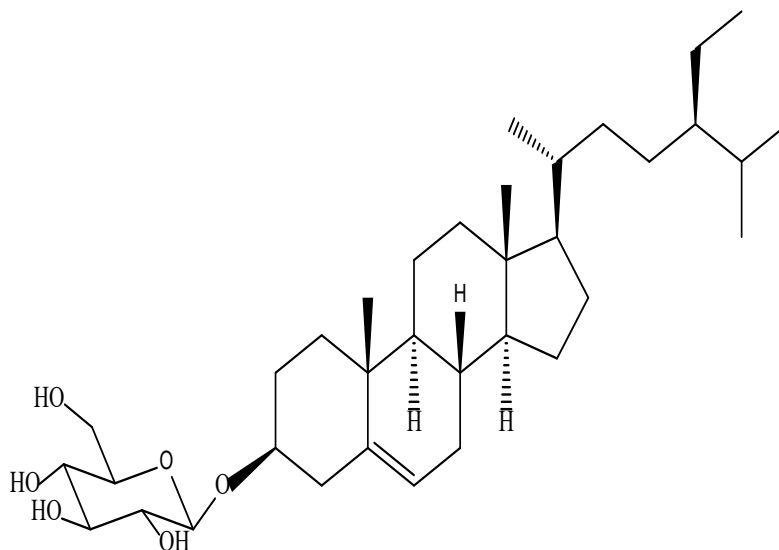
Figure III-74 : spectre RMN ^{13}C du produit CP6

La comparaison des données spectrales dans le tableau III-19 avec celles de la littérature nous permettent déterminer le composé CP6 comme étant 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol, connue sous le nom Quercétine. Il a été isolé antérieurement des espèces du genre *Cytisus* : *C. scoparius* [73], *C. albus* [74]. La quercétine possède des activités anti-oxydante et anti-inflammatoire [75], antimicrobienne, antiviral et anticancéreuse [76].

Tableau III-19 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (300 MHz) et RMN ^{13}C (75 MHz) du produit CP6 dans le CD_3OD .

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité, $J(\text{Hz})$
2	148,1	/	/
3	136,5	/	/
4	176,9	/	/
5	161,4	/	/
6	100,0	6,19	d ($J=2,1$)
7	166,1	/	/
8	94,9	6,36	d ($J=2,1$)
9	158,7	/	/
10	103,8	/	/
1'	123,2	/	/
2'	116,6	7,64	d ($J=2,1$)
3'	146,6	/	/
4'	150,0	/	/
5'	117,2	6,90	d ($J=8,4$)
6'	121,1	7,59	dd ($J=8,4-2,1$)

III-2-3-7-Elucidation structurale du produit CP7



Daucostérol

Le composé **CP7** a été identifié au Daucostérol par la comparaison avec l'analyse des spectres ESI⁺, RMN ¹H, RMN ¹³C du composé CR8 identifié précédemment. Il a été purifié des plusieurs espèces de la famille Fabaceae telles que : *Machaerium brasiliense* vogel [77], *Baphia leptobotrys* Harms [78], *Rubus parvifolius* [79], *Astragalus ernestii* [80]. Le Daucostérol est identifié pour la première fois dans le genre *Cytisus*.

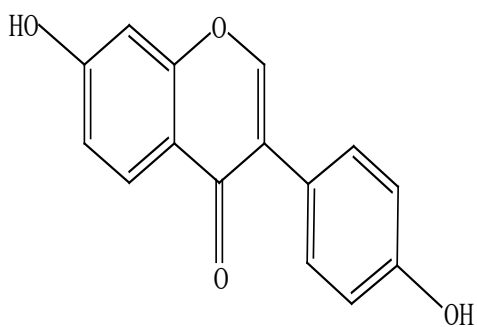
III-2-4-Conclusion

Ce travail décrit l'étude phytochimique de l'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth qui appartient à la famille Fabaceae. Elle est utilisée en médecine traditionnelle comme cardiotonique, diurétique et purgative.

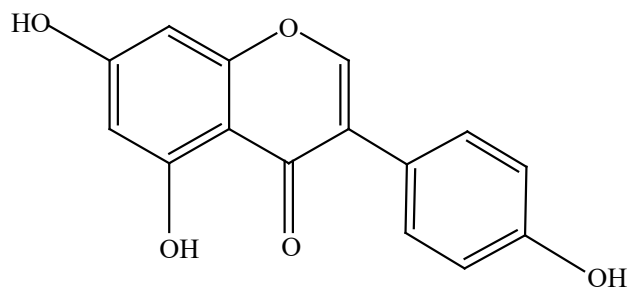
Cette étude est réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes conduisant à l'isolement et l'identification de sept composés grâce aux techniques chromatographiques (CC, CCE) et méthodes d'analyse spectroscopiques (RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC, HMBC, COSY H-H, ESI-MS) en plus la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés isolés sont constitués de :

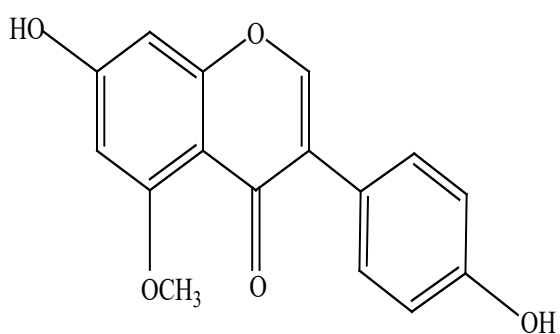
- ❖ Quatre isoflavones : **Daidzeine, Génistéine, IsoprUNETINE, Biochanine A.**



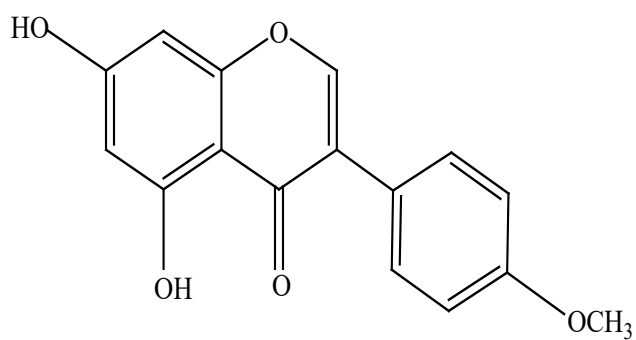
Daidzeine



Génistéine

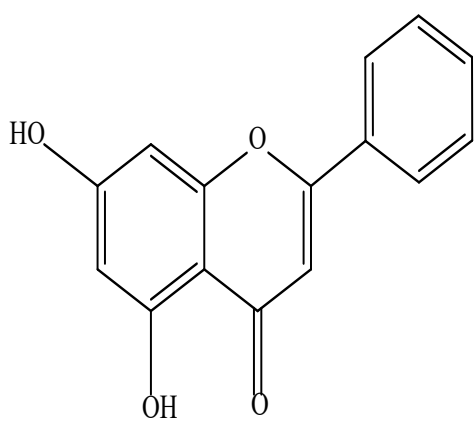


Isoprunetine

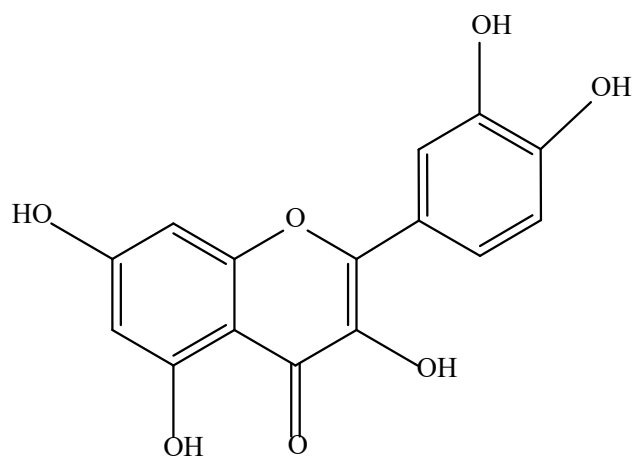


Biochanine A

❖ Un flavone : **Chry sine**, Un flavonol : **Quercétine**.

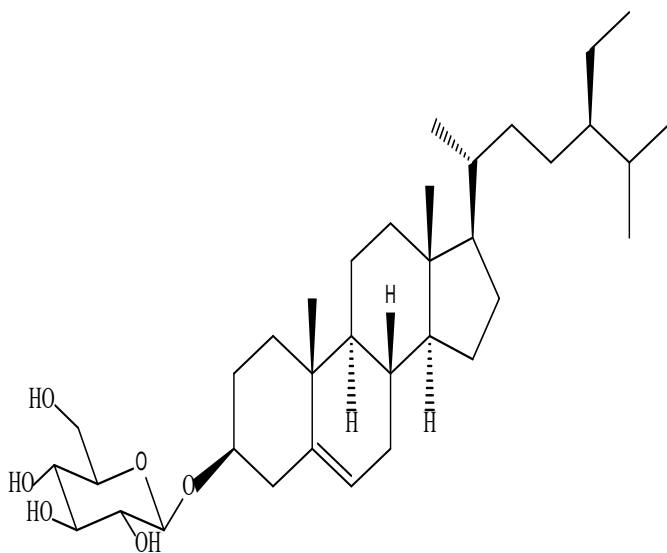


Chry sine



Quercétine

❖ Un phytostérol : **Daucostérol**.



Daucostérol

Références

- [1] K. R, Markham., B,Ternai., R,Stanley., H,Geiger. *Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives*. Tetrahedron, 34(9), 1389-1397. **1978**.
- [2] C,Karamenderes., E,Bedir., R,Pawar., S,Baykan. *Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from Centaurea hierapolitana*. Phytochemistry, 68(5), 609-615. **2007**
- [3] T.M,Kubacey., E.G, Haggag., S.A,El-Toumy., A.A,Ahmed., I.M,El-Ashmawy. *Biological activity and flavonoids from Centaurea alexanderina leaf extract*. J. Pharm. Res, 5(6), 3352-3361. **2012**.
- [4] N,Mezache., D,Bendjeddou., D, Satta., R, Mekkiou., S, Benayache. *Secondary metabolites from Centaurea lippii*. Chemistry of natural compounds, 46(5), 801-802. **2010**.
- [5] S,Lal Shyaula., G,Abbas., H,Siddiqui., S,Sattar., M, Iqbal Choudhary. *Synthesis and antiglycation activity of kaempferol-3-O-rutinoside (nicotiflorin)*. Medicinal Chemistry, 8(3), 415-420. **2012**.
- [6] A,Sala., M.C,Recio., G. R, Schinella., S,Máñez., R.M,Giner., M,Cerdá-Nicolás. *Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside*. European Journal of Pharmacology, 461(1), 53-61. **2003**.
- [7] J.F.R,Lobo., J.M,Vinther., R.M,Borges. *High-resolution α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in Eremanthus crotonoides (Asteraceae)*. Molecules, 21(6), 782. **2016**.
- [8] P,Chicaro., E,Pinto., P,Colepicolo., J.L.C,Lopes. *Flavonoids from Lychnophora passerina (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants*. Biochemical systematics and ecology, 32(3), 239-243. **2004**.
- [9] D.K,Patel. P-MN005. *Pharmacological importance and biological potential of apigenin for the treatment of neurodegenerative disorders: investigation through numerous scientific research data analysis in the medicine*. Clinical Neurophysiology, 132(8), e103. **2021**.
- [10] G,Flamini., C,Bulleri. *Secondary constituents from Centaurea horrida and their evolutionary meaning*. Biochem. Syst. Ecol. 30, 1051e1054. **2002**.

- [11] S.A,Ahmed. *Cytotoxic activities of flavonoids from Centaurea scoparia*. The Scientific World Journal, **2014**.
- [12] S,Akkal., F,Benayache., K,Medjroubi., F,Tillequin. *Flavonoids from Centaurea furfuracea (Asteraceae)*. Biochemical systematics and ecology, 31(6), 641-643. **2003**.
- [13] A,Bentamène., R,Boucheham., M,Baz., S,Benayache., J,Creche. *Flavonoid glucosides from Centaurea Sphaerocephala*. Chemistry of Natural compounds, 46(3), 452-453. **2010**.
- [14] D,Gülcemal., O,Alankus-Çaliskan., C,Karaalp., A,U,Örs., P,Ballar. *Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from Centaurea urvillei DC. subsp. Urvillei*. Carbohydrate Research 345, 2529-2533. **2010**.
- [15] T,Ersöz., U.S,Harput., I,Saracoğlu. *Phenolic Compounds from Scutellaria pontica*. Turk. J. Chem. 26, 581–588. **2002**.
- [16] F,Moussaoui., A,Zellagui., N,Segueni., A,Touil. *Flavonoid Constituents from Algerian Launaea resedifolia (O.K.) and Their Antimicrobial Activity*. Rec. Nat. Prod. 4, 91–95. **2010**.
- [17] M,Funakoshi-Tago., K,Nakamura., K,Tago., T,Mashino. *Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin*. International immunopharmacology, 11(9), 1150-1159. **2011**.
- [18] N,Khandelwal., Y,Chander., R,Kumar., T,Riyesh., R.K,Dedar., M,Kumar., B.R,Gulati., S,Sharma., B.N,Tripathi., S,Barua. *Antiviral activity of Apigenin against buffalopox: Novel mechanistic insights and drug-resistance considerations*. Antiviral Research, 181, 104870. **2020**.
- [19] M,Shoeb., S,Celik., M,Jaspars., Y,Kumarasamy., S.M,MacManus., L,Nahar., P.K,Thoo-Lin. *Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin a unique indole alkaloid from the seeds of Centaurea schischkinii*. Tetrahedron. 61(38): 9001-9006. **2005**.
- [20] P,Forgo., I,Zupkó., J,Molnár., A,Vasas., G,Dombi. *Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from Centaurea jacea L*. Fitoterapia, 83(5), 921-925. **2012**.
- [21] W,Senosy., A,Kamal., S,El-Toumy., E,Gendy. *Phenolic compounds and Hepatoprotective activity of Centaurea aegyptiaca L. on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats*. Journal of Advanced Pharmacy Research, 2(2), 123-132. **2018**.

- [22] M. T, Picher., E,Seoane. *Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from Centaurea aspera var. stenophylla*. *Phytochemistry*, 23(9), 1995-1998. **1984**.
- [23] A,Nacer., A,Bernard., J,Boustie., R,Touzani. *Aglycone flavonoids of Centaurea tougourensis from Algeria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(2), 230-231. **2006**.
- [24] L,Hammoud., R,Seghiri., S,Benayache., P,Mosset., A,Lobstein., M,Chaabi., F,Leon., I,Brouard., J,Bermejo. *A new flavonoid and other constituents from Centaurea nicaeensis All. var. walliana M*. *Natural product research*, 26(3), 203-208. **2012**.
- [25] P,Bashyal., P,Parajuli., R.P,Pandey. *Microbial biosynthesis of antibacterial chrysoeriol in recombinant Escherichia coli and bioactivity assessment*. *Catalysts*, 9(2), 112. **2019**.
- [26] C,Formisano., D,Rigano., F,Senatore., S,Bancheva., A,Maggio., S,Rosselli. *Flavonoids in Subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort.(Tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution and ¹³C-NMR Spectral Data*. *Chemistry and Biodiversity*, 9(10), 2096. **2012**.
- [27] D. Y, Choi., J. Y, Lee., M. R, Kim., E. R, Woo., Y. G, Kim. *Chrysoeriol potently inhibits the induction of nitric oxide synthase by blocking AP-1 activation*. *Journal of biomedical science*, 12(6), 949-959. **2005**.
- [28] A,Bentamene., M,Baz., R,Boucheham., S,Benayache., J,Creche. *Flavonoid aglycones from Centaurea sphaerocephala*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(2), 234-235. **2008**.
- [29] R,Seghiri., O,Boumaza., R,Mekkiou., S,Benayache., P,Mosset., J,Quintana., F,Estevez., F,Leon., J,Bermejo. *A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*. 2(3):114–118. **2009**.
- [30] R,Negrete Córdova., N,Backhouse Erazo., B,Bravo., S,Erazo., R,García. *Quelques flavonoïdes de Centaurea Floccosa Hook. et Arn*. **1987**.
- [31] U,Grienke., S,Radić Brkanac., V,Vujčić., E,Urban., S,Ivanković., R,Stojković., J.M,Rollinger., J,Kralj., A,Brozovic. *Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from Centaurea ragusina L*. *Frontiers in Pharmacology*. 9:972. **2018**.
- [32] S,Mouffok., H,Haba., C,Lavaud., C,Long. *Chemical constituents of Centaurea ophalotricha Coss. & Durieu ex Batt. & Trab*. *Rec. Nat. Prod*, 6(3), 292-295. **2012**.

