

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des Frères Mentouri –Constantine-

N° d'orde:

Série:

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

En Chimie Organique

Option: Phytochimie

THEME

Etude phytochimique et biologique de *Bituminaria bituminosa*(L.)C.H.Stirton (Fabaceae) et *Centaurea dimorpha* Viv. (Asteraceae)

PAR

AZZOUZI Salima ep OUCHTATI

Devant le jury

M^r. Salah AKKAL	Prof. U.des Frère Mentouri –Constantine-	Président
M^r. Kamel MEDJROUBI	Prof. U. des Frère Mentouri –Constantine-	Rapporteur
M^r. Amar ZELLAGUI	Prof. U. Larbi Ben M'hidi -Oum el Bouaghi-	Examineur
M^r. Merzoug BENAHMED	M.C. U. Larbi Tebessi –Tebessa-	Examineur

Soutenue le: 20/04/2016

Remerciements

Avant toute chose, je remercie dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Je tien à exprimer mes sincères et vifs remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Kamel MEDJROUBI, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses précieux conseils, ses critique constructives et surtout pour la confiance qu'il ma accordée dans la réalisation de ce travail. Recevez ici ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur Salah AKKAL, pour sa disponibilité, ses précieux conseils, sa gentillesse et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Mes remerciements vont également à Monsieur Amar ZELLAGUI, Professeur à l'université d'Oum el Bouagui et Monsieur le Docteur Merzoug BENAHMED, Maître de conférence de l'université de Tebessa, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie en particulier Madame Nabila ZAABAT, Maître de conférence de l'université des Frère Mentouri -Constantine- pour ses conseils précieux, son soutien moral, son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et son amitié.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Lakhder DJARRI, Maître de conférence de l'université des Frère Mentouri -Constantine- pour ses conseils, son aide et sa grande générosité.

Mes remerciements vont également à Madame Farida SMATTI et Monsieur Khadour BENLABED pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Constantine Ibn Badis.

J'adresse également mes remerciements à mon frère Mouhemed Taher et ma belle sœur Laïla pour leur disponibilité et leur aide concernant la partie bactériologie.

Je voudrai également remercier l'ensemble de mes amis et collègues du laboratoire pour avoir su me soutenir et m'encourager au cours de ce travail. Je cite en particulier: Souhila LAAOUR, Radia AYAD, Amel ACHOURI, Fatima zohra BELFADDEL, Ibtissem BOULACEL, Nabila Souilah, Moustapha LEFHAL, Elhani MEKHLOUFI, Zeine el abidine ABABBSA.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur Gérard De BELAIR de l'université Badji Mokhtar de Annaba, pour l'identification de plante Bituminaria bituminosa.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Docteur Tarek HAMEL de l'université Badji Mokhtar de Annaba, pour l'identification de la plante Centaurea dimorpha.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

À la mémoire de mes chers parents.

À mon cher mari Mouhemed.

À mes enfants: khaled Islam et Imed Eddine.

À mes frères, à mes sœurs.

À toute ma famille.

À tous mes amis.

Liste des Abréviations

- 2HID:** 2-hydroxyisoflavanone synthase.
- 2HIS:** 2-hydroxyisoflavanone déshydratase.
- Ac:** Acétyle.
- AcOEt:** Acétate d'éthyle.
- Ara:** -L- Arabinopyranoside.
Ara: -L- Arabinopyranoside.
- ARP:** Anti Radical Power.
- C4H:** Cytochrom P450 cinnamate-4-hydroxylase.
- C4L:** 4-Coumaroyl CoA ligase.
- CC:** Chromatographie liquide sur colonne.
- CCM:** Chromatographie préparative sur couche mince.
- CD₃OD:** méthanol deutéré.
- CH₂Cl₂:** Dichlorométhane.
- CHI:** Chalcone isomérase.
- CHS:** Chalcone synthase.
- CHU:** Centre Hospitalier Universitaire.
- CI:** Ionisation Chimique.
- COSY:** Correlation Spectroscopy.
- CP:** Chromatographie préparative sur papier.
- CUPRAC:** CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity.
- d:** doublet.
- DCI:** Ionisation chimique directe.
- dd:** doublet de doublet.
- DEPT135:** Spectre de carbone 13 réalisé en Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer.
- DMSO-d₆:** diméthylsulfoxyde deutéré.
- DPPH:** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole.
- E%:** coefficient d'extinction massique.
- EI:** impact électronique.
- ES:** Electro Spray.
- et al:** et autres auteurs.
- FAB:** ionisation par bombardement d'atomes rapides.

FHT: flavanone-3-hydroxylase.

FLS: flavonol synthase.

FSI: flavone synthase.

Glc: -D- Glucopyranoside.

Glucur: -D- Glucuronopyranoside.

H₂O: eau distillée.

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation.

IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50%.

IFS: isoflavone synthase.

J (Hz): constante de couplage exprimée en Hertz.

LC/MS: Chromatographi liquide à haut performance couplée à la spectrométrie de masse.

Me: Méthyle.

MEC: Méthyle Ethyle Cétone.

MeGlucur: -D- Glucuronopyranoside methyle ester.

MeOH: Méthanol.

m/z: Rapport masse/charge électronique.

n-BuOH: n-butanol.

NCCLS: National Committe of Clinical Laboratory standards.

nm: nanomètre.

PAL: Phenylalanine ammonia Lyase.

PI: pourcentage d'inhibition.

ppm: Partie par million.

R_f: rapport frontal.

Rha: Rhamnoglucosyle.

RMN: Résonance Magnétique nucléaire.

RMN¹H: Résonance Magnétique nucléaire du proton.

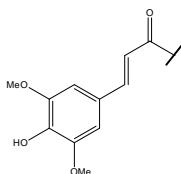
RMN¹³C: Résonance Magnétique nucléaire du carbone 13.

Rut: -D- Rutinosyle.

s: singulet.

SD: Déviation Standard (ou écart type).

Sin: Sinapyl.



TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity.

Trolox: acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique.

UV: Ultraviolet.

: longueur d'onde maximal d'absorption (UV).

(ppm): Déplacement chimique exprimé en ppm.

: coefficient d'extinction molaire.

Liste des figures

Chapitre II: Etude des flavonoïdes

Figure-1-: Structures de base des flavonoïdes.....	34
Figure-2-: Biosynthèse des dérivés cinnamiques.....	35
Figure-3-: Formation de chalcone à partir des acides cinnamiques.....	36
Figure-4-: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes.....	37
Figure-5-: Structures des différentes sous-classes d'isoflavono des.....	38
Figure-6-: Biosynthèse des isoflavono des.....	41
Figure-7-: Les bandes caractéristiques d'un squelette flavon que.....	45
Figure-8-: Formation des différents types de complexes après addition de AlCl ₃ et en présence de HCl.....	48

Chapitre III: Partie expérimentale

Figure-1-: Produits isolés de <i>Bituminaria bituminosa</i> (L.) C.H.Stirton.....	58
Figure-2-: Présentation des parties aériennes de <i>Bituminaria bituminosa</i>	60
Figure-3-: Organigramme d'extraction du <i>Bituminaria bituminosa</i> (L.) C.H.Stirton.....	61
Figure-4-: (a) Herbier de <i>Centaurea dimorpha</i> Viv. (b) <i>Centaurea</i> <i>dimorpha</i> Viv.....	65
Figure-5-: Organigramme d'extraction du <i>Centaurea dimorpha</i> Viv.(I).....	66
Figure-6-: Organigramme d'extraction du <i>Centaurea dimorpha</i> Viv.(II).....	68

Chapitre V: Activité biologique

Figure-1-: Photos de quelques étapes de l'activité antibactérienne.....	123
--------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des tableaux

Chapitre I: Rappel bibliographique

Tableau-1-: Structure des isoflavonoides isolés de quelques espèces du genre <i>Bituminaria bituminosa (Psolarea)</i>	6
Tableau-2-: Structure des méroterpénoides isolés de deux espèces du genre <i>Bituminaria (Psolarea)</i>	7
Tableau-3-: Divers composés isolés de quelques espèces du genre <i>Bituminaria (Psolarea)</i>	9
Tableau-4-: Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre <i>Bituminaria (Psolarea)</i>	11
Tableau-5-: Les flavonoides isolés du genre <i>Centaurea (2009-2015)</i>	15
Tableau-6-: Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre <i>Centaurea</i>	25

Chapitre II: Etude des flavonoides

Tableau-1-: Familles de plantes dans lesquelles ont été isolé les flavonoides.....	39
Tableau-2-: Relation entre la fluorescence sous lumière UV et la structure flavonoiques.....	44
Tableau-3-: La relation entre le R_f et la structure flavonique.....	45
Tableau-4-: Relation entre le maximum d'absorption UV et le type de flavonoides.....	46
Tableau-5-: Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après addition des réactifs.....	49
Tableau-6-: Déplacements chimiques des protons du noyau A.....	50
Tableau-7-: Quelques déplacements chimiques des protons du noyau B.....	51
Tableau-8-: Déplacement chimique des carbones des génines de quelques composés flavoniques.....	52

Chapitr III: Partie expérimentale

Tableau-1-: Tableau de fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	62
Tableau-2-: Tableau de fractionnement de l'extrait n-butanol.....	63
Tableau-3-: Résultats de fractionnement de l'extrait CH_2Cl_2	69
Tableau-4-: Résultats de fractionnement de l'extrait AcOEt.....	70

Tableau-5: Résultats de la séparation de la fraction F ₄	71
----------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre IV: Résultats et discussion

Tableau-1: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé B ₁	73
Tableau-2: Données de la série spectrale UV du composé B ₁	75
Tableau-3: Données de la spectroscopie RMN ¹³ C du composé B ₁	77
Tableau-4: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé B ₃	79
Tableau-5: Données de la série spectrale UV du composé B ₃	81
Tableau-6: Données de la spectroscopie RMN ¹³ C du composé B ₃	82
Tableau-7: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé B ₄	85
Tableau-8: Données de la série spectrale UV du composé B ₄	88
Tableau-9: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé D ₁	90
Tableau-10: Données de la série spectrale UV du composé D ₁	92
Tableau-11: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé D ₂	94
Tableau-12: Données de la série spectrale UV du composé D ₂	97
Tableau-13: Données de la spectroscopie RMN ¹ H du composé C ₁	100
Tableau-14: Données de la série spectrale UV du composé C ₁	102
Tableau-15: RMN ¹ H et COSY du composé C ₂	105
Tableau-16: Données de la série spectrale UV du composé C ₂	107
Tableau-17: Données de la RMN ¹³ C et HSQC du composé C ₂	109

Chapitre V: Activité biologique

Tableau-1: Activité anti-oxydante de l'extrait butanolique de la plante <i>B.bituminosa</i> par les tests DPPH et CUPRAC.....	116
Tableau-2: activité antibactérienne de l'extrait CH ₂ Cl ₂	119
Tableau-3: activité antibactérienne de l'extrait AcOEt.....	119
Tableau-4: activité antibactérienne de l'extrait n-BuOH.....	120
Tableau-5: activité antibactérienne de l'extrait AcOEt.....	121
Tableau-6: activité antibactérienne de l'extrait n-BuOH.....	121

SOMMAIRE

Introduction Générale	1
<i>Références bibliographique</i>	3
Chapitre I: Rappel Bibliographique	
I. Famille des Fabaceae.....	4
I.1. Caractères botaniques de la Famille.....	4
I.1.1. Appareil végétatif.....	4
I.1.2. Appareil producteur.....	4
I.2. Classification des Fabaceae.....	5
II. Genre <i>Bituminaria</i>	5
II.1. Caractéristique botanique.....	5
II.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Bituminaria</i>	5
II.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle	10
III. Famille des Asteraceae.....	12
III.1. Caractères botaniques de la famille.....	12
III.1.1. Appareil végétatif.....	12
III.1.2. Appareil producteur.....	12
III.2. Classification des Asteraceae.....	13
IV. Genre <i>Centaurea</i>	13
IV.1. Caractéristique botanique.....	13
IV.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Centaurea</i>	13
IV.2.1. les flavonoïdes du genre <i>Centaurea</i>	14
IV.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle.....	24
<i>Références bibliographiques</i>	26
Chapitre II: Etude des flavonoïdes	
I. Les flavonoïdes.....	34
I.1. Généralités.....	34
I.2. Distribution.....	34
I.3. Biosynthèse.....	34
II. Les isoflavonoïdes.....	38

II.1. Généralités.....	38
II.2. Distribution.....	39
II.3. Biosynthèse.....	40
III. Activités biologiques des flavonoïdes.....	42
III.1. Activités antibactérienne.....	43
III.2. Activités anti-oxydante.....	42
IV. L'étude chimique des flavonoïdes.....	43
IV.1. Séparation et purification.....	43
V. Analyse structurale des flavonoïdes.....	44
V.1. Fluorescence sous lumière UV.....	44
V.2. Rapport frontal R_f	44
V.3. spectroscopie UV-visible.....	45
V.3.1. Addition de réactifs.....	46
V.3.1.1. Spectre en présence de NaOH.....	46
V.3.1.2. Spectre en présence de NaOAc.....	47
V.3.1.3. Spectre en présence de NaOAc+H ₃ BO ₃	47
V.3.1.4. Spectre en présence de AlCl ₃ et AlCl ₃ +HCl.....	47
V.4. Spectrométrie de masse.....	49
V.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	50
V.5.1. La RMN du proton (RMN ¹ H).....	50
V.5.2. La RMN du carbone 13 (RMN ¹³ C).....	52
Références bibliographiques.....	54

Chapitre III: Partie expérimentale

I. Etude phytochimique de l'espèce <i>Bituminaria bituminosa</i> (L.)C.H.Stirton.....	58
I.1. Introduction.....	58
I.2. Etude bibliographique.....	58
I.3. place dans la systématique.....	59
I.4. Synonyme de la plante <i>B.bituminaria</i>	59
I.5. Nom vernaculaire de <i>B.bituminosa</i>	59
I.6. Description botanique.....	59
I.7. Protocole expérimental.....	60
I.7.1. Récolte du matériel végétal.....	60
I.7.2. Extraction.....	60

I.7.3. Séparation et purification des extraits polaires de <i>Bituminaria bituminosa</i>	62
I.7.3.a. Séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	62
I.7.3.b. Séparation et purification de l'extrait n-butanol.....	63
II. Etude phytochimique de l'espèce <i>Centaurea dimorpha</i> Viv.....	64
II.1. Etude bibliographique.....	64
II.2. place dans la systématique.....	64
II.3. Synonyme de la plante <i>C. dimorpha</i>	64
II.4. Description botanique.....	64
II.5. Protocole expérimental.....	65
II.5.1. Récolte du matériel végétal.....	65
II.5.2. Extraction.....	65
II.5.3. Séparation et purification des extraits issus de <i>Centaurea dimorpha</i> Viv.....	69
II.5.3.a. Séparation et purification des composés de l'extrait dichlorométhane.....	69
II.5.3.b. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	70
<i>Références bibliographiques</i>	72

Chapitre IV: Résultats et discussion

I. Détermination structural des produits isolés de l'espèce <i>B. bituminosa</i>	73
I.1. Le composé B ₁	73
I.2. Le composé B ₃	78
I.3. Le composé B ₄	84
II. Détermination structural des produits isolés de l'espèce <i>C. dimorpha</i>	90
II.1. Le composé D ₁	90
II.2. Le composé D ₂	94
II.3. Le composé C ₁	99
II.4. Le composé C ₂	103
<i>Références bibliographiques</i>	112

Chapitre V: Activité biologique

I. Activité anti-oxydante.....	113
I.1. Matériel et méthode.....	113
I.1.1. Test DPPH.....	113
I.1.2. Test CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity).....	115
I.2. Résultat et discussion.....	116
II. Détermination de l'activité antibactérienne.....	116

II.1. Matériel.....	117
II.1.1. Matériel bactériologique.....	117
II.1.2. Matériel végétal.....	117
II.2. Méthode.....	117
II.3. Résultat et discussion.....	118
II.3.1. Détermination de l'activité antibactérienne de la plante <i>Bituminaria bituminosa</i>	118
II.3.2. Détermination de l'activité antibactérienne de la plante <i>Centaurea dimorpha</i>	121
II.4. Conclusion.....	122
Références bibliographiques.....	124
Conclusion Générale	125

Introduction Générale

Introduction générale

Depuis les temps les plus anciens, les grandes civilisations (égyptienne, chinoise, babylonienne, grecque, romaine...etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires... etc.

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir plusieurs milliers de constituants différents [1].

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [2], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Le présent travail est une contribution dans la valorisation de la flore algérienne, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques.

La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phytochimique et biologique.

C'est pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude des deux plantes suivantes :

1. L'espèce *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton, appartenant à la famille des Fabaceae (Légumineuses), sous famille de Papilionaceae (Faboideae) . Les diverses investigations phytochimiques menées sur cette famille et plus particulièrement sur le genre *Bituminaria* ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires surtout les furanocoumarines et les isoflavonoïdes [3,4].
2. L'espèce *Centaurea dimorpha* Viv., plante endémique, appartenant à la famille des Asteraceae (Composées) [5]. En effet, le genre *Centaurea* a fait l'objet de nombreuses recherches phytochimiques et pharmacologiques durant plusieurs années [6,7].

Introduction générale

Notre travail sera divisé en cinq chapitres :

- ✓ Dans le premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique des connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Fabaceae et Asteraceae et les deux genres étudiés (*Bituminaria* et *Centaureae*), ainsi que quelques utilisations en médecine traditionnelle des deux plantes.
- ✓ Le second chapitre sera consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes et isoflavonoïdes), les différents squelettes flavoniques, leur biogenèse, leur diversité structurale et leur intérêt thérapeutique, reporté également toutes les démarches et les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de substances naturelles.
- ✓ Le troisième chapitre sera consacré au travail personnel :
 - Un aperçu botanique sur chaque plante.
 - Séparation et purification des composés obtenus.
- ✓ L'interprétation des résultats et la détermination structurale des produits isolés seront détaillées dans le quatrième chapitre.
- ✓ L'évaluation biologique sur les extraits des deux plantes sera présentée dans le cinquième chapitre.
- ✓ A la fin, une conclusion générale.

Introduction générale

Références bibliographiques

1. Hostettmann, K., Potterat, O., Wolfende, J. L., **1998**. The potential of Higher Plants as a source of New Drugs. *Chimia* **52**, 10-17.
2. Quezel, P. and Santa, S., **1963**. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, C.N.R.S. Paris.
3. Xiao, G., LI, G., Chen, L., Zhang, Z., Yin, J., Wu, T., Cheng, Z., Wei, X., Wang, Z., **2010**. 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.
4. Hamed, A. I., Springuel, I., El-Emary, N; A., Mitome, H. and Yamada, Y., **1997**. A phenolic cinnamate dimer from *Psoralea plicata*. *Phytochemistry*. **45**, 1257-1261.
5. Plante natives Algérie: inventaire. [consulté le 01/10/2015]. <https://algerianativeplants.net/html/plante-algerie-inventaire.php>.
6. Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi. And Tillequin, F., **2007**. Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds*. **43**, 319-320.
7. Nacer, A., Merza, J., Kabouche, Z., Rouati, S., Boustie, J., Richomme, P., **2012**. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **43**, 163-165.

Chapitre I

Rappel bibliographique

Rappel bibliographique

I. Famille des Fabaceae

La grande famille des Fabaceae (de fada, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue.

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19.400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [1]. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées [2].

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja...ect.) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin...ect.), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie [1]

I.1. Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreuses différences aux niveaux des fleurs, qui dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones.

I.1.1.Appareil végétatif

- La racine : est pivotante constituée par des renflements ou nodosités dans lesquelles vivent en symbiose des bactéries du genre *Rhizobium* capables de fixer l'azote atmosphérique.
- Les feuilles : sont généralement alternes, composées-imparipennées et stipulées, peuvent évoluer vers une feuille simple, ou vers une feuille composées-pennée, en particulier la foliole terminale se transforme parfois en vrille et les stipules peuvent devenir plus importantes que les feuilles, voire les remplacer.

I.1.2.Appareil producteur

- Les fleurs sont groupées en grappe plus ou moins allongée. Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoïdeés), possèdent des fleurs actinomorphes de petites tailles avec des étamines très nombreuses. Alors, que chez les Fabaceae les plus évoluées, les fleurs sont zygomorphes avec 10 étamines ou moins libres.

L'ovaire est supère surmonté d'un style et stigmaté, et formé d'un seul carpelle.

- Le fruit : est une gousse ou un légume qu'on appelle un fruit sec à deux ouvertures : ventrale et dorsale. Le nombre d'ovules dans chaque fruit est variable selon les espèces.

Rappel bibliographique

- Les graines : résultant d'un ovule courbe, sont elles-mêmes arquées. Elles sont exalbuminées et riche en amidon (pois, fèves et lentilles), en huile (arachides, graines de soja), et en matières protéiques (graines de soja).

I.2. Classification des Fabaceae

Les Fabaceae ou les Légumineuses, possèdent deux formes de plantes : une forme arborescente prédomine dans les pays chauds, et une forme herbacée dans les régions tempérées. Les Fabaceae peuvent être subdivisées en quatre sous-familles [3]:

- Les Mimoso deae.
- Les Caesalpino deae.
- Les Césalpinio dées
- Les Faboïdeae autrefois appelées Papilionacées, en raison de la forme de la corolle en « papillon», comprenant plusieurs genres comme la *Bituminaria*.

II. Genre *Bituminaria*

Le genre *Bituminaria* appartient à la famille des Fabaceae est connu également sous le nom de *Psoralea*, et compte environ 120 espèces [4].

Ce genre est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Asie occidentale et en Afrique du nord [5]. Alors qu'on Algérie se trouve généralement dans le Tell [6].

II.1. Caractéristique botanique

Les *Bituminaria* sont des plantes glanduleuses, vivaces, à tiges ligneuse, et des feuilles trifoliolées longuement pétiolées et stipulée [6]. Les fleurs sont portées par un pédoncule assez long. Elles sont réunies en un faux capitule serré et arrondi. Les fruits sont des gousses d'environ 2 cm.

II.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Bituminaria*

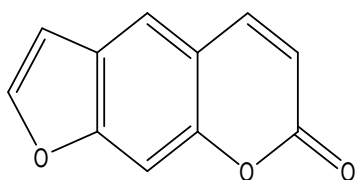
Les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Bituminaria* ont permis l'isolement des furanocoumarines, des isoflavonoïdes, des méroterpénoides [7] et d'autres métabolites secondaires tels que, les huiles essentielles [8,9]; et les phenyl-propanoïdes [10].

- **Les Furanocoumarine**

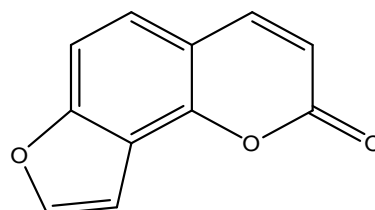
Une recherche bibliographique réalisée sur le genre *Psoralea* montre que les furanocoumarine les plus rencontrés sont: **le psoralène 1** et **L'angelicine 2** connu aussi par le nom

Rappel bibliographique

isopsoralène, fréquemment isolés de plusieurs espèces appartenant à ce genre, on peut citer comme exemple: *Psoralea plicata* [10], *Psoralea glandulosa* [11], *Psoralea corylifolia* [12, 13] et *Bituminaria morisiana* [14].



Psoralène 1



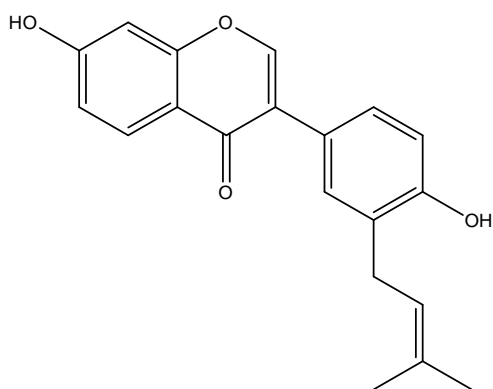
Angelicine 2

- **Les isoflavonoïdes**

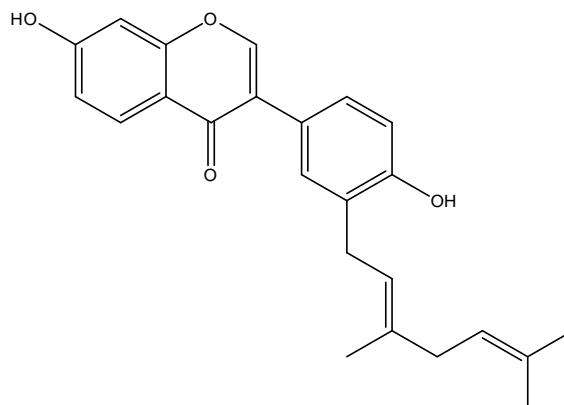
La majorité des isoflavonoïdes isolés du genre *Bituminosa* sont des isoflavonoïdes prenylés. Le tableau ci-dessous présente quelque structure des isoflavonoïdes isolés des espèces du genre *Bituminaria*.

Tableau-1-: Structure des isoflavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Bituminaria* (*Psolarea*)

Nom de l'espèce	Structures	Références
<i>Psolarea corylifolia</i>	<u>3</u> , <u>4</u>	[12] [15]
	<u>5</u>	[12]
	<u>6</u>	[13] [16]
<i>Psolarea plicata</i>	<u>7</u>	[10]
<i>Bituminarea morisiana</i>	<u>5</u>	[4]

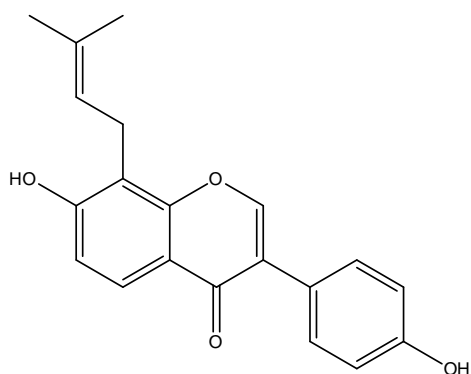


Neobavaisoflavone 3

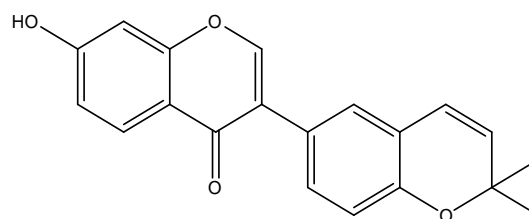


Corylifol A 4

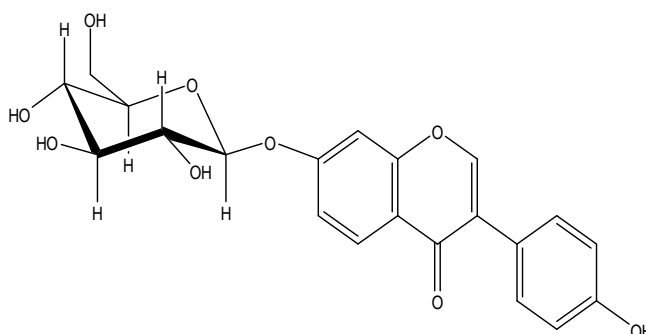
Rappel bibliographique



8-prenyldaidzeine 5



Coryline 6



Daidzine 7

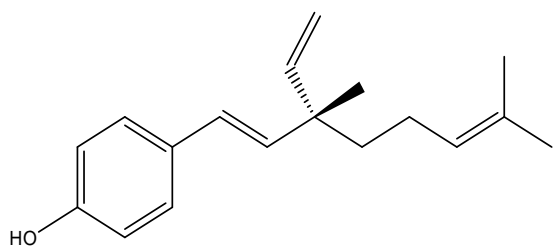
- **Les mèroterpénoïdes**

Les mèroterpénoïdes les plus fréquemment rencontrés dans le genre *Psoralea* sont les dérivés du bakuchiol. Le tableau ci-dessous représente quelques composés mèroterpénoïdes isolés de deux espèces du genre *Bituminaria* (*Psoralea*).

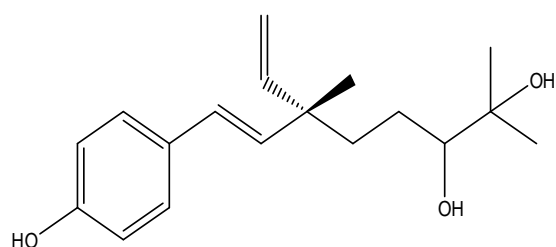
Tableau -2-: Structure des mèroterpénoïdes isolés de deux espèces du genre *Bituminaria* (*Psoralea*)

Nom de l'espèce	Structures	Références
<i>Psoralea corylifolia</i>	<u>9</u>	[13] [15] [17] [18]
	<u>10, 11, 12</u>	[17]
	<u>13, 14</u>	[17] [18]
<i>Psoralea glandulosa</i>	<u>9</u>	[19]
	<u>15, 16</u>	[11] [19]

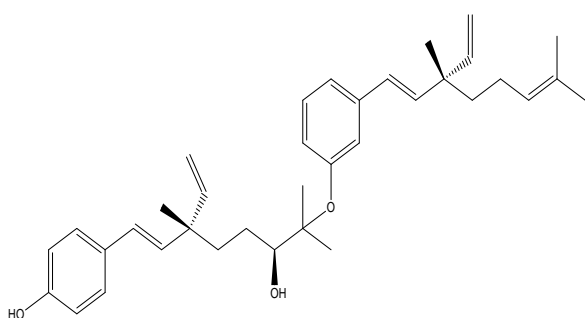
Rappel bibliographique



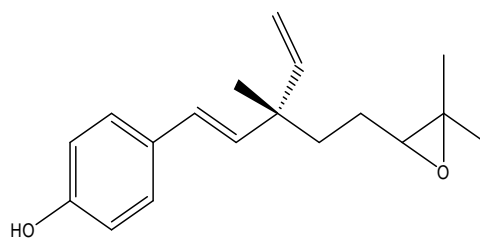
Bakuchiole **9**



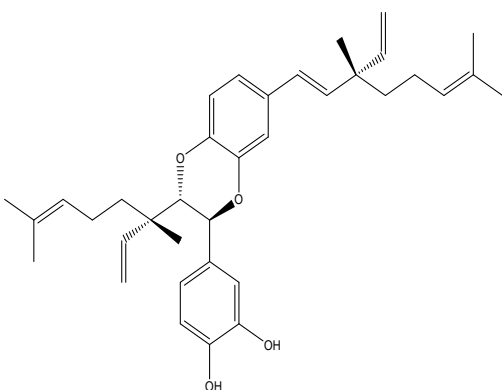
12,13-dihydro-12,13-dihydroxybakuchiole **10**



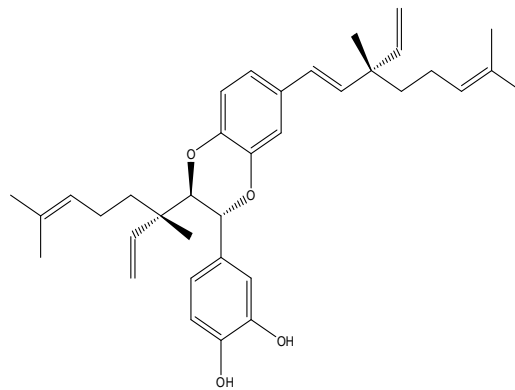
(12' S) bisbakuchiole C **11**



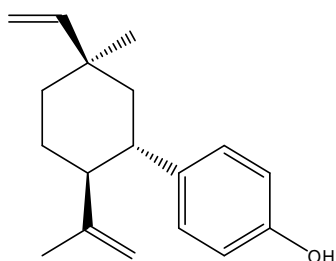
12,13-dihydro-12,13-epoxybakuchiole **12**



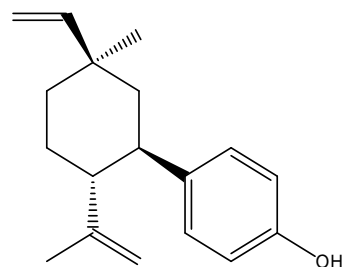
Bisbakuchiole A **13**



Bisbakuchiole B **14**



Cyclobakuchiols A **15**



Cyclobakuchiols B **16**

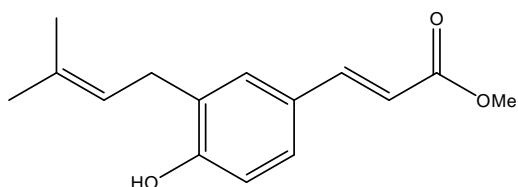
Rappel bibliographique

- **Autres composé**

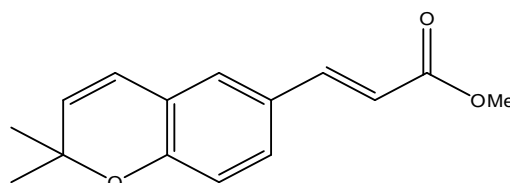
Le tableau ci-dessous représente quelques produits divers isolés de quatre espèces du genre *Bituminaria* (*Psolarea*)

Tableau 3: Divers composés isolés de quelques espèces du genre *Bituminaria* (*Psoralea*)

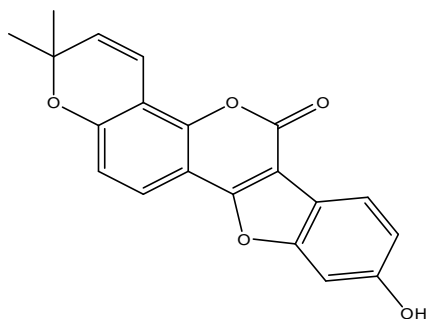
Nom de l'espèce	Structures	Références
<i>Psolarea juncea</i>	<u>18, 19</u>	[20]
<i>Psolarea plicata</i>	<u>20</u> <u>21, 22</u>	[21] [10]
<i>Bituminaria morisiana</i>	<u>23, 24</u>	[4]
<i>Psolarea corylifolia</i>	<u>25, 26, 27</u>	[12] [15]



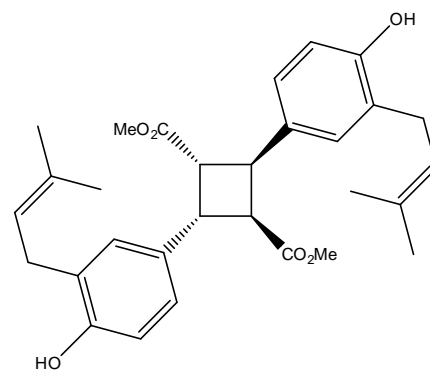
Plicatine B 18



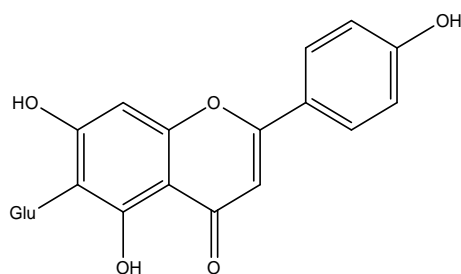
Werneria chromene 19



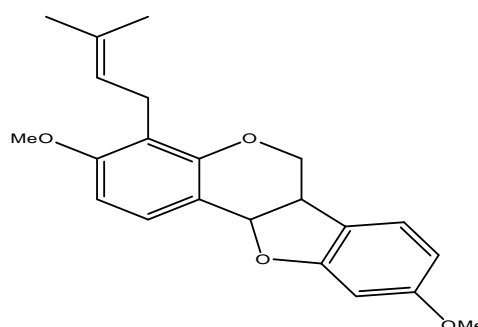
Plicadine 20



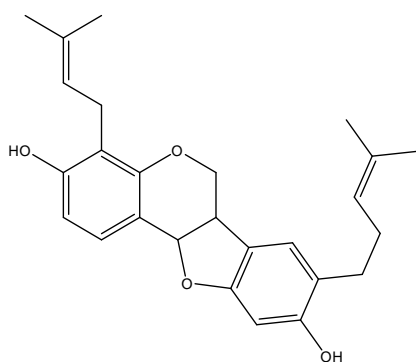
-diplicatine 21



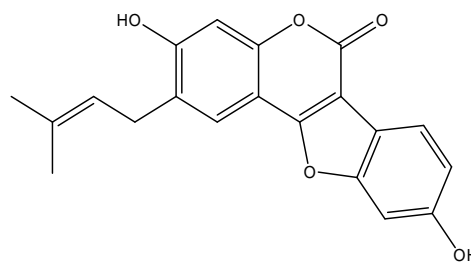
Isovitexine 22



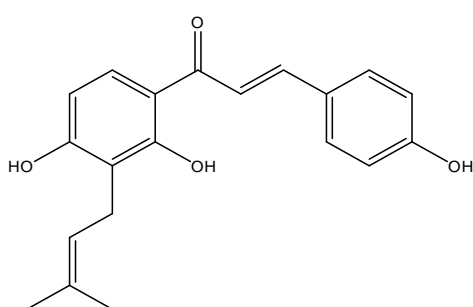
5'-deprényldimethylexybraedine C 23



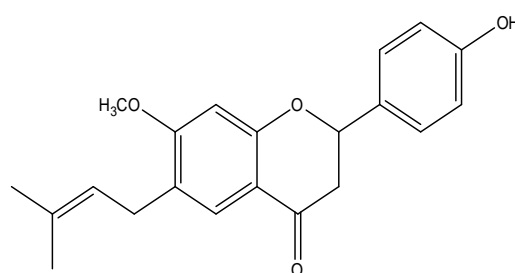
Erybaedine C 24



Psoralidine 25



Isovabachalcone 26



Bavachinine 27

II.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle

En médecine indigène le genre *Bituminaria* possède plusieurs vertus thérapeutiques tel que antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, diurétique, diaphorétique et il sert également de remède pour soigner la lèpre, les infections biliaires et les troubles de cycle menstruel [22,23].

Plusieurs espèces du genre *Bituminaria* (*Psolarea*) sont utilisées en médecine traditionnelle, on peut citer comme exemple: l'espèce *P. glandulosa* utilisée pour le traitement des plaies et la fièvre [24].

En médecine hindoue, les graines de l'espèce *P. corylifolia* associées à l'huile de chaulmoogra sont utilisées pour soigner les leucodermies et la lèpre [5]. Alors qu'en médecine traditionnelle chinoise cette espèce est utilisée: pour tonifier les reins, aide à la guérison des fractures osseuses, à combattre l'impuissance, l'énurésie, la perte des cheveux et le vitiligo [25].

Rappel bibliographique

Par ailleurs, il a été montré que:

- Les produits (Psoralidine, Bakuchinine, Psoralène et l'Angelicine) isolés des grains de l'espèce *Psolarea corylifolia* présentent une activité antibactérienne significatif contre un certain nombre de bactéries Gram(+) et Gram(-) [26].
- Le Psoralilidine isolé des fruits de *P. Corylifolia* possède une activité antioxydante très importante avec un IC₅₀ égale à 44,7 µM par rapport au Trolox [12].

Le tableau ci-dessous représente les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Bituminaria*(*Psoralea*).

Tableau -4-: Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Bituminaria* (*Psolarea*)

Espèce	Propriétés thérapeutique	Réf
<i>Psoralea glandulosa</i>	Anti-inflammatoire Antipyrétique	[19] [27]
<i>Psoralea juncea</i>	Antimicrobiène	[20]
<i>Psoralea corylifolia</i>	Antimicrobienne	[28]
	Antioxydante	[12] [13] [29]
	Antibactérienne	[26] [30]
	Anti-tumorale	[31] [32]
	Immun-modulatrice	[31]
	Anti-inflammatoire	[33] [34]
	Antifongique	[35] [36]
Antidiabétique	[37] [38] [39]	
Antidépresseur	[40] [41]	

Rappel bibliographique

III.Famille des Asteraceae

La famille des Astéracées autrefois appelées les composées, c'est la plus vaste famille des Phanérogames, environ 22.000 espèces réparties en 1.500 genres [42].

C'est une famille cosmopolite qu'on trouve partout sauf dans l'Antarctique. Surtout dans les régions tempérées, mais aussi dans les régions semi arides, tropicales ou semi tropicales: régions méditerranéennes, Mexique, province du Cap, bois et prairies d'Amérique du sud et d'Australie. Nombreuses espèces dans les régions arctiques, tempérées et montagnardes du globe. Rares dans les forêts tropicales humides [42].

Plus de 200 genres sont utilisés comme plante ornementales (aster, chrysanthème,... etc.). Certains comme le genre *Pyrethrum* est utilisé comme un insecticide. Le genre *Artemisia* est utilisé pour la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi, et le genre *Ambrosia* est connu pour le caractère allergène de leur pollen [43].

III.1.Caractère botanique de la famille

Cette famille présente des caractères morphologiques divers: arbustes persistants, sous-arbrisseaux, herbacées vivaces (rhizomateuses et tubéreuses), herbacées annuelles ou bisannuelle, herbacées géante (dans les îles tropicales ou en montagne), et même des grands arbres, des épiphytes et des plantes aquatiques qui sont des cas extrêmes.