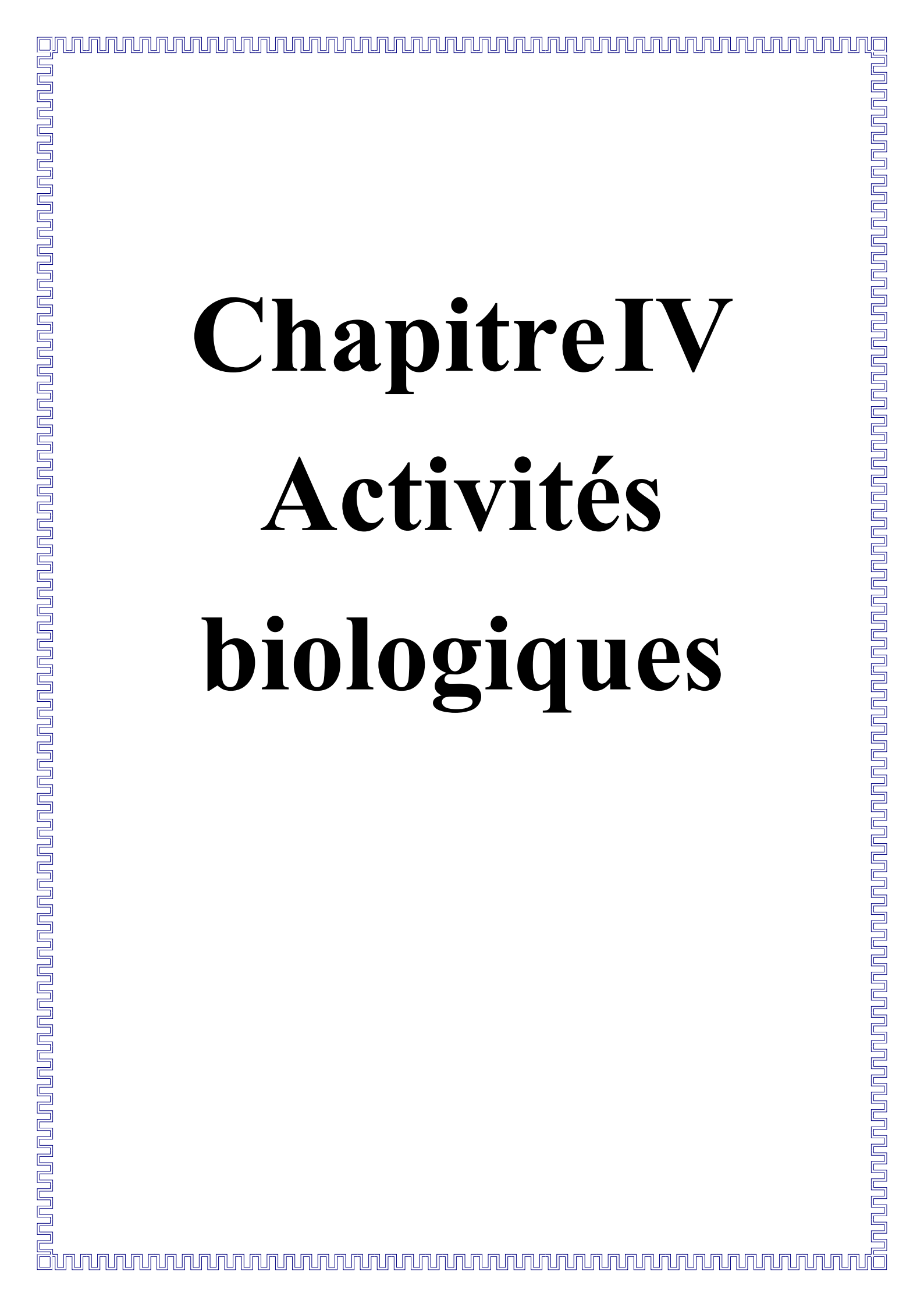
- [33] F,Guido., P,Maria., M,Ivano., E,Kuddisi., D,Huseyin., B,Yavuz. *Flavonoid glycosides from Centaurea pseudoscabiosa subsp. pseudoscabiosa from Turkey*. Phytochemistry. 61, 433-437. **2002**.
- [34] V,Tesevic., D,Djokovic., V,Vajs., P,Marin. *Constituents of the roots of plant species Centaurea scabiosa*. Chemical society. 59, 979-981. **1994**.
- [35] Y,Liu., X,Song., J,He., X,Zheng. *Synthetic derivatives of chrysin and their biological activities*. Medicinal Chemistry Research, 23(2), 555-563. **2014**.
- [36] L.P,Sun., A,Chen., H.C,Hung., Y.H,Chien., J.S,Huang., C.Y,Huang., Y.W,Chen. *Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis*. Journal of agricultural and food chemistry, 60(47), 11748-11758. **2012**.
- [37] E.R, Moghadam., H.L,Ang., S.E,Asnaf., Zabolian, A., Saleki, H., Yavari, M., H,Esmaili., A,Zarrabi., M,Ashrafizadeh. *Broad-spectrum preclinical antitumor activity of chrysin: current trends and future perspectives*. Biomolecules, 10(10), 1374. **2020**.
- [38] P,Dae-Sup., S.Z,Choi., K.K,Ran., L.S,Mee., L.K,Ro.*Immunomodulatory activity triterpens and phenolic compounds from Album L*. Journal of applied pharmacology 11, 1-4. **2004**.
- [39] A,Sen., P,Dhavan., K. K, Shukla., S,Singh. *Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from Momordica charantia*. Sci Secure J Biotechnol, 1(1), 9-13. **2012**.
- [40] D,Csupor., U,Widowitz., G,Blazsó., E,Laczkó-Zöld., J.S.N, Tatsimo., A,Balogh., K,Boros., B,Dankó., R,Bauer. *Anti-inflammatory Activities of Eleven Centaurea Species Occurring in the Carpathian Basin*. Phytotherapy Research. 27(4):540–544. **2013**.
- [41] G,Flamini., E,Antognoli. *Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of Centaurea bracteata from Italy*. Phytochemistry. 57(4):559–564. **2001**.
- [42] J.H,Lee., J.Y,Lee., J.H,Park., H.S,Jung., J.S,Kim., S.S,Kang., Y.S,Kim. *Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice*. Vaccine, 25(19), 3834-3840. **2007**.

- [43] S.B,Mahato. *¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features*. Phytochemistry, 37(6), 1517-1575. **1994**.
- [44] A.H,Meriçli. *Palmitic acid ester of sitosteryl 3 β -glucoside from *Centaurea regia**. Phytochemistry, 27(12), 3964-3965. **1988**.
- [45] M.B,Gallo. *Biological activities of lupeol*. Int. J. Biomed. Pharm. Sci, 3(1), 46-66. **2009**.
- [46] C.Y,Ragasa., J.R.V,Ebajo., M.M,De Los Reyes., E.H,Mandia., R,Brkljača. *Triterpenes from *Calophyllum inophyllum linn.** International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 7(4), 718-722. **2015**.
- [47] L,Che., Y, Li., R,Song., C,Qin., W,Hao., B,Wang., B,Wang., L,Yang. *Anti-inflammatory and anti-apoptosis activity of taraxasterol in ulcerative colitis in vitro and in vivo*. Experimental and Therapeutic Medicine, 18(3), 1745-1751. **2019**.
- [48] K,Sharma. *Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants*. Pharmacognosy Reviews, 9(17), 19. **2015**.
- [49] A,Sen., S,OzbasTuran. *Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea**. Pharmaceutical Biology, 55(1), 541-546. **2017**.
- [50] F,Hua., C.H,Li., X.G,Chen. *Daidzein exerts anticancer activity towards SKOV3 human ovarian cancer cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest, and inhibiting the Raf/MEK/ERK cascade Retraction in/10.3892/ijmm*. 2021.4929. International journal of molecular medicine, 41(6), 3485-3492. **2018**.
- [51] I.E,Orhan., F,Tosun., U,Tamer., A,Duran., B,Alan. *Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity*. J Serb Chem Soc. 1, 35-42. **2011**.
- [52] J.B,Harborne. *Chemosystematics of the leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genisteae*. Phytochemistry 8, 1449-1456. **1969**.
- [53] F,Larit., M.A,Nael., S,Benyahia., M.M,Radwan., F,León., I,Jasicka-Misiak., A,Poliwoda., D,Wieczorek., F,Benayache., S,Benayache., P,Wieczorek. *Secondary metabolites from the aerial parts of *Cytisus villosus Pourr.** Phytochemistry letters, 24, 1-5. **2018**.

- [54] R,Sundararajan., N.A,Haja., K,Venkatesan., K,Mukherjee., B.P,Saha., A,Bandyopadhyay. *Cytisus scoparius link-A natural antioxidant. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1-7. **2006**.
- [55] S,Hamza Sherif. *Synthesis, characterization, and antioxidant activities of genistein, biochanin A, and their analogues. Journal of Chemistry*. **2018**.
- [56] S. L, Wong., H.S,Chang., G.J,Wang., M.Y, Chiang., H.Y, Huang., C.H, Chen., S.C,Tsai., C.H, Lin. *Secondary metabolites from the roots of Neolitsea daibuensis and their anti-inflammatory activity. J. Nat. Prod.*, 74, 2489–2496. **2011**.
- [57] M,Kerkatou., A,Menad., D,Sarri., F,León., I,Brouard., R,Bouldjedj., P,Chalard., S,Ameddah., S,Benayache. *Secondary metabolites from Genista aspalathoides Lamk ssp. aspalathoides M. 2013*.
- [58] R,Boukaabache., N,Boubekri., O,Boumaza., R,Mekkiou., R,Seghiri., D,Sarri., F,Benayache. *Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of Genista quadriflora Munby (Fabaceae). Der Pharmacia Lettre*, 5(6), 56-59. **2013**.
- [59] O,Boumaza., R,Mekkiou., R,Seghiri., D,Sarri., S,Benayache., V.P,Garcia., J,Bermejo., F,Benayache. *Flavonoids and isoflavonoids from Genista tricuspidata. Chemistry of natural compounds*, 42(6), 730-731. **2006**.
- [60] D,Maanani., A,Zellagui., Y.S,Çakm., M,Asan-Ozusaglam., S,Rhouati., S,Akkal. *Phytochemical and biological activities of Genista microcephala coss. et dur. 2017*.
- [61] S.A,Adesanya., M.J,O'Neill. *Isoflavonoids from Phaseolus coccineus. Phytochemistry*, 24(11), 2699-2702. **1985**.
- [62] S.A,dos Santos., M.G,de Carvalho. *¹H-and ¹³C-NMR unambiguous assignments of isoflavones from Virola caducifolia. J. Braz. Chem. Soc*, 6, 349-352. **1995**.
- [63] C,Ito., M,Itoigawa., T,Kanematsu., N,Ruangrungsi., T,Mukainaka., H,Tokuda., H,Nishino. *Isoflavonoids from Dalbergia olivari. Phytochemistry*, 64(7), 1265-1268. **2003**.
- [64] J.P,Abdou., J,Momeni., A,Adhikari., N,Tsabang., A.T,Tchinda., M.I,Choudhary. *New coumestan and coumaronochromone derivatives from Dalbergia boehmii Taub.(Fabaceae). Phytochemistry Letters*, 21, 109-113. **2017**.

- [65] L,Tůmová. *The effect of UV light on isoflavonoid production in Genista tinctoria culture in vitro*. Acta physiologiae plantarum, 33(2), 635-640. **2011**.
- [66] D.C,Pinto., M.A,Simões. *Genista tridentata L.: A Rich Source of Flavonoids with Anti-inflammatory Activity*. Medicines, 7(6), 31. **2020**.
- [67] L,Kole., B,Giri., S.K,Manna., B,Pal. *Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFκB nuclear translocation*. European journal of pharmacology, 653(1-3), 8-15. **2011**.
- [68] K.X,Hu., X.C,Shi., D,Xu., P,Laborda., G.C,Wu., F.Q,Liu., P, Laborda. *Antibacterial mechanism of Biochanin A and its efficacy for the control of Xanthomonas axonopodis pv. glycines in soybean*. Pest Management Science, 77(4), 1668-1673. **2021**.
- [69] A,Sundaresan., T,Radhiga. *Biological activity of biochanin A: A review*. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4(1), 1-5. **2018**.
- [70] W,Benabderrahmane., A,Amrani., O,Benaissa., M,Lores., J.P,Lamas., T,de Miguel., F,Benayache. *Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial properties of ethyl acetate extract obtained from Cytisus triflorus l'Her*. Natural Product Research, 34(11), 1586-1590. **2020**.
- [71] O.R,Pereira., A.M,Silva., M.R,Domingues., S.M,Cardoso. *Identification of phenolic constituents of Cytisus multiflorus*. Food Chemistry, 131(2), 652-659. **2012**.
- [72] F,Larit.,M.A,Nael., S,Benyahia., M.M,Radwan., F,León., I,Jasicka-Misiak., A,Poliwoda., D,Wieczorek., F,Benayache., S,Benayache., P.P,Wieczorek. *Secondary metabolites from the aerial parts of Cytisus villosus Pourr*. Phytochemistry letters, 24, 1-5. **2018**.
- [73]R,Sundararajan., N.A,Haja., K,Venkatesan., K,Mukherjee., B.P,Saha., A,Bandyopadhyay. *Cytisus scoparius link-A natural antioxidant*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6(1), 1-7. **2006**.
- [74] D,Hanganu., L,Filip., N.K,Olah., A,Mocan., L,Vlase., O,Raita., I,Oniga. *Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity for Cytisus nigricans and Cytisus albus*. Farmacia, 64(6), 863-867. **2016**.

- [75] M, Lesjak., I,Beara., N,Simin., D,Pintać., T,Majkić., K,Bekvalac., D,Orčić. *Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives*. Journal of Functional Foods, 40, 68-75. **2018**.
- [76] M.T,Gatto. *Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters*. Bioorganic & medicinal chemistry 10.2: 269-272. **2002**.
- [77] J.F,Silva., G.R,Ximenez., M,Bianchin., J.O,Jasper., L.H,Pastorini., J.E,Carvalho., A.M, Pomini. *Isolation of hopane triterpenes and other constituents from Machaerium brasiliense vogel (Fabaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 93, 104182. **2020**.
- [78] A.K.N,Wonkam., C.A.N,Ngansop., M.A.T,Tchuenmogne., B.T,Tchegnitegni., G.T.M,Bitchagno., A.F, Awantu. *Chemical constituents from Baphia leptobotrys Harms (Fabaceae) and their chemophenetic significance*. Biochemical Systematics and Ecology, 96, 104260. **2021**.
- [79] Q.X,Mei., X.L,Chen., X.Xia., Z.J,Fang., H.B,Zhou., Y.Q,Gao. *Isolation and chemotaxonomic significance of chemical constituents from Rubus parvifolius*. Chinese Herbal Medicines, 8(1), 75-79. **2016**.
- [80] S.U.N, Li-Man., W.A.N.G, Xiao-Ling., D.E.N.G, Wen-Long., D.I.N.G, Li-Sheng. *Chemical constituents from Astragalus ernestii*. Chinese Journal of Natural Medicines, 9(1), 38-41. **2011**.

A decorative border with a repeating geometric pattern of interlocking squares and lines, rendered in a light blue color, frames the entire page.

Chapitre IV

Activités

biologiques

IV-1-Activité anti-oxydante

IV-1-1-Stress oxydatif

Les molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme et sont constamment contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (Figure IV-1) à cause d'une surproduction de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants [1, 2].