III.1.1. Appareil végétatif

- Les racines : sont généralement pivotantes et par fois fibreuses.
- Les tiges : sont généralement droites, mais tombent quelque fois au fait de s'élever. Quelques espèces ont des tiges souterraines sous forme des rhizomes, ceux-ci peuvent être charnus ou boisée selon les espèces.
- Les feuilles: sont alternes, quelque fois opposées, simples, pennatinervées ou palmatinervées, sessiles découpé, lacinié, et parfois elles peuvent être succulentes.

III.1.2.Appareil producteur

- Les fleurs ou les fleurons : sont groupées en capitule, comprend un réceptacle plan ou plus moins bombé sur lequel sont inséré de la base au sommet, en ordre spirale:
 - ✓ D'abord des bractées stériles verts (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses formant un involucre).
 - ✓ Ensuite des petites bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacun une fleur.

Rappel bibliographique

L'ensemble forme une « fleur composée », d'où l'ancien nom de la famille. Les capitules élémentaires sont généralement à leur tour diversement groupés en grappe, cyme, ou encore en corymbe.

- ✓ Les fruits: sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus qui favorise la dispersion des graines par le vent.
- ✓ Les graines: Elles sont exalbuminées.

III.2. Classification des Asteraceae

On distingue quatre sous-familles [44]:

- Les Liguliflores ou chicoracées.
- Les Labiactiflores.
- Les Radiées ou corymbifère.
- Les Tubuliflores ou carduacées comprenant le genre *Centaurea*.

IV. Genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* compte environ 700 espèces. Il appartient à la tribu Cyanareae et à la famille des Astéraceae.

Ce genre est très répandu aussi bien sur le territoire Algérien qu'en Europe méridionale, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent Américain [45].

IV.1. Caractéristique botanique

Se sont des herbacées annuelles, vivaces et arbrisseaux. Possédant des feuilles à épines faibles et peu piquantes. Les fleurs sont toutes tubulées, les externes souvent plus grandes stériles et étalées. Les aigrettes des fleurs centrales à sois lisses ou dents courtes. Les bractées involucrelles terminées par une formation différenciée qui porte une épine pectinée [42].

IV.2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea*, a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, ces travaux ont permis l'isolement des composés acétyléniques [46], des alcaloïdes [47], des composés phénoliques [48], des lactones sesquiterpéniques [49] et des flavonoïdes [50].

Rappel bibliographique

IV.2.1. Les flavonoïdes du genre *Centaurea*

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Centaurea* a montré leur richesse en produits flavonoïques, dont la majorité est de type flavone [50]. Comme l'apigénine, l'hispiduline, luteoline et la jaceosidine.

Notons que les flavonoïdes *O*-glucosylés sont les plus abondants par rapport aux *C*-glucosylés dans ce genre.

Rappel bibliographique

Tableau -5-: Les flavonoïdes isolés du genre *Centaurea* (2009 – 2015)

Numéro de la structure	Nom de la structure	Espèce	Réf
<u>28</u>	Chrysine	<i>C. amphalodes</i> <i>C. omphalotricha</i>	[51] [92]
<u>29</u>	Baicaleine	<i>C. scabiosa</i>	[52]
<u>30</u>	Apigénine	<i>C. jacea</i> L. <i>C. pannonica</i> (Heuff.)Simonk. <i>C. davidovii</i> <i>C. parilica</i> <i>C. alexandrerina</i> <i>C. omphalotricha</i> <i>C. scobiosa</i> <i>C. urvillei</i> <i>C. arenaria</i> <i>C. depressa</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. marocana</i> <i>C. nicaeensis</i>	[53] [54] [55] [55] [56] [57] [52] [58][59] [60] [61] [86] [90] [91]
<u>31</u>	Scutellareine	<i>C. depressa</i>	[61]
<u>32</u>	Scutellareine 6 – methyl ether	<i>C. davidovii</i>	[55]
<u>33</u>	Scutellareine 6,4- dimethyl ether	<i>C. davidovii</i> <i>C. parilica</i>	[55] [55]
<u>34</u>	Scutellareine 6,7,4'-trimethyl ether	<i>C. davidovii</i>	[55]
<u>35</u>	Hispiduline	<i>C. jacea</i> L <i>C. pannonica</i> (Heuff.)Simonk <i>C. marocana</i> <i>C. melitensis</i>	[53] [54] [90] [93]
<u>36</u>	Cirsimaritine	<i>C. omphalotricha</i> <i>C. amphalodes</i> <i>C. marocana</i>	[57] [51] [90]
<u>37</u>	Salvigenine	<i>C. amphalodes</i>	[51]
<u>38</u>	Luteoline	<i>C. davidovii</i> <i>C. omphalotricha</i> <i>C. depressa</i> <i>C. urvillei</i>	[55] [57] [61] [58][59]
<u>39</u>	Cirsiliol	<i>C. jacea</i> L <i>C. calcitrapa</i>	[53] [86]

Rappel bibliographique

Tableau-5- (suite)

Numéro de la structure	Nom de la structure	Espèce	Réf
<u>40</u>	Nepetine	<i>C. foucauldiana</i> <i>C. parilica</i> <i>C. stenolepis</i> <i>C. pannonica</i> (Heuff.)Simonk <i>C. davidovii</i> <i>C. sulphurea</i> <i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur. <i>C. spruneri</i> <i>C. melitensis</i>	[62] [55] [55] [54] [55] [63] [88] [89] [93]
<u>41</u>	6-hydroxyluteoline 6,3'-dimethyl ether (Jaceosidine)	<i>C. davidovii</i> <i>C. parilica</i> <i>C. foucauldiana</i> <i>C. sulphurea</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. nicaeensis</i>	[55] [55] [62] [63] [86] [91]
<u>42</u>	Chrysoeriol	<i>C. amphalodes</i> <i>C. africana</i> <i>C. nicaeensis</i>	[51] [64] [91]
<u>43</u>	Eupatine (Cirsilineol)	<i>C. sulphurea</i> <i>C. foucauldiana</i>	[63] [62]
<u>44</u>	Eupatorine	<i>C. jacea</i> L <i>C. arenaria</i> <i>C. calcitrapa</i>	[53] [60] [86]
<u>45</u>	3'-O-methyleupatorine	<i>C. arenaria</i> <i>C. sulphurea</i> <i>C. foucauldiana</i>	[60] [63] [62]
<u>46</u>	Eupatiline	<i>C. arenaria</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. spruneri</i>	[60] [86] [89]
<u>47</u>	5,7- dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone .	<i>C. scoparia</i>	[65]
<u>48</u>	Oroxyline A	<i>C. scoparia</i> <i>C. omphalotricha</i>	[65] [92]
<u>49</u>	Diosmetine	<i>C. pannonica</i> (Heuff.) Simonk	[54]
<u>50</u>	Chrysin 8-C-glucopyranoside	<i>C. amphalodes</i>	[51]
<u>51</u>	Cosmosiine	<i>C. sphaerocephala</i> <i>C. scoparia</i> <i>C. urvillei</i> <i>C. alexanderina</i>	[66] [65] [59] [56]

Rappel bibliographique

Tableau-5- (suite)

Numéro de la structure	Nom de la structure	Espèce	Réf
<u>52</u>	Apigénine 7-O- -methylglucuronide	<i>C. urvillei</i> <i>C. nicaeensis</i>	[59] [91]
<u>53</u>	Apigénine 7-O- galacturonic acide methyl ester	<i>C. alexanderina</i>	[56]
<u>54</u>	Hispiduline 7-O- -glucopyranoside	<i>C. urvillei</i> <i>C. pannonica</i> (Heuff)Simonk	[59] [54]
<u>55</u>	Hispiduline 7-O- -glucuronopyranoside	<i>C. urvillei</i>	[59]
<u>56</u>	Hispiduline 7-O- methylglucuronide	<i>C. urvillei</i>	[59]
<u>57</u>	Cynaroside	<i>C. scoparia</i>	[65]
<u>58</u>	Chrysoeriol 7-O-glucoside	<i>C. sphaerocephala</i>	[66]
<u>59</u>	Chrysoeriol 7-O-rutinoside	<i>C. ensiformis</i>	[67]
<u>60</u>	Nepétine 7-O- -D-glucopyranoside	<i>C. pannonica</i> (Heuff) simonk	[54]
<u>61</u>	Isovitexine	<i>C. lippii</i> <i>C. alexanderina</i>	[68] [56]
<u>62</u>	Apigénine 6,8-di-C- -D-glucopyranoside	<i>C. ensiformis</i> <i>C. alexanderina</i>	[67] [56]
<u>63</u>	Vitexine	<i>C. alexanderina</i>	[56]
<u>64</u>	Apigénine 6-C- -D-glucopyranoside 8-C- -L-arabinopyranoside (Schaftoside)	<i>C. ensiformis</i>	[67]
<u>65</u>	Apigénine 6-C- -D-glucopyranoside 8-C- -L-arabinopyranoside (Neoschaftoside)	<i>C. ensiformis</i>	[67]
<u>66</u>	Hispiduline 7-O-glucoside	<i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur.	[88]
<u>67</u>	Apigénine 4'-O- -methylglucuronide	<i>C. nicaeensis</i>	[91]
<u>68</u>	Kaempferole	<i>C. urvillei</i> <i>C. alexanderina</i>	[58][59] [56]
<u>69</u>	6-methoxykaempferol	<i>C. pannonica</i> (Heuff.)Simonk <i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur.	[54] [87][88]
<u>70</u>	Isokaempferide	<i>C. arenaria</i> <i>C. davidovii</i> <i>C. Jacea</i> L <i>C. marocana</i>	[60] [55] [53] [90]
<u>71</u>	3'-hydroxykaempferol 3,6-dimethyl ether	<i>C. stenolepis</i>	[55]
<u>72</u>	6- methoxykaempferol 3- methyl ether	<i>C. Jacea</i> L <i>C. marocana</i>	[53] [90]

Rappel bibliographique

Tableau-5- (suite)

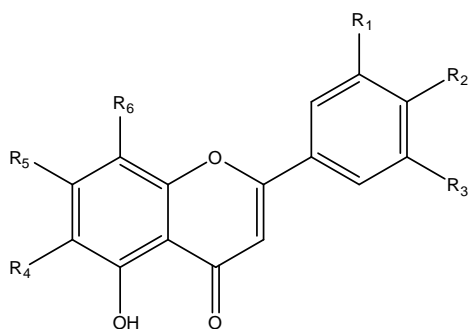
Numéro de la structure	Nom de la structure	Espèce	Réf
<u>73</u>	Quercetine	<i>C .alexanderina</i> <i>C.melitensis</i>	[56] [93]
<u>74</u>	Corniculatusine	<i>C .africana</i>	[64]
<u>75</u>	Quercetagine 3,6,4'-trimethyl ether (Centaureidine)	<i>C .stenolepis</i> <i>C .Jacea L</i> <i>C .scoparia</i>	[55] [53] [65]
<u>76</u>	Axillarine	<i>C .Jacea L</i>	[53]
<u>77</u>	Jaceidine	<i>C .africana</i> <i>C .stenolepis</i>	[64] [69]
<u>78</u>	4'- methylgossypetine	<i>C .africana</i>	[64]
<u>79</u>	3'-hydroxyflindulatine	<i>C .africana</i>	[64]
<u>80</u>	Jaceidine	<i>C .alexanderina</i>	[56]
<u>81</u>	Kaempferol 3-O- - rutinoside	<i>C .alexanderina</i> <i>C .lippii</i>	[56] [68]
<u>82</u>	Astragaline	<i>C .alexanderina</i>	[56]
<u>83</u>	6- hydroxykaempferol 7-O- - glucopyranoside	<i>C .urvielli</i>	[58]
<u>84</u>	6-hydroxykaempferol 7-O- - glucuronopyranoside	<i>C .urvielli</i>	[59]
<u>85</u>	Quercetine 3-O-glucoside (Hirsutine)	<i>C . lippii</i> <i>C . stenolepis</i>	[68] [69]
<u>86</u>	Quercetine 3-rutinoside (rutine)	<i>C . scabiosa</i> <i>C . alexanderina</i>	[52] [56]
<u>87</u>	Patuletine 3-O- -glucoside	<i>C . stenolepis</i>	[69]
<u>88</u>	Jaceine	<i>C . stenolepis</i>	[69]
<u>89</u>	Centaureine	<i>C . africana</i> <i>C . alexanderina</i>	[64] [56]
<u>90</u>	Algerianine	<i>C . africana</i>	[64]
<u>91</u>	5,7,4'-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone 7-O- - glucoside	<i>C.microcarpa</i> Coss. et Dur.	[87]
<u>92</u>	Kaempferole 7-O-glucoside	<i>C.microcarpa</i> Coss. et Dur.	[88]
<u>93</u>	6-methoxykaempferole 7-O-glucoside	<i>C.microcarpa</i> Coss. et Dur.	[88]
<u>94</u>	Patuletine 7-O-glucoside	<i>C.microcarpa</i> Coss. et Dur.	[88]
<u>95</u>	Fisetine (5-deoxyquercetine)	<i>C . alexanderina</i>	[56]

Rappel bibliographique

Tableau-5- (suite)

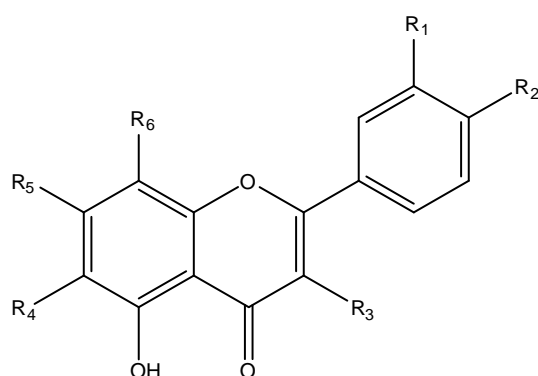
Numéro de la structure	Nom de la structure	Espèce	Réf
<u>96</u>	3',4'-dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acetoxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8) – flavone-3- <i>O</i> - -D-glucopyranoside	<i>C . scoparia</i>	[65]
<u>97</u>	3,3',4'-trihydroxy-(3'',4''-dihydro-3'',-4''-dihydroxy)-2'',2''-dimethylpyrano – (5'',6'':7,8) – flavone	<i>C . scoparia</i>	[65]
<u>98</u>	Atalantoflavone	<i>C . scoparia</i>	[65]
<u>99</u>	5-hydroxy-3',4',8-trimethoxy-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)-flavone	<i>C . scoparia</i>	[65]
<u>100</u>	3',4',5,8-tetramethoxy-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)-flavone	<i>C . scoparia</i>	[65]
<u>101</u>	Naringenine	<i>C . alexanderina</i>	[56]
<u>102</u>	Naringenine 7- <i>O</i> - - glucuronopyranoside	<i>C . urvielli</i>	[59]
<u>103</u>	Hesperidine	<i>C . alexanderina</i>	[56]
<u>104</u>	Taxifoline	<i>C . scobiosa</i>	[52]
<u>105</u>	Catechine	<i>C . stoebe</i>	[70]
<u>106</u>	5,7,2'-trihydroxy-6-methoxyflavone	<i>C.omphalotricha</i>	[92]
<u>107</u>	5,7,2'-trihydroxyflavone	<i>C.omphalotricha</i>	[92]
<u>108</u>	ériodictyol	<i>C.spruneri</i>	[89]

Rappel bibliographique



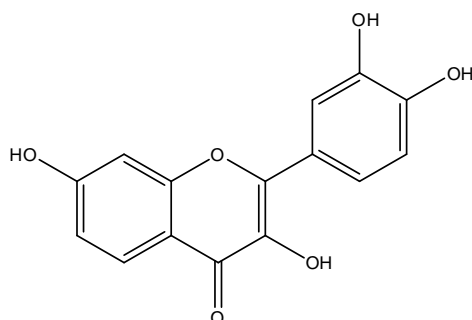
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<u>28</u>	H	H	H	H	OH	H
<u>29</u>	H	H	H	OH	OH	H
<u>30</u>	H	OH	H	H	OH	H
<u>31</u>	H	OH	H	OH	OH	H
<u>32</u>	H	OH	H	OCH ₃	OH	H
<u>33</u>	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	H
<u>34</u>	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>35</u>	H	OH	H	OH	OCH ₃	H
<u>36</u>	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>37</u>	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>38</u>	OH	OH	H	OH	OH	H
<u>39</u>	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>40</u>	OH	OH	H	OCH ₃	OH	H
<u>41</u>	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	H
<u>42</u>	OCH ₃	OH	H	H	OH	H
<u>43</u>	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>44</u>	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>45</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>46</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	H
<u>47</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
<u>48</u>	H	H	H	OCH ₃	OH	H
<u>49</u>	OCH ₃	OH	H	H	OH	H
<u>50</u>	H	H	H	H	OH	Glc
<u>51</u>	H	OH	H	H	OGlc	H
<u>52</u>	H	OH	H	H	OMeGlucur	H
<u>53</u>	H	OH	H	H	OGlucuronic methyl	H
<u>54</u>	H	OH	H	OCH ₃	OGlc	H
<u>55</u>	H	OH	H	OCH ₃	OGlucur	H
<u>56</u>	H	OH	H	OCH ₃	OMeGlucur	H
<u>57</u>	OH	OH	H	H	OGlc	H
<u>58</u>	OCH ₃	OH	H	H	OGlc	H
<u>59</u>	OCH ₃	OH	H	H	ORut	H
<u>60</u>	OH	OH	H	OCH ₃	OGlc	H
<u>61</u>	H	OH	H	Glc	OH	H
<u>62</u>	H	OH	H	Glc	OH	Glc
<u>63</u>	H	OH	H	H	OH	Glc
<u>64</u>	H	OH	H	Glc	OH	Ara
<u>65</u>	H	OH	H	Glc	OH	Ara
<u>66</u>	H	OH	H	OCH ₃	OGlc	H
<u>67</u>	H	OMeGlucur	H	H	OH	H

Rappel bibliographique

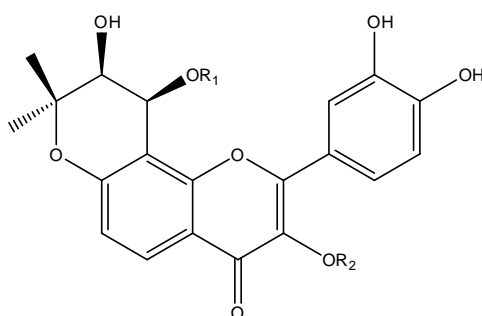


	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<u>68</u>	H	OH	OH	H	OH	H
<u>69</u>	H	OH	OH	OCH ₃	OH	H
<u>70</u>	H	OH	OCH ₃	H	OH	H
<u>71</u>	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>72</u>	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>73</u>	OH	OH	OH	H	OH	H
<u>74</u>	OH	OH	OH	H	OH	OCH ₃
<u>75</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>76</u>	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>77</u>	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>78</u>	OH	OCH ₃	OH	H	OH	OH
<u>79</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
<u>80</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
<u>81</u>	H	OH	ORut	H	OH	H
<u>82</u>	H	OH	OGlc	H	OH	H
<u>83</u>	H	OH	OH	OH	OGlc	H
<u>84</u>	H	OH	OH	OH	OGlucur	H
<u>85</u>	OH	OH	OGlc	H	OH	H
<u>86</u>	OH	OH	ORut	H	OH	H
<u>87</u>	OH	OH	OGlc	OCH ₃	OH	H
<u>88</u>	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OGlc	H
<u>89</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OGlc	H
<u>90</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	6-Sin-OGlc	H
<u>91</u>	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OGlc	H
<u>92</u>	H	OH	OH	H	OGlc	H
<u>93</u>	H	OH	OH	OCH ₃	OGlc	H
<u>94</u>	OH	OH	OH	OCH ₃	OGlc	H

Rappel bibliographique

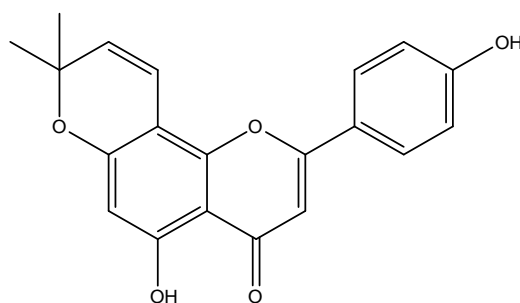


Fisetin (5-deoxyquercetin) **95**

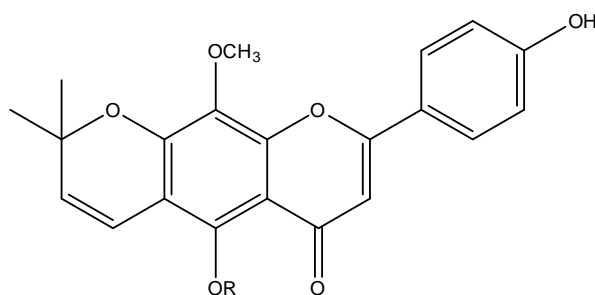


R₁= Ac; **R**₂= Glc: 3',4'-dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acetoxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)- flavone-3-O- -D-glucopyranoside **96**

R₁=H; **R**₂=H : 3,3',4'-trihydroxy-(3'',4''-dihydro-3''-hydroxy-4''-acetoxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'':7,8)- flavone **97**



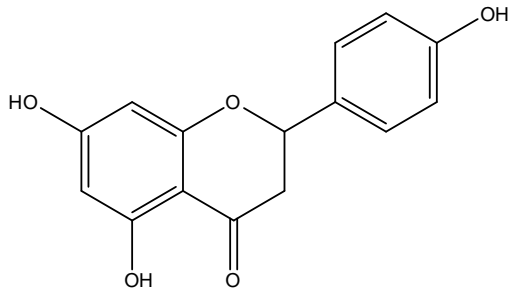
Atalantoflavone **98**



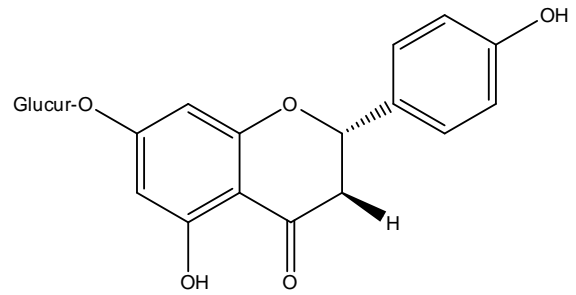
R= H: 5-hydroxy-3',4',8-trimethoxy-2'',2''-dimethylpyrano(5'',6'': 7,8)-flavone **99**

R= CH₃: 3',4',5,8-tetramethoxy-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'': 7,8)-flavone **100**

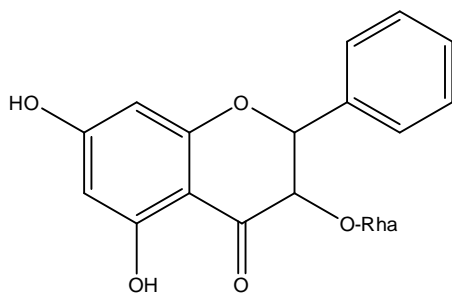
Rappel bibliographique



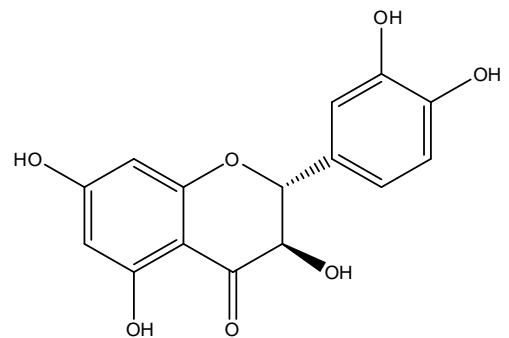
Naringenine **101**



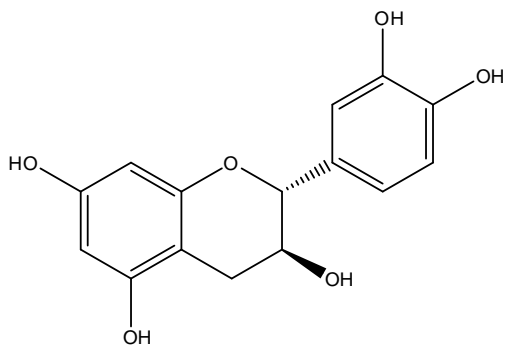
Naringenine 7-O- β -glucuronopyranoside **102**



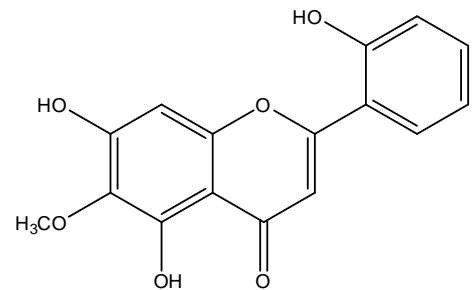
Hesperidine **103**



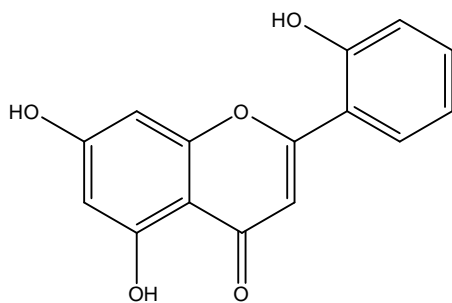
Taxifoline **104**



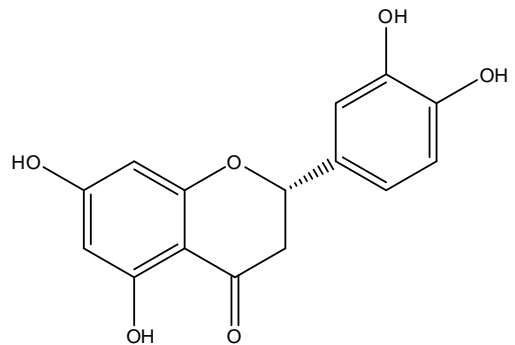
Catechine **105**



5,7,2'-trihydroxy-6-methoxyflavone **106**



5,7,2'-trihydroxyflavone **107**



ériodictyol **108**

Rappel bibliographique

IV.3. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle

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

- *Centaurea calcitrapa* L. ,*Centaurea jacea* L. et *Centaurea sinaica* sont utilisées dans le traitement de la fièvre [71] .
- *Centaurea behen* L. est utilisé dans le traitement des troubles d'estomac [72].
- En médecine traditionnelle populaire turque :
 - ✓ Les fleurs épineuses fraîches de l'espèce *Centaurea solstitialis*L.ssp sont utilisées pour le traitement des ulcères peptiques [73].
 - ✓ Les fleurs séchées de *Centaurea cyanus* sont utilisées sous forme d'infusion pour calmer la diarrhée [74].

Par ailleurs, il a été montré que l'extrait chloroforme de *Centaurea musimomum* présente des activités anti-plasmodiale et cytotoxique [75], alors que l'extrait méthanolique de l'espèce *Centaurea diffusa* présente une activité antibactérienne signifiante [76].

Le **Tableau-6-** représente les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Centaurea*.

Rappel bibliographique

Tableau -6 -: Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Centaurea*

Propriétés thérapeutiques	Espèce	Réf
Antioxydante	<i>C. stenolepis.</i>	[69]
	<i>C. polypodiifolia</i> var.pseudobehen.	[77]
	<i>C.pyrrhoblephara.</i>	[77]
	<i>C.antalyense.</i>	[77]
	<i>C. kurdica.</i>	[78]
	<i>C. rigida.</i>	[78]
	<i>C. amanicola.</i>	[78]
	<i>C. cheirolopha.</i>	[78]
	<i>C. ptosimopappoides.</i>	[78]
	<i>C. pseudoscabiosa</i> subsp.araratica.	[79]
	<i>C. pulcherrima</i> var. pulcherrima.	[79]
	<i>C. salicifolia</i> subsp.abbreviata.	[79]
	<i>C.babylonica.</i>	[79]
	<i>C.calcitrapa</i> subsp.calcitrapa.	[80]
<i>C. ptosimopappa.</i>	[80]	
<i>C. spicata.</i>	[80]	
<i>C.microcarpa</i> Coss. et Dur.	[87]	
Antimicrobienne	<i>C.stenolepis.</i>	[69]
	<i>C. spruneri</i> Boiss.&Heldr.	[81]
	<i>C. solstitialis</i> L.ssp.solstitialis.	[82]
	<i>C. austro-anatolica.</i>	[83]
Anti-inflammatoire	<i>C.alexanderina.</i>	[56]
	<i>C.iberica</i> trev.ex Spreng.	[84]
	<i>C. ainetensis.</i>	[85]
Cytotoxique	<i>C. scoparia</i>	[65]
	<i>C. calcitrapa</i> subsp.calcitrapa	[80]
	<i>C. ptosimopappa</i>	[80]
	<i>C. spicata</i>	[80]
	<i>C. omphalotricha</i>	[57]
Antidiabétique	<i>C.alexandrina</i>	[56]
Anticancéreux	<i>C.alexandrina</i>	[56]
Antivirale	<i>C. solstitialis</i> L.ssp.solstitialis.	[82]
Anticholinestérasique	<i>C. polypodiifolia</i> var.pseudobehen.	[77]
	<i>C.pyrrhoblephara.</i>	[77]
	<i>C.antalyense.</i>	[77]

Rappel bibliographique

Références bibliographiques

1. Wojciechowski, M. F., Lavin, M. and Sanderson, M. J., **2004**. A phylogeny of Legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. **11**, 1846-2004.
2. Dupont, F. and Guignard, J. L., **2007**. Abrégé de Botanique 14^{ème} édition. Editions Masson, Paris; p-285.
3. Dupont, F. et Guignard, J. L., **2012**. Botanique. Les familles des plantes « Abrégées de pharmacie ». 15^{ème} édition. p-300.
4. Pistelli, L., Noccioli, C., Appendino, G., Bianchi, F., Sterner, O., Ballero, M., **2003**. Pterocarpan from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. *Phytochemistry*. **64**, 595-598.
5. Bernad Boullard., **2001**. *Plante Médicinale du monde-Croyances et Réalité*-, Editions ESTEM, Paris. p-433.
6. Quezel, P. and Santa, S., **1962**. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris. p-502.
7. Gordaliza, M., del Corral, J. M. M., Castro, M. A., Gorriti, C., San Feliciano, A., **1999**. Composition and biological activities of genus *Psoralea*. *Current Topics in Phytochemistry*. **2**, 151-161.
8. Tava, A., Pecetti, L., Ricci, M., Pagnotta, M. A., Russi, L., **2007**. Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa*(L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. *Flavour and Fragrance Journal*. **22**, 363-370.
9. Bertoli, A., Menichini, F., Noccioli, C., Morelli, I., Pestelli, L., **2004**. Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**, 166-171.
10. Hamed, A. I., Springuel, I., El-Emary, N; A., Mitome, H. and Yamada, Y., **1997**. A phenolic cinnamate dimer from *Psoralea plicata*. *Phytochemistry*. **45**, 1257-1261.
11. Bckhouse, C. N., Delporte, C. L., Negrete, R.E., Cassels, B. K., Schneider, C., Breitmaier, E. and San Feliciano, A., **1995**. Cyclobakuchiols A and B from *Psoralea Glandulosa*. *Phytochemistry*. **40**, 325-327.
12. Xiao, G., Li, G., Chen, L., Zhang, Z., Yin, J., Wu, T., Cheng, Z., Wei, X., Wang, Z., **2010**. Isolation of antioxidants from *Psoralea corylifolia* fruits using high-speed

Rappel bibliographique

- counter-current chromatography guided by thin layer chromatography-antioxidant autographic assay. *Journal of Chromatography A*. **1217**, 5470-5476.
13. Jiangning, G., Xinchu, W., Hou, W., Qinghua, L., Kaishun, B., **2005**. Antioxidants from a Chinese medicinal herb – *Psoralea corylifolia* L. *Food Chemistry*. **91**, 287-292.
14. Leonti, M., Casu, L., Gertsch, J., Bonsignore, L., Floris, C., Casu, M., Cttiglia, F., **2010**. A pterocarpan from the seed of *Bituminaria morisiana*. *J Nat Med*. **64**, 354-357.
15. Oh, K. Y., Lee, J. H., Curtis-Long, M. J., Cho, J. K., Kim, J. Y., Lee, W. S., Park, K.H., **2010**. Glycosidase inhibitory phenolic compounds from the seed of *Psoralea corylifolia*. *Food Chemistry*. **121**, 940-945.
16. Shan, L., Yang, S., Zhang, G., Zhou, D., Qiu, Z., Tian, L., Yuan, H., Feng, Y. and Shi, X. 2014. Comparison of the Inhibitory Potential of Bavachalcone and Corylin against UDP-Glucuronosyltransferases. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume **2014**, Article ID 958937, 6 pages.
17. Wu, C., Hong, S. S., Cai, X. F., Dat, N. T., Nan, J., Hwang, B. Y., Leea, J. J. and Lee, D., **2008**. Hypoxia-inducible factor-1 and nuclear factor- B inhibitory meroterpene analogues of bakuchiol, a constituent of the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **18**, 2619–2623.
18. Cheng-Zhu Wu, C., Cai, X. F., Dat, N. T., Hong, S. S., Han, A., Seo, E., Hwang, B. Y., Nan, J., Leec, D. and Leea, J. J., **2007**. Bisbakuchiols A and B, novel dimeric meroterpenoids from *Psoralea corylifolia*. *Tetrahedron Letters*. **48**, 8861–8864.
19. Backhouse, C. N., Delporte, C. L., Negrete, R. E., Erazo, S., Zuñiga, A., Pinto, A., Cassels, B. K., **2001**. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with antiinflammatory and antipyretic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **78**, 27–31.
20. Schmitt, A., Telikepalli, H. and Mitscher, L. A., **1991**. Plicatin B, The antimicrobial principle of *Psoralea juncea*. *Phytochemistry*. **30**, 3569-3570.
21. Rasool, N., Khan, A. Q., Ahmed, V. U. and Malik, A., **1991**. A benzoquinone and a coumestan from *Psoralea plicata*. *Phytochemistry*. **30**, 2800-2803.
22. Steinmetz, E. F. and Lindermann, G., **1964**. *Riechstoff, Aromen, Koerpepflegemittel*. **14**, 409.
23. Perry, L. M. and Metzger, J., **1980**. *Medicinal Plants of East and South-East Asia, Attributed Properties and Uses*. The MIT Press, Cambridge, MA. p- 224.

Rappel bibliographique

24. Muñoz, M., Barrera, M. and Meza, I., **1981**. *El uso medicinal de plantas nativas y naturalizadas en Chile*. Publicación Ocasiona No.33, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile. p-91.
25. Chang, X., **2001**. *Facile comprehension de la medicine traditionnelle chinoise. Materia Medica Chinoise*, Institut Canadien de la Medicine Traditionnelle Chinoise. p-343.
26. Khatune, N. A., Islam, M. E., Haque, M. E., Khondkar, P., Rahman, M. M., **2004**. Antibacterial compounds from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Fitoterapia*. **75**, 228-230.
27. Backhaus, N., Delporte, C., Negrete, R., Salinas, P., Pinto, A., Aravena, S., Cassels, B. K., **1996**. Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui* and *P.glandulosa*. *International Journal of Pharmacognosy*. **34**, 53-57.
28. Katsura, H., Tsukiyama, R. I., Suzuki, A., Kobayashi, M., **2001**. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**, 3009- 3013.
29. Adhikari, S., Joshi, R., Patro, B. S., Ghanty, T. K., Chintalwar, G. J., Sharma, A., Chattopadhyay, S., Mukherjee, T., **2003**. *T.Chem.Res.Toxicol*. **16**, 1062.
30. Yin, S., Fan, C. Q., Wang, Y., Lei, D. and Yue, J. M., **2004**. Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia* and their structure-activity relationship study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **12**, 4387-4392.
31. Latha, P. G., Evans, D. A., Panikkar, K. R., Jayavardhanan, K. K., **2000**. Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. *Fitoterapia*. **71**, 223-231.
32. Bapat, K., Chintalwar, G. J., Pandey, U., Thakur, V. S., Sarma, H. D., Samuel, G., **2005**. Preparation and in vitro evaluation of radio iodinated bakuchiol as an antitumour agent. *Applied Radiation and Isotopes*. **62**, 389-393.
33. Anand, K. K., Sharma, M. L., Singh, B., Ghatak, B. J. R., **1978**. Antiinflammatory, antipyretic & analgesic properties of bavachinin-a flavanone isolated from seeds of *Psoralea corylifolia* Linn. (Babchi). *Indian J Exp Biol*. **16**, 1216-1217.
34. Pae, H.-O., Cho, H., Oh, G. -S., Kim, N. -Y., Song, E. -K., Kim, Y. -C., Yun, Y. -G., Kang, C. -L., Kim, J. -D., Kim, J. -M., Chung, H. -T., **2001**. *Int Immunopharmacol*. **1**, 1849.
35. Ragendra, N. R., Anandi, C., Balasubramanian, S. and Pugalendi, K. V., **2004**. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated

Rappel bibliographique

- with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*. **91**, 21-24.
36. Xingyong, Y. A., Jun, L. A., Xiaowen, W., **2006**. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*. **27**, 1726–1731.
37. Kim, Y. -C., Oh, H., Kim, B. S., Kang, T. -H., Ko, E. -K., Han, Y. M., Kim, B. Y., Ahn, J. S., **2005**. *In vitro* Protein Tyrosine Phosphatase 1B inhibitory phenols from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Planta Med.* **71**, 87-89.
38. Krenisky, J. M., Luo, J., Reed, M. J., Carney, J. R., **1999**. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. *Biol Pharm Bull.* **22**, 1137-1140.
39. Tayade, P. M., Jagtap, S. A., Borde, S., Chndrasekar, N., Joshi, A. **2012**. Effect of *Psoralea corylifolia* on dexamethasone-induced insulin resistance in mice. *Journa of King Saud University – Science*. **24**, 251-255.
40. Xu, Q., Pan, Y., Yi, L. T., Li, Y. C., Mo, S. F., Jiang, F. X., Qiao, C. F., XU, H. X., Lu, X. B., Kong, L. D., Kung, H. F., **2008**. Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia* in the mouse forced swimming test. *Biol Pharm Bull.* **31**, 1109-1114.
41. Chen, Y., Wang, H., Xia, X., **2007**. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the chronic mild stress model of depression in mice. *Phytomedicine*. **14**, 523–529.
42. *Asterales- J et E*. [consulté le 23/12/2014]. Disponible à partir de : <http://j-e.febvre.pagesperso-orange.fr/Systematique/asteridea/asterales.pdf>.
43. *La famille des Astéracées*. [consulté le 23/12/2014]. www.clubmgen-toulouse.org/toulouse/activites/botanique/Fiche_botanique/asteracee.pdf.
44. Bonnier., **1934**. *Flore complete de France, Suisse et Belgique*. Edition 10. p-118.
45. Mabberley, D. J., **1987**. *The Plant Book* **110**, Combridge University Press.
46. Bohlman, F., Burkhardt, T., Zber, C., **1973**. *Naturally occurring Acetylenes* **452**, Academic Press, London.
47. Shoeb, M., Mac Manus, S. M., Jaspars; M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S. D., **2006**. Ammericanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignin, from the seed of *Centaurea amreicana*. *Tetrahedron*. **62**, 11172-11177.

Rappel bibliographique

48. Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermijo, J., Benayache, F., **2006**. Phenolic compounds from *Centaurea africana*. *Chemistry of Natural Compounds*. **42**, 491-492.
49. Saroglou, V., Karioti, A., Dimas, C. and Skaltsa, H., **2005**. Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*. **68**, 1404-1407.
50. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Maggio, A., Rosselli, S. and Bruno, M., **2012**. Flavonoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe Cardueae, Asteraceae) : Distribution and ¹³C-NMR spectral data. *Chemistry & Biodiversity*. **9**, 2096-2158.
51. Kkalfalla, A., Berrahal, D., Kabouche, A., Touzani, R. and Kabouche, Z., **2012**. Flavonoids from *Centaurea omphalodes*. *Chemistry of Natural Compounds*. **48**, 482-483.
52. Lar ' Kina, M. S., Kadyrova, T. V., Ermilova, E. V., Krasnov, E. A., **2009**. Quantitative determination of flavonoids from the aerial part of greater knapweed (*Centaurea scabiosa* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **43**, 320-323.
53. Forgo, P., Zupkó, I., Molná, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J., **2012**. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. **83**, 921-925.
54. Ifantis, T. M., Soluji , S., Pavlovi -Muratspahi , D., Skaltsa, H., **2013**. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. From Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry*. **94**, 159-170.
55. Nikolova, M & Bancheva,S., **2013**. Surface flavono ds of *Centaurea stenolepis* and the local endemics *Centaurea davidovii* and *C. parilica* (Asteraceae, sect, Lepteranthus) from Bulgaria. *Phytologia Balcanica*. **19**, 357-360.
56. Kubacey, T. M., Haggag, E. G., El-Toumy, S. A., Ahmed, A. A., El-Ashmawy, I. M. and Youns, M. M., **2012**. Biological activity and flavono ds from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *Journal of Pharmacy Research*. **5**, 3352-3361.
57. Kolli, E., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Brouard, I., Bermejo, J. and Benayache, S., **2012**. Cytotoxic Sesquiterpene lactone and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *Journal of Brazilian Chemical Society*. **23**, 977-983.
58. Gülcemal, D., Alanku - Çali kan, Ö., Karaalp, C., Bedir, E., **2009**. Phytochemical investigations of *Centaurea urvillei* DC. sbusp *urvillei*. *Planta Medica*. **75**, 1054.