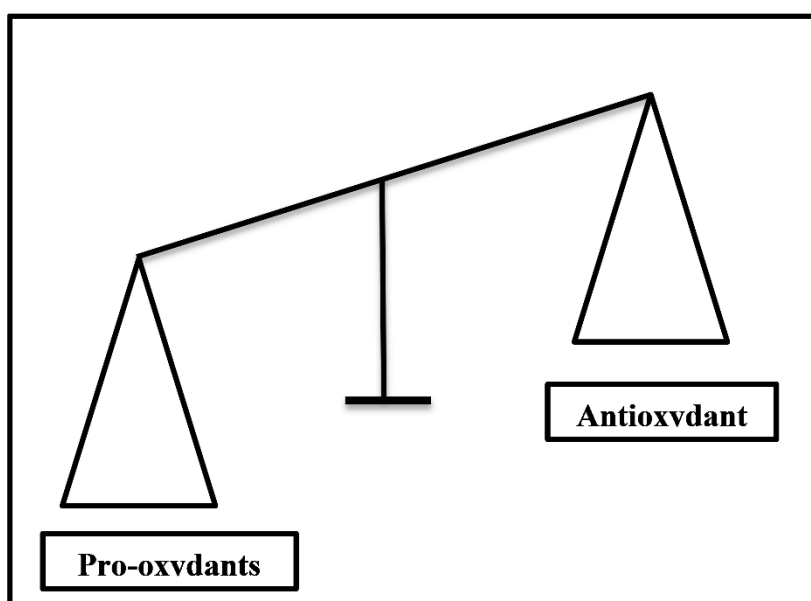


Figure IV-1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants

IV-1-2-Conséquence du Stress oxydatif

En réagissant avec des composants cellulaires importants (ADN, lipides et protéines), les radicaux libres peuvent être à l'origine de maints dommages sur tout l'organisme humain et accélèrent ainsi le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète) et la dégradation des cellules et des tissus [3, 4, 5].

IV-1-3-Anti-oxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de

petites molécules hydro-ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [6].

IV-1-3-1-Antioxydants enzymatiques

Trois types d'enzymes antioxydants sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [7] :

- ❖ Les super-oxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [8, 9].
- ❖ La catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci [10, 11].
- ❖ La glutathion peroxydase (GPO) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène [12].

IV-1-3-2-Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs.

Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

- ❖ Acide ascorbique (vitamine C).
- ❖ Tocophérols (dont la vitamine E).
- ❖ Caroténoïdes.
- ❖ Les polyphénols.

IV-1-3-3-Conditions d'utilisation des antioxydants:

Il est habituel de dire qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres, néanmoins leur utilisation en alimentation doit répondre à quelques exigences, citons entre autres :

- ❖ Solubilité dans les graisses.
- ❖ Efficacité à faible dose.
- ❖ Non toxicité.
- ❖ N'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable.

- ❖ Résistants aux processus technologiques.
- ❖ Stabilité dans le produit fini [13, 14].

IV-2-Activité antimicrobienne

IV-2-1-Introduction

Les microbes sont des êtres vivants rencontrés dans des environnements très divers y compris le corps humain sur la peau, dans la bouche, les intestins et sur les diverses muqueuses. Ils contribuent, au développement du système immunitaire du corps à la digestion des fibres à l'apport en vitamines B et K. Par conséquent, les microbes concourent à la santé et au bien-être de leurs hôtes humains [15]. Toutefois ils peuvent être pathogènes et à l'origine de plusieurs maladies infectieuses périlleuses nécessitant des médicaments pour les éradiquer.

L'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multi résistance aux antibiotiques constitue une des motivations essentielles à la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. De nombreux travaux antérieurs étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir anti-microbien de plantes médicinales, et une fois l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes a été prouvée ces végétaux, trouveront des applications pratiques dans divers domaines.

Au cours des recherches antérieures sur l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, on constate que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [16]. Certaines études ont été élaborées dans le sens de l'isolement et l'identification des substances responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes afin qu'elles soient effectivement exploitées dans différents domaines à savoir l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, l'industrie alimentaire [17].

A cet effet, nous nous sommes engagés à étudier l'effet antimicrobien des extraits acétate d'éthyle et butanolique de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter et de le comparer au potentiel antimicrobien d'espèces déjà étudiées tout en vérifiant si la variabilité de la composition chimique influence l'activité antimicrobienne.

L'essai de l'activité antimicrobienne s'est déroulé comme suit :

-Etude du comportement des bactéries et levures isolées vis-à-vis des antibiotiques.

- Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des deux extraits.
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits en déterminant les diamètres de la zone d'inhibition.

IV-2-2-l'activité antibactérienne

IV-2-2-1-Types de bactéries

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes à Gram positif et Gram négatif.

- **Bactéries à Gram positif (BGP)** : le peptidoglycane est la partie la plus externe de la bactérie. Il est plus épais que chez les bactéries à Gram négatif et entoure la membrane cytoplasmique de la bactérie.
- **Bactéries à Gram négatif (BGN)** : la paroi bactérienne contient un élément supplémentaire, la membrane externe, laquelle entoure le peptidoglycane qui est plus fin que chez les bactéries à Gram positif.

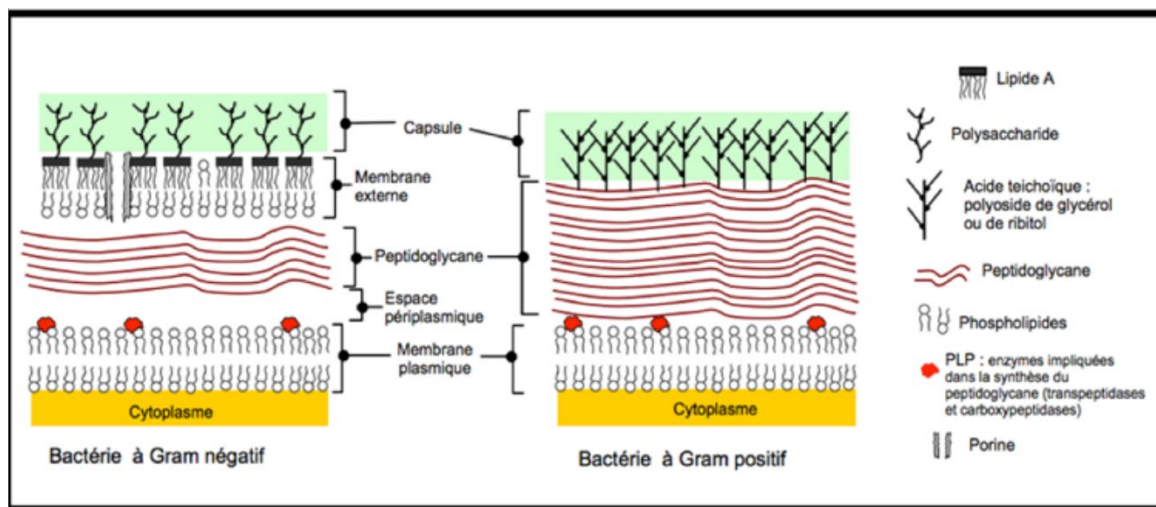


Figure IV-2: Structure de la paroi bactérienne des bactéries Gram positif et Gram négatif [18]

En général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent

adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [18].

IV-2-2-2-Caractères généraux sur les souches étudiées

Les souches pathogènes utilisées sont celles qui causent les maladies courantes (infections urinaires, génitales, broncho-pulmonaires, cutanées, intestinales, rhumatisme articulaire, angines....)

Tableau IV-1 : les souches bactériennes testées et les pathologies qu’elles induisent

Souches	Pathologie
Souche gram+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infections cutanées, endocardite, ostéomyélite, pneumonie
Souche gram-	
<i>Escherichia coli</i>	infections urinaires, biliaires, intestinales et génitales
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Différentes infections hospitalières ou nosocomiales
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	maladies septicémiques ou pyohémiques (méningites, abcès du poumon, pyuries) et infections urinaires
<i>Proteus mirabilis</i>	Infections urinaires et différentes infections des plaies chirurgicales, des abcès de peau et des tissus
<i>Serratia marcescens</i>	nombreuses infections nosocomiales

IV-2-3-l’activité antifongique

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires pouvant entraîner de sévères infections [19].

Les Candida sont des levures endogènes ou exogènes [20] ubiquitaires: on les retrouve comme agent commensal de la peau, du tractus digestif et urinaire. Il existe plus de 200 espèces de candida dont, seules 10% sont connues pour être responsables d’infections chez l’Homme [21].

Les espèces testées au cours de ce travail sont organisées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV-2 : les souches fongiques testées et les pathologies qu'elles induisent

Souches	Pathologie
<i>Candida albicans</i>	Candidose cutnéomuqueuse
<i>Candida parapsilosis</i>	infections cutanées et profondes formation des biofilms sur les dispositifs implantables

IV-2-4-Les Composés antimicrobiens

Un antibiotique est un composé chimique dérivé ou produit par des organismes vivants, capable à de faibles concentrations d'inhiber la croissance microbienne [22]. Cette définition est limitée à des antibiotiques produits par des micro-organismes, mais elle peut être étendue pour inclure des substances similaires présentes dans les plantes supérieures. Les plantes ont de nombreuses façons de générer des composés antimicrobiens pour les protéger contre les pathogènes [23]. Les tissus externes peuvent être riches en composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes et d'autres composés qui inhibent le développement de champignons et de bactéries [24].

Dans notre travail, nous avons utilisés comme témoins positive les deux antibiotiques Gentamicine et Fluconazol pour l'évaluation des activités antibactérienne et antifongique respectivement.

GENTAMICINE

La gentamicine est un antibiotique polyosidique aminé, il s'agit d'une molécule cationique, très hydrosoluble, chimiquement stable. Comme tous les aminosides, elle est caractérisée par une bactéricidie rapide concentration dépendante avec un effet post-antibiotique sur les BGN aérobies, les coques à Gram positif (CGP) aérobie et plus particulièrement les staphylocoques. Découverte en 1963, elle est à ce jour l'aminoside le plus couramment utilisé [25].

FLUCONAZOLE

Le fluconazole est un antifongique de synthèse, appartenant à la classe des antifongiques triazolés, caractérisés par la présence de trois atomes d'azotes dans leur cycle azoté pentagonal, Commercialisé en 1990.

Le fluconazole est indiqué pour le traitement :

- Des candidoses oropharyngées chez l'enfant immunodéprimé.
- Des candidoses systémiques, incluant les candidoses disséminées et profondes (candidémies, péritonites), candidoses oesophagiennes et candidoses urinaires.
- Des cryptococcoses neuroméningées ; le traitement d'entretien au cours du sida doit être poursuivi indéfiniment [26].

IV-3-partie expérimentale

IV-3-1-Dosage des polyphénols totaux

La détermination du TPC des extraits (acétate d'éthyle et n-butanol) de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été effectuée par méthode colorimétrique en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton & Rossi, 1965) [27].

Un volume de 200 µl de chaque extrait a été mélangé avec le réactif Folin Ciocalteu (2,5 ml, dilué à 1:10 avec de l'eau distillée) et incubé à température ambiante. Après 5 min, 800 µl de solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (7,5%) sont ajoutés. La solution finale est bien mélangée et conservée à l'obscurité pendant 30 minutes dans un bain-marie. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre. Les mesures ont été effectuées en triple et la quantité des polyphénols totaux a été estimée en référence à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentrations. Le taux des polyphénols totaux est exprimé en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG / g MS).

IV-3-2-Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes des extraits (AcOEt et n-BuOH) de *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été déterminée par dosage colorimétrique (Zhishen et al. 1999) [28]. En résumé, 2 ml d'AlCl₃ (4%) ont été ajoutés à 2 ml de solution méthanolique de l'extrait, les mélanges ont été incubés pendant une heure à température ambiante ensuite l'absorbance est directement mesurée sur un spectrophotomètre à 415 nm. La quercétine a été utilisée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent quercétine / g de matière sèche (mgEQ / gMS).

IV-3-4-Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne *in vitro* des extraits organiques (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) préparés à partir des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*, a été estimée à l'aide de la méthode de diffusion des disques décrite par (Kursat et Erecevit 2009) [31]. Cet essai a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie et de biologie végétale université de Mostaganem.

Les souches bactériennes testées au cours de ce travail sont réparties en trois souches de référence ATCC et trois souches pathogènes organisées dans le tableau suivant :

Tableau IV-3 : les souches bactériennes testées pour l'espèce *C. resupinata*

Souches testées :	
<u>La souche Gram (+)</u>	<u>Les souches Gram (-)</u>
❖ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	❖ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	❖ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	❖ <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	❖ <i>Proteus mirabilis</i>
	❖ <i>Serratia marcescens</i>

IV-3-4-1- Méthode par diffusion sur milieu gélosé (Méthode de disques)

L'Antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis de divers antibiotiques.

La technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS 2014 (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [15].

a. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés dans la présente étude sont la gélose nutritive et la gélose Muller-Hinton pour l'isolement des souches et le test de la sensibilité aux différents extraits respectivement.

b. Mode opératoire

❖ **Revivification des souches**

Chaque souche bactérienne conservée a été revivifiée dans 5ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées.

❖ **Rajeunissement des souches**

A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture est ensemencée en stries sur gélose nutritive puis incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées.

❖ **Préparation de l'inoculum**

Des suspensions bactériennes sont préparées à partir des colonies jeunes (une ou deux colonies de bactéries) diluées dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl et homogénéisées à l'aide d'un vortex pour donner une turbidité équivalente à 0.5 Mac Farland.

❖ **Ensemencement des milieux**

L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum [32] à l'aide d'un écouvillon stérile sur les boîtes contenant de 12 à 15 ml du milieu Muller-Hinton, en trempant l'écouvillon dans la suspension bactérienne puis en étalant la surface entière de la gélose par des stries sérés de haut en bas à trois reprises [33, 34].

❖ **Préparation et dépôt des disques**

Des disques stériles de papier Whatman N°3 de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 20µl de chaque extrait (**100mg/ml**) à l'aide d'une micropipette à cône stérile, sur la gélose préalablement ensemencée. Les disques imprégnés de 20µl des différents solvants stériles (solvant d'extraction : acétate d'éthyle et n-butanol), et les disques imprégnés de 20µl de l'antibiotique (gentamycine) ont été utilisés comme un contrôle négatif et un contrôle positif respectivement, et ont été déposés dans la même boîte pour assurer les mêmes conditions.

Les boîtes ont été par la suite incubées à 4°C pendant 30 min pour assurer une bonne diffusion des extraits, puis à 37°C pendant 18 à 24h [31, 32, 35, 36, 37, 38].

❖ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition apparue autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse en mm.

IV-3-5-Activité antifongique

Etude *in vitro* de l'activité antifongique des extraits acétate d'éthyle et butanolique préparés à partir des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* est réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie et de biologie végétale université de Mostaganem. La méthode utilisé c'est la méthode de diffusion des disques [39] sur les souches suivantes : *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*.

❖ **Protocole**

Le même protocole de l'activité antibactérienne a été appliqué avec un milieu spécifique pour la culture des levures : le milieu Sabouraud, un temps d'incubation plus long : 24h à 48h à 37°C et le fluconazole comme contrôle positif.

IV-3-6-Analyse statistique

Les données expérimentales sont représentées par la moyenne ± écart type de trois essais. Les représentations graphiques ont été déterminées par le programme Excel 2010.

IV-4-Resultats et Discussion

IV-4-1-Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits AcOEt et n-BuOH obtenus à partir de plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et la courbe de régression linéaire ($Y = 0,0968X$, $R^2 = 0,9995$) (Figure IV-4). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG / g MS) (tableau IV-4).

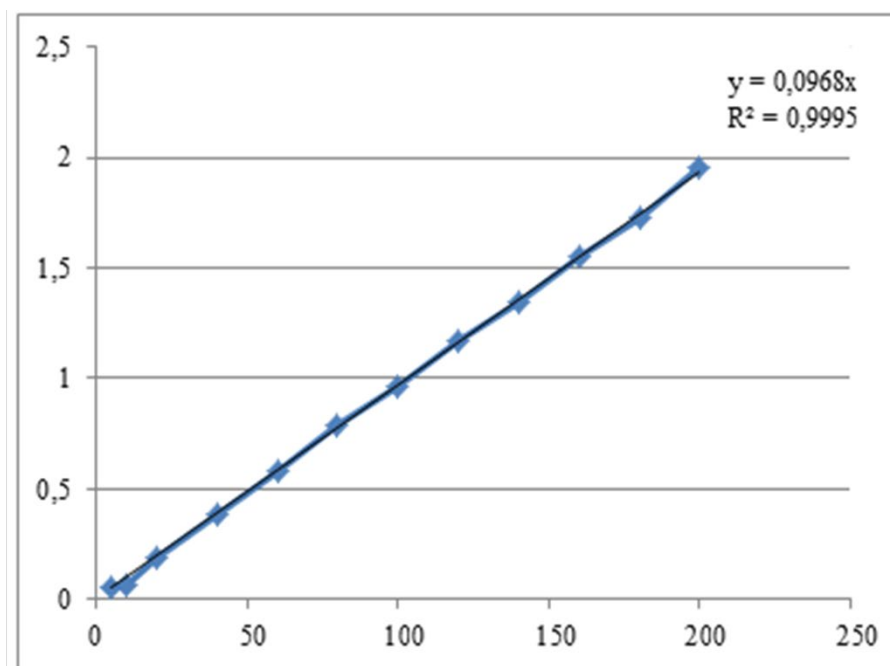


Figure IV-4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux (moyenne \pm de trois essais SD)

Tableau IV-4 : Teneur en polyphénols totaux de la plante *Centaurea resupinata*

Extrait de la plante <i>C.r</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur (mg EGA/g d'extrait)	173.3 \pm 4.321	102.227 \pm 2.472

IV-4-2-Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits AcOEt et *n*-BuOH de plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été évaluée à partir de la droite d'étalonnage de la quercétine ($y = 0,0017x - 0,0142$, $R^2 = 0,9971$) (Figure IV-5). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau IV-5.

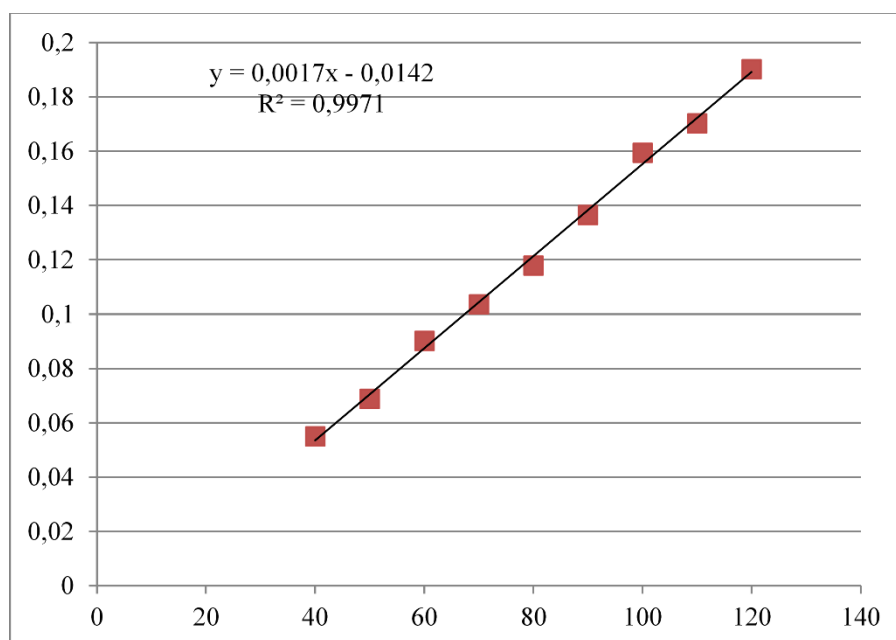


Figure IV-5: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux (moyenne \pm de trois essais SD)

Tableau IV-5 : Teneur en flavonoïdes de la plante *Centaurea resupinata*

Extrait de la plante <i>C.r</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur (mg EQ/g d'extrait)	44.223 \pm 3.052	26.531 \pm 1.654

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes indiquent que l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* est plus riche en polyphénols totaux (173.3 \pm 4.321 mg EGA/g d'Ex) et en flavonoïdes (44.223 \pm 3.052 mg EQ/g d'Ex), comparativement à l'extrait *n*-BuOH (102.227 \pm 2.472 mg EGA/g d'Ex ; 26.531 \pm 1.654 mg EQ/g d'Ex).

Ces résultats corréleront parfaitement avec l'étude phytochimique précédente qui a abouti à l'isolement de plusieurs métabolites flavonoïques. La teneur d'une plante en composés phénoliques dépend généralement du facteur génétique, des conditions climatiques, les conditions de stockage et la maturité de la plante à la récolte [40, 41].

IV-4-3- Evaluation de l'activité anti-oxydante

L'essai de l'activité antiradicalaire de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a révélé que les extraits AcOEt et n-BuOH réagissent positivement au DPPH. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures (IV-6, IV-7, IV-8).

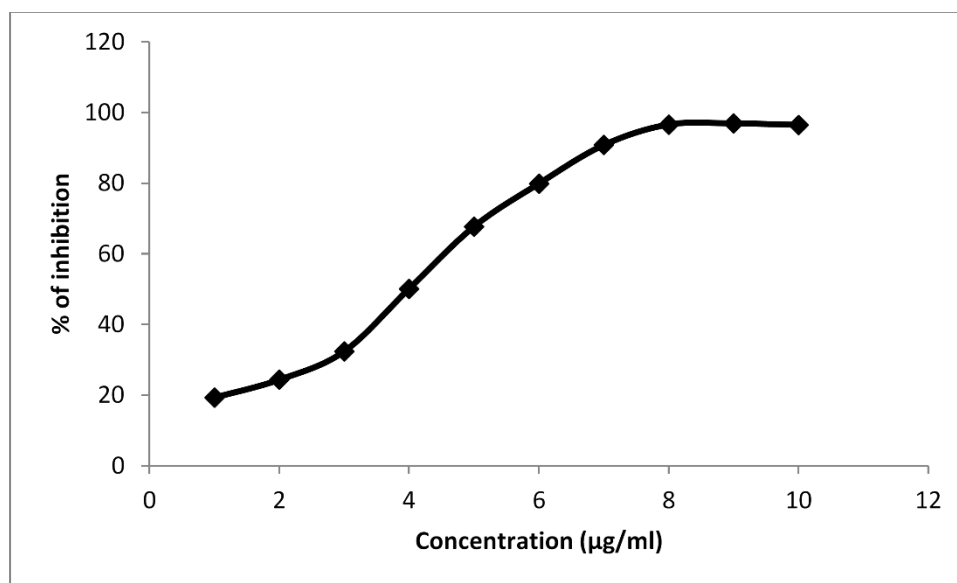


Figure IV-6: Activité anti-oxydante du standard (acide ascorbique)

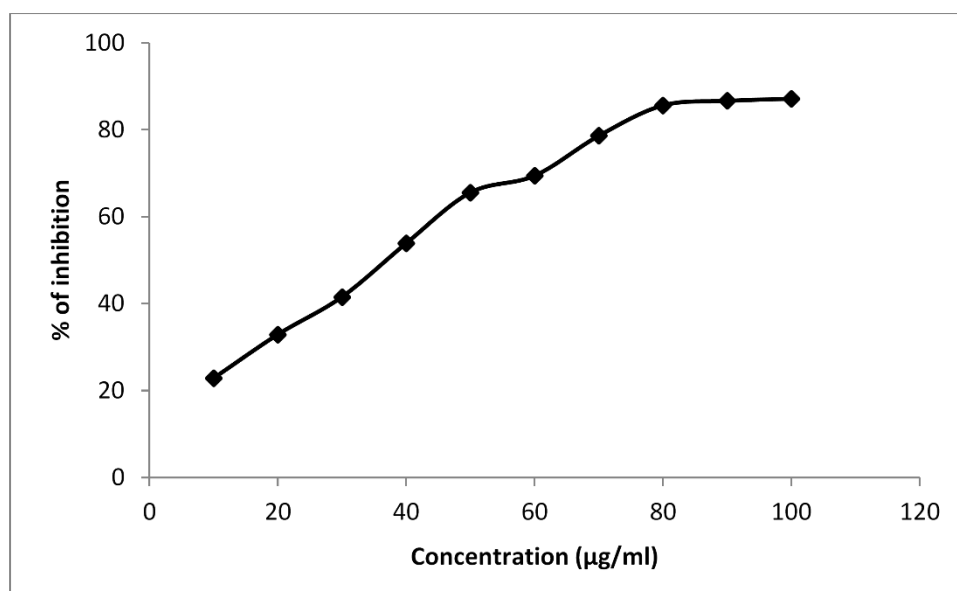


Figure IV-7: Activité anti-oxydante de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Centaurea resupinata*

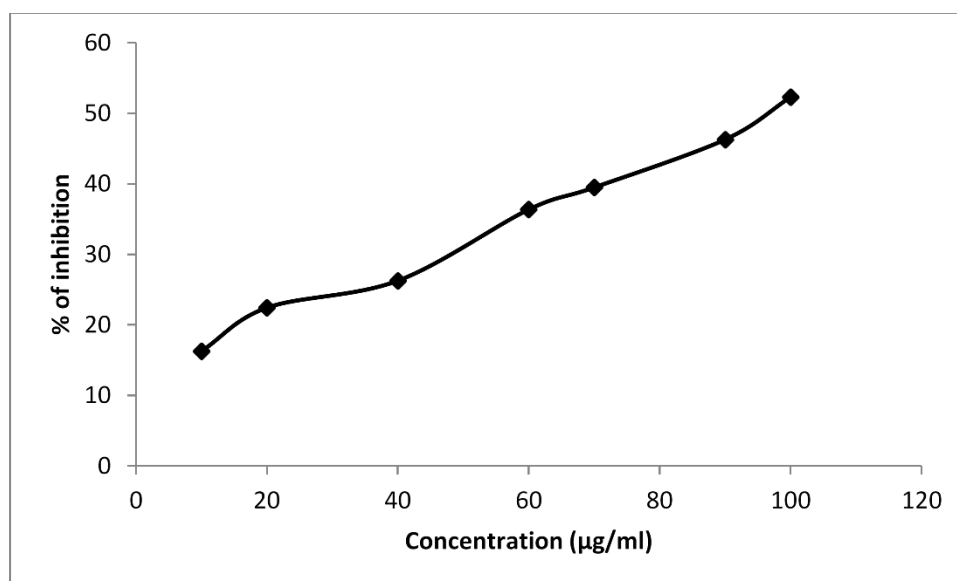


Figure IV-8: Activité anti-oxydante de l'extrait butanolique de l'espèce *Centaurea resupinata*

On constate que le pourcentage de piégeage du radical DPPH est concentration -dépendant, en effet l'augmentation des concentrations des extraits implique une augmentation du piégeage du radical stable.

Les valeurs d'IC₅₀ pour les extraits AcOEt , n-BuOH et l'acide ascorbique sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau IV-6: Activité anti-oxydante des extraits de *Centaurea resupinata* et antioxydant standard

Extrait/Standard	IC ₅₀ (µg/ml)
Acide ascorbique	4.024 ± 0.007
AcOEt	36.263 ± 0.005
n-BuOH	97.013 ± 0.019

Le pouvoir antioxydant est exprimé en IC₅₀. Plus cette valeur est très faible, l'activité est très élevé [42].

Les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* présentent une activité intéressante avec une $IC_{50} = 36.263 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 97.013 \pm 0.019 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

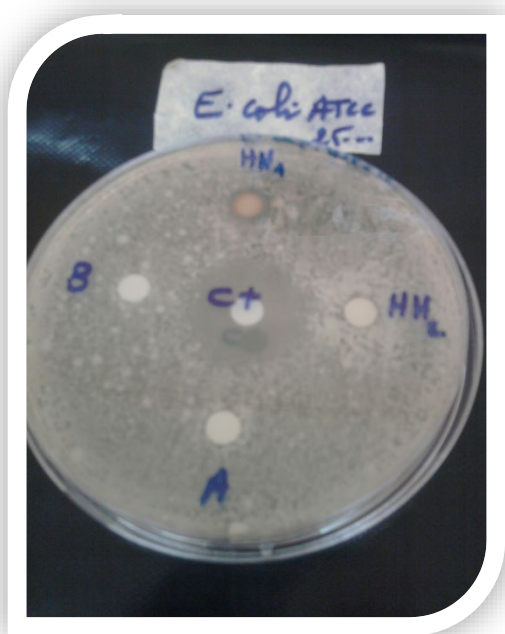
IV-4-4-Résultats de l'activité antimicrobienne de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*

IV-4-4-1-l'activité antibactérienne

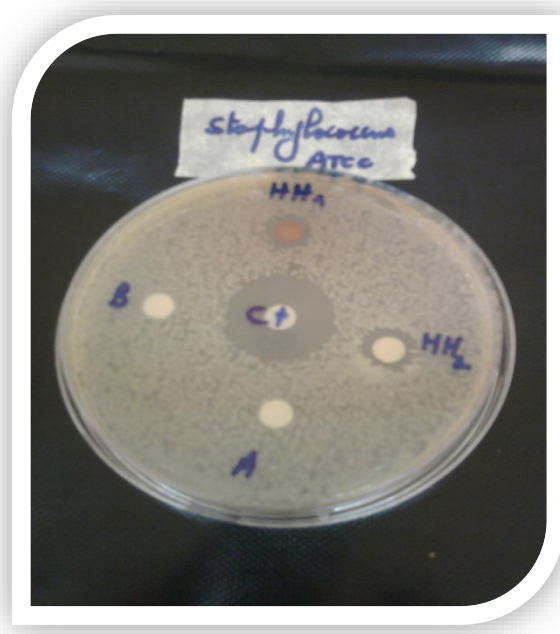
Tableau IV-7: Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce *Centaurea resupinata*

ATB/Extraits Souches	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
C+ Gentamicine	17,22±0,530	11,35±0,353	15±0,0	22,47±2,368	26,62±0,884	17,25±0,674
HH1	10,57±0,247	-	-	10,82±0,247	11,1±0,848	9,02±0,330
HH2	7±1,131	-	-	12,17±0,813	15,65±0,283	8,77±1,058

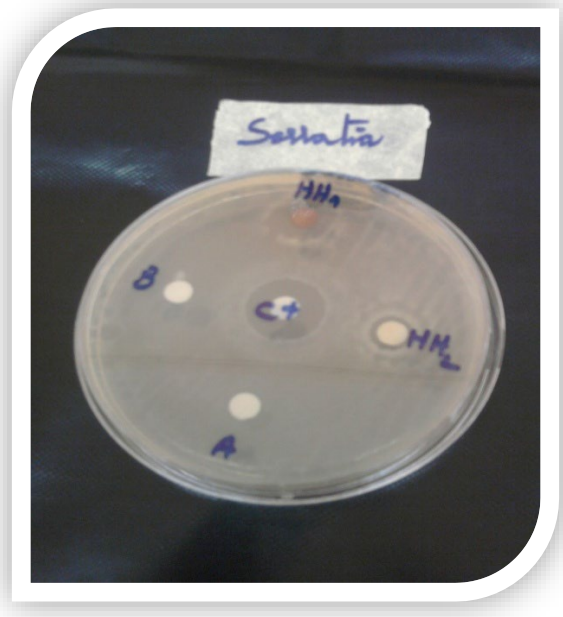
(-) : pas d'inhibition, HH1 : extrait d'acétate d'éthyle, HH2 : extrait butanolique.