Rappel bibliographique

59. Gülcemal, D., Alanku -Çali kan, Ö., Karaalp, C., Örs, A. U., Ballar, P., Bedir, E., **2010**. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydrate Research*. **345**, 2529-2533.
60. Casapi, B., Haidú, Z., Zupkó, I., Berényi, A., Forgo, A., Szabó, P., Hohmann, J., **2010**. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research*. **24**, 1664-1669.
61. Demir, S., Karaalp, C., Bedir, E., **2009**. Secondary metabolites of *Centaurea depressa* Bied. *Planta Medica*. **75**, 921.
62. Bensouici, C., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R. and Bruneau, C., **2012**. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea foucauldiana*. *Chemistry of Natural Compounds*. **48**, 510-511.
63. Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R. and Bruneau, C., **2011**. Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*. **46**, 966-967.
64. Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, F., **2009**. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*. **2**, 114-118.
65. Ahmed, S.A. and Kamel, E. M., **2014**. Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Centaurea scoparia*. *The Scientific World Journal*. **2014**, 1-7.
66. Bentamene, A., Bouchecham, R., Braz, M., Benayache, S., Creche, J., Benayache, F., **2010**. *Chemistry of Natural Compounds*. **46**, 452.
67. Baykan-Erel, S., Bedir, E., Khan, I. A., Karaalp, C., **2010**. Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* P.H. Davis. *Biochemical Systematics and Ecology*. **38**, 1056-1058.
68. Mezache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, F., **2010**. Secondary metabolites from *Centaurea lippii* (Asteraceae). *Chemistry of Natural Compounds*. **46**, 801-802.
69. Sen, A., Gurbuz, B., Gurer, U. S., Bulut, G. and Bitis, L., **2014**. Flavonoids and Biological Activities of *Centaurea stenolepis*. *Chemistry of Natural Compounds*. **50**, 128-129.
70. Tharayil, N., Triebwasser, D. J., **2010**. Elucidation of diurnal pattern of catechin exudation by *Centaurea stoebe*. *Journal of Chemical Ecology*. **36**, 200-204.
71. Yesilada, E., **2002**. Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Ener, B. (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, London, UK, pp.119-135.

Rappel bibliographique

72. Erol, M. K., Tuzlacu, E., **1999**. Turkish Folk Medicinal Plants, Part II: Egirdir (Isparta). *Fitoterapia*. **70**, 593-610.
73. Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., **1995**. Traditional Medicine in Turkey V. Folk medicine in inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*. **46**, 133-152.
74. Baytop, T., **1999**. Türkiye de Bitkiler ile Tedavi (Geçmi te ve Bugün), Nobel Tip Kitabevleri, Istanbul. p.316.
75. Medjrubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., **2005**. Sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*. **76**, 744-746.
76. Skliar, M. I., Toribio, M. S., Oriani, D. S., **2005**. Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. *Fitoterapia*. **76**, 737-739.
77. Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., Duran, A., **2013**. Antioxidant potential and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*. **55**, 290-296.
78. Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., Duran, A., **2011**. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food and Chemical Toxicology*. **49**, 2914-2920.
79. Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., Duran, A., **2013**. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chemistry*. **114**, 91-97.
80. Erol-Dayi, Ö., Pekmez, M., Bona, M., Aras-Perk., Arda, N., **2011**. Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and cytotoxicity of three *Centaurea* species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptosimopappa* and *C. spicata*. *Free Radicals and Antioxidants*. **1**, 31-36.
81. iri , A., Karioti, A., Glamo lija, J., Sokovi , M. and Skaltsa, H., **2011**. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J Serb Chem Soc*. **76**, 27-34.
82. Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T., Ye ilada, E., **2009**. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. **164**, 545-552.
83. Ugur, A., Sarac, N., Ceylan, O., Duru, M; E., **2009**. Chemical composition of endemic *Centaurea austro-anatolica* and studies of its antimicrobial activity against multi-resistant bacteria. *Acta Pharm*. **59**, 463-472.

Rappel bibliographique

- 84.** Koca, U., Süntar, I. P., Keles, H., Yesilada, E., Akkol, E. K., **2009**. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. Ex Spreng. *Journal of Ethnopharmacology*. **126**, 551-556.
- 85.** Talhouk, R. S., El-Jouni, W., Baalbaki, R., Gali-Muhtasib, H., Kogan, J. and Tolhouk. S. N., **2008**. Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2**, 024-033.
- 86.** Kitouni, R., Benayache, F., Benayache, S., **2015**. Flavonoids of the Exudat of *Centaurea calcitrapa*. *Chemistry of Natural Compounds*. **51**, 762-763.
- 87.** Louaar, S., Zellagui, A., Gherraf, N., Medjroubi, K., Derbre, S., Seguin, E., Laouer, H., Akkal, S. **2014**. Antiradical Activity of Flavonoids from the Algerian Native Plant: *Centaurea microcarpa* Coss. et Dur. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. **4**, 249-253.
- 88.** Louaar, S., Achouri, A., Lefhal, M., Laouer, H., Medjroubi, K., Duddeck, H., Akkal, S. **2011**. Flavonoids from Algerian Endemic *Centaurea microcarpa* and their Chemotaxonomical significance. *Natural Product Communications*. **6**, 1603-1604.
- 89.** Ciric, A., Karioti, A., Glamoclija, J., Socovic, M., Skaltsa, H. **2011**. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J. Serb. Chem. Soc.* **76**, 27-34
- 90.** Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V.P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. **2011**. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem. Nat. Comp.* **47**, 105-106.
- 91.** Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. **2012**. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. walliana M. *Nat. Prod. Res.* **26**, 203-208.
- 92.** Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M. **2012**. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Rec. Nat. Prod.* **6**, 292–295.
- 93.** Ayad, R., Ababsa, Z. E. A., Belfadel, F. Z., Akkal, S., Leon, F., Brouard, I., Medroubi, K. **2012**. Phytochemicamical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *Int. J. Med. Plants*. **2**, 151- 154.

Chapitre II

Etude des flavonoïdes

I. Les flavonoïdes

I.1. Généralités :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes, environ 65000 structures ont été identifiées [1].

Contrairement aux flavonoïdes présents dans les fleurs, qui leur confèrent leurs couleurs, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont masqués par la présence de chlorophylle [1].

Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅, caractérisée par un enchaînement Ar-C₃-Ar.

La figure (1) présente les principales classes de flavonoïdes.

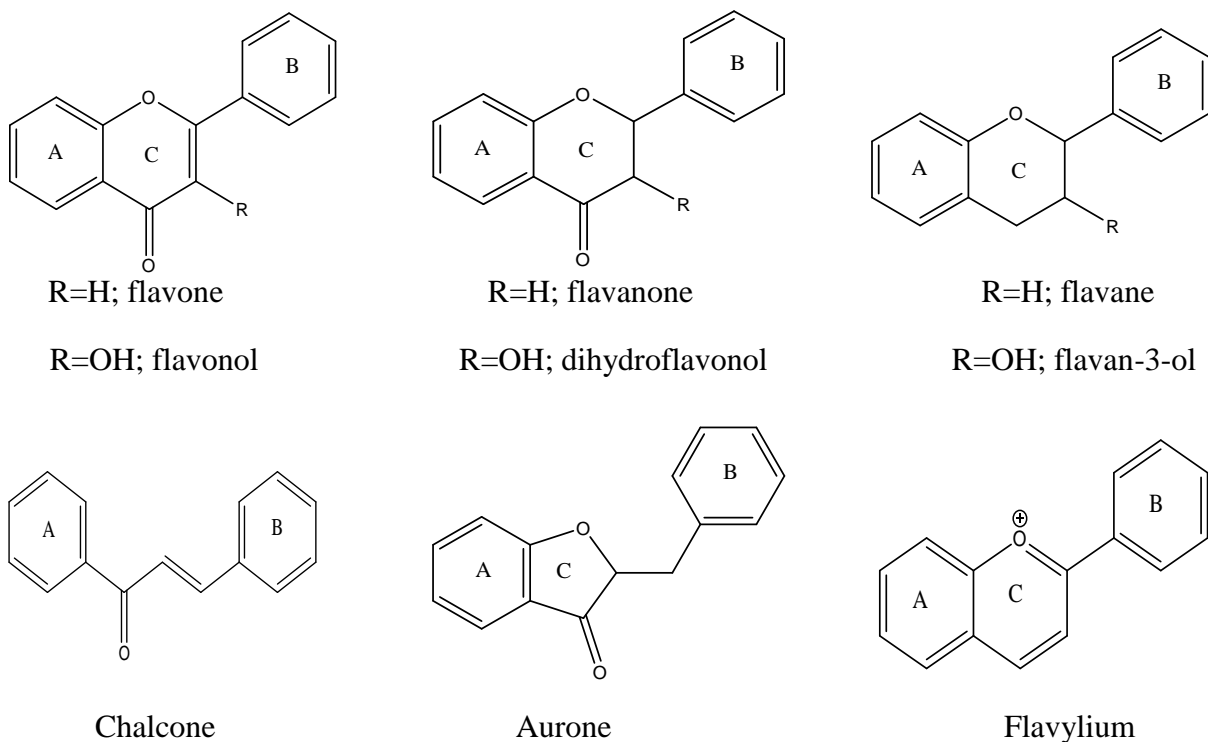


Figure (1) : structures de base des flavonoïdes [2]

I.2. Distribution

En générale, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des feuilles, des fleurs, des tiges ou des racines. Dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux on trouve les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés [3].

I.3. Biosynthèse

La première étape intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes est une étape commune à beaucoup d'autres métabolites, elle est désignée sous le nom générique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (**Figure -2-**).

Etude des flavonoïdes

Elle permet la synthèse d'acide *p*-coumarique et d'acide cinnamique. L'enzyme, permettant la désamination non-oxydative de la phénylalanine et donc la formation de l'acide cinnamique, est nommée PAL pour phénylalanine ammonia lyase [4].

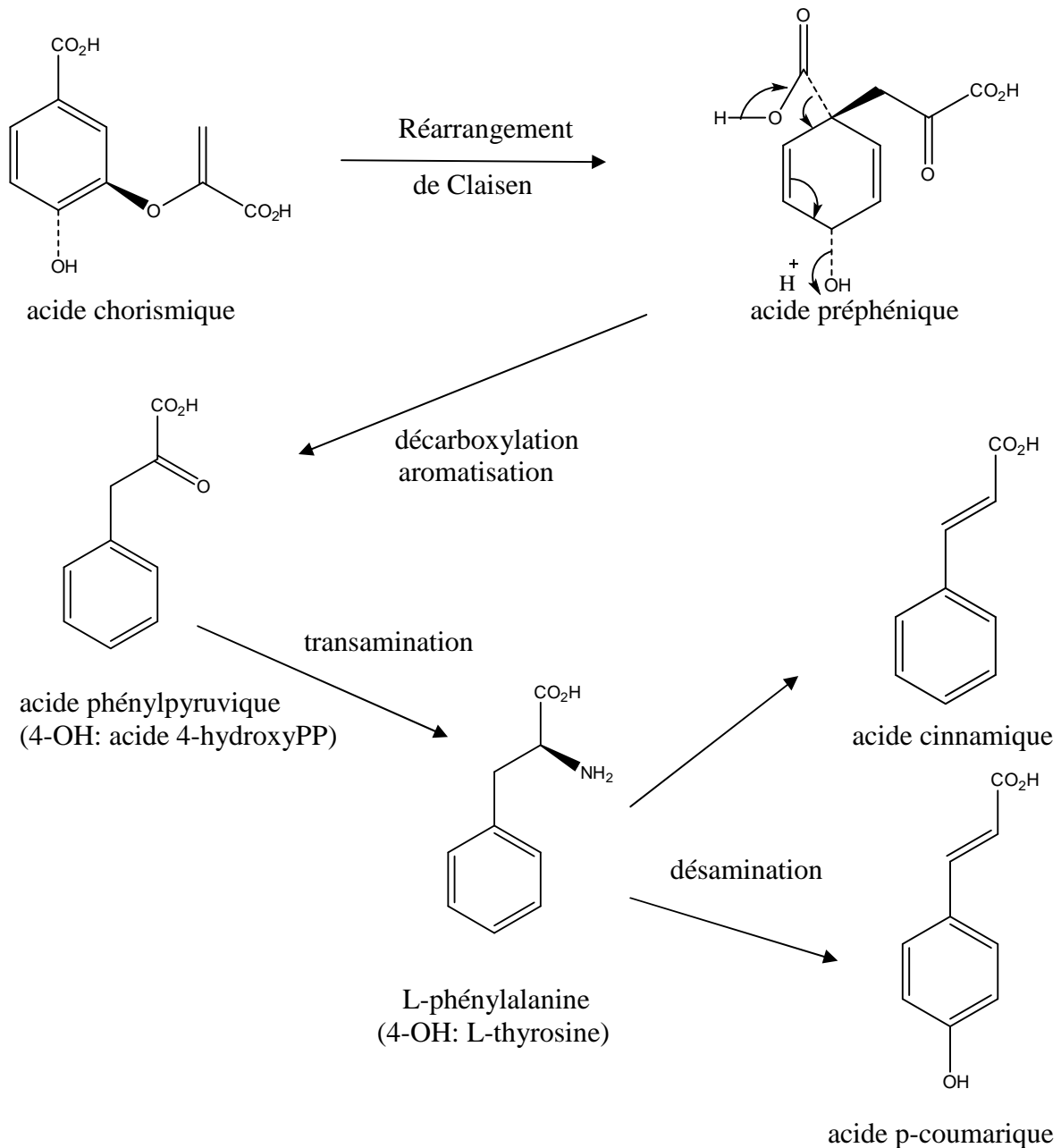


Figure-2- : biosynthèse des dérivés cinnamiques

Le cytochrome P450 cinnamate -4- hydroxylase (C4H), permet d'ajouter une fonction hydroxyle en position 4 du noyau aromatique et d'obtenir l'acide *p*-coumaroyl CoA est synthétisé via l'action de la 4-coumaroyl CoA ligase (C4L). Le *p*-coumaroyl CoA conduit à la synthèse de nombreux métabolites secondaires aromatiques. Une unité *p*-coumaroyl CoA va former le cycle B et la chaîne propanique, alors que le cycle A est formé par condensation de 3 unités C₂ (sous forme de 3 malonyl-CoA, formés à partir de l'acétate via une forme

Etude des flavonoïdes

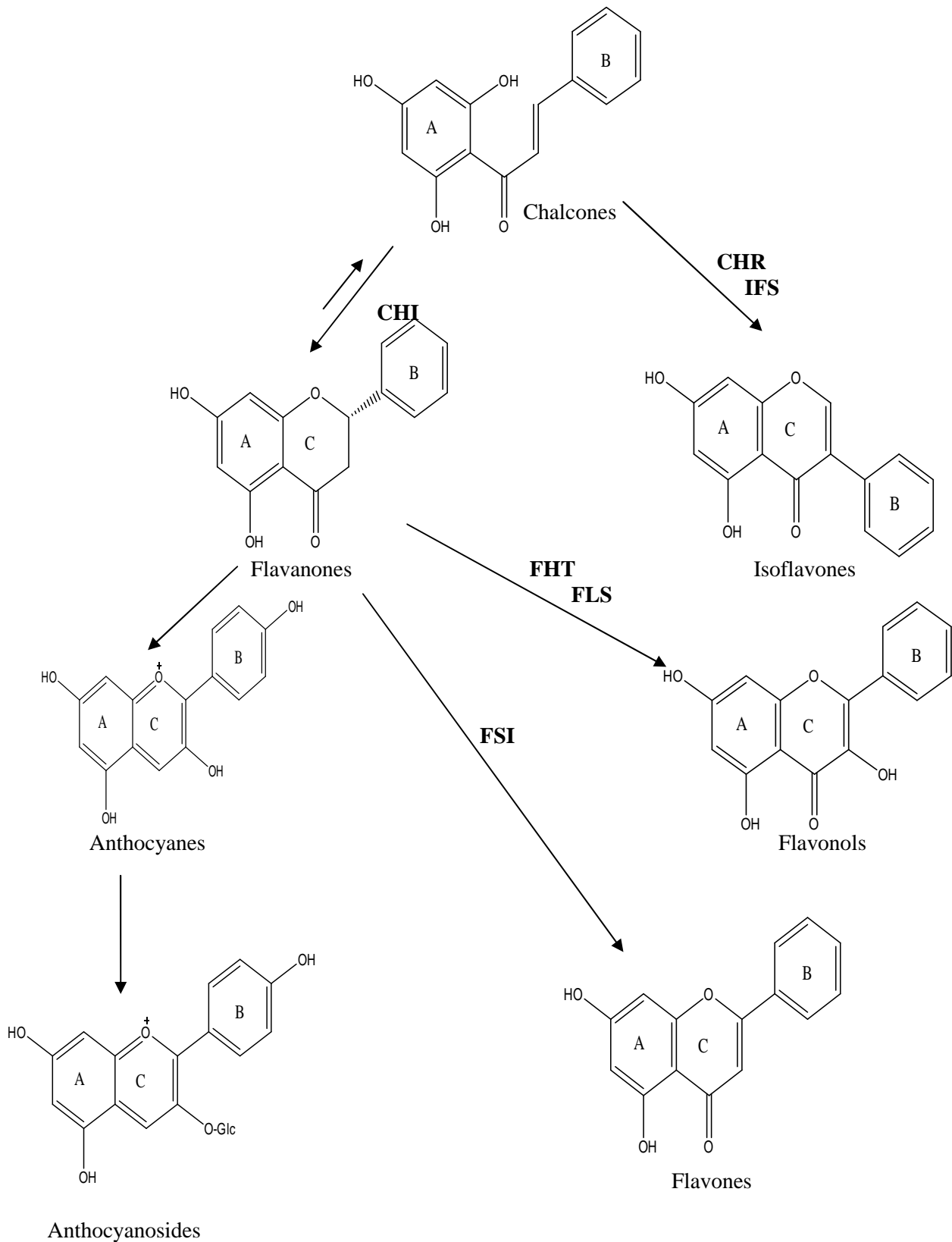


Figure-4- : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes

II. Les isoflavonoïdes

II.1. Généralités

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes) ,formant une squelette de base 1,2-diphénylpropane. Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (**Figure-5-**), classés en fonction du degré d'oxydation, l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires, les plus communs étant les isoflavones, alors que les isoflavanols et les coumaranochromones sont peu rencontrés [3].

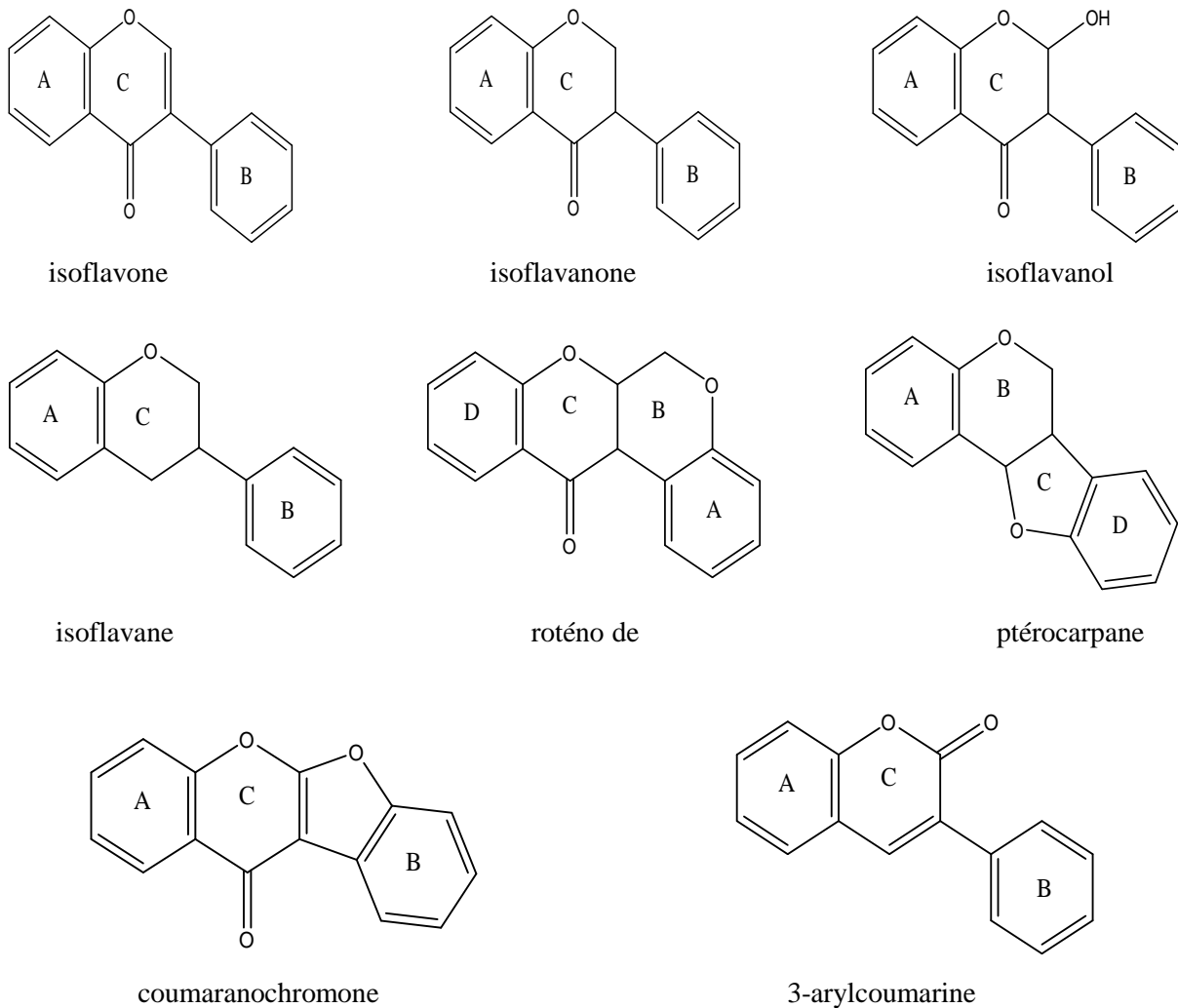


Figure -5- : Structures des différentes sous-classes d'iso flavonoïdes

Etude des flavonoïdes

II.2. Distribution

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, quelque fois dans les feuilles et les fleurs [3].

Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont quasi-uniquement présents chez les Légumineuses [3]. Il apparaît néanmoins qu'au 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes n'appartenant pas aux Légumineuses, mais à 59 autres familles (**Tableau-1-**) [8].

Tableau-1- : Familles de plantes dans lesquelles ont été isolé les isoflavonoïdes [8]

Ordre	Famille
Bryales	Bryaceae .
Pinales	Araucariaceae, Cupressaceae , Podocarpaceae .
Cyperales	Poaceae , Cyperaceae .
Eriocaulales	Eriocaulaceae .
Juncales	Juncaceae .
Liliales	Asphodelaceae , Iridaceae , Liliaceae , Stemonaceae .
Zingiberales	Zingiberaceae .
Asterales	Asteraceae .
Gentianales	Apocynaceae, Asclepiadaceae .
Lamiales	Verbenaceae .
Rubiales	Rubiaceae .
Scrophulariales	Scrophulariaceae .
Solanales	Solanaceae , Convolvulaceae .
Caryophyllales	Amaranthaceae , Chenopodiaceae , Nyctaginaceae .
Polygonales	Polygonaceae .
Capparales	Brassicaceae .
Ebenales	Sapotaceae .
Malvales	Bombacaceae, Malvaceae , Sterculiaceae .
Theales	Clusiaceae , Ochnaceae .
Violales	Cucurbitaceae , Violaceae .
Myricales	Myricaceae .
Urticales	Cannabaceae , Moraceae , Urticaceae .
Laurales	Lauraceae .
Magnoliales	Magnoliaceae , myristicaceae .
Nymphaeales	Nymphaeaceae .
Papaverales	Papaveraceae .
Ranunculales	Menispermaceae .
Apiales	Apiaceae .

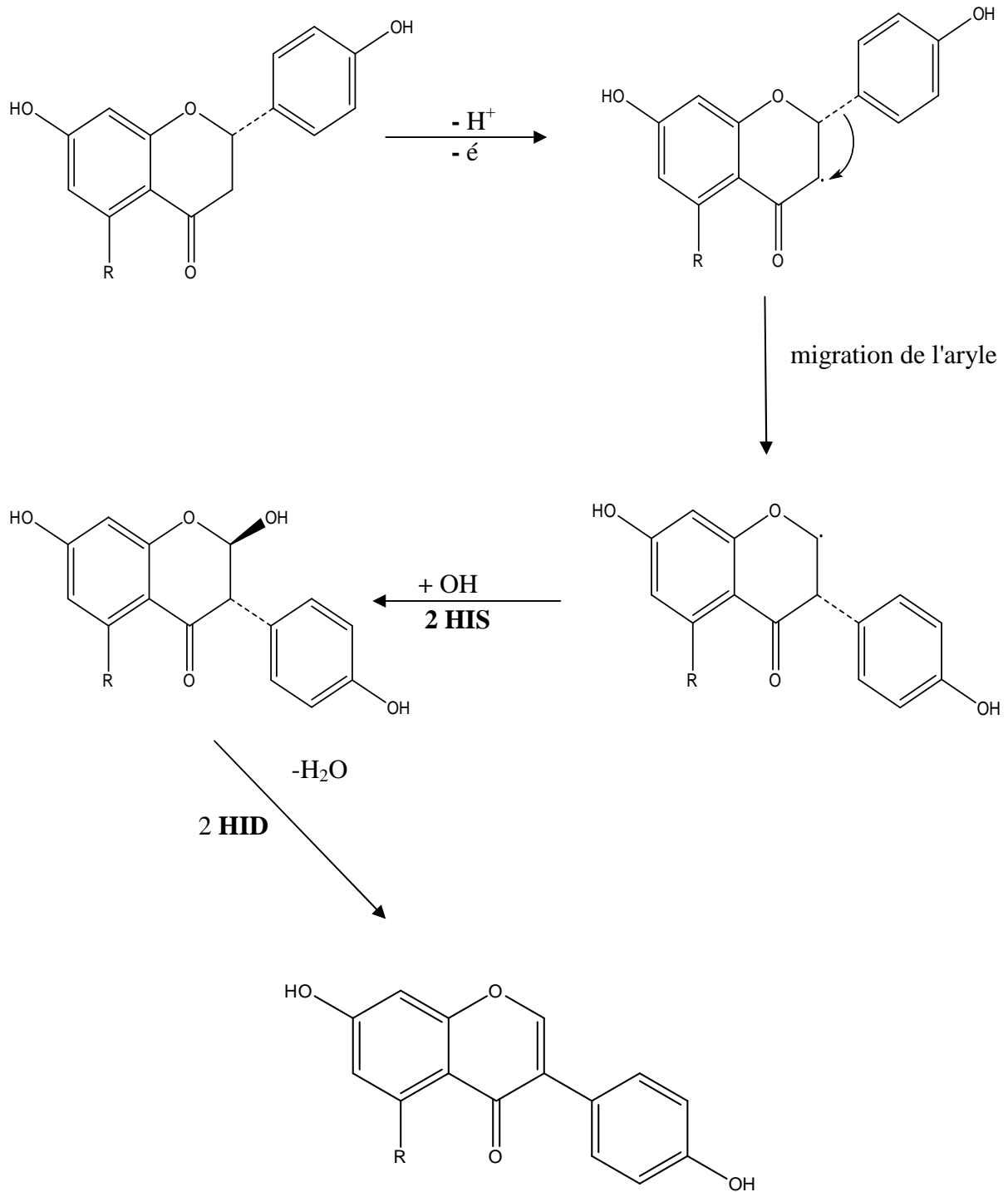
Etude des flavonoides

Celastrales	Celestraceae .
Euphorbiales	Euphorbiaceae .
Fabales	Leguminoseae .
Linales	Erythroxyllaceae .
Myrtales	Melastomataceae , Myrtaceae .
Polygales	Polygalaceae .
Rhamnales	Vitaceae , Rhamnaceae.
Rosales	Connaraceae , Crassulaceae , Rosaceae .
Sapindales	Rutaceae , Zygophyllaceae .

II.3.Biosynthèse

La présence d'isoflavonoïdes chez les Légumineuses peut s'expliquer. Il semblerait en effet , que l'on retrouve uniquement dans cette famille l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoides. Le terme IFS est utilisé pour décrire la réaction de migration du groupement aryle (**Figure-6-**), couplée à une 2- hydroxylation catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2 HIS) , ainsi que la réaction de déshydratation qui est soit spontanée , soit catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (2HID) [5, 9] .

Etude des flavonoïdes



R= H: daidzéine

R= OH: génistéine

Figure-6- : Biosynthèse des isoflavonoïdes

III. Activités biologique des flavonoïdes

III.1. Activité antibactérienne

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes [10].

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisofalavanones avec un, deux ou trois groupement hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus* sp, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens [10].

De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram +. Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité [11].

III.2. Activité anti – oxydante

Les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leur activité anti-oxydante. Ils participent à combattre les radicaux libres issus de l'oxygène et de l'azote. Ces molécules mises en cause dans de nombreux processus dégénératifs, accélèrent le vieillissement des tissus et cellules. Le stress oxydatif occasionné par ces radicaux libres semble fragiliser la bonne santé de l'organisme. Les défenses naturelles servent à limiter leur effet, mais l'organisme ne peut, parfois, pas se défendre seul, notamment chez les personnes plus âgées, et, nécessite de trouver de nouvelles armes à travers une alimentation riche en composés flavonoïdique [12].

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres [13-16]. Ces travaux ont montré que :

- Pour le cycle C : La présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4, et une hydroxylation en 3 augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes.
- Pour le cycle B : une ortho-dihydroxylation confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes [13,17]. Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule [13]. Les 3 sites de chélation principaux se situent [15] :

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4.
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4.
- Entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

Etude des flavonoïdes

🌱 Aussi, plusieurs études biologiques ont montré que les flavonoïdes présentent de nombreuses activités telles que:

- ✓ Anticancérogènes et inhibitrices de la croissance de cellules tumorales in vitro [18,19].
- ✓ Antifongique [20].
- ✓ Antivirale [21].
- ✓ Antiparasitaires [22,23].
- ✓ Anti-inflammatoire [24,25].
- ✓ Insectide [26,27,28].

IV. L'Etude chimique des flavonoïdes

IV.1.Séparation et purification

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que :

- ✓ La chromatographie liquide sur colonne (CC) : elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide éluée par des systèmes de solvants en mode gradient ou en mode isocratique. C'est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes [31].
- ✓ La chromatographie préparative sur papier (CP) : basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support. Les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont:
 - L'acide acétique 15 et 30% constitue le système aqueux.
 - Le n-butanol/Acide acétique/Eau (BAW) 4/1/5 constitue le système organique [32].
- ✓ La chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.

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

Etude des flavonoïdes

V. Analyse structurale des flavonoïdes

Les méthodes d'analyse structurale comprennent des méthodes chimiques et physico-chimiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

V.1. Fluorescence sous la lumière UV :

L'adsorption des substances flavoniques sur lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le **Tableau-2-** montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [32].

Tableau-2- : Relation entre la fluorescence sous lumière UV et la structure flavoniques.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5,6,7 ou 5,7,8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR Chalcones
Bleue	Flavone ou Flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec OH en 3 et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

V.2. Le rapport frontal R_f

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = d/D$$

d : distance entre l'origine et la tache du produit après élution.

D : distance entre l'origine et le front du solvant

Cette valeur varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silic, polymide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglucone ou glycosyle), ainsi que la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique [31, 32, 33]. Le **Tableau-3-** montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur valeur du R_f .

Etude des flavonoïdes

Tableau-3- : La relation entre le R_f et la structure flavonique

Structure flavonique	R_f
Augmentation des groupes hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
Méthylation des hydroxyles	R_f augment dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
Glycosylation	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux

V.3.spectroscopie UV-visible

Cette méthode est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [34].

(Figure-7-).

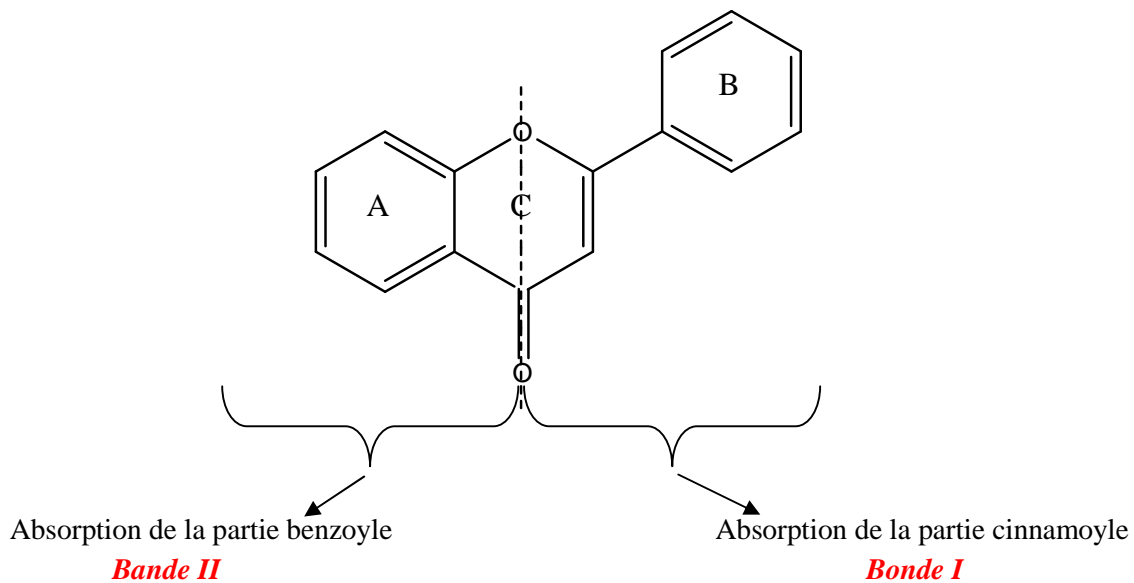


Figure-7- : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

- **Bande I :** présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm , elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C_2-C_3) et le noyau B , elle donne donc , des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

Etude des flavonoïdes

- **Bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm , elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales de cycle A [31].

Le **Tableau-4-** donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelque type de flavonoïdes.

Tableau-4- : Relation entre le maximum d'absorption UV et le type de flavonoïdes

Type de composé flavonique	Bande I(nm)	Bande II(nm)
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330 Ep	245-275

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [35].

Le spectre méthanolique d'un isoflavonoïde est caractérisé par l'apparition de la bande I sous forme d'un épaulement due à l'absence de la conjugaison entre le groupement carbonyle et le noyau B [32].

V.3.1. Addition de réactifs

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que **NaOH**, **NaOAc**, **AlCl₃**, **H₃BO₃** et **HCl** . Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique .

V.3.1.1.Spectre en présence de NaOH

NaOH, une base forte , ionise tous les hydroxyles phénolique du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la

bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [31]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et /ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [32].

V.3.1.2.Spectre en présence de NaOAc

L'acétate de sodium, NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [32].

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [32], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [32].

V.3.1.3.Spectre en présence de NaOAc +H₃BO₃

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H₃BO₃) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système orthodihydroxyle sur le cycle B (3',4') ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [32].

V.3.1.4.Spectre en présence de AlCl₃ et AlCl₃ +HCl

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl₃) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [35], par contre, ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carboxyle sont stables [36,37]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport

Etude des flavonoïdes

au spectre après addition de AlCl_3 et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH.

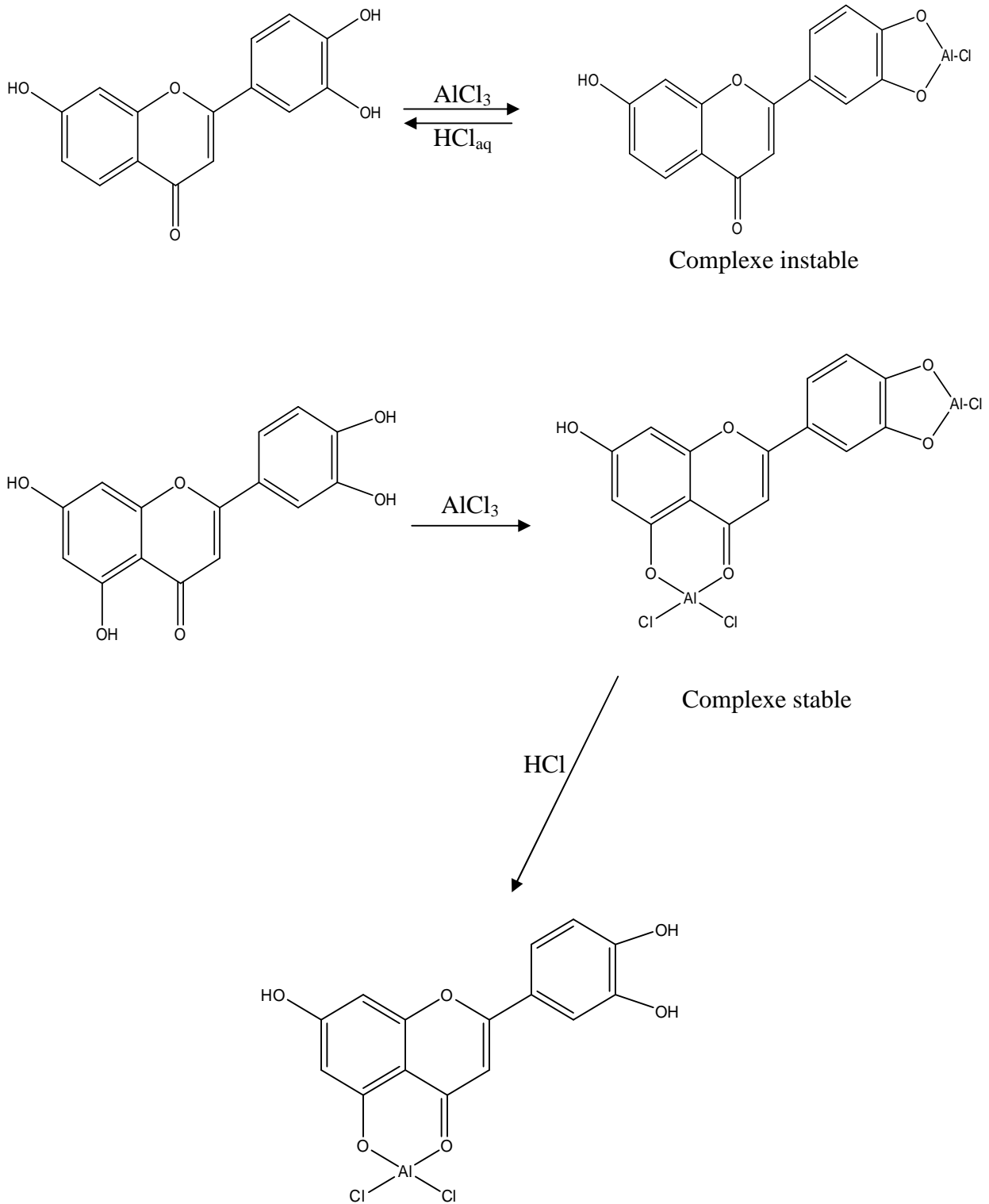


Figure-8- : Formation des différents types de complexes après addition de AlCl_3 et en présence de HCl .

Etude des flavonoïdes

- ❖ Le déplacement et l'intensité des deux bandes I et II du spectre effectué dans le méthanol montre la nature de la structure du flavonoïde ainsi que sa substitution, conformément au **Tableau -5-**.

Tableau -5- : Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après addition des réactifs [32].