Escherichia coli ATCC 25922



Staphylococcus aureus ATCC 2592



Proteus mirabilis

Serratia marcescens

Figure IV-9: Effets actifs des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce *Centaurea resupinata* sur la croissance bactérienne



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

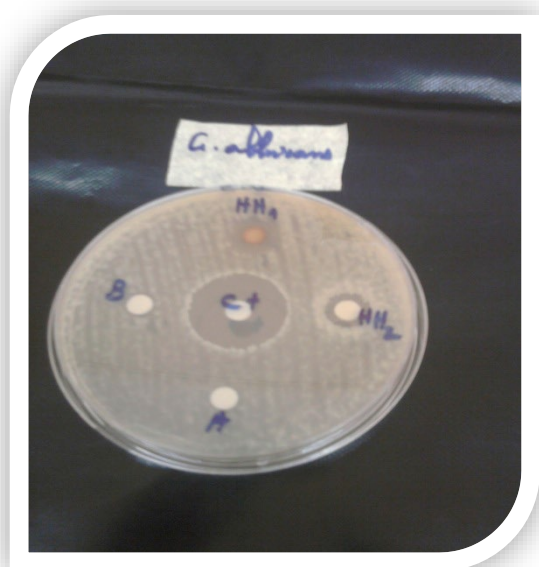
Klebsiella pneumoniae

Figure IV-10: Effets inactifs des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce *Centaurea resupinata* sur la croissance bactérienne

IV-4-4-2-l'activité antifongique

Tableau IV-8 : Diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de certaines levures des extraits AcOEt et n-BuOH de L'espèce *Centaurea resupinata*

ATB/Extraits Souches	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
Fluconazole (C+)	25,82±0.056	16,35±0.104
HH1	9,4±1.343	11,55±0.283
HH2	11,82±1.167	7,2±1.131


Candida albicans

Candida parapsilosis
Figure IV-11 : Activité antifongique des extraits AcOEt n-BuOH de L'espèce *Centaurea resupinata*

IV-4-4-3-Discussion

L'observation des antibiogrammes a révélé que les extraits de *Centaurea resupinata* sont actifs sur les souches testées mis à part *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebsiella pneumoniae*. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de constater que l'extrait butanolique de *Centaurea resupinata* a manifesté la plus importante activité antibactérienne contre le *Proteus mirabilis* avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de $15,65 \pm 0,283$ mm, une activité non négligeable en comparaison avec la gentamycine.

Les extraits acétate d'éthyle et n-Butanol à 100 mg/ml se sont avérés actif contre l'ensemble des souches fongiques testées, nous remarquons que:

- ✓ L'extrait n-Butanol a inhibé la croissance des souches *Candida albicans* (11,82 mm) et *Candida parapsilosis* (7,2 mm).
- ✓ L'extrait acétate d'éthyle a inhibé la croissance des souches *Candida albicans* (9,4mm) et *Candida parapsilosis* (11,55 mm).

En somme, une suprématie de l'extrait AcOEt par rapport à l'extrait butanolique est claire surtout sur la souche *Candida parapsilosis* en comparaison avec le fluconazole où les diamètres des zones d'inhibitions sont très rapprochés (11,55 mm pour l'extrait acétate d'éthyle versus 16.35 mm pour le fluconazole).

IV-5- Conclusion

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes des deux extraits AcOEt et n-BuOH des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* est réalisée par des méthodes colorimétriques : Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium, respectivement. Les résultats obtenus montrent que l'extrait AcOEt est relativement riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait n-BuOH.

L'étude *in vitro* de L'activité anti-oxydante des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de *C. resupinata* subsp. *dufourii* en utilisant la technique du piégeage du radical libre DPPH a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle possède un pouvoir antioxydant intéressant.

L'activité antimicrobienne de *Centaurea resupinata* a été déterminée sur six souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux levures : *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Les résultats obtenus,

prouvent l'existence d'une activité antimicrobienne importante tangible pour les deux extrais testés.

Références

- [1] C,Poncelet. *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Springer Paris. **2011**.
- [2] L,Papazian. *Le syndrome de détresse respiratoire aiguë* (p. p156). Springer Paris. **2008**.
- [3] J,Hadj Salem. *Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique* (Doctoral dissertation, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL). **2009**.
- [4] L,Jacob. *L'insuffisance rénale aiguë*. Springer Science & Business Media. **2007**.
- [5] J,Pincemail. *Le Coenzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier*. Vaisseaux, Cœur, Poumons, 8, 55-60. **2003**.
- [6] N,Cano., D,Barnoud., S.M,Schneider., M.P,Vasson., M,Hasselmann . *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Science & Business Media. **2006**.
- [7] E,Pelletier. *Écotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. PUQ. **2004**.
- [8] M.J,Droillard. *Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (Dianthus caryophyllus) during senescence*. Plant Physiology, 94(3), 1187-1192. **1990**.
- [9] A.C.M,Arisi., G,Cornic., L,Jouanin. *Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen*. Plant Physiology, 117(2), 565-574. **1998**.
- [10] M,Yoshimoto., H,Sakamoto., N,Yoshimoto., R,Kuboi. *Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes*. Enzyme and microbial technology, 41(6-7), 849-858. **2007**.
- [11] P,Nicholls. *Classical catalase: ancient and modern*. Archives of biochemistry and biophysics, 525(2), 95-101. **2012**.
- [12] C,Bédane. *Photodermatologie. Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie*. **2008**.

- [13] C,Boubekri. *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra). **2014**.
- [14] K,Bouhadjra. *Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge* (Doctoral dissertation, UMMTO). **2011**.
- [15] L.M,Prescott., J.M,Willey., L.M,Sherwood. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur. **2018**.
- [16] J,Reichling., P,Schnitzler., U,Suschke. *Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview*. Complementary Medicine Research, 16(2), 79-90. **2009**.
- [17] H,Guangrong., J,Jiixin. *Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of Artemisia anomala S. Moore*. African Journal of Biotechnology, 7(9). **2008**.
- [18] F,Zani., G,Massimo., S,Benvenuti., A,Bianchi., A,Albasini., M,Melegari., G,Vampa., A,Bellotti. *Studies on the genotoxic properties of essential oils with Bacillus subtilis rec-assay and Salmonella/microsome reversion assay*. Planta medica, 57(03), 237-241. **1991**.
- [19] M,Vaubourdolle. *Infectiologie*. 3ème édition Le moniteur. P : 448. **2006**.
- [20] C,Moulinier. *Parasitologie et mycologie médicales: éléments de morphologie et de biologie*. Editions Médicales Internationales,796p. **2003**.
- [21] P,Eggimann., J,Garbino. *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. The Lancet infectious diseases, 3(11), 685-702. **2003**.
- [22] G.E,Trease. *Pharmacognosy* (13th edn). Bailliere Tindall, London, 176-180. **1989**.
- [23] J,Kuc. *Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance, bioactive compounds from plants*, Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 154): 213-228. **2007**.
- [24] J,Kuc. *Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques*, In: *Forest potentials: productivity and value*, Ballard R (ed), Weyerhaeuser Company Press, Centralia: 147-190. **1985**.
- [25] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. *Update on good use of injectable aminoglycosides, gentamycin, tobramycin, netilmycin, amikacin*. Pharmacological

properties, indications, dosage, and mode of administration, treatment monitoring. *Medecine et maladies infectieuses*, 42(7), 301-308. **2012**.

[26] M,Najahi. *Résistance au Fluconazole de 68 souches de levures genre Candida isolées des services de réanimation du CHU de Rabat* (Doctoral dissertation). **2012**.

[27] V.L,Singleton. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. **1965**.

[28] J,Zhishen., T,Mengcheng. *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food chemistry*, 64(4), 555-559. **1999**.

[29] P,Molineux. *The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. *Songklanakarin J-Sci.Technol.* 26: 211-219. **2004**.

[30] T,Hatano., H,Kagawa., T,Yasuhara. *Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 36(6):2090–2097. **1988**.

[31] M,Kursat. *The Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of Some Lamiaceae Members Collected from Turkey*. *Turkish Journal of Science & Technology.* 4(1). **2009**.

[32] J,Tagg. *Assay system for bacteriocins*. *Applied Microbiology.* 21(5):943. **1971**.

[33] M.C,Mathabe., R.V,Nikolova., N,Lall. *Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa*. *Journal of Ethnopharmacology.* 105(1–2):286–293. **2006**.

[34] H,Mighri., H,Hajlaoui., A,Akrout., H,Najjaa. *Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone*. *Comptes Rendus Chimie.* 13(3):380–386. **2010**.

[35] A.R, Given. *Assay system for bacteriocins*. *Applied Microbiology.* 21(5):943. **1971**.

[36] S,Rifai., A,Fassouane., A,El-Abbouyi., A,Wardani., A,Kijjoa. *Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts*. *Journal de Mycologie Médicale.*,15(1):33–38. **2005**.

- [37] M,Shoeb., M,Jaspars., S.M,MacManus., S,Celik., L,Nahar., P,Kong-Thoo-Lin. *Anticolon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of Centaurea gigantea (Asteraceae)*. Journal of Natural Medicines. 61(2):164–169. **2007**.
- [38] B,El-Amraoui., J.F,Biard., M.J,Uriz., S,Rifai. *Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts*. Journal de Mycologie Médicale. 20(1):70–74. **2010**.
- [39] G,Sacchetti., S,Maietti., M,Muzzoli., M,Scaglianti., S,Manfredini., M,Radice. *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Food chemistry, 91(4), 621-632. **2005**.
- [40] H,Falleh., R,Ksouri., K,Chaieb., N,Karray-Bouraoui., N,Trabelsi., M,Boulaaba. *Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities*. Comptes Rendus Biologies, 331(5), 372-379. **2008**.
- [41] A,Podsędek. *Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review*. LWT-Food Science and Technology, 40(1), 1-11. **2007**.
- [42] D.H,Bastos., L.A,Saldanha., R.R,Catharino., A,Sawaya., I.B,Cunha., P.O,Carvalho. *Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (Ilex paraguariensis) and Green Tea (Camelia sinensis) Extracts*. Molecules 12(3), 423-432. **2007**.
- [43] M.O,Chiavari-Frederico., L.N,Barbosa., I,Carvalho dos Santos., G,Ratti da Silva., A,Fernandes de Castro., W,de Campos Bortolucci., L.N,Barboza., C.F,de Araújo Almeida Campos., J.E,Gonçalves., J.V,Menetrier., E,Jacomassi., Z.C,Gazim., S,Wietzikoski., F.A,dos Reis Lívero. *Antimicrobial activity of Asteraceae species against bacterial pathogens isolated from postmenopausal women*. Plos one, 15(1), e0227023. **2020**.
- [44] H,Guangrong., J,Jiixin. *Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of Artemisia anomala S. Moore*. African Journal of Biotechnology, 7(9). **2008**.
- [45] J,Billing. *Antimicrobial functions of spices: why some like it hot*. The Quarterly review of biology, 73(1), 3-49. **1998**.
- [46] M.C,Pibiri. *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, Lausanne (Suisse). **2006**.

Conclusion générale

Dans le contexte de la valorisation de la flore végétale Algérienne, le présent travail a mis sous la loupe deux espèces ; *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* et *Cytisus purgans* L. Benth. appartenant respectivement à la famille des Astéracées et Fabacées. Ces deux familles d'une notoriété thérapeutique dans la médecine traditionnelle.

L'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a permis d'isoler et d'identifier dix produits naturels répartis en trois classe de métabolites secondaires :

- Six flavonoïdes (Nicotiflorine, Tiliroside, Apigetrine, Chrysoériol, Apigénine, Chrysin).
- Deux phytostérols (β -sitostérol, Daucostérol).
- Deux triterpènes (Lupéol, Taraxastérol).

L'étude chimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth a conduit à l'isolement et l'identification de sept métabolites secondaires :

- quatre isoflavones : Daidzéine, Génistéine, Isoprunétine, Biochanine A
- un flavone : Chrysin
- un flavonol : Quercétine
- un phytostérol : Daucostérol

D'un point de vue chimiotaxonomique, la composition chimique des deux espèces est en parfait accord avec les plantes des genres *Centaurea* et *Cytisus*.

La séparation de tous ces produits a été effectuée à l'aide de différentes techniques de purification particulièrement : la chromatographie sur colonne de gel de polyamide ou de gel silice normale et chromatographie sur plaques préparatives de silice en phase inverse RP18.

L'identification structurale des métabolites isolés a été élucidée au moyen de l'utilisation des techniques d'analyses spectroscopiques : UV, RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC), spectrométrie de masse (MS), la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature.

La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium, respectivement.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes indiquent que l'extrait AcOEt de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* est le plus riche en polyphénols totaux (173.3 ± 4.321 mg EAG/g d'Ex) et en flavonoïdes (44.223 ± 3.052 mg EQ/g d'Ex), puis l'extrait n-BuOH qui présente des teneurs en polyphénols (102.227 ± 2.472 mg EAG/g d'Ex) et en flavonoïdes (26.531 ± 1.654 mg EQ/g d'Ex).

L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante des extraits de plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, en utilisant l'acide ascorbique comme standard. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré un pouvoir antioxydant significatif par rapport à l'extrait de n-butanol ($IC_{50} = 36.263 \pm 0.005$ µg/ml; $IC_{50} = 97,013 \pm 0,019$ µg/ml), ce qui peut s'expliquer par sa richesse en flavonoïdes.

L'activité antibactérienne de *Centaurea resupinata* subsp a été déterminée vis-à-vis de six souches avec la gentamicine comme contrôle positif, et ce par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats obtenus révèlent que les deux extraits sont actifs contre les souches : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*. Tandis que l'extrait n-BuOH possède une forte activité sur la souche *Proteus mirabilis*.

Les résultats de l'activité antifongique ont montré que les extraits AcOEt et n-BuOH présentent un pouvoir anti fongique remarquable.

L'activité antimicrobienne intéressante de *Centaurea resupinata* subsp est probablement inhérente à sa composition en métabolites secondaires.

Chapitre V

Partie expérimentale

V-1-Matériel et appareillage

V-1-1-Récolte des plantes étudiées

La récolte des deux espèces *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* et *Cytisus purgans* (L.) Benth a été effectuée au mois de Juin dans la région des Aurès (Oued-elmaa) et en Juillet (Echemoule) respectivement. L'identification botanique a été réalisée par le Professeur Bachir Oudjehih, institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université Batna-1.

V-1-2-Chimie extractive

V-1-2-1-Chromatographie sur couche mince et Epaisse (CCM et CCE)

La Chromatographie sur couche mince est réalisée sur des plaques de gel de silice en phase normale (Kieselgel 60 F254) sur feuille d'aluminium (Merck) (20 × 20 cm). La Chromatographie sur couche Epaisse a été effectuée sur des plaques en verre recouverte de silice en phase inverse RP-18 F254S, 200 µm Merck (20 x 20 cm), la lecture est faite sous la lampe UV (254 et 366 nm) puis révélées par l'acide sulfurique à 50% et jusqu'à l'apparition des taches de diverses couleurs.

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

La technique CC permet un fractionnement et purification des extraits et des fractions selon leur polarité. Les phases stationnaires utilisées sont le gel de silice en phase normale Kieselgel Merck (230-400 Mesh) et le polyamide SC6. Les dimensions de la colonne ont été choisies en fonction de la quantité d'échantillon à étudier. La quantité de silice et du polyamide utilisée est généralement 30-40 fois supérieure à la quantité de l'échantillon. Selon l'analyse par CCM, on sépare et rassemble les fractions.

V-1-3-Chimie structurale

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

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil de type BRUKER Avance de l'Institut de Chimie Université de Strasbourg. Les spectres RMN ¹H sont enregistrés à 500 et 300 MHz et les spectres RMN ¹³C sont enregistrés à 125 et 75 MHz, Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl₃, CD₃OD et DMSO-*d*₆.

V-1-3-2-Spectroscopie de masse (SM)

Les spectres de masse des produits isolés ont été obtenus en ionisation par électrospray basse résolution (ESI-MS) en mode positif et solubilisation les échantillons dans le MeOH.

V-1-3-3-Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV-Vis des composés purifiés ont été enregistrés dans le méthanol en utilisant des cuves en quartz contenant 2 ml de solution. Le spectrophotomètre employé est de type Jasco V-530, piloté par un logiciel Spectra Manager.

V-1-3-4-Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$

Le pouvoir rotatoire des composés isolés a été déterminé sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241, avec une solution MeOH. La mesure a été effectuée dans une cuve de 10 cm de longueur et volume de 1ml à température ambiante, la source lumineuse utilisée est la raie D du sodium (589 nm).

V-2-Etude de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*

V-2-1-Extraction

500 g des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*, préalablement séché puis broyées ont donné une poudre fine. Elles sont mises en macération dans un mélange hydroalcoolique éthanol/eau (70/30) pendant 48 heures à température ambiante (cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant). Après filtration et concentration, l'extrait éthanolique résultant est soumis à une extraction liquide/liquide en utilisant trois solvants à polarité croissante hexane, acétate d'éthyle, et n-butanol (3 × 100 ml) pour chaque solvant, les phases organiques récupérées sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre puis évaporées à sec. 3,6 g, 7,8 g et 18,7g ont été obtenus des 'extraits hexanique, acétate d'éthyle et butanolique respectivement. Les analyses par CCM sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, révèlent la richesse des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique en métabolites secondaires.