Réactifs	Déplacement (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavone
	330-360	250-280	Flavonol (3-OR)
	350-385	250-280	Flavonol (3-OH)
NaOH	+45 à +65 de la bande I sans diminution d'intensité optique .		4'-OH
	+45 à +60 de la bande I avec diminution d'intensité optique .		3-OH , 4'-OR
	Apparition d'une nouvelle bande entre 320-335nm Décomposition lente		7-OH 3,4' di-OH ou orthodi-OH sur le noyau A (6,7ou 7,8).
NaOAc	+5 à +20 de la bande II faible déplacement de la bande II		7-OH 7-OH avec substituant en C-6 ou C-8
NaOAc + H ₃ BO ₃	+12 à +36 de la bande I Faible déplacement bathochromique de la bande I		3',4'-di OH orthodi-OH sur le noyau A
AlCl ₃	+20 à +25 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ +HCl		Orthodi-OH sur le noyau B+ 6,7 ou 7,8 di-OH
	+30 à +40 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ +HCl		Orthodi-OH sur le noyau B
AlCl ₃ + HCl	+35 à +55 de la bande I		5-OH
	+17 à +20 de la bande I		5-OH(avec 6-oxygénation)
	+50 à +60 de la bande I		3-OH ou 3-OH et 5-OH

V.4.Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique très puissante qui permet la détermination structural des composés organique par leurs rapports masse / charge.

Plusieurs techniques ont été appliquée aux flavonoïdes, telle que l'impact électronique (EI), l'ionisation chimiques (CI), l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) et l'ionisation chimique directe (DCI) [38,39].

Actuellement, la spectrométrie de masse trouve divers application grâce au couplage avec les techniques chromatographiques. Ces techniques de couplage permettent des analyses très rapide et très rigoureuses. Parmi ces dernies on cite la LC/MS une technique d'analyse de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont connus ou non [40,41].

V.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une technique très importante pour la détermination des structures flavoniques [42]. C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

V.5.1. La R.M.N du proton (RMN ¹H)

Concernant l'analyse des flavonoïdes, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ¹H) permet de connaître la position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde, le nombre de substituants méthoxy portés par le squelette flavonique et aussi le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

a. Analyse des signaux provenant des protons de la génine (de l'aglycone)

Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

❖ Protons du noyau A :

Lorsque le noyau A est disubstitué par des OH en 5 et 7, les protons H-6 et H-8 présentent deux doublets, respectivement entre 6 et 6,25 ppm avec une constante de couplage $J= 2,5$ Hz et entre 6,39 et 6,56 ppm avec la même constante de couplage. La substitution des OH en positions 5 et/ou 7 conduit au déblindage des deux protons voisins [42]. Le tableau -6- suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau A.

Tableau -6- : Déplacements chimiques des protons du noyau A

Flavonoïde	H-5	H-6	H-8
5,7-OH	/	6-6,2 ppm d($J=2,5$ Hz)	6,3-6,5 ppm d($J=2,5$ Hz)
5-OH, 7-OR R=Sucres	/	6,4-6,5 ppm d($J=2,5$ Hz)	6,7-6,9 ppm d($J=2,5$ Hz)
5,6,7-OR R=H ou Sucres	/	/	6,3 ppm (s)
5,7,8-OR R=H ou Sucres	/	6,3 ppm (s)	/
7-OR R=H ou Sucres	8 ppm d($J=9$ Hz)	6,7-7,1 ppm dd($J=9 ; 2,5$ Hz)	6,7-7,0 ppm d($J=2,5$ Hz)

Etude des flavonoïdes

❖ Protons du noyau B :

Le déplacement chimique des protons du noyau B se trouve entre 6,5-8,1 ppm. Ce déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C.

Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8.5 Hz).

Les protons H-2' et H-6' résonnent toujours à des champs inférieurs à ceux des protons H-3' et H-5'. Le tableau -7- suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau B [42].

Tableau -7- : Quelques déplacements chimiques des protons du noyau B [42]; [43] ; [44]

Flavonoïde	H-2'	H-6'	H-3'	H-5'
Flavones (4'-OH)[42]	7,7-7,9 ppm d(J=8,5Hz)	7,7-7,9 ppm d(J=8,5Hz)	6,5-7,1 ppm d(J=8,5Hz)	6,5-7,1 ppm d(J=8,5Hz)
Flavonols (4'-OH)[42]	7,9-8,1 ppm d(J=8,5Hz)	7,9-8,1 ppm d(J=8,5Hz)	6,5-7,1 ppm d(J=8,5Hz)	6,5-7,1 ppm d(J=8,5Hz)
Flavones (3'-OMe ; 4'-OH)[43]	7,4-7,5 ppm d(J=2,1Hz)	7,3-7,5 ppm d(J=7,2;2,1Hz)	/	6,8-6,9 ppm d(J=7,2Hz)
Flavonols (3'-OMe ; 4'-OH)[44]	7,7-7,8 ppm d(J=2,1Hz)	7,6-7,7 ppm dd(J=8,5;2,1Hz)	/	6,9-7 ppm d(J=8,5Hz)

❖ Protons du cycle C

Le proton H-3 d'une structure flavone résonne entre 6 et 7 ppm sous forme d'un singulet [45], pouvant être confondu avec les protons H-6 et H-8.

b. Analyse des signaux provenant des protons de la partie osidique

❖ Proton anomérique

Le proton anomérique apparaît sur le spectre sous forme d'un doublet déblindé par rapport aux autres protons osidiques. La valeur de la constante de couplage permet de distinguer les anomères ($J=7-8$ Hz) des anomériques ($J=3-4$ Hz) [46].

Le proton anomérique lié à un autre ose, devient relativement loin de l'influence du noyau flavonique, et résonne à champ plus fort que le proton anomérique lié à la génine. A titre d'exemple dans le cas de kampférol 3-O- β -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside le proton H-1'' du rhamnose résonne à 4,54 ppm dans le méthanol deutérié [47] alors que

Etude des flavonoïdes

dans le cas du kampférol-3-*O*-rhamnoside le proton anomérique H-1'' résonne à 5,43 ppm avec une constante de couplage $J=2,1$ Hz [48].

❖ Autres protons osidiques

Les autres protons osidiques résonnent entre 3 et 4 ppm. Ils apparaissent souvent sous forme de multiplets difficiles à interpréter

V.5.2.la R.M.N du carbone 13 (RMN ¹³C)

La RMN¹³C donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [31 ,49].

- ❖ Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
- ❖ La connaissance de type des liaisons-*C* et/ou -*O* sucres.

Le **Tableau -8-** présente les déplacements chimiques (en ppm) des carbones des gémènes de quelques composés flavoniques.

Tableau-8- : Déplacement chimique des carbones de gémènes de quelques composés flavoniques

Composé	1[50]	2 [50]	3 [51]	4 [52]	5 [53]	6 [53]
Solvant	DMSO	DMSO	CD ₃ OD	CD ₃ OD	CD ₃ OD	CD ₃ OD
C-2	165,5	164,0	158 ,9	148	159 ,3	159,0
C-3	104,3	102,7	135,5	137,2	135,6	135,3
C-4	183,2	181,5	179,7	177,3	179,2	179,4
C-5	162,0	160,8	150,4	162,5	162,9	162,9
C-6	100,3	99,5	100,1	99,3	98,6	99,5
C-7	164,9	162,9	158,5	165,3	166,2	166,4
C-8	95,6	104,6	129,1	94 ,4	94,2	94,9
C-9	158,5	156,0	158,1	158,2	158,5	158,5
C-10	105,1	103,9	105,7	104,5	105,5	105,9
C-1'	122,7	121,6	122,9	124,3	123,1	123,1
C-2'	129,8	128,6	132,3	116,0	116,4	116,1
C-3'	117,3	116,1	116,2	148,7	145,8	145,7
C-4'	161,8	161 ,4	161,7	146,2	149,8	149,9
C-5'	117,3	116,1	116,2	116,2	117,3	117,9
C-6'	129,8	128,6	132,3	121,7	122,3	122,8

Etude des flavonoides

C-1''	-	74,4	104,1	-	103,7	101,9
C-2''	-	71,1	75,7	-	75,1	73,9
C-3''	-	78,7	78,1	-	79,3	75,2
C-4''	-	70,6	71,4	-	72,5	70,2
C-5''	-	81,9	78,5	-	78,3	75,4
C-6''	-	61,4	62,7	-	68,5	67,6
C-1'''	-	-	-	-	101,2	100,1
C-2'''	-	-	-	-	71,0	72,1
C-3'''	-	-	-	-	71,0	72,4
C-4'''	-	-	-	-	73,2	73,2
C-5'''	-	-	-	-	70,2	69,7
C-6'''	-	-	-	-	17,0	17,9

1 : Apigénine , **2** : apigénine -8-C-glucopyranoside .

3 : 8-methoxykaempferol-3-O- - glucopyranoside , **4** : Quercétine.

5 : Quercétine-3-O- -rutinoside, **6** : Quercétine-3-O- -robinobioside.

Références bibliographiques

1. Harborne, J.B. and Williams, C.A., **2000**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.
2. Bruneton, J., **2009**. Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales. p-1292.
3. Iwashina, T., **2000**. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. **113**, 287-299.
4. Vogt, T., **2009**. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. **3**, 2-20.
5. Dixon, R.A. and Steele, C.L., **1999**. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*. **4**, 394-400.
6. Winkel-Shirley, B., **2001**. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. **126**, 485-493.
7. Fowler, Z.L. and Koffas, M.A.G., **2009**. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **83**, 799-808.
8. Lapcik, O., **2007**. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry*. **68**, 2909-2916.
9. Veitch, N.C., **2006**. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*. **24**, 417-464.
10. Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., **2005**. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**, 343-356.
11. Jimenez-Gonzalez, L., Alvarez-Corral, M., Munoz-Dorado, M. and Rodriguez-Garcia, I., **2008**. Pterocarpanes : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*. **7**, 125-154.
12. Pietta, P., **2000**. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **63**, 1035-1042.
13. Halbwirth, H., **2010**. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. **11**, 595-621.
14. Kale, A., Gawande, S. and Kotwal, S., **2008**. Cancer phytotherapeutics : role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*. **22**, 567-577.

15. Mladinka, P., Zatloukalova, L., Filipisky, T. and Hrdina, R., **2010**. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* **49**, 963-975.
16. Rufer, C.E. and Kulling, S.E., **2006**. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2926-2931.
17. Leopoldini, M., Russo, N. and Toscano, M., **2010**. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* **125**, 288-306.
18. Bruneton, J., **1993**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Techniques et documentation. Edition : Lavoisier (2^{ème} édition) Paris.
19. Morin, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., **1987**. Antibacterial activity and mode of Action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* **18**, 2231-2234.
20. Grayer, R.J. and Harborne, J.B., **1994**. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* **37**, 19-42.
21. Andres, A., Donovan, S.M. and Kuhlenschmidt, M.S., **2009**. Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry* **20**, 563-569.
22. Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., Lima, R.A.D., Torge, R. and Monache, G.D., **2009**. Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry* **16**, 3414-3468.
23. Batista, R., Junior, A.D.J.S. and Oliveira, A.B.D., **2009**. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicine. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* **14**, 3038-3072.
24. Pierini, R., Gee, J.M., Belshaw, N.J. and Johnson, I.T., **2008**. Flavonoids and intestinal cancers. *British Journal of Nutrition* **99**, 53-59.
25. Liang, Y.C., Tsai, S.H., Tsai, D.C., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K., **2001**. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters* **496**, 12-18.
26. Yenesew, A., Twinomuhwezi, H., Kabar, J.M., Akala, H.M., Kiremire, B.T., Heydenreich, M., Peter, M.G., Eyase, F.L., Waters, N.C. and Walsh, D.S., **2009**. Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from *Derris trifoliata*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **23**, 409-414.

27. Sreelatha, T., Hymavathi, A., Rao, V.R.S., Devanand, P., Rani, P.U., Rao, J.M. and Babu, K.S., **2009**. A new benzil derivative from *Derris scandens*: structure-insecticidal activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .**20**, 549-553.
28. Rattan, R.S., **2010**. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. **29** ,913-920.
29. Bruneton, J., **1999**. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition. 3, lavoisier, Paris.
30. Ribereau-Gayou, J.B., **1968**. The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo, Paris.
31. Markham, K.R., **1982**. Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
32. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., **1970**. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. p-254.
33. Berthillier, A., **1972**. La chromatographie et ses application, Dunod paris.
34. Jurd, L. and Horowitz, R., **1962**. Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
35. Markham, K.R. and Mabry, T.J., **1968**. *Phytochemistry*. **7**, p-1197.
36. Horhammer, L. and Hänsel, R., **1952**. *Arch. Pharm.* **285**, 438.
37. Jurd, L. and Geissman, T.A., **1956**. *J. Org. Chem.* **21**, 1395.
38. Ma, Y. L., Li, Q. M., Van den Heuvel, H., Claeys, M., **1997**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **11**, 1357-1364.
39. Stobiecki M., **2000**. *Phytochemistry*. **54**, 237-256.
40. Ablajan, K., Abliz, Z., Shang, X.-Y., He, J.-M., Zhang, R.-P. and Shi, J.-G., **2006**. Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **41**, 352-360.
41. Wolfender, J. L., Waridel, P., Ndjoko, K., Hobby, K. R., Major, H. J., Hostettmann, K., **2000**. IT-MS n for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* 28.
42. Markham, K. R., Geiger, H., **1994**. *The Flavonoids*. Ed. Harborne, J. B., Capman and Hall, London.
43. Eunjung, L., Byoung-Ho, M., Younghee, P., Sungwon, H., Sunhee, L., Younggiu, L., **2008**. Effets of hydroxyl and methoxy substituents on NMR data in flavonol. *Bulletin of Korean Chemistry Society*. **29**, 507-510.

44. Yayli, N., Seymen, H., Baltaci, C., 2001. Flavone C-glycosides from *Scleranthus uncinatus*. *Phytochemistry*. **58**, 607.
45. Mabry, T. J., 1969. The Ultra-violet and nuclear magnetic resonance analysis of flavonoids perspectives in phytochemistry. Ed. Harborne, J. B., 1-45.
46. Markham K. R., Mabry T. J., 1975. *In The Flavonoids*. Ed. Harborne J. B., Mabry T., and Mabry H., Cahpman and Hall, London. p-45.
47. Sang, S., Laspley, K., Jeong, W. S., Lachance, P. A., Ho, C. T., Rosen, R. T., 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 2459-2463.
48. Bilia, A. R., Ciampi, L., Mendez, J., Morelli, I., 1996. *Pharmaceutic Acta Helvetiae*. **71**, 199-204.
49. Markham, K.R., 1976. ¹³C NMR of flavonoides-II, Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*. **32**, 2607-2612.
50. Markham, K. R., Ternail, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T. J., 1978. *Tetrahedron*. **34**, 1389-1397.
51. Rayyan, S., Fossen, T., Nateland, H. S., Andersen, Ø. M., 2005. Isolation and identification of falvonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug "*Crataegi folium cum flore*" (Hawthorn). *Phytochemical Analysis*. **16**, 334-341.
52. Fossen, T., Pedersen, A. T., Andersen, Ø. M., 1998. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry*. **47**, 281.
53. Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O., Dini, A., 1995. Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**, 2020-2024.

Chapitre III

Partie expérimentale

I. Etude phytochimique de l'espèce *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton

I.1.Introduction

L'herbe au bitume se trouve principalement en Afrique du Nord, en Europe méditerranéenne et central, en Macaronésie et au Moyen-Orient. Elle set commune dans toute l'Algérie et surtout dans le Tell. Elle pousse dans les forêts, les broussailles, sur terrains secs, arides et pierreux [1].

Cette plante est utilisée dans le traitement des spasmes et employée contre la fièvre et l'épilepsie. Elle est aussi cultivée comme plante ornementale ou fourragère [1].

I.2.Etude bibliographique

L'étude phytochimiques effectués sur les parties aériennes de l'espèce *Bituminaria bituminosa* (L.)C.H.Stiron ont permis l'isolement de trois ptérocarpanes : erybraedine C **1**, Bitucarpine A **2**, Bitucarpine B **3**, ainsi que : E-werneria chromene **4**, plicatine B **5**, D-pinitole, -sitosterole et -sitosterole glucoside [2]. Une étude biologique récente a montrée que cette plante présente une activité cytotoxique [3].

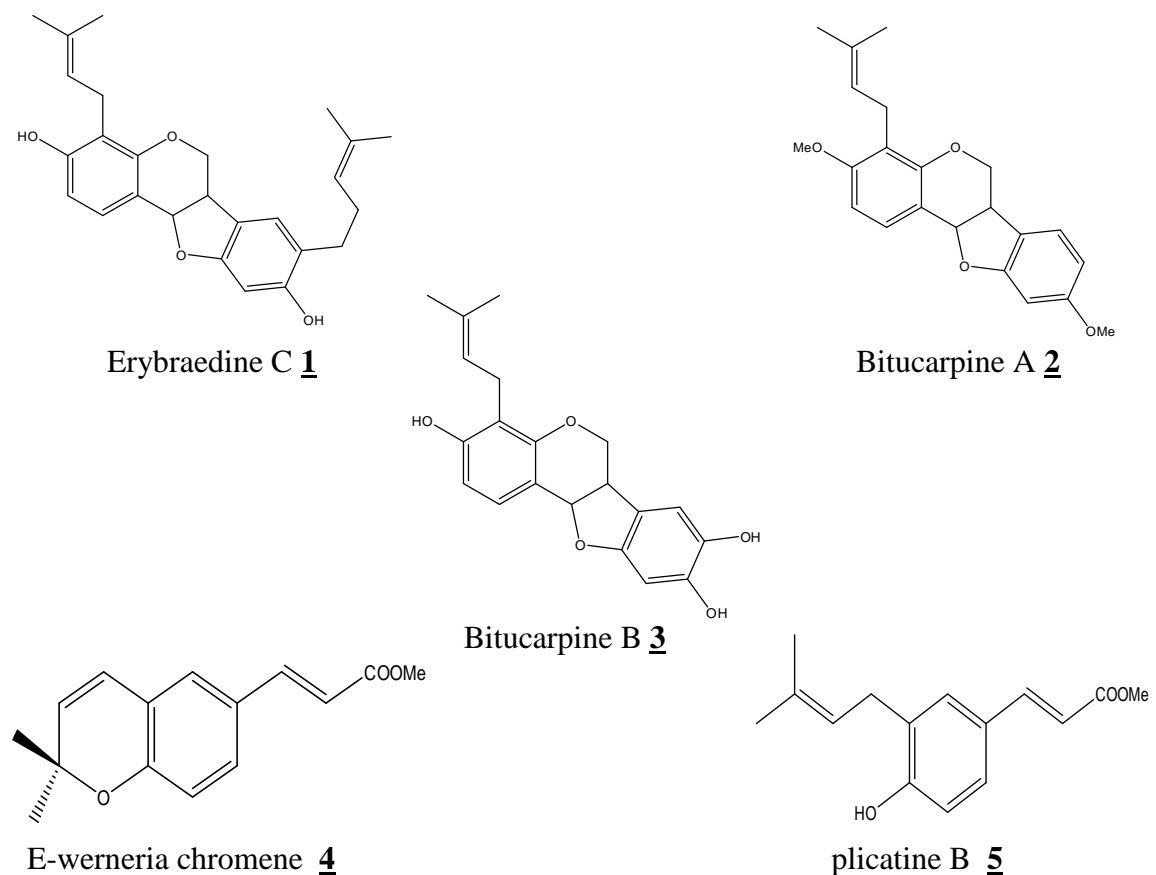


Figure-1- : Produits isolés de *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton

Partie Expérimentale

I.3.Place dans la systématique

Régne	—————→	Plantae
Sous-Régne	—————→	Viridaeplantae
Division	—————→	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	—————→	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	—————→	Rosidae
Ordre	—————→	Fabales
Famille	—————→	Fabaceae
Genre	—————→	<i>Bituminaria</i>
Espèce	—————→	<i>bituminosa</i> (L.)C.H. Stirton

I.4.Synonyme de la plante *B.bituminaria*

- *Psoralea bituminosa* .
- *Aspal thium bituminosa* (L.) Kuntze .

I.5.Nom vernaculaire de *B.bituminaria*

adna , Menitna

I.6.Description botanique

C'est une plante érigée, haute de 50-150 cm .Inflorescences en capitule dense de 10-15 fleurs, folioles entières. Fleurs longues de 1 cm au moins, à corolle bleue ou blanche bien plus longue que le calice [4].

Partie Expérimentale



Figure-2-:présentation des parties aériennes de *Bituminaria bituminosa*

I.7.Protocole expérimental

I.7.1.Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée de la région de Maaskar, au mois de mai 2011. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (800 g).

I.7.2.Extraction

800g des parties aériennes ont subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol:eau ; 7 :3) à chaud pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois. Après filtration et concentration à sec sous pression réduite à une température inférieure à 45°C, l'extrait méthanolique obtenu est dilué avec de l'eau distillée bouillante. Après décantation, le filtrat subit une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol.

Les trois phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On obtient 1g de la phase dichlorométhane, 1.37g de la phase acétate d'éthyle et 23.73g de la phase n-butanol (**Figure-3-**).

Partie Expérimentale

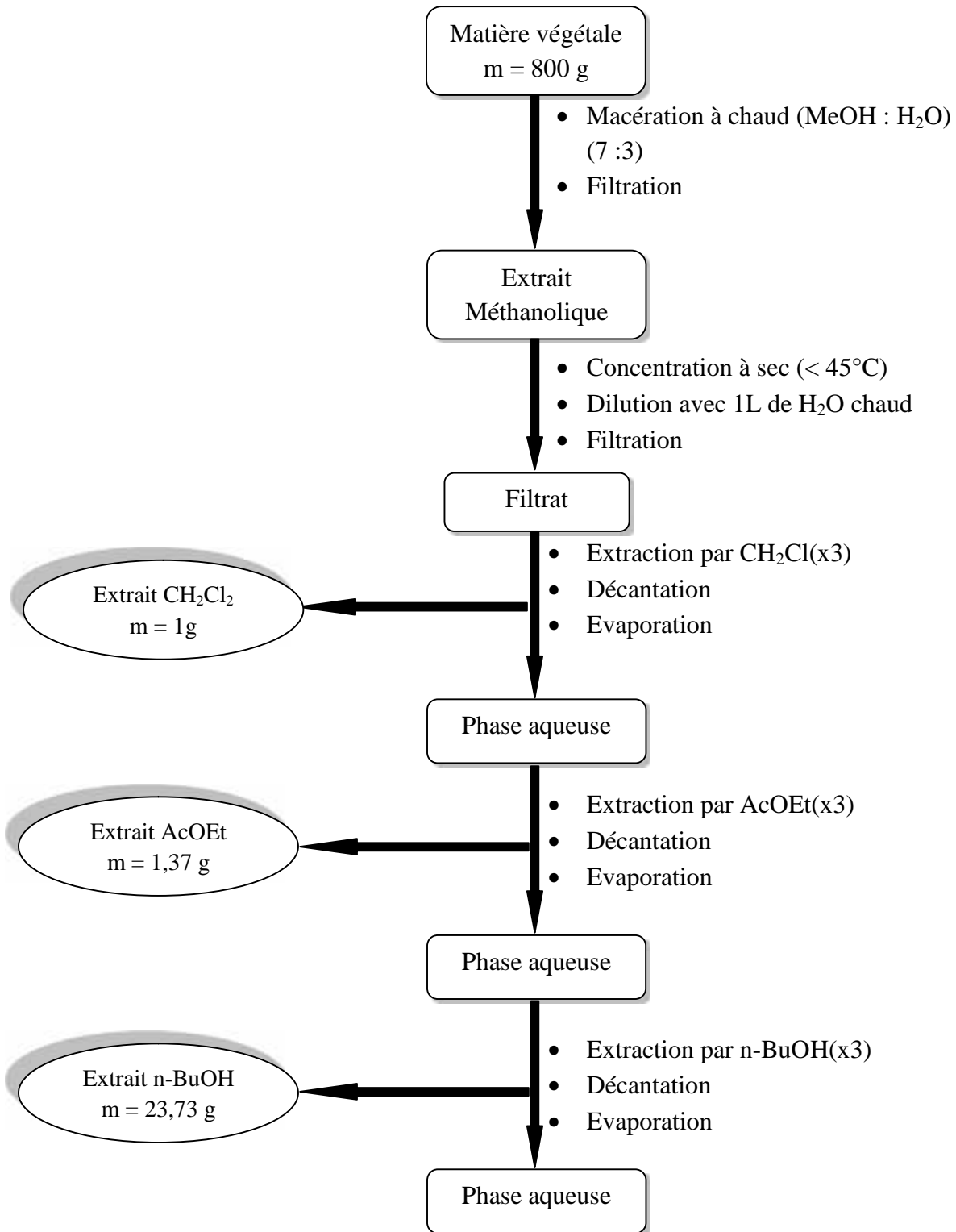


Figure-3- : Organigramme d'extraction du *Bituminaria bituminosa*(L.)C.H.Stirton.

Partie Expérimentale

I.7.3. Séparation et purification des extraits polaires de *Bituminaria bituminosa*

I.7.3.a. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle

Une masse de 1.3g d'extrait acétate d'éthyle a été déposée sur une colonne de gel de silice (type 60 ; 0,040-0,063 mm). L'élution a été réalisée par un mélange de gradients (n-Hexane, Acétate d'éthyle, MeOH), 20 fractions ont été obtenues (**Tableau-1-**).

Tableau-1- : Tableau de fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Lot des fractions	N° de la fraction	Système d'élution		
		n-Hexane	A cOEt	MeOH
1 – 5	F ₁	100	0	0
6 -12	F ₂	90	10	0
13 - 19	F ₃	80	20	0
20 - 27	F ₄	70	30	0
28- 29	F ₅	60	40	0
30 -34	F ₆	50	50	0
35 - 40	F ₇	40	60	0
41-52	F ₈	30	70	0
53-68	F ₉	20	80	0
69-76	F ₁₀	10	90	0
77-84	F ₁₁	0	100	0
85-93	F ₁₂	0	90	10
94-106	F ₁₃	0	80	20
107-111	F ₁₄	0	70	30
112-115	F ₁₅	0	60	40
116-123	F ₁₆	0	50	50
124-137	F ₁₇	0	40	60
138-140	F ₁₈	0	30	70
141-142	F ₁₉	0	20	80
143-148	F ₂₀	0	0	100

Partie Expérimentale

- **Etude de la fraction F₈**

- ✓ La fraction F₈ a donné un précipité blanc qui a été lavé plusieurs fois par le méthanol pour obtenir le produit B₁.

I.7.3.b. Séparation et purification des composés de l'extrait n-butanol

Une masse de 15 g de l'extrait butanolique a été chromatographiée sur colonne de polyamide SC-6. L'élution a été réalisée par un mélange de polarité croissante (Toluène-MeOH) pour donner 15 fractions. (**Tableau-2-**)

Tableau-2- : Tableau de fractionnement de l'extrait n-butanol

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution	
		Toluène	MeOH
1-4	F1	100	0
6-7	F2	98	2
8-19	F3	96	4
20-26	F4	94	6
27-38	F5	92	8
39-44	F6	90	10
45-54	F7	85	15
55-60	F8	80	20
61-67	F9	75	25
68-82	F10	70	30
83-86	F11	60	40
87-96	F12	50	50
97-100	F13	40	60
101-103	F14	20	80
104	F15	0	100

Partie Expérimentale

- **Etude des fractions F₈, F₉, F₁₁**

- ✓ Le composé **B₂** sous forme d'un précipité blanc a été obtenu après un lavage au méthanol de la fraction F₈.
- ✓ Le composé **B₃** sous forme d'un précipité blanc a été obtenu après un lavage au méthanol de la fraction F₉.
- ✓ le composé **B₄** sous forme d'un précipité de couleur jaune a été obtenu de la fraction F₁₁ après lavage au méthanol.

II. Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea dimorpha* Viv.

II.1. Etude bibliographique

D'après La recherche bibliographique, la plante *Centaurea dimorpha* Viv. n'a fait l'objet d'aucune investigation phytochimique.

II.2. Place dans la Systématique

Embranchement	—————>	Angiospermeae
Classe	—————>	Dicotyledoneae
Ordre	—————>	Asterales
Famille	—————>	Astéraceae
Sous-Famille	—————>	Cynareae
Genre	—————>	<i>Centaurea</i>
Espèce	—————>	<i>dimorpha</i> Viv.

II.3. Synonyme de la plante *Centaurea dimorpha* Viv.

- *Centaurea eriocephala* Boiss.
- *Centaurea polyacantha* Coss. non Willd.

II.4. Description botanique

C'est une plante désertique. Epine centrale des bractées moyennes ne dépassant pas 15mm de longueur, accompagnée par 4-6 épines basilaires. Epine plus foncées que le corps de la bractée. Plante à aspect de *C. sphaerocephala*, pubescente. Tige ailées à ailes faiblement épineuses, de 20-30 cm, souvent couchées et naissant alors sous un capitule central subsessile dans une rosette de feuilles. Akènes de 4 mm sur 2, tachetés, à aigrette plus courte ou subégale et à hile très gros. Son nom vernaculaire «Belala». [5].



Figure-4-: (a)Herbier de *Centaurea dimorpha* Viv. (b) *Centaurea dimorpha* Viv.

II.5.Protocol expérimental

II.5.1.Récolate du matériel végétal

- ❖ **1^{ère} Récolte :** La plante a été récoltée durant le mois de mai 2008 des environ de la ville de M'Sila. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (482g).
- ❖ **2^{ème} Récolte :** la plante a été récoltée durant le mois de mai 2012 des environ de la ville de M'Sila. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (1000g).

II.5.2.Extraction

- **Extraction de la 1^{ère} récolte de la plante**

Les parties aériennes de *C.dimorpha*Viv. (m=482g) sont mises à macérer dans le méthanol pendant 24 heures, cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Après concentration sous vide à 35°C, l'extrait méthanolique obtenu est dilué avec de l'eau distillée (500 ml pour 1Kg de matière sèche).

Après filtration le filtrat ainsi obtenu formant la phase aqueuse a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. Les trois phases organiques ainsi obtenues (CH₂Cl₂, AcOEt et n-BuOH) sont séchées par du Na₂SO₄anhydre, puis filtrées, concentrées à sec sous pression réduite donnant les extraits correspondants.

La figure suivante résume les différentes étapes de cette extraction :

Partie Expérimentale

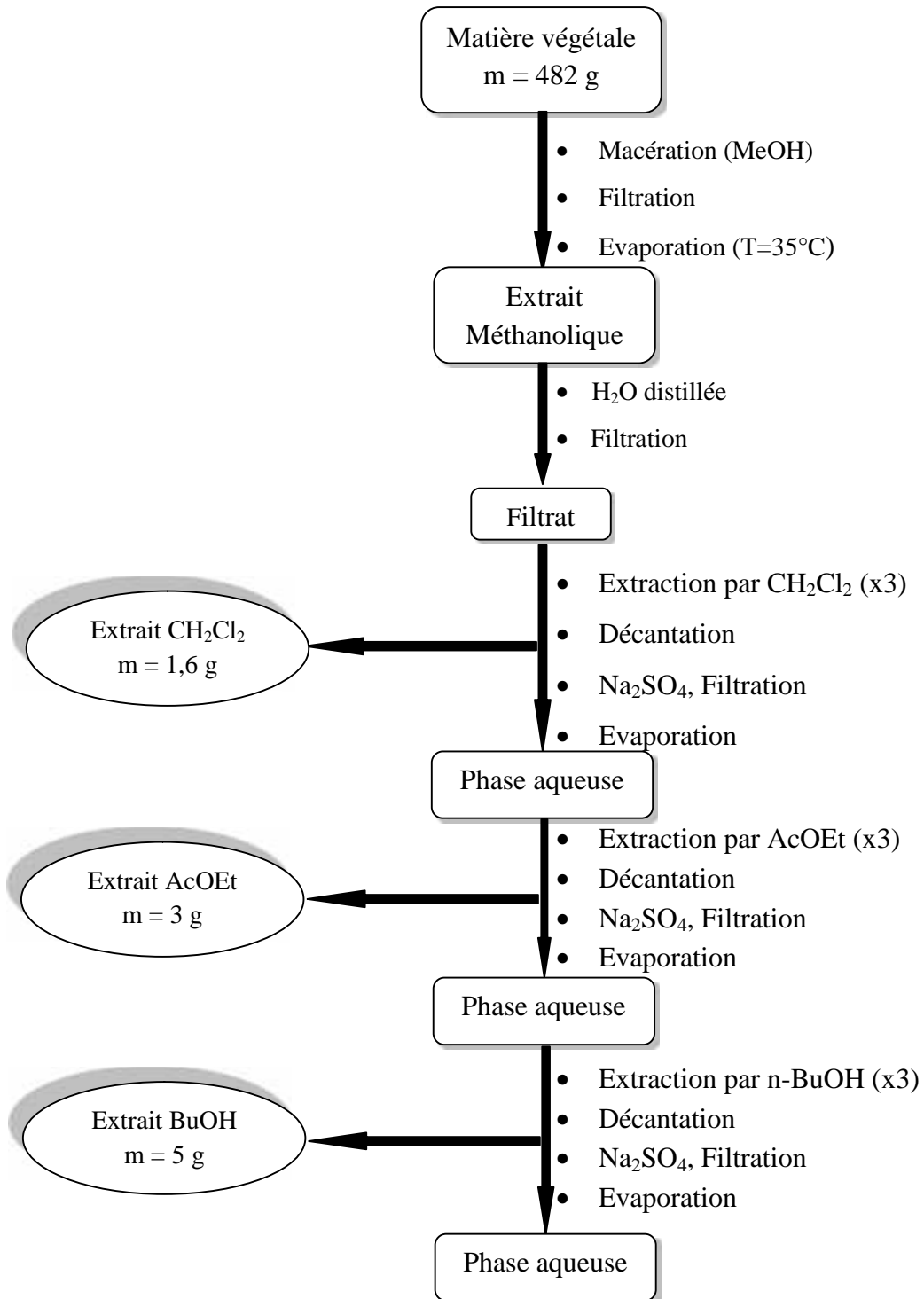


Figure-5- : Organigramme d'extraction du *Centaurea dimorpha* Viv (I).

Partie Expérimentale

Extraction de la 2^{ème} récolte de la plante.

1000g des parties aériennes ont subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (MeOH:H₂O, 7:3) à chaud pendant 24 heures cette opération est renouvelée 3 fois. Après filtration, concentration à une température inférieure à 45°C, on ajoute 1 L de H₂O bouillante au filtrat. La solution ainsi obtenue est laissée décanter pendant une nuit. Après filtration, la solution aqueuse est épuisée successivement par n-Hexane, acétate d'éthyle (AcOEt), et en fin n-butanol (n-BuOH), conduisant à l'obtention de 3 phases:

- ✓ Hexane
- ✓ acétate d'éthyle (1,44g)
- ✓ n-butanol (9,5g)

Le protocole des différentes étapes d'extraction de l'espèce *Centaurea dimorpha* Viv est représenté dans la **Figure -6-** .

Partie Expérimentale

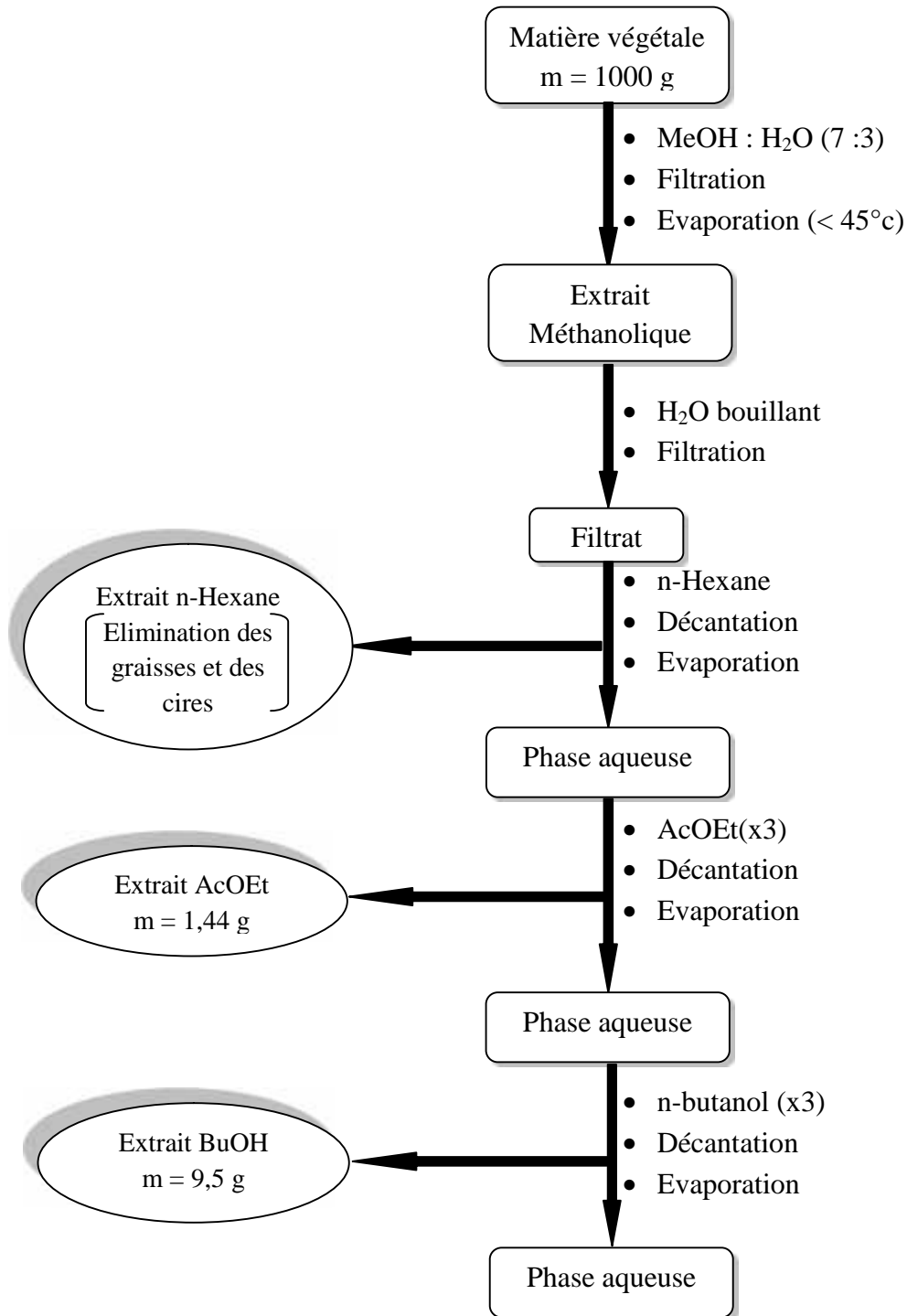


Figure -6- : Organigramme d'extraction du *Centaurea dimorpha* Viv. (II).

Partie Expérimentale

II.5.3. Séparation et purification des extraits issus de *Centaurea dimorpha* Viv

II.5.3.a. Séparation et purification des composés de l'extrait dichlorométhane

Le fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ (1,6 g) est réalisé sur une colonne de gel de silice (60 ; 0,040-0,063 mm). L'élution a été effectuée par le n-hexane, dont on augmente progressivement la polarité par addition de l'acétate d'éthyle, Conduisant à 32 fractions. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau -3-**.

Tableau -3- : Résultats de Fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution	
		n-Hexane	AcOEt
1-17	F ₁	100%	0%
18	F ₂	9	1
19	F ₃		
20	F ₄		
21	F ₅		
22-23	F ₆		
24-26	F ₇		
27-29	F ₈		
30-33	F ₉		
34-38	F ₁₀		
39-41	F ₁₁		
42-57	F ₁₂		
58-83	F ₁₃		
84-88	F ₁₄		
89-91	F ₁₅		
92-99	F ₁₆		
100-101	F ₁₇		
102	F ₁₈		
103-112	F ₁₉		
113-143	F ₂₀		
144-170	F ₂₁		
171-191	F ₂₂		
192-200	F ₂₃		
201-218	F ₂₄	1	1
219-220	F ₂₅		
221-239	F ₂₆		
240-257	F ₂₇		
258-266	F ₂₈	1	2
267-284	F ₂₉		
285-310	F ₃₀		
311-318	F ₃₁	0%	100%
319-324	F ₃₂	100% MeOH	

Partie Expérimentale

- **Etude de la fraction F₁₉:**

La fraction F₁₉ a été séparée sur CCM préparative de polyamide en utilisant Tolène/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (4 :3 :3) comme éluant pour donner deux composés **D₁** et **D₂**.

II.5.3.b.Séparation et purification des composés de l'extrait AcOEt :

1.44 g d'extrait AcOEt ont été déposés sur une colonne de gel de silice (60, 0,040 – 0,030 mm). L'élution a été réalisée par un gradient Ether de pétrole /Acétate d'éthyle/MeOH de polarité croissante pour donner 24 fractions. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau-4-**.