V-2-2-Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle (7 g) a été réalisé par une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. Le système d'élution est effectué par un mélange Hexane/EtOAc (100-0 à 0-100) ensuite EtOAc –MeOH (100-0 à 0-100). Les chromatographies sur couche mince CCM des fractions recueillies sont visualisées à la lumière UV (à 254 et 366 nm) et révélées par une solution d'acide sulfurique et chauffage, ce qui a conduit à l'obtention de 10 fractions majoritaires F1- F10. Le fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle est récapitulé dans le tableau (V-1).

Tableau V-1 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Centaurea resupinata*

Eluant (Hexane /AcOEt)	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 90-10	F1	341
80-20	F2	260
70-30	F3	142
60-40	F4	215,3
50-50 à 40-60	F5	160
30-70 à 20-80	F6	230
10-90 à 0-100	F7	296
AcOEt/MeOH	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 80-20	F8	80
70-30 à 50-50	F9	113,7
40-60 à 0-100	F10	467,8

❖ La fraction F2

La fraction F2 (260 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'éluion réalisée au moyen d'un mélange CH₂Cl₂-MeOH (100-0 à 50-50) a conduit à 6 sous-fractions.

La sous-fraction F2.3 (75 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice normale éluee par CH₂Cl₂-MeOH (100-0 à 80-20) conduisant à l'isolement a l'état pur les composés **CR9** (11 mg) et **CR10** (14 mg) (Figure V-1).

(CH₂Cl₂/MeOH) 5%

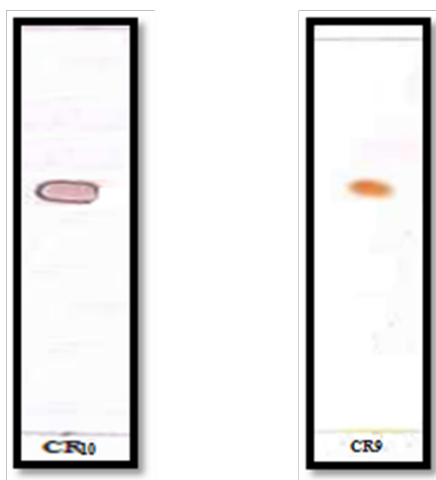


Figure V-1: CCM des composés CR9, CR10

❖ La fraction F3

La fraction F3 (142 mg) est purifiée par une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élué est réalisé par un mélange CH_2Cl_2 -MeOH (100-0 à 0-100) pour isoler les composés **CR7** (15 mg) et **CR8** (9 mg) (Figure V-2).

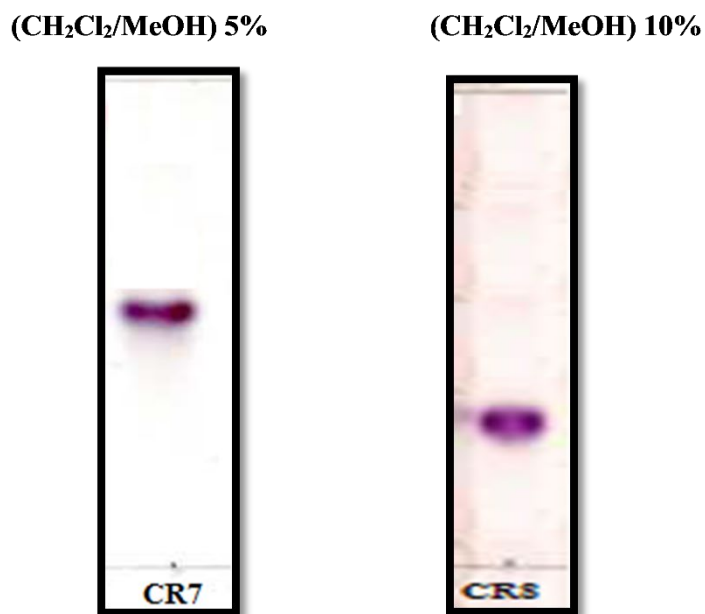


Figure V-2: CCM des composés CR7, CR8

❖ La fraction F5

La fraction F5 (160 mg) a été chromatographiée sur colonne de polyamide SC6, éluée par un mélange Toluène/MeOH (100-0 à 0-100) pour conduire aux composés **CR6** (17 mg) et **CR4** (12 mg) (Figure V-3).

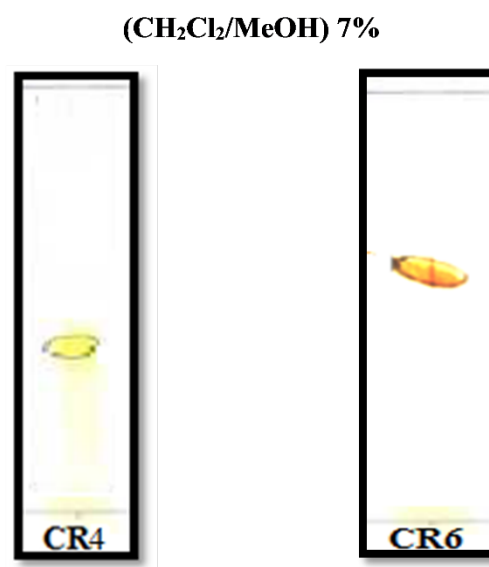


Figure V-3: CCM des composés CR4, CR6

❖ La fraction F6

La fraction F6 (230 mg) a subi une séparation sur colonne de polyamide éluee par un mélange Toluène/MeOH (100-0 à 0-100), permettant l'obtention des produits **CR5** (34 mg) et **CR3** (26 mg) (Figure V-4).

(CH₂Cl₂/MeOH) 20%

(CH₂Cl₂/MeOH) 10%

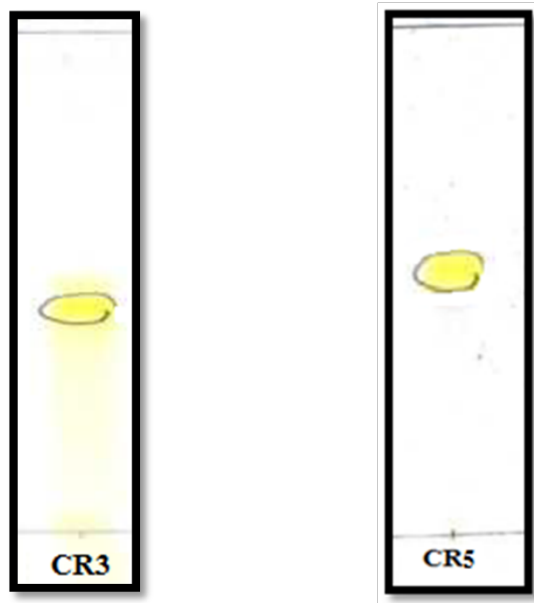


Figure V-4: CCM des composés CR3, CR5

❖ La fraction F7

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale effectuée sur la fraction F7 (296 mg), au moyen d'un mélange CH₂Cl₂/MeOH (100-0 à 80-20), a permis l'isolement a l'état pur du composé **CR2** (23,6 mg) (Figure V-5).

(CH₂Cl₂/MeOH) 20%



Figure V-5: CCM du composé CR2

❖ La fraction F8

La précipitation de la fraction F8 (80 mg) dans l'hexane a conduit à l'isolement du composé **CR1** (18 mg) (Figure V-6).

(CH₂Cl₂/MeOH) 20%

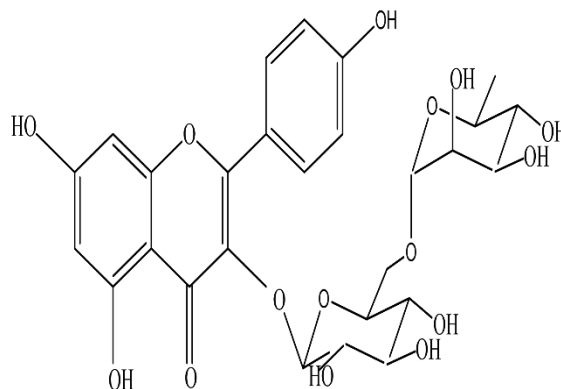


Figure V-6: CCM du composé CR1

V-2-3-Données spectrales et constantes physiques des produits isolés de l'espèce *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*

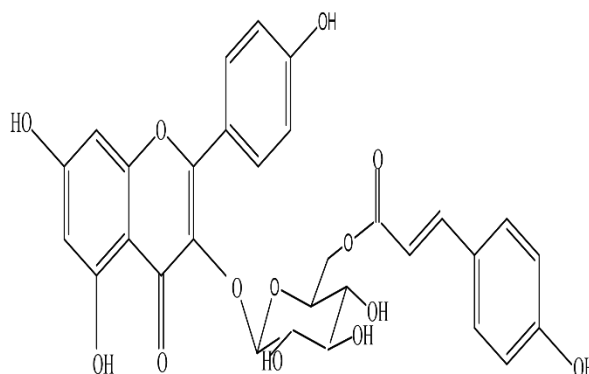
V-2-3-1-Composé CR1

- ❖ **Nom** : Nicotiflorine
- ❖ **Formule brute** : C₂₇H₃₀O₁₅
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ **[α]_D** = - 54,1 (C = 1, MeOH)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
m/z = 617 [M+Na]⁺
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-3

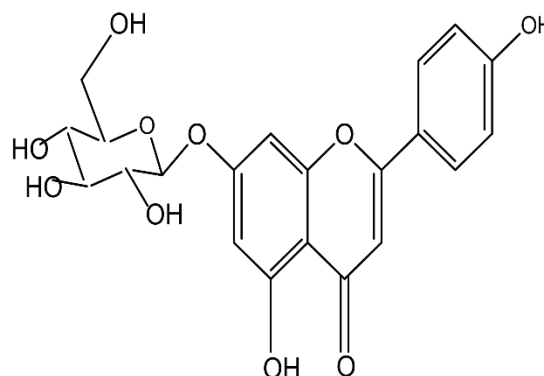


V-2-3-2-Composé CR2

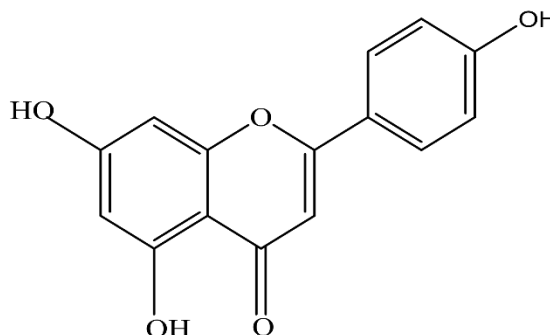
- ❖ **Nom** : Tiliroside
- ❖ **Formule brute** : $C_{30}H_{26}O_{13}$
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ $[\alpha]_D = -60$ (C= 0,2, MeOH)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 617$ $[M+Na]^+$
- ❖ **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans CD_3OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-4

**V-2-3-3-Composé CR3**

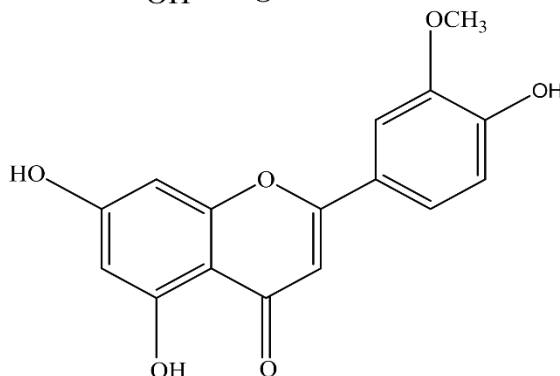
- ❖ **Nom** : Apigetrine
- ❖ **Formule brute** : $C_{21}H_{20}O_{10}$
- ❖ **Aspect** : Cristaux d'aiguille jaunes
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 455$ $[M+Na]^+$
- ❖ **RMN 1H** (300 MHz) et **RMN ^{13}C** (75 MHz) dans CD_3OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-6

**V-2-3-4-Composé CR4**

- ❖ **Nom** : Apigénine
- ❖ **Formule brute** : $C_{15}H_{10}O_5$
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans CD_3OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-7

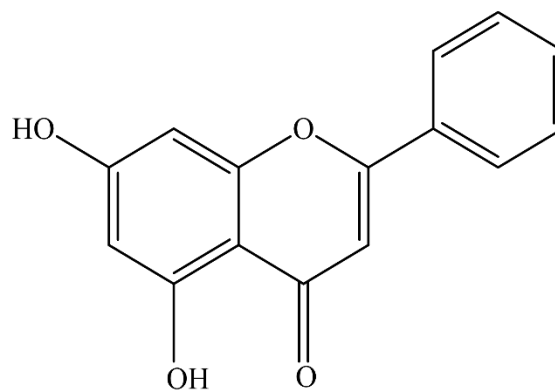
**V-2-3-5-Composé CR5**

- ❖ **Nom** : Chrysoériol
- ❖ **Formule brute** : $C_{16}H_{12}O_6$
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans DMSO
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-9

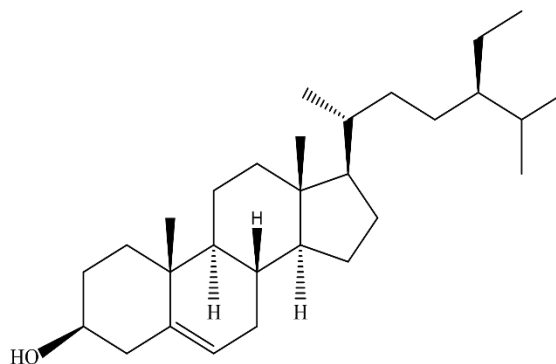


V-2-3-6-Composé CR6

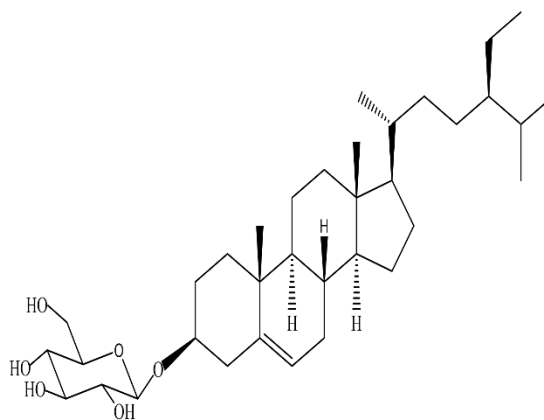
- ❖ **Nom** : Chryisine
- ❖ **Formule brute** : C₁₅H₁₀O₄
- ❖ **Aspect** : Cristaux légèrement jaunes
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-10

**V-2-3-7-Composé CR7**

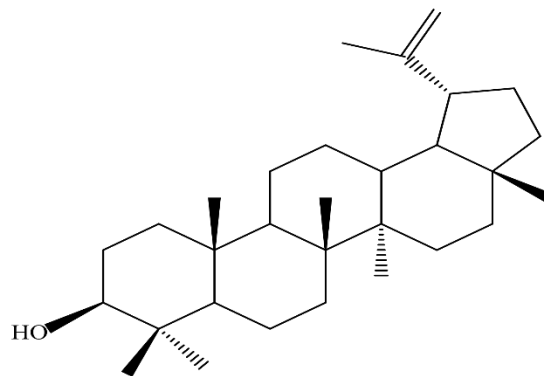
- ❖ **Nom** : β-sitostérol
- ❖ **Formule brute** : C₂₉H₅₀O
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **[α]_D** = -30 (C = 0,8, CHCl₃)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
m/z = 437[M+Na]⁺
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CDCl₃
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-11

**V-2-3-8-Composé CR8**

- ❖ **Nom** : Daucostérol
- ❖ **Formule brute** : C₃₅H₆₀O₆
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **[α]_D** = -41,5 (C = 0,4, MeOH)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
m/z = 599 [M+Na]⁺
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-12

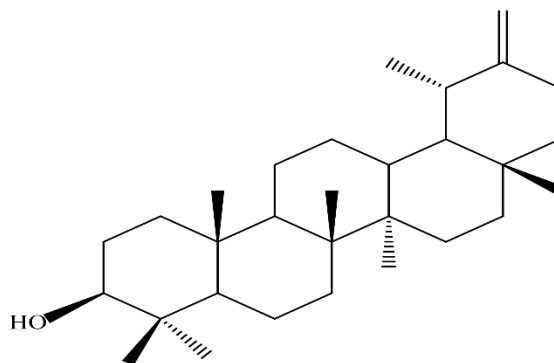
**V-2-3-9-Composé CR9**

- ❖ **Nom** : Lupéol
- ❖ **Formule brute** : C₃₀H₅₀O
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **[α]_D** = +26,4 (C = 0,4, CHCl₃)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
m/z = 427 [M+H]⁺
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CDCl₃
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-13



V-2-3-10-Composé CR10

- ❖ **Nom** : Taraxastérol
- ❖ **Formule brute** : C₃₀H₅₀O
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **[α]_D** = + 95 (C= 0,36 , CHCl₃)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
m/z = 427 [M+H]⁺
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CDCl₃
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-14

**V-3-Etude de l'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth****V-3-1-Extraction**

500 g des parties aériennes de la plante *Cytisus purgans* (L.) Benth séchées et broyées, sont mises à macérer dans un mélange (EtOH/H₂O:70/30) trois fois avec renouvellement du solvant pendant 48 heures à température ambiante. Après la filtration et l'évaporation du solvant, la phase aqueuse obtenue subit une extraction liquide/liquide par l'Hexane (3 x 100 ml), l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml) et *n*-butanol (3 x 100 ml). L'évaporation à sec des phases organiques permet l'obtention de 2,7 g d'extrait hexanique (CPHE), 6,5 g d'extrait acétate d'éthyle (CPAC) et 11,3 g d'extrait butanolique (CPBU). Les CCM effectuées sur les trois extraits dans différents systèmes d'éluant montrent la richesse des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique en métabolites secondaires.