Tableau-4- : Résultats de Fractionnement de l'extrait AcOEt

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		
		Ether de pétrole	AcOEt	MeOH
1-5	F ₁	100	0	0
6-66	F ₂	90	10	0
67-79	F ₃	85	15	0
80-86	F ₄	80	20	0
87-91	F ₅	75	25	0
92-105	F ₆	70	30	0
106-120	F ₇	65	35	0
121-139	F ₈	60	40	0
140-143	F ₉	50	50	0
144-157	F ₁₀	40	60	0
158-163	F ₁₁	30	70	0
164-171	F ₁₂	20	80	0
172-177	F ₁₃	10	90	0
178-185	F ₁₄	0	100	0
186-190	F ₁₅	0	90	10
191-194	F ₁₆	0	80	20
195-198	F ₁₇	0	70	30
199-201	F ₁₈	0	60	40
202-205	F ₁₉	0	50	50
206-209	F ₂₀	0	40	60
210-213	F ₂₁	0	30	70
214-217	F ₂₂	0	20	80
218-221	F ₂₃	0	10	90
222-225	F ₂₄	0	0	100

Partie Expérimentale

- **Etude des fractions F₄, F₇, F₉**

- ✓ la fraction F₄ (50 mg) a subi une séparation chromatographique sur colonne de gel silice (60; 0,040-0,063 nm) en utilisant comme éluant un mélange de CH₂Cl₂/Acétate d'éthyle. 5 sous fraction ont été ainsi obtenues.

Tableau-5- : Résultat de la séparation de la fraction F₄

Lot	N° de la fraction	Système d'élution	
		CH ₂ Cl ₂	AcOEt
1-8	W ₁	90	10
9-20	W ₂	80	20
21-30	W ₃	70	30
31-36	W ₄	50	50
37-41	W ₅	30	70

- La sous fraction W₂ a été purifié sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le méthanol comme éluant pour donner le composé C₁.
 - ✓ La fraction F₇ a donné un précipité jaune qui a été purifiée par lavage au méthanol pour obtenir le composé C₂.
 - ✓ La fraction F₉ a donnée un précipité blanc qui a été purifiée par lavage au méthanol pour obtenir le composé C₃.

Références bibliographiques

1. *Guide illustré de la flore algérienne*. **2012**. Wilaya d'Alger, Mairie de Paris. p- 26.
2. Pistelli, L., Noccioli, C., Appendino, C., Bianchi, F., Sterner, O., Ballero, M., **2003**. Pterocarpan from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. *Phytochemistry*. **64**, 595-598.
3. D'angiollillo, F., Pistelli, L., Noccioli, C., Ruffoni, B., Piaggi, S., Scarpato, R. and Pistelli, L., **2014**. *In vitro* cultures of *Bituminaria bituminosa*: Pterocarpan, Furanocoumarin and Isoflavone Production and Cytotoxic Activity. *Natural Product Communications*. **9**, 477-480.
4. Quezel, P. and Santa, S., **1962**. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris. p-502.
5. Quezel, P. and Santa, S., **1963**. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, C.N.R.S. Paris. p-1031.

Chapitre IV

Résultats et discussion

Résultats et Discussion

I. Détermination structural des produits isolés de l'espèce *B. bituminosa*

I.1. Le composé B₁

L'examen du spectre RMN¹H (Spectre N°1, N°1bis) montre:

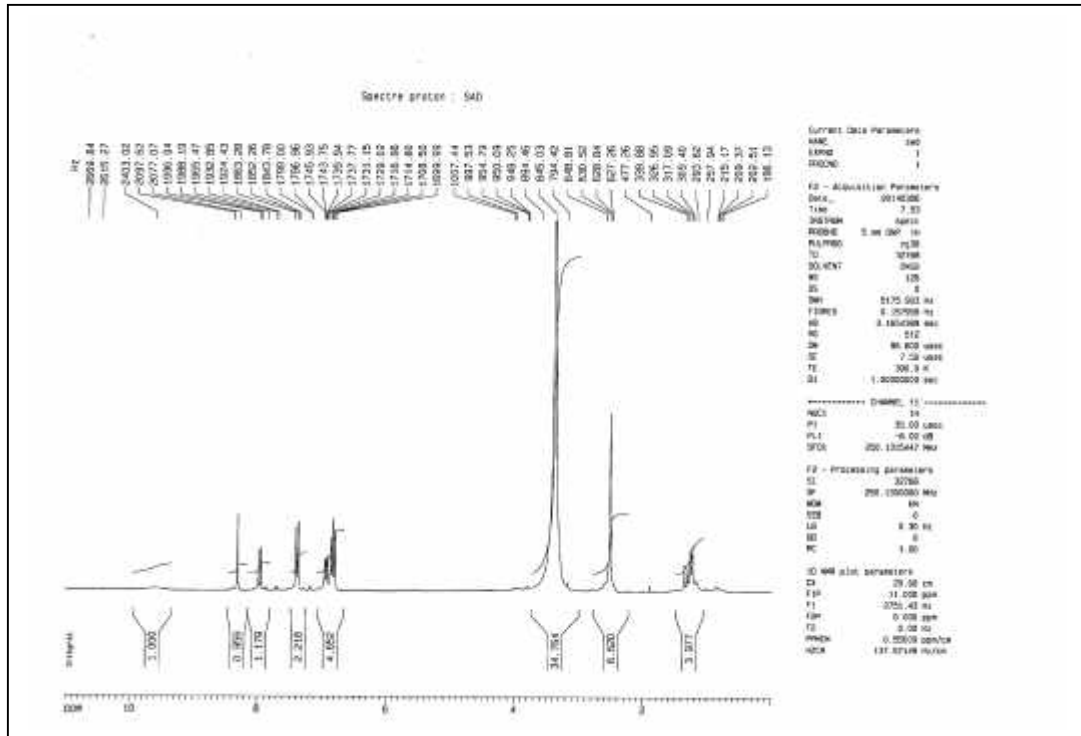
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,30$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 6,82$ ppm et à $\delta = 7,38$ ppm, ($J = 8,5$ Hz), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- Un épaulement d'intégration 1H à $\delta = 9,70$ ppm attribuable à 4'-OH.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz) indicateur d'un couplage méta à $\delta = 6,85$ ppm attribuable à H-8.
- Un doublet dédoublé ($J = 8,7$ ppm; $J = 2,1$ ppm) indicateur d'un couplage méta et d'un couplage ortho à $\delta = 6,93$ ppm attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 8,7$ ppm) indicateur d'un couplage ortho à $\delta = 7,96$ ppm attribuable à H-5.

Les données relatives à la RMN¹H de ce composé sont reportées dans le **Tableau-1-** .

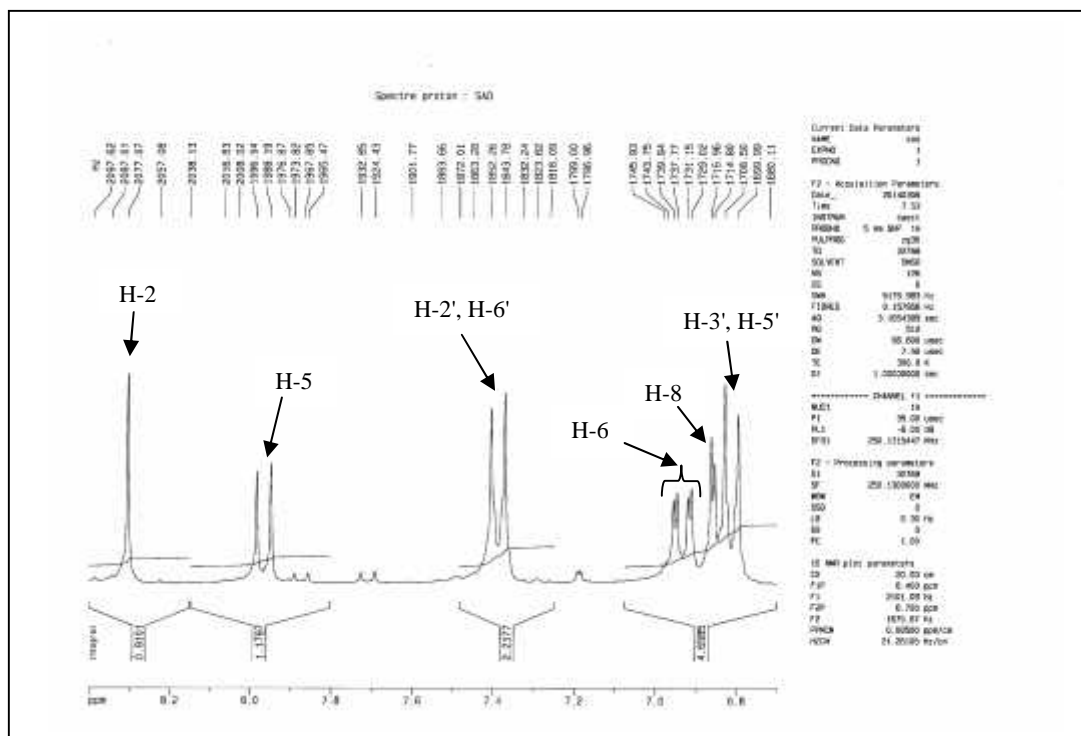
Tableau -1-: Données de la spectroscopie RMN¹H du composé B₁

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
9,70	1H	s	4'-OH
8,30	1H	s	H-2
7,96	1H	d(8,7)	H-5
7,38	2H	d(8,5)	H-2' ; H-6'
6,93	1H	dd (8,7-2,1)	H-6
6,85	1H	d(2,1)	H-8
6,82	2H	d(8,5)	H-3' ; H-5'

Résultats et Discussion



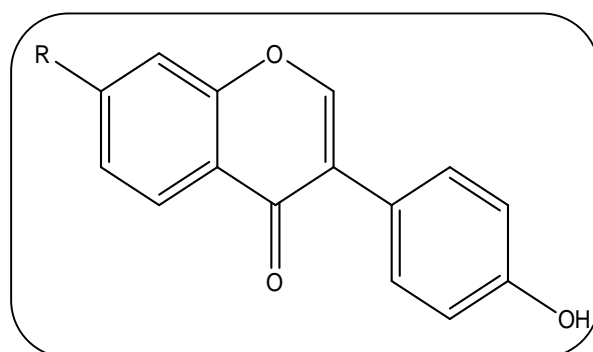
Spectre N°1: RMN¹H (250 MHz, DMSO) du produit B₁



Spectre N°1 bis: Etalement du spectre N°1 dans la zone 6,70 – 8,40 ppm

Résultats et Discussion

Les données de la RMN¹H permettent de proposer la structure suivante:



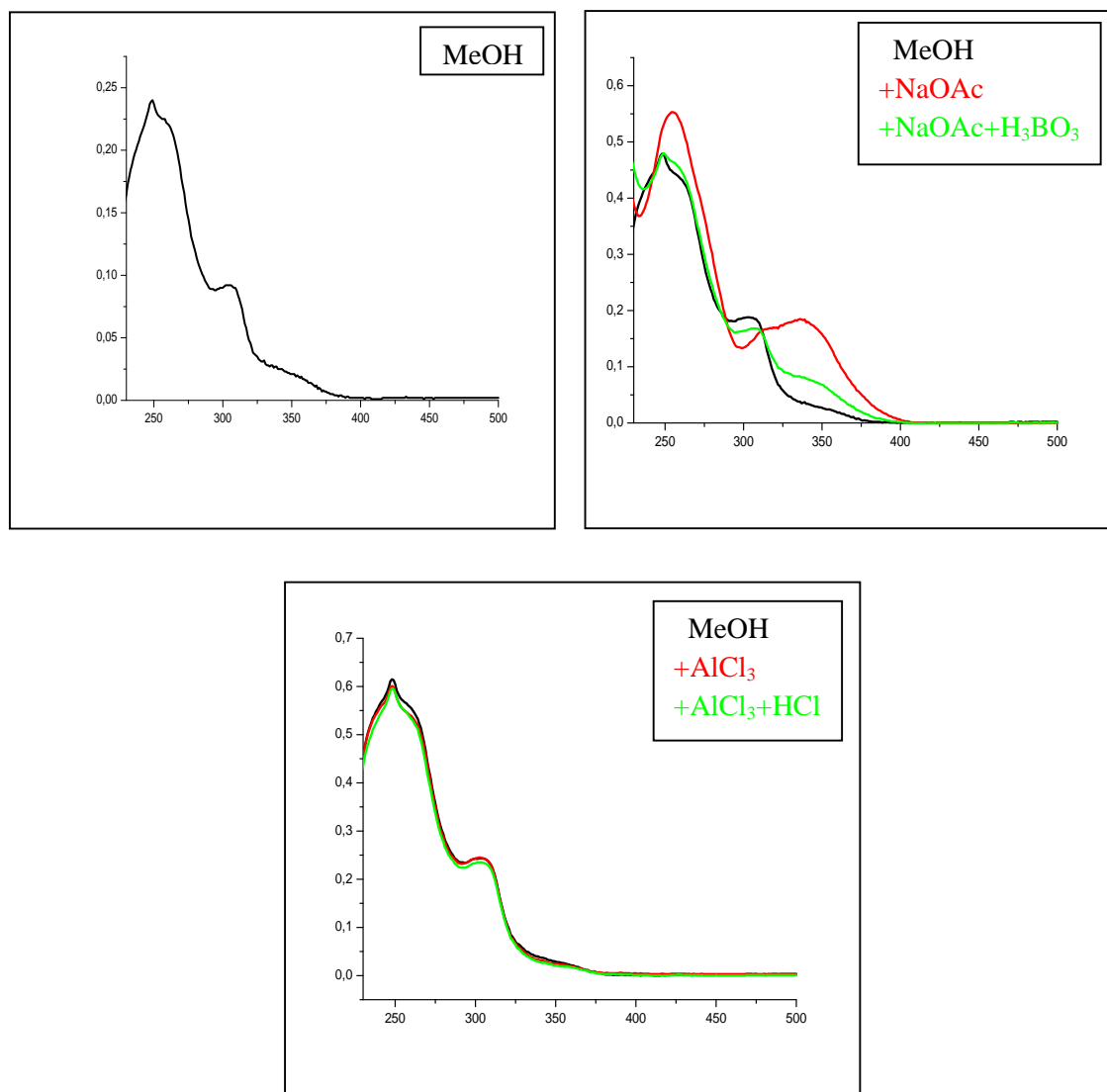
Les données de la série spectrale UV (**Tableau-2-**, **Spectre N°2**) montrent:

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 306 nm et la bande II à 249 nm ainsi que la fluorescence Orange sous lumière de Wood confirment le squelette de type isoflavone.
- Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc (+5 nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande II en comparant les spectres NaOAc+H₃BO₃ et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système orthodi-OH sur le noyau A.
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande II enregistré après addition de AlCl₃+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme l'absence d'un OH libre en position 5.

Tableau-2-: Données de la série spectrale UV du composé B₁

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	306	249
+NaAOC	336	254
+NaOAc+H ₃ BO ₃	307	249
+AlCl ₃	305	249
+AlCl ₃ +HCl	305	249

Résultats et Discussion



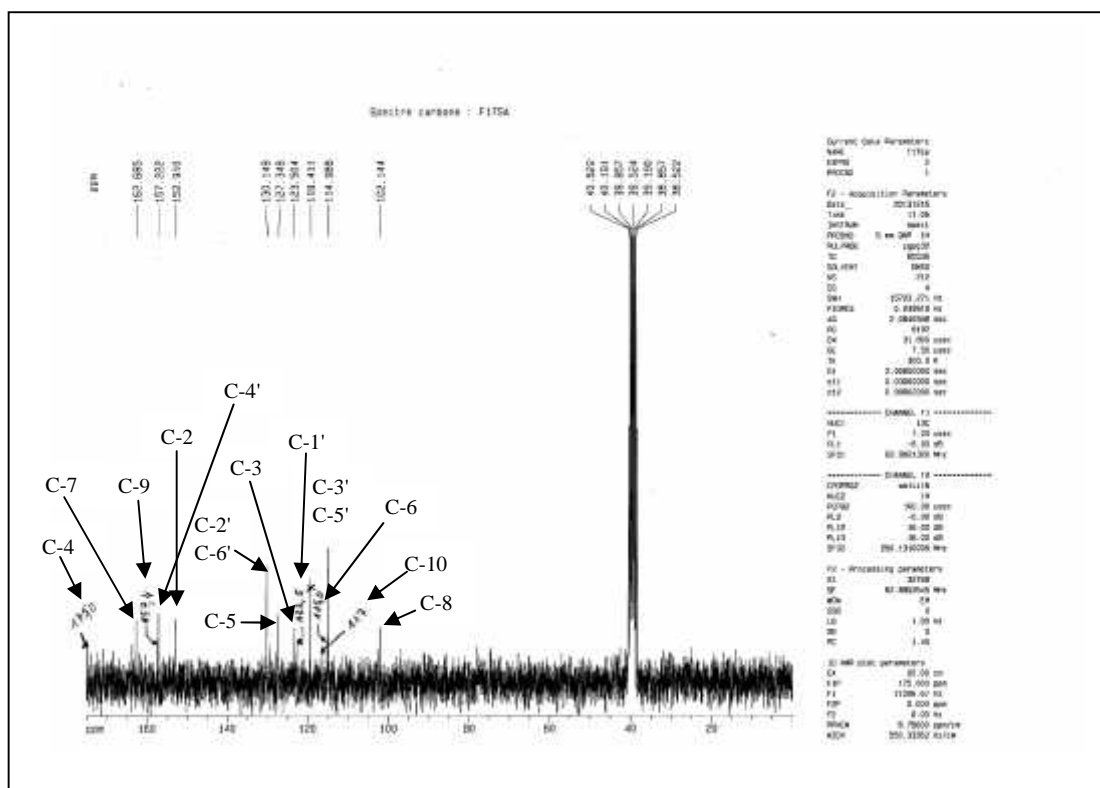
Spectre N° 2: Série spectrale UV du produit B₁

Résultats et Discussion

Les résultats de la RMN¹³C (**Tableau-3-** ; **Spectre N°3**) confirme les données des analyses précédentes.

Tableau-3-: Données de la spectroscopie RMN¹³C du composé B₁

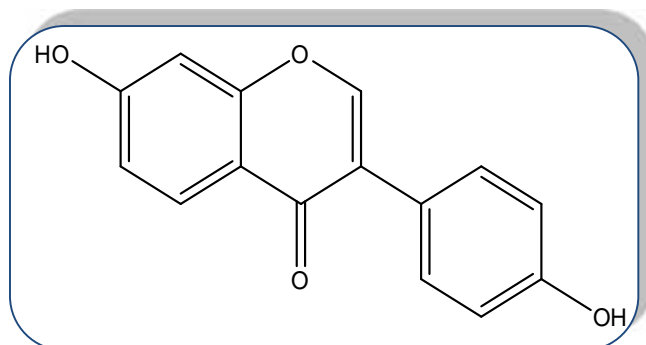
Déplacement chimique (ppm)	Attribution
152,9	C-2
123,5	C-3
175,0	C-4
127,3	C-5
115,0	C-6
162,6	C-7
102,1	C-8
157,4	C-9
117	C-10
122,5	C-1'
130,1	C-2' ; C-6'
114,9	C-3' ; C-5'
157,2	C-4'



Spectre N°3: RMN¹³C (125 MHz, DMSO) du produit B₁

Résultats et Discussion

L'ensemble de ces données, nous conduit à la structure de la **4',7-dihydroxyisoflavone (daidzeine)**. Cette identification est confirmée par comparaison des données spectrales avec celle publiées dans la littérature [1].



4',7-dihydroxyisoflavone (Daidzeine)

I.2. Le composé B₃

L'examen du spectre RMN¹H (Spectre N°4, N°4 bis) montre:

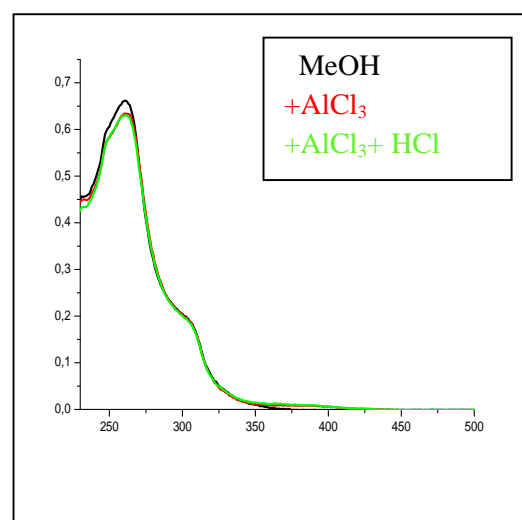
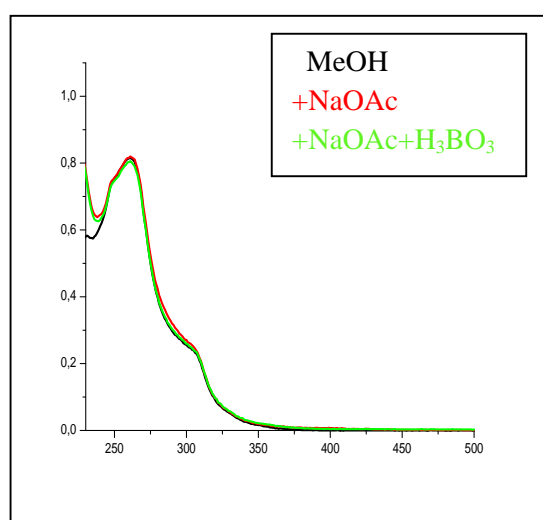
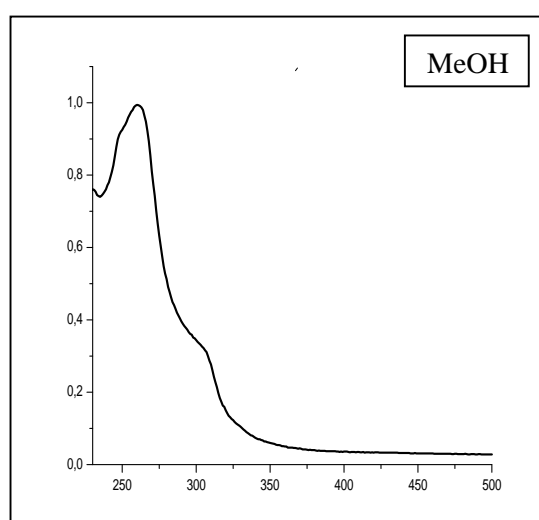
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,45$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 6,82$ ppm et à $\delta = 7,41$ ppm, ($J = 8,5$ Hz), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 9,55$ ppm attribuable à 4'-OH.
- Un doublet dédoublé ($J = 8,8$ ppm; $J = 2,2$ ppm), indicateur d'un couplage méta et d'un couplage ortho à $\delta = 7,15$ ppm attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,2$ Hz), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,25$ ppm attribuable à H-8.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 8,8$ ppm), indicateur d'un couplage ortho à $\delta = 8,05$ ppm attribuable à H-5.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 6,4$ Hz), caractérisant le proton anomérique d'un glucose à $\delta = 5,10$ ppm.

Les données relatives à la spectroscopie RMN¹H sont rassemblées dans le **Tableau-4-**

Résultats et Discussion

Tableau-5-: Données de la série spectrale UV du composé B₃

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	306	261
+NaOAc	306	261
+NaOAc+H ₃ BO ₃	306	261
+AlCl ₃	305	261
+AlCl ₃ +HCl	305	261



Spectre N°5: Série spectrale UV du produit B₃

Résultats et Discussion

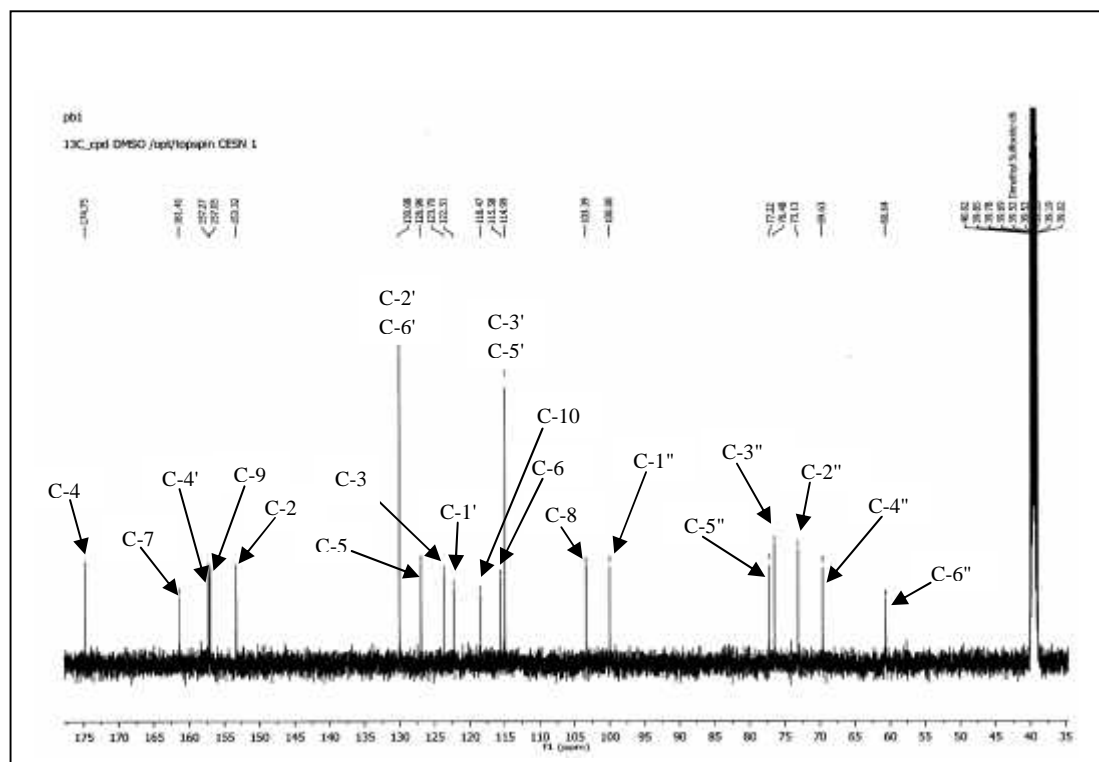
Le spectre RMN¹³C (**Spectre N°6**) et le spectre DEPT 135 (**Spectre N°7**) confirme les données des analyses précédentes: en effet le spectre RMN¹³C donne 21 atomes de carbones dont six signaux résonants à 100 ppm; 73,1 ppm; 76,4 ppm; 69,6 ppm; 77,2 ppm; 60,6 ppm. Selon la littérature, ces déplacements chimiques sont caractéristiques des carbones osidiques C-1", C-2", C-3", C-4", C-5" et C-6" d'un *O*-glucose [1].

Les données relatives à la RMN¹³C de ce composé sont reportées dans le **Tableau-6-**.

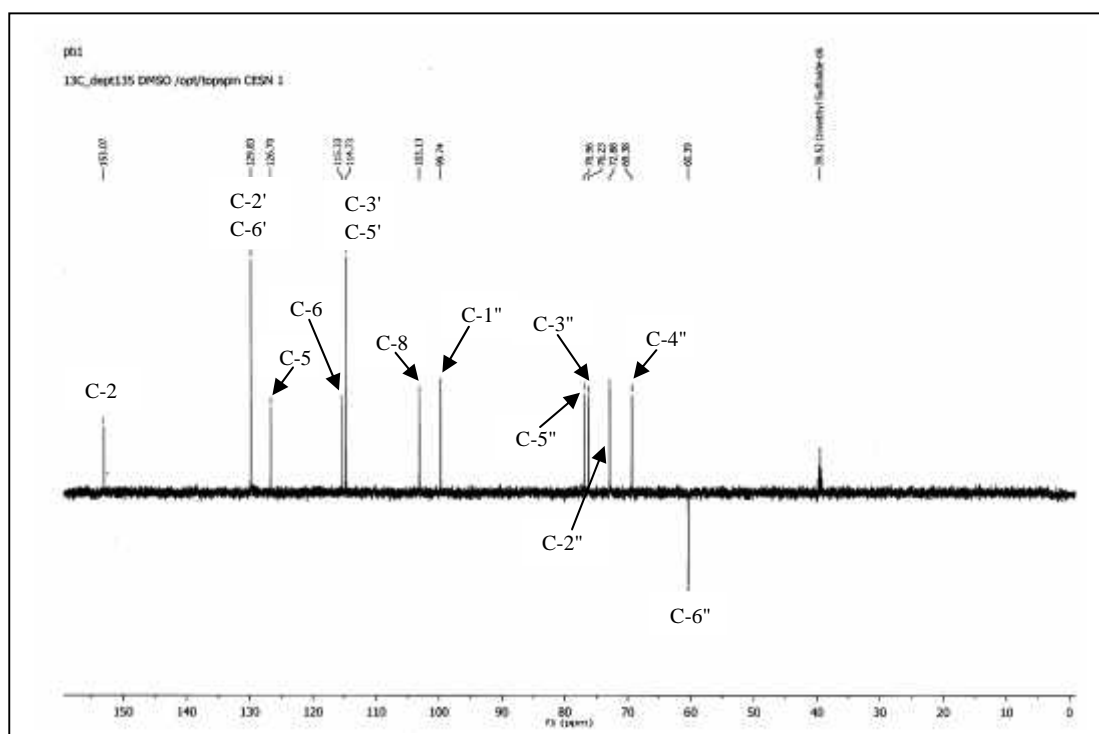
Tableau-6-: Données de la spectroscopie RMN¹³C du composé B₃

Déplacement chimique (ppm)	Attribution
153,3	C-2
123,7	C-3
174,7	C-4
126,9	C-5
115,5	C-6
161,4	C-7
103,3	C-8
157,0	C-9
118,4	C-10
122,3	C-1'
130,0	C-2' ; C-6'
114,9	C-3' ; C-5'
157,2	C-4'
100,0	C-1"
73,1	C-2"
76,4	C-3"
69,6	C-4"
77,2	C-5"
60,6	C-6"

Résultats et Discussion



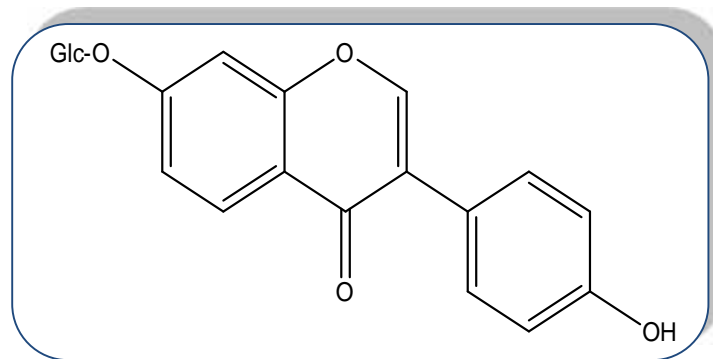
Spectre N°6: RMN¹³C (250 MHz, DMSO) du produit B₃



Spectre N° 7: DEPT 135 (250 MHz, DMSO) du produit B₃

Résultats et Discussion

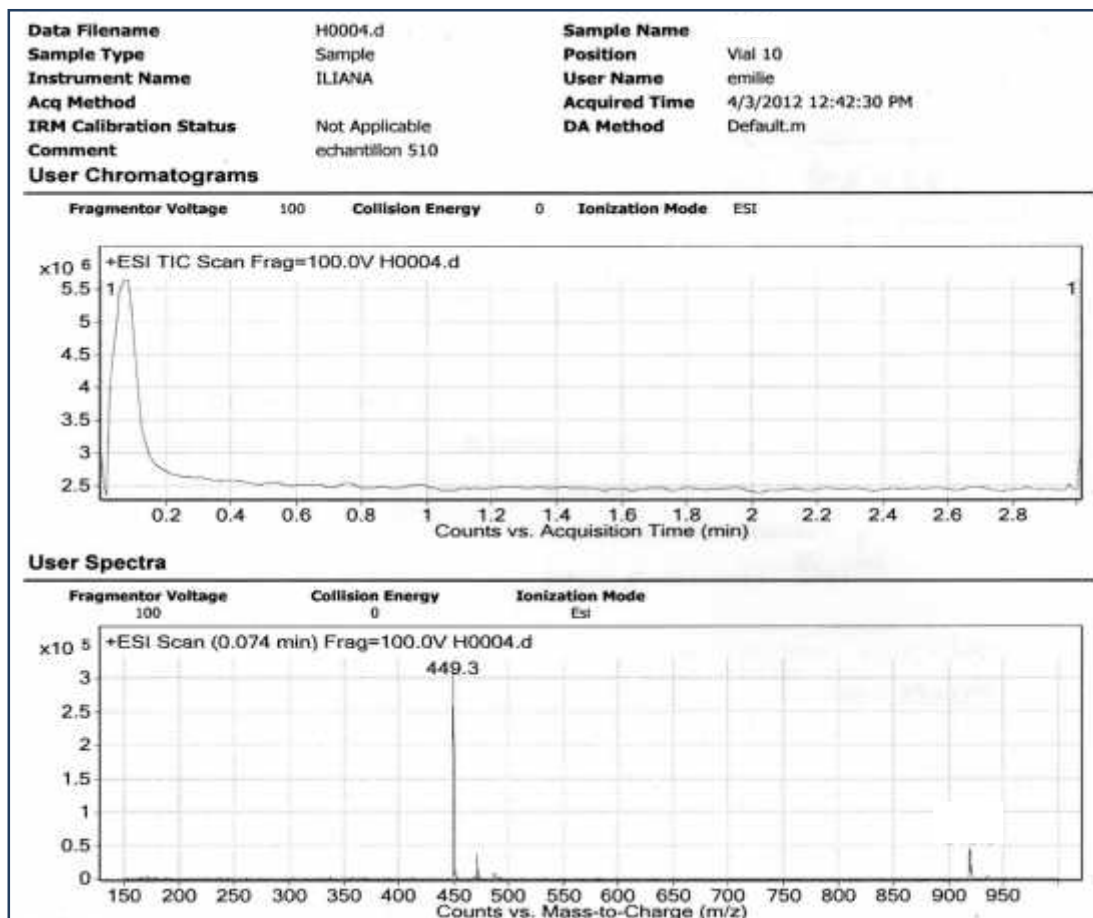
L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous permis de déduire la structure du composé B₃. Il s'agit de la **daidzein 7-O-glucoside (Daidzine)** [1-2].



Daidzein 7-O-glucoside (Daidzine)

I.3. Le composé B₄

Le spectre de masse enregistré en mode Electrspray (**Spectre N°8**) montre un pic pseudomoléculaire à $m/z = 449$ $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute C₂₁H₂₀O₁₁.



Spectre N° 8: Spectre de masse du produit B₄

Résultats et Discussion

L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre N°9; N°9 bis**) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier par:

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,48$ ppm attribuable à H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,68$ ppm attribuable à H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,89$ ppm ($J = 8,1$ Hz) indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,42$ ppm ($J = 2,2$ Hz), indicateur d'un couplage méta attribuable à H-2'.
- Un doublet dédoublé ($J = 8,1$ Hz; $J = 2,2$ Hz), indicateur d'un couplage méta et d'un couplage ortho à $\delta = 7,45$ ppm attribuable à H-6'.

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en position 3' et 4'.

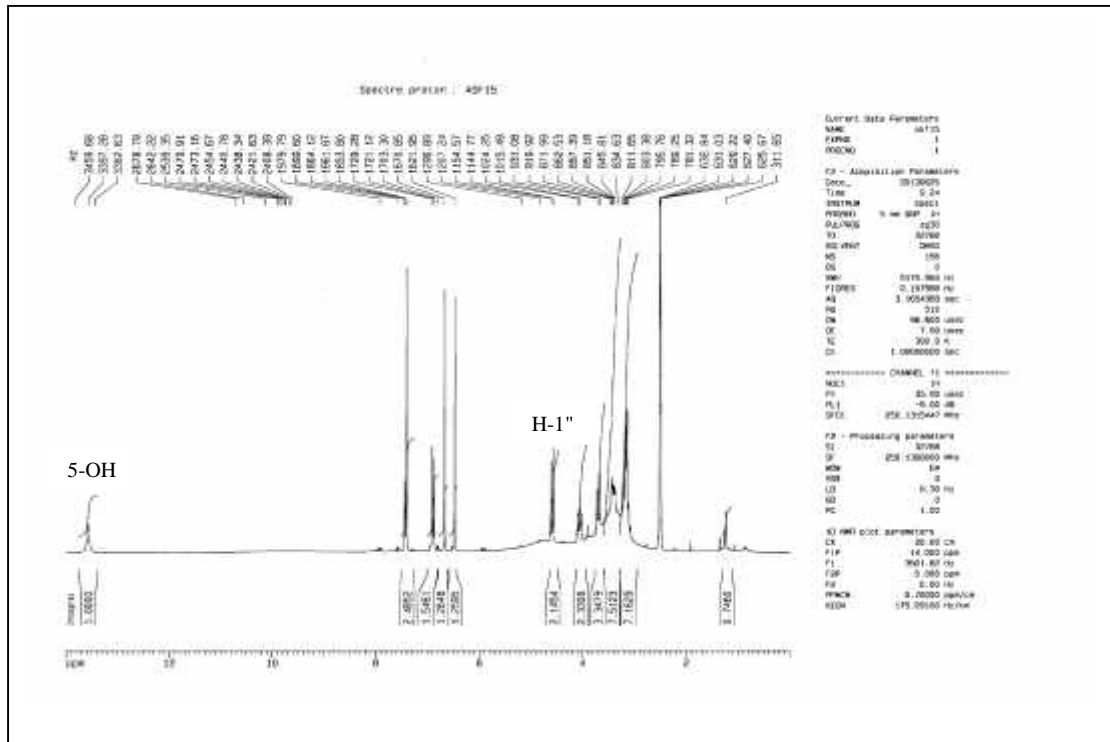
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 9,8$ Hz) à $\delta = 4,59$ ppm caractérisant le proton anomérique d'un glucose.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 13,55$ ppm attribuable à 5-OH.

Les données relatives à la RMN¹H de ce composé sont dans le **Tableau-7-**.

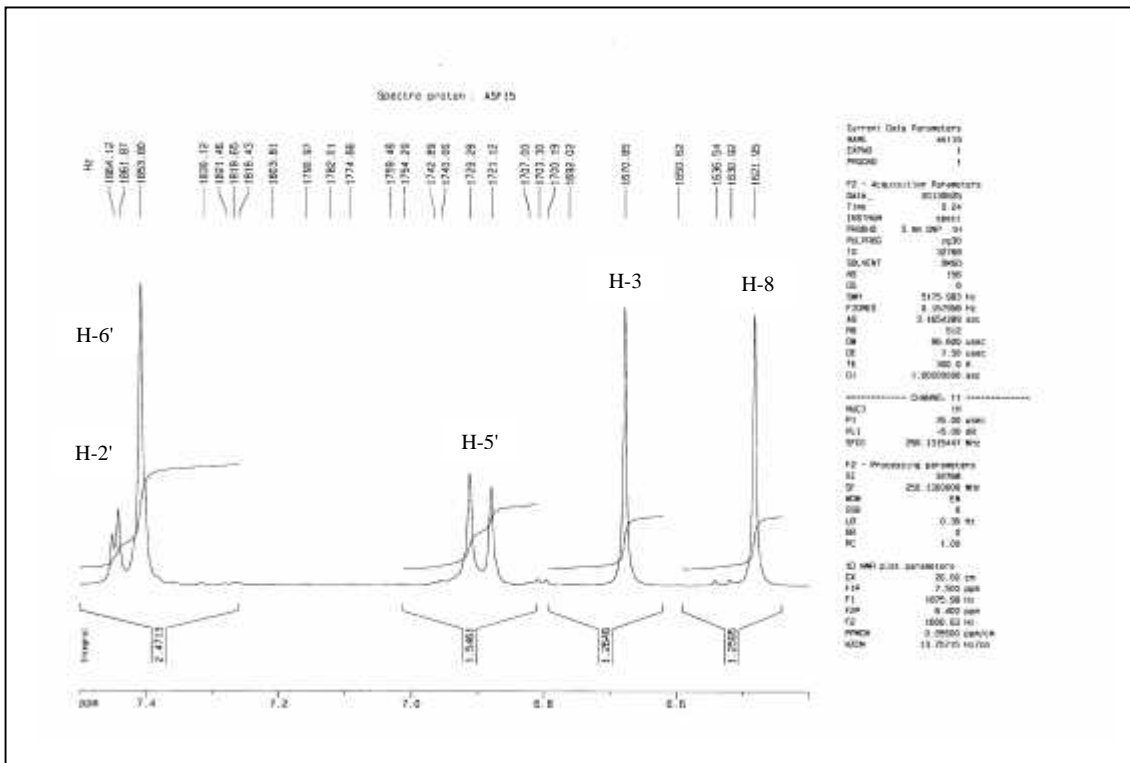
Tableau-7-: Données de la spectroscopie RMN¹H du composé B₄

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
13,55	1H	s	5-OH
7,45	1H	dd(8,1-2,2)	H-6'
7,42	1H	d(2,2)	H-2'
6,89	1H	d(8,1)	H-5'
6,68	1H	s	H-3
6,48	1H	s	H-8
4,59	1H	d(9,8)	H-1''

Résultats et Discussion



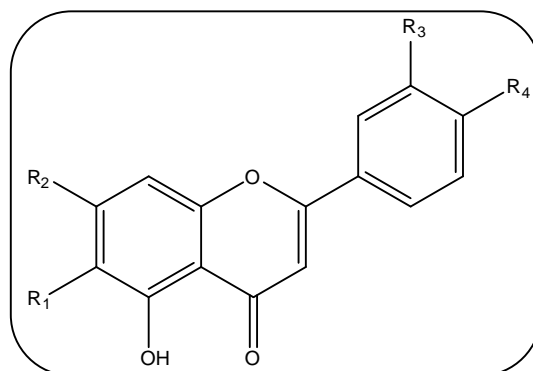
Spectre N° 9: RMN¹H (250 MHz, DMSO) du produit B₄



Spectre N°9 bis: Etalement du spectre N°9 dans la zone 6-8 ppm

Résultats et Discussion

Les données de la RMN¹H permettent de proposer la structure suivante.



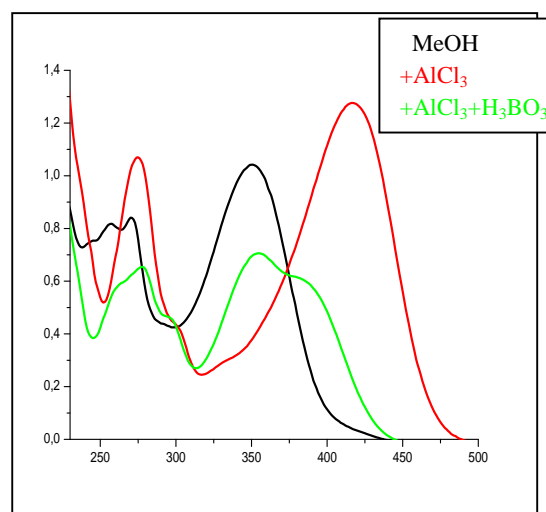
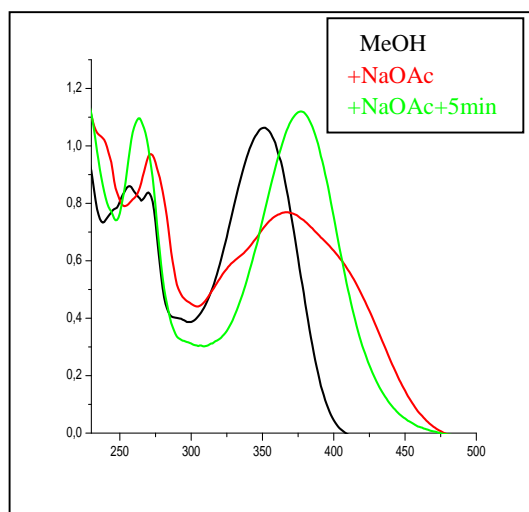
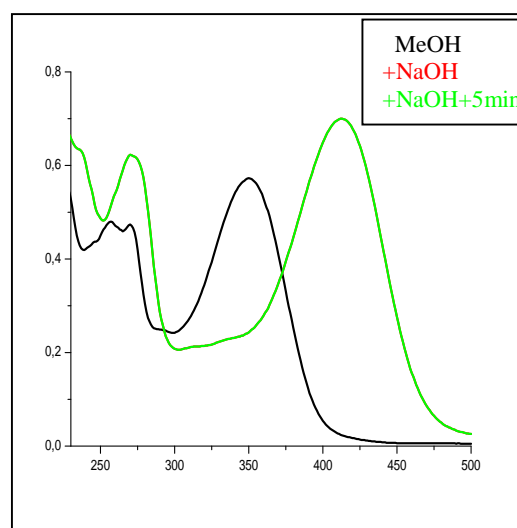
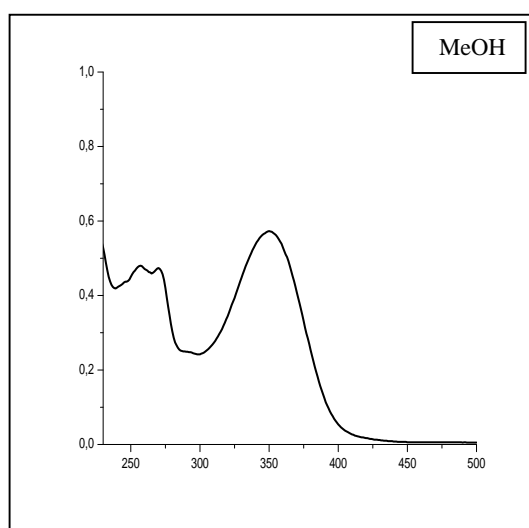
Cette structure flavonique est confirmée d'une part par une fluorescence violette sous lumière de wood et d'autre part par l'étude de la série spectrale UV (**Tableau-8-**, **Spectre N°10**) dont on peut tirer les indications suivantes:

- Le spectre enregistré dans le MeOH montre deux bande d'absorption, une bande II à 270 nm et une bande I à 350 nm confirmant la structure d'une flavone.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +62$ nm) avec le maintien de la même intensité de l'absorbance prouve qu'il existe un groupe (-OH) en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 334 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre pris dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7 ($\lambda = +2$ nm).
- Le déplacement hypsochromique de la bande I dans AlCl₃+HCl par rapport au spectre AlCl₃ ($\lambda = -35$ nm) et l'effet bathochrome de la même bande dans NaOAc+H₃BO₃ par rapport au méthanol ($\lambda = +17$ nm) confirment la présence d'un système ortho diOH sur le noyau B.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +32$ nm) enregistré après addition de AlCl₃ comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un (-OH) libre en position 5.

Résultats et Discussion

Tableau-8-: Données de la série spectrale UV du composé B₄

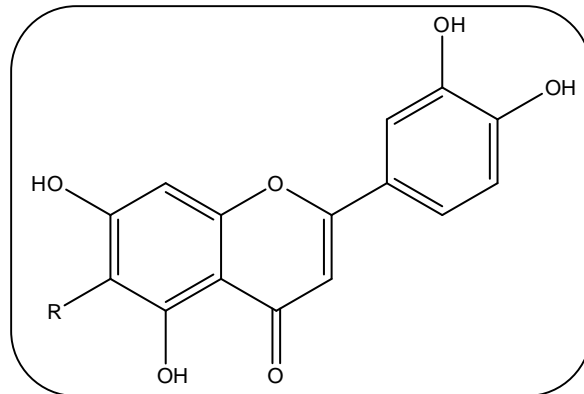
Réactifs	Bande I(nm)	Bande II(nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	350	270	-
+NaOH	412	270	334
+NaOH+5min	412	270	334
+AlCl ₃	417	275	-
+AlCl ₃ +HCl	382	278	355
+NaOAc	367	272	397
+NaOAc+H ₃ BO ₃	377	264	-



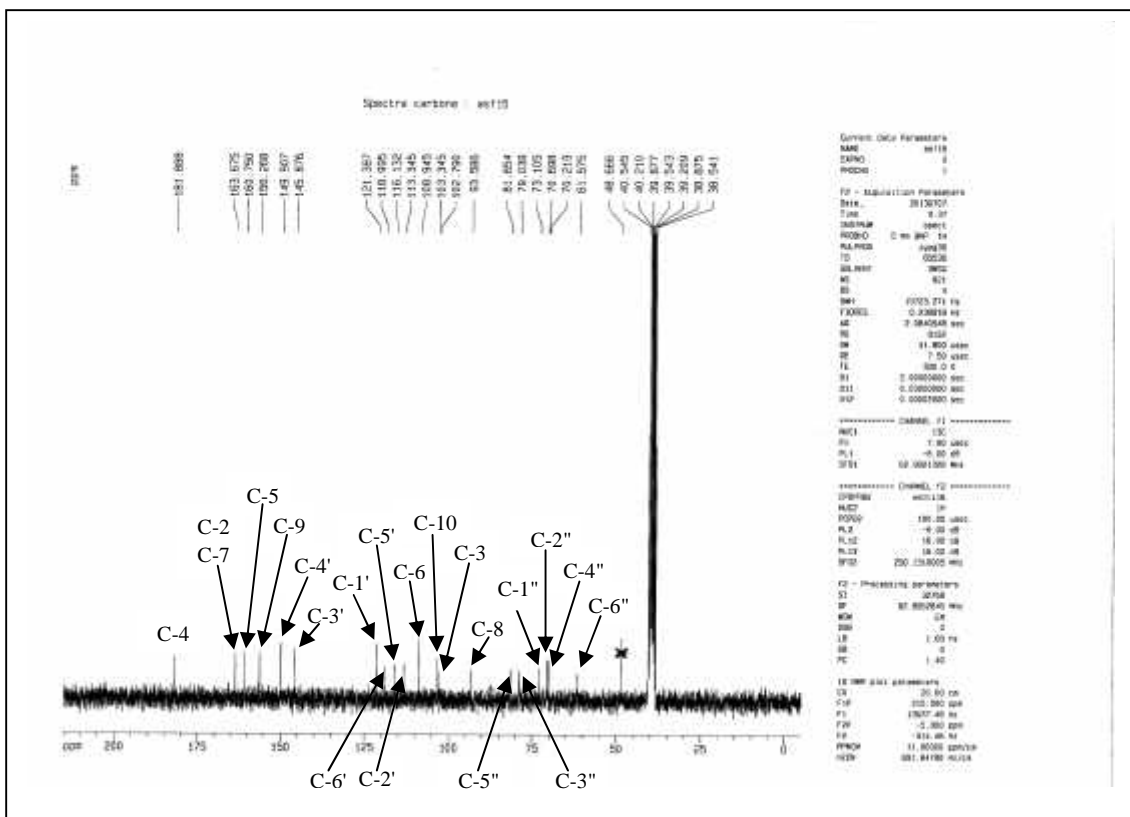
Spectre N°10: Série spectrale UV du produit B₄

Résultats et Discussion

Les données de la RMN¹H et celles de la série spectrale UV permette de proposer la structure suivante:



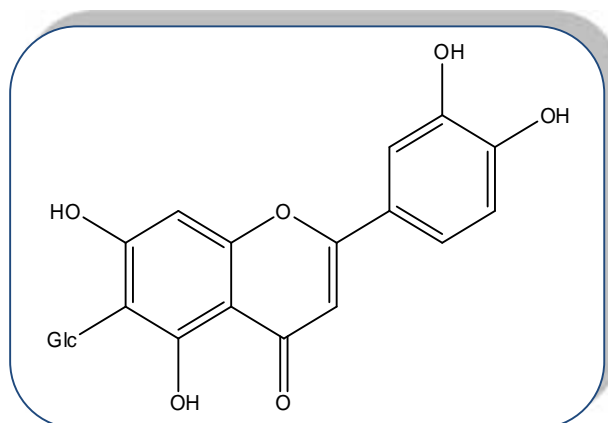
Le spectre RMN¹³C (**Spectre N°11**) donne 21 atomes de carbones dont six signaux résonants à 61,5 ppm; 70,2 ppm; 70,6 ppm; 73,1 ppm; 79,0 ppm; 81,6 ppm. Selon la littérature, ces déplacement chimiques correspond aux carbones C-6'', C-4'', C-2'', C-1'', C-3'', C-5'' d'un C-glucoside [3].



Spectre N° 11: RMN¹³C (125 MHz, DMSO) du produit B₄

Résultats et Discussion

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé B₄. Il s'agit du **Luteoline 6-C-glucoside (Isoorientine)** [3, 4, 5].



Luteoline 6-C-glucoside (Isoorientine)

II. Détermination structural de produits isolés de l'espèce *C. dimorpha*

II.1. Le composé D₁

L'étude du spectre RMN¹H (**Spectre N°12**) montre la présence des signaux caractéristique d'un flavonoïde de type flavone reconnaissable par:

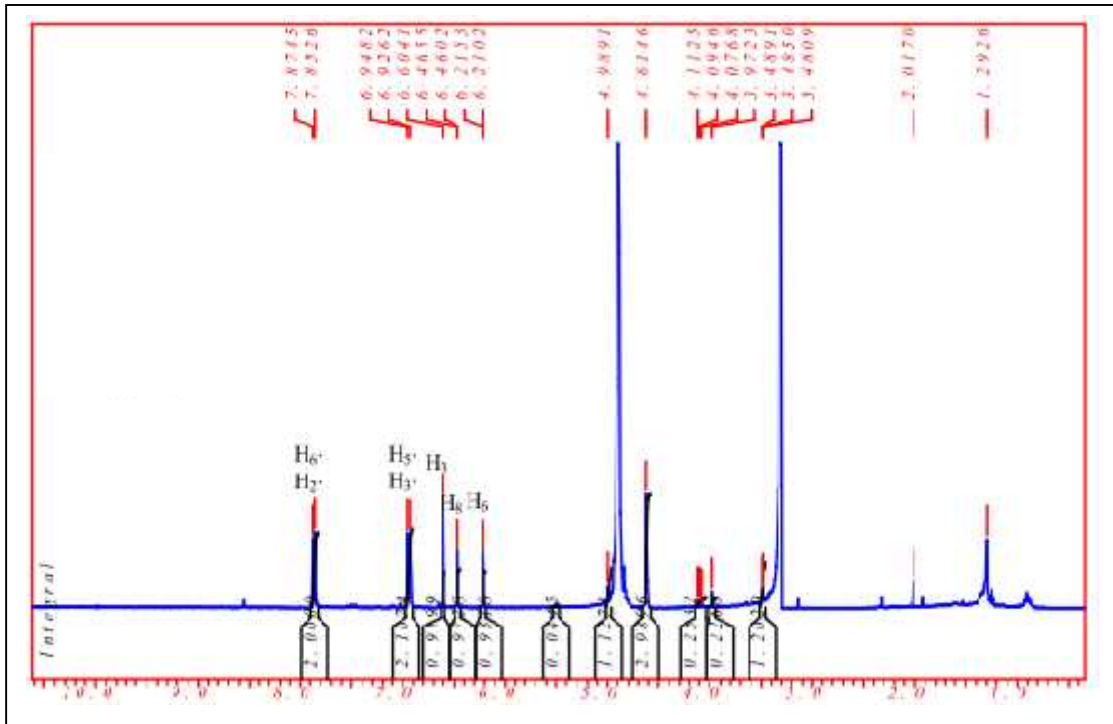
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,60$ ppm attribuable à H-3.
- Deux doublet d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,46$ ppm, le second à $\delta = 6,21$ ppm de couplage $J = 2,1$ Hz (couplage meta) attribuable à H-8 et H-6 respectivement indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7.
- Deux doublet d'intégration 2H chacun, à $\delta = 6,93$ ppm et à $\delta = 7,86$ ppm, ($J = 8,8$ Hz), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.

L'ensemble de ces données est reporté dans le **Tableau-9-**.

Tableau-9- : Données de la spectroscopie RMN¹H du composé D₁

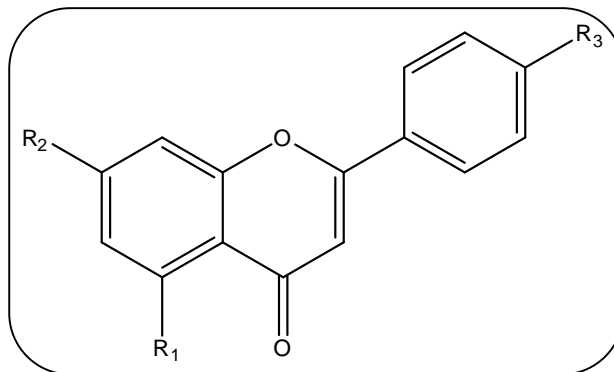
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
7,86	2H	d(8,8)	H-2', H-6'
6,93	2H	d(8,8)	H-3', H-5'
6,60	1H	s	H-3
6,46	1H	d(2,1)	H-8
6,21	1H	d(2,1)	H-6

Résultats et Discussion



Spectre N°12 : RMN ^1H (400 MHz, CD_3DO) du produit D_1

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante:



Cette structure flavono que est confirmée par la fluorescence violette sous lumière de Wood, ainsi que l'étude de la série spectral UV (**Tableau-10-**, **Spectre N°13**), de laquelle on peut tirer les indications suivantes:

- Le maximum d'absorption de la bande I à 336 nm du spectre enregistré dans le méthanol indiquant qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +63$ nm) indique la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm est révélateur de la présence d'un OH libre en position 7.

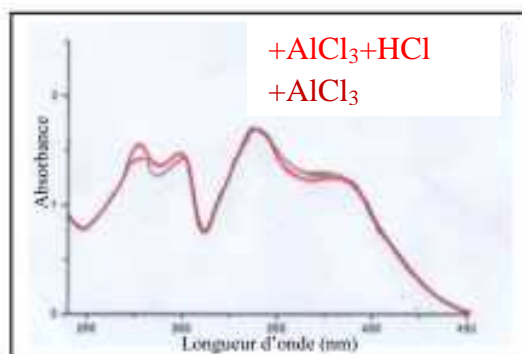
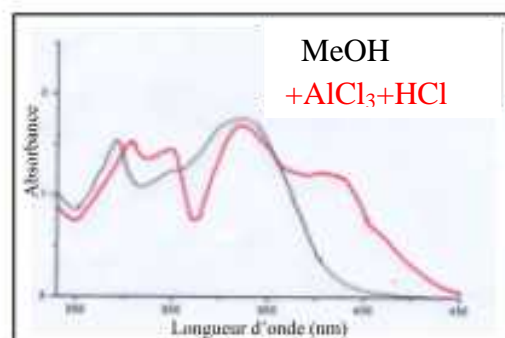
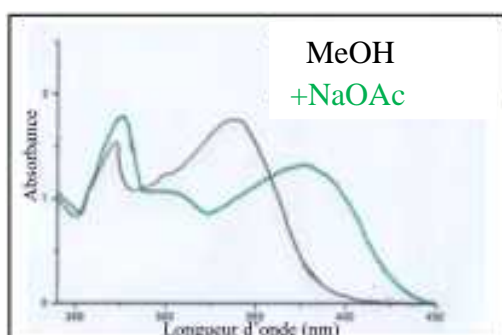
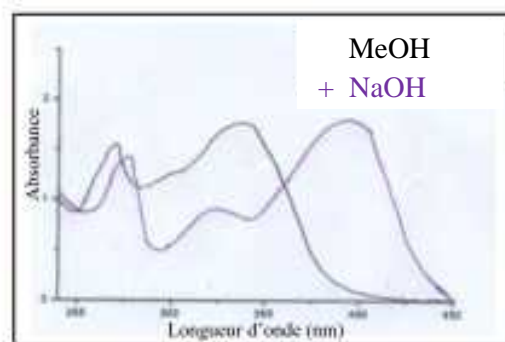
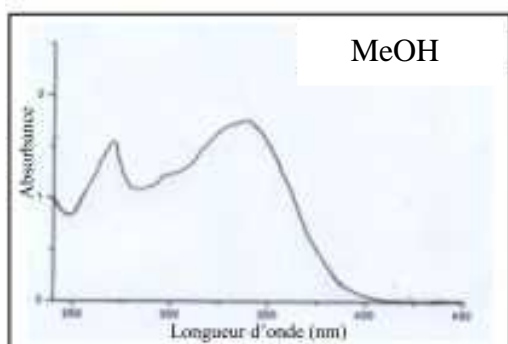
Résultats et Discussion

- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrom de la bande II ($\lambda_{max} = +6$ nm) par rapport au spectre du MeOH confirme la présence d'un OH libre en position 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl_3+HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\lambda_{max} = +45$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl_3+HCl et AlCl_3 , indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di OH sur le cycle B.

Tableau-10- : Données de la série spectrale UV du composé D₁

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	336	269	-
NaOH	399	275	325
AlCl_3	381	276	301-341
AlCl_3+HCl	381	277	300-339
NaOAc	371	275	301

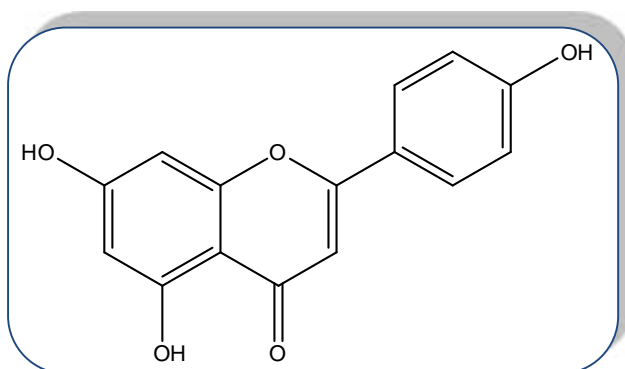
Résultats et Discussion



Spectre N°13 : série spectrale UV du produit D₁

Résultats et Discussion

L'ensemble des données RMN¹H et UV, laisse proposer la structure suivante:



5,7,4'-trihydroxyflavone (Apigénine)

I.2. Le composé D₂

L'étude du spectre RMN¹H (**Spectre N°14**) montre la présence de signaux caractéristique d'un flavonoïde de type flavone reconnaissable par:

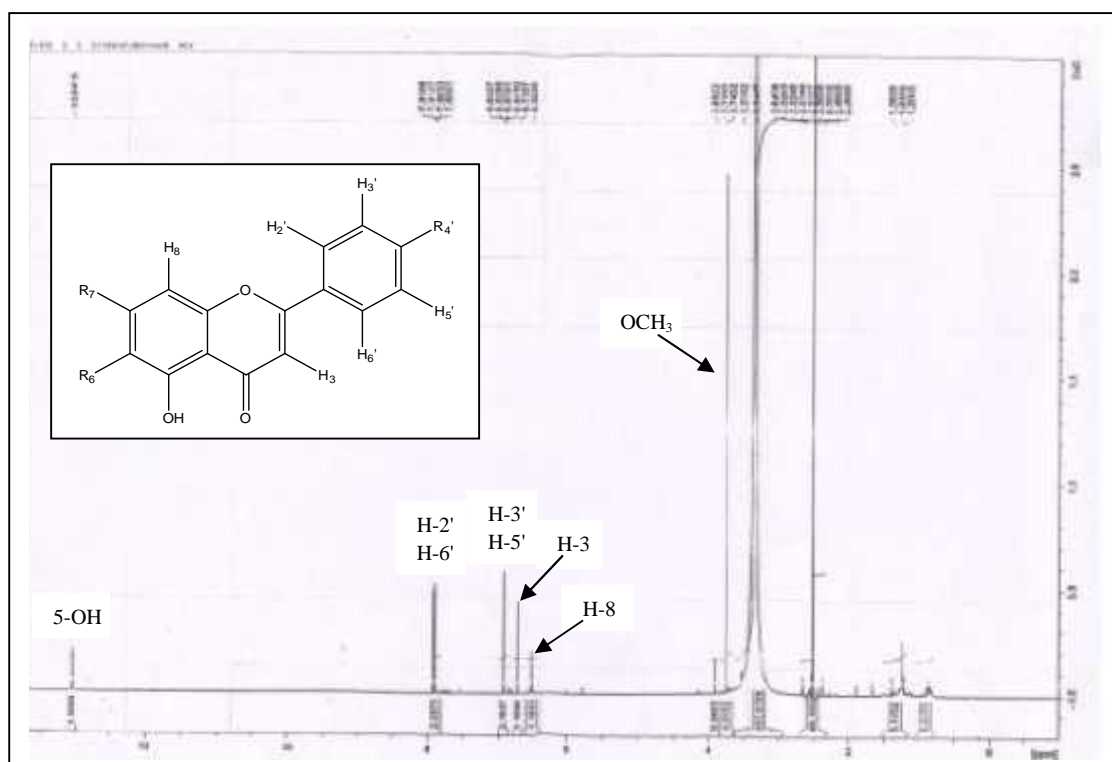
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,84$ ppm attribuable à H-3.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,78$ ppm attribuable à H-8.
- Deux doublet d'intégration 2H chacun, à $\delta = 6,91$ ppm et $\delta = 7,91$ ppm, ($J = 7,08$ Hz), attribuable à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 2,52$ ppm montrant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 13,04$ ppm attribuable à 5-OH.

Le **Tableau-11-** présente tous ces résultats.

Tableau-11-: Données de la spectroscopie RMN¹H du composé D₂

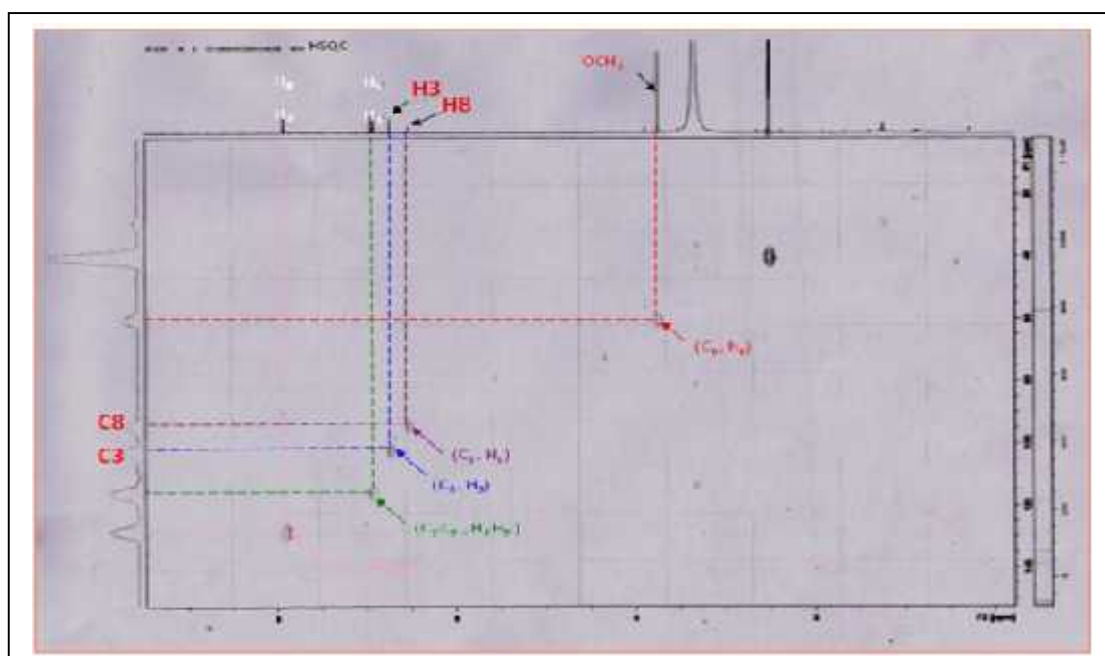
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
13,04	1H	s	5-OH
7,90	2H	d(7,08)	H-2', H-6'
6,91	2H	d(7,08)	H-3', H-5'
6,84	1H	s	H-3
6,78	1H	s	H-8
2,52	3H	s	-OCH ₃

Résultats et Discussion



Spectre N°14 : RMN¹H (400 MHz, DMSO) du produit D₂

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



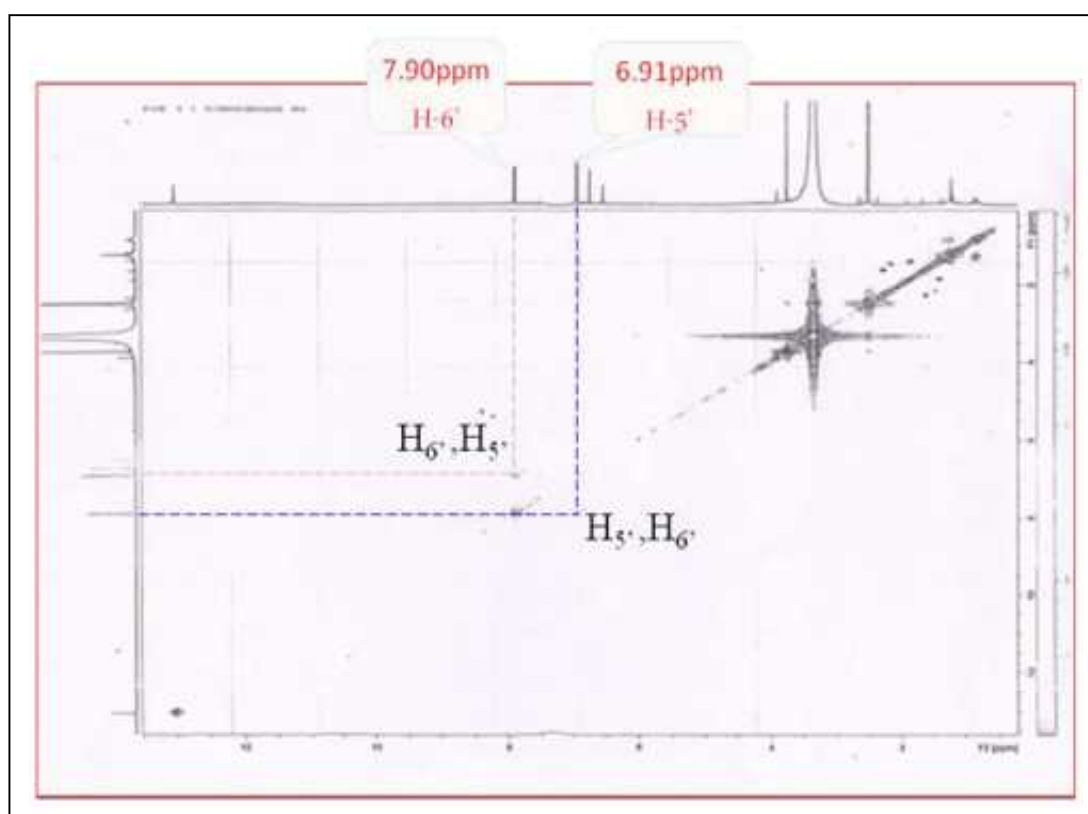
Spectre N°15 : HSQC (400 MHz, DMSO) du produit D₂

Résultats et Discussion

Le spectre HSQC (**Spectre N°15**) montre que l'atome de carbone C-8 qui a un déplacement chimique caractéristique (95,6 ppm), est relié directement au proton H-8 le quel son déplacement chimique est de 6,78 ppm, et que l'atome de carbone C-3 qui a un déplacement chimique caractéristique (104,3 ppm), est relié directement au proton H-3 qui a comme déplacement chimique la valeur 6,84 ppm.

Les autres corrélations obtenues dans le spectre HSQC correspond exactement à leurs atomes de carbones mentionnés dans le spectre RMN¹H.

Le spectre COSY (**Spectre N°16**) montre une tache de corrélation entre H-5',H-3' et H-6',H-2' confirme la substitution de la position 4'.



Spectre N°16 : COSY (400 MHz,DMSO) du produit D₂

Résultats et Discussion

Par ailleurs, la fluorescence violette sous lumière de Wood, plus la valeur maximale de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 338 nm confirmant la structure d'une flavone (**Spectre N°17**).

L'addition du réactif NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I (= +62 nm) sans diminution de l'intensité prouve la présence d'un groupement OH libre en position 4', d'un autre coté, l'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm montre la présence d'un OH libre en 7.

Il n'y a pas de déplacement de la bande I après comparaison des deux spectres : AlCl_3 et AlCl_3+HCl , indique l'absence du groupement ortho di-OH sur le cycle B.

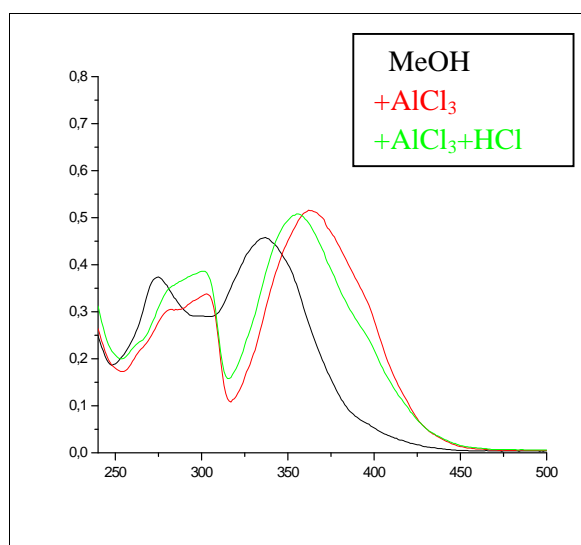
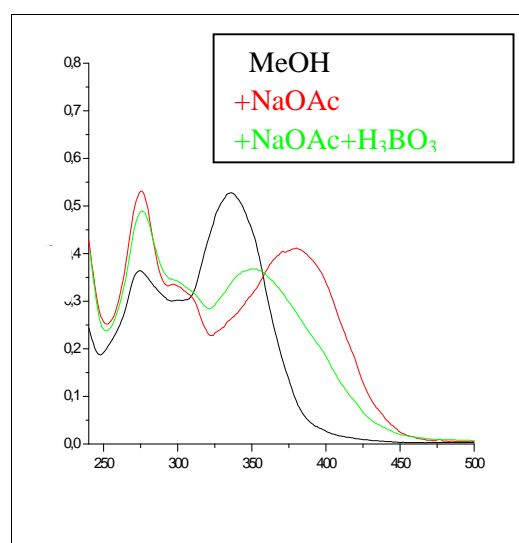
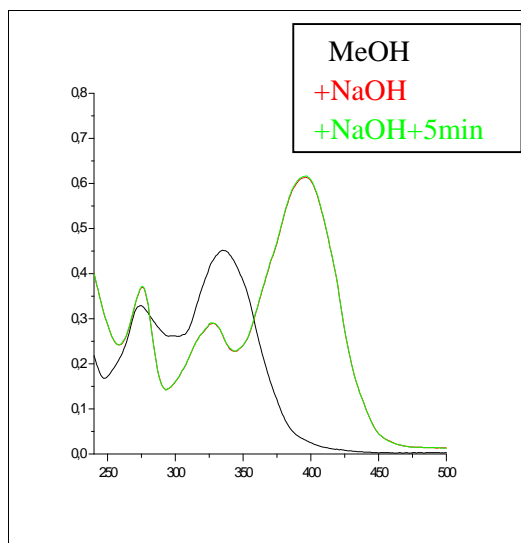
Le déplacement bathochrome de la bande I (= +19 nm) enregistré après addition de AlCl_3+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 5 avec oxygénation en position 6.

Ces résultats obtenus sont représentés sur le tableau suivant.

Tableau-12- : Données de la série spectrale UV du composé D_2

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	338	275	-
+NaOH	400	275	327
+NaOH+5min	400	275	327
+ AlCl_3	368	284	-
+ AlCl_3+HCl	357	284	-
+NaOAc	380	277	-
+NaOAc+ H_3BO_3	350	275	-

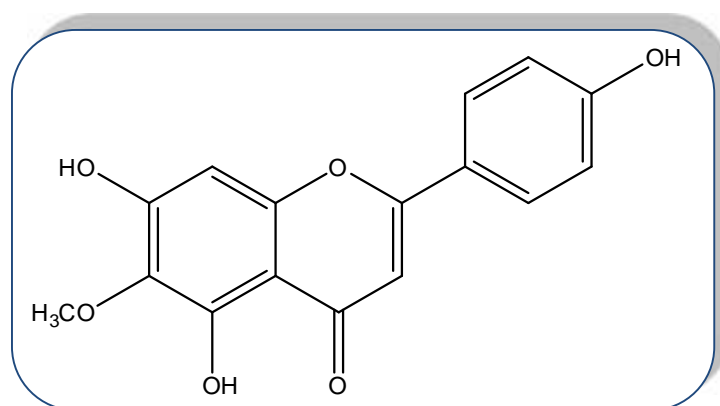
Résultats et Discussion



Spectre N°17 : Série spectrale UV du produit D₂

Résultats et Discussion

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé D₂. Il s'agit du **5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone** connu sous le nom de **Hispiduline**.



5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (Hispiduline)

I.3. Le composé C₁

L'étude du spectre RMN¹H (**Spectre N°18, N°18 bis**) montre la présence des signaux caractéristique d'une flavonoïde de type flavone reconnaissable par:

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,43$ ppm attribuable à H-6.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,85$ ppm attribuable à H-8.

La présence de ces deux signaux est en faveur d'un cycle A substitué en position 5 et 7.

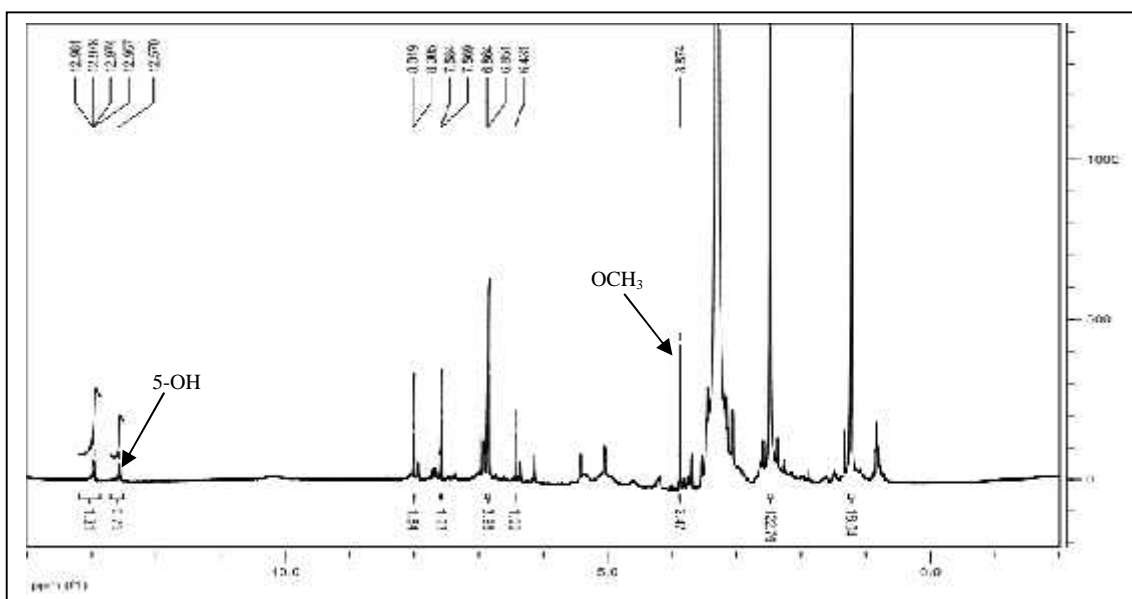
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,86$ ppm attribuable à H-3.
- Deux doublet d'intégration 2H chacun, à $\delta = 7,57$ ppm et $\delta = 8,01$ ppm ($J = 8,4$ Hz), attribuable à H-3',H-5' et H-2',H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 12,57$ ppm attribuable à 5-OH.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,87$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

L'ensemble de ces données est reporté dans le **Tableau-13**.

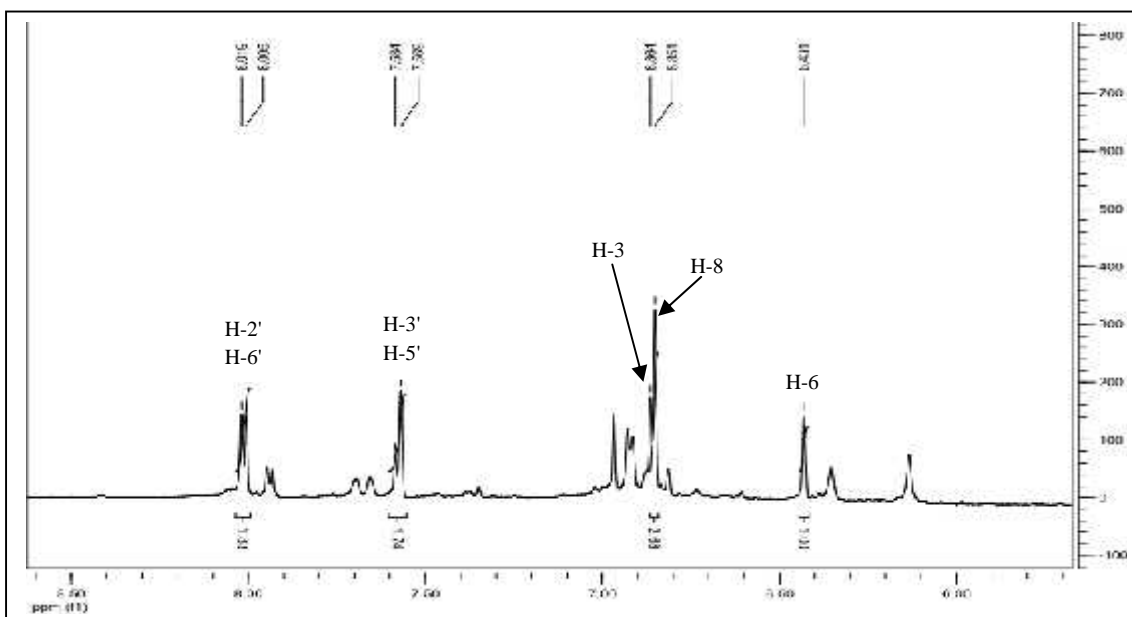
Résultats et Discussion

Tableau-13-: Données de la spectroscopie RMN¹H du composé C₁

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
12,57	1H	s	5-OH
8,01	2H	d (8,4)	H-2',H-6'
7,57	2H	d (8,4)	H-3',H-5'
6,86	1H	s	H-3
6,85	1H	s	H-8
6,43	1H	s	H-6
3,87	3H	s	OCH ₃



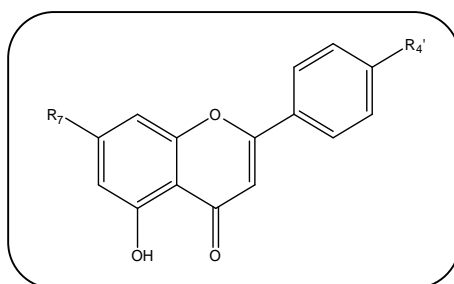
Spectre N°18 : RMN¹H (600 MHz, DMSO) du produit C₁



Spectre N°18 bis: Etalement du spectre N°18 dans la zone 6,00-8,50 ppm

Résultats et Discussion

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante:



Cette structure flavon que est confirmée par la fluorescence violette sous lumière de Wood, ainsi que l'étude de la série spectrale UV (**Tableau-14-**, **Spectre N°19**), dont on peut tirer les indications suivantes:

- Le maximum d'absorption de la bande I à 342 nm dans le spectre enregistré dans le MeOH indiquant qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +50$ nm) indique la présence d'un OH libre en 4'.
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique l'absence d'un OH libre en position 7.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande I en comparant les spectres NaOAc+H₃BO₃ et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système orthodi-OH sur le noyau B, ceci est confirmé par l'absence du déplacement hypsochrome de la même bande dans AlCl₃+HCl par rapport au AlCl₃.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +51$ nm) enregistré après addition de AlCl₃ comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5.