V-3-2-Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle (6 g) a été chromatographie sur colonne de gel de silice normale, en utilisant comme éluant un gradient de solvants Hexane/EtOAc (100-0 à 0-100) puis EtOAc-MeOH (100-0 à 0-100). Huit fractions majoritaires sont obtenus F1-F8, après rassemblement des fractions ayant des CCM similaires.

Le tableau (V-2) présente les différentes fractions obtenues sur la base de l'analyse CCM.

Tableau V-2 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Cytisus purgans*

Eluant (Hexane /AcOEt)	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 80-20	F1	117,3
70-30 à 60-40	F2	203,5

50-50 à 40-60	F3	345,7
30-70 à 20-80	F4	567,2
10-90 à 0-100	F5	345,1
AcOEt/MeOH	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 80-20	F6	212
70-30 à 50-50	F7	789,4
40-60 à 0-100	F8	678,4

❖ La fraction F2

La fraction F2 (203,5 mg) est chromatographiée sur colonne de gel de silice normale. L'élution réalisée au moyen d'un mélange CH_2Cl_2 -MeOH (100-0 à 90-10) a abouti à l'isolement du composé **CP5** à l'état pur (3,4 mg) (Figure V-7).

(CH_2Cl_2 /MeOH) 7%



Figure V-7: CCM du composé CP5

❖ La fraction F3

La fraction F3 (345,7 mg) est appliquée à une chromatographie de polyamide SC6, dans un mélange Toluène/MeOH (100-0 à 0-100), donnant 10 sous-fractions. La sous-fraction F3.3 (64,9mg) est soumise à une chromatographie sur plaque préparative en phase inverse RP-18. L'élution utilisée est un mélange de solvants H_2O /MeOH (80-20). Cette purification a permis d'obtenir les composés **CP3** (4,7 mg) et **CP4** (4,2 mg). (Figure V-8).

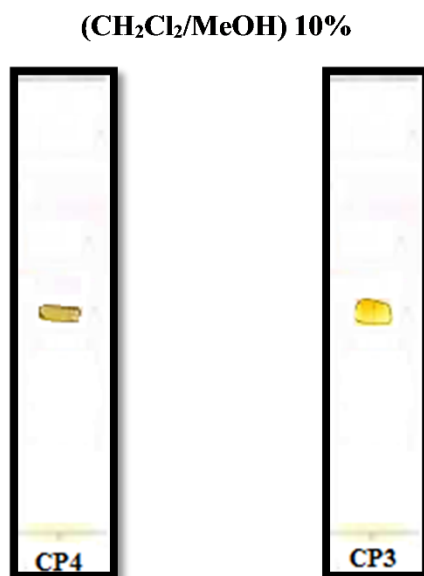


Figure V-8: CCM des composés CP4 et CP3

❖ La fraction F4

La fraction F4 (567,2 mg) est fractionnée par une colonne de gel de silice normale. L'élution menée par le mélange du solvant CH₂Cl₂/MeOH (100-0 à 50-50) a conduit à l'obtention de 8 sous-fractions. La sous fraction F4.2 (83,6mg) est purifiée par une chromatographie sur colonne de de gel de silice normale, en utilisant comme éluant le mélange CH₂Cl₂/MeOH (100-0 à 80-20) pour donner le composé CP1 (3,1mg) (Figure V-9).

(CH₂Cl₂/MeOH) 10%



Figure V-9: CCM du composé CP1

❖ La fraction F5

La fraction F5 (345,1mg) a subi une chromatographie sur colonne de de gel de silice normale. L'élution est effectuée par le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100-0 à 70-30), permettant d'obtenir 6 sous-fractions. La précipitation de sous fraction F5.4 (90 mg) dans l'acétone a permis d'obtenir le composé **CP2** pur (4,3mg) (Figure V-10).

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) 10%



Figure V-10: CCM du composé CP2

❖ La fraction F6

Le composé **CP7** (7,9 mg) est isolé à l'état pur par une précipitation de la fraction F6 (212 mg) dans le méthanol (Figure V-11).

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) 10%



Figure V-11: CCM du composé CP7

❖ La fraction F7

La purification de la fraction F7 (789,4 mg) par une chromatographie de polyamide SC6 dans un système Toluène/MeOH (100-0 à 0-100) a conduit au le composé **CP6** (6,1mg) (Figure V-12).

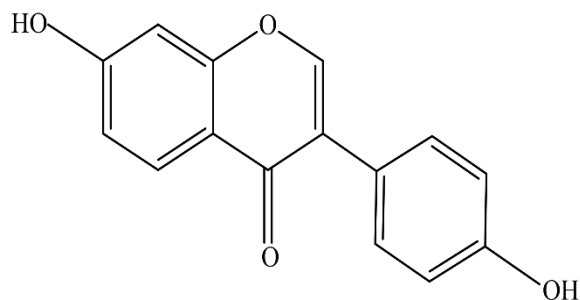
(CH₂Cl₂/MeOH) 20%

Figure V-12: CCM du composé CP6

V-3-3-Composés isolés de l'espèce *Cytisus purgans* (L.) Benth

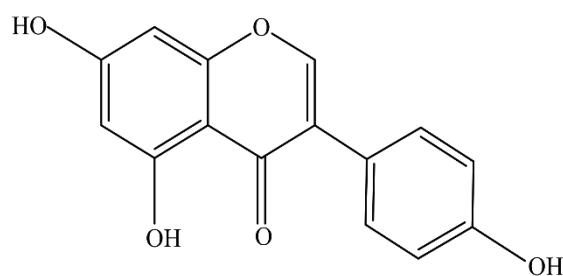
V-3-3-1-Composé Cp1

- ❖ **Nom** : Daidzeine
- ❖ **Formule brute** : C₁₅H₁₀O₄
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 255 [M+H]^+$
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-15



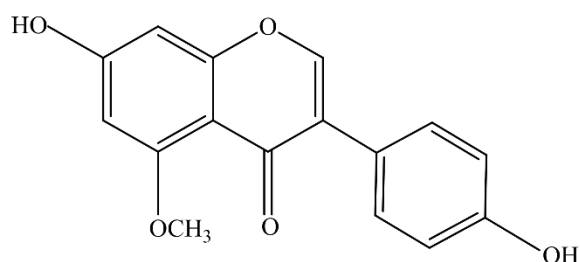
V-3-3-2-Composé Cp2

- ❖ **Nom** : Génistéine
- ❖ **Formule brute** : C₁₅H₁₀O₅
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 271 [M+H]^+$
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-16

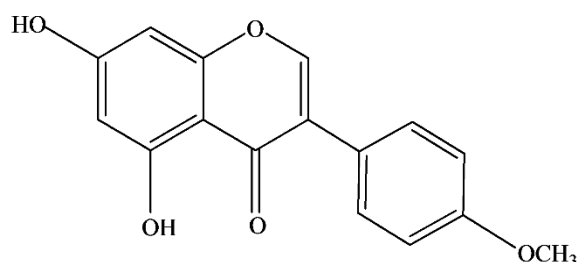


V-3-3-3-Composé Cp3

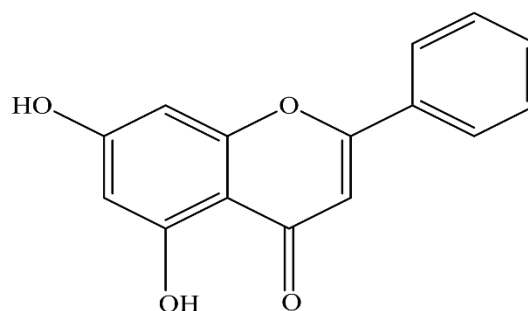
- ❖ **Nom** : Isoprunetine
- ❖ **Formule brute** : C₁₆H₁₂O₅
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 285 [M+H]^+$
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
(125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-17

**V-3-3-4-Composé Cp4**

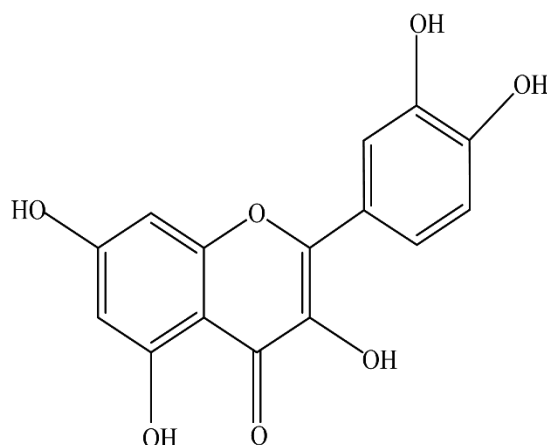
- ❖ **Nom** : Biochanine A
- ❖ **Aspect** : aiguilles incolores
- ❖ **Formule brute** : C₁₆H₁₂O₅
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
(125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-18

**V-3-3-5-Composé CP5**

- ❖ **Nom** : Chryisine
- ❖ **Formule brute** : C₁₅H₁₀O₄
- ❖ **Aspect** : Cristaux légèrement jaunes
- ❖ **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
(125 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-10

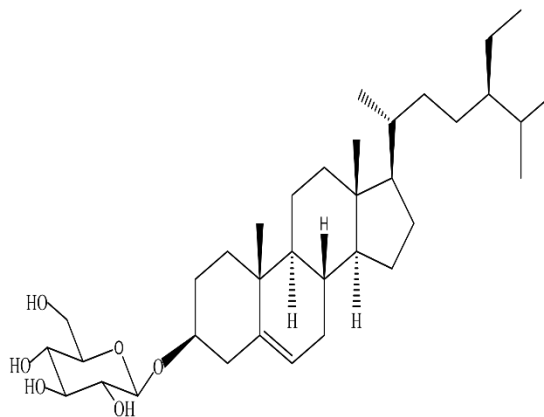
**V-3-3-6-Composé CP6**

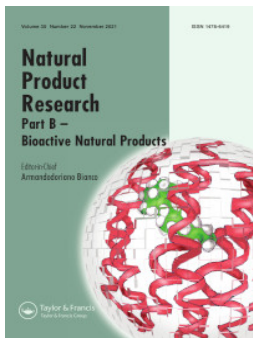
- ❖ **Nom** : Quercétine
- ❖ **Formule brute** : C₁₅H₁₀O₇
- ❖ **Aspect** : poudre jaune
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 325 [M+Na]^+$
- ❖ **RMN ¹H** (300 MHz) et **RMN ¹³C**
(75 MHz) dans CD₃OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-19



V-3-3-7-Composé CP7

- ❖ **Nom** : Daucostérol
- ❖ **Formule brute** : $C_{35}H_{60}O_6$
- ❖ **Aspect** : poudre blanche
- ❖ $[\alpha]_D = -41,5$ (C= 0,4, MeOH)
- ❖ **MS** : ESI-MS mode positif
 $m/z = 599$ $[M+Na]^+$
- ❖ **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C**
(125 MHz) dans CD_3OD
- ❖ **Données spectrales** : Tableau III-12





Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter

Badra Bouzghaia, Mohammed Tahar Ben Moussa, Rima Goudjil, Hassina Harkat & Patrick Pale

To cite this article: Badra Bouzghaia, Mohammed Tahar Ben Moussa, Rima Goudjil, Hassina Harkat & Patrick Pale (2021) Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter, *Natural Product Research*, 35:22, 4734-4739, DOI: [10.1080/14786419.2020.1715397](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1715397)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1715397>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 23 Jan 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 299



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 2 View citing articles [↗](#)

SHORT COMMUNICATION



Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter

Badra Bouzghaia^{a,b}, Mohammed Tahar Ben Moussa^a, Rima Goudjil^c,
Hassina Harkat^a and Patrick Pale^d

^aLaboratoire de physio-toxicologie, pathologie cellulaires et moléculaires-biomolécules (LPTPCMB), Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université de Batna-2, Batna, Algérie;

^bDépartement de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Batna, Algérie; ^cLaboratoire de microbiologie et de biologie végétale, Université de Mostaganem-Algerie, Mostaganem, Algeria; ^dLaboratoire de Synthèse et Réactivité Organiques, Associé au CNRS, Institut de Chimie de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

ABSTRACT

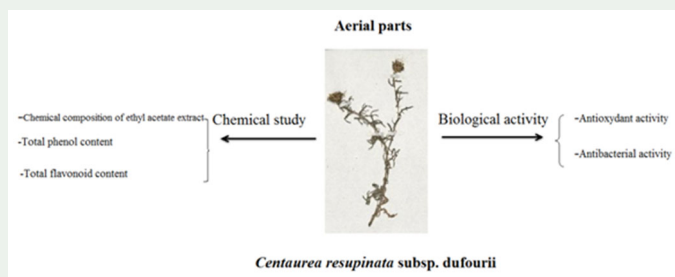
The current study focuses on the chemical composition, and evaluation of antioxidant and antibacterial activity of the aerial parts of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii*. Using different chromatographic methods nine compounds 1–9 were isolated. The structural identification of isolated compounds was achieved using several spectroscopic methods NMR techniques (¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC) and mass spectroscopy (ESI-MS) and by comparison with literature data. The structures of these compounds were identified as nicotiflorin (1), apigetrin (2), chrysoeriol (3), apigenin (4), chrysin (5), daucosterol (6), β-sitosterol (7), taraxastrerol (8) and lupeol (9). The antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate and *n*-butanol extracts have been evaluated. The antioxidant activity was assessed in vitro using DPPH radical scavenging method, which showed that ethyl acetate extract possessed an interesting antioxidant potential (IC₅₀ = 36.263 ± 0.005 μg/mL).

ARTICLE HISTORY

Received 2 October 2019
Accepted 30 December 2019


KEYWORDS

Centaurea resupinata;
antibacterial activity;
antioxidant activity;
flavonoids; triterpenes;
phytosterols



CONTACT Harkat Hassina  harkat_hassina@yahoo.fr

This article was originally published with errors, which have now been corrected in the online version. Please see Correction (<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2020.1857011>)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1715397>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

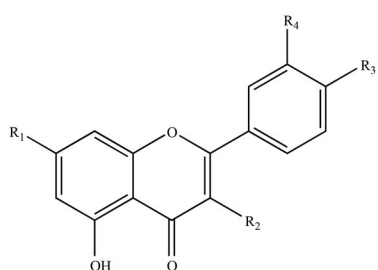
1. Introduction

The genus *Centaurea* (Asteraceae), is prevalent in all over the world. It includes more than 500 species (Forgo et al. 2012) encompassing about 45 species growing spontaneously in Algeria. This genus has been reported, in folk medicine, as diuretic (Aktumsek et al. 2011), tonic (Tekeli et al.2010), anti-rheumatic remedy (Koca et al. 2009; Albayrak et al. 2017), anti-inflammatory (Garbacki et al. 1999), antipyretic (Akkol et al. 2009), and antibacterial (Formisano et al. 2008).