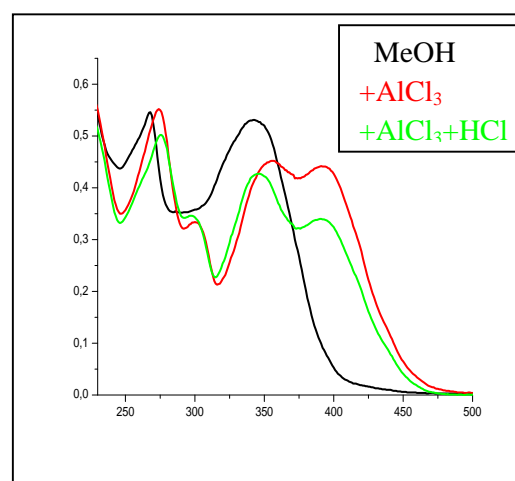
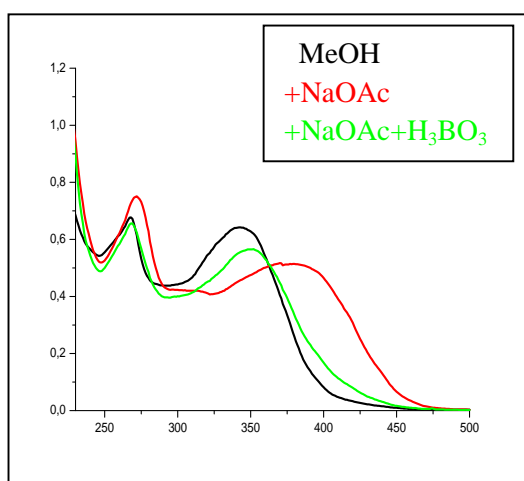
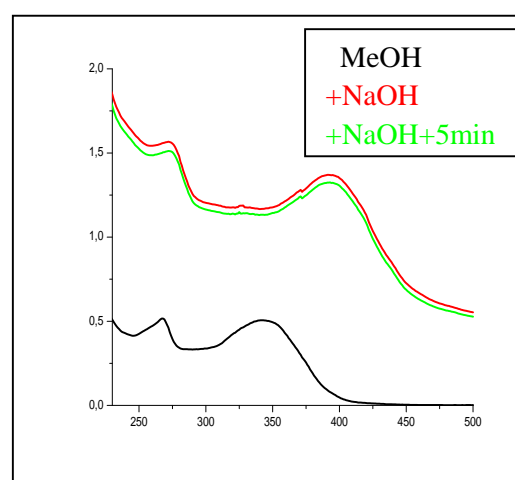
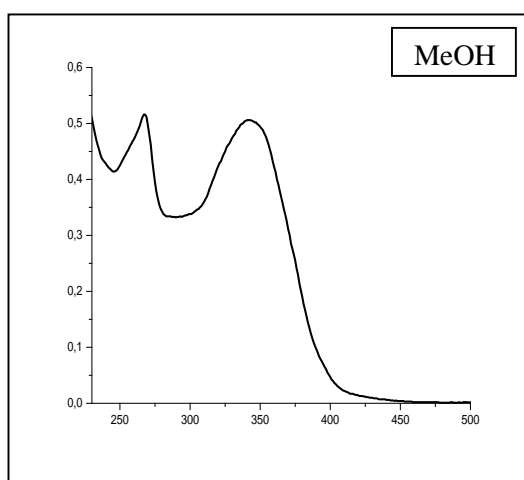
Ces résultats permettent de localiser le groupement méthoxyle en position 7.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau suivant.

Résultats et Discussion

Tableau-14-: Données de la série spectrale UV du produit C₁

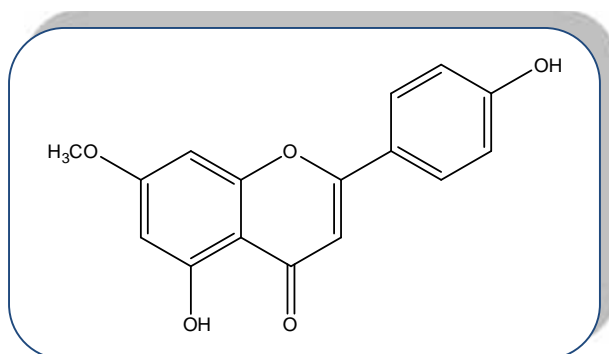
Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	342	269	-
+NaOH	392	272	-
+NaOH+5min	392	272	-
+NaOAc	380	270	-
+NaOAc+H ₃ BO ₃	350	269	-
+AlCl ₃	393	274	300-357
+AlCl ₃ +HCl	390	276	298-347



Spectre N°19 : Série spectrale UV du produit C₁

Résultats et Discussion

L'ensemble des données spectrales RMN¹H et UV nous a conduit à la structure de : **5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (Genkwanine)** [6].



5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (Genkwanine)

II.4. Le composé C₂

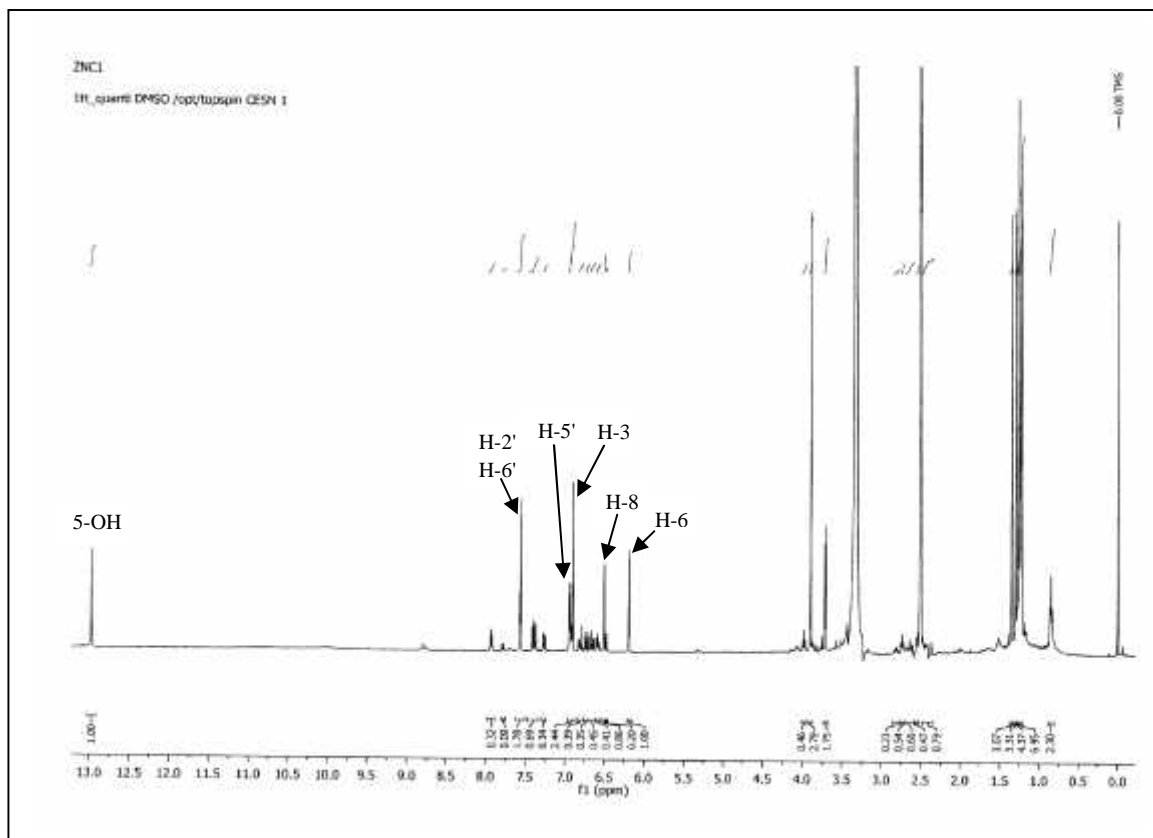
L'étude du spectre RMN¹H (**Spectre N°20, N°20 bis**) montre la présence des signaux caractéristique d'un flavonoïde de type flavone reconnaissable par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,89$ ppm attribuable à H-3.
- Deux doublet d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,18$ ppm, le second à $\delta = 6,50$ ppm avec une constante de couplage $J = 1,9$ Hz (couplage meta) attribuable à H-6 et H-8 respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7. Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à $\delta = 13$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec le carbonyle montre que cette position est hydroxylée.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,93$ ppm ($J = 8,9$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta = 7,56$ ppm attribuable à H-2' et H-6'.

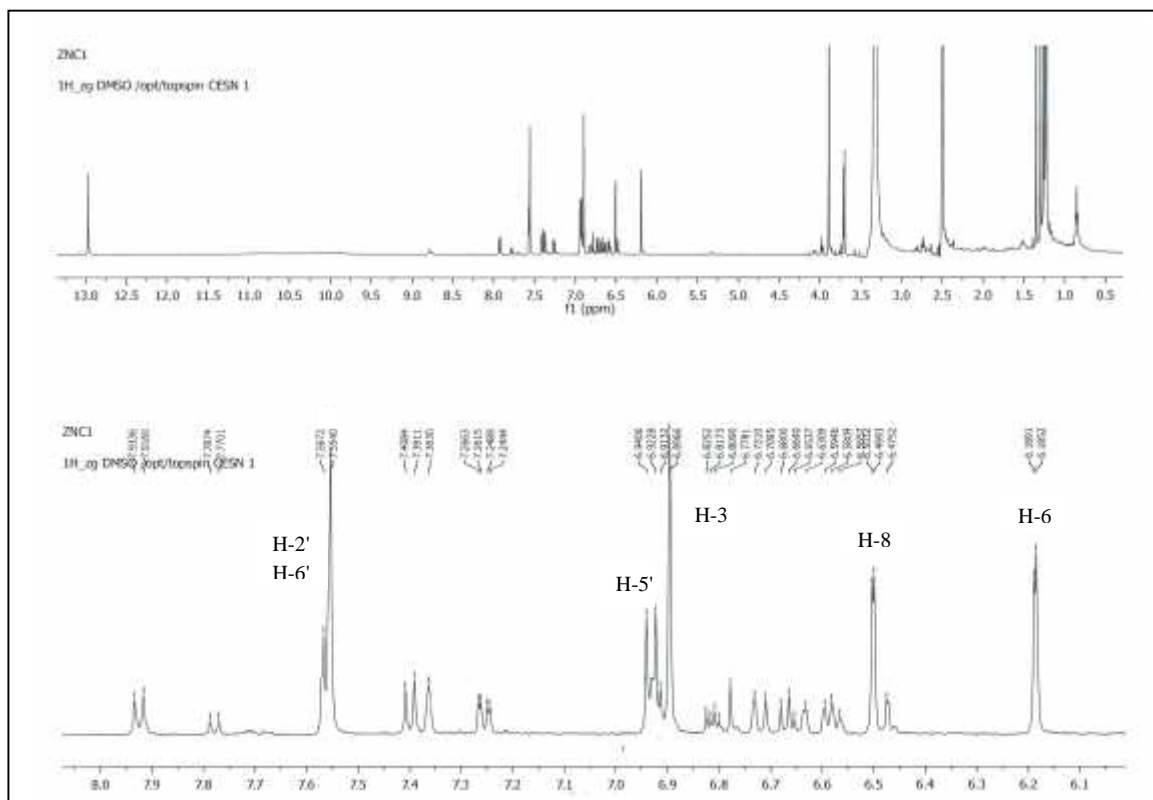
La présence de ces deux derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en position 3' et 4'.

- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,58$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Résultats et Discussion



Spectre N°20 : RMN¹H (500 MHz, DMSO) du produit C₂



Spectre N°20 bis: Etalement du spectre N°20 dans la zone 6,1 – 8,0 ppm

Résultats et Discussion

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N°21**) montre:

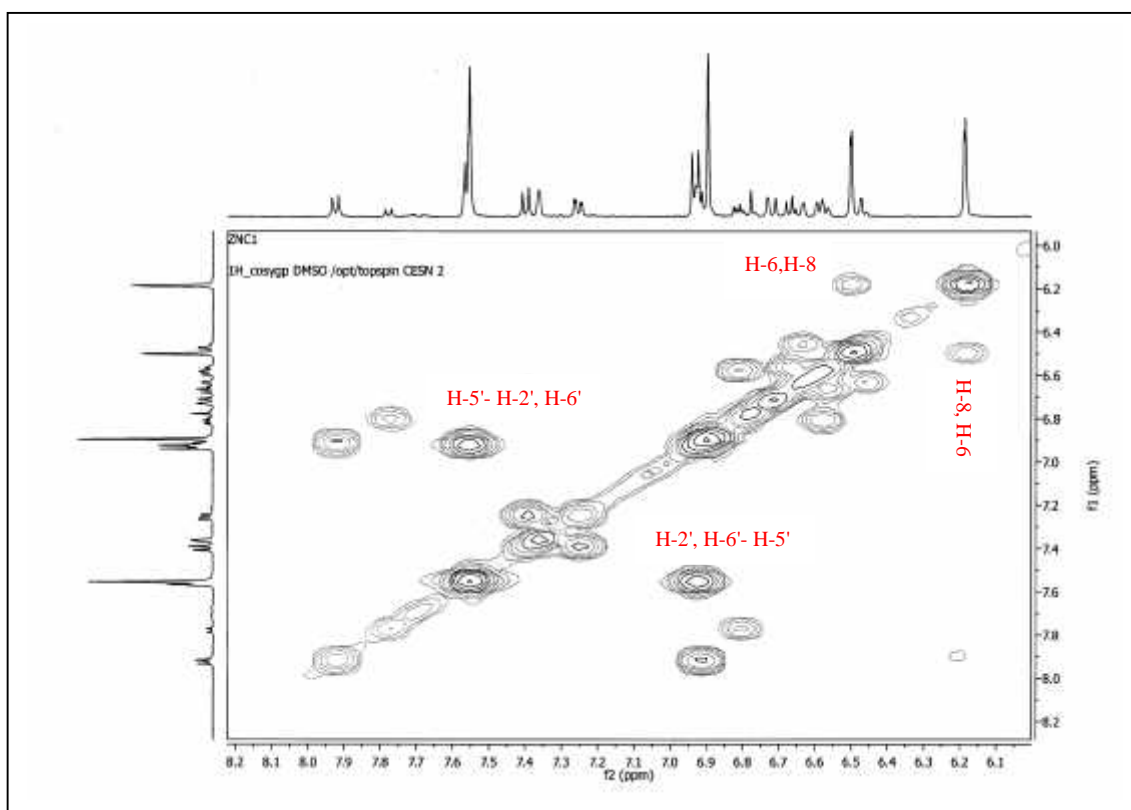
- Une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,56$ ppm et $\delta = 6,93$ ppm confirmant les attributions de H-2',H-6' et H-5' donc une substitution du noyau B en 3' et 4'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et H-8 confirme la substitution des deux positions 5 et 7.

Les données relatives à la RMN¹H ainsi que la COSY sont rassemblées dans le **Tableau-15-**.

Tableau-15-: RMN¹H et COSY du composé C₂

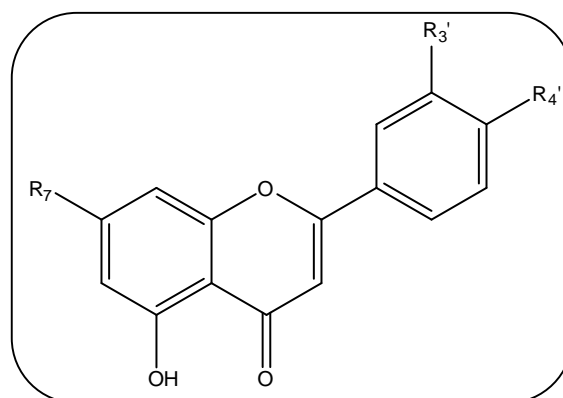
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité <i>J</i> (Hz)	Attribution	COSY
13	1H	s	5-OH	-
7,56	2H	d	H-2', H-6'	5'
6,93	1H	d(8,9)	H-5'	2',6'
6,89	1H	s	H-3	-
6,50	1H	d(1,9)	H-8	6
6,18	1H	d(1,9)	H-6	8
3,58	3H	s	OCH ₃	-

Résultats et Discussion



Spectre N°21 : COSY (500 MHz, DMSO) du produit C₂

Les données de la RMN¹H et la COSY permettent de proposer la structure suivante



Cette structure flavon que est confirmée d'une part par une fluorescence violette sous lumière de Wood et d'autre part par l'étude de la série spectrale UV (**Tableau-16-**, **Spectre N°22**) dont on peut tirer les indications suivantes:

- Le spectre enregistré dans le MeOH montre deux bandes d'absorption, une bande I à 343 nm et une bande II à 269 nm confirmant la structure d'une flavone.

Résultats et Discussion

- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +54$ nm) avec le maintien de la même intensité de l'absorbance prouve qu'il existe un groupe (-OH) en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 330 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\lambda = +6$ nm) par rapport au spectre pris dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +42$ nm) enregistré après addition de AlCl_3+HCl comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 5.
- Pas de déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl_3+HCl et AlCl_3 , ce qui prévoit l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B, ceci est confirmé par l'absence du déplacement bathochrome de la même bande dans $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ par rapport au MeOH.

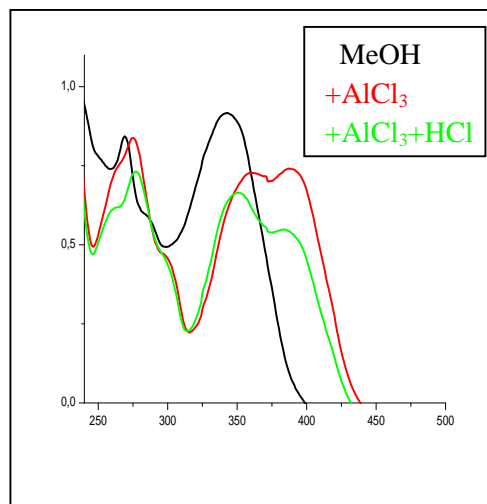
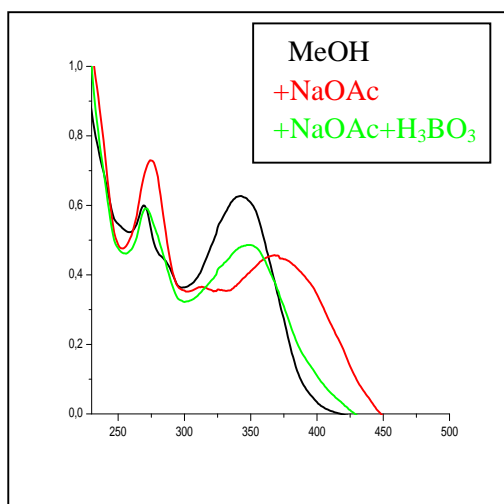
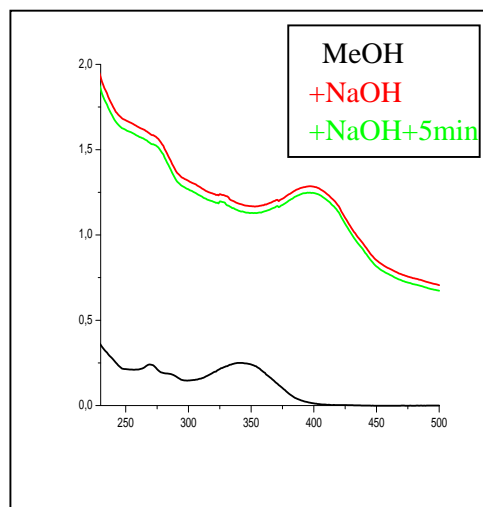
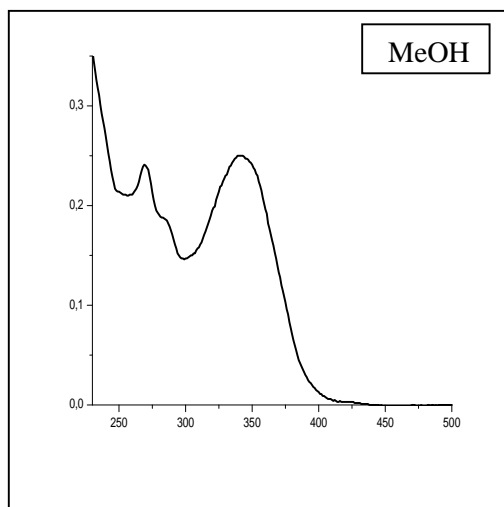
Ces résultats permettent de localiser le groupement méthoxyle en position 3'.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le **Tableau-16-**.

Tableau-16-: Données de la série spectrale UV du composé C_2

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	343	269	285
+NaOH	397	276	330
+NaOH+5min	397	276	330
+ AlCl_3	388	275	298-360
+ AlCl_3+HCl	385	277	350
+NaOAc	366	275	314
+ $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$	347	270	-

Résultats et Discussion



Spectre N°22 : Série spectrale UV du produit C₂

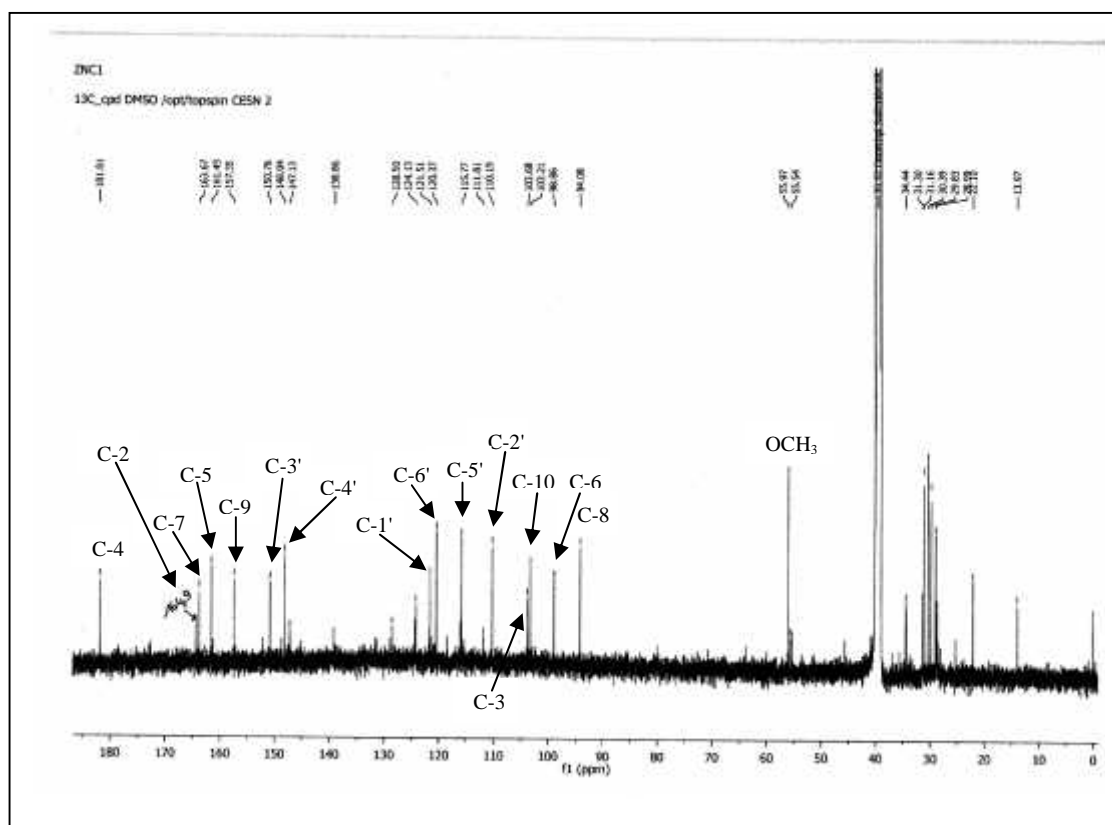
Résultats et Discussion

Le spectre RMN¹³C (**Spectre N°23**) et le spectre HSQC (**Spectre N°24**) confirment les données des analyses précédentes: en effet le spectre HSQC montre les différentes corrélations entre chaque proton mentionné dans le spectre RMN¹H et son atome de carbone. L'ensemble de ces données sont mentionnés sur le tableau suivant.

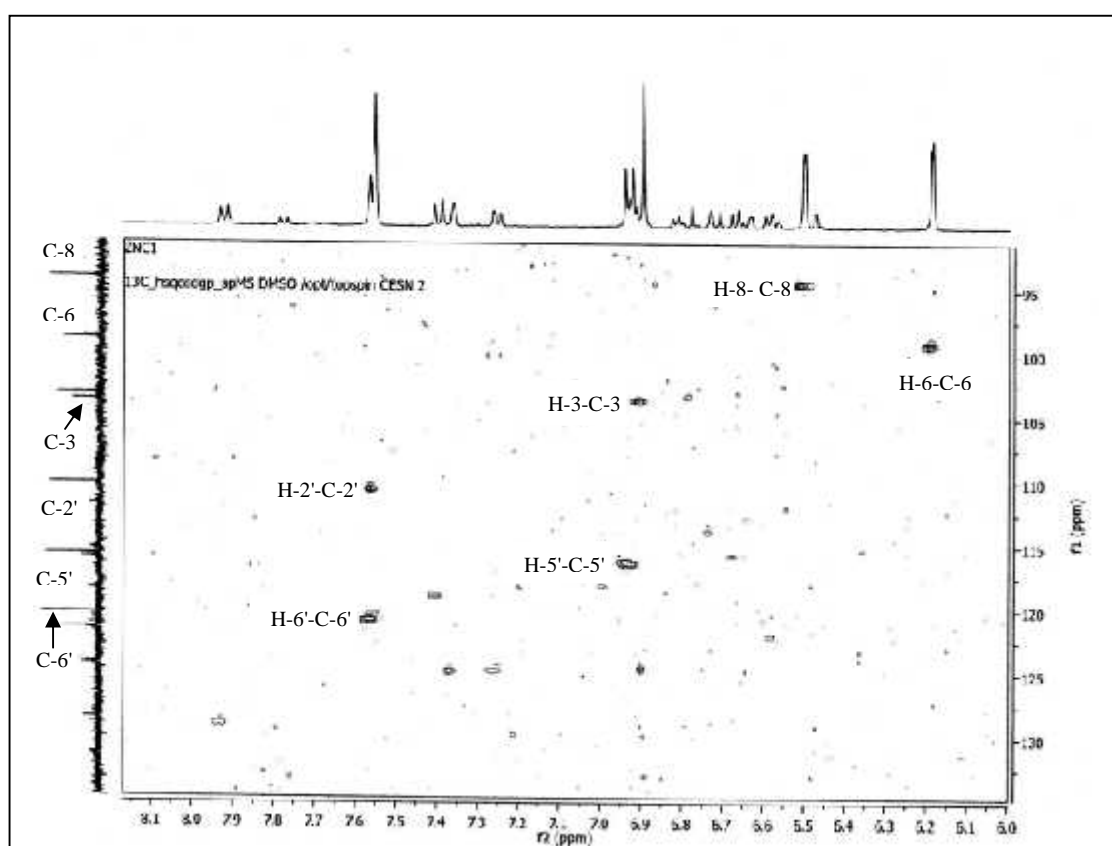
Tableau-17-: Données de la RMN¹³C et HSQC du composé C₂

Déplacement chimique (ppm)	Attribution	HSQC
164,9	C-2	-
103,6	C-3	H-3
181,8	C-4	-
161,4	C-5	-
98,8	C-6	H-6
163,6	C-7	-
94,0	C-8	H-8
157,3	C-9	-
103,2	C-10	-
121,5	C-1'	-
110,1	C-2'	H-2'
150,7	C-3'	-
148,0	C-4'	-
115,7	C-5'	H-5'
120,3	C-6'	H-6'
55,9	OCH ₃	-

Résultats et Discussion



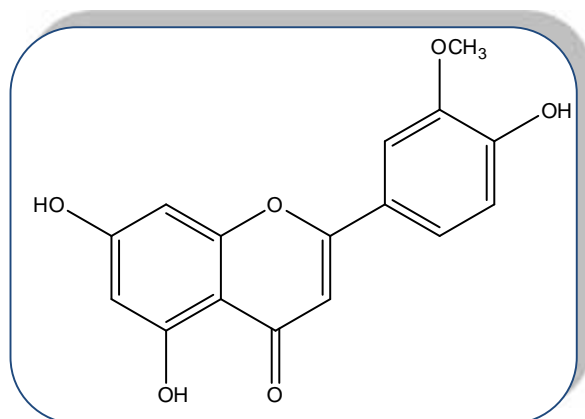
Spectre N°23 : RMN¹³C (250MHz, DMSO) du produit C₂



Spectre N°24 : HSQC (500 MHz, DMSO) du produit C₂

Résultats et Discussion

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrale nous permis de déduire la structure du composé C₂. Il s'agit da la **5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyflavone (Chrysoériol)**. Cette identification est confirmée par comparaison des données spectrales avec celle publiées dans la littérature [7].



5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyflavone (Chrysoériol)

Références bibliographiques

1. Kinjo, J., Furusawa, J., Baba, J., Takeshita, T., Yamasaki, M. and Nohara, T. **1987**. Studies on the Constituents of *Pueraria lobata*. III.¹⁾ Isoflavonoids and Related Compounds in the Roots and the Voluble Stems. *Chem Pharm Bull.* **35**, 4846-4850.
2. Lowe, E.D., Gao, G.Y., Johnson, L.N., Keung, W.M. **2008**. Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Med Chem.* **51**, 4482-4487.
3. Kumazawa, T., Minatogawa, T., Matsuba, S., Sato, S., Onodora, J. I. **2000**. An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glucosylflavone. *Carbohydrate Research.* **329**, 507-513.
4. Peng, J., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y. **2005**. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatograph. *Journal of Chromatography A.* **1074**, 111-115.
5. Zhang, B. H., Yao, S., Tan, Y. X., He, J. H., Zheng, G. H. **2013**. Chemical research for bioactive constituents in *Kummerowia striata* (Thunb) Schindl. *J Chem Pharm Res.* **5**, 1249-1251.
6. Pan, S-M., Ding, H-Y., Chang, W-L. and Lin, H-C. **2006**. Phenols from the Aerial Parts of *Leonurus sibiricus*. *The Chinese Pharmaceutical Journal.* **58**, 35-40.
7. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Maggio, A., Rosselli, S. and Bruno, M., **2012**. Flavonoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe Cardueae, Asteraceae) : Distribution and ¹³C-NMR spectral data. *Chemistry & Biodiversity.* **9**, 2096-2158.

Chapitre V

Activité biologique

I. Activité anti-oxydante

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnel, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire [1].

Pour l'évaluation du potentiel antioxydant de l'extrait butanolique de la plante *Bituminaria bituminosa*, nous avons utilisées deux méthodes : la méthode du radical DPPH et CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity).

I.1. Matériel et Méthode

I.1.1. Test DPPH

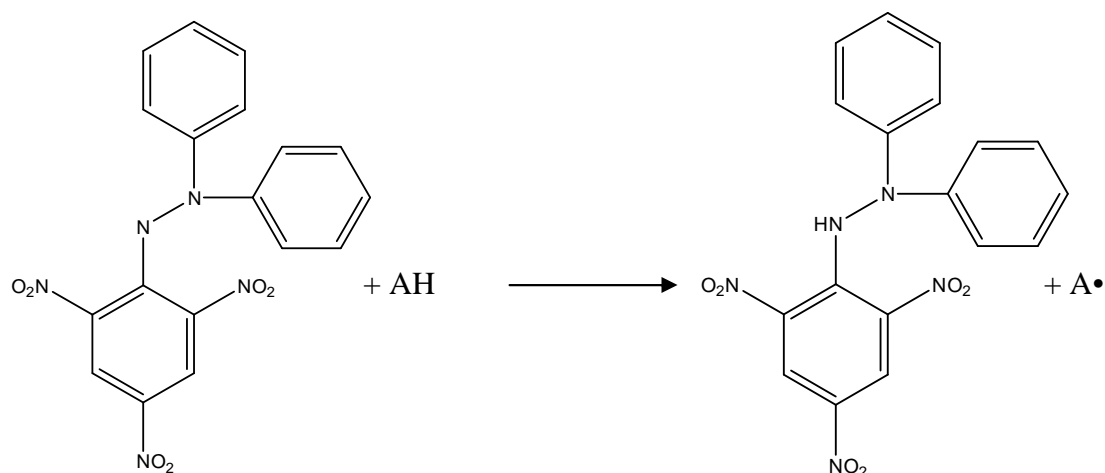
- **Radical DPPH**

Le pouvoir antioxydant peut être mesuré par la capacité du composé testé à piéger le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazule). Il s'agit d'un radical stable possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox (acide 6-hydroxy -2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique).

- **Principe**

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical 1,1 diphényl -2- picrylhydrazyl (DPPH[•]) a été évaluée à température ambiante. La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre dans 50mL de MeOH. La solution de référence est le Trolox. Cinq solutions de concentration différentes sont préparées à partir de la solution mère (50mg dans 10 ml de MeOH) en suivant un protocole adapté de Brand-Williams [2].

Le radical DPPH[•] présente une coloration violette intense qui vire au jaune en présence de capteurs de radicaux libres et se réduit en 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazine.



DPPH• (Violette)

DPPH-H + A• (Jaune)

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par spectrophotométrie à $\lambda = 515\text{nm}$. Elle rend ainsi compte du pouvoir piègeur des molécules étudiées vis-à-vis du DPPH• [3]. Elle permet de déterminer ainsi l'IC₅₀, concentration à laquelle 50% de la coloration est perdu soit 50% des radicaux piégés. Les résultats sont exprimés par rapport à ceux obtenus par le Trolox pris comme antioxydant de référence. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicat.

• Méthode

Cinq dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ont été préparées à partir d'une solution mère (10mg/1mL) de l'extrait butanolique. Sur une plaque de 96 puits. Dans les puits on place des différentes concentrations auxquelles sont additionnés 200 μ L DPPH. L'absorbance du mélange est mesurée à 515nm par un lecteur de microplaque ; la lecture se fait toutes les minutes pendant 45 minutes. L'activité de l'extrait (n-BuOH) est évaluée par rapport à la solution 100% qui renferme le méthanol absolu (blanc réactif) et par rapport à la solution 100% de DPPH [4, 5, 6,7].

Le pourcentage d'inhibition PI de la formation des radicaux DPPH libre est calculé selon la formule suivante : $PI = [1 - (DO_{\text{extrait}} / DO_{100\%})] \times 100$; où :

DO_{extrait} = absorbance de la solution contenant une dilution de l'extrait en présence du DPPH.

$DO_{100\%}$ = absorbance de la solution 100% contenant uniquement la solution de DPPH

Activité biologique

$$\text{TEAC}_{\text{molaire}} = \frac{\text{extrait}}{\text{Trolox}}$$

: (coefficient d'extinction molaire) si la concentration est exprimée en mol/L.

I.2. Résultat et Discussion

Les résultats de l'activité anti-oxydante de l'extrait butanolique de la plante *B. bituminosa* vis-à-vis du radical DPPH et le test CUPRAC sont représentés dans le **Tableau-1**. La substance de référence était le Trolox. Ces tests ont été réalisés systématiquement au moins 3 fois.

Tableau -1- : activités anti-oxydantes de l'extrait butanolique (n-BuOH) par les tests DPPH et CUPRAC

	DPPH			CUPRAC	
	IC ₅₀	ARP	TEAC	E‰	TEAC
Trolox	0,10	9,43	-	0,07	-
n- BuOH	0,26	3,84	0,40	0,10	1,42

ARP (Anti Radical Power) = $1/\text{IC}_{50}$.

TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) = $\text{ARP}_{\text{extrait}} / \text{ARP}_{\text{Trolox}}$.

• Discussion

Les résultats obtenus montrent que l'extrait butanolique de la plante *B. bituminosa* présente une faible activité anti-oxydante que ce soit avec le DPPH ($\text{IC}_{50}=0,26\text{mg/mL}$) ou le CUPRAC ($\text{E}\% = 0,10 \text{ L/g/cm}$) par rapport au Trolox ($\text{IC}_{50}=0,10 \text{ mg/mL}$, $\text{E}\% = 0,07 \text{ L/g/cm}$).

II. Détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie «C.H.U Constantine» sur les souches bactérienne suivantes :

Escherichia coli ATCC 25922 (*E.coli* ATCC); *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S.aureus* ATCC); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P.aeruginosa* ATCC); *Escherichia Coli* (*E.coli*); *Staphylococcus aurens* (*S.aurens*); *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*); *Proteus mirabilis* (*P.mirabilis*); *Klebsilla pneumoniae* (*K.pneumoniae*); *Enterobacter sp*; *Serratia sp* et emolitic streptocoque.

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel bactériologique :

Les souches utilisées proviennent de l'institut Pasteur à Alger et de prélèvements de malades du C.H.U.

II.1.2 Matériel végétal :

Les extraits étudiés sont :

- ✓ L'extrait chloroformique (CH₂ Cl₂); l'extrait Acétate d'éthyle (AcOEt) et l'extrait butanolique (n-BuOH) de la plante *Bituminaria bituminosa*.
- ✓ L'extrait Acétate d'éthyle (AcOEt) et l'extrait butanolique (n-BuOH) de la plante *Centaurea dimorpha*.

II.2. Méthode

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosée standardisée par (NCCLS) cité par Celiktas et al [9].

NCCLS : (National Committee of Clinical Laboratory Standards)

- **Les milieux de culture**

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- ✓ Gélose Héктоen : Pour l'isolement des souches : *E.coli*, *P.aeruginosa*, *P.mirabilis*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter* sp et *Serratia* sp.
- ✓ Gélose Chapman : Pour l'isolement de *S.aureus* .
- ✓ Gélose M-H(Muller – Hinton) : Pour tester l'effet des extraits testés sur les souches étudiées.
- ✓ Gélose Mueller Hinton qui contient 5% sang de cheval : Pour les bactéries exigeantes (*emolitic streptococcus*)

- **Préparation des solutions**

Les extraits ont été repris avec l'Ethanol (60%). Trois dilutions 1/2, 1/4, 1/8 ont été préparées à partir d'une solution mère (2mg/mL) pour chaque extrait.

- **Repiquage des espèces bactériennes**

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

Activité biologique

- **Préparation de l'inoculum**

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et homogénéisées dans un tube de solution d'eau physiologique stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0,5 (10^6 UFC/mL). Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

- **Ensemencement**

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose (gélose Muller Hinton et gélose Muller Hinton au sang) à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.

- **Incubation**

Des disques de papier Wattman n° 3 de 6mm de diamètre stériles (stérilisation à 120°C pendant 15min par autoclavage), sont imprégnés d'extraits à raison de $40\ \mu\text{L}$ par disque, ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par l'Ethanol (60%) ont été réalisés.

Les boîtes ont été incubées 24H à 37°C en atmosphère normale pour les bactéries non exigeantes et dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 pour les bactéries exigeantes pour le développement du germe en question.

- **La lecture**

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminée par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques.

II.3.Résultats et discussion

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD

II.3.1.Détermination de l'activité antibactérienne de la plante *Bituminaria bituminosa*

Les résultats de l'évaluation du potentiel antibactérien des extraits (CH_2Cl_2 ; AcOEt et n-BuOH) sont représentés dans les tableaux (2), (3) et (4)

Activité biologique

Tableau 2 : activité antibactérienne de l'extrait CH₂Cl₂

Microorganismes	CH ₂ Cl ₂				Ethanol 60%
	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,74± 0,5	15,17± 0,5	14,47± 0,4	14,90± 0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	20,45± 1,3	18,03±1,1	15,83± 1,2	14,38 ±1,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,64±0,7	12,60±0,1	12,24± 0,7	12,50± 1,1	-
<i>Escherichia coli</i>	14,46± 0,0	13,03± 0,8	13,04± 0,7	12,36± 0,9	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,76± 1,7	11,31± 1,7	11,49± 1,4	11,18± 1,0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,21± 1,9	14,05±2,2	12,09± 0,5	10,90± 1,1	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12,89±1,5	11,64±1,9	13,24± 2,0	13,01± 1,8	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,41± 0,8	14,73±0,5	14,24± 0,4	14,54± 0,7	-
<i>Enterobacter sp</i>	14,51±0,5	13,06± 0,4	14,0± 1,6	13,05± 1,1	-
<i>Serratia sp</i>	13,63± 1,8	13,64±2,4	14,93± 0,4	14,41±0,7	-
emolitic Streptocoque	12,18± 2,2	-	-	-	-

Tableau 3 : activité antibactérienne de l'extrait AcOEt

Microorganismes	AcOEt				Ethanol 60%
	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,25± 1,0	13,17± 1,5	13,55± 0,6	13,08±1,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	11,88±0,8	11,11± 0,7	10,73± 1,1	11,57± 0,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11,32±1,6	12,24±1,4	11,57± 2,0	12,16± 0,3	-
<i>Escherichia coli</i>	13,03±1,8	13,35± 1,1	12,26± 1,4	11,53± 0,8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,31± 2,5	11,22± 1,9	10,98± 1,9	10,06± 0,7	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,45± 0,6	12,26± 1,0	10,78± 0,8	11,36±0,7	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12,20±1,5	11,72± 1,1	11,69± 1,7	10,68± 1,6	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,35± 1,4	13,69± 0,9	13,26± 1,3	11,39±1,0	-
<i>Enterobacter sp</i>	14,05±1,8	12,88± 2,2	11,40± 0,3	10,86± 0,6	-
<i>Serratia sp</i>	11,35±1,4	9,74± 0,5	12,31± 1,6	13,46± 0,2	-
emolitic Streptocoque	-	-	-	-	-

Activité biologique

Tableau 4 : activité antibactérienne de l'extrait n-BuOH

Microorganismes	n-BuOH				Ethanol 60%
	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,68± 1,4	9,17± 1,1	8,38± 0,7	8,23± 0,7	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,81± 2,2	6,76± 1,8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	8,20± 1,7	7,09± 2,7	6,62± 2,1	7,21± 1,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	11,70±1,3	9,80± 1,4	8,78± 1,0	9,13± 0,8	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,04± 1,3	9,54±1,2	8,43±1,2	8,07±2,4	-
<i>Enterobacter sp</i>	12,28±0,9	8,93± 1,7	8,55± 1,7	8,91± 1,7	-
<i>Serratia sp</i>	7,45± 2,2	8,30± 1,2	7,46± 1,3	7,15±1,4	-
emolitic Streptocoque	-	-	-	-	-

❖ Discussion des résultats

Les résultats présentés dans les tableaux ci-dessus montrent que :

- ✓ L'extrait CH₂Cl₂ a une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur les souches bactériennes. Les diamètres d'inhibitions les plus importants ont été enregistrés sur les souches : *S. aureus* ATCC (20,45±1,30mm), *K. pneumoniae* (16,41± 0,80mm) et *E. Coli* ATCC (15,74±0,50mm) à la concentration de 2 mg/mL. Pour le reste des souches testées nous avons enregistré des diamètres d'inhibition allant de 12 jusqu'à 14mm.
- ✓ L'extrait AcOEt n'a aucune action sur la souche emolitic *Streptocoque*. La zone d'inhibition la plus importante a été enregistrée avec la souche *Enterobacter sp* (14,05± 1,80mm) à la concentration de 2 mg/mL. Le reste des bactéries testées présentent des diamètres d'inhibition qui varient entre 10 et 13 mm.
- ✓ L'extrait n-BuOH est inactif sur les souches bactériennes Gram + (*S.aureus* ATCC, *S.aureus* et emolitic *Streptocoque*) ainsi que *P.aeruginosa*. Le reste des souches testées présentent des zones d'inhibition allant de 7 jusqu'à 12 mm.

Activité biologique

II.3.2. Détermination de l'activité antibactérienne de la plante *Centaurea dimorpha*

Les résultats de l'évaluation du potentiel antibactérien des extraits (AcOEt et n-BuOH) sont représentés dans les tableaux (5) et (6)

Tableau-5- : activité antibactérienne de l'extrait AcOEt

Microorganismes	AcOEt				Ethanol 60%
	2mg/mL	1mg/mL	0,5mg/mL	0,25mg/mL	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13,33± 0,4	12,16± 0,1	11,16± 0,6	10,50± 1,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14,16± 0,2	13,83± 0,1	12,50± 0,4	11,16± 0,9	-
<i>Escherichia coli</i>	12,83± 0,6	12,00± 0,3	11,50± 0,7	10,83± 1,3	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,83± 0,6	11,50± 0,2	10,66± 0,4	9,83± 0,2	-
<i>Proteus mirabilis</i>	14,66± 0,6	14,16± 0,6	13,16± 0,8	12,33± 0,4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,00± 0,4	13,16± 0,2	12,50± 0,4	10,83± 0,6	-
<i>Enterobacter</i> sp	14,16± 0,4	13,33± 0,4	11,83± 0,2	10,33± 0,5	-
<i>Serratia</i> sp	13,83± 0,8	13,16± 0,9	11,83± 0,2	10,83± 0,2	-
emolitic Streptocoque	-	-	-	-	-

Tableau-6-: Activité antibactérienne de l'extrait n-BuOH

Microorganismes	n-BuOH				Ethanol 60%
	2mg/mL	1mg/mL	0,5mg/mL	0,25mg/mL	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,33± 0,4	13,50± 0,7	12,83± 0,6	11,83± 0,6	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15,16± 6,2	14,33± 0,6	14,16± 0,6	13,16± 0,6	-
<i>Escherichia coli</i>	13,33± 0,2	12,50± 0,4	11,83± 0,4	10,50± 0,4	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,00± 0,4	13,33± 0,4	12,50± 0,4	11,83± 0,6	-
<i>Proteus mirabilis</i>	14,33± 0,4	13,83± 0,2	13,16± 0,2	12,50± 0,4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,83± 0,2	14,00± 0,4	13,50± 0,4	12,50± 0,4	-
<i>Enterobacter</i> sp	14,50± 0,4	13,50± 0,4	12,50± 0,4	11,83± 0,2	-
<i>Serratia</i> sp	13,83± 0,2	13,00± 0,4	12,16± 0,6	11,50± 0,7	-
emolitic Streptocoque	-	-	-	-	-

❖ Discussion des résultats

Les résultats présentes dans les tableaux -5- et -6- montrent que :

- ✓ Les deux extraits (AcOEt ,n-BuOH) n'ont aucun activité sur les souches bactériennes Gram + (*S.aureus* ATCC, *S.aureus* et *emolitic Streptocoque*)
- ✓ L'extrait AcOEt est plus active sur les souches : *P.mirabilis* ,*P.aeruginosa* ATCC, *Enterobacter* sp et *K.pneumonia* pour les quelles nous avons enregistré des diamètres d'inhibition de : $14,66 \pm 0,62 \text{mm}$; $14,16 \pm 0,23 \text{mm}$; $14,16 + 0,47 \text{mm}$ et $14,00 \pm 0,41 \text{mm}$ respectivement à la concentration de 2 mg/mL.
- ✓ L'extrait n-BuOH a une bonne activité inhibitrice sur l'ensemble des souches bactériennes Gram – testés. Les zones d'inhibitions les plus importantes on été enregistré sur les souches ; *P. aeruginosa* ATCC ($15,16 \pm 0,62 \text{mm}$) ,*K.pneumonia* ($14,83 \pm 0,23 \text{ mm}$) , *Entrobacter* sp ($14,50 \pm 0,40 \text{ mm}$) , *P.mirabolis* ($14,33 \pm 0,47 \text{ mm}$) et *E. coli* ATCC ($14,33 + 0,47 \text{ mm}$) à la concentration de 2mg/mL.

II.4. Conclusion

- ❖ L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante *B .bituminosa* a montré que l'extrait dichlorométhane (CH_2Cl_2) est plus actif que les deux extraits (AcOEt et n-BuOH), les diamètres d'inhibition enregistrés indiquent qu'il agie d'une façon sélective sur la souche *S.aureus* ATCC.
- ❖ Les extraits AcOEt et n-BuOH de la plante *C.dimophra* sont avérés inactifs contre l'ensemble des souches bactériennes Gram + testées .Pour le reste des souches bactériennes les deux extraits ont montré une bonne activité bactérienne surtout l'extrait butanolique.

Activité biologique

✚ La figure suivante représente quelques étapes de cette étude



Figure-1:- photos de quelques étapes de l'activité antibactérienne

Références bibliographiques

1. Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M-E., Topcu, G., **2007**. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*) : An edible medicinal plant. *Food Chem.* **103**, 623-630.
2. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., **1995**. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* **28**, 25–30.
3. Iren, P., Carles, C., Christos, P., Panagiotis, K., **2000**. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA- induced luminol chemiluminescence and DPPH[•](2,2-diphenyl-L-picrylhydrazyl)free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* **44**, 507-512.
4. Lim, K. T., Hu, C., Kitts, D. D., **2001**. Antioxydant activity of a *Rhus verniciflua* stokes ethanol extract. *Food and Chemical Toxicology.* **39**, 229-237.
5. Song, Y. S., Kim, S. H., Sa, J. H., Changbae, J., Limd, C. J., Park, E. H., **2003**. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacol.* **88**, 113-116.
6. Tapiaa, A., Rodriguezb, J., Theodulozb, C., Lopezd, S., Feresinc, EG., Hirschmanna, GS., **2004**. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology.* **95**, 155-161.
7. Naik, G. H., Priyadarsinia, K. I., Naika, D. B., Gangabthagirathib, R., Mohana, H., **2004**. Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine.* **11**, 530–538.
8. Apak, R., Güclü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., **2004**. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **52**, 7970-7981.
9. Celiktas, O. Y., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K. H. C., **2007a**. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100**, 553-559.

Conclusion Générale

Conclusion général

Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux espèces végétales. Il s'agit d'une Fabaceae (*Bituminaria bituminosa*) et d'une Asteraceae (*Centaurea dimorpha*).

L'étude phytochimique réalisée sur les deux extraits acétate d'éthyle et n-butanol de la plante *B.bituminosa* nous a permis d'isoler quatre composés dont trois ont été déterminées, il s'agit de:

- 🌈 **Daidzeine** (4',7-dihydroxyisoflavone).
- 🌈 **Daidzine** (daidzeine-7-O-glucoside).
- 🌈 **Isoorientine** (Luteoline-6-C-glucoside) [**Nouveau dans l'espèce**].

En ce qui concerne *C.dimorpha* le travail d'extraction, séparation et purification des phases dichlorométhane et acétate d'éthyle nous a conduit à l'isolement de 5 produits, parmi lesquels nous avons établi la structure de 4 composés:

- 🌈 **Apegénine**.
- 🌈 **Hispiduline**.
- 🌈 **Chrysoériol**.
- 🌈 **Genkwanine**.

Ces quatre produits sont isolés pour la première fois dans cette espèce.

Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN et ses séquences, bidimensionnelle COSY, HSQC, ainsi que la spectrométrie de masse ES.

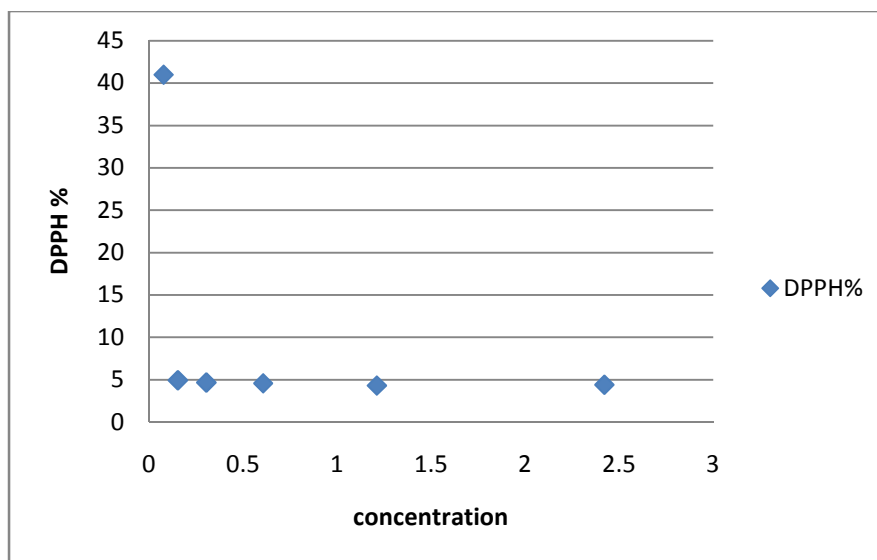
L'activité anti-radicalaire de l'extrait butanolique de l'espèce *B.bituminosa* a été déterminée par deux méthodes (DPPH et CUPRAC). Les résultats ont montrés que l'extrait n-BuOH présente une faible activité antioxydante par rapport au Trolox.

Les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol de la plante *B.bituminosa* ont montrés une bonne activité antibactérienne sur les souches bactériennes étudiées.

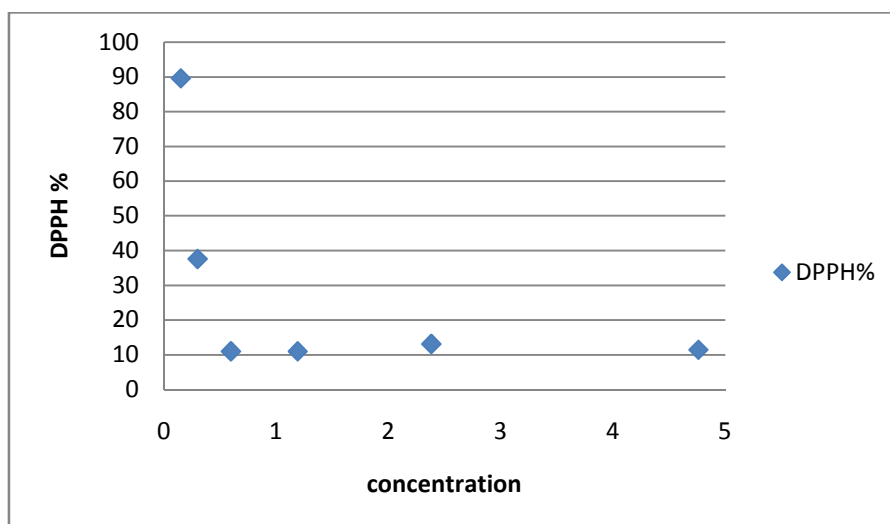
L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de l'espèce *C.dimorpha* a montrée que les deux phases non aucune action sur l'ensemble des souches bactériennes Gram(+) testées. Pour le reste des souches [Gram(-)] les deux extraits possèdent une bonne activité.

Annexe

- ❖ Activité antioxydante de l'extrait n-butanol de la plante *Bituminaria bituminosa* et du Trolox vis-à-vis du radical DPPH

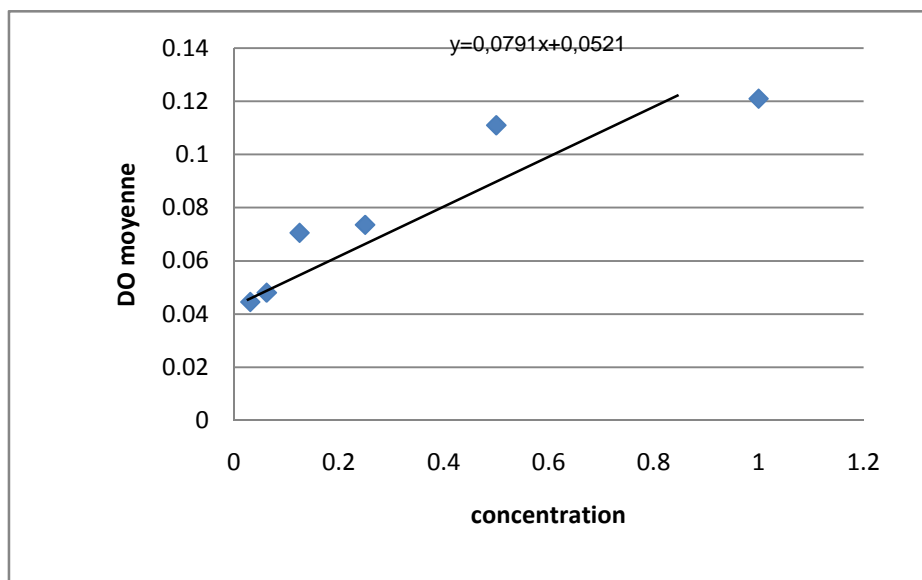


Activité A.O du Trolox vis-à-vis DPPH

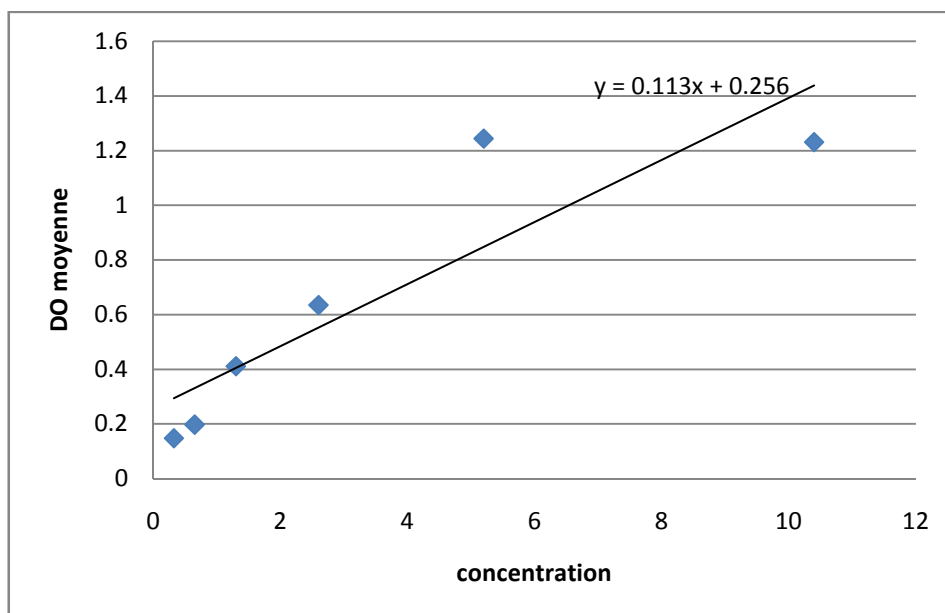


Activité A.O de l'extrait n-BuOH vis-à-vis DPPH

- ❖ Activité antioxydante de l'extrait n-butanol de la plante *Bituminaria bituminosa* et du Trolox vis-à-vis du CUPRAC



Activité A.O du Trolox vis-à-vis du CUPRAC



Activité A.O de l'extrait n-BuOH vis-à-vis du CUPRAC

Résumé

L'objectif de notre travail consiste à l'étude phytochimique et biologique de deux espèces en l'occurrence *Bituminaria bituminosa*(L.) C.H.Stirton. de la famille Fabaceae et *Centaurea dimorpha* Viv. de la famille Asteraceae.

Les différentes méthodes chromatographiques de séparation utilisées dans notre expérimentation ont permis l'isolement de quatre composés de la plante *B.bituminosa* (seulement trois ont été identifiées), et cinq produits de la plante *C.dimorpha* (quatre seulement ont été identifiée).

La détermination des structures a été réalisée par la combinaison des différentes méthodes spectrométriques et spectroscopiques modernes (SMES, UV, RMN-1D,2D).

L'extrait butanolique de l'espèce *B.bituminosa* a montré une faible capacité de pouvoir antioxydant. Les différents extraits des deux plantes étudiées ont montrés une bonne activité antibactérienne.

Mots clés: Fabaceae, Asteracea, *Bituminaria bituminosa*, *Centaurea dimorpha*, antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

Our research includes the study of the phytochemical and biological aspects of the two presented species *Bituminaria bituminosa*(L.) C.H.Stirton. which belongs to Fabaceae family and *Centaurea dimorpha* Viv. which belongs to Asteraceae family.

Several chromatographic methods were used in our work. These methods allowed us to isolate four products from *B.bituminosa* plant (only three have been identified), and five products from *C.dimorpha* plant (only four have been identified).

The identification of structures has been realised by combining the different spectrometric and spectroscopic methods (SMES, UV, RMN-1D,2D).

Butanolic extract of *B.bituminosa* species showed a weak antioxidant capacity. The various extracts of the two studied plants have shown a good antibacterial activity.

Key words: Fabaceae, Asteracea, *Bituminaria bituminosa*, *Centaurea dimorpha*, antioxidant, antibacterial activity.

الهدف من عملنا هذا هو الدراسة الفيتوكيميائية و البيولوجية لنوعين من النبات
Bituminaria bituminosa(L.) C.H.Stirton التي تنتمي إلى العائلة الباقولية و *Centaurea*
dimorpha Viv.

B.bituminosa

C.dimorpha

على ثلاثة منها فقط

تحديد الصيغ البنوية للمركبات السابقة الذكر قد تم بالاعتماد على مختلف الطرق التحليلية الطيفية الحديثة
(SMES, UV, RMN-1D,2D).

اظهر المستخلص البوتانولي لنبنة *B.bituminosa* فعالية ضعيفة مضادة للاكسدة كما اظهرت مختلف
المستخلصات للنبنتين المدروستين فعالية مضادة للبكتيريا.

Centaurea dimorpha Bituminaria bituminosa

الكلمات المفتاحية: العائلة الباقولية

فعالية مضادة للبكتيريا.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtm



Document heading doi: 10.1016/S1995-7645(14)60278-9

Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae)Salima Azzouzi¹, Nabila Zaabat¹, Kamel Medjroubi¹, Salah Akkal^{1*}, Kadour Benlabed², Farida Smati², Marie-Geneviève Dijoux-Franca³¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles Molécules Bioactives et Analyses Physico-Chimiques et Biologiques, Département de Chimie, Facultés des Sciences Exactes, Université de Constantine 1, Algérie²Laboratoire de Bactériologie CHU, Benbadis Constantine, Algérie³UMR 5557, Ecologie Microbienne, ISPB, 69373 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 Mar 2014

Received in revised form 28 Apr 2014

Accepted 15 May 2014

Available online 16 Jul 2014

Keywords:

Bituminaria bituminosa L.

Fabaceae

Antibacterial

Antioxidant

Isoflavone

Flavone

*Staphylococcus aureus**Klebsiella pneumonia**Escherichia coli*

ABSTRACT

Objective: To investigate the phytochemical composition, the antioxidant and antibacterial activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae) (*B. bituminosa*).**Methods:** The aerial parts of *B. bituminosa* yielded two compounds. The structures of these compounds were determined using UV, ¹H-NMR and ¹³C-NMR experiments and comparison of their spectroscopic properties with literature data. The antibacterial activity of the extracts (CH₂Cl₂, ethyl acetate and *n*-BuOH) was determined using disk diffusion method against standard and clinical strains. Antioxidant potential of *n*-BuOH extract was evaluated through two methods: DPPH and cupric ion reducing antioxidant capacity assay.**Results:** The *n*-BuOH extract from *B. bituminosa* yielded the isolation of isoflavone and flavone. The extracts CH₂Cl₂, ethyl acetate and *n*-BuOH demonstrated significant antibacterial activities. CH₂Cl₂ extract showed the maximum antibacterial activity with high concentration of 2 mg/mL against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* ATCC 25922 (20.45 mm, 16.41 mm and 15.74 mm inhibition zone, respectively). The value IC₅₀ was 0.26 µg/mL for *n*-BuOH extract using DPPH method. Whereas the E₅₀ value was 0.10 L/mg every centimeter for cupric ion reducing antioxidant capacity assay.**Conclusions:** The phytochemical study of *B. bituminosa* revealed the presence of isoflavone (daidzin) and flavone (isorientin) and identified for the first time in this specie. The antibacterial activity of the plant *B. bituminosa* is certainly related to its chemical content. The *n*-BuOH extract showed a significant antioxidant activity.

1. Introduction

The Fabaceae (Leguminosae) is an exceptional large angiosperm Family. Traditionally, three subfamilies are recognized, of which Papilionoideae (Faboideae) is by far the biggest one with about 14 000 species including numerous ones that are economically important[1].

The genus *Psoralea* (*Bituminaria*) is firmly entrenched in phytochemistry as a source of furanocoumarins, whose

linear archetypal compound (furo[3,2-*g*][1] benzopyran-7-one) was named psoralen after it. Paradoxically, the presence of furanocoumarins is not a main feature of the genus, whose pattern of secondary metabolites is characterized by other shikimates, especially isoflavonoids and meroterpenoids[2]. In Algerian flora, the genus *Bituminaria* consists of three species: *Bituminaria bituminosa* L. (*B. bituminosa*), *Bituminaria americana* L., and *Bituminaria licata* Del.[3]. *B. bituminosa* is distributed all over the Mediterranean coastal area. Traditionally, it is used to treat spasms and treat against fever and epilepsy[4].

Previous phytochemical studies on this species revealed the presence of furanocoumarins[5–7],

*Corresponding author: Pr. Salah Akkal, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

E-mail: salah4dz@yahoo.fr

Foundation Project: Financially supported by MESRS, Algeria (Grant No. E00920110035/2012).

pterocarpan^[5] and the essential oil of the leaves, flowers and seeds^[8].

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aerial parts of *B. bituminosa* were collected from Maskara (Algeria) in May 2011, and the plant was identified by Dr. Gérard De Belair (Departement of Biology, Annaba University, Algeria). A voucher specimen was put in the herbarium of our laboratory.

2.2. Extraction and isolation

Air dried aerial parts (800 g) of plant were extracted three times with boiling 70% MeOH. The extracted MeOH was evaporated till dryness. The residue was dissolved in boiled water then filtered. The filtrat was extracted with CH₂Cl₂, ethyl acetate (EtOAc) and *n*-BuOH successively.

The *n*-BuOH extract was applied to a column of polyamide MN SC6 and eluted with a gradient of toluene–MeOH with increasing polarity.

Fractions eluted with toluene–MeOH 75–25 gave a white precipate, which was washed with MeOH to give compound 1 (130 mg). Fractions eluted with toluene–MeOH 60–40 gave yellow precipate, which was washed with MeOH to give compound 2 (100 mg).

2.3. Antibacterial activity

2.3.1. Biological material

All of the bacteria, standard strains [*Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*)] and clinical strains [*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., α emolitic streptocoque] were obtained from Bacteriology Laboratory Constantine University Hospital (C.H.U).

2.3.2. Biological test

The extracts (CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH) were used to investigate the antibacterial activity of *B. bituminosa* using the disk diffusion method^[9]. The bacterial strains were first cultivated on Mueller–Hinton agar, with the exception of streptocoque (Mueller–Hinton agar containing 50 mL blood/L) at 37 °C for 24 h prior to seeding

on to the nutrient agar.

A sterile 6 mm diameter filter disk (Whatman No. 3 filter paper) was placed on the infusion agar seed with bacteria, and each extract suspended in ethanol 60% was dropped on to each paper disk (40 μ L per disk) for all the concentrations (2.00 mg/mL, 1.00 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.25 mg/mL). The treated Petri dish was kept at 4 °C for 1 h, and incubated at 37 °C for 24 h. The antibacterial activity was assessed by measuring the zone of growth inhibition surrounding the disk. Each experiment was carried out in triplicate and the results were expressed as mean \pm SD.

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH free radical–scavenging activity

Free radical scavenging capacity of the purified compounds was determined with the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay^[10]. The molecule DPPH is characterized as stable–free radical by the virtue of the delocalization of the spare electron over the molecule. This delocalization gives a rise to a deep violet colour, which is characterized by an absorption band in methanol solution centered at 515 nm with a spectrophotometer. This assay was conducted according to the method described by Brand–Williams^[11] and carried out on 96 wells microplate. The percentage of DPPH remaining was calculated as a function of the molar ratio of antioxidant to DPPH:

$$\text{DPPH (\%)} = \left[\frac{\text{DO}_{\text{control}} - \text{DO}_{\text{sample}}}{\text{DO}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

The IC₅₀ value (mol/L antiox)/(mol/L DPPH), which defined as the effective concentration of antioxidant was necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%^[12], was calculated from the results by linear regression analysis. The antiradical power (ARP) was calculated as 1/IC₅₀: the highest ARP is associated with the greatest DPPH scavenging effect. Evaluation of free radical–scavenging activity was performed with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). TEAC value is based on the ability of the antioxidant to scavenge the radical DPPH and is defined as TEAC = ARP_{(compound)}/ARP_{(Trolox)}}.}

2.4.2. Antioxidant capacity by cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The test of CUPRAC was first described by Apak *et al*^[12]. It is based on the capacity to use the copper (II)–neocuproine reagent as the chromogenic oxidizing agent. This test was carried out on 96 wells microplates. The absorbance was measured at 450 nm using the spectrophotometer. The antioxidant capacity of compounds and extracts was evaluated as Trolox

equivalents (TEAC values). If the results are exposed as $DO=f(\text{concentration of compound in g/L})$, TEAC could be calculated as $E\%_{(\text{compound})}/E\%_{(\text{Trolox})}$, where $E\%$ represents the slope for each curve obtained.

3. Results

3.1. Structures elucidation

Compound 1: daidzin (daizein 7-O-glucoside); white powder, $UV\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH})$ nm: 261–305.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , δ in mg/L) data: 9.55 (1H, brs, 4'-OH), 8.45 (1H, s, 2-H), 8.05 (1H, d, $J=8.8$ Hz, 5-H), 7.41 (2H, d, $J=8.5$ Hz, 2'-H), 7.25 (1H, d, $J=2.2$ Hz, 8-H), 7.15 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.2$ Hz, 6-H), 6.82 (2H, d, $J=8.5$ Hz, 3'-H), 5.10 (1H, d, $J=6.4$ Hz, 1''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , δ in mg/L) data: 153.3 (C-2), 123.7 (C-3), 175.0 (C-4), 127.0 (C-5), 115.6 (C-6), 161.3 (C-7), 103.3 (C-8), 156.9 (C-9), 118.4 (C-10), 122.3 (C-1'), 130.0 (C-2'), 114.9 (C-3'), 156.9 (C-4'), 99.9 (C-1''), 72.9 (C-2''), 76.0 (C-3''), 69.4 (C-4''), 76.9 (C-5''), 60.5 (C-6'').

Comparing with the reported data, the $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data are in agreement with those of daidzin in the literature[13].

Compound 2: isoorientin (luteolin 6-C-glucoside); yellow powder, $UV\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH})$ nm: 270–350.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ in mg/L) data: 13.55 (1H, brs, 5-OH), 7.45 (1H, dd, $J=8$, 1Hz, $J=2.2$ Hz, 6'-H), 7.42 (1H, d, $J=2.2$ Hz, 2'-H), 6.89 (1H, d, $J=8.1$ Hz, 5'-H), 6.68 (1H, s, 3-H), 6.48 (1H, s, 8-H), 4.59 (1H, d, $J=9.8$ Hz, 1''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6 , δ in mg/L) data: 163.6 (C-2), 102.7 (C-3), 181.8 (C-4), 160.7 (C-5), 108.9 (C-6), 163.6 (C-7), 93.5 (C-8), 156.2 (C-9), 103.3 (C-10), 121.3 (C-1'), 113.3 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.1 (C-5'), 118.9 (C-6'), 73.1 (C-1''), 70.6 (C-2''), 79.0 (C-3''), 70.2 (C-4''), 81.6 (C-5''), 61.5 (C-6'').

Comparing with the reported data, the $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data are in agreement with those of isoorientin in the literature[14].

3.2. Antibacterial activity

The diffusion test was applied to 12 Gram-positive (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus*, α emolitic streptococque) and Gram-negative (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp. and *Serratia* sp.) microorganisms. The control treatment (ethanol 60%) had no inhibitory effect on any of the tested microorganisms. The results of these

tests are presented in Tables 1, 2 and 3.

Table 1

Antibacterial activity of the extract CH_2Cl_2 .

Microorganisms	CH_2Cl_2				Control
	2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.74±0.50	15.17±0.50	14.47±0.40	14.90±0.50	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	20.45±1.30	18.03±1.10	15.83±1.20	14.38±1.20	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13.64±0.70	12.60±0.10	12.24±0.70	12.50±1.10	–
<i>E. coli</i>	14.46±0.00	13.03±0.80	13.04±0.70	12.36±0.90	–
<i>S. aureus</i>	12.76±1.70	11.31±1.70	11.49±1.40	11.18±1.00	–
<i>P. aeruginosa</i>	12.21±1.90	14.05±2.20	12.09±0.50	10.90±1.10	–
<i>P. mirabilis</i>	12.89±1.50	11.64±1.90	13.24±2.00	13.01±1.80	–
<i>K. pneumoniae</i>	16.41±0.80	14.73±0.50	14.24±0.40	14.54±0.70	–
<i>Enterobacter</i> sp.	14.51±0.50	13.06±0.40	14.00±1.60	13.05±1.10	–
<i>Serratia</i> sp.	13.63±1.80	13.64±2.40	14.93±0.40	14.41±0.70	–
α emolitic streptococque	12.18±2.20	–	–	–	–

Table 2

Antibacterial activity of the extract EtOAc.

Microorganisms	EtOAc				Control
	2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12.25±1.00	13.17±1.50	13.55±0.60	13.08±1.00	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	11.88±0.80	11.11±0.70	10.73±1.10	11.57±0.20	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11.32±1.60	12.24±1.40	11.57±2.00	12.16±0.30	–
<i>E. coli</i>	13.03±1.80	13.35±1.10	12.26±1.40	11.53±0.80	–
<i>S. aureus</i>	10.31±2.50	11.22±1.90	10.98±1.90	10.06±0.70	–
<i>P. aeruginosa</i>	11.45±0.60	12.26±1.00	10.78±0.80	11.36±0.70	–
<i>P. mirabilis</i>	12.20±1.50	11.72±1.10	11.69±1.70	10.68±1.60	–
<i>K. pneumoniae</i>	12.35±1.40	13.69±0.90	13.26±1.30	11.39±1.00	–
<i>Enterobacter</i> sp.	14.05±1.80	12.88±2.20	11.40±0.30	10.86±0.60	–
<i>Serratia</i> sp.	11.35±1.40	9.74±0.50	12.31±1.60	13.46±0.20	–
α emolitic streptococque	–	–	–	–	–

3.3. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the *n*-BuOH extract of *B. bituminosa* was evaluated through the ability to scavenge DPPH and the capacity to reduce the cupric ion. The results are presented in Table 4.

Table 3

Antibacterial activity of the extract *n*-BuOH.

Microorganisms	<i>n</i> -BuOH				Control
	2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9.68±1.40	9.17±1.10	8.38±0.70	8.23±0.70	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	–	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.81±2.20	6.76±1.80	–	–	–
<i>E. coli</i>	8.20±1.70	7.09±2.70	6.62±2.10	7.21±1.00	–
<i>S. aureus</i>	–	–	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–
<i>P. mirabilis</i>	11.70±1.30	9.80±1.40	8.78±1.00	9.13±0.80	–
<i>K. pneumoniae</i>	11.04±1.30	9.54±1.20	8.43±1.20	8.07±2.40	–
<i>Enterobacter</i> sp.	12.28±0.90	8.93±1.70	8.55±1.70	8.91±1.70	–
<i>Serratia</i> sp.	7.45±2.20	8.30±1.20	7.46±1.30	7.15±1.40	–
α emolitic streptococque	–	–	–	–	–

Table 4

Antioxidant activity of *n*-BuOH extract.

Extract	DPPH			CUPRAC	
	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	ARP	TEAC	$E\% (L/g/cm)$	TEAC
Trolox	0.10	9.43	–	0.07	–
<i>n</i> -BuOH	0.26	3.84	0.40	0.10	1.42

4. Discussion

4.1. Antibacterial activity

The CH₂Cl₂ extract showed a good activity against *S. aureus* ATCC 29213 (20.45 mm), *K. pneumoniae* (16.41 mm) and *E. coli* ATCC 25922 (15.74 mm) with high concentration of 2 mg/mL. The other strains showed an inhibition zone varied from 12 mm to 14 mm.

EtOAc has an activity against *Enterobacter* sp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922 and *P. mirabilis* (14.05 mm, 13.03 mm, 12.35 mm, 12.25 mm and 12.20 mm inhibition zone respectively) with high concentration of 2 mg/mL, whereas there is no activity against α emolitic streptococque.

The *n*-BuOH extract has no activity against *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and α emolitic streptococque, although the potency of the extract against the other strains showed an inhibition zone varied from 6 mm to 12 mm with higher concentration of 2 mg/mL.

Among the tested extracts, the CH₂Cl₂ extract was more effective than the other extracts.

4.2. Antioxidant activity

The antioxidant capacity of the *n*-BuOH extract was nearly equivalent than Trolox towards CUPRAC (TEAC_{CUPRAC}=1.42). Whereas that extract presents a weak radical scavenging activity toward DPPH comparing to Trolox (TEAC_{DPPH}=0.40).

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by MESRS, Algeria [grant No.E00920110035/2012].

References

[1] Peters WS, Haffer D, Hanakam CB, Van Bel AJ, Knoblauch M. Legume phylogeny and the evolution of a unique contractile apparatus that regulates phloem transport. *Am J Bot* 2010; **97**(5): 797–808.

[2] Wink M. Evolution of secondary metabolites in legume (Fabaceae). *S Afr J Bot* 2013; **89**: 164–175.

[3] Queze P, Santa S. *New flora of Algeria and southern desert regions*. Paris: Cent. Nat. Rech. Scient; 1962, p. 502.

[4] d'Alger W, de Paris M. [*Illustrated guide to the flora of Algeria*]. Paris: Délégation Générale aux Relations Internationales; 2012, p. 26.

[5] Leonti M, Casu L, Gertsch J, Bonsignore L, Floris C, Casu M, et al. A pterocarpan from the seeds of *Bituminaria morisiana*. *J Nat Med* 2010; **64**(3): 354–357.

[6] Walker DJ, Martinez–Fernandez D, Correal E, Romero–Espinosa P, Antonio Del Rio J. Accumulation of furanocoumarins by *Bituminaria bituminosa* in relation to plant development and environmental stress. *Plant Physiol Biochem* 2012; **54**: 133–139.

[7] Del Río JA, Ortuño A, Pérez I, Bennett RG, Real D, Correal E. Furanocoumarin content in *Bituminaria bituminosa* varieties and *Cullen* species. In: Porqueddu C, Ríos S, editors. Meeting of the sub–network on mediterranean forage resources of the FAO–CIHEAM international network for the research and development of pasture and forage crops. Alicante (Spain): 2010. The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity; 2010 Apr 7–10; Zaragoza. CIHEAM/CIBIO/FAO/SEEP: Options Méditerranéennes; 2010, p. 69–70.

[8] Bertoli A, Menichini F, Noccioli C, Morelli I, Pistelli L. Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa* L. *Flavour Frag J* 2004; **19**(2): 166–171.

[9] Sivasothy Y, Sulaiman SF, Ooi KL, Ibrahim H, Awang K. Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff. *Food Control* 2013; **30**(2): 714–720.

[10] Harkati B, Akkal S, Bayet C, Laouer H, Dijoux–Franca MG. Evaluation of antioxidant activity, free radical scavenging and CUPRAC of two compounds isolated from *Scorzonera undulata* ssp *deliciosa*. *Adv Environ Biol* 2013; **7**(4): 591–594.

[11] Brand–Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT–Food Sci Technol* 1995; **28**(1): 25–30.

[12] Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2013; **85**(5): 957–998.

[13] Lowe ED, Gao GY, Johnson LN, Keung WM. Structure of daidzin, a naturally occurring anti–alcohol–addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Med Chem* 2008; **51**(15): 4482–4487.

[14] Zhang BH, Yao S, Tan YX, He JH, Zheng GH. Chemical research for bioactive constituents in *Kummerowia striata* (Thunb) Schindl. *J Chem Pharm Res* 2013; **5**(12): 1249–1251.