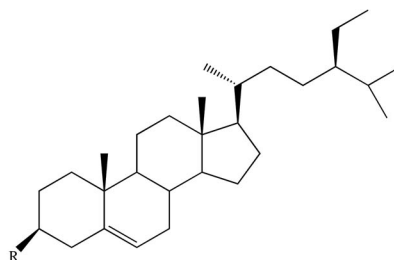
Different species of the genus *Centaurea* have been object of many phytochemical investigations that showed their wealth of bioactive secondary metabolites such as flavonoids (Christensen 1991; Shoeb et al. 2007; Mirzahosseini et al. 2019), sesquiterpene lactones (Koukoulitsa et al. 2002; Saroglou et al. 2005; Shakeri et al. 2018) lignans (Hodaj et al. 2017), phytosterols and triterpenes (Serin 1997; Bulut et al. 2019).

The present paper deals with the isolation and structure elucidation of nine known metabolites

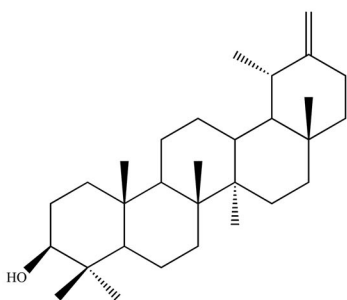
Figure 1 from the ethyl acetate extract of aerial parts of *C. resupinata* subsp. *dufourii*. Since several isolated compounds were described as possessing an interesting antioxidant activity, we found it pertinent to evaluate the antioxidant activity



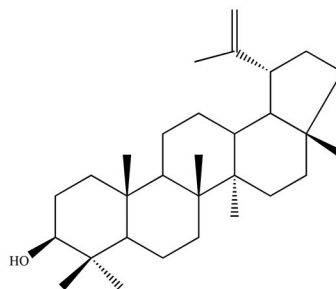
Compound 1: R₁=R₃=OH, R₂=O-ramnoglucoyl, R₄=H
Compound 2: R₁=O-glucose, R₂=R₄=H, R₃=OH
Compound 3: R₁=R₃=OH, R₂=H, R₄=OCH₃
Compound 4: R₁=R₃=OH, R₂=R₄=H
Compound 5: R₁=OH, R₂=R₃=R₄=H



Compound 6: R=O-glucose
Compound 7: R=OH



Compound 8



Compound 9

Figure 1. Structures of the isolated compounds 1–9 of *C. resupinata* subsp. *dufourii*.

of the ethyl acetate and *n*-Butanol extracts. In addition, both extracts exhibited a moderate potential as antibacterial compounds against micro-organisms.

To the best of our knowledge, this work constitutes the first phytochemical and biological study of *C. resupinata* subsp. *dufourii*.

2. Results and discussion

2.1. Chemical composition of *C. resupinata* subsp. *dufourii*

This work allowed the isolation of nine compounds from ethyl acetate extract of *C. resupinata* subsp. *dufourii*. The structures of the compounds (Figure 1) were identified on the basis of spectral analysis, mainly ^1H , ^{13}C and 2D-NMR (COSY, HSQC and HMBC) and mass spectroscopy (ESI-MS) and by comparing with those reported in the literature, as Kaempférol-3-*O*-rutinoside (nicotiflorin) **1** (Karamenderes et al. 2007), apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (apigetrin) **2** (Kubacey et al. 2012), 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (chrysoeriol) **3** (Bentamene et al. 2008; Seghiri et al. 2009), 5,7,4'-trihydroxyflavone (apigenin) **4** (Shoeb et al. 2005), 5,7'-dihydroxyflavone (chrysin) **5** (Grienke et al. 2018), β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (daucosterol) **6** (Flamini et al. 2001), 24-ethylcholest-5-en-3-ol (β -sitosterol) **7** (Csupor et al. 2013), 18 α , 19 α -urs-20(30)-en-3 β -ol (taraxasterol) **8** (Sen et al. 2017), lup-20(29)-en-3-ol (lupeol) **9** (Meriçli 1988).

2.2. Total phenol and flavonoid contents

The concentration of total phenolic content (TPC) and flavonoid (TFC) in various extracts of aerial parts of *C. resupinata* subsp. *dufourii* were measured using Folin-Ciocalteu method, and the aluminium chloride method respectively. The results were found to be 173.3 ± 4.321 mg GAE/mg and 44.223 ± 3.052 mg QE/mg, (Table S1, Supplementary material).

This finding could be explained by the present phytochemical investigation of ethyl acetate extract witch revealed the presence of many flavonoids compounds.

2.3. Evaluation of antioxidant activity

The antioxidant activity of aerial parts of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *C. resupinata* subsp. *dufourii* was measured *in vitro* using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) according to the procedure described by (Hatano et al. 1988). Ascorbic acid was used as the reference compound. Ethyl acetate extract showed the highest activity of radical scavenging in comparison with *n*-butanol extract ($\text{IC}_{50} = 36.263 \pm 0.005$ $\mu\text{g/ml}$; $\text{IC}_{50} = 97.013 \pm 0.019$ $\mu\text{g/ml}$) (Table S2, Supplementary material), which can be explained by its richness in flavonoids components, known especially for their antioxidant activity.

2.4. Evaluation of antibacterial activity

In vitro study of antibacterial activity of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of aerial parts of *C. resupinata* subsp. *dufourii*, was assessed using the disc diffusion method described by (Kursat and Erecevit 2009) with slight modifications, five bacterial strains including one Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and four Gram negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis*, and *Klebsiella pneumonia* BLSE. Obtained results given in (Table S3, Supplementary material) showed that the two extracts possessed a moderate antibacterial activity. Both were active against all test strains except *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* ATCC 27853, and the highest diameter of inhibition were was appeared on *P. mirabilis* with 15.65 ± 0.283 mm for the *n*-butanol extract.

3. Conclusion

The phytochemical investigation of the ethyl acetate extract of aerial parts of *C. resupinata* subsp. *dufourii* led to the isolation and characterization of nine known compounds five flavonoids (1–5), two triterpenes (6–7) and two phytosterols (8–9). Ethyl acetate extract showed high phenolic and flavonoid contents. This result was in good agreement with their antioxidant activity. Moreover, both ethyl acetate and *n*-butanol extracts of aerial parts of *C. resupinata* subsp. *dufourii* have moderate potential as antibacterial compounds against micro-organisms.

Acknowledgements

The authors wish to express their acknowledgements to the University of Strasbourg (France), for providing research facilities and technical support.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Akkol EK, Arif R, Ergun F, Yesilada E. 2009. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *J Ethnopharmacol.* 122(2):210–215.
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. 2011. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol.* 49 (11):2914–2920.
- Albayrak S, Atasagun B, Aksoy A. 2017. Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. Obtained by three extraction techniques. *Asian Pacific J Trop Med.* 10(6):599–606.
- Bentamene A, Baz M, Boucheham R, Benayache S, Creche J, Benayache F. 2008. Flavonoid aglycones from *Centaurea sphaerocephala*. *Chem Nat Compd.* 44(2):234–235.
- Bulut F, Demirtas I, Koldas S, Gul F, Behcet L, Ozen T, Oke-Altuntas F. 2019. The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic *Centaurea derderiifolia*. *Nat Prod Res.* :1–4. doi:10.1080/14786419.2019.1644507.
- Christensen LP. 1991. Flavones and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry.* 30(8):2663–2665.

- Csupor D, Widowitz U, Blazsó G, Laczkó-Zöld E, Tatsimo JSN, Balogh Á, Boros K, Dankó B, Bauer R, Hohmann J. 2013. Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the Carpathian Basin. *Phytother Res.* 27(4):540–544.
- Flamini G, Antognoli E, Morelli I. 2001. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry.* 57(4):559–564.
- Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. 2012. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia.* 83(5):921–925.
- Formisano C, Rigano D, Senatore F, Celik S, Bruno M, Rosselli S. 2008. Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities. *Nat Prod Res.* 22(10):833–839.
- Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Bodart P, Tits M, Angenot L. 1999. Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. *J Ethnopharmacol.* 68(1–3):235–241.
- Grienke U, Radić Brkanac S, Vujčić V, Urban E, Ivanković S, Stojković R, Rollinger JM, Kralj J, Brozovic M, Stojković MR. 2018. Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina* L. *Front Pharmacol.* 9:972.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull.* 36(6):2090–2097.
- Hodaj E, Tsiptsoglou O, Abazi S, Hadjipavlou-Litina D, Lazari D. 2017. Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Nat Prod Res.* 31(10):1195–1200.
- Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S, Khan IA. 2007. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry.* 68(5):609–615.
- Koca U, Süntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. 2009. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev.ex Spreng. *J Ethnopharmacol.* 126(3):551–556.
- Koukoulitsa E, Skaltsa H, Karioti A, Demetzos C, Dimas K. 2002. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. *Planta Med.* 68(7):649–652.
- Kubacey TM, Haggag EG, ElToumy SA. 2012. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *J Pharm Res.* 5(6):3352–3361.
- Kursat M, Erecevit P. 2009. The antimicrobial activities of methanolic extracts of some lamiaceae members collected from Turkey. *Turk J Sci Technol.* 4(1):1–8.
- Meriçli AH. 1988. Palmitic acid ester of sitosteril 3 β -glucoside from *Centaurea regia*. *Phytochemistry.* 27(12):3964–3965.
- Mirzahosseini G, Manayi A, Khanavi M, Safavi M, Salari A, Madjid Ansari A, San'ati H, Vazirian M. 2019. Bio-guided isolation of *Centaurea bruguierana* subsp. *belangerana* cytotoxic components. *Nat Prod Res.* 33(11):1687–1690.
- Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K, Skaltsa H. 2005. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J Nat Prod.* 68(9):1404–1407.
- Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estevez F, Leon F, Bermejo J, Benayache F. 2009. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett.* 2(3):114–118.
- Sen A, Ozbas Turan S, Bitis L. 2017. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharm Biol.* 55 (1):541–546.
- Serin S. 1997. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry.* 46 (3):545–548.
- Shakeri A, Amini E, Asili J, Masullo M, Piacente S, Iranshahi M. 2018. Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. *Nat Prod Res.* 32(12):1436–1440.
- Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus S M, Nahar L, Thoo-Lin P K, Sarker S D. 2005. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron.* 61(38):9001–9006.

- Shoeb M, Jaspars M, MacManus SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. 2007. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *J Nat Med.* 61(2):164–169.
- Tekeli Y, Sezgin M, Aktumsek A, Ozmen Guler G, Aydin Sanda M. 2010. Fatty acid composition of six *Centaurea* species growing in Konya, Turkey. *Nat Prod Res.* 24(20):1883–1889.

Résumé

L'objectif principal de ce travail, est d'identifier les métabolites secondaires des parties aériennes des deux espèces *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (Asteraceae) et *Cytisus purgans* L. Benth (Fabaceae). Ces deux familles de plantes sont connues pour leur richesse en biomolécules actives et leur l'intérêt pharmacologique.

L'utilisation des différentes techniques chromatographiques de séparation et les méthodes d'analyse spectroscopiques : UV, RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY H-H, HSQC, et HMBC), spectrométrie de masse, la mesure de pouvoir rotatoire ainsi que la comparaison avec les données de la littérature ont permis de déterminer la structure de dix composés purs isolés de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Centaurea resupinata* (six flavonoïdes, deux phytostérols, deux triterpènes) et sept produits de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Cytisus purgans* (quatre isoflavones, un flavone, un flavonol, un phytostérol).

Notre travail vise également l'évaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des deux extraits AcOEt et n-BuOH des parties aériennes de la plante *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* par les méthodes : Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium, respectivement. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait AcOEt est relativement riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait n-BuOH.

L'étude *in vitro* de l'activité anti-oxydante des deux extraits est effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats ont révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle possède un pouvoir antioxydant intéressant.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits AcOEt et n-BuOH de *Centaurea resupinata* subsp a été déterminée sur six souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux levures : *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Les résultats ont montré que les deux extraits testés possèdent une activité antimicrobienne importante.

Mots clés : Asteraceae, Fabaceae, *Centaurea resupinata*, *Cytisus purgans*, flavonoïdes, triterpènes, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The main objective of this work is to identify the secondary metabolites of the aerial parts of the two species *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (Asteraceae) and *Cytisus purgans* L. Benth (Fabaceae). These two families of plants are known for their richness in active biomolecules and their pharmacological interest.

The use of different chromatographic separation techniques and spectroscopic analysis methods: UV, 1D proton and carbon NMR, 2D NMR (COSY H-H, HSQC, and HMBC), mass spectrometry, measurement of optical rotation as well as the comparison with the data of the literature made it possible to determine the structure of ten pure compounds isolated from the ethyl acetate extract of the species *Centaurea resupinata* (six flavonoids, two phytosterols, two triterpenes) and seven products of the extract ethyl acetate from the species *Cytisus purgans* (four isoflavones, one flavone, one flavonol, one phytosterol).

Our work also aims at the quantitative evaluation of total polyphenols and total flavonoids of the two AcOEt and n-BuOH extracts of the aerial parts of the plant *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* by the methods: Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride, respectively. The results indicate that the AcOEt extract is relatively rich in polyphenols and flavonoids compared to the n-BuOH extract.

The in vitro study of the antioxidant activity of the two extracts is carried out by the DPPH free radical trapping method. The results revealed that the ethyl acetate extract has an interesting antioxidant power.

The antimicrobial activity of AcOEt and n-BuOH extracts of *Centaurea resupinata* subsp was evaluated on six bacterial strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and two yeasts: *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. The results showed that the two extracts tested possess significant antimicrobial activity.

Keywords: Asteraceae, Fabaceae, *Centaurea resupinata*, *Cytisus purgans*, flavonoids, triterpenes, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تحديد المستقلبات الثانوية للأجزاء الهوائية من النوعين *Centaurea* العائلتان من النباتات بثرائهما بالجزيئات الحيوية النشطة وأهميتها الدوائية. *Cytisus purgans* L. Benth (Fabaceae) و *resupinata* subsp. *dufourii* (Asteraceae). تشتهر هاتان

استخدام تقنيات الفصل الكروماتوغرافي المختلفة وطرق التحليل الطيفي: الأشعة فوق البنفسجية ، RMN 1D البروتون والكربون ، RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC) ، قياس الطيف الكتلي وكذلك قياس الدوران البصري وبالمقارنة مع البيانات من الأدبيات ، مكنت من تحديد عشرة مركبات نقية معزولة من مستخلص أسيتات الإيثيل من نوع *Centaurea resupinata* (سنة مركبات فلافونويد ، واثنين من فيتوستيرول ، واثنين من التربينات) وسبعة مركبات نقية من مستخلص أسيتات الإيثيل من نوع *Cytisus purgans* (أربعة إيزوفلافون ، فلافون واحد ، فلافونول واحد ، فيتوستيرول واحد).

يهدف عملنا أيضًا إلى التقييم الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد لمستخلصي AcOEt و n-BuOH للأجزاء الهوائية من نبات *Centaurea resupinata* بالطريقتين : Folin-Ciocalteu و trichlorure d'aluminium على التوالي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص AcOEt غني نسبيًا بالبوليفينول والفلافونويد مقارنة بمستخلص n-BuOH.

تم إجراء الدراسة المخبرية للنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين بطريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH. كشفت النتائج أن مستخلص أسيتات الإيثيل له قوة مثيرة للاهتمام كمضاد للأكسدة.

تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات AcOEt و n-BuOH من *Centaurea resupinata* على ست سلالات بكتيرية: *Escherichia coli* ATCC 25922 ، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Proteus mirabilis* ، *Serratia marcescens* ، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 واثنين من الخمائر: *Candida albicans* و *Candida parapsilosis*. أظهرت النتائج أن المستخلصين يمتلكان فعالية مهمة كمضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية:

Asteraceae ، Fabaceae ، *Centaurea resupinata* ، *Cytisus purgans* ، الفلافونويدات ، التربينات، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات.