



**Criblage phytochimique et biologique de la plante endémique algérienne
*Carthamus caeruleus***

Par

Naziha Bendou

Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.) en ressources renouvelables

Québec, Canada

RÉSUMÉ

La recherche sur les plantes médicinales a connu un essor important, principalement en raison de l'intérêt pour les thérapies naturelles et les produits dérivés des métabolites secondaires. Ces composés bioactifs ont démontré un large éventail d'activités biologiques, telles que des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses. Parmi les nombreuses plantes médicinales étudiées, *Carthamus caeruleus* est utilisée en médecine traditionnelle dans plusieurs régions algériennes. Elle est notamment reconnue pour ses bienfaits dans le traitement des brûlures et des cicatrices cutanées.

Afin d'approfondir les connaissances concernant les propriétés de *Carthamus caeruleus*, ce projet de recherche s'est penché sur l'extraction, l'isolation et la caractérisation des composés de cette plante. Les travaux de cette étude ont permis d'extraire des fractions à l'aide de solvants de polarités différentes. Les fractions obtenues (dichlorométhane, acétate d'éthyle et eau) ont été testées pour leurs activités biologiques. La fraction DCM a montré une activité antioxydante remarquable ($IC_{50} < 0,195 \mu\text{g/mL}$), suivie par AcOEt ($IC_{50} = 2,8 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$) et H_2O ($IC_{50} = 7 \pm 3 \mu\text{g/ml}$). La fraction AcOEt est la plus riche en polyphénols ($18 \pm 2 \text{ g/100g}$). Sur le plan anti-inflammatoire, la fraction DCM s'est distinguée avec une inhibition des monoxydes (NO) de 100 % à $40 \mu\text{g/ml}$ ($IC_{50} = 13 \pm 3 \mu\text{g/ml}$), tandis que la fraction AcOEt affiche 89 % d'inhibition à la même concentration. Les fractions H_2O et brut ont montré des résultats modérés. Concernant l'activité antibactérienne, la fraction DCM a présenté des IC_{50} de $17 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ pour *Escherichia coli* et $18 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ pour *Staphylococcus aureus*, confirmant son potentiel antibactérien. La fraction AcOEt a montré une activité modérée avec des IC_{50} respectifs de $62 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ et $85 \pm 11 \mu\text{g/ml}$. Les essais de cytotoxicité révèlent que la fraction DCM est modérément toxique avec des IC_{50} de $108 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ pour A-549 et $59 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ pour DLD-1. En revanche, les fractions AcOEt et H_2O ne montrent qu'une faible toxicité.

Chaque fraction a subi un fractionnement bioguidé et a permis d'isoler des composés bioactifs, dont l'identification a été confirmée par des analyses spectroscopiques (RMN, spectrométrie de masse). Parmi les molécules identifiées, figurent la syringine (glycoside phénylpropanoïde), la syringinoside (diglycoside phénylpropanoïde), le (4E,6E,12E)-4,6,12-tétradécatriène-8,10-diyne-1,3-diol), le safynol et le 2-méthoxy safynol (polyacétylène), ainsi que des flavonoïdes comme l'isorhamnétine, la 3',4'-diméthoxyquercétine et l'acacétine. La scopolétine et l'isoscopolétine ont également été isolées. Des triterpènes tels que l'alpha-amyrine et la bêta-amyrine ont aussi été identifiés. Par ailleurs, une analyse du profil lipidique des extraits a révélé une composition riche en acides gras essentiels. Les acides gras saturés représentent 24,5 % du profil total, avec une nette prédominance de l'acide palmitique (20,22 %). Les acides gras monoinsaturés (principalement l'acide oléique) sont présents, totalisant un peu plus de 12,2 % du profil lipidique. Les polyinsaturés dominent largement le profil lipidique avec 63,2 %, principalement constitué d'acide linoléique (40,5 %) et d'acide alpha-linolénique (22,3 %).

Le test de cytotoxicité des composés isolés a révélé que la majorité d'entre eux, notamment la syringine **1**, la syringinoside **2**, l'alpha et bêta amyrine **6**, la scopolétine **8**, l'isorhamnétine **11**, la 3',4'-diméthoxyquercétine **12** et l'isoscopoletine **14**, sont dépourvues de cytotoxicité significative ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$). En revanche, l'acacétine **13** a présenté la cytotoxicité la plus marquée contre les lignées cancéreuses A-549 et DLD-1 (IC_{50} jusqu'à $36 \mu\text{M}$), mais également une toxicité comparable sur les cellules normales WS-1 ($IC_{50} = 72 \mu\text{M}$), suggérant un effet cytotoxique non sélectif. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'isorhamnétine **11** ($IC_{50} = 30 \pm 5 \mu\text{M}$), la 3',4'-diméthoxyquercétine **12** ($IC_{50} = 45 \pm 6 \mu\text{M}$) et surtout l'acacétine **13** ($IC_{50} = 22 \pm 3 \mu\text{M}$) ont induit une inhibition de 100 %, témoignant d'une forte efficacité. L'isoscopoletine **14** a également montré une activité notable ($IC_{50} = 79 \pm 13 \mu\text{M}$). Pour l'activité antioxydante, seule la syringinoside **2** a révélé une IC_{50} significative ($13 \pm 3 \mu\text{M}$). Enfin, aucun des composés testés n'a présenté d'activité antibactérienne ($IC_{90} > 200 \mu\text{M}$ contre *E. coli* et *S. aureus*).

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
DÉDICACE	viii
REMERCIEMENTS	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	4
REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1.1 Rappel sur l'anatomie de la peau	4
1.1.1 L'épiderme	4
1.1.2 Le derme	5
1.1.3 L'hypoderme	5
1.2 Définition d'une brûlure cutanée	6
1.2.1 Les différents degrés des brûlures	6
1.3 Étude botanique	9
1.3.1 La famille des Astéracées	9
1.3.2 Genre <i>Carthamus</i>	9
1.3.3 Description botanique	10
1.3.4 Cycle biologique	11
1.3.5 Habitat et répartition géographique	11
1.3.6 Classification botanique	12
1.3.7 Utilisations en médecine traditionnelle	13
1.4 Composition chimique	14
1.4.1 Les métabolites secondaires	14
1.4.2 Les composés terpéniques	22
1.4.3 Les acides gras	24
CHAPITRE 2	26
MATÉRIEL ET MÉTHODE	26
2.1 Matériel général et instrumentation	26
2.1.1 Matériel général	26
2.1.2 Instrumentation	27
2.2 Méthodologie	32
2.2.1 Échantillonnage	32
2.2.2 Extraction	32

2.2.3	Fractionnement et isolation de composés purs.....	35
2.2.4	Analyse du profil des acide gras	45
2.2.5	Dosage des phénoliques	46
2.2.6	Activités biologiques	47
CHAPITRE 3		54
RESULTATS ET DISCUSSION		54
3.1	Résultats de l'extraction et de la séparation	54
3.2	Résultats de l'activité biologique des fractions obtenus	56
3.3	Identification des composés isolés	59
3.4	Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés.....	69
3.5	Résultats de l'analyse du profil d'acides gras.....	75
CONCLUSION		80
LISTE DE RÉFÉRENCES.....		82
ANNEXE 1.....		91
Annexe 1 : Spectres RMN de la syringine		91
Annexe 2 : Spectres RMN de la syringinose.....		93
Annexe 3 : Tableaux des spectres RMN des polyacétylènes.....		95
Annexe 4 : Spectres RMN de l'alpha amyrine et bêta amyrine		97
Annexe 5 : Spectres RMN de l'isohamnétine		103
Annexe 6 : Spectres RMN du l'isoscopoletine.		105
Annexe 7 : Profil des acides gras sur GC-MS		107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPOSES DETECTES DANS LES FEUILLES ET LES RACINES DE <i>CARTHAMUS CAERULEUS</i>	25
TABLEAU 2 : RESUME DES RENDEMENTS D'EXTRACTION ET DE SEPARATION LIQUIDE - LIQUIDE.	54
TABLEAU 3 : RESULTATS DU DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'EXTRAIT BRUT ET DE SES SOUS FRACTIONS.....	56
TABLEAU 4: RESULTATS D'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES SOUS FRACTIONS.....	57
TABLEAU 5 : RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES SOUS FRACTIONS.....	57
TABLEAU 6 : RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE CELLULAIRE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES SOUS FRACTIONS SUR LES FIBROBLASTES HUMAINS WS1.	58
TABLEAU 7 : RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES SOUS FRACTIONS A L'AIDE DU TEST ORAC.	58
TABLEAU 8 : RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES SOUS FRACTIONS.....	59
TABLEAU 9 : RESULTATS D'ANALYSE DU PROFIL D'ACIDE GRAS.....	76
TABLEAU 10: RESULTATS D'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES COMPOSES ISOLES	77
TABLEAU 11: RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES COMPOSES ISOLES.	78
TABLEAU 12 : RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES COMPOSES ISOLES. ..	79

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: LES DEGRÉS DES BRULURES CUTANÉES.....	7
FIGURE 2: <i>CARTHAMUS CAERULEUS</i>	10
FIGURE 3: LES RACINES DE L'ESPÈCE <i>CARTHAMUS CAEULEUS</i>	13
FIGURE 4: PROTOCOLE DE PRÉPARATION TRADITIONNELLE DE LA CRÈME DES RACINES DE <i>CARTHAMUS CAERULEUS</i>	14
FIGURE 5 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ACIDE GALLIQUE.	17
FIGURE 6 : STRUCTURES CHIMIQUES DE BASE DES DIFFÉRENTS FLAVONOÏDES.....	18
FIGURE 7 : STRUCTURE CHIMIQUE DE SAFFLOFLAVANSIDE.....	20
FIGURE 8 : STRUCTURE CHIMIQUE DE CARTHAMINE.	21
FIGURE 9 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'A-AMYRINE (GAUCHE) ET LA B-AMYRINE (DROITE).	23
FIGURE 10. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU PROTOCOLE DE RECHERCHE	33
FIGURE 11: ANALYSE CCM DE L'EXTRACTION LIQUIDE LIQUIDE DE L'EXTRAIT BRUT ET LES FRACTIONS.....	34
FIGURE 12: ANALYSE CCM DES COMPOSÉS 1 ET 2.....	37
FIGURE 13: ANALYSE CCM DE LA FRACTION DE L'ACÉTATE D'ÉTHYLE ET SOUS FRACTIONS.	38
FIGURE 14 : CHROMATOGRAMME HPLC-DAD A 254 NM DE LA FRACTION AB ET LES COMPOSÉS ISOLÉS 3, 4, ET 5 PAR HPLC SEMI-PRÉPARATIVE.....	39
FIGURE 15 : ANALYSE CCM DE LA FRACTION DCM ET SOUS FRACTIONS.....	40
FIGURE 16 : ANALYSE CCM DES COMPOSÉS 6 ET 7.....	41
FIGURE 17 : ANALYSE CCM DU COMPOSÉ 14.	44
FIGURE 18 : ANALYSE CCM DE L'EXTRAIT BRUT ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR SÉPARATION LIQUIDE-LIQUIDE.	55
FIGURE 19 : STRUCTURE DES COMPOSÉS ISOLÉS DE L'EXTRAIT DE <i>CARTHAMUS CAERULEUS</i>	68
FIGURE 20 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA SYRINGINE 1.	69
FIGURE 21 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA SYRINGINOSIDE 2.	69
FIGURE 22 : (4E,6E,12E) -4,6,12-TETRADECATRIENE-8,10-DIYNE-1,3-DIOL 3.....	70
FIGURE 23 : STRUCTURE CHIMIQUE DE SAFYNOL 4.	70
FIGURE 24 : STRUCTURE CHIMIQUE DE 2-METHOXY SAFYNOL 5.	71
FIGURE 25 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ALPHA AMYRINE 6A.....	71
FIGURE 26 : STRUCTURE CHIMIQUE DE BETA AMYRINE 6B.	72
FIGURE 27 : STRUCTURE DE LA SCOPOLETINE 8.	73
FIGURE 28 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ISOHAMNETINE 11.....	73
FIGURE 29 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 3',4'-DIMETHOXY QUERCETINE 12.....	74
FIGURE 30 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 5,7-DIHYDROXY-4'-METHOXYFLAVONE 13.	74
FIGURE 31 : STRUCTURE DE L'ISOSCOPOLETINE 14.....	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACN = Acétonitrile.

AcOEt = Acétate d'éthyle.

ACS = American Chemical Society.

CCM = Chromatographie sur Couche Mince.

COSY = Correlation spectroscopy.

DAD = Diode array detector.

DCM = Dichlorométhane.

DEPT135 = Distortionless enhancement by polarisation transfer.

DMSO = Dimethyl sulfoxide.

HMBC = Heteronuclear multiple-bond correlation.

HPLC = High pressure liquid chromatography.

HSQC = Heteronuclear single quantum coherence.

IC₅₀ = Concentration inhibitrice médiane.

IC₉₀ = Concentration inhibitrice à 90%.

J = Constante de couplage.

LCMS = Liquid chromatography mass spectrometry.

L-NAME = *N*-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride.

LASEVE = Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales.

MeOH = Méthanol.

MS = Mass spectrometry.

NA = Non applicable.

NO = Nitric oxide.

ORAC = Oxygen radical absorbance capacity.

Q-TOF = Quadrupole time of flight.

R_f = Rapport frontal.

RMN = Résonance magnétique nucléaire.

TE = Trolox équivalent.

Tma = Tonnes métriques anhydres.

UV = Ultra-Violet.

DÉDICACE

*À mes chers parents,
Pour votre amour inconditionnel, votre soutien sans faille et vos sacrifices qui m'ont permis de rêver
et de réussir.*

*À mon mari bien-aimé,
Pour ta patience, ton encouragement et ta présence constante à mes côtés dans chaque étape de
ce parcours.*

*À ma petite fille adorée,
Ma source infinie d'inspiration et de joie, qui m'a rappelé chaque jour pourquoi il est important de
persévérer et de croire en l'avenir.*

REMERCIEMENTS

La fin de cette maîtrise s'accompagne d'un profond sentiment d'accomplissement, mêlé à une douce nostalgie en repensant aux moments précieux et aux personnes extraordinaires qui ont contribué à rendre ce parcours inoubliable.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de recherche, André Pichette, ainsi que mes codirecteurs, Jean Legault et Vakhtang Mshvildadze. Leur encadrement bienveillant, leur soutien constant et leur confiance en moi ont fait de ce voyage une expérience d'apprentissage des plus enrichissantes, où j'ai pu évoluer avec assurance et autonomie.

Un merci tout particulier à Yacine Boumghar, dont l'encouragement et les précieux conseils ont été un véritable moteur tout au long de cette maîtrise.

Je tiens à remercier chaleureusement Serge Lavoie pour sa disponibilité et son aide précieuse en RMN, ainsi que Balla Sylla, dont le travail rigoureux, les discussions inspirantes et les conseils avisés ont marqué mon expérience.

Je remercie également tous les membres de l'équipe du laboratoire de Jean Legault, notamment Karl Lalancette et Catherine Dussault, pour leur contribution aux tests d'activités biologiques et leur constante disponibilité.

Un merci spécial à Marie Frissard, ma collègue et surtout mon amie, qui a été ma confidente tout au long de cette aventure. Ta présence m'a apporté une énergie et un soutien inestimables, et je te souhaite tout le succès que tu mérites.

Je n'oublierai jamais les merveilleux moments partagés au sein du laboratoire LASEVE, où j'ai tissé des amitiés sincères avec Christina Thibault, Soazic Lehermet, Joanne Plourde, Sujit Manmode, Antoine Desportes, Louis-Olivier Samson et Dominique Grenier-Pimpare. Ces instants resteront gravés dans ma mémoire.

Enfin, je souhaite adresser ma reconnaissance la plus profonde à ma famille, en particulier à mon père Mohamed Bendou et à ma mère Ourdia Ayadi, qui m'ont toujours encouragée à aller de l'avant et à persévérer dans ce programme exigeant.

Mais surtout, un immense merci à mon mari, Idris Gormit, pour ton soutien inconditionnel tout au long de cette aventure. Tu as été mon roc pendant les moments difficiles, apaisant mes doutes et me rappelant de garder espoir. Ton amour, ta patience et ta compréhension ont été mes plus grandes forces. Maintenant que cette page se tourne, nous pourrons enfin profiter pleinement de notre vie ensemble, sans le poids des études et des examens. Merci pour tout ce que tu es et pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour. Je t'aime, et c'est ce qui compte le plus.

INTRODUCTION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les brûlures constituent un problème de santé publique à l'échelle mondiale, entraînant environ 180 000 décès par an¹. Au Canada, plus de 46 000 brûlures sont signalées chaque année, dont environ 2 100 nécessitent une hospitalisation. Parmi ces cas, près de la moitié concernent des échaudures à 52,3 %, tandis que 29,9 % résultent d'un contact avec des objets brûlants¹. Les principales causes d'échaudures sont les boissons chaudes et l'eau chaude, représentant respectivement 34,1 % et 28,9 % des cas. Concernant les brûlures par contact, les cuisinières et les fours sont responsables de 22,0 % des cas, suivis des foyers et de leurs accessoires avec 19,6 % des cas. Environ 13,0 % des brûlures sont suffisamment graves pour nécessiter une hospitalisation, avec un taux d'hospitalisation particulièrement élevé de 38,9 % chez les personnes exposées à des incendies, à des flammes ou à des fumées¹.

Une brûlure est définie comme une destruction aiguë, partielle ou totale, du revêtement cutané due à une exposition à une chaleur intense ou à des agents physiques ou chimiques^{2,3}. Les brûlures peuvent être classées en fonction de divers critères, tels que leur profondeur, leur étendue et les facteurs individuels du patient, en brûlures mineures, modérées ou graves².

Différents traitements visant à protéger, cicatriser ou désinfecter peuvent être appliqués sur les brûlures cutanées superficielles non infectées, telles que les émulsions cutanées⁴. Dans les cas de brûlures étendues, une cascade de réactions corporelles peut rapidement mettre en danger la vie du patient, rendant nécessaire une intervention chirurgicale, comme la greffe de peau^{5,6,7,8}. Cette procédure implique de prélever un morceau de peau sur une zone saine (généralement la cuisse) pour le greffer sur la zone lésée qui ne peut pas cicatriser seule, et pour éviter l'apparition des désordres cicatriciels il est nécessaire d'utiliser les vêtements compressifs ; une orthèse cutanée qui exerce une pression sur une cicatrice de brûlure⁹.

Cependant, tous ces traitements peuvent comporter des effets secondaires, tels que des infections cutanées, des allergies et des cicatrices inesthétiques, entraînant des préoccupations en raison de leur fréquence et des coûts associés aux soins. Pour répondre à cette problématique, il est

important de trouver des nouveaux produits naturels capables d'identifier les brûlures profondes tout en garantissant une cicatrisation esthétique à un coût abordable⁹.

Au cours des dernières années, les plantes médicinales ont été largement utilisées pour traiter les brûlures cutanées, apportant soulagement de la douleur, contrôle des saignements et accélération du processus de cicatrisation⁹. L'Algérie est riche en biodiversité, avec plus de 4 000 espèces et sous-espèces de plantes identifiées dont 15 % sont endémiques⁹. De nombreuses plantes possèdent des métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques variées⁹. En Kabylie, notamment, la médecine traditionnelle à base de plantes reste un pilier des soins de santé pour une part importante de la population. À Tizi Ouzou, l'utilisation de plantes médicinales est répandue, en particulier chez les personnes âgées (plus de 50 ans), représentant 81,3 % des utilisateurs¹⁰.

Dans le cadre de cette recherche, nous nous intéressons à *Carthamus caeruleus*, dont les racines sont couramment utilisées sous forme de crème semi-solide. Cette crème favorise la réparation de la barrière cutanée, apaise et protège la peau, réduit le risque d'infection et stimule la régénération cellulaire, permettant ainsi la disparition complète des cicatrices¹⁰.

L'objectif est d'identifier et d'analyser les composés bioactifs présents dans ces racines. Ce processus permet de découvrir des substances susceptibles de posséder des propriétés médicinales, telles que des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires ou cytotoxiques. Le laboratoire LASEVE dispose d'une expertise approfondie dans les études phytochimiques, principalement orientées vers l'ethnobotanique. De nombreuses techniques d'extraction, de séparation, de purification et d'identification y sont utilisées. Depuis plusieurs années, le laboratoire s'intéresse à la valorisation d'extraits riches en composés bioactifs pour le développement de différents produits biopharmaceutiques.

Objectifs

Objectif général

- Analyse phytochimique et l'évaluation biologique des racines de *Carthamus caeruleus*

Objectifs spécifiques

Pour atteindre cet objectif, nous devons réaliser les tâches spécifiques suivantes :

- Récolter, sécher et broyer les racines *Carthamus caeruleus*.
- Réaliser une étude phytochimique des racines.
- Évaluer les activités biologiques antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique, et antibactérienne des extraits.
- Isoler et caractériser les composés responsables des activités biologiques.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à la description de l'espèce végétale choisie ainsi qu'aux familles chimiques des composés identifiés dans le genre *Carthamus* sous forme de revue de la littérature scientifique. Le deuxième chapitre décrit en détail les procédures expérimentales mises en œuvre. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus à partir des expérimentations effectuées, accompagné d'une discussion qui met en avant les points essentiels qui en découlent. Enfin, une conclusion suivie de perspectives est proposée à la fin de ce document.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Rappel sur l'anatomie de la peau

La peau est l'organe le plus vaste et le plus lourd du corps humain, représentant environ 16 % du poids corporel total. Elle sert de barrière physique entre l'organisme et l'environnement, offrant une protection contre les agressions mécaniques, thermiques et chimiques¹⁰. La peau permet également la régulation thermique, la production de vitamine D et joue un rôle majeur dans le système immunitaire. Elle est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Chaque couche joue un rôle fondamental dans les fonctions biologiques de la peau et dans sa capacité à se régénérer après une lésion¹¹.

1.1.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau et, à ce titre, il est directement exposé aux agressions extérieures. Il joue un rôle protecteur essentiel contre les agents pathogènes, les radiations UV et les pertes d'eau. Cette couche est principalement constituée de cellules appelées kératinocytes, mais elle renferme également plusieurs autres types cellulaires qui lui confèrent diverses fonctions¹¹.

Les kératinocytes représentent environ 90 % de la population cellulaire de l'épiderme. Leur rôle principal est la synthèse de la kératine, une protéine fibreuse insoluble dans l'eau qui protège la peau des agressions mécaniques et chimique. Les kératinocytes sont organisés en plusieurs couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée, qui est la couche la plus superficielle¹².

Situés dans la couche basale de l'épiderme, les mélanocytes produisent la mélanine, un pigment responsable de la coloration de la peau. La mélanine protège la peau des rayons UV en absorbant la lumière et en réduisant les risques de mutations génétiques qui peuvent entraîner des cancers de la peau¹².

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques qui jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire de la peau. Elles détectent les agents pathogènes et participent à l'initiation des réponses immunitaires de la peau¹³.

Les cellules de Merkel sont localisées dans les couches basales de l'épiderme et se trouvent à proximité des terminaisons nerveuses. Elles sont impliquées dans la sensation tactile et la détection de la pression¹³.

1.1.2 Le derme

Le derme est la couche située sous l'épiderme. Il constitue le tissu de soutien de la peau et contient une variété de structures essentielles au maintien de l'intégrité de la peau, telles que des vaisseaux sanguins, des nerfs, des follicules pileux et des glandes¹⁴. Le derme se compose principalement de tissu conjonctif, constitué de fibres de collagène, d'élastine et de réticuline qui confèrent à la peau sa résistance, son élasticité et sa capacité de régénération¹⁴.

Les fibroblastes sont des cellules du derme responsables de la production de collagène et d'élastine, deux protéines qui donnent à la peau sa fermeté et son élasticité. Les fibroblastes jouent également un rôle clé dans la cicatrisation de la peau après une lésion¹⁵.

Le derme abrite également des cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes qui participent activement aux réponses inflammatoires et à la défense contre les infections. Ces cellules jouent un rôle fondamental dans la réparation des tissus et dans l'élimination des agents pathogènes¹⁵.

Le derme contient également plusieurs structures annexes importantes, notamment les glandes sudoripares, les glandes sébacées et les follicules pileux. Ces annexes sont essentielles pour les fonctions de régulation thermique et de protection de la peau¹⁵.

1.1.3 L'hypoderme

L'hypoderme, ou tissu sous-cutané, est la couche la plus profonde de la peau. Composé principalement de tissu adipeux, il joue un rôle important dans l'isolation thermique du corps, le stockage des graisses et le soutien des organes internes¹⁵. L'hypoderme permet également de protéger les muscles et les os des chocs externes. Les cellules spécialisées dans cette fonction sont les adipocytes, qui stockent les lipides sous forme de graisses¹⁵.

1.2 Définition d'une brûlure cutanée

Une brûlure cutanée est définie comme une lésion tissulaire résultant d'une exposition à des agents thermiques (chaleur), chimiques, électriques ou radiatifs. Elle peut entraîner une destruction partielle ou totale de la peau et des tissus sous-jacents, compromettant l'intégrité et la fonction de la peau, avec des conséquences parfois graves pour la santé de l'individu¹⁶. Les brûlures peuvent altérer la fonction physique (en perturbant la régulation thermique, l'immunité, ou la sensibilité) et entraîner des conséquences esthétiques importantes (cicatrices et déformations)¹⁷.

Les brûlures sont classées en fonction de plusieurs critères, dont le degré de lésion cutanée, la surface corporelle affectée et la localisation des lésions. La prise en charge des brûlures dépend de ces facteurs et nécessite des interventions adaptées pour minimiser les complications et accélérer la récupération¹⁷.

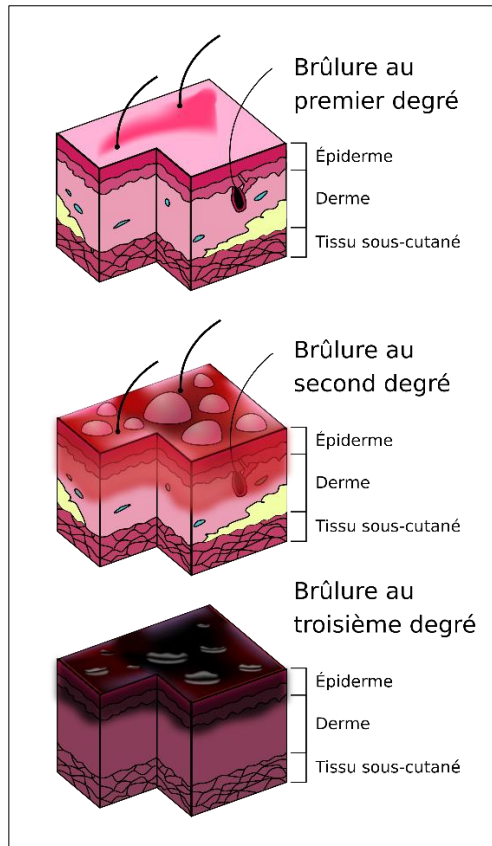
1.2.1 Les différents degrés des brûlures

La classification des brûlures se base principalement sur le degré d'atteinte des couches cutanées, allant du premier au quatrième degré, tel que le montre la figure 1 ci-dessous. Cette classification permet d'évaluer la gravité de la brûlure et de définir les traitements appropriés¹⁷.

1.2.1.1 Brûlure de 1^{er} degré

Une brûlure de premier degré est une brûlure superficielle, limitée à l'épiderme. Elle se caractérise par une peau rouge, douloureuse et parfois légèrement enflée, semblable à un coup de soleil. Ce type de brûlure ne laisse généralement pas de cicatrices après guérison. Histologiquement, seules les couches superficielles de l'épiderme sont atteintes¹⁸. En raison de la faible profondeur de l'atteinte, la cicatrisation se fait spontanément en 3 à 4 jours, sans intervention chirurgicale.

Le traitement des brûlures de premier degré consiste en la gestion de la douleur (analgésiques) et l'application de pansements gras ou de crèmes hydratantes pour maintenir l'hydratation de la peau. Il est également essentiel de protéger la zone touchée des infections en évitant le contact avec des agents pathogènes¹⁹.



Skimel. Burn degrees on human skin diagram in French 2022. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Burn_Degree_Diagram-fr.png.

Figure 1: Les degrés des brûlures cutanées.

1.2.1.2 Brûlure de 2^e degré

Les brûlures de deuxième degré affectent non seulement l'épiderme mais aussi une partie du derme. Elles sont classées en deux sous-types :

- Brûlure superficielle de deuxième degré : Les lésions sont caractérisées par une peau rouge, douloureuse, avec des phlyctènes (cloques remplies de liquide clair). Histologiquement, la brûlure affecte l'épiderme et le derme superficiel, mais la couche basale de l'épiderme est encore intacte²⁰. Ce type de brûlure se cicatrise généralement en 8 à 10 jours sans laisser de cicatrices importantes, bien que des soins appropriés (pansements gras, analgésiques, etc.) soient nécessaires²¹.
- Brûlure profonde de deuxième degré : Les lésions sont plus graves, avec une peau de couleur blanche ou pâle, parfois moins douloureuse en raison de la destruction partielle des

terminaisons nerveuses. Histologiquement, cette brûlure atteint les couches profondes du derme, mais la peau peut encore guérir, bien que la cicatrisation prenne plus de temps²¹. Dans certains cas, une greffe de peau peut être nécessaire si la cicatrisation ne se produit pas naturellement. Ce type de brûlure peut laisser des cicatrices importantes, notamment en raison de la destruction des fibres de collagène et d'élastine²¹.

1.2.1.3 Brûlure de 3^e degré

Les brûlures de troisième degré sont les plus graves, avec une destruction complète de l'épiderme et du derme, et parfois de l'hypoderme. Elles sont caractérisées par une peau dure, sèche, cartonnée, de couleur blanchâtre, brune ou noire, et sont souvent indolores en raison de la destruction des terminaisons nerveuses. La cicatrisation ne peut pas se faire spontanément, et une prise en charge médicale urgente est nécessaire²².

Le traitement de ce type de brûlure comprend généralement l'excision des tissus morts et une greffe de peau pour favoriser la régénération des tissus. La rééducation et le traitement de la douleur peuvent durer plusieurs mois, et les cicatrices laissées par ces brûlures peuvent être sévères, nécessitant des interventions chirurgicales ou esthétiques²².

1.2.1.4 Brûlure de 4^e degré

Les brûlures de quatrième degré sont extrêmement graves et englobent des lésions non seulement de la peau, mais aussi des tissus sous-jacents tels que les muscles, les tendons et parfois les os. La peau devient carbonisée et la lésion est souvent accompagnée de défaillances des organes internes en raison de la destruction des tissus profonds. Ces brûlures nécessitent des interventions chirurgicales d'urgence, y compris des greffes de peau, des amputations dans certains cas, et des soins intensifs pour gérer les complications²².

La prise en charge de ces brûlures repose sur des traitements chirurgicaux, une surveillance clinique et une rééducation post-chirurgicale pour minimiser les pertes fonctionnelles et esthétiques²³.

1.3 Étude botanique

1.3.1 La famille des Astéracées

Les Astéracées font parties d'une famille importante des plantes dicotylédones. Elle est connue sous le nom de famille cosmopolite, car ce sont des plantes à distribution géographique très vaste et répandue dans le monde entier²⁴. Elle se trouve dans les habitats forestiers, les prairies d'altitude et même les espaces verts urbains. Cependant, elle est beaucoup moins fréquente dans les zones tropicales²⁴.

La morphologie des plantes *Asteraceae* est également diversifiée. Certaines espèces sont des arbres atteignant plus de 30 m²⁴. Cependant, d'autres sont des arbustes, et la plupart sont des herbes vivaces ou moins annuelles, allant de tournesols de 1 à 3 m de haut à des formes presque sessiles²⁵. Cette famille comprend plus de 1600 genres et 25000 espèces dans le monde²⁵. Par exemple *Achillea*, *Artemisia*, *Carthamus*, *Dittrichia*, *Helichrysum*, *Jurinea*, *Onopordon*, *Postia*, *Pulicaria*, *Thevenoti*, et *Xanthium*²⁵. La majorité de ces espèces ont des applications thérapeutiques en médecine traditionnelle qui présentent un large éventail d'activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes²⁵.

1.3.2 Genre *Carthamus*

Le nom générique est peut-être dérivé d'un mot arabe, signifiant teinture (Kartam), et rappellerait les propriétés de certaines de ces plantes²⁵. C'est une de plante à fleurs qui a une morphologie proche des chardons²⁵. Le genre *Carthamus* est un membre de la famille des cynarées, sous-familles tubuliflores, et de la famille des Astéracées. Ce genre comprend 20 espèces, se différenciant par leur habitat, leurs caractéristiques botaniques et utilisations²⁶. L'espèce la plus connue est le *Carthamus tinctorius*, ou le carthame des teinturiers²⁶. Ce dernier est cultivé principalement pour ses graines qui sont riches en huile et utilisées à des fins alimentaires et industrielles²⁶. *Carthamus caeruleus* ou le carthame bleu, est souvent cultivée à des fins ornementales ainsi que pour ses graines riches en huile. Ses racines sont utilisées en médecine traditionnelle²⁷.

1.3.3 Description botanique



Araújo, P. V. *Carduncellus caeruleus*. URL: flora-on.pt.

Figure 2: *Carthamus caeruleus*

Tel que le montre la figure 2 ci-dessus, *Carthamus caeruleus* est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, se présentant sous la forme d'une tige dressée, simple ou peu ramifiée, mesurant entre 20 et 60 cm. Elle est glabre ou légèrement velue et possède un rhizome constitué d'une racine principale horizontale et de racines secondaires verticales. Les feuilles, qui peuvent être glabres ou pubescentes, sont fortement nervées et ont une forme ovale ou lancéolée^{27,28}. La plante se distingue par des feuilles inférieures pétiolées et dentées, ainsi que des feuilles supérieures sessiles, amplexicaules ou dentées-épineuses. Ses capitules, qui mesurent environ 3 cm de large sur 3 à 4 cm de long, sont généralement de couleur bleu-violet, bien que certaines variétés puissent produire des fleurs violettes. Les capitules se présentent de manière solitaire au sommet de la tige et des rameaux, avec une forme globuleuse ou ovoïde. Le fruit est un akène, beaucoup plus court que l'aigrette, glabre, subglobuleux ou légèrement tétragone, et de couleur blanchâtre^{28,29}.

1.3.4 Cycle biologique

Carthamus caeruleus est une plante herbacée vivace qui se caractérise par sa capacité à se reproduire à la fois par semence et par drageonnage. Les graines germent généralement à la fin de mars ou au début d'avril, profitant des températures printanières favorables pour initier leur développement^{29,30}.

Les racines de cette plante jouent un rôle crucial dans sa propagation. Elles drageonnent régulièrement, formant de nouveaux plants à partir des racines souterraines. Ce mécanisme permet à *Carthamus caeruleus* de coloniser son environnement de manière efficace, surtout dans des habitats où les conditions sont propices à sa croissance³⁰.

La floraison de *Carthamus caeruleus* a lieu entre mai et juin. Pendant cette période, les capitules, qui peuvent être bleu-violet ou parfois violets, s'épanouissent au sommet des tiges et des rameaux. Ces fleurs attirent divers pollinisateurs²⁷⁻³⁰.

En ce qui concerne la pollinisation, *Carthamus caeruleus* utilise deux méthodes principales. La pollinisation entomophile qui est réalisée par des insectes tels que les abeilles et les papillons, qui se déplacent de fleur en fleur à la recherche de nectar. D'autre part, la pollinisation anémophile, qui se produit lorsque le pollen est dispersé par le vent, peut également contribuer à la fertilisation des fleurs³¹⁻³².

1.3.5 Habitat et répartition géographique

Carthamus caeruleus est une plante qualifiée de rudérale, ce qui signifie qu'elle s'épanouit dans des habitats perturbés ou dégradés³². Elle préfère les terres humifères et légères, riches en matière organique. Cette espèce est particulièrement adaptée à des environnements tels que les chemins, les coupes de bois, ainsi que les champs et jardins qui ont été enrichis en compost ou en fumier. Elle présente une grande flexibilité en matière de conditions de sol, tolérant une large variété de substrats, mais se développe particulièrement bien dans les sols contenant des matières organiques fraîches^{32,33}. Cela lui permet de prospérer dans des milieux où d'autres plantes pourraient avoir du mal à s'établir. *Carthamus caeruleus* est distribué dans diverses régions, notamment en Europe, en Afrique du Nord et du Sud, en Asie, ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud. Toutefois, sa présence en Amérique du Nord reste peu documentée dans la littérature scientifique, et aucune

localisation précise n'est clairement rapportée. En revanche, une autre espèce du même genre, *Carthamus tinctorius*, est bien connue et cultivée au Canada, notamment dans les provinces des Prairies comme l'Alberta. Elle est utilisée dans des essais pour la production de substances pharmaceutiques végétales³⁴. Sa capacité à coloniser différents habitats en fait une espèce commune dans ces régions. En Algérie, cette plante a été observée et collectée dans plusieurs zones, notamment à Bouira, Tizi-Ouzou, Tlemcen, Sétif et Boumerdes³⁵.

1.3.6 Classification botanique

Règne : Plantae ;

Embranchement : Spermaphytes ;

Classe : Magnoliopsida ;

Ordre : Asterales ;

Famille : Asteraceae ;

Sous famille : Carduoideae ;

Groupe : Cardueae ;

Sous-groupe : Centaureinae ;

Genre : *Carthamus* ;

Espèce: *caeruleus* .

Nom français : Cardoncelle bleue

Nom arabe : Kenjdar, Gergaa, Qartum

Nom berbère : Mersgess³⁵.

1.3.7 Utilisations en médecine traditionnelle



© Naziha Bendou, 2024

Figure 3: Les racines de l'espèce *Carthamus caeruleus*

Les racines de *Carthamus caeruleus* L., tel que le montre la figure 3 ci-dessus, sont largement utilisées pour traiter les brûlures cutanées dans les régions de Tizi Gheniff, Tizi Ouzou, Sétif et Boumerdes, sous forme de crème.

Comme l'illustre la figure 4 ci-dessous, la préparation de cette crème commence par l'épluchage et le lavage minutieux des racines. Après cette étape, les racines sont écrasées à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le mélange obtenu est ensuite filtré à l'aide d'un tissu en mousseline, ce qui permet d'extraire un liquide. En quelques minutes, cet extrait liquide se transforme en une crème épaisse. Cette crème est ensuite appliquée directement sur les brûlures cutanées pour favoriser leur guérison^{36,37}.



© Naziha Bendou, 2024

Figure 4: Protocole de préparation traditionnelle de la crème des racines de *Carthamus caeruleus*.

1.4 Composition chimique

1.4.1 Les métabolites secondaires

Contrairement aux métabolites primaires, comme les glucides, les protéines, les acides aminés et les acides nucléiques, qui sont indispensables à des processus vitaux tels que la croissance, le développement, la reproduction, la respiration ou la photosynthèse, les métabolites secondaires remplissent des rôles variés, souvent spécifiques et parfois encore mal compris³⁸. Bien que les métabolites primaires soient essentiels à la survie immédiate, l'absence de métabolites secondaires n'entraîne pas directement la mort d'un organisme, mais peut réduire sa capacité à s'adapter et à prospérer dans son environnement³⁹. Dérivés des métabolites primaires, ces composés agissent comme des molécules spécialisées. Les métabolites secondaires jouent un rôle clé dans les interactions des plantes avec leur environnement. Ils interviennent dans les mécanismes de défense contre divers agents nuisibles, tels que les herbivores, les insectes, les champignons, les bactéries et autres pathogènes³⁹. Ils contribuent également au transport des métaux, à la différenciation cellulaire et à la communication chimique, en particulier dans le cadre de relations symbiotiques avec d'autres organismes⁴⁰. En renforçant les réseaux écologiques auxquels elles appartiennent, ces molécules favorisent l'adaptation et la résilience des plantes face aux défis environnementaux⁴¹.

La répartition et la diversité des métabolites secondaires dans les plantes varient considérablement d'une espèce à l'autre, et ces différences sont largement influencées par des facteurs environnementaux^{42,43}. Le type d'écosystème, la localisation géographique et les conditions climatiques jouent un rôle crucial dans la modulation de ces profils métaboliques⁴⁴. Par exemple, les plantes situées dans des environnements plus stressants, comme les zones sèches ou à forte exposition au soleil, peuvent développer des profils métaboliques spécifiques en réponse aux conditions locales^{45,46}. Cette variabilité peut également résulter d'adaptations génétiques ou de plasticité phénotypique, permettant aux plantes de s'ajuster aux fluctuations environnementales et de maximiser leur survie dans des habitats variés^{47,48,49}.

Les métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les terpènes, jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense des plantes. En plus de leurs fonctions protectrices, ces molécules possèdent des propriétés thérapeutiques notables, notamment des activités anti-inflammatoires, antibactériennes et antioxydantes⁵⁰. Ces caractéristiques font des métabolites secondaires des cibles prometteuses pour le développement de traitements naturels contre diverses affections. Parmi les plantes riches en ces composés, plusieurs espèces du genre *Carthamus*, telles que *Carthamus tinctorius* et *Carthamus caeruleus*, se distinguent par leurs profils métaboliques particulièrement intéressants. Ces plantes sont connues pour contenir des métabolites secondaires aux effets bénéfiques pour la santé humaine⁵¹. Par exemple, l'huile extraite de *Carthamus tinctorius* est utilisée dans des remèdes traditionnels en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, tandis que d'autres espèces du genre montrent des activités antibactériennes. Ces métabolites secondaires peuvent ainsi jouer un rôle crucial dans la prévention et le traitement de maladies, faisant de ces plantes un sujet d'intérêt pour la recherche pharmacologique et la médecine alternative^{51,52,53}.

1.4.1.1 Les composés phénoliques

1.4.1.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent une classe importante de composés phénoliques largement présents dans le règne végétal. Ces molécules, caractérisées par un noyau phénolique

substitué par un ou plusieurs groupes carboxyliques, jouent un rôle essentiel dans la défense des plantes contre les pathogènes, les herbivores et les stress environnementaux^{54,55}. Elles se divisent principalement en deux groupes : les acides dérivés de l'acide benzoïque (comme l'acide gallique) et ceux dérivés de l'acide cinnamique (comme l'acide férulique, *p*-coumarique et caféique). Les acides phénoliques sont souvent liés à d'autres molécules, comme les sucres ou les protéines, sous forme de composés solubles ou insolubles^{56,57}.

Des espèces de *Carthamus* sont reconnues pour leur richesse en acides phénoliques, dont l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide gallique et l'acide coumarique. Ces molécules bioactives possèdent des propriétés thérapeutiques remarquables⁵⁸. Leurs effets antioxydants protègent les cellules contre les dommages liés aux radicaux libres, retardant ainsi le vieillissement cellulaire et prévenant certaines maladies chroniques. Par ailleurs, leurs propriétés anti-inflammatoires contribuent à soulager divers troubles inflammatoires, tandis que leur action antimicrobienne offre une barrière naturelle contre les infections⁵⁹.

À titre d'exemple, de l'acide gallique (voir la figure 5) a été isolé dans le genre de *Carthamus* plus précisément dans l'espèce *Carthamus tinctorius*, où sa concentration varie en fonction des différentes parties de la plante et peut différer d'une espèce à l'autre. L'acide gallique est un acide phénolique aux nombreuses activités biologiques⁵⁹. En tant qu'antioxydant, il protège les cellules contre le stress oxydatif, réduisant ainsi le risque de maladies dégénératives. Il possède également des propriétés anti-inflammatoires, en inhibant les cytokines et les prostaglandines impliquées dans l'inflammation. En outre, l'acide gallique présente des effets antimicrobiens en inhibant la croissance de bactéries, de champignons et de virus⁵⁹. Ces effets ont été largement documentés dans la littérature scientifique, justifiant ainsi l'intérêt pharmacologique de ce composé⁶⁰.

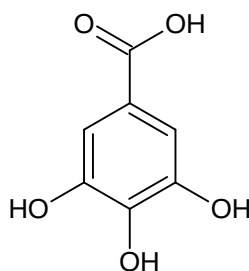


Figure 5 : Structure chimique de l'acide gallique.

La biosynthèse de l'acide gallique chez les plantes commence principalement à partir de la voie du shikimate, qui produit des précurseurs phénoliques comme l'acide p-coumarique⁶¹. Ce dernier est hydroxylé en acide caféique, qui subit ensuite des réactions de méthylation et d'hydroxylation supplémentaires pour former l'acide gallique. Une autre voie implique la dégradation de l'acide ellagique, un flavonoïde, en acide gallique via des enzymes spécifiques. Ce processus est influencé par des enzymes telles que la cinnamate-4-hydroxylase et les méthyltransférases dépendantes de la S-adénosylméthionine⁶¹.

1.4.1.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, tel que le montre la figure 6 ci-dessous, sont une famille de composés phénoliques produits par les plantes, connus pour leurs nombreux bienfaits pour la santé. Ils se distinguent par leur structure chimique basée sur un squelette flavone, qui peut être modifié par des groupes hydroxyles, des méthyles ou des sucres^{62,63}. Présents dans une grande variété de fruits, légumes, thés et plantes médicinales, ils possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Les flavonoïdes jouent également un rôle essentiel dans la pigmentation des plantes, leur protection contre les UV et leur défense contre les pathogènes⁶³.

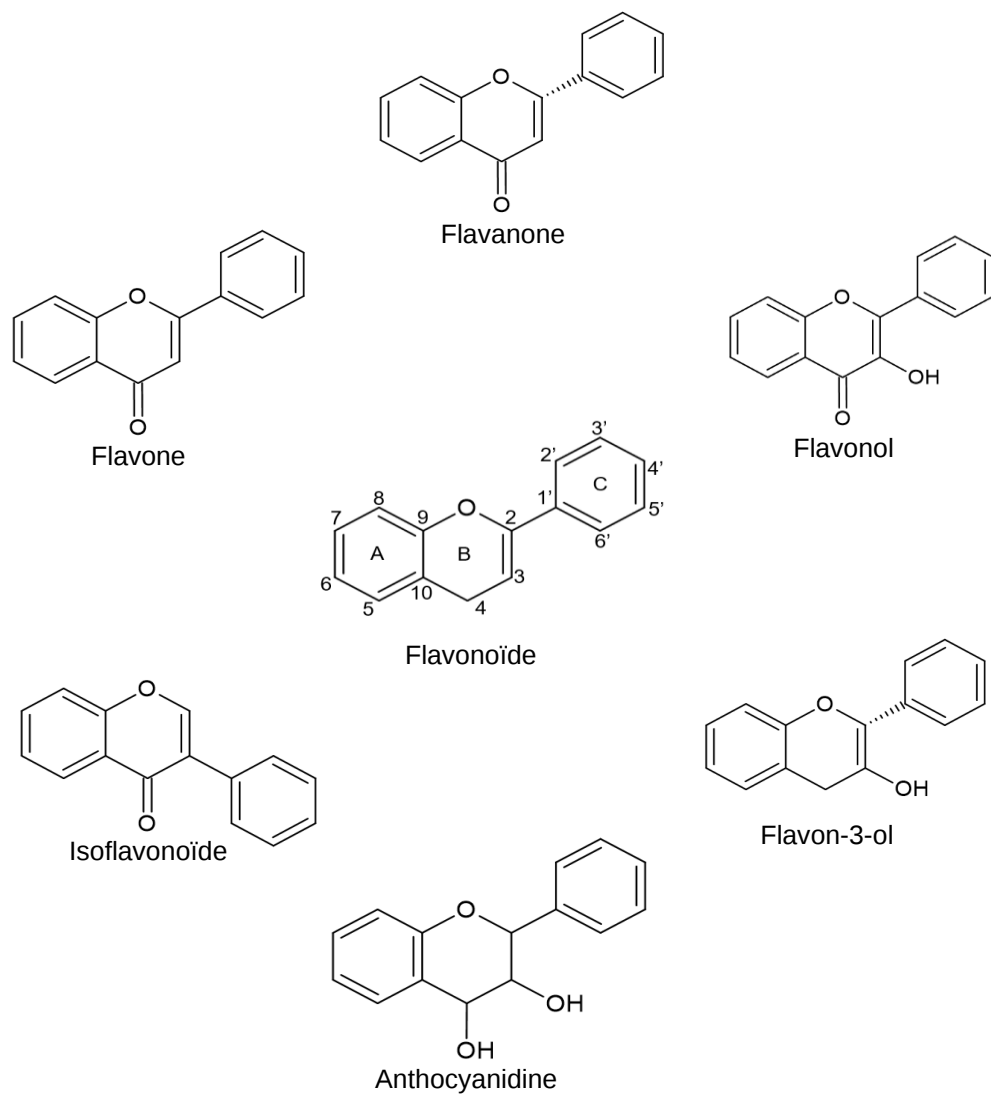


Figure 6 : Structures chimiques de base des différents flavonoïdes.

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs sous-groupes ayant chacun des propriétés spécifiques. Les flavonols, tels que la quercétine, présente dans les oignons, les pommes et les baies, possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, tandis que le kaempférol, trouvé dans le chou frisé, les épinards et le brocoli, est étudié pour ses effets anticancéreux⁶⁴. Parmi les flavones, l'apigénine, isolée dans le persil et le céleri, a des propriétés relaxantes et antitumorales, et la lutéoline, abondante dans le thym et la menthe, est reconnue pour ses effets anti-inflammatoires⁶⁵. Les flavanols, tels que l'épigallocatechine gallate (EGCG) du thé vert, offrent de puissants effets antioxydants, et la catéchine, présente dans le chocolat noir et les pommes, soutient la santé cardiovasculaire⁶⁶. Les flavanones, comme l'hespéridine et la naringénine, retrouvées dans les agrumes, contribuent respectivement à la circulation sanguine et aux réponses antioxydantes et anti-inflammatoires⁶⁶. Les anthocyanidines, représentées par la cyanidine et la pélargonidine, donnent leurs couleurs rouges et violettes aux baies, raisins et fraises, tout en offrant des effets protecteurs pour le cœur et des propriétés anti-inflammatoires⁶⁶. Enfin, les isoflavones, telles que la génistéine et la daidzéine du soja, agissent comme phytoestrogènes et offrent des protections contre l'ostéoporose⁶⁷.

Les flavonoïdes des plantes du genre *Carthamus*, sont essentiels pour leurs propriétés biologiques et leurs multiples applications. Ces composés, comme le saffloflavanside représenté à la figure 7, participent à la pigmentation distinctive de la plante tout en renforçant sa défense contre les stress environnementaux, tels que les rayons UV et les infections⁶⁷. Utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs effets antioxydants et leur capacité à favoriser la circulation sanguine⁶⁷.

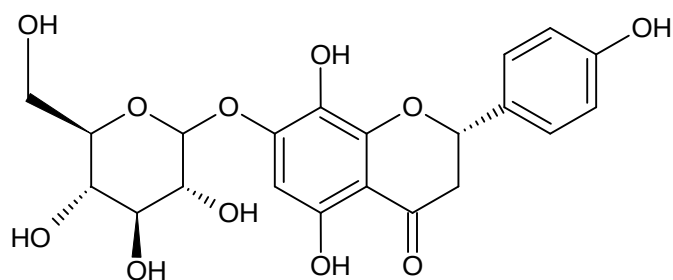


Figure 7 : Structure chimique de saffloflavanside.

La biosynthèse du saffloflavanside dans le carthame des teinturiers (*Carthamus tinctorius*) suit les étapes classiques de la voie des flavonoïdes, issues des voies du shikimate et des polycétides. Elle débute avec la phénylalanine, convertie en acide cinnamique par la phénylalanine ammonialyase (PAL), et le malonyl-CoA, qui fournit les unités carbonées nécessaires⁶⁷. L'acide cinnamique est transformé en acide p-coumarique par la cinnamate-4-hydroxylase (C4H), activé en p-coumaroyl-CoA, puis condensé avec le malonyl-CoA par la chalcone synthase (CHS) pour former la naringénine chalcone. Cette dernière est isomérisée en naringénine, puis modifiée par hydroxylation, méthylation et glycosylation via des enzymes comme les glycosyltransférases (GT), qui ajoutent des sucres au noyau flavonoïde⁶⁷.

1.4.1.1.3 Les chalcones

Les chalcones sont des composés organiques de la famille des flavonoïdes, largement présents dans les plantes. Elles jouent un rôle clé dans le métabolisme végétal et sont souvent considérées comme des précurseurs de flavonoïdes et d'anthocyanines⁶⁸. Leur structure chimique caractéristique se compose de deux anneaux phénoliques (A et B) reliés par un pont méthylène entre les positions 3 et 4, avec une double liaison. Les chalcones peuvent être classées en fonction de leurs substituants, comme les groupes hydroxyles (-OH) ou méthoxy (-OCH₃), et leur position sur les anneaux benzéniques. Cette variation dans la structure influence leur solubilité et leur interaction avec des récepteurs biologiques, ce qui explique la diversité de leurs effets⁶⁹.

Les chalcones se caractérisent par diverses activités biologiques. Elles agissent comme des antioxydants, contribuant à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux

libres⁶⁹. Elles présentent également des propriétés anti-inflammatoires, notamment en modulant les voies inflammatoires et en limitant la production de certains médiateurs. Sur le plan anticancéreux, elles peuvent perturber la prolifération des cellules malignes et favoriser leur destruction. Par ailleurs, elles affichent une activité antimicrobienne, ciblant efficacement certaines bactéries et champignons pathogènes⁷⁰⁻⁷¹.

Les chalcones sont présentes dans plusieurs plantes, y compris le *Carthamus tinctorius*, tels que la carthamine et la safranine, responsables de certaines de ses propriétés thérapeutiques, comme des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antimicrobiens^{72,73}. La carthamine, représentée sur la figure 8, est une chalcone présente dans les racines et les fleurs de *Carthamus tinctorius* (le carthame). Ce composé est largement reconnu pour sa couleur rouge caractéristique et il est utilisé comme pigment naturel dans les produits alimentaires, cosmétiques et textiles⁷⁴. En plus de son utilisation comme colorant naturel, le carthamine possède également des propriétés biologiques intéressantes⁷⁵.

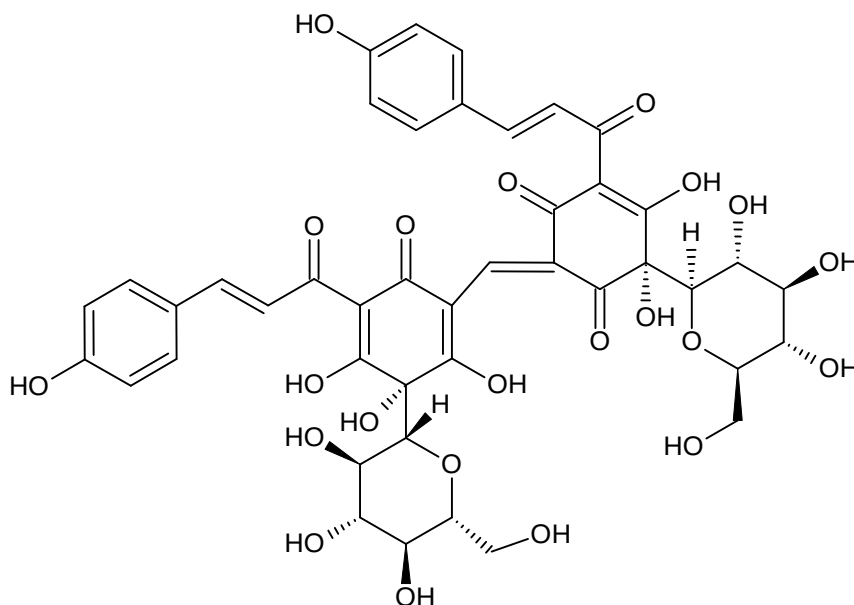


Figure 8 : Structure chimique de carthamine.

La biosynthèse de la carthamine implique plusieurs étapes enzymatiques. Elle commence par la biosynthèse de l'acide shikimique, un précurseur clé des flavonoïdes⁷⁶. L'acide shikimique est converti en p-coumaroyl-CoA, un intermédiaire crucial, par l'action de diverses enzymes. Ensuite, ce

composé est utilisé pour former des chalcones via une réaction catalysée par une chalcone synthase. La chalcone subit plusieurs réactions de cyclisation et d'hydroxylation, formant ainsi des flavonoïdes intermédiaires^{77,79,80}. Ces intermédiaires subissent ensuite des modifications supplémentaires, incluant des méthylations et des hydroxylations spécifiques. La dernière étape de la biosynthèse de la carthamine implique l'addition d'un groupe phénol, aboutissant à la formation de carthamine^{78,79}.

1.4.2 Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille étendue de métabolites secondaires produits principalement par les plantes. Formés à partir d'unités d'isoprène (C_5H_8), ils sont classés en différentes sous-catégories en fonction du nombre d'unités d'isoprène présentes dans leur structure: monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}), et ainsi de suite⁸¹. Ces composés jouent un rôle essentiel dans les interactions écologiques, en tant qu'attractifs pour les pollinisateurs, agents de défense, et signaux chimiques. Les terpènes possèdent également une large gamme d'activités biologiques qui les rendent précieux dans les domaines pharmaceutiques, cosmétique et alimentaire^{82,83}.

Les triterpènes sont des composés organiques naturels caractérisés par une structure chimique complexe comportant 30 atomes de carbone (C_{30})^{84,85}. Ces molécules, souvent présentes sous forme de saponines (triterpènes glycolysés), sont largement répandues dans le règne végétal, sont connues pour leurs multiples effets thérapeutiques. Les triterpènes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antimicrobiennes, et hépato protectrices⁸⁶. De nombreux triterpènes agissent également comme immunomodulateurs et antioxydants, renforçant leur intérêt en pharmacologie^{87,88}.

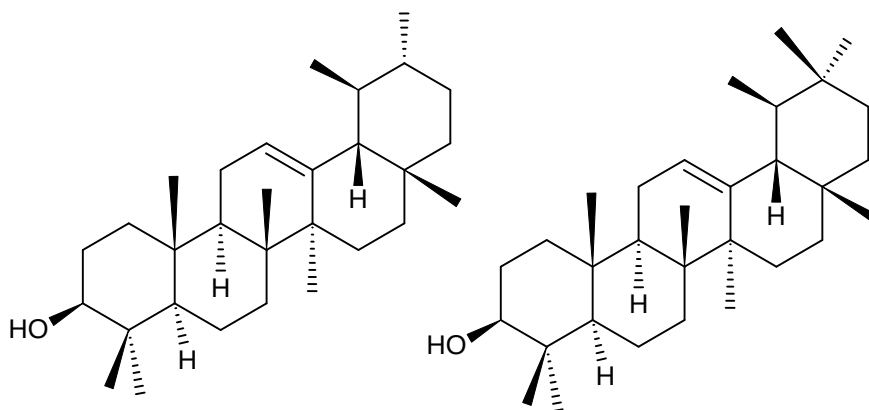


Figure 9 : Structure chimique de l' α -amyrine (gauche) et la β -amyrine (droite).

Les triterpènes sont des composés largement distribués dans le règne végétal, et leur présence est bien documentée dans les plantes du genre *Carthamus*, y compris *Carthamus lanatus*⁸⁹. Parmi les triterpènes identifiés dans ce genre, l' α -amyrine et la β -amyrine sont illustrés sur la figure 9 ci-dessus. Ces deux composés sont des isomères stéréochimiques partageant la même formule chimique ($C_{30}H_{50}O$), mais différant par l'arrangement spatial de certains groupes fonctionnels⁹⁰. L' α -amyrine se caractérise par une configuration chimique spécifique influençant ses propriétés biologiques, tandis que la β -amyrine présente une légère variation dans la configuration des atomes autour du cycle principal. Grâce à leurs propriétés, ces triterpènes trouvent des applications dans divers domaines^{91,92}. En pharmacologie, ils sont étudiés pour leur potentiel dans le traitement des maladies inflammatoires, du diabète et de certains cancers⁹². En cosmétique, leurs propriétés antioxydantes et protectrices les rendent précieux pour des produits de soin de la peau, notamment pour lutter contre le vieillissement et protéger des agressions extérieures^{92,93}.

La biosynthèse des α -amyrine et β -amyrine est un processus complexe qui s'inscrit dans la voie des isoprénoïdes des plantes. Elle débute par la production des précurseurs isopentényl diphosphate (IPP) et diméthylallyl diphosphate (DMAPP), issus de la voie du mévalonate (MVA) ou de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP)⁹⁴. Ces unités servent à former le farnésyl pyrophosphate (FPP), qui est condensé en squalène par la squalène synthase. Le squalène est ensuite oxydé en 2,3-oxydosqualène, précurseur des triterpènes^{94,95}.

La cyclisation de l'oxydosqualène, catalysée par des enzymes spécifiques, détermine la formation des deux composés : l' α -amyrine synthase produit l' α -amyrine, tandis que la β -amyrine

synthase conduit à la β -amyrine. Ces enzymes influencent la configuration spatiale des cycles pentacycliques. Des modifications post-cyclisation, comme l'oxydation ou l'acétylation, diversifient encore ces triterpènes⁹⁴⁻⁹⁶.

1.4.3 Les acides gras

Les acides gras sont des composés organiques constitués d'une chaîne hydrocarbonée (aliphatique) terminée par un groupe carboxyle (-COOH). Ils sont essentiels dans de nombreux processus biologiques et constituent les composants de base des lipides, comme les graisses et les huiles⁹⁷. Les acides gras peuvent être classés en saturés (sans double liaison, comme l'acide palmitique) et insaturés (avec une ou plusieurs doubles liaisons). Ces derniers se divisent en mono-insaturés (par exemple, l'acide oléique, C18:1) et poly-insaturés (comme l'acide linoléique, C18:2, et l'acide linolénique, C18:3)^{98,99}.

Les acides gras jouent des rôles variés dans l'organisme, notamment en tant que source d'énergie après leur métabolisme par β -oxydation. Ils sont également des constituants majeurs des membranes cellulaires sous forme de phospholipides et interviennent dans la signalisation cellulaire en servant de précurseurs à des molécules bioactives telles que les prostaglandines et les leucotriènes. Les acides gras essentiels, comme les oméga-3 et oméga-6, sont cruciaux pour la fonction cellulaire, car ils ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain^{97,98,100}.

Cette importance physiologique des acides gras justifie l'intérêt porté à leur composition dans les sources végétales, notamment chez les espèces du genre *Carthamus*, en particulier *Carthamus tinctorius*, l'huile extraite contient principalement des acides gras¹⁰⁰. L'acide linoléique (C18:2, oméga-6) est l'acide gras prédominant, représentant 60 à 80 % de l'huile de carthame. Cet acide gras est essentiel pour l'inflammation, la fonction immunitaire et la santé cardiovasculaire¹⁰¹. L'acide oléique (C18:1, oméga-9), présent à hauteur de 15 à 20 %, possède des propriétés anti-inflammatoires et est bénéfique pour le métabolisme du cholestérol. Le palmitique (C16:0) et le stéarique (C18:0), des acides gras saturés, se retrouvent également en petites quantités, contribuant à l'énergie et au métabolisme¹⁰².

Les variétés de carthame peuvent être sélectionnées pour produire des huiles avec une forte teneur en acide linoléique ou en acide oléique¹⁰³. L'huile de carthame, riche en acides gras insaturés,

est largement utilisée dans l'alimentation en raison de ses bienfaits pour la santé cardiovasculaire, ainsi que dans l'industrie cosmétique pour ses propriétés hydratantes et antioxydantes. Elle trouve également des applications dans l'industrie pharmaceutique, où les acides gras sont utilisés dans la fabrication de suppléments alimentaires¹⁰⁴.

Tableau 1 : Composés détectés dans les feuilles et les racines de *Carthamus caeruleus*.

Composé	Détecté dans les feuilles	Détecté dans les racines
Acide 2,3-diméthylcinnamique	Non	Oui
Acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque	Non	Oui
Acide dihydroxycinnamique	Non	Oui
Acide caféique	Oui	Non
Acide férulique	Non	Oui
Acide gallique	Oui	Non
Acide hydroxycinnamique	Oui	Non
Acide isovanillique	Non	Oui
Acide m-anisique	Non	Oui
Acide p-coumarique	Oui	Oui
Acide rosmarinique	Non	Oui
Acide tannique	Oui	Oui
Myricétine	Oui	Oui
Quercétine	Oui	Oui
Rutine	Non	Oui
Hespéridine	Non	Oui
Naringénine-7-glucoside	Oui	Non
Lutéoline	Oui	Oui
Orientine	Oui	Oui
Vitexine	Non	Oui
1,2-Dihydroxybenzène	Oui	Non
Caféine	Non	Oui
Coumarine	Oui	Oui
Hydroxy-quinone	Oui	Oui
p-Hydroxybenzaldéhyde	Oui	Oui
Résorcinol	Oui	Oui

Selon la littérature, l'analyse chromatographique HPLC-DAD des extraits aqueux de feuilles et de racines de l'espèce *Carthamus caeruleus* a permis la détection de plusieurs composés. Aucune purification, ni isolation des composés n'a été effectuée. Au total, 22 composés ont été détectés dans les racines et 16 dans les feuilles. L'ensemble des composés détectés est résumé dans le tableau 1 ci-dessus¹⁰⁵.

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Matériel général et instrumentation

2.1.1 Matériel général

2.1.1.1 Solvants

Les solvants utilisés dans ce travail provenaient de Fisher Chemical et ont été choisis en fonction de leur niveau de pureté, adapté à chaque type d'utilisation. Le grade ACS a été utilisé pour les extractions et analyses par CCM, le grade Optima pour un usage analytique et le grade LCMS pour les expériences réalisées avec un spectromètre de masse. Pour les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), les solvants étaient fournis par Sigma-Aldrich et contenaient 99,8 % de deutérium, garantissant leur qualité pour cette technique. L'eau utilisée dans les différentes étapes expérimentales provenait d'un système de purification Milli-Q, équipé d'un filtre de 0,22 µm, afin d'assurer une grande pureté.

2.1.1.2 Chromatographie sur couche mince

Plusieurs chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées pour caractériser les principales familles de composés présents dans l'extrait et les fractions. Les expériences ont été effectuées avec des systèmes d'élution variés, polaires et apolaires, adaptés à la polarité des composés étudiés. Les plaques chromatographiques ont été révélées en utilisant différents réactifs spécifiques à chaque famille de molécules.

Pour les composés polyphénoliques, les plaques ont été traitées avec le révélateur NP-PEG 20 % dans le méthanol, puis examinées sous une lumière UV à 254 nm et 365 nm. Ce révélateur met en évidence différentes familles de composés par apparition de bandes colorées distinctes : bleu pour les acides phénoliques et jaune-vert à orange pour les flavonoïdes. Les composés terpéniques, quant à eux, seront révélés à l'aide de H₂SO₄ (20 % dans du méthanol), suivi d'un chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, avant observation sous UV-visible.

2.1.1.3 Chromatographie sur colonne ouverte

Dans ce projet, la chromatographie sur colonne ouverte a été largement utilisée pour le fractionnement, l'isolation et la purification des composés. Une colonne de verre montée sur un statif servait de support, avec une couche de laine de verre recouverte de sable pour stabiliser la phase stationnaire. Cette dernière a été pesée de manière à obtenir un ratio de 1 g d'échantillon à séparer pour 100 g de phase stationnaire. L'échantillon a été déposé dans la colonne soit sous forme de dépôt liquide soit sous forme de «dry pack» en cas de faible solubilité avec de l'éluant de départ de la colonne.

Deux phases stationnaires étaient utilisées selon la polarité des composés :

- Résine DIAION HP-20 : Cette résine, composée de particules poreuses de polymère styrène-divinylbenzène (250-850 μm , pores de 26 nm), a permis de séparer les composés polaires par adsorption. Les éluants, composés de mélanges d'eau et de méthanol ($\text{MeOH:H}_2\text{O}$), ont été déterminés et ajustés à la suite de essais par CCM, avec une augmentation progressive de la proportion de solvant organique (0 % à 100 %). Après séparation, la résine a été nettoyée à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et reconditionnée à l'eau.
- Gel de silice F60 (40-63 μm , 60 Å) : Utilisé pour les composés apolaires, ce gel repose sur des interactions entre la phase stationnaire et la phase mobile. La migration des composés dépend de leur polarité. Les éluants étant sélectionnés à partir de essais CCM pour garantir une séparation optimale. Les fractions collectées, ont été ensuite évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi.

2.1.2 Instrumentation

2.1.2.1 Chromatographie liquide à basse pression (BP)

La chromatographie liquide à basse pression (BP) Pure Büchi® est un instrument performant pour séparer et fractionner des composés. Cette technique utilise une faible pression pour faire circuler la phase mobile à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Comparée à la

chromatographie liquide à haute pression (HPLC prep), la BP fonctionne à des pressions plus basses, ce qui simplifie son utilisation et réduit les contraintes sur les équipements.

L'appareil BP est généralement équipé d'un détecteur DAD, qui permet de surveiller en temps réel les composés au fur et à mesure de leur élution, grâce à leur absorption spécifique dans une plage de longueurs d'onde déterminée. Cela facilite l'identification des fractions contenant les composés recherchés. Les différentes fractions sont récupérées par un collecteur de fractions automatisé.

L'un des principaux atouts de la BP est sa capacité à gérer un débit de solvant relativement élevé, généralement compris entre 20 et 80 mL/min. Ce débit accélère le processus d'élution par rapport aux techniques gravimétriques tout en offrant un contrôle précis des paramètres opératoires. De plus, les fractions récupérées ont généralement un faible volume, de l'ordre de 5 à 20 mL, ce qui permet un fractionnement plus précis. Ces petits volumes facilitent les analyses ultérieures, comme la CCM ou la spectroscopie, tout en réduisant la consommation de solvant et les manipulations nécessaires.

2.1.2.2 HPLC DAD

L'analyse des extraits et fractions a été effectuée à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplé à un détecteur UV-DAD (Diode Array Detector). Cette méthodologie a complété les techniques de chromatographie sur couche mince (CCM) pour identifier précisément les familles de composés présents dans les échantillons par l'analyse de leur spectre UV, mais aussi pour évaluer la pureté des composés, développer des conditions de séparation sur HPLC semi-préparative.

L'instrument utilisé est un système Agilent 1100® (modules de dégazage et d'injection Agilent 1200), équipé d'une colonne C18 Luna Omega 5 µm (250 x 4,6 mm, 100 Å) de la marque Phenomenex®. La colonne utilisée est spécialement conçue pour séparer les composés polaires et apolaires. Les composés polaires ont été élués avant les composés apolaires, ces derniers étant plus retenus par la colonne. Le système de phase mobile consistait en un mélange d'eau et de méthanol ou acétonitrile, avec une concentration croissante de (méthanol ou acétonitrile) au cours de l'élution.

Le débit a été fixé à 1 mL/min et la colonne a été maintenue à une température constante de 25 °C pour garantir des résultats reproductibles.

Les échantillons ont été préparés dans un solvant adapté, généralement du méthanol, et filtrés à l'aide de filtres PTFE de 0,45 µm pour éliminer les impuretés susceptibles d'obstruer la colonne. Les échantillons ont été injectés à des volumes de 5 à 10 µL selon leur complexité, avec des concentrations adaptées : les extraits complexes à 10 mg/mL, les fractions simplifiées à 5 mg/mL, et les composés purs à 1 mg/mL. Ces concentrations ont été choisies pour respecter les limites de détection et de quantification du système chromatographique. Un blanc composé du solvant de solubilisation a été injecté pour vérifier que les composés observés ne provenaient pas du solvant.

Certains solvants ont été acidifiés à 0,1 % avec de l'acide formique afin d'améliorer la résolution des pics chromatographiques. Le détecteur à barrettes de diodes (DAD) a permis d'obtenir des chromatogrammes à différentes longueurs d'onde, adaptées aux composés analysés. Les longueurs d'ondes choisies étaient 210 nm, 254 nm et 280 nm, 320 nm et 365 nm. Par exemple, les acides phénoliques sont observés de 280 à 320 nm.

2.1.2.3 HPLC semi-préparative

La chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC préparative) est un système similaire à la HPLC analytique, à la différence que les quantités injectées sont plus importantes et que ce procédé permet la collecte de fractions à la sortie de la colonne en se basant sur un mode de détection classique, tel qu'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Les méthodes ont été d'abord développées et optimisées sur une HPLC analytique à l'aide d'une colonne similaire avant d'être transférées au système préparatif. Une séparation sur HPLC analytique est utilisée pour isoler des composés en fractions contenant entre 2 et 10 composés observés. Avec un débit important de solvant (environ 20 mL/min) et à la collecte de fractions, la séparation et l'isolement de composés sont facilités, bien que des extraits trop complexes puissent empêcher une séparation optimale.

Le laboratoire LASEVE dispose d'une HPLC semi-préparative Agilent inclut les modules suivants : un dégazeur DGU-20A, des pompes LC-20AP, un échantillonneur SIL-10AP, un détecteur DAD SPD-M20A permet d'obtenir des chromatogrammes à différentes longueurs d'onde et un

collecteur de fraction automatique FRC-10A (Shimadzu®), équipée d'une colonne C18 (Luna Omega 5 µm, 250 x 21,2 mm, 100 Å) de la marque Phenomenex®. Les échantillons à séparer ont été solubilisés dans un solvant adapté, souvent le méthanol, à des concentrations allant de 100 à 200 mg/mL. Avant injection, ils ont été filtrés à l'aide d'un filtre de 0,45 µm. Dans un premier temps, les extraits ont été injectés à des volumes compris entre 25 et 50 µL afin de valider le gradient à utiliser. Une fois celui-ci confirmé, les volumes d'injection peuvent atteindre jusqu'à 2 000 µL, volume maximal de la boucle d'injection. Le choix du volume a été ajusté pour éviter de saturer le détecteur UV et limiter le nombre d'injections nécessaires.

Les séparations ont été réalisées à l'aide de gradients eau/méthanol selon les composés à analyser, avec un débit compris entre 10 et 30 mL/min. Les fractions collectées ont un volume maximum de 20 mL. Lors du processus, les solvants des fractions collectées ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis l'eau restante est éliminée par lyophilisation (Labconco®).

Les analyses par LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) permettent de détecter et de quantifier les composants d'un extrait tout en fournissant des informations spectrales utiles pour confirmer l'identité des composés, en complément des analyses RMN. L'ionisation est réalisée en mode positif ou négatif selon la nature des composés. Pour ce projet, les composés polyphénoliques ont été ionisés en mode négatif et les terpènes en mode positif. Le rapport m/z obtenu permet de déduire la masse molaire des composés analysés. Cependant, la fragmentation possible lors de l'ionisation peut faire en sorte que le m/z corresponde à un fragment plutôt qu'à la masse exacte du composé.

Les spectres de masse des composés isolés ont été acquis à l'aide d'un système Agilent 1260 Infinity II est composé d'un spectromètre LC/MSD Series Infinity Lab avec une ionisation par électrospray. La colonne utilisée était identique à celle de la HPLC analytique. Aucune séparation étant nécessaire pour les composés purs, un gradient de 20 % à 100 % de méthanol ou d'acétonitrile dans l'eau a été réalisé sur une durée de 15 minutes.

Pour améliorer l'efficacité de l'ionisation, notamment pour les composés phénoliques, les solvants utilisés ont été acidifiés à 0,1 % avec de l'acide formique. Cette acidification facilite particulièrement l'ionisation des composés difficiles à analyser.

Les analyses par HPLC-DAD-Q-TOF ont été réalisées sur un système Agilent 1260 Infinity®. Il est couplé à un spectromètre de masse 6546 Q-TOF. Cette technique combine un analyseur quadripolaire(Q) et un analyseur de type temps de vol (TOF), permettant une identification précise des composés grâce à une haute résolution et une excellente précision massique. La colonne et la méthode utilisées pour l'analyse LC-MS et HPLC-DAD-Q-TOF sont identiques avec une acidification à 0,1 % d'acide formique en plus pour les solvants utilisés en HPLC-DAD-Q-TOF.

2.1.2.4 GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique analytique puissante utilisée pour l'identification et la quantification des composés volatils. Elle est particulièrement adaptée à l'analyse des acides gras, qui peuvent être séparés et détectés avec précision grâce à leurs caractéristiques chimiques et physiques.

Lors de cette étude, les acides gras ont été analysés en utilisant une colonne capillaire SP2560 (100 m x 0,25 mm, 0,25 µm) en silice, qui agit comme échangeuse d'ions pour optimiser la séparation. L'échantillon a été injecté à une température de 225 °C, avec un débit de gaz vecteur (hélium) de 0,8 mL/min. Un mode de split avec un ratio de 10 a été appliqué pour réguler la quantité d'échantillon entrant dans la colonne.

La méthode employée repose sur un gradient de température précis. L'analyse a commencé à 100 °C, maintenu pendant 4 minutes, avant une montée progressive à 240 °C à une vitesse de 3 °C/min. Cette température finale a été maintenue pendant 15 minutes, pour un temps total d'analyse de 65,7 minutes. Ces conditions permettent une séparation efficace des acides gras, en fonction de leur volatilité et de leur polarité.

La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) réglé à une température de 300 °C, assurant une sensibilité élevée pour les composés organiques.

2.1.2.5 RMN

Le laboratoire LASEVE dispose d'un appareil de résonance magnétique nucléaire (RMN) Bruker Ascend 500 MHz®, permettant de déterminer la structure chimique des molécules. Cette technique repose sur l'interaction entre les noyaux atomiques et un champ magnétique puissant

généralisé par un électroaimant supraconducteur. L'appareil est piloté par un ordinateur qui enregistre les spectres. Leur interprétation permet d'étudier la structure chimique et la pureté des échantillons. La RMN a été utilisée pour analyser les composés isolés, en acquérant des spectres 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC). Le solvant choisi, le nombre de scans et la largeur des fenêtres spectrales varient selon la structure chimique du composé et la quantité disponible.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Échantillonnage

Les racines de *Carthamus caeruleus* L. ont été récoltées à l'automne 2020 dans la région de Tizi-Gheniff, située dans la wilaya de Tizi-Ouzou, en Algérie. Après la récolte, les rhizomes ont été découpés puis séchés à température ambiante et conservés à l'obscurité pendant plusieurs semaines, afin de réduire leur taux d'humidité et d'obtenir un produit stable, à l'abri de toute dégradation. Les racines sèches ont présenté une teneur résiduelle en eau inférieure à 10 %, ce qui est conforme aux standards pour les analyses phytochimiques. Une fois séchés, les rhizomes ont été broyés à l'aide d'un robot culinaire Hamilton Beach® jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène. Cette poudre a ensuite été stockée au congélateur à -20 °C pour éliminer toute activité microbienne et enzymatique.

2.2.2 Extraction

La figure 10 résume les différentes étapes utilisées lors de cette recherche : extraction, fractionnement et analyses chromatographiques et spectroscopiques des différentes fractions obtenues.

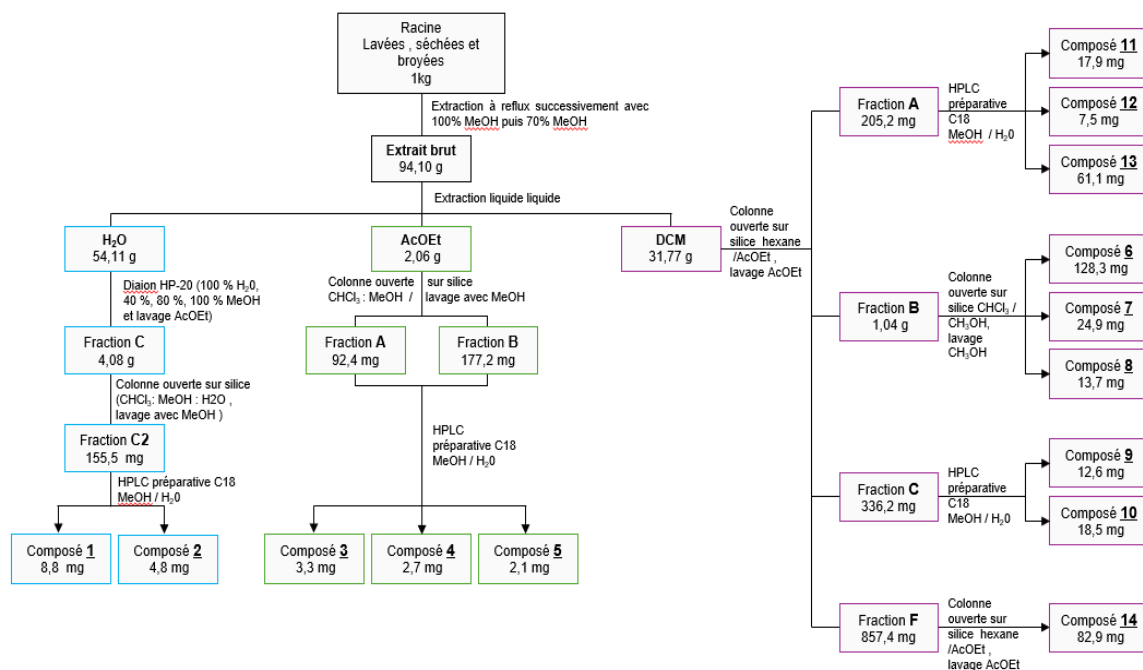


Figure 10. Les différentes étapes du protocole de recherche

2.2.2.1 Extraction à reflux

L'extraction des composés des racines séchées de *Carthamus caeruleus* L. a été réalisée par reflux en utilisant deux solvants : le méthanol pur (100 % MeOH) et un mélange de méthanol/eau (70 % MeOH). La poudre des racines séchées a été soumise à un ratio solvant/matière de 1:10 (v/v) pour une durée d'extraction de 1 heure 30 minutes.

Pour maximiser le rendement, l'extraction avec le méthanol pur a été répétée trois fois, tandis que celle avec le mélange méthanol/eau a été effectuée deux fois. Chaque cycle d'extraction a été suivi d'une filtration sur un entonnoir Büchner équipé d'un filtre Whatman (grade 3).

Une fois les extraits combinés pour chaque solvant, une seconde filtration sur Büchner a été réalisée pour éliminer les impuretés résiduelles. Les extraits filtrés ont ensuite été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à 40 °C. En tout, 1 kg de poudre de *Carthamus caeruleus* a permis d'obtenir 93,8 g d'extrait méthanolique.

2.2.2.2 Extraction liquide – liquide

L'extrait brut méthanolique a été soumis à une série d'extractions liquide-liquide successives en utilisant des solvants de polarité croissante, afin de fractionner les composés selon leurs

caractéristiques chimiques. Cette étape a été réalisée pour séparer les différentes classes de composés présents dans l'extrait brut.

Dans un premier temps, 100 mL d'eau distillée ont été ajoutés à l'extrait méthanolique concentré, et le mélange obtenu a été transféré dans une ampoule à décanter. Une extraction avec le dichlorométhane a ensuite été effectuée en trois cycles successifs, en utilisant environ 500 mL de dichlorométhane pour chaque cycle. Après chaque extraction, les phases aqueuse et organique ont été soigneusement décantées. La phase organique (dichlorométhane) a été récupérée, concentrée, et conservée.

Ensuite, l'extraction liquide-liquide s'est poursuivie en ajoutant de l'acétate d'éthyle à la phase aqueuse restante. Cinq cycles d'extraction ont été réalisés avec 300 mL d'acétate d'éthyle pour chaque cycle. Après chaque extraction, la phase organique contenant l'acétate d'éthyle a été récupérée, concentrée, et conservée.

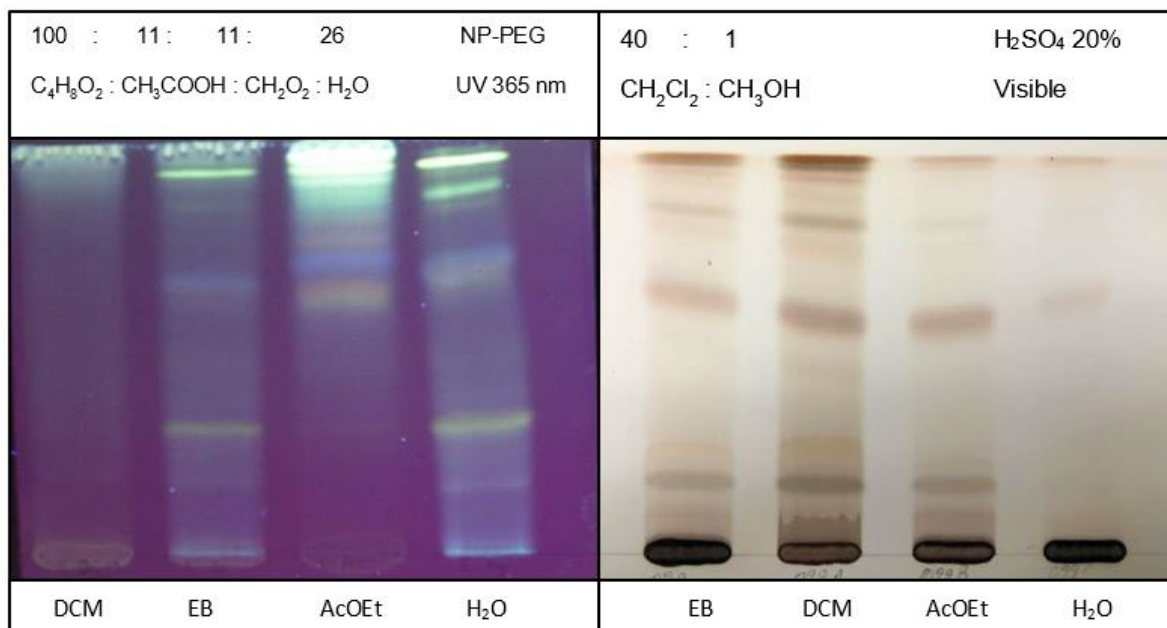


Figure 11: Analyse CCM de l'extraction liquide - liquide de l'extrait brut et des fractions.

Au terme de ces étapes, trois fractions principales ont été obtenues tel que le montre la figure 11 ci-dessus : la fraction dichlorométhane contenant principalement des composés apolaires, la

fraction acétate d'éthyle regroupant des composés de polarité intermédiaire et la fraction aqueuse, enrichie en composés polaires.

2.2.3 Fractionnement et isolation de composés purs

2.2.3.1 Fractionnement de la fraction aqueuse

Suite à l'extraction liquide-liquide de l'extrait brut, trois fractions ont été obtenues : aqueuse, dichlorométhane (DCM) et acétate d'éthyle (AcOEt). Les essais d'activités biologiques réalisés sur ces fractions ont révélé que ce sont principalement les fractions DCM et AcOEt qui présentaient les activités les plus significatives. Dans cette logique, un démarrage du fractionnement bioguidé à partir de ces deux fractions actives aurait été justifié. Cependant, le choix s'est porté sur la fraction aqueuse pour initier le processus de fractionnement, et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, une observation attentive a révélé la présence, de composés de polarité intermédiaire dans la fraction aqueuse, dont certains semblent également présents dans la fraction AcOEt. De plus, la fraction AcOEt, bien que biologiquement active, était obtenue en faible quantité, limitant ainsi les possibilités d'isolation et de purification à cette étape. Ainsi, pour maximiser les chances de récupération de ces composés potentiellement bioactifs et faciliter leur isolement, il a été jugé pertinent d'exploiter en priorité la fraction aqueuse, qui représentait une quantité intéressante.

Le fractionnement de la fraction aqueuse, initialement constituée de 50,16 g d'extrait brut, a été réalisé en deux étapes, en raison de la quantité importante de matière à traiter et des limitations de la capacité maximale de la colonne. Un total de 2,03 g de la fraction aqueuse a été réservé pour des analyses complémentaires, incluant la CCM, la HPLC analytique et les essais d'activités biologiques, réduisant ainsi la masse à fractionner à 48,13 g.

Lors de la première étape, 26,02 g de la fraction aqueuse ont été chargés sur une colonne ouverte contenant 2,5 kg de résine DIAION HP-20. Le volume mort de la colonne était de 5 L. L'extrait, préalablement solubilisé dans une quantité minimale d'eau distillée, a été séparé par une élution successive avec des solvants de polarité croissante (100 % eau, 40 % méthanol/eau, 80 % méthanol/eau, 100 % méthanol, suivie d'un lavage final à l'acétate d'éthyle).

La deuxième étape a été réalisée sur les 21,11 g restants de l'extrait aqueux, en utilisant la même colonne DIAION HP-20, préalablement lavée et régénérée. Les mêmes conditions opératoires ont été appliquées pour ce deuxième fractionnement, permettant de garantir une séparation similaire.

Après chaque étape, les fractions obtenues ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) pour évaluer leur composition chimique. Les fractions présentant des profils similaires ont été regroupées, ce qui a permis de combiner les produits des deux séparations. Au final, quatre sous-fractions principales ont été obtenues à partir de la fraction aqueuse initiale.

2.2.3.1.1 Fractionnement de la fraction C et isolation des composés 1 à 2

L'isolation des composés 1 et 2 a été réalisée en suivant une série d'étapes de purification comprenant une séparation sur colonne ouverte et une chromatographie liquide préparative, permettant d'atteindre des fractions de haute pureté.

La séparation de la fraction aqueuse sur une colonne ouverte de la silice en phase normale avec un gradient de 80 % méthanol a permis d'obtenir la fraction C (4,08 g). L'élution a été réalisée en suivant le gradient suivant : CHCl₃ : MeOH : H₂O (55:15:1, 55:20:1, 26:18:3, 50:30:5, 50:35:6, 50:35:8), suivie d'un lavage final avec 100 % MeOH. Cette étape a permis d'éliminer les impuretés tout en concentrant les composés d'intérêt dans une sous-fraction de 155,5 mg, désignée la fraction C2 tel que le montre la figure 12 ci-dessous.

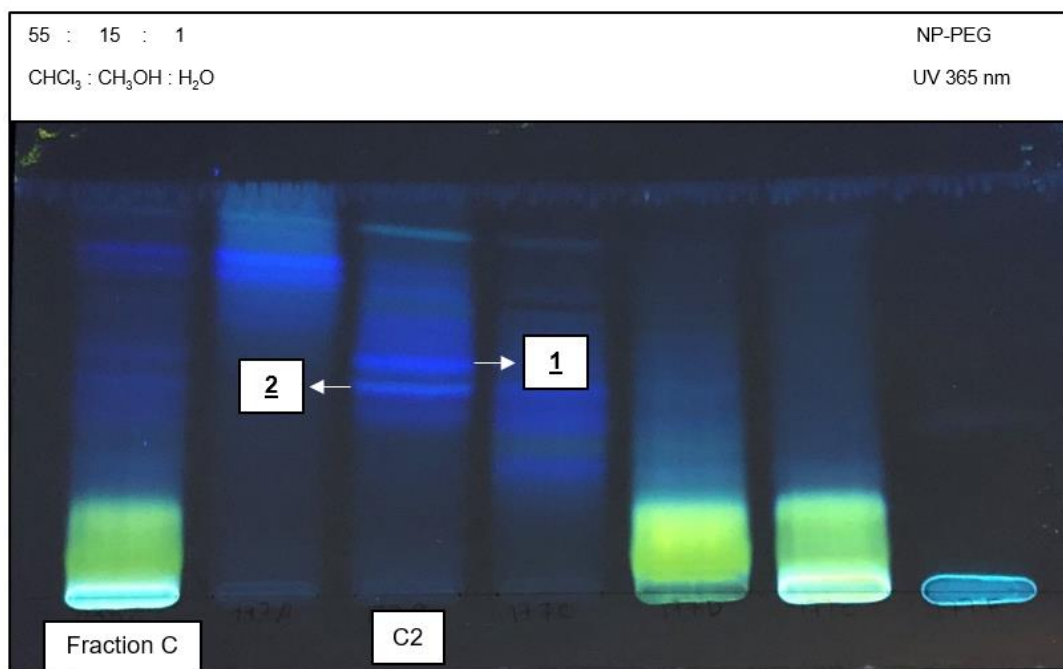


Figure 12: Analyse CCM des composés 1 et 2.

La sous-fraction C2 a ensuite été purifiée par chromatographie liquide préparative (HPLC) en phase inversée sur une colonne C18. Le système de solvants utilisé pour l'élution était binaire : solvant A (Eau + 0,1 % HCOOH) et solvant B (MeOH + 0,1 % HCOOH). Les conditions opératoires incluaient un débit de 1 ml/min, une composition initiale de 90 % A et 10 % B, avec une pression maximale de 400 bars. Cette purification a permis d'isoler deux composés : 1 (m = 8,8 mg) et 2 (m = 4,8 mg).

2.2.3.2 Fractionnement de la fraction d'acétate d'éthyle

La fraction d'acétate d'éthyle pesant 1,69 g a été soumise à un processus de fractionnement pour isoler et caractériser ses composants chimiques. Le fractionnement a été réalisé sur une colonne contenant 170 g de gel de silice. La séparation a été effectuée en utilisant un total de 800 mL de différents mélanges d'éluateurs composés de chloroforme, de méthanol et d'eau selon les proportions suivantes : chloroforme/méthanol (10:1), chloroforme/méthanol/eau (26:14:1, 26:14:3, 26:18:3) et méthanol pur (lavage). Après le fractionnement, les fractions collectées ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) pour évaluer leur composition chimique. Cette analyse

a permis de regrouper les fractions présentant des profils similaires. En regroupant ces fractions, sept sous-fractions principales ont été obtenues à partir de la fraction initiale d'acétate d'éthyle tel que le représente la figure 13 ci-dessous.

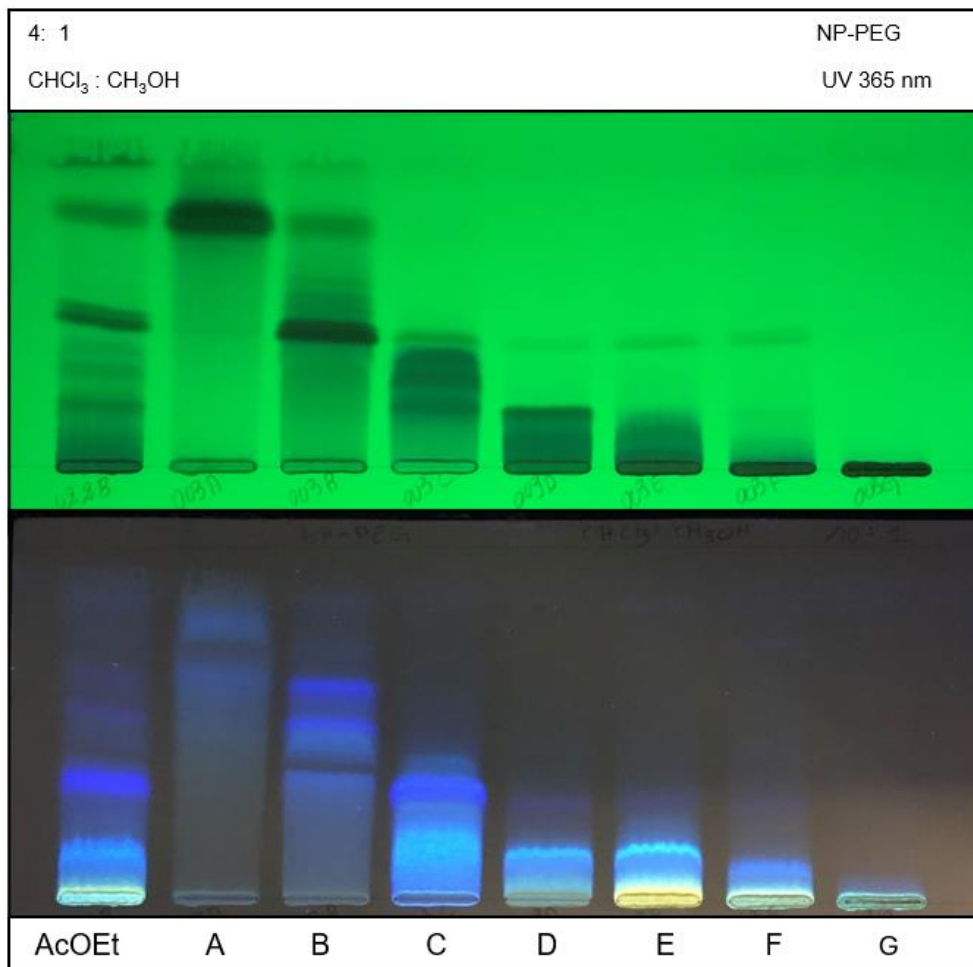


Figure 13: Analyse CCM de la fraction de l'acétate d'éthyle et sous fractions.

2.2.3.2.1 Fractionnement de la fraction A et B et isolation des composés 3 à 5

Le fractionnement a été réalisé sur le mélange de la fraction A et la fraction B à l'aide d'une chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative. Les échantillons ont été injectés dans le système en utilisant les conditions suivantes : un volume d'injection de 200 μ L, une concentration de l'échantillon de 240 mg/mL, une colonne de type C18, avec comme solvants le méthanol (MeOH) et l'eau (H_2O). La durée totale de la méthode était de 30 minutes, et le débit était fixé à 20 mL/min.

Le gradient d'élution utilisé pour cette analyse était le suivant : de 0 à 15 minutes, 45 % MeOH - 45 % H₂O ; de 15 à 16 minutes, une transition de 45 % à 51 % MeOH ; de 16 à 20 minutes, une évolution de 51 % à 55 % MeOH ; de 20 à 21 minutes, une augmentation de 55 % à 100 % MeOH ; enfin, de 21 à 30 minutes, un maintien à 100 % MeOH.

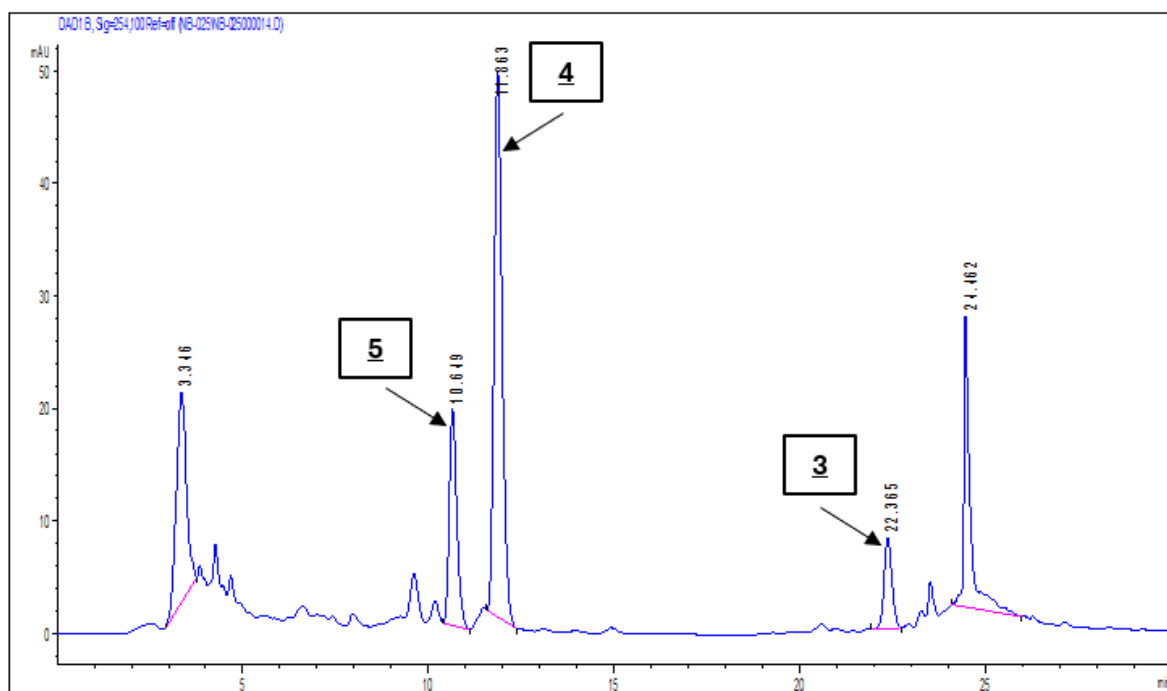


Figure 14 : Chromatogramme HPLC-DAD à 254 nm de la fraction AB et les composés isolés 3, 4, et 5 par HPLC semi-préparative.

Cette séparation a permis d'isoler cinq composés distincts tel que le montre la figure 14 ci-dessous. Cependant, seuls trois d'entre eux ont été identifiés avec succès, à savoir le composé 3 (3,3 mg), le composé 4 (2,7 mg) et le composé 5 (1,1 mg). Les quantités relativement faibles des composés récoltés s'expliquent principalement par la présence d'une fuite dans le système de chromatographie liquide au cours de l'expérience. Cette anomalie a entraîné une perte de l'échantillon injecté et a affecté les rendements finaux.

2.2.3.3 Fractionnement de la fraction dichlorométhane

La fraction obtenue au dichlorométhane, pesant 9,67 g, a été purifiée en vue d'isoler ses constituants chimiques tel que le montre la figure 15 ci-dessus. Ce fractionnement a été réalisé à l'aide d'une colonne chromatographique contenant 1 kg de gel de silice, dont le volume mort a été déterminé à 2 L. La séparation a été effectuée à l'aide de divers mélanges d'éluants composés d'hexane et d'acétate d'éthyle, selon les proportions suivantes : hexane (100 %), hexane/acétate d'éthyle (80:1, 40:1, 20:1), et un lavage final avec de l'acétate d'éthyle.

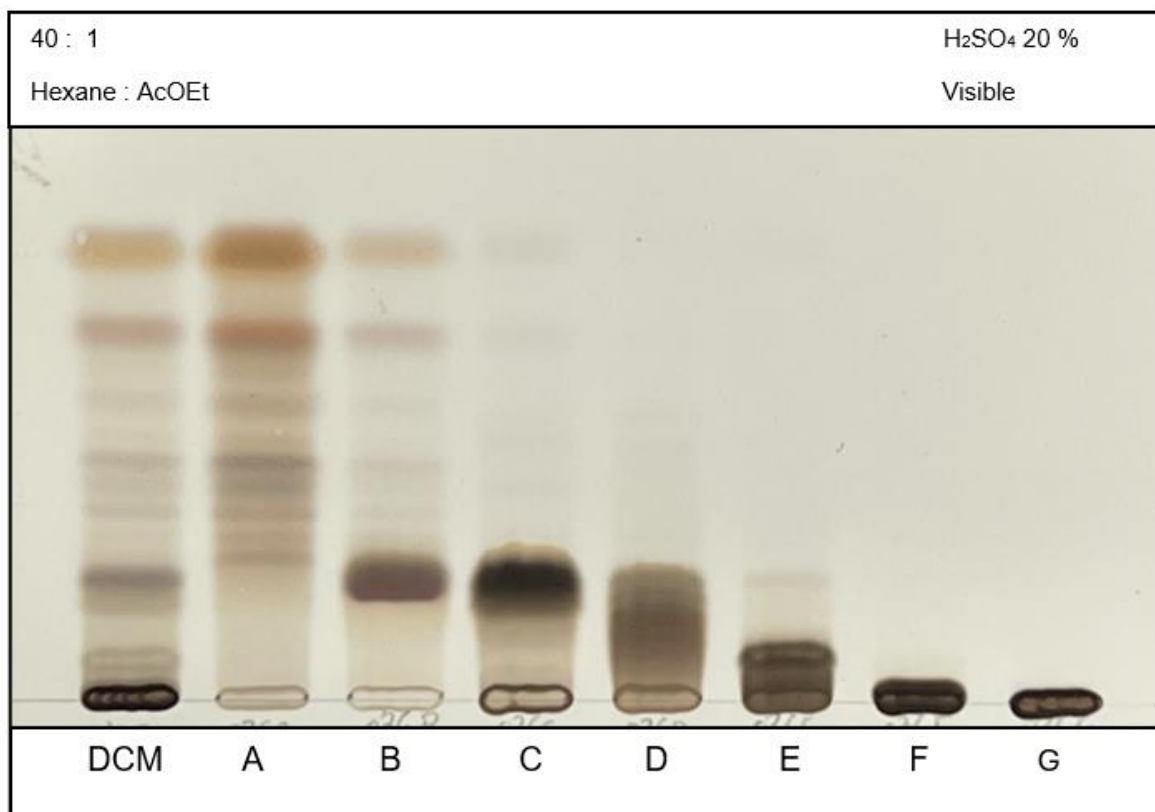


Figure 15 : Analyse CCM de la fraction DCM et sous fractions.

Les fractions obtenues ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) afin d'évaluer leur composition chimique. Cette analyse a permis de regrouper les fractions présentant des profils chromatographiques similaires. Après regroupement, sept sous-fractions principales ont été isolées à partir de la fraction initiale d'acétate d'éthyle. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15 ci-dessus.

2.2.3.3.1 Fractionnement de la fraction B et isolation des composés 6 et 7

Les composés 6 et 7 ont été isolés à partir de la fraction B, d'une masse de 1,04 g, par un fractionnement réalisé sur une colonne chromatographique contenant 105 g de gel de silice. La séparation a été effectuée en utilisant des éluants de polarité croissante, composés d'hexane et d'acétate d'éthyle, selon les proportions suivantes : hexane pur (100 %), hexane/acétate d'éthyle (80:1, 40:1), et un lavage final à l'acétate d'éthyle pur.

Les fractions obtenues ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) pour évaluer leur composition chimique. Cette méthode a permis d'identifier les fractions présentant des profils chromatographiques similaires, qui ont ensuite été regroupées. À l'issue de ce processus, sept sous-fractions principales ont été obtenues comme le montre la figure 16 ci-dessous. Parmi elles, seuls les composés 6 (182,3 mg) et 7 (24,9 mg) ont été obtenus à partir de la fraction B, tel que le montre la figure 16 ci-dessous.

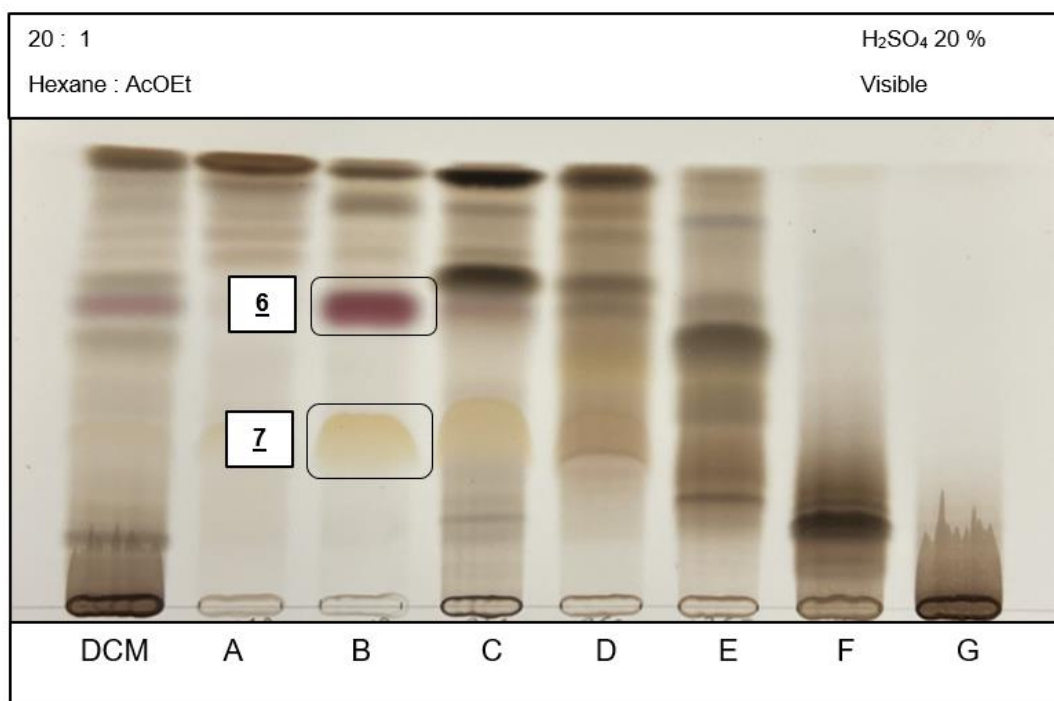


Figure 16 : Analyse CCM des composés 6 et 7.

2.2.3.3.2 Fractionnement de la fraction C et isolation des composés 8 à 10

Une chromatographie liquide haute performance (HPLC) en mode semi-préparatif a été réalisée pour isoler trois composés. Les conditions expérimentales étaient les suivantes : un volume d'injection de 200 µL d'une solution à une concentration de 226,8 mg/mL dans le méthanol, un débit d'élution fixé à 20 mL/min, et un gradient d'élution allant de 15 % à 100 % de méthanol dans l'eau sur une durée de 20 minutes. Cette phase a été suivie d'un lavage isocratique de la colonne avec du méthanol pur pendant 10 minutes.

Les fractions ont été collectées à raison de 10 mL par fraction, permettant une séparation efficace des composés présents dans le mélange initial. À l'issue de cette séparation, trois composés principaux ont été isolés : le composé 8 (13,7 mg), le composé 9 (12,6 mg) et le composé 10 (18,5 mg).

2.2.3.3.3 Fractionnement de la fraction A et isolation des composés 11 à 13

Le fractionnement a été réalisé sur l'HPLC semi préparative sur la fraction A pour séparer et isoler des composés purs. Les paramètres de l'expérience étaient les suivants : un volume d'injection de 200 µL d'une solution méthanolique à une concentration de 205,2 mg/mL, un débit d'élution de 20 mL/min, et un gradient d'élution en deux étapes. La première étape a fait varier la proportion de méthanol dans l'eau de 30 % à 50 % sur une durée de 15 minutes, suivie d'une deuxième étape allant de 50 % à 100 % en 10 minutes. Un lavage final isocratique de la colonne avec du méthanol pur a été réalisé pendant 5 minutes.

Les fractions, collectées par volumes de 8 mL, ont permis une séparation précise des constituants du mélange initial. Cette technique a abouti à l'isolement de trois composés distincts : le composé 11 (17,9 mg), le composé 12 (7,5 mg) et le composé 13 (61,1 mg).

2.2.3.3.4 Fractionnement de la fraction F et isolation du composé 14

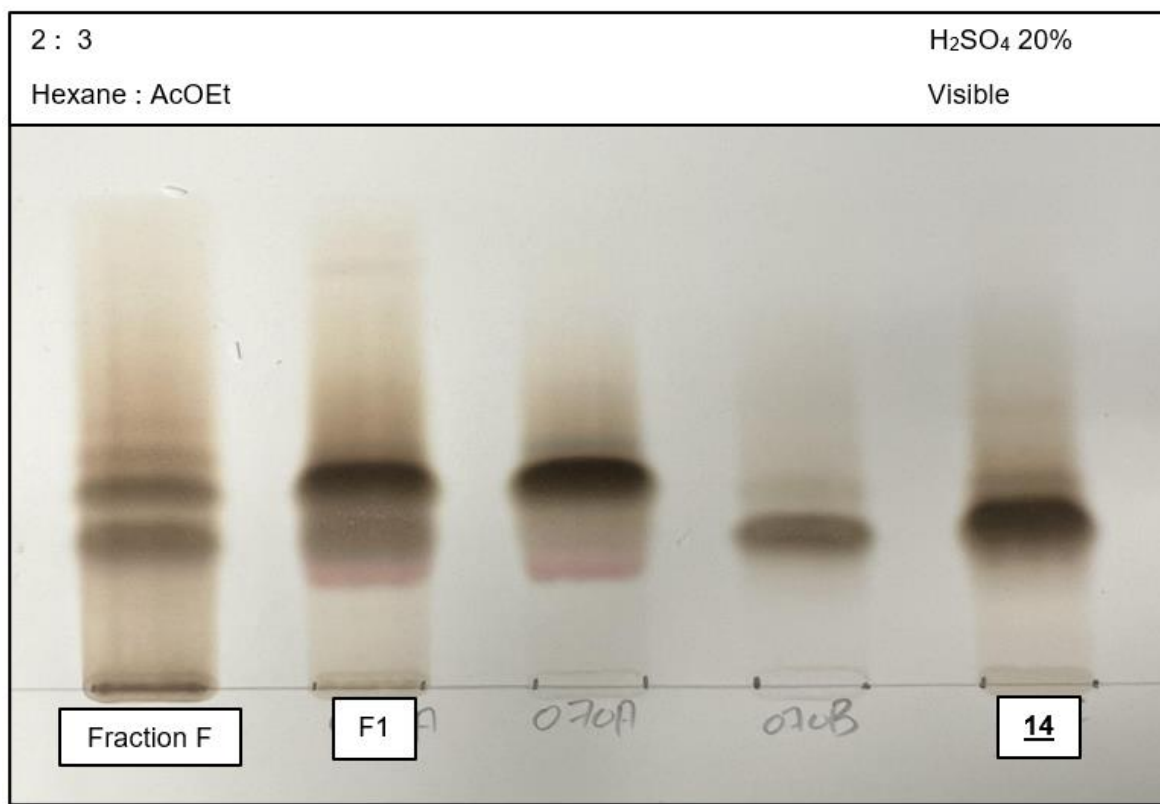


Figure 17 : Analyse CCM du composé 14.

Une chromatographie basse pression a été réalisée pour séparer la fraction F (805,2 mg). L'expérience a été menée à l'aide d'une colonne générique de silice de 80 g, avec un débit d'élution fixé à 25 mL/min. Une phase d'équilibration de 10 minutes a été effectuée avant l'élution, et l'analyse s'est déroulée sur une durée totale de 55 minutes en mode flash, avec un échantillon sous forme liquide. L'appareil utilisé pour cette séparation était un système chromatographique de type C-815. L'élution a été réalisée en utilisant un mélange de solvants composé d'hexane (solvant A) et d'acétate d'éthyle (solvant B). Le gradient d'élution a débuté avec 50 % du mélange AB pendant les 5 premières minutes, suivi d'une augmentation à 60 % sur les 5 minutes suivantes, puis à 70 % jusqu'à 40 minutes. L'élution s'est poursuivie avec 100 % du mélange AB entre 40 et 50 minutes, avant de maintenir cette proportion jusqu'à la fin de l'analyse à 55 minutes.

La détection des composés a été assurée par deux techniques complémentaires : l'UV et l'ELSD. Pour la détection UV, un seuil de 0,05 AU, avec une sensibilité faible a été utilisé, et les

longueurs d'onde de 254, 280, 320 et 365 nm ont été explorées, avec un balayage spectral allant de 254 à 400 nm. En complément, l'ELSD a été réglé sur une sensibilité faible avec un seuil de détection de 20 mV. Seules les fractions présentant des pics chromatographiques ont été collectées, chaque fraction ayant un volume de 8,5 mL. Cette méthode a permis d'isoler plusieurs fractions dont la fraction F1 (140,9 mg). Cette dernière a ensuite été soumise à un re-fractionnement sur une colonne chromatographique contenant 15 g de gel de silice, avec un volume mort déterminé à 30 mL. La séparation a été réalisée en utilisant une série de mélanges d'éluants constitués d'hexane et d'acétate d'éthyle. Les proportions appliquées étaient les suivantes : hexane/acétate d'éthyle (70:1, 50:1, 20:1), suivies d'un lavage final avec de l'acétate d'éthyle. Cette analyse a permis d'isoler plusieurs composés, dont le composé **14**, obtenu avec une masse de (82,9 mg) tel que le montre la figure 17 ci-dessus.

Afin d'optimiser le système éluant pour la séparation sur colonne de silice, des analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées. L'objectif de ces essais n'était pas d'identifier de manière exhaustive tous les composés présents, mais de visualiser efficacement leur migration en fonction des solvants testés. Ainsi, le choix du révélateur s'est fait en fonction de la nature chimique supposée des composés. Lorsque ceux-ci étaient connus pour appartenir à une classe spécifique, telle que les composés phénoliques, le révélateur NP/PEG a été directement utilisé. Dans d'autres cas, notamment lorsque la nature des composés était moins spécifique ou pour une révélation plus générale, l'acide sulfurique (H_2SO_4) a été privilégié. Par conséquent, une seule image de plaque révélée est présentée pour chaque CCM, correspondant au révélateur le plus adapté au type de composé ciblé, sans recourir systématiquement à une double révélation par NP/PEG et H_2SO_4 .

2.2.4 Analyse du profil des acide gras

L'analyse du profil des acides gras des racines de *Carthamus caeruleus* est une analyse pour caractériser les composés lipidiques. Cette analyse implique trois étapes principales : l'extraction des lipides, leur conversion en esters méthyliques d'acides gras (FAMES), et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à un spectromètre de masse (GC-MS).

L'extraction des lipides a été réalisée en utilisant la méthode Soxhlet, qui repose sur le principe de l'extraction par solvant à chaud. Le protocole utilisé est le suivant : 20 g de poudre végétale séchée sont placés dans une cartouche de cellulose, puis extrait avec 250 mL d'hexane (200 mL initiaux, complétés par 50 mL au cours de l'extraction pour éviter l'assèchement du ballon), pendant 2 heures à reflux à une température d'environ 69 °C. Le processus consiste à porter l'hexane à ébullition, permettant au solvant d'extraire les composés lipophiles de l'échantillon. Une fois l'extraction terminée, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu représente la fraction lipidique brute de l'échantillon.

Pour rendre les acides gras compatibles avec l'analyse GC-MS, ils sont transformés en esters méthyliques par une réaction de transestérification. À cet effet, 50 mg de lipides bruts sont dissous dans 2 mL d'hexane, puis 2 mL d'une solution de méthanol/acide sulfurique (2 % v/v H₂SO₄ dans le méthanol) sont ajoutés. Le mélange est ensuite chauffé à 70 °C pendant 40 minutes dans un bain-marie, avec agitation occasionnelle. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1 mL d'eau distillée, puis les FAMES sont extraits à l'aide de 2 mL d'hexane. La phase organique est ensuite récupérée, séchée sur du sulfate de sodium anhydre, puis filtrée avant injection. Cette étape permet d'obtenir des composés volatils et thermiquement stables, prérequis pour l'analyse en phase gazeuse.

L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée en mode d'ionisation par impact électronique (EI), permettant l'identification des FAMES en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres de fragmentation à une base de données de référence.

2.2.5 Dosage des phénoliques

La quantification des composés phénoliques dans les extraits et fractions a été effectuée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour cela, un volume de 50 µL d'une solution d'analyte à des concentrations croissantes (comprises entre 0,39 et 50 mg/mL dans l'éthanol) a été mélangé avec 25 µL de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué dans de l'eau (1 : 2, v/v) dans des plaques à 96 puits (NUNC). Après un délai de 5 minutes, 125 µL d'une solution de carbonate de sodium décahydraté (20 g/100 mL) a été ajouté, et l'absorbance a été mesurée à 758 nm à l'aide d'un lecteur de plaques automatique (Varioskan Ascent®). La valeur d'absorbance du blanc (éthanol sans analyte) a été déduite des mesures pour chaque échantillon. Les résultats ont ensuite été exprimés en

équivalents d'acide gallique en se basant sur une courbe d'étalonnage établie simultanément à partir de ce composé de référence. Chaque essai a été réalisé en triplicata sur une même plaque, et les échantillons ont été analysés deux fois, à deux mois d'intervalle.

2.2.6 Activités biologiques

Afin d'évaluer le potentiel antibrûlure et cicatrisant de *Carthamus caeruleus*, il est pertinent d'étudier certaines activités biologiques incluant les activités cytotoxique, anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne. Ces activités permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'extrait et les composés isolés peuvent favoriser la guérison et la réparation cutanée. L'évaluation de la cytotoxicité vise à déterminer la capacité d'un extrait à altérer la viabilité cellulaire¹⁰⁶. Dans le cadre du développement d'un traitement pour les brûlures, il est important de s'assurer que les composés bioactifs présents ne sont pas toxiques pour les cellules cutanées normales, impliqués dans la production de collagène et la reconstruction du derme¹⁰⁶.

Lorsqu'une brûlure survient, elle provoque une lésion des tissus cutanés qui déclenche une réponse inflammatoire immédiate. Cette réaction, indispensable à la défense de l'organisme, est médiée par l'activation de cellules immunitaires telles que les macrophages et les neutrophiles, qui libèrent divers médiateurs chimiques pro-inflammatoires, notamment les cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α), les prostaglandines, et le monoxyde d'azote (NO). Ces molécules interviennent dans la lutte contre les agents pathogènes et la dégradation des tissus nécrosés. Toutefois, une production excessive de ces médiateurs peut entraîner des effets délétères tels qu'un œdème, une vasodilatation importante, une douleur accrue et, surtout, un ralentissement du processus de cicatrisation en raison d'un stress cellulaire prolongé¹⁰⁷. Un extrait anti-inflammatoire peut permettre de réduire la production excessive de médiateurs tout en conservant une inflammation contrôlée, propice à la régénération tissulaire¹⁰⁸.

Les brûlures induisent un stress oxydatif important, se traduisant par la production massive de radicaux libres, principalement des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce phénomène résulte de plusieurs facteurs, notamment la rupture des membranes cellulaires, l'activation des cellules immunitaires et la mort cellulaire secondaire¹⁰⁹. Les radicaux libres ainsi générés exercent une action délétère sur les cellules environnantes en oxydant les lipides membranaires (provoquant une

peroxydation lipidique), les protéines structurales et l'ADN cellulaire. L'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait permet de déterminer sa capacité à neutraliser ces radicaux libres. Une forte activité antioxydante traduit une aptitude à protéger les cellules viables contre les dommages oxydatifs, à limiter les altérations cellulaires secondaires et favorise une cicatrisation plus rapide et plus efficace¹¹⁰.

Les brûlures détruisent la barrière protectrice de la peau, ce qui rend le tissu exposé vulnérable à l'invasion de bactéries, comme *Staphylococcus aureus* et d'autres germes opportunistes¹¹¹. Ces microbes peuvent provoquer des infections secondaires qui ralentissent la cicatrisation et peuvent, parfois, entraîner des complications graves comme des surinfections chroniques¹¹¹. Il est donc important de tester l'activité antibactérienne d'un extrait afin de vérifier sa capacité à empêcher la prolifération de ces bactéries au niveau de la plaie. Un extrait ayant une bonne activité antibactérienne permet de réduire le risque d'infection et de maintenir un environnement propre, favorable à la régénération des tissus par les fibroblastes et les kératinocytes¹¹¹.

2.2.6.1 Activité cytotoxique

L'évaluation de l'activité cytotoxique constitue une étape cruciale dans le développement de traitements anticancéreux¹¹². Ce processus vise à déterminer l'effet d'agents chimiques ou naturels sur la viabilité cellulaire, en ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines⁸⁵. Dans le cadre de ce projet, l'activité cytotoxique a été évaluée sur des cellules cancéreuses de poumon (A549) et de côlon (DLD-1), ainsi que sur des fibroblastes de peau sains (WS-1), en utilisant des techniques basées sur la fluorescence pour mesurer leur impact sur la viabilité cellulaire.

La cytotoxicité des extraits a été mesurée à l'aide de deux tests complémentaires employant des fluorochromes distincts : la résazurine et le Hoechst. La résazurine est une molécule non fluorescente qui, lorsqu'elle est métabolisée par des cellules vivantes, se transforme en résorufine fluorescente. Ce test permet de quantifier le nombre de cellules vivantes et donc de mesurer indirectement la cytotoxicité des composés à travers l'activité métabolique des cellules. Le Hoechst, quant à lui, est un agent intercalant qui s'insère entre les bases de l'ADN et devient fluorescent. La

fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN présent, reflétant le nombre total de cellules.

Les essais ont été réalisés dans des microplaques à 96 puits à fond plat. Chaque puits était ensemencé avec 5×10^3 cellules de l'une des trois lignées et incubé à 37 °C pendant 16 heures pour permettre l'adhésion des cellules. Par la suite, des concentrations croissantes des extraits, allant de 1,56 à 200 µg/ml, ont été ajoutées aux puits, en veillant à ce que la concentration en DMSO soit inférieure à 5 % (v/v) pour éviter toute toxicité non spécifique. Les plaques ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C.

Pour le test à la résazurine, une solution à 2 % de fluorochrome a été ajoutée dans chaque puits, suivie d'une incubation de 2 heures. La fluorescence émise par la résorufine a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre automatisé (Fluoroskan Ascent FI®) avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. En complément, le test Hoechst a nécessité le lavage des cellules avec du HBSS et leur lyse en présence de SDS à 0,01 %. Les cellules ont ensuite été congelées puis traitées avec une solution d'Hoechst à 30 µg/ml avant une incubation de 2 heures à température ambiante. La fluorescence a été mesurée à 355 nm (excitation) et 460 nm (émission).

Les résultats des deux tests ont permis de calculer la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) pour chaque extrait. Cette valeur correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de la croissance cellulaire par rapport aux contrôles. L'étoposide, un agent anticancéreux bien connu, a été utilisé comme contrôle positif. Les extraits présentant une IC₅₀ faible contre les cellules cancéreuses et une IC₅₀ élevée contre les fibroblastes sains sont considérés comme ayant un potentiel anticancéreux sélectif.

2.2.6.2 Activité anti-inflammatoire

Le corps humain dispose de mécanismes de défense innés pour lutter contre les infections et éliminer les corps étrangers, tels que les virus, les bactéries ou les cellules endommagées¹¹³. La réaction inflammatoire, activée par des cytokines comme le TNF-α produit par les macrophages, constitue la première ligne de défense et provoque des signes cliniques tels que douleur, rougeur et chaleur au niveau des tissus affectés¹¹⁴.

Cependant, une inflammation excessive peut endommager les tissus, notamment la peau, en altérant la matrice extracellulaire via des enzymes comme la collagénase et l'élastase¹¹⁵. Ces dommages affaiblissent l'élasticité de la peau, favorisant des pathologies comme le psoriasis. Par ailleurs, la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages, en réaction avec le superoxyde, forme le peroxynitrite (ONOO⁻), un oxydant puissant qui active NF-κB, un facteur de transcription clé dans l'inflammation. Ainsi, développer des traitements ciblant ces mécanismes pourrait prévenir ces dommages¹¹⁵.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par l'inhibition de la production de NO, un marqueur clé de l'inflammation. Des macrophages murins (RAW 264.7) ont été cultivés dans des microplaques à 96 puits à une densité de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits. Après 24 heures à 37°C avec 5 % de CO₂, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes d'analytes et stimulées par du lipopolysaccharide (LPS) à 100 ng/mL pour induire la production de NO. Le *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) a été utilisé comme contrôle positif.

Après stimulation, le surnageant cellulaire a été récolté et mélangé au réactif de Griess (sulfanilamide et *N*-1-naphtyléthylènediamine en solution acide). Cette réaction, produisant une coloration proportionnelle à la concentration de NO, a été mesurée à 540 nm. Les résultats, exprimés en IC₅₀, déterminent la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de la production de NO. En parallèle, un test de Hoechst a évalué la cytotoxicité des extraits, confirmant que l'effet observé est lié à l'inhibition du NO et non à une toxicité cellulaire.

2.2.6.3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante est essentielle pour prévenir et gérer les dommages causés par le stress oxydatif, un facteur clé du vieillissement cutané et de diverses pathologies. Le vieillissement de la peau résulte de processus intrinsèques (génétique, type de peau, hormones) et extrinsèques (pollution, tabac, alimentation, rayons UV)¹¹⁶.

Parmi les facteurs extrinsèques, les rayons UV ont un impact destructeur, favorisant la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le radical hydroxyle (HO[•]), le superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)¹¹⁷. Lorsque ces ROS dépassent les capacités de neutralisation de l'organisme, ils entraînent des dommages cellulaires significatifs, comme la

dégradation des lipides, protéines et acides nucléiques, causant des altérations tissulaires et une inflammation chronique¹¹⁸.

Le stress oxydatif agit directement sur la peau en dégradant le collagène et l'élastine, deux protéines structurales essentielles¹¹⁹. Il stimule leur dégradation enzymatique (par la collagénase et l'élastase) et réduit leur synthèse, entraînant une perte de fermeté et d'élasticité. Ce processus favorise également l'hyperpigmentation, les dommages à l'ADN et les maladies cutanées, y compris les cancers. Il est également impliqué dans des pathologies systémiques comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives¹¹⁹.

Pour limiter ces effets, la recherche des composés antioxydants capables de neutraliser les ROS ou d'en limiter la formation est indispensable. Les antioxydants agissent principalement par deux mécanismes : l'élimination directe des ROS (« scavenging ») et la chélation des métaux (par exemple, le fer), qui catalysent la production de ROS via la réaction de Fenton. L'évaluation de l'activité antioxydante repose sur des approches chimiques et cellulaires complémentaires¹²⁰.

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) évalue la capacité d'un échantillon à neutraliser les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) à l'aide d'une sonde fluorescente, la fluorescéine. La réduction de la fluorescence, induite par l'oxydation de la fluorescéine, est directement corrélée à l'efficacité antioxydante¹²⁰.

Ce protocole utilise des microplaques à 384 puits, où des échantillons et des contrôles (quercétine et Trolox) sont soumis à un agent oxydant, le 2,2'-azobis(2-méthyl-propionamidine) dihydrochloride (AAPH)²¹. La fluorescence est mesurée à intervalles réguliers sur une heure grâce à un fluorimètre. Les résultats, exprimés en $\mu\text{mol TE/mg}$ d'extrait (équivalents Trolox), permettent des comparaisons standardisées. Malgré sa reproductibilité et sa sensibilité aux radicaux peroxydes, le test ORAC présente certaines limitations, notamment son incapacité à détecter les antioxydants qui agissent par chélation des métaux.

Le test antioxydant cellulaire examine la capacité d'un composé à protéger des fibroblastes humains (WS-1) exposés à un stress oxydatif induit par le tert-butyl hydroperoxide (tBH). Le tBH génère des radicaux hydroxyles qui oxydent une sonde fluorescente, le 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCFH-DA). La fluorescence générée reflète le niveau d'oxydation cellulaire.

Les fibroblastes sont cultivés dans des microplaques à 96 puits et incubés avec DCFH-DA avant exposition à l'échantillon testé et au tBH. Les mesures de fluorescence sont effectuées immédiatement et après trois heures. L'efficacité antioxydante est exprimée en IC₅₀, correspondant à la concentration requise pour inhiber 50 % de l'oxydation. Cette méthode reproduit des conditions biologiques proches de celles *in vivo*, tout en permettant d'évaluer l'activité des agents chélateurs de fer. Elle complète ainsi le test ORAC en offrant une perspective cellulaire des mécanismes antioxydants.

2.2.6.4 Activité antibactérienne

La résistance aux antibiotiques représente un problème majeur dans le domaine de la santé publique, avec des conséquences graves sur le traitement des infections. Ce phénomène repose sur le développement de stratégies adaptatives chez les bactéries, visant à diminuer l'efficacité des antibiotiques¹²¹. Parmi ces stratégies figurent la dégradation des antibiotiques, leur expulsion hors de la cellule ou encore la modification de leur structure pour éviter leur reconnaissance par les médicaments. Ces mécanismes favorisent la propagation des souches résistantes, rendant les traitements plus complexes et coûteux¹²².

L'usage inapproprié des antibiotiques, tant dans le domaine médical que dans l'agriculture, constitue l'un des principaux facteurs responsables de cette résistance¹²³. L'administration prématurée ou insuffisante des traitements antibiotiques chez les patients, ainsi que l'emploi d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'élevage animal, ont entraîné l'émergence de souches pathogènes résistantes¹²⁴. Ce contexte rend impératif le développement de nouvelles molécules dotées de propriétés antibactériennes pour contrer l'évolution des infections¹²⁵.

Dans le cadre de ce mémoire, l'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode de microdilution. Cette technique permet de déterminer la concentration inhibitrice 90 % (IC₉₀), définie comme la concentration nécessaire pour inhiber 90 % de la croissance bactérienne (IC₉₀). Deux souches bactériennes ont été testées : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, qui représentent respectivement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Staphylococcus aureus est une bactérie cocciqque, regroupée en amas évoquant des grappes de raisin, immobile et asporulée. Elle vit de manière commensale sur la peau et les muqueuses des

mammifères, mais peut être responsable de diverses infections, incluant des intoxications alimentaires dues à la production de toxines. En revanche, *Escherichia coli* est une bactérie bacillaire à Gram négatif, souvent mobile grâce à sa ciliature péritriche. Cette bactérie est présente naturellement dans la flore intestinale, mais peut provoquer des infections urinaires, digestives ou encore des méningites néonatales.

Les essais ont été réalisés dans des microplaques à 96 puits contenant des densités bactériennes de 5×10^3 cellules par puits pour *E. coli* et 40×10^3 pour *S. aureus*. Les échantillons ont été exposés à des concentrations croissantes d'extraits antibactériens, variant entre 1,56 et 200 µg/mL, dans un milieu de bouillon nutritif contenant 0,1 % de DMSO pour éviter la toxicité. Après une incubation de 24 heures à 37 °C, l'absorbance a été mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Varioskan (Thermo, Labsystems).

La gentamycine, un antibiotique de référence appartenant à la famille des aminoglycosides¹²⁶, a été utilisée comme contrôle positif. Cette molécule agit en inhibant la synthèse protéique des bactéries, offrant ainsi une base comparative fiable pour les nouvelles substances testées.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats de l'extraction et de la séparation

Tableau 2 : Résumé des rendements d'extraction et de séparation liquide - liquide.

Extraction	Extrait / Fraction	Masse (g)	Solvant	Masse (g)	Rendement (%)
Extraction méthanolique	Brut	1 kg	100 % méthanol / 70% méthanol	94,10 g	9,41
Extraction liquide - liquide	DCM	93,08 g	Dichlorométhane	31,77 g	33,76
	AcOEt		Acétate d'éthyle	2,06 g	2,19
	H ₂ O		Eau	54,11 g	57,50

À partir de 1 kg de poudres des racines de *Carthamus caeruleus*, une extraction par reflux successif a été réalisée en utilisant 100 % de méthanol (MeOH) puis 70 % de MeOH. Cette étape a permis d'obtenir un extrait brut d'une masse de 94,10 g, correspondant à un rendement de 9,41 %. Afin de fractionner cet extrait brut, une extraction liquide-liquide a été effectuée avec une masse initiale de 93,80 g, en utilisant successivement les solvants dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AcOEt) et eau (H₂O).

Tel que le montre le tableau 2 ci-dessus, trois fractions ont été obtenues à l'issue de cette séparation :

- La fraction DCM présente une masse de 31,77 g, avec un rendement de 33,76 %.
- La fraction AcOEt, quant à elle, obtenue à une masse de 2,06 g pour un rendement de 2,19 %.
- Enfin, la fraction H₂O présente la masse la plus élevée, soit 54,11 g, avec un rendement de 57,50 %.

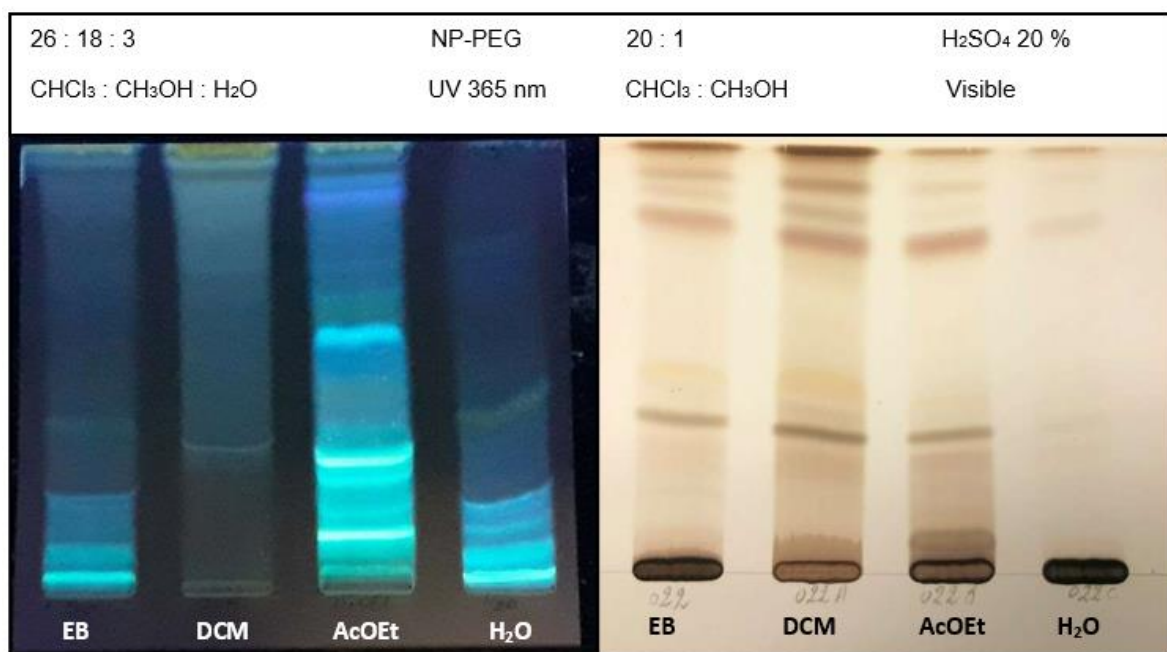


Figure 18 : Analyse CCM de l'extrait brut et des fractions obtenues par séparation liquide-liquide.

La figure 18 illustre les résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions obtenues après extraction liquide-liquide avec des solvants de polarités différentes. Cette séparation a permis de mettre en évidence des métabolites spécifiques selon leur affinité chimique. La fraction au dichlorométhane (DCM) est constituée principalement de métabolites non polaires, tels que les lipides, stérols et terpènes. Sous observation à la lampe UV à 365 nm, ces composés ne présentent généralement pas de fluorescence marquée. Lors de la pulvérisation avec du H₂SO₄ à 20 % suivie d'un chauffage, les terpènes apparaissent avec une coloration rose violacée, tandis que les stérols forment des taches brunes ou noires visibles en lumière normale.

La fraction obtenue avec l'acétate d'éthyle (AcOEt) contient essentiellement des métabolites modérément polaires, incluant les flavonoïdes, alcaloïdes et certains acides phénoliques. Sous UV à 365 nm, en présence du révélateur NP-PEG, ces composés émettent des fluorescences jaunes, bleues ou vertes, caractéristiques de ces familles chimiques. Lors de la révélation avec H₂SO₄ à 20 % après chauffage, les acides phénoliques se manifestent par des taches brun-claires visibles à l'œil nu. La fraction aqueuse (H₂O) est composée principalement de métabolites hautement polaires, tels que les sucres, glycosides, acides aminés et certains polyphénols. Généralement, ces composés ne

réagissent pas visiblement avec H_2SO_4 à 20 %, mais certains polyphénols peuvent être détectés grâce à leur fluorescence bleue ou verte sous UV à 365 nm, lorsqu'ils sont révélés avec le NP-PEG.

3.2 Résultats de l'activité biologique des fractions obtenus

Le dosage phénolique par la méthode Folin-Ciocalteu révèle des concentrations variables en polyphénols entre les fractions étudiées comme le montre le tableau 3 ci-dessous. La fraction AcOEt présente la teneur la plus élevée en polyphénols (18 ± 2 g/100 g), ce qui peut expliquer en partie son activité antioxydante notable. La fraction H_2O contient également une quantité de polyphénols ($6,5 \pm 0,3$ g/100 g), tandis que la fraction DCM affiche une teneur ($3,8 \pm 0,3$ g/100 g).

Tableau 3 : Résultats du dosage des composés phénoliques de l'extrait brut et de ses sous fractions.

	Dosages phénoliques au Folin-Ciocalteu
Extraits / Fractions	% (g/100g)
Brut	$5,7 \pm 0,3$
DCM	$3,8 \pm 0,3$
AcOET	18 ± 2
H_2O	$6,6 \pm 0,3$

Les résultats des essais de cytotoxicité sur trois lignées cellulaires (A-549, DLD-1 et WS-1), présentés dans le tableau 4 ci-dessous, révèlent que la fraction DCM présente une cytotoxicité modérée avec des valeurs d' IC_{50} de 108 ± 7 $\mu\text{g/ml}$ pour A-549, 59 ± 2 $\mu\text{g/ml}$ pour DLD-1 et 62 ± 3 $\mu\text{g/ml}$ pour WS-1, les lignées DLD-1 et WS-1 étant plus sensibles. La fraction AcOEt présente une cytotoxicité plus faible à modérée avec des IC_{50} plus élevées (126 ± 7 $\mu\text{g/ml}$ pour DLD-1 et 135 ± 11 $\mu\text{g/ml}$ pour WS-1). Enfin, la fraction H_2O ne présente aucune cytotoxicité notable, avec des IC_{50} supérieures à 200 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 4: Résultats d'activité cytotoxique de l'extrait brut et des sous fractions.

	Résazurine IC ₅₀ (µg/ml)			Hoechst IC ₅₀ (µg/ml)		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Extraits / Fractions						
Brut	>200	>200	>200	>200	148 ± 14	122 ± 36
DCM	108 ± 7	59 ± 2	62 ± 3	75 ± 9	32 ± 9	35 ± 7
AcOEt	>200	126 ± 7	135 ± 11	191 ± 18	69 ± 9	77 ± 8
H₂O	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Etoposide en µM	>50	24 ± 4	6,0 ± 0,4	3,7 ± 0,8	7 ± 1	1,1 ± 0,3

Les essais anti-inflammatoires réalisés sur les cellules RAW264.7 montrent que la fraction DCM est la plus active, avec une inhibition de 100 % à une concentration non toxique de 40 µg/ml et une toxicité apparaissant à 80 µg/mL tel que le résume le tableau 5 ci-dessous. La fraction AcOEt présente également une bonne activité anti-inflammatoire, avec 89 % d'inhibition à 40 µg/ml, mais elle devient toxique à partir de 80 µg/ml. En revanche, la fraction H₂O affiche une inhibition beaucoup plus faible (15 % à 160 µg/ml) sans présenter de toxicité dans la gamme testée. La fraction brute montre une activité négligeable avec une inhibition <10 % à 80 µg/ml.

Tableau 5 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut et des sous fractions.

	Anti-inflammatoire sur RAW264.7		
Extraits / Fractions	IC₅₀^a	% inhibition à la concentration maximale non toxique	Concentration cytotoxique^b
Brut	>80 µg/ml	< 0% @ 80 µg/ml	160 µg/ml
DCM	13 ± 3 µg/ml	100% @ 40 µg/ml	80 µg/ml
AcOEt	18 ± 2 µg/ml	89% @ 40 µg/ml	80 µg/ml
H₂O	>160 µg/ml	15% @ 160 µg/ml	NA
Quercétine	L-NAME 250 µM	41 ± 5%	
Catéchine	L-NAME 1 mM	75 ± 9%	

Concernant l'activité antioxydante tel que le montrent les tableaux 6 et 7 ci-dessous, les résultats des essais cellulaires révèlent que la fraction DCM possède la meilleure capacité antioxydante avec une $IC_{50} < 0,195 \mu\text{g/ml}$, ce qui témoigne d'une forte efficacité. Les fractions AcOEt et H_2O montrent des activités plus modérées avec des IC_{50} de $2,8 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ et $7 \pm 3 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Les résultats du test ORAC confirment ces observations : DCM présente une valeur significative de $0,371 \mu\text{mol TE/mg}$, tandis que la fraction AcOEt atteint $2 \mu\text{mol TE/mg}$, indiquant une activité antioxydante relativement élevée comparée aux autres fractions. Comparativement aux deux témoins positifs, les valeurs ORAC sont faibles alors que l'activité antioxydante cellulaire (fraction DCM) est similaire à la quercétine.

Tableau 6 : Résultats de l'activité antioxydante cellulaire de l'extrait brut et des sous fractions sur les fibroblastes humains WS1.

	Antioxydant cellulaire sur WS1
Extraits / Fractions	IC_{50} antioxydante
Brut	$39 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ (9%)
DCM	$<0,195 \mu\text{g/ml}$
AcOEt	$2,8 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ (25%)
H_2O	$7 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ (46%)
Quercétine	$0,20 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (16%)

Tableau 7 : Résultats de l'activité antioxydante de l'extrait brut et des sous fractions à l'aide du test ORAC.

	ORAC	
Extraits / Fractions	$\mu\text{mol TE / mg}$	$\mu\text{mol TE / } \mu\text{mol}$
Brut	$0,86 \pm 0,03$	
DCM	$0,371 \pm 0,008$	
AcOEt	2 ± 1	
H_2O	$0,8 \pm 0,1$	
Quercétine	23 ± 2	$7,8 \pm 0,6$
Catéchine	24 ± 3	$6,9 \pm 0,8$

Tel que le montre le tableau 8 ci-dessous, les essais antibactériens contre *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) montrent que la fraction DCM possède la plus forte activité, avec des valeurs d'IC₅₀ de 17 ± 3 µg/ml pour *E. coli* et 18 ± 4 µg/ml pour *S. aureus*, ce qui indique un potentiel antibactérien intéressant. La fraction AcOEt présente une activité antibactérienne modérée, avec des IC₅₀ plus élevées respectivement de 62 ± 14 µg/ml pour *E. coli* et de 85 ± 11 µg/ml pour *S. aureus*. Les fractions brute et H₂O sont inactives.

Tableau 8 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut et des sous fractions.

Extraits / Fractions	IC ₅₀ (µg/ml)		IC ₉₀ (µg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Brut	83 ± 3	118 ± 3	>200	>200
DCM	17 ± 9	18 ± 4	>200	>200
AcOEt	62 ± 14	85 ± 1	>200	>200
H₂O	>200	>200	>200	>200
Gentamycine	$0,0124 \pm$ $0,0003$	$0,018 \pm 0,001$	$0,0258 \pm$ $0,0006$	$0,046 \pm 0,003$

3.3 Identification des composés isolés

La RMN du composé **1** démontre qu'il s'agit de la syringine ; un glycoside phénolique, constitué d'un cycle benzénique tétra-substitué de formule moléculaire C₁₇H₂₄O₉. Ce composé a été identifié dans plusieurs espèces tels que *Carthamus lanatus* et *Saussurea neoserrata*¹¹⁵. Le spectre RMN du proton montre plusieurs signaux caractéristiques : des multiplets entre 6,7 et 6,9 ppm attribués aux protons aromatiques H-2 et H-6 du cycle benzénique tétrasubstitué, indiquant une symétrie moléculaire. Le signal à 6,58 ppm (doublet de triplet, J = 15,7 Hz, 4,8 Hz) correspond au proton H-8 porté par une double liaison trans, confirmé par le couplage caractéristique d'une configuration trans. Le signal à 5,78 ppm (doublet, J ≈ 6 Hz) est attribué au proton anomérique H-1' lié au glucose, confirmant la nature glycosidique de la molécule. Entre 4,3 et 4,6 ppm, un signal apparaît,

correspondant au méthylène oxygéné H-9, tandis qu'à 3,7-3,8 ppm (singlet, 6H), on observe deux groupes méthoxy (-OCH₃) attachés au cycle aromatique en C-3 et C-5. Le spectre RMN du carbone ¹³C complète cette analyse en révélant des signaux significatifs : 154,5 ppm pour les carbones aromatiques C-3 et C-5 liés aux groupes méthoxy, 136,5 ppm pour le carbone quaternaire C-4, et 105,2 ppm pour le carbone anomérique C-1' du glucose. Les carbones du sucre sont identifiés par des signaux à 79,2 ppm, 78,7 ppm, 76,2 ppm et 72,1 ppm, correspondant respectivement aux C-2', C-3', C-4' et C-5' du glucose. Le carbone terminal CH₂ est visible à 63,0 ppm (C-6'), tandis que le carbone lié au méthylène oxygéné apparaît à 63,2 ppm et les carbones des groupes méthoxy sont confirmés à 57,1 ppm. La spectrométrie de masse Q-TOF a permis d'identifier avec précision la masse moléculaire de composés **1**. La masse exacte expérimentale est de 372,1424 g/mol, en parfaite concordance avec la masse théorique. Les ions majeurs observés incluent m/z 395,1316 correspondant à [M+Na]⁺ avec un écart de précision de 0,87 ppm, attestant la haute résolution des mesures. Le temps de rétention (RT) est mesuré à 0,227 min, soulignant la pureté du composé.

Le composé **2** a été identifié comme étant la syringinoside; un diglycoside phénylpropanoïde précédemment isolé de diverses espèces végétales telles que *Peganum harmala* L. et *Stellera chamaejasme* L. Ce composé est reconnu pour ses propriétés biologiques, notamment ses activités anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes¹¹⁶.

L'identification précise de sa structure a été réalisée grâce à l'analyse des spectres RMN et de la spectrométrie de masse, complétée par des données issues de la littérature. Dans le spectre RMN ¹H, les protons aromatiques (H-3 et H-5) apparaissent sous forme des doublets à 6,99 et 6,81 ppm, indiquant la symétrie du noyau aromatique. Les groupes méthoxyles liés aux carbones C-10 et C-11 génèrent des signaux singulets à 3,85 ppm. Les protons (H-8 et H-9) de la chaîne allylique présentent des déplacements chimiques à 7,15 ppm et 4,36 ppm, accompagnés de constantes de couplage caractéristiques qui confirment une double liaison trans (configuration « E »). Les protons anomériques des deux unités glucosidiques sont détectés à 4,84 ppm et 4,22 ppm sous forme de doublets, caractérisant des liaisons β-glycosidiques.

Le spectre RMN ¹³C révèle les carbones anomériques à 102,0 ppm et 106,0 ppm, ainsi que les carbones méthoxyles à 56,0 ppm. Les signaux des carbones quaternaires aromatiques à 153,0

ppm et 153, 7 (C-3, C-5) et ceux des carbones vinyliques à 128,0 ppm (C-7) et 130,0 ppm (C-8) confirment la structure d'un noyau phénolique substitué.

En mode négatif, la spectrométrie de masse a permis d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 534,52 g/mol correspondant à une formule brute de $C_{23}H_{34}O_{14}$. Ces données valident la structure d'un diglycoside phénylpropanoïde composé d'un noyau 3,5-diméthoxyphénol substitué et de deux unités de β -D-glucopyranoses.

L'analyse des spectres RMN du composé **3** confirme qu'il s'agit de la molécule qui appartient à la classe des polyacétylènes triène-diyne, soit la (4E,6E,12E) -4,6,12-tetradecatriene-8,10-diyne-1,3-diol. Cette molécule est caractérisée par la présence de doubles liaisons, de triples liaisons et de deux groupes hydroxyles. Ce polyacétylène reconnu par ces propriétés anti-inflammatoires a été isolé à partir des rhizomes d'*Atractylodes lancea* (AL)¹⁰⁵. Le spectre RMN 1H révèle un signal caractéristique à 1,83 ppm, attribué au groupement méthyle terminal (CH_3) en position 14, apparaissant sous forme de multiplet. Cette attribution est validée par des corrélations HMBC avec les carbones en positions 12 et 13¹⁰⁵. Les protons des carbones sp^2 situés en positions 4, 6, et 12 apparaissent respectivement à 5,92 ppm, 6,35 ppm, et 6,32 ppm, avec des constantes de couplage ($J \approx 15$ Hz) indiquant une configuration trans (E) des doubles liaisons. Par ailleurs, le proton lié au carbone hydroxylé en position 3 est déblindé et présente un signal à 5,73 ppm, confirmant la présence d'un groupe hydroxyle à cette position¹⁰⁵.

Le spectre RMN ^{13}C vient compléter cette analyse en montrant des signaux cohérents avec la structure proposée. Les carbones sp^2 des doubles liaisons sont identifiés dans la région de 110 à 145 ppm, notamment aux positions 4, 6, et 12 (141,95 ppm, 145,50 ppm, et 144,77 ppm respectivement). Les carbones sp des triples liaisons, situés en C-8 et C-10, apparaissent à 80,8 ppm et 77,1 ppm. Le carbone méthylique terminal en position 14 génère un signal à 18,9 ppm, tandis que le carbone hydroxylé en position 3 est clairement détecté à 110,6 ppm, confirmant la présence des groupes fonctionnels. Les corrélations observées dans le spectre HMBC valident la connectivité entre les différentes parties de la molécule. Par exemple, le proton en position 4 est corrélé aux carbones en positions 3 et 5, confirmant l'organisation autour de la double liaison. De même, les

protons en positions 6 et 12 montrent des corrélations avec les carbones voisins, corroborant l'attribution des doubles liaisons et leur configuration géométrique trans.

Pour ce qui est du composé **4**, l'analyse des spectres RMN a permis de l'identifier comme étant du safynol, soit la (2R,3E,11E) -3,11-tridecadiene-5,7,9-triène-1,2-diol) un composé acétylénique, qui est retrouvé dans des plantes de l'espèce *Carthamus tinctorius*¹⁰⁶. Cette structure est caractérisée par la présence de deux groupes hydroxyles (-OH) et de plusieurs insaturations. Le spectre ¹H de composé **4**, un doublet de doublets a été observé à 1,84 ppm, correspondant à un groupe méthyle (CH₃) en position 13. Ce signal est fortement corrélé avec le carbone en position 12 sur le spectre HMBC, confirmant la présence d'une chaîne terminale insaturée. Par ailleurs, un signal large à 5,91 ppm est attribué à un proton vinylique, indiquant la présence d'une double liaison conjuguée dans la structure. Le spectre RMN du carbone de composé **4** indique une liaison triple entre le carbone en position 10 (δC = 72,98 ppm) et celui en position 11 (δC = 78,81 ppm), ces derniers étant typiques des carbones sp. De plus, les carbones en position 2 (δC = 73,39 ppm) et 4 (δC = 109,32 ppm) sont davantage déblindés, en raison de leur proximité avec les groupes hydroxyles.

Le composé **5**, identifié comme le 2-méthoxy-safynol, partage une structure chimique similaire au composé **4**, le safynol, mais diffère par la présence d'un groupe méthoxy (-OCH₃) sur le carbone en position 2. Cette différence structurelle a des implications significatives, à la fois sur le plan spectroscopique et chimique. Le 2-méthoxy-safynol a été isolé à partir de l'espèce végétale *Carthamus tinctorius*¹⁰⁶. Ce composé fait partie des composés bioactifs identifiés dans la préparation médicinale traditionnelle, connue pour ses propriétés anti-athérogènes, notamment dans le traitement des maladies cardiovasculaires. En spectroscopie RMN du proton, la présence du groupe méthoxy dans le 2-méthoxy-safynol se distingue par un signal sous forme de singulet à un déplacement chimique de 3,81 ppm, attribuable aux trois protons équivalents du groupe méthoxy (-OCH₃). En RMN du carbone, la substitution méthoxy entraîne un déplacement chimique qui apparaît à 108,60 ppm pour le carbone en position 2.

L'analyse RMN du composé **6** a permis de l'identifier comme étant de l'alpha-amyrine **6a** et la bêta-amyrine **6b**. L'alpha-amyrine et la bêta-amyrine sont deux triterpènes pentacycliques

étroitement liés qui se distinguent principalement par la configuration spatiale de leur double liaison au niveau des carbones C-12 et C-13. L'analyse attentive des spectres RMN du proton et du carbone a révélé la présence de signaux appartenant à deux composés. En comparant ces résultats à la littérature¹¹⁶, il a été identifié comme étant l'alpha-amyrine et la bêta-amyrine, avec une prédominance de cette dernière sur la base des intensités des pics observés. Dans le spectre RMN¹³C du composé isolé, les déplacements chimiques des carbones C-12 et C-13 sont observés à 121,7 et 140,8 ppm respectivement. Ces valeurs sont cohérentes avec les données rapportées pour le composé **6b**. Cependant, des pics supplémentaires à des déplacements également typiques de composé **6a** ont été détectés. Toujours en RMN ¹³C, le carbone C-3 du composé **6a** montre un signal à 105,9 ppm tandis que dans le composé **6b** montre un signal à 77,3 ppm ce même carbone. Ces différences indiquent que les deux isomères sont présents dans l'échantillon. De manière similaire, le spectre RMN ¹H montre des variations claires dans les signaux des protons liés aux carbones C-12 et C-3. Le proton H-12 dans le composé **6a** apparaît à 5,12 ppm (t) tandis que pour le composé **6b**, il est observé à 5,33 ppm (t). De plus, les protons des groupes méthyles montrent des déplacements légèrement différents, par exemple à un δ de 0,74 (H-28, alpha-amyrine) contre un δ de 0,73 (H-28, bêta-amyrine).

Le HPLC-Q-TOF a fourni des informations pour la confirmation de la structure de composé **6a** et **6b**. La formule brute du composé, C₃₀H₅₀O, a été confirmée par la présence des pics suivants : [M+H]⁺ à 427,38 m/z, correspondant à la masse exacte de la molécule protonée ; [M+Na]⁺ à 449,37 m/z, indiquant la formation de l'adduit avec le sodium ; et [M+2Na-H]⁺ à 451,87 m/z, confirmant une structure stable avec deux sodiums. Selon la littérature, l'alpha amyrine et le bêta-amyrine ont été isolées à partir de nombreuses plantes telles que *Protium heptaphyllum*, *Cecropia obtusifolia* et *Erythrina americana*. Elles sont reconnues pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, antioxydantes et antidiabétiques¹¹⁶.

Le composé **8** est confirmé comme étant la scopolétine, également connue sous son nom systématique 7-hydroxy-6-methoxycoumarine. Cette identification repose sur l'analyse des données spectroscopiques obtenues par RMN ¹H et ¹³C ainsi que sur une comparaison avec la littérature scientifique décrivant cette molécule. La scopolétine est une coumarine hydroxylée et méthoxylée,

extraite de plusieurs espèces : *Morinda citrifolia*, *Helichrysum italicum*, *Convolvulus pluricaulis*, *Artemisia annua*, *Lasianthus lucidus* et *Morus alba* et *Launaea resedifolia*¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Les carbones du composé **8** montrent des déplacements chimiques caractéristiques comme, entre autres, un signal à 172,7 ppm correspondant au carbone du groupement carbonyle. Les carbones aromatiques sont observés entre 135 à 144 ppm ce qui est caractéristique d'une coumarine substituée. Le carbone du groupe méthoxy (-OCH₃) en position 6 est identifié à 61,92 ppm, une valeur typique pour un méthyle d'un éther aromatique. Le proton H-8 apparaît à 4,83 ppm avec une multiplicité de triplet (t), associée à des constantes de couplage de 7,5 Hz et 8,0 Hz, cohérentes avec un environnement aromatique substitué. Les autres protons aromatiques, comme H-4 et H-9, montrent des déplacements chimiques respectivement à 4,09 ppm et 2,07 ppm, avec une multiplicité de triplets et de doublets, confirmant leur position sur le cycle. Le proton du groupe hydroxyle (-OH) est observé à 6,39 ppm, caractéristique d'un groupe hydroxyle aromatique. Selon les études *in vitro*, la scopolétine possède des activités pharmacologiques, notamment anti-hépatotoxique, antibactérienne, antifongique, antituberculeuse et antioxydante¹⁰⁹. Les études *in vivo* ont démontré des activités pharmacologiques telles qu'anti-thyroïdienne, antihypertensive, antiproliférative, anti-inflammatoire, neurologique, anti-dopaminergique et anti-adrénergique, antidiabétique et antihyperuricémique¹⁰⁹.

L'analyse des spectres RMN et la comparaison avec les données spectroscopiques de la littérature ont permis d'identifier le composé **11** comme étant l'isohamnétine, également connue sous le nom de 3'-méthoxyquercétine. Il s'agit d'un flavonol méthylé, un dérivé de la quercétine, où un groupe méthoxy (-OCH₃) est situé sur le carbone 3' du cycle B. Ce composé appartient à la famille des flavonoïdes isolée à partir *Callianthemum taipaicum*. L'isohamnétine a démontré une activité inhibitrice notable contre des pathogènes fongiques tels que *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia cerealis*¹¹⁰. La structure chimique de composé **11** repose sur un squelette flavonolique comprenant trois cycles : deux cycles benzéniques (A et B) et un cycle pyranique (C). Elle est caractérisée par la présence d'un groupe méthoxy sur le carbone 3', de groupes hydroxyles (-OH) sur les positions 3, 4', 5 et 7, ainsi que d'un carbonyle (C=O) sur le carbone 4 du cycle C.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C confirment la présence du groupement méthoxy (-OCH₃) avec un déplacement chimique en carbone à 55,93 ppm et un singulet à 3,6 ppm en proton. Les cycles

aromatiques (A, B, C) montrent des déplacements chimiques cohérents, notamment ^{13}C de 171,94 ppm pour le carbone carbonyle (C-4), ^{13}C de 140,05 ppm et ^1H de 5,8 ppm (d, $J=15,8$ Hz) pour un proton conjugué, ainsi que des valeurs comprises entre ^{13}C de 140 à 147 ppm pour des carbones aromatiques. Les protons aromatiques des cycles A et B présentent des signaux ^1H à 7,72 ppm, 7,6 ppm et 6,02 ppm, avec des constantes de couplage cohérentes. Enfin, le cycle pyranique (C) se distingue par un carbone ^{13}C à 82,59 ppm et un proton ^1H à 5,37 ppm (s), confirmant la structure de l'isohamnétine.

La caractérisation du composé **12** indique que sa structure est similaire à celle du composé **11**, à la différence qu'il possède des groupes méthoxy aux positions 3' et 4' du cycle B, tandis que le méthoxy est présent uniquement dans la position 3' dans le composé **11**. Les spectres RMN montrent qu'il s'agit du 3',4'-diméthoxy quercétine qui est un flavonoïde méthoxylé dérivé de la quercétine. Ce composé a été isolé des feuilles de *Kalanchoe pinnata* ; une plante tropicale utilisée en médecine traditionnelle pour traiter divers maux, tels que les infections, les inflammations, les ulcères gastriques, les douleurs, la toux et la fièvre¹¹¹. Les recherches modernes ont confirmé que les flavonoïdes, tels que la 3',4'-diméthoxy quercétine, jouent un rôle essentiel dans les effets thérapeutiques de cette plante¹¹¹. La structure chimique du composé **12** repose sur un noyau flavonoïde comprenant deux groupes méthoxy (-OCH₃) situés aux positions 3' et 4' sur le cycle B, trois groupes hydroxyles (-OH) aux positions 5, 7 et 3 sur les cycles A et C, et une fonction cétone (-C=O) à la position 4 du cycle C. Sa formule moléculaire est C₁₇H₁₄O₈, avec une masse moléculaire de 329,96 g/mol, confirmé par spectrométrie de masse avec m/z 330,9826 en $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Le composé **12** présente des doublets pour les protons H-6' ($\delta \sim 7,23$ ppm) et H-5' ($\delta \sim 6,98$ ppm), avec un couplage ortho ($J=9,1$ Hz $J = 9,1$). Des singulets ont été observés pour H-2' ($\delta \sim 7,59$ ppm) et pour les groupes méthoxy H-7' ($\delta \sim 4,05$ ppm) et H-8' ($\delta \sim 3,95$ ppm). Un signal distinct à $\delta \sim 179$ ppm correspond au carbone cétone (C-4), tandis que les signaux des carbones aromatiques sont situés entre 100 et 160 ppm.

Les résultats des analyses RMN du composé **13** isolé, associés aux données de la littérature, confirment qu'il s'agit de l'acacétine, également appelée 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone. Ce flavonoïde naturel est présent dans le règne végétal et possède une formule chimique C₁₆H₁₂O₅ avec

une masse moléculaire de 284,26 g/mol. La molécule se caractérise par deux groupes hydroxyles en positions 5 et 7 et un groupe méthoxy en position 4'. L'acacétine est particulièrement présente dans des plantes telles que *Carthamus tinctorius*, *Ziziphora clinopodioides* et *Sidastrum micranthum*, souvent utilisées en phytothérapie pour leurs nombreuses propriétés médicinales¹¹²⁻¹¹³. Les spectres RMN ont permis de caractériser la structure chimique du composé **13**. Le carbone C-4 est visible sur le RMN ¹³C à 178,2 ppm, caractéristique de la présence d'un groupement carbonyle conjugué. Les carbones aromatiques substitués, comme C-2'/6' ($\delta C = 126,8$ ppm) et C-3'/5' ($\delta C = 114,8$ ppm), montrent un couplage typique des hydrogènes en position ortho avec des déplacements chimiques à $\delta H = 8,09$ ppm et $\delta H = 6,28$ ppm respectivement, et une constante de couplage $J = 8,2$ Hz. Les carbones du cycle flavonoïde, tels que C-6 ($\delta C = 99,8$ ppm, $\delta H = 5,81$ ppm, $J = 2,4$ Hz) et C-8 ($\delta C = 88,4$ ppm, $\delta H = 5,82$ ppm, $J = 2,4$ Hz), présentent des déplacements caractéristiques, indiquant un couplage méta. Le groupe méthoxyle sur le carbone C-4' est identifié à un δC de 55,3 ppm, avec un signal δH de 3,73 ppm sous forme de singulet. Le composé **13** est reconnu pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des effets cardioprotecteurs en protégeant les cardiomyocytes contre les lésions liées à l'ischémie et au stress oxydatif, ainsi que des propriétés anti-inflammatoires. Bien que son activité antibactérienne directe soit limitée (CMI = 256 $\mu g/mL$), l'acacétine agit comme un modulateur d'antibiotiques en réduisant significativement la concentration minimale inhibitrice de médicaments comme la norfloxacine et l'érythromycine¹¹³.

Le composé **14** isolé a été identifié comme étant de l'isoscopoletine connue sous le nom de 6-hydroxy-7-méthoxy-coumarine, appartenant à la classe des coumarines. Ce composé est caractérisé par un noyau coumarinique substitué par un groupe hydroxyle (-OH) en position 6 et un groupe méthoxy (-OCH₃) en position 7, avec une formule moléculaire C₁₀H₈O₄ et un poids moléculaire de 192,17 g/mol¹¹⁴. La 6-hydroxy-7-méthoxy-coumarine a été isolée à partir des parties aériennes de la plante égyptienne *Ammi majus* L, mais elle est également présente dans d'autres plantes telles que *Artemisia capillaris*. L'isoscopoletine a démontré des propriétés biologiques remarquables, notamment des activités anti-inflammatoires, antivirales, antioxydantes et antimicrobiennes¹¹⁴.

Les déplacements chimiques de la 6-hydroxy-7-méthoxy-coumarine, mesurés par RMN proton et carbone, confirment sa structure. Les principaux déplacements enregistrés sont un δC de

162.5 ppm pour le carbone en position 2, un δC de 115.5 ppm pour le carbone en position 3, et un δH de 6.45 ppm pour le proton lié au groupe hydroxyle en position 6. Une comparaison des données expérimentales avec celles rapportées dans la littérature montre des variations mineures dues aux conditions expérimentales, notamment le solvant utilisé¹¹⁴.

Le composé **14** (isoscopoletine) se différencie du composé **8** (scopoletine), qui est un isomère de position, par la disposition de ses groupes fonctionnels. Le composé **14** possède un groupe hydroxyle (-OH) en position 6 et un groupe méthoxy (-OCH₃) en position 7, tandis que le composé **8** présente ces groupes à l'inverse, avec le -OH en position 7 et le -OCH₃ en position 6. Ces différences structurales se traduisent également dans leurs spectres RMN : l'hydroxyle en position 6 de l'isoscopoletine est observé à un δH de 6,45, tandis que l'hydroxyle en position 7 de la scopoletine apparaît à δH de 6,36 ppm. La figure 19 ci-dessous montre les structures moléculaires des composés identifiés.

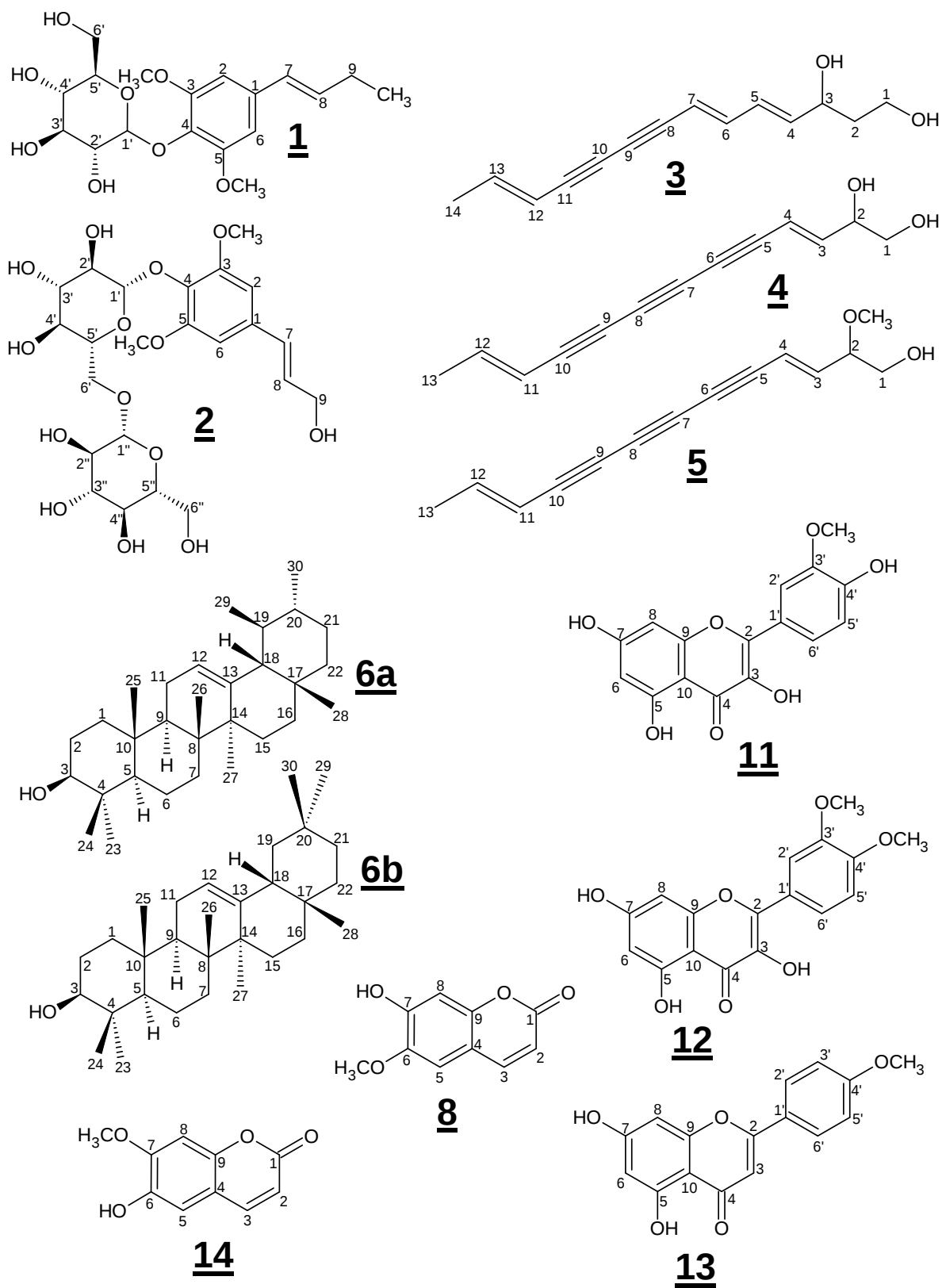


Figure 19 : Structure des composés isolés de l'extrait de *carthamus caeruleus*.

3.4 Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés.

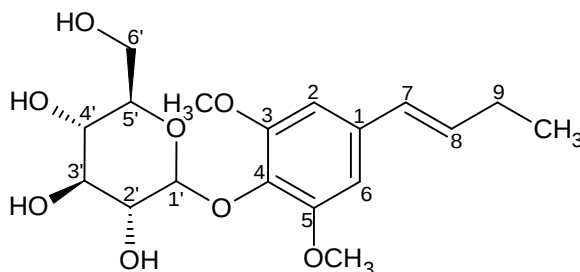


Figure 20 : Structure chimique de la syringine 1.

Poudre blanchâtre, ESI-MS: m/z 395,1 $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{17}H_{24}O_9$, 372,1424) Rf 3,7 (gel de silice 60 F254 $CHCl_3$ / CH_3OH / H_2O 55 :15 :1). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ : 4,85 (d, J = 5,4 Hz, H-1), 6,34 (dd, J = 15,5, 5,1 Hz, H-2), 6,55 (d, J = 15,4 Hz, H-3), 6,74 (s, H-5,9), 3,85 (s, OCH_3), 6,32 (m, H-1'), 3,3 (s, H-2'), 3,34 (s, H-3'), 3,39 (s, H-4'), 3,46 (s, H-5'), 3,65 (dd, J = 11,6, 5,1 Hz, H-6'). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ : 63,5 (C-1), 130,0 (C-2), 131,2 (C-3), 105,3 (C-5,9), 154,3 (C-6,8), 57,0 (C-10,11, OCH_3), 105,4 (C-1'), 71,3 (C-2'), 75,7 (C-3'), 77,8 (C-4'), 78,3 (C-5'), 62,5 (C-6').

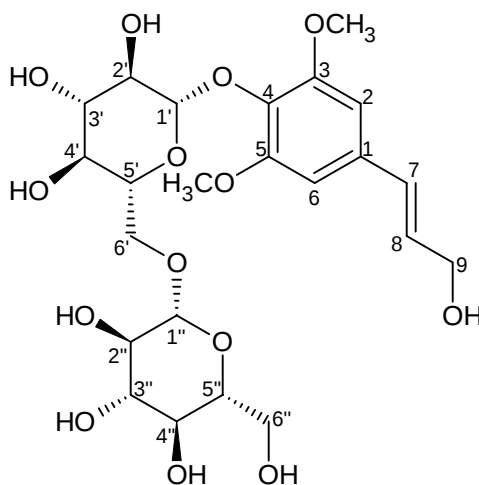


Figure 10 : Structure chimique de la syringinoside 2.

Poudre blanchâtre, ESI-MS: m/z 534,5 $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{23}H_{33}O_{14}$, 533,1871) Rf 3,6 (gel de silice 60 F254 $CHCl_3$ / CH_3OH / H_2O 55 :15 :1). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ : 4,68 (d, J = 5,2 Hz,

H-1), 6,12 (dd, $J_1 = 16,1$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, H-2), 6,99 (d, $J = 15,3$ Hz, H-3), 6,81 (d, $J = 16,1$ Hz, H-5), 7,15 (s, H-6), 4,36 (dd, $J_1 = 14,1$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, H-8), 4,34 (d, $J = 4,8$ Hz, H-9), 4,31 (d, $J = 7,3$ Hz, H-1'), 6,10 (d, $J = 4,6$ Hz, H-2'), 4,73 (s, H-3'), 3,43 (m, H-4'), 3,22 (m, H-5'), 3,75 (t, $J = 5,4$ Hz, H-6'), 4,08 (d, $J = 7,9$ Hz, H-1''), 3,20 (d, $J = 4,6$ Hz, H-2''), 3,17 (d, $J = 6,0$ Hz, H-3''), 3,27 (d, $J = 5,0$ Hz, H-4''), 3,11 (m, H-5''), 3,74 (t, $J = 4,2$ Hz, H-6''), 3,85 (s, OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 137,5 (C-1), 106,4 (C-2), 153,7 (C-3), 135,5 (C-4), 153,2 (C-5), 106,4 (C-6), 127,9 (C-7), 130,6 (C-8), 61,5 (C-9), 101,9 (C-1'), 76,4 (C-2'), 73,7 (C-3'), 78,0 (C-4'), 76,9 (C-5'), 60,5 (C-6'), 103,7 (C-1''), 76,5 (C-2''), 77,7 (C-3''), 69,9 (C-4''), 78,0 (C-5''), 61,5 (C-6''), 56,0 (OCH₃).

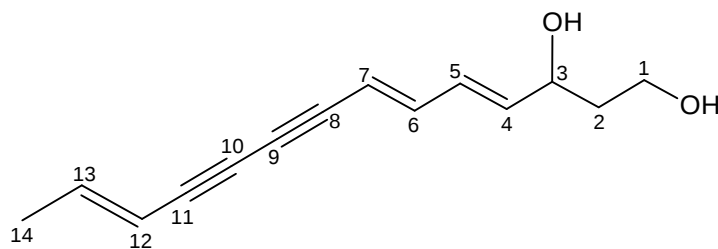


Figure 22 : (4E,6E,12E) -4,6,12-Tetradecatriene-8,10-diyne-1,3-diol **3**.

Légèrement jaune, ESI-MS : m/z 215,3 [M-H]⁻ (calculé pour C₁₄H₁₆O₂, 216,1150). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 3,66 (m, H-1), 1,72 (q, $J = 6,5$ Hz, H-2), 4,30 (q, $J = 6,5$ Hz, H-3), 5,92 (dd, $J_1 = 15,1$, $J_2 = 6,4$ Hz, H-4), 6,35 (dd, $J_1 = 15,9$, $J_2 = 10,7$ Hz, H-5), 6,73 (dd, $J_1 = 15,6$, $J_2 = 10,9$ Hz, H-6), 5,73 (d, $J = 15,6$ Hz, H-7), 5,64 (d, $J = 15,8$ Hz, H-12), 6,32 (s, H-13), 1,83 (m, H-14). RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 59,6 (C-1), 40,6 (C-2), 70,0 (C-3), 141,9 (C-4), 129,8 (C-5), 145,5 (C-6), 110,5 (C-7), 80,8 (C-8), 77,0 (C-9), 73,0 (C-10), 82,2 (C-11), 110,8 (C-12), 144,7 (C-13), 18,9 (C-14).

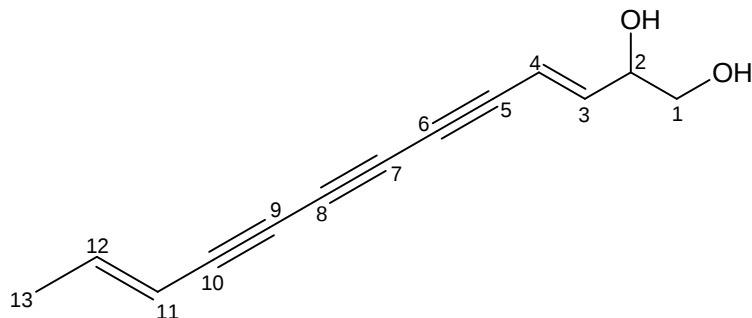


Figure 11 : Structure chimique de safynol **4**.

Légèrement jaune, ESI-MS : m/z 199,2 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{13}H_{12}O_2$, 200,0837). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ : 3,49 (m, H-1), 4,20 (m, H-2), 6,46 (s, H-3), 5,91 (d, $J = 16,0$ Hz, H-4), 5,64 (d, $J = 15,8$ Hz, H-11), 6,44 (s, H-12), 1,84 (dd, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, H-13). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ : 66,5 (C-1), 73,3 (C-2), 150,2 (C-3), 109,3 (C-4), 75,0 (C-5), 77,7 (C-6), 65,8 (C-7), 66,7 (C-8), 72,9 (C-9), 78,8 (C-10), 110,0 (C-11), 147,4 (C-12), 19,0 (C-13).

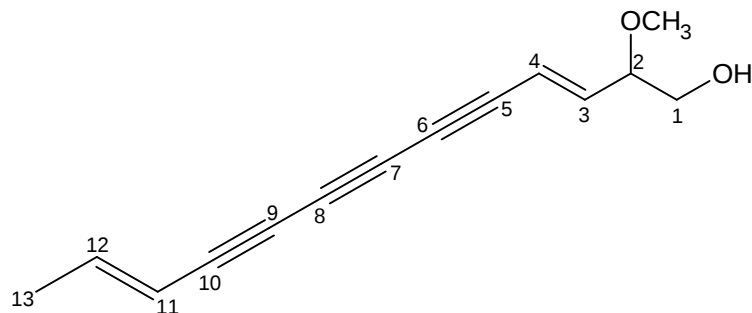


Figure 24 : Structure chimique de 2-méthoxy safynol **5**.

Légèrement jaune, ESI-MS : m/z 246,5 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{14}H_{16}O_2$, 247,1450). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ : 3,51 (m, H-1), 3,81 (s, H-2), 6,42 (s, H-3), 5,89 (d, $J = 16,0$ Hz, H-4), 5,64 (d, $J = 15,8$ Hz, H-11), 6,43 (s, H-12), 1,83 (dd, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, H-13). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ : 66,2 (C-1), 72,3 (C-2), 150,2 (C-3), 108,3 (C-4), 75,0 (C-5), 77,7 (C-6), 64,8 (C-7), 65,7 (C-8), 72,6 (C-9), 78,2 (C-10), 110,6 (C-11), 146,4 (C-12), 18,8 (C-13), 108,6 (OCH_3).

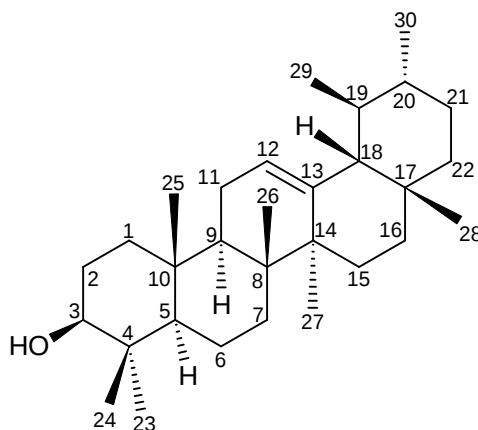


Figure 25 : Structure chimique de l'alpha amyryne **6a**.

Poudre blanchâtre, ESI-MS : m/z 427,4 $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{30}H_{50}O$, 426,3851). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 5,12 (t, $J=3,39$ Hz, H-12), 3,22 (dd, $J=4,94$, 10,8 Hz, H-3), 1,94 (dd, $J=4,45$, 12,8 Hz, H-2), 1,86 (dd, $J=3,85$, 6,25 Hz, H-11), 1,77 (dd, $J=4,01$, 12,3 Hz, H-15), 1,01 (s, H-16), 0,94 (s, H-23), 0,89 (s, H-25), 0,85 (s, H-30), 0,74 (s, H-28), 0,74 (s, H-29), 0,74 (s, H-24). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 138,6 (C-13), 123,1 (C-12), 105,9 (C-3), 56,9 (C-18), 56,1 (C-5), 51,3 (C-9), 45,9 (C-14), 42,2 (C-22), 39,2 (C-8), 38,9 (C-19), 34,8 (C-20), 34,0 (C-4), 32,4 (C-1), 31,1 (C-10), 30,7 (C-17), 30,3 (C-7), 29,8 (C-21), 29,3 (C-28), 28,9 (C-23), 27,3 (C-16), 26,2 (C-2), 25,5 (C-15), 23,2 (C-11), 22,0 (C-27), 20,3 (C-30), 18,3 (C-6), 17,7 (C-26), 15,8 (C-25), 14,3 (C-29), 12,7 (C-24).

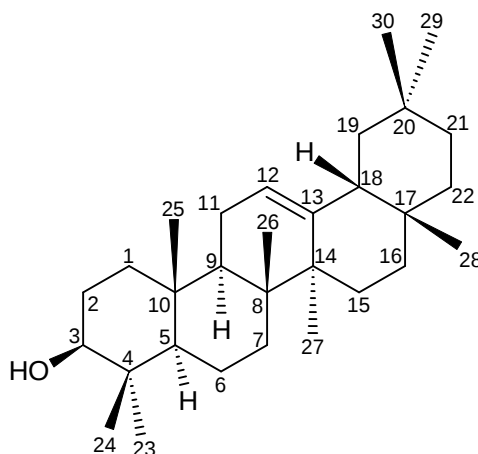


Figure 26 : Structure chimique de bêta amyrine **6b**.

Poudre blanchâtre, ESI-MS : m/z 427,4 $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{30}H_{50}O$, 426,3851). RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5,33 (t, $J=3,38$ Hz, H-12), 3,53 (dd, $J=4,93$, 9,82 Hz, H-3), 1,94 (dd, $J=4,38$, 11,2 Hz, H-2), 1,86 (dd, $J=3,85$, 6,15 Hz, H-11), 1,73 (dd, $J=4,02$, 11,3 Hz, H-15), 1,05 (s, H-16), 0,96 (s, H-26), 0,87 (s, H-25), 0,83 (s, H-30), 0,73 (s, H-28), 1,83 (s, H-29), 0,73 (s, H-24). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 140,8 (C-13), 121,7 (C-12), 77,3 (C-3), 77,1 (C-18), 76,8 (C-5), 71,8 (C-9), 56,8 (C-14), 56,2 (C-22), 50,2 (C-8), 50,2 (C-19), 42,3 (C-20), 42,4 (C-4), 42,3 (C-1), 39,8 (C-10), 39,6 (C-17), 37,3 (C-7), 36,5 (C-21), 36,2 (C-28), 35,8 (C-23), 31,9 (C-16), 31,7 (C-2), 28,3 (C-15), 28,0 (C-11), 24,3 (C-27), 23,9 (C-30), 22,9 (C-6), 22,6 (C-26), 19,4 (C-25), 18,8 (C-29), 11,9 (C-24).

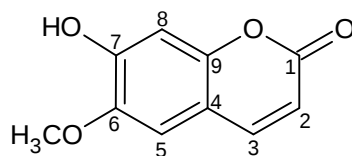


Figure 12 : Structure de la scopolétine 8.

Solide jaunâtre, ESI-MS : m/z 191,2 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{10}H_8O_4$, 192,1651). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 6,39 (br, H-6), 4,83 (t, $J = 7,5, 8$ Hz, H-8), 4,09 (t, $J = 7,5, 8,1$ Hz, H-4), 2,07 (d, $J = 7,8$ Hz, H-9), 1,99 (d, $J = 8$ Hz, H-2), 1,81 (d, $J = 8,3$ Hz, H-7), 1,3 (s, H-10). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 172,7 (C-1), 171,9 (C-5), 144,9 (C-6), 144,6 (C-3), 135,7 (C-8), 132,5 (C-4), 112,3 (C-9), 110,8 (C-2), 72,3 (C-7), 61,9 (C-10).

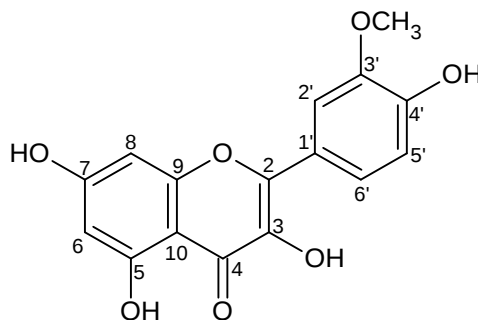


Figure 28 : Structure chimique de l'isohamnétine 11.

Solide jaunâtre clair, ESI-MS : m/z 317,2 $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{16}H_{12}O_7$, 316,2623). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 5,8 (br, d, $J = 15,8$ Hz, H-3), 7,72 (dd, $J = 8,52, 2,03$ Hz, H-11), 7,6 (dd, $J = 8,12, 1,58$ Hz, H-12), 6,02 (d, $J = 8,12$ Hz, H-14), 4,98 (br d, $J = 16,0$ Hz, H-4), 5,54 (d, $J = 2,03$ Hz, H-10), 5,37 (br s, H-15), 3,6 (s, H-5). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 171,9 (C-6), 147,9 (C-1), 144,9 (C-13), 140,0 (C-3), 140,0 (C-2), 125,5 (C-11), 123,7 (C-12), 114,8 (C-14), 113,1 (C-4), 109,9 (C-10), 82,6 (C-15), 76,8 (C-7), 71,8 (C-9), 66,6 (C-8), 55,9 (C-5).

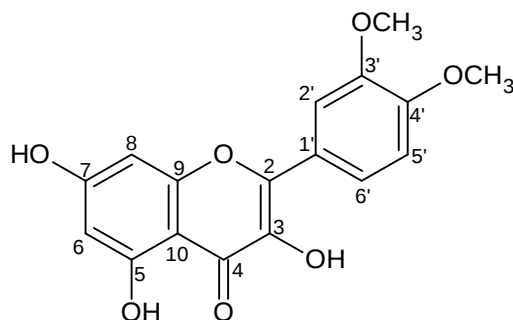


Figure 29 : Structure chimique de la 3',4'-diméthoxy quercétine **12**.

Solide Jaunâtre clair, ESI-MS 329,9 m/z $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{17}H_{14}O_7$, 330,9726). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,59 (d, $J = 9,15$ Hz, H-6'), 7,23 (s, H-2'), 6,98 (d, $J = 9,15$ Hz, H-5'), 6,76 (s, H-6), 6,29 (s, H-8), 4,05 (s, H-7', OCH_3), 3,95 (s, H-8', OCH_3). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 179,7 (C-4), 161,3 (C-5), 154,5 (C-7), 153,5 (C-10), 152,1 (C-2), 150,1 (C-3'), 145,9 (C-4'), 128,3 (C-3), 122,2 (C-1'), 119,0 (C-6'), 113,6 (C-2'), 108,0 (C-5'), 105,8 (C-9), 105,5 (C-6), 86,7 (C-8), 59,0 (C-7', OCH_3), 52,2 (C-8', OCH_3).

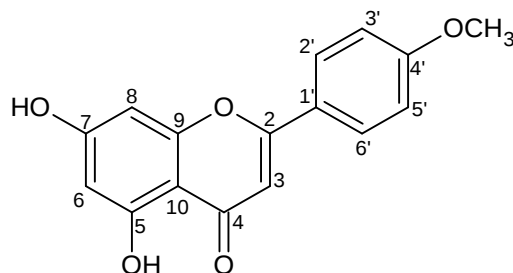


Figure 30 : Structure chimique de la 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone **13**.

Solide Jaunâtre, ESI-MS 285,6 m/z $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{16}H_{12}O_5$, 284,2606). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 8,09 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2'/6'), 6,28 (d, $J = 8,2$ Hz, H-3'/5'), 6,02 (s, H-3), 5,81 (d, $J = 2,4$ Hz, H-6), 5,82 (d, $J = 2,4$ Hz, H-8), 3,73 (s, H-4' OCH_3). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 178,2 (C-4), 177,5 (C-2), 175,9 (C-7), 175,9 (C-4'), 164,4 (C-5), 140,0 (C-9), 126,8 (C-2'/6'), 123,6 (C-1'), 114,8 (C-3'/5'), 104,1 (C-10), 103,8 (C-3), 99,8 (C-6), 88,4 (C-8), 55,3 (C-4' OCH_3).

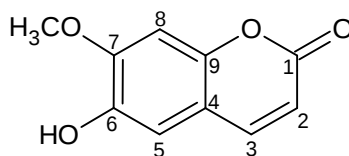


Figure 31 : Structure de l'isoscopoletine **14**.

Solide jaunâtre, ESI-MS : m/z 191,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{10}H_8O_4$, 192,1706), Rf 2,7 (gel de silice 60 F254 hexane / AcOEt, 2 :3). RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 6,45 (s br, H-6), 5,91 (dd, $J = 7,23, 8,01$ Hz, H-8), 5,64 (dd, $J = 7,22, 8,13$ Hz, H-4), 4,23 (d, $J = 7,81$ Hz, H-9), 3,51 (m, H-2), 2,34 (s, H-7), 3,83 (s, H-10). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 162,6 (C-1), 160,5 (C-5), 142,6 (C-6), 115,5 (C-3), 113,5 (C-8), 145,0 (C-4), 106,8 (C-9), 108,1 (C-2), 77,7 (C-7), 58,3 (C-10).

3.5 Résultats de l'analyse du profil d'acides gras

Les composés **7**, **9** et **10** appartiennent à la classe des lipides, plus précisément aux acides gras. Le tableau 9 présente une analyse détaillée du profil lipidique de l'extrait de *Carthamus caeruleus*, répartissant les acides gras en trois grandes catégories : saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. Les acides gras saturés représentent 7,75 g/100 g (24,54 % du profil total), avec une nette prédominance de l'acide palmitique (C16:0) à 6,69 g/100 g (20,22 %). Les monoinsaturés sont peu présents, totalisant 3,87 g/100 g (12,23 %), entièrement constitués d'acide oléique (C18:1n9). Les polyinsaturés dominent largement le profil lipidique avec 19,97 g/100 g (63,23 %), portés par une forte concentration d'acide linoléique (C18:2n6, oméga-6) à 12,79 g/100 g (40,51 %) et d'acide alpha-linolénique (C18:3n3, oméga-3) à 7,04 g/100 g (22,28 %). Le pourcentage global de lipides dans l'échantillon est de 31,59 %, indiquant une teneur grasse moyenne.

Tableau 9 : Résultats d'analyse du profil d'acide gras.

Calcul - Gras	g/100g	% Profil acide gras
SATURÉS TOTAL g/100 g	7,75	
C15:0	0,09	0,27
C16:0	6,69	20,22
C17:0	0,23	0,72
C18:0	0,62	1,97
C22:0	0,12	0,39
MONOINSATURÉS TOTAL g/100 g	3,87	
C18:1n9 c	3,87	12,23
POLYINSATURÉS TOTAL g/100 g	19,97	
C18:2n6 c	12,79	40,51
C18:3n6	0,14	0,43
C18:3n3	7,04	22,28
% de Gras dans l'échantillon	31,59	100,00

3.5 Activités biologiques des composés isolés

Les activités biologiques décrites dans cette section ont été testées sur la syringine **1**, syringinoside **2**, alpha et bêta amyryne **6**, scopolétine **8**, isorhamnétine **11**, 3',4'-diméthoxy quercétine **12**, 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone **13** et isoscopolétine **14**. Ces composés ont été retenus en raison des quantités récupérées à la suite de l'isolation.

Tel que montre le tableau 10 ci-dessous, la syringine **1**, la syringinoside **2**, l'alpha et bêta amyryne **6**, la scopolétine **8**, l'isorhamnétine **11**, la 3',4'-diméthoxyquercétine **12** et l'isoscopolétine **14** ne présentent aucune activité cytotoxique. La 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone **13** montre l'activité cytotoxique la plus intéressante parmi ces composés.

Tableau 10: Résultats d'activité cytotoxique des composés isolés

Composés isolés	Résazurine IC ₅₀ (µM)			Hoechst IC ₅₀ (µM)		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Syringine	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Syringinoside	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Alpha et bêta amyryne	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Scopolétine	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Isorhamnétine	125 ± 9	81 ± 5	124 ± 9	97 ± 7	55 ± 5	105 ± 12
3',4'-diméthoxy quercétine	155 ± 7	98,7 ± 0,8	126 ± 18	130 ± 16	78,1 ± 1,0	106 ± 10
5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone	71 ± 7	46 ± 3	75 ± 9	64 ± 5	36 ± 1	72 ± 9
Isoscopolétine	> 200	194 ± 3	> 200	> 200	134 ± 8	188 ± 17

Tel que montre le tableau 11, la syringine **1**, la syringoside **2** et l'alpha et bêta amyryne (**6a** et **6b**) n'ont pas montré d'activité anti-inflammatoire même à des concentrations de 160 µM. La scopoletine **8**, quant à elle, a montré une activité anti-inflammatoire modérée avec un pourcentage d'inhibition de 33,9 % à 160 µM. L'isorhamnétine **11**, la 3',4'-diméthoxy quercétine **12**, la 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone **13** et l'isoscopoletine **14** ont montré une forte activité anti-inflammatoire avec 100 % d'inhibition de la production de NO à une concentration de 160 µM.

Tableau 11: Résultats de l'activité anti-inflammatoire des composés isolés.

Composés isolés	Anti-inflammatoire sur RAW 264.7		
	IC ₅₀	% inhibition à concentration maximale non toxique	Concentration cytotoxique
Syringine	>160 µM	< 0% @ 160 µM	NA
Syringinose	>160 µM	< 0% @ 160 µM	NA
Alpha et beta amyryne	>160 µM	< 0% @ 160 µM	NA
Scopolétine	>160 µM	33,9% @ 160 µM	NA
Isorhamnétine	30 ± 5 µM	100% @ 160 µM	NA
3',4'-diméthoxy quercétine	45 ± 6 µM	100% @ 160 µM	NA
5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone	22 ± 3 µM	100% @ 160 µM	NA
Isoscopoletine	79 ± 13 µM	100% @ 160 µM	NA
L-NAME	250 µM	45 ± 5 %	NA
L-NAME	1 mM	75 ± 9 %	NA

Tel que montre le tableau 12 ci-dessous, aucun des composés isolés ne présente une activité significative contre *E. coli* ou *S. aureus*.

Tableau 12 : Résultats de l'activité antibactérienne des composés isolés.

Composés isolés	IC ₉₀ (μM)	IC ₉₀ (μM)
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Syringine	>200	>200
Syringinose	>200	>200
Alpha et beta amyrine	>200	>200
Scopolétine	>200	>200
Isorhamnétine	>200	>200
3',4'-diméthoxy quercétine	>200	>200
5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone	>200	>200
Isoscopolétine	>200	>200
Gentamycine	0,021 ± 0,03 μg/ml	0,09 ± 0,03 μg/ml

CONCLUSION

L'objectif principal du projet consistait à étudier la composition chimique et les activités biologiques des extraits, des fractions et des produits naturels isolés des racines de *Carthamus caeruleus*. L'extraction méthanolique effectuée sur 1 kg de poudre de racines a permis d'obtenir 94,10 g d'extrait brut, ce qui correspond à un rendement de 9,41 %. L'extrait solubilisé dans l'eau et ensuite partitionné avec le DCM et l'AcOEt par extraction liquide-liquide a conduit à trois fractions distinctes : 31,77 g pour la fraction DCM (33,76 %), 2,06 g pour la fraction AcOEt (2,19 %) et 54,11 g pour la fraction aqueuse (57,50 %). La fraction AcOEt montre une teneur élevée en polyphénols (18 ± 2 g/100 g) et inhibe la production de NO (activité anti-inflammatoire) de 89 % à 40 µg/ml. La fraction DCM, riche en composés non polaires, a montré une forte activité anti-inflammatoire en inhibant la production de NO de 100 % à 40 µg/ml ainsi qu'une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ($IC_{50}=17$ µg/ml) et *Staphylococcus aureus* ($IC_{50}=18$ µg/ml). Cette fraction a également montré une forte activité antioxydante sur modèle cellulaire avec une IC_{50} inférieure à 0,195 µg/ml.

Cette étude a permis l'isolation et l'identification de plusieurs composés issus des racines de *Carthamus caeruleus*. Parmi ces composés, on retrouve la syringine 1, le syringinoside 2, le (4E,6E,12E)-4,6,12-tétradécatriène-8,10-diyn-1,3-diol 3, le safynol 4 et sa variante le 2-méthoxy-safynol 5. L'alpha et la bêta-amyrine (composés 6a et 6b), des flavonoïdes tels que l'isorhamnétine 11, la 3',4'-diméthoxyquercétine 12, l'acacétine 13 ainsi que des coumarines comme la scopolétine 8 et l'isoscopolétine 14 ont également été identifiés. Les analyses des acides gras de la fraction lipidique (extrait à l'hexane) ont révélé la présence de l'acide palmitique (20,2 %), l'acide stéarique (2,0 %), l'acide oléique (12,2 %) et l'acide gamma-linolénique (0,4 %). Ces résultats montrent que la fraction lipidique de *Carthamus caeruleus* contient un mélange équilibré d'acides gras saturés (24,54 %), mono-insaturés (12,23 %), et polyinsaturés (63,23 %).

L'évaluation de la cytotoxicité de certains composés isolés a révélé que la majorité d'entre eux, notamment la syringine 1, le syringinoside 2, l'alpha et bêta amyrine 6, la scopolétine 8, l'isorhamnétine 11, la 3',4'-diméthoxyquercétine 12 et l'isoscopoletine 14, sont dépourvus de cytotoxicité significative ($IC_{50} > 200$ µM). En revanche, l'acacétine 13 a présenté une légère

cytotoxicité contre les lignées cancéreuses A-549 et DLD-1 mais également une toxicité comparable sur les cellules normales WS-1. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'isorhamnétine **11** ($IC_{50} = 30 \pm 5 \mu M$), la 3',4'-diméthoxyquercétine **12** ($IC_{50} = 45 \pm 6 \mu M$), l'isoscopoletine **14** ($IC_{50} = 79 \pm 13 \mu M$) et surtout l'acacétine **13** ($IC_{50} = 22 \pm 3 \mu M$) ont inhibé 100 % de la production de NO à une concentration de 160 μM . Les quelques composés testés n'ont pas montré d'activité antioxydante sur modèle cellulaire, ni d'activité antibactérienne sur *E. coli* et *S. aureus*.

Pour les travaux futurs, il serait intéressant d'identifier un modèle de test qui permettrait de confirmer clairement « l'effet antibrûlure » des racines de *Carthamus caeruleus*. Enfin, le développement de formulations spécifiques, notamment pour le traitement des brûlures et des cicatrices cutanées pourrait être envisagé.

LISTE DE RÉFÉRENCES

1. Organisation mondiale de la santé. Page d'accueil, centre des médias, principaux repères, détail, brûlures **2018**.
2. Lafourcade, D., Prise en charge de la brûlure cutanée thermique : parcours-type du centre de traitement des brûlés jusqu'à celui de rééducation. Thèse doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux U.F.R des sciences pharmaceutiques **2015**, p. 30-52.
3. Gautam, K.; Pai, R. R.; Bhat, S., Granulomatous lesions of the skin. *Journal of Pathology of Nepal* **2011**, 1, 81-86.
4. Liang, Y.; Liang, Y.; Zhang, H.; Guo, B., Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, 17 (3), 353-384.
5. Essafi, M.A. ; Les granulomatoses cutanées : Profil anatomocliniques par une étude rétrospective sur une durée de 13 ans au service de Dermatologie de L'Hôpital Militaire Moulay Ismail de Meknès (A propos de 120 cas). Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté de Médecine et Pharmacie **2018**, p. 22-39.
6. Bencheikh, S.E. ; Étude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum labiatae*. Thèse de doctorat en génie des procédés et environnement. Université K-M Ouargla **2017**, p. 08-10.
7. Hamadi, F.; Boudif, K.; Gougam, H.; Djouab, A.; Allane, T.; Benmounah, A.; Benamara, S., Characterization of a traditional semi-solid anti-burn preparation. *Phytotherapie* **2014**, 12, 149-155.
8. Nikolić, M.; Stevović, S., Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban For and Urban Green* **2015**, 14 (6), 782-789.
9. Achika, J.; Arthur, D.; Gerald, I.; Adedayo, A., A Review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. *IOSR Journal of Applied Chemistry* **2014**, 7 (8), 1-8.
10. Arroudj, L.; Zitoune, C.; Belkacem, N., Evaluation of the biological activity of a local medicinal plant *Carthamus caeruleus*. *University of Bejaia* **2017**, p. 28-64.
11. Gautam, K.; Pai, R. R.; Bhat, S., Granulomatous lesions of the skin. *Journal of Pathology of Nepal* **2011**, 1, 81-86.
12. Duwez, M.; Valette, A.; Foroni, L.; Allenet, B., Involvement of hospital pharmacy technician for expanding medication reconciliation process in France: Actors' willingness and opinions. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2019**, 77 (2), 168-177.
13. Organisation mondiale de la santé. Page d'accueil, centre des médias, principaux repères, détail, brûlures **2018**.
14. Lafourcade, D., Prise en charge de la brûlure cutanée thermique : parcours-type du centre de traitement des brûlés jusqu'à celui de rééducation. Thèse doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux U.F.R des sciences pharmaceutiques **2015**, p. 30-52.
15. Mougui, A., Les brûlures graves de l'enfant : Épidémiologie et facteurs pronostics (à propos de 163 cas). Thèse doctorat en médecine. Université Cadi Ayyad Faculté de médecine et de pharmacie Marrakech **2014**, p. 10-15.

16. Marcet, M., La cicatrisation des brûlures par le miel. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux, Collège Sciences de la Sante, U.F.R. des sciences Pharmaceutiques **2017**, p. 22-31.
17. Turchi, M.; Arslan, A.; Iranshahi, M., Biological effects of Arctiin from some medicinal plants of Asteraceae family. *American Journal of Biology and Life Sciences* **2016**, 4 (5), 41-47.
18. García-Herrera, P.; Sánchez-Mata, M.C.; Cámara, M.; Fernández-Ruiz, V.; Díez-Marqués, C.; Molin, M.; Tardío, J., Nutrient composition of six wild edible Mediterranean Asteraceae plants of dietary interest. *Journal of Food Composition and Analysis* **2014**, 34 (2), 163-170.
19. Abolhassani Chimeh, R.; Rustaiyan, A.; Haghighat, S., Chemical composition and antimicrobial activity of the extract from *Anthemis coelopoda* Boiss. var. *coelopoda* stems and roots. *Chemistry Medicine Environmental Science* **2016**, 3 (12), 41-47.
20. Sobanski, J.; Giavalisco, P.; Fischer, A.; Kreiner, J.M.; Walther, D.; Schöttler, M.A.; Pellizzer, T.; Golczyk, H.; Obata, T.; Bock, R.; et al., Chloroplast competition is controlled by lipid biosynthesis in evening primroses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, 116 (12), 5665-5674.
21. Gualberto, J.M.; Newton, K.J., Plant mitochondrial genomes: Dynamics and mechanisms of mutation. *Annual Review of Plant Biology* **2017**, 68, 225-252.
22. Smith, D.R., Evolution: In the genomes of chloroplasts, anything goes. *Current Biology* **2017**, 27 (21), R1151-R1153.
23. Liang, Y.; Liang, Y.; Zhang, H.; Guo, B., Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, 17 (3), 353-384.
24. Essafi, M.A. ; Les granulomatoses cutanées : Profil anatomoclinique par une étude rétrospective sur une durée de 13 ans au service de dermatologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès (A propos de 120 cas). Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté de Médecine et Pharmacie **2018**, p. 22-39.
25. Bencheikh, S.E. ; Étude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum labiatae*. Thèse de doctorat en génie des procédés et environnement. Université K-M Ouargla **2017**, p. 8-10.
26. Hamadi, F.; Boudif, K.; Gougam, H.; Djouab, A.; Allane, T.; Benmounah, A.; Benamara, S., Characterization of a traditional semi-solid anti-burn preparation. *Phytotherapie* **2014**, 12, 149-155.
27. Djemaa, R.; Lamari, H., Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la Wilaya de Tizi Ouzou (Communes Tirmitine et M'kira). Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques **2018**, p. 26-27.
28. Girard-Lalancette, K.; Pichette, A.; Legault, J., Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro-and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry* **2009**, 115 (2), 720-726.
29. Prost-Squarcioni, C., Histology of skin and hair follicle. *Medicine Science (Paris)* **2006**, 22 (2), 131-137.
30. Harris-Tryon, T. A.; Grice, E. A., Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science* **2022**, 376 (6596), 940-945.
31. Anne-Françoise, R., Brûlures et brûlés : soins et traitements. *Le guide minute* **2018**, p.19-130.

32. Habif, T. P.; OnTipball, J. L. Jr.; Chapman, M. S.; Lindos, J. G. H.; Zug, K. A.; Levalle, Q., *Maladies cutanées, diagnostic et traitement. 2^e édition*, **2012**, p. 260-365.
33. Kone, M., *Les Brûlures : Aspects épidémio-cliniques et thérapeutiques au centre hospitalo-universitaire Pr Bocar Sidi Sall de Kati. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie*, **2023**, p. 12-36.
34. Quézel, P.; Santa, S., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2, Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris*, **1963**, p. 19-22.
35. Mioulane, P., *Encyclopédie universelle des 15 000 plantes et fleurs de jardin. Larousse, Paris*, **2004**.
36. Slimani, S., *Étude des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antispasmodiques et cicatrisantes des racines de *Carthamus caeruleus*. Mémoire de master, Université Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*, **2017**, p. 14-28.
37. Hopkins, W. G., *Physiologie végétale. 1^{re} édition, De Boeck Supérieur* **2003**, p. 213.
38. Balmey, M.; Grey-Wilson, C., *Toutes les fleurs de Méditerranée : Les fleurs, les graminées, les arbres et les arbustes. Éditions Delachaux et Niestlé SA, Paris* **2000**, p. 458-459.
39. Chemouri, F. Z.; Ghezlaoui-Bendi-Djelloul, B.-E.; Benabadji, N., *Floral diversity of the Tlemcen mountains (Western Algeria). Ecologia Balkanica* **2015**, 7 (2), 1-11.
40. Pastrikos, G., *Carthamus caeruleus L. (Cardueae, Asteraceae), a new record for Rodos Island, Greece. Phytologia Balcanica* **2018**, 6, 11-13.
41. Mihoub, I.; Robert, T.; Ghashghaie, J.; Vilatersana, R.; Lamy, F.; Benmrid, R.; Lamothe-Sibold, M.; Aid, F., *Phylogenetic position of two endemic Carthamus species in Algeria and their potential as sources of genes for water use efficiency improvement of safflower. Journal of Systematics and Evolution* **2016**, 54 (4), 393-404.
42. Baghiani, A.; Boumerfeg, S.; Belkhiri, F.; Khennouf, S.; Charef, N.; Harzallah, D.; Arrar, L.; Abdel-Wahhab, M. A., *Antioxidant and radical scavenging properties of Carthamus caeruleus L extracts grow wild in Algeria flora. Comunicata Scientiae* **2010**, 1 (2), 128-136.
43. Amina, B.; Fethia, F., *Ethnobotanical study, phytochemical characterization and healing effect of Carthamus caeruleus L. rhizomes. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **2013**, 3 (1), 61-68.
44. Karima, S.; Farida, S.; Mihoub, Z. M., *Antimicrobial activity of an Algerian medicinal plant: Carthamus caeruleus L. Pharmacognosy Communications* **2013**, 3 (4), 1-6.
45. Dahmani, M. M.; Laoufi, R.; Selama, O.; Arab, K., *Gas chromatography coupled to mass spectrometry characterization, anti-inflammatory effect, wound-healing potential, and hair growth-promoting activity of Algerian Carthamus caeruleus L (Asteraceae). Indian Journal of Pharmacology* **2018**, 50 (3), 123-129.
46. Ouda, A. N.; Fatiha, M.; Sadia, M.; Zohra, S. F.; Noureddine, D., *In vivo anti-inflammatory activity of aqueous extract of Carthamus caeruleus L rhizome against carrageenan-induced inflammation in mice. Jordan Journal of Biological Sciences* **2021**, 14 (3), 529-535.
47. Frątczak, A.; Bylka, W.; Studzińska-Sroka, E., *Phenolic acids – structure, biological activity, and importance in cosmetology. Polish Journal of Cosmetology* **2015**, 18 (4), 270-274.

48. Gawlik-Dziki, U., Phenolic acids as bioactive food components. *Food Science, Technology and Quality* **2004**, 4 (41), 29-40.
49. Parus, A., Antioxidant and pharmacological properties of phenolic acids. *Advances in Phytotherapy* **2013**, 1, 48-53.
50. Karami, S.; Sabzalian, M. R.; Rahimmalek, M., Seed polyphenolic profile, antioxidative activity, and fatty acids composition of wild and cultivated *Carthamus* species. *Chemistry and Biodiversity* **2018**, 15 (3), e1700562.
51. Bocheva, A.; Mikhova, B.; Taskova, R.; Mitova, M.; Duddeck, H., Antiinflammatory and analgesic effects of *Carthamus lanatus* aerial parts. *Fitoterapia* **2003**, 74 (6), 559-563.
52. Zhou, Y.-Z.; Chen, H.; Qiao, L.; Xu, N.; Cao, J.-Q.; Pei, Y.-H., Two new compounds from *Carthamus tinctorius*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2010**, 102, 429-433.
53. Roy, A.; Khan, A.; Ahmad, I.; Alghamdi, S.; Rajab, B. S.; Babalghith, A. O.; Alshahrani, M. Y.; Islam, S.; Islam, M. R., Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International* **2022**, 10, 1-9.
54. Alzaabi, M. M.; Hamdy, R.; Ashmawy, N. S.; Hamoda, A. M.; Alkhayat, F.; Khademi, N. N.; Abo Al Joud, S. M.; El-Keblawy, A. A.; Soliman, S. S. M., Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. *Phytochemistry Reviews* **2022**, 21, 291-312.
55. Badshah, S. L.; Faisal, S.; Muhammad, A.; Poulson, B. G.; Emwas, A. H.; Jaremko, M., Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, 140, 111596.
56. Chen, L.; Cao, H.; Huang, Q.; Xiao, J.; Teng, H., Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, 62 (28), 7730-7742.
57. Dias, M. C.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S., Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules* **2021**, 26 (17), 5377.
58. Yang, Y.; Trevethan, M.; Wang, S.; Zhao, L., Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2022**, 104, 108967.
59. Gardener, S. L.; Rainey-Smith, S. R.; Weinborn, M.; Bondonno, C. P.; Martins, R. N., Intake of products containing anthocyanins, flavanols, and flavanones, and cognitive function: A narrative review. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2021**, 13, 640381.
60. Li, C.; Tang, Y.; Ye, Y.; Zuo, M.; Lu, Q., Potential of natural flavonols and flavanones in the treatment of ulcerative colitis. *Frontiers in Pharmacology* **2023**, 14, 1120616.
61. Ávila-Gálvez, M. Á.; Giménez-Bastida, J. A.; González-Sarrías, A.; Espín, J. C., New insights into the metabolism of the flavanones *Eriocitrin* and *Hesperidin*: A comparative human pharmacokinetic study. *Antioxidants* **2021**, 10(3), 435.
62. Denaro, M.; Smeriglio, A.; Trombetta, D., Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Citrus* flavanones mix and its stability after *In vitro* simulated digestion. *Antioxidants* **2021**, 10(2), 140.
63. Khan, A.; Ikram, M.; Hahm, J.R.; Kim, M.O., Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders. *Antioxidants* **2020**, 9, 609.

64. Stevens, Y.; Rymenant, E.V.; Grootaert, C.; Camp, J.V.; Possemiers, S.; Masclee, A.; Jonkers, D., The intestinal fate of *Citrus* flavanones and their effects on gastrointestinal health. *Nutrients* **2019**, *11*, 1464.
65. Salaritabar, A.; Darvishi, B.; Hadjiakhoondi, F.; Manayi, A.; Sureda, A.; Nabavi, S.F.; Fitzpatrick, L.R.; Nabavi, S.M.; Bishayee, A., Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 5097–5114.
66. Khan, M.K.; Huma, Z.E.; Dangles, O., A comprehensive review on flavanones, the major *Citrus* polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *33*, 85–104.
67. Konan, S. K.; Kimou, S. H.; Kouamé, T. K.; Néné, F. B.; Biré, A., Evaluation of agronomic performance and secondary metabolite content of three onion (*Allium cepa* L.) varieties grown in dry and rainy seasons in central Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **2024**, *18* (3), 1062-1073.
68. Mani, R.; Natesan, V., Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* **2018**, *145*, 187-196.
69. Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A., Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19*(10), 16240-16265.
70. Rana, A.; Samtiya, M.; Dhewal, T.; Mishra, V.; Aluko, R. E., Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry* **2022**, *46*(6), e14264.
71. Wang, L. Y.; Li, F. X.; Yang, Y. X.; Tang, Y.; Li, Y.; Shi, F.; Ming, J., Interaction mechanism between polyphenols and polysaccharides and effect on polyphenolic properties: a review. *Food Science* **2017**, *38*(11), 276-282.
72. Singla, R. K.; Dubey, A. K.; Gary, A.; Sharma, R. K.; Fiorion, M.; Ameen, S. M.; Haddad, M. A.; Al-Hiary, M., Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* **2019**, *102*(5), 1397-1400.
73. Liu, Y.; Wang, M.; Cao, Y.; Zeng, M.; Zhang, Q.; Ren, Y.; Chen, X.; He, C.; Fan, X.; Zheng, X.; Feng, W., Chemical constituents from the flowers of *Carthamus tinctorius* L. and their lung protective activity. *Molecules* **2022**, *27*(11), 3573.
74. Cheng, H.; Yang, C.; Ge, P.; Liu, Y.; Zafar, M. M.; Hu, B.; Zhang, T.; Luo, Z.; Lu, S.; Zhou, Q.; Jaleel, A.; Ren, M., Genetic diversity, clinical uses, and phytochemical and pharmacological properties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.): an important medicinal plant. *Frontiers in Pharmacology* **2024**, *15*, 1374680.
75. Elkanzi, N. A. A.; Hrichi, H.; Alolayan, R. A.; Derafa, W.; Zahou, F. M.; Bakr, R. B., Synthesis of chalcones derivatives and their biological activities: A review. *ACS Omega* **2022**, *7*, 27769-27786.
76. Pereira, R.; Silva, A. M. S.; Ribeiro, D.; Silva, V. L. M.; Fernandes, E., Bis-chalcones: A review of synthetic methodologies and anti-inflammatory effects. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *252*, 115280.
77. Jasim, H. A.; Nahar, L.; Jasim, M. A.; Moore, S. A.; Ritchie, K. J.; Sarker, S. D., Chalcones: synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules* **2021**, *11*(8), 1203.
78. Shalaby, M. A.; Rizk, S. A.; Fahim, A. M., Synthesis, reactions and application of chalcones: a systematic review. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2023**, *21*, 5317-5346.

79. Baerle A., Savcenko A., Tatarov P., Fetea F., Ivanova R. Stability limits of a red carthamin–cellulose complex as a potential food colorant. *Food & Function* **2021**, 17(12), 8037–8043.
80. Guo, H.; Zhu, L.; Tang, P.; Chen, D.; Li, Y.; Li, J.; Bao, C., Carthamin yellow improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating inflammation and ferroptosis in rats. *International Journal of Molecular Medicine* **2021**, 47(4), 52.
81. Bian, W.; Wei, L.; Wang, K., Carthamin yellow alleviates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis by repairing the intestinal barrier and activating the Nrf2/GPX4 axis. *International Immunopharmacology* **2024**, 141, 113020.
82. Waki, T.; Terashita, M.; Fujita, N.; Fukuda, K.; Kato, M.; Negishi, T.; Uchida, H.; Aoki, Y.; Takahashi, S.; Nakayama, T., Identification of the genes coding for carthamin synthase, peroxidase homologs that catalyze the final enzymatic step of red pigmentation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant and Cell Physiology* **2021**, 62(12), 2064–2073.
83. Nuraddinova, N. N.; Yuldasheva, M. R.; Saparbayev, S. R., Synthesis of carthamine derivatives. *Universal Journal of Medical and Natural Sciences* **2024**, 1(5), 2992–8826.
84. Yue, S.; Tang, Y.; Li, S.; Duan, J.-A. Chemical and biological properties of quinochalcone C-glycosides from the florets of *Carthamus tinctorius*. *Molecules* **2013**, 18(12), 15220–15254.
85. Zhang, X.; Shao, C.; Jin, L.; Wan, H.; He, Y., Optimized separation of carthamin from safflower by macroporous adsorption resins and its protective effects on PC12 cells injured by OGD/R via Nrf2 signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2023**, 71(48), 18986–18998.
86. González-Arceo, M.; Gomez-Lopez, I.; Carr-Ugarte, H.; Eseberri, I.; González, M.; Cano, M. P.; Portillo, M. P.; Gómez-Zorita, S., Anti-obesity effects of isorhamnetin and its conjugates. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24(1), 299.
87. Darmawan, A.; Megawati; Fajriah, S., 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a flavonol compound isolated from *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2013**, 3(1), 88–90.
88. Yang, W. J.; Liu, C.; Gu, Z. Y.; Zhang, X. Y.; Cheng, B.; Mao, Y.; Xue, G. P., Protective effects of acacetin isolated from *Ziziphora clinopodioides* Lam. (*Xintahua*) on neonatal rat cardiomyocytes. *Chinese Medicine* **2014**, 9(1), 28.
89. Patanè, C.; Cosentino, S. L.; Calcagno, S.; Pulvirenti, L.; Siracusa, L., How do sowing time and plant density affect the pigments safflomins and carthamin in florets of safflower? *Industrial Crops and Products* **2020**, 148, 112313.
90. Abe, Y.; Sohtome, T.; Sato, S., Biomimetic synthesis of carthamin, a red pigment in safflower petals, via oxidative decarboxylation. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2020**, 57(7), 2735–2740.
91. Ninkuu, V.; Zhang, L.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Zeng, H., Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (11), 5710.
92. Del Prado-Audelo, M. L.; Cortés, H.; Caballero-Florán, I. H.; González-Torres, M.; Escutia-Guadarrama, L.; Bernal-Chávez, S. A.; Giraldo-Gomez, D. M.; Magaña, J. J.; Leyva-Gómez, G., Therapeutic applications of terpenes on inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, 12, 704197.
93. Boncan, D. A. T.; Tsang, S. K. S.; Li, C.; Lee, I. H. T.; Lam, H. M.; Chan, T. F.; Hui, J. H. L., Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21(19), 7382.

94. Darshani, P.; Sarma, S. S.; Srivastava, A. K.; Baishya, R.; Kumar, D., Anti-viral triterpenes: a review. *Phytochemistry Reviews* **2022**, *21*, 1761–1842.
95. Renda, G.; Gökkaya, İ.; Şöhretoğlu, D., Immunomodulatory properties of triterpenes. *Phytochemistry Reviews* **2022**, *21*(2), 537–563.
96. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T., Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, *11*, 568032.
97. Tao, H.; Lauterbach, L.; Bian, G.; Chen, R.; Hou, A.; Mori, T.; Cheng, S.; Hu, B.; Lu, L.; Mu, X.; Li, M.; Adachi, N.; Kawasaki, M.; Moriya, T.; Senda, T.; Wang, X.; Deng, Z.; Abe, I.; Dickschat, J. S.; Liu, T., Discovery of non-squalene triterpenes. *Nature* **2022**, *606*, 414–419.
98. Indriati, S.; Yusuf, M.; Riskayanti, R.; Amaliah, N.; Latief, M.; Sjafruddin, R.; Attahmid, N. F. U., GC-MS and antioxidant capacity analysis in propanol extract of *Carthamus tinctorius* L. *INTEK: Journal Panellation* **2021**, *8*(1), 2615–5427.
99. Mangain, J.; Mujib, A.; Bansal, Y.; Gulzar, B.; Zafar, N.; Syeed, R.; Alsughayyir, A.; Dewir, Y. H., Elicitation induced α -amyrin synthesis in *Tylophora indica* *in vitro* cultures and comparative phytochemical analyses of *in vivo* and micropropagated plants. *Plants* **2024**, *13*(1), 122.
100. Abd-El-Aziz, N. M.; Hifnawy, M. S.; Lotfy, R. A.; Younis, I. Y., LC/MS/MS and GC/MS/MS metabolic profiling of *Leontodon hispidulus*, *in vitro* and *in silico* anticancer activity evaluation targeting hexokinase 2 enzyme. *Scientific Reports* **2024**, *14*, 6872.
101. Wan, L.; Huang, Q.; Li, C.; Yu, H.; Tan, G.; Wei, S.; El-Sappah, A. H.; Sooranna, S.; Zhang, K.; Pan, L.; Zhang, Z.; Lei, M., Integrated metabolome and transcriptome analysis identifies candidate genes involved in triterpenoid saponin biosynthesis in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Frontiers in Plant Science* **2024**, *14*, 1295186.
102. Luo, C.; Duan, Z.; Kikuchi, T.; Otsuki, K.; Zhang, M.; Kambayashi, R.; Ito, K.; Sugiyama, A.; Li, W., Comprehensive chemical analysis of *Codonopsis lanceolata* roots using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole-exactive–orbitrap Mass Spectrometry. *Chemistry* **2025**, *7*(1), 4.
103. McPherson, M. A.; Good, A. G.; Topinka, A. K. C.; Hall, L. M. Theoretical hybridization potential of transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with weedy relatives in the new world. *Canadian Journal of Plant Science* **2004**, *84* (4), 923–934.
104. Malik, F.; et al., Cytotoxic activity of ethanol extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flowers against T47D breast cancer cell line. *Journal Farmasi Sains dan Practis* **2021**, *7* (3), 384–392.
105. Wu, Z.; Li, R.; Sun, M.; Hu, X.; Xiao, M.; Hu, Z.; Jiao, P.; Pu, S.; Zhai, J.; Zhang, J., Current advances of *Carthamus tinctorius* L.: a review of its application and molecular regulation of flavonoid biosynthesis. *Medicinal Plant Biology* **2024**, *3*, e004.
106. Schlag S., Vetter W. Quantitative data of up to thirty sterols in vegetable oils and fats. *European Food Research and Technology* **2024**, *15*, 131–146.
107. Wang, S.; Cao, J.; Deng, J.; Hou, X.; Hao, E., Chemical characterization of flavonoids and alkaloids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupled with hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry* **2021**, *12*, 100143.

108. Delshad, E.; Yousefi, M.; Sasannezhad, P.; Rakhshandeh, H.; Ayati, Z., Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from traditional medicine to modern medicine. *Electronic Physician* **2018**, *10*, 6672–6681.
109. Liu, K.; Harrison, M. T.; Wang, B.; Yang, R.; Yan, H.; Zou, J.; Liu, D. L.; Meinke, H.; Tian, X.; Ma, S.; Zhang, Y.; Man, J.; Wang, X.; Zhou, M., Designing high-yielding wheat crops under late sowing: a case study in southern China. *Agronomy for Sustainable Development* **2022**, *42*(2), 29.
110. Van der Merwe, R.; Labuschagne, M. T.; Herselman, L.; Hugo, A., Effect of heat stress on seed yield components and oil composition in high- and mid-oleic sunflower hybrids. *South African Journal of Plant and Soil* **2015**, *32*(3), 121–128.
111. Yeilaghi, H.; Arzani, A.; Ghaderian, M.; Fotovat, R.; Feizi, M.; Pouredad, S. S., Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Food Chemistry* **2012**, *130*, 618–625.
112. Kahkeshani, N.; Farzaei, F.; Fotouhi, M.; Alavi, S. S.; Bahramsoltani, R.; Naseri, R.; Momtaz, S.; Abbasabadi, Z.; Rahimi, R.; Siahpoosh, A.; Farzaei, M. H.; Bishayee, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **2019**, *22*(3), 225–237.
113. Umar, S.; Ambreen, H.; Variath, M. T.; Rao, A. R.; Agarwal, M.; Kumar, A.; Goel, S.; Jagannath, A., Utilization of molecular, phenotypic, and geographical diversity to develop a compact composite core collection in the oilseed crop, safflower (*Carthamus tinctorius* L.), through a maximization strategy. *Frontiers in Plant Science* **2016**, *7*, 19.
114. Cosge, Ş.; Kiralan, M.; Ramadan, M. F., Impact of harvest times on the quality characteristics of oils recovered from different safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars sown in spring and autumn. *European Food Research and Technology* **2016**, *242*(3), 371–381.
115. Ahmadzadeh, S.; Kadivar, M.; Saeidi, G., Investigation of oil properties and seed composition in some safflower lines and cultivars. *Journal of Food Biochemistry* **2014**, *38*(5), 527–532.
116. Kim, J.H., Polyacetylenic compounds from *Atractylodes* rhizomes. *Korean Journal of Herbology* **2016**, *31*(5), 25–39.
117. Belounis, Y.; Moualek, I.; Sebbane, H.; Dekir, A.; Bendif, H.; Garzoli, S.; Houali, K., Phytochemical characterization and antibacterial activity of *Carthamus caeruleus* L. aqueous extracts: In vitro and in silico molecular docking studies. *Chemistry & Biodiversity* **2025**, *22*, e202402662.
118. Liu, L.; Cheng, Y.; Zhang, H., Phytochemical analysis of anti-atherogenic constituents of Xue-Fu-Zhu-Yu-Tang using HPLC-DAD-ESI-MS. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*(11), 1295–1301.
119. Patel, S.; Bhattacharyya, A. Beta-amyrin, a pentacyclic triterpenoid, and its pharmacological significance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2015**, *5*(6), 437–443.
120. Gherraf, N.; El-Bassuony, A. A.; Zellagui, A.; Rhouati, S.; Ahmed, A. A.; Ouahrani, M. R., Isolation of coumarins and coumarin glucoside from *Launaea resedifolia*. *Asian Journal of Chemistry* **2006**, *18*(3), 2348–2352.
121. Firmansyah, A.; Winingsih, W.; Manobi, J. D. Y., Review of scopoletin: isolation, analysis process, and pharmacological activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2021**, *11*(4), 12006–12019.

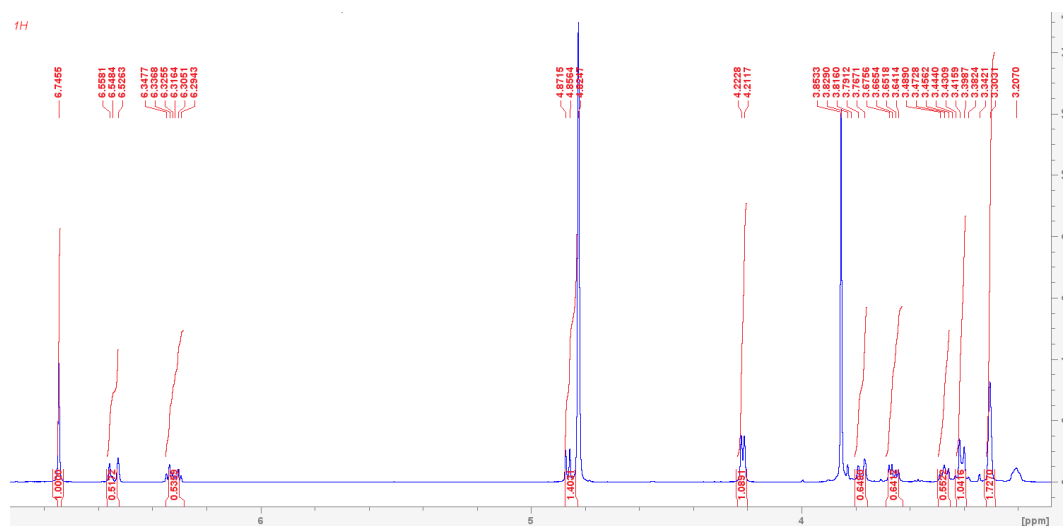
122. Semwal, R. B.; Semwal, D. K.; Combrinck, S.; Trill, J.; Gibbons, S.; Viljoen, A., Acacetin – a simple flavone with diverse pharmacological activities. *Phytochemistry Letters* **2019**, 32, 56–65.
123. Selim, Y. A.; Ouf, N. H., Anti-inflammatory new coumarin from *Ammi majus* L. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 2(1), 1.
124. Jeong, M.; Ju, Y.; Kwon, H.; Kim, Y.; Hyun, K.Y.; Choi, G.E., Protocatechuic acid and syringin from *Saussurea neoserrata* Nakai attenuate prostaglandin production in human keratinocytes exposed to airborne particulate matter. *Current Issues in Molecular Biology* **2023**, 45, 5950–5966.
125. Shi, P.; Ruan, Y.; Zhong, C.; Teng, L.; Ke, L., Identification of pharmacokinetic markers for safflower injection using a combination of system pharmacology, multicomponent pharmacokinetics, and quantitative proteomics study. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, 13, 1062026.
126. Aly, S. H.; Kandil, N. H.; Hemdan, R. M.; Kotb, S. S.; Zaki, S. S.; Abdelaziz, O. M.; AbdelRazek, M. M. M.; Almahli, H.; El Hassab, M. A.; Al-Rashood, S. T.; Binjubair, F. A.; Eldehna, W. M., GC/MS profiling of the essential oil and lipophilic extract of *Moricandia sinaica* Boiss. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. *Molecules* **2023**, 28(5), 2193.

ANNEXE 1

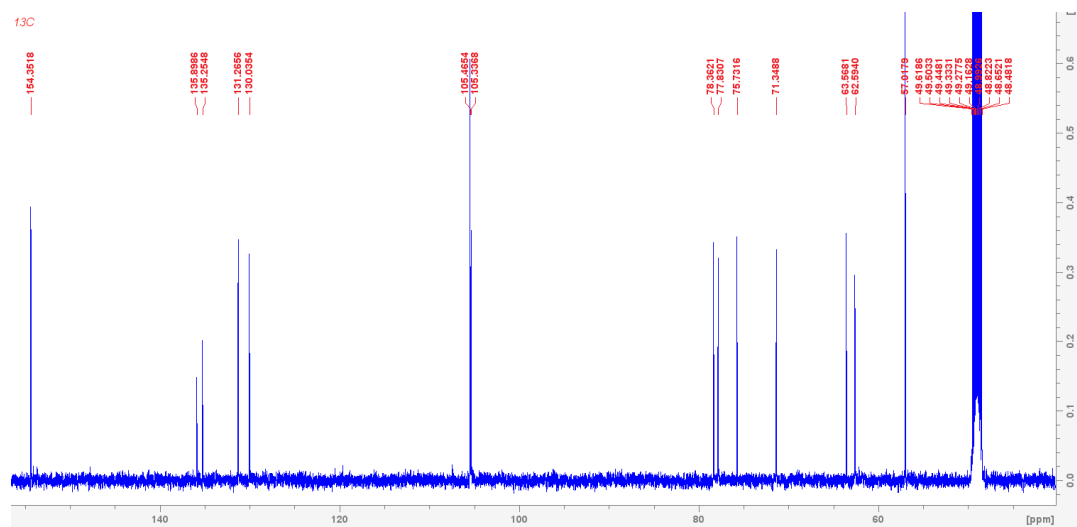
Annexe 1 : Spectres RMN de la syringine

Tableau de d'assignation de proton et de carbone 1

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
1	63,5681	4,85	d	5,4	
2	130,0354	6,34	dd	15,5	5,1
3	131,2656	6,55	d	15,4	
4	—				
5,9	105,3368	6,74	s		
6,8	154,3518				
7	—				
10,11(OCH ₃)	57,0179	3,85	s		
1'	105,4654	6,32	m		
2'	71,3488	3,3	s		
3'	75,7316	3,34	s		
4'	77,8307	3,39	s		
5'	78,3621	3,46	s		
6'	62,594	3,65	dd	11,6	5,1



Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de 1

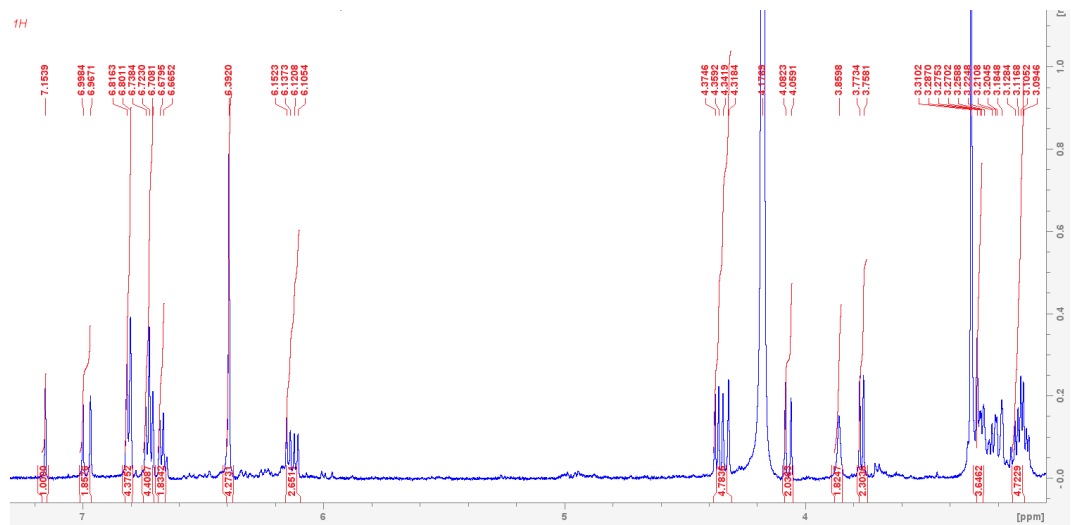


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de 1

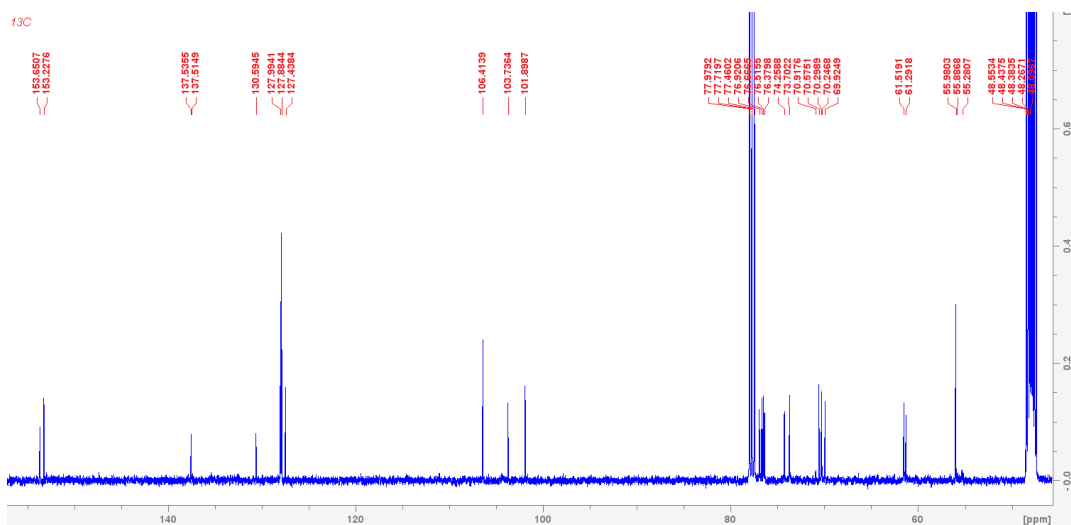
Annexe 2 : Spectres RMN de la syringinoside

Tableau de d'assignation de proton et de carbone 2

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
1	137,5149	4,68	d	5,2	
2	106,4139	6,12	dd	16,1	4,4
3	153,6507	6,99	d	15,3	
4	135,5355				
5	153,2276	6,81	d	16,1	
6	106,4139	7,15	s		
7	127,8844				
8	130,5945	4,36	dd	14,1	4,4
9	61,5191	4,34	d	4,8	
1'	101,8987	4,31	d	7,3	
2'	76,3798	6,1	d	4,6	
3'	73,7022	4,73	s		
4'	77,9792	3,43	m		
5'	76,9206	3,22	m		
6'	60,5068	3,75	t	5,4	
1''	103,7364	4,08	d	7,9	
2''	76,5155	3,2	d	4,6	
3''	77,7197	3,17	d	6	
4''	69,9249	3,27	d	5	
5''	77,9792	3,11	m		
6''	61,5191	3,74	t	4,2	
10, 11OCH ₃	55,9803	3,85	s		



Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de **2**



Agrandissement du spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) de **2**

Annexe 3 : Tableaux des spectres RMN des polyacétylènes

Tableau de d'assignation de proton et de carbone 3

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
1	59,6704	3,66	m		
2	40,6585	1,72	q	6,5	
3	69,9985	4,30	q	6,5	
4	141,9548	5,92	dd	15,1	6,4
5	129,8389	6,35	dd	15,9	10,7
6	145,4966	6,73	dd	15,6	10,9
7	110,5874	5,73	d	15,6	
8	80,8253				
9	77,0733				
10	73,0874				
11	82,2209				
12	110,8305	5,64	d	15,8	
13	144,7678	6,32			
14	18,9029	1,83	m		

Tableau de d'assignation de proton et de carbone 4

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
1	66,5096	3,49	m		
2	73,3943	4,20	m		
3	150,2837	6,46			
4	109,3252	5,91	d	16,0	
5	75,0448				
6	77,785				
7	65,8098				
8	66,7833				

9	72,9838				
10	78,8183				
11	110,0417	5,64	d	15,8	
12	147,4189	6,44			
13	19,0484	1,84	dd	6,9	1,9

Annexe 4 : Spectres RMN de l'alpha amyryne et bêta amyryne

Tableau de d'assignation de proton et de carbone **6a**

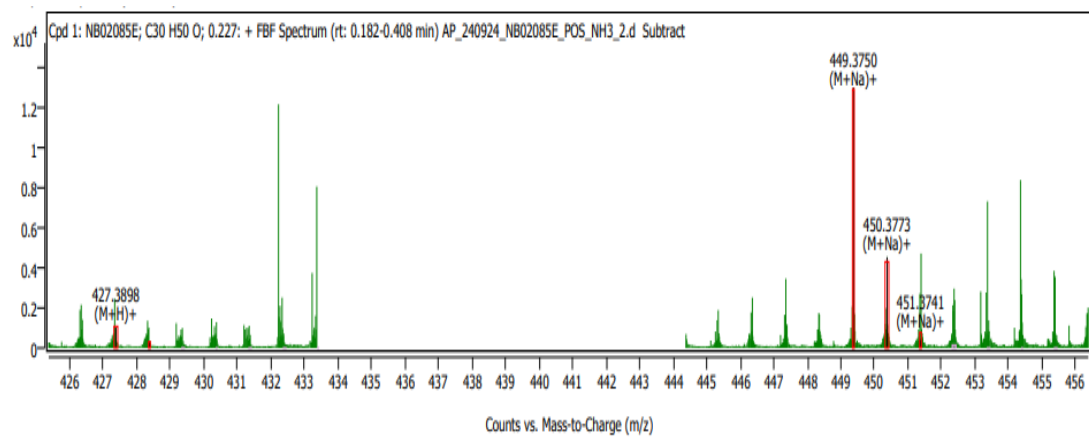
Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
13	138,5601				
12	123,0711	5,12	t	3,39	
3	105,9101	3,22	dd	4,94	10,8
18	56,9076				
5	56,1135				
9	51,2533				
14	45,8861				
22	42,2481				
8	39,1684				
19	38,9178				
20	34,7682				
4	34,0129				
1	32,4356				
10	31,0522				
17	30,6645				
7	30,3489				
21	29,7752				
28	29,2586	0.74	s		
23	28,9644	0.94	s		
16	27,2857	1.01	s		
2	26,1725	1.94	dd	4,45	12,8

15	25,4687	1.77	dd	4,01	12,3
11	23,1732	1.86	dd	3,85	6,25
27	21,9587				
30	20,3158	0.85	s		
6	18,3288				
26	17,6952	0.95	s		
25	15,7951	0.89	s		
29	14,2645	0.74	s		
24	12,6923	0.74	s		

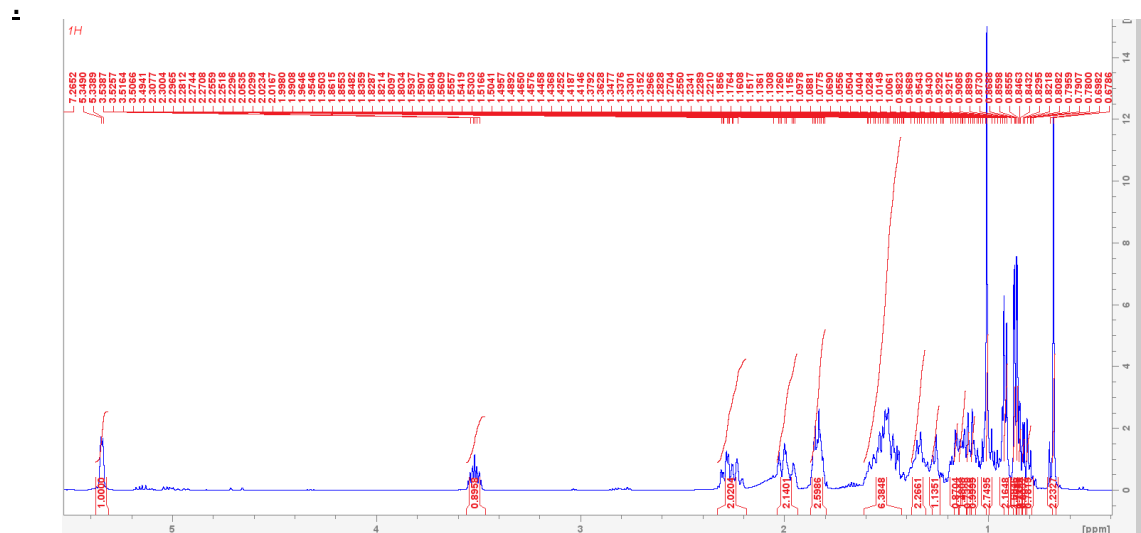
Tableau de d'assignation de proton et de carbone **6b**

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
13	140,795				
12	121,712	5,33	t	3,38	
3	77,3141	3,53	dd	4,93	9,82
18	77,0601				
5	76,8061				
9	71,7952				
14	56,8064				
22	56,2111				
8	50,2032				
19	50,1779				
20	42,3162				
4	42,3549				
1	42,3162				
10	39,8292				
17	39,5577				
7	37,3031				
21	36,5334				
28	36,2361	0,73	s		

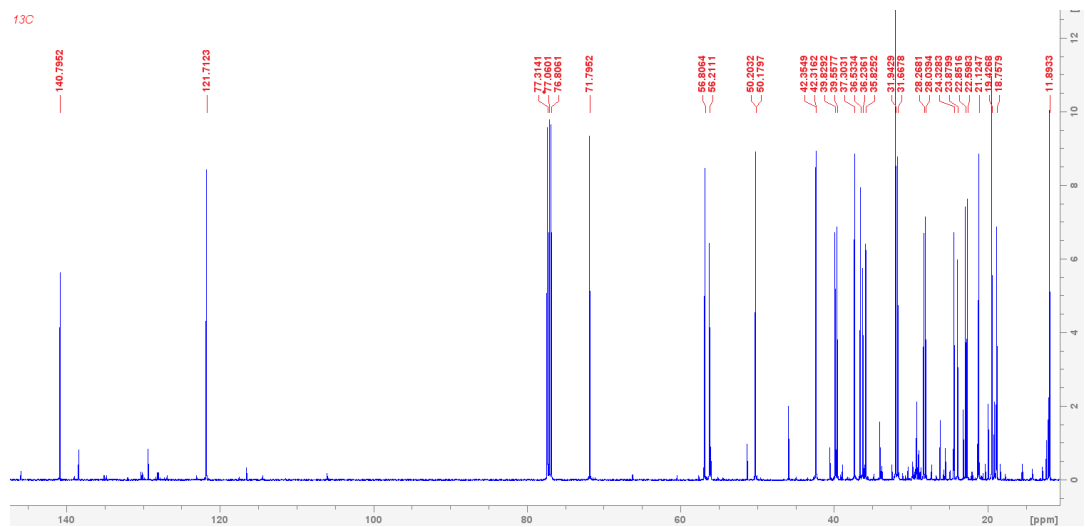
23	35,8252		s		
16	31,9429	1,05	s		
2	31,6678	1,94	dd	4,38	11,2
15	28,2681	1,73	dd	4,02	11,3
11	28,0394	1,86	dd	3,85	6,15
27	24,3283				
30	23,8799	0,83	s		
6	22,8516				
26	22,5983	0,96	s		
25	19,4268	0,87	s		
29	18,7579	1,83	s		
24	11,8933	0,73	s		



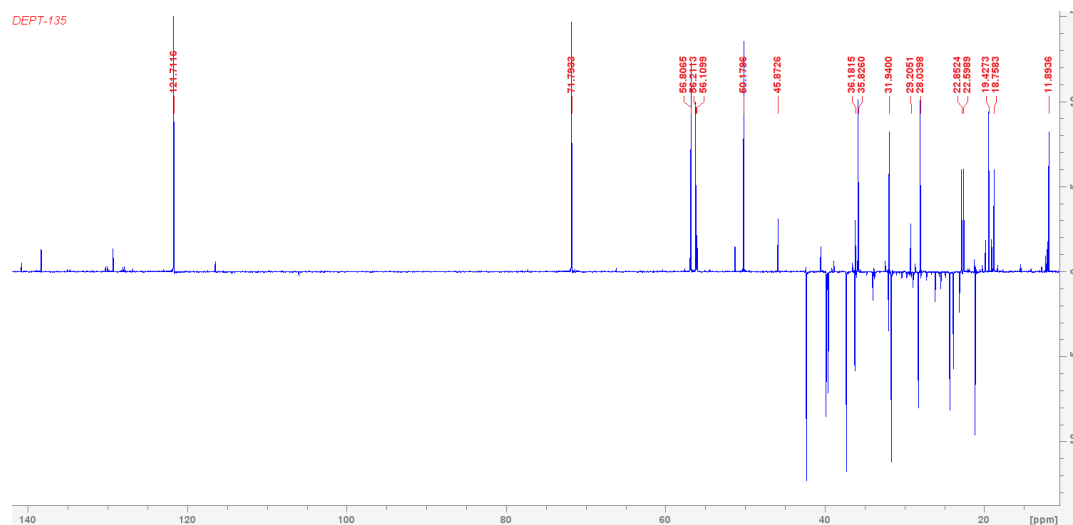
Analyse HPLC-Q-TOF du composé 6



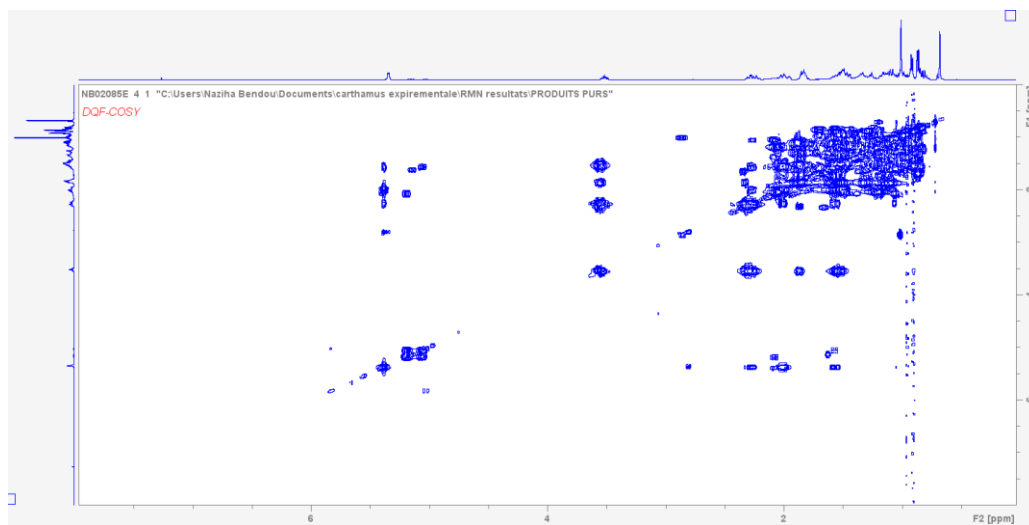
Agrandissement du spectre RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de **6**



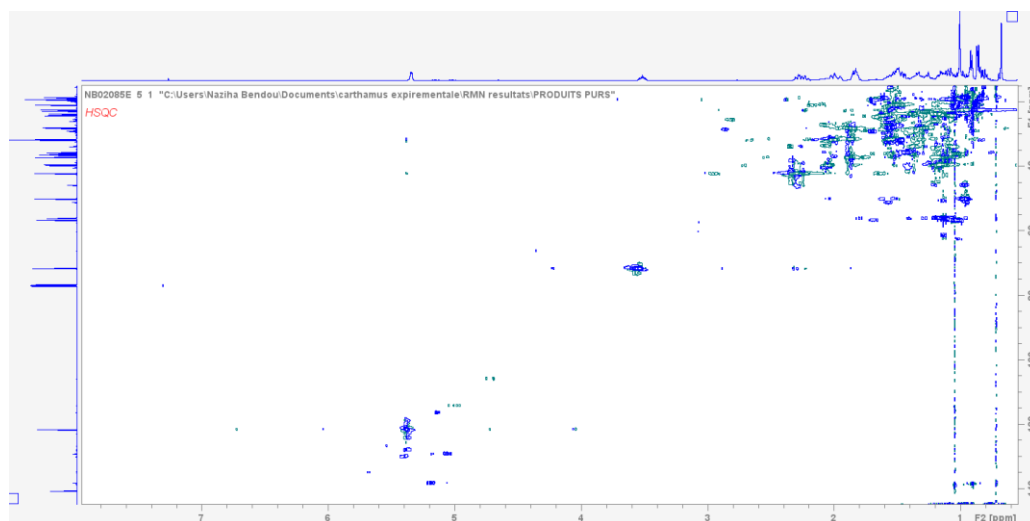
Agrandissement du spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de **6**



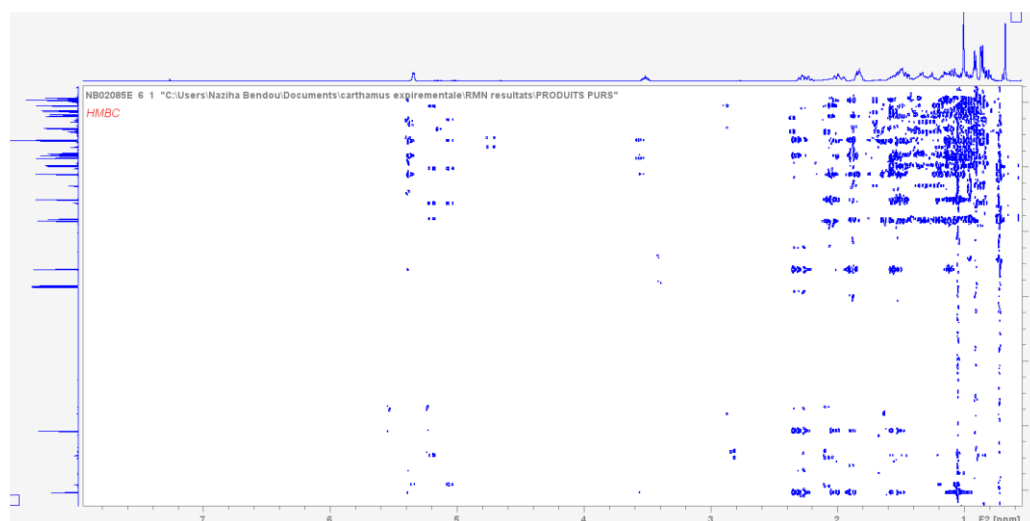
Agrandissement du spectre RMN DEPT135 (CDCl_3 , 500 MHz) de **6**



Spectre RMN COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de **6**



Spectre RMN HSQC (CDCl₃, 500 MHz) de **6**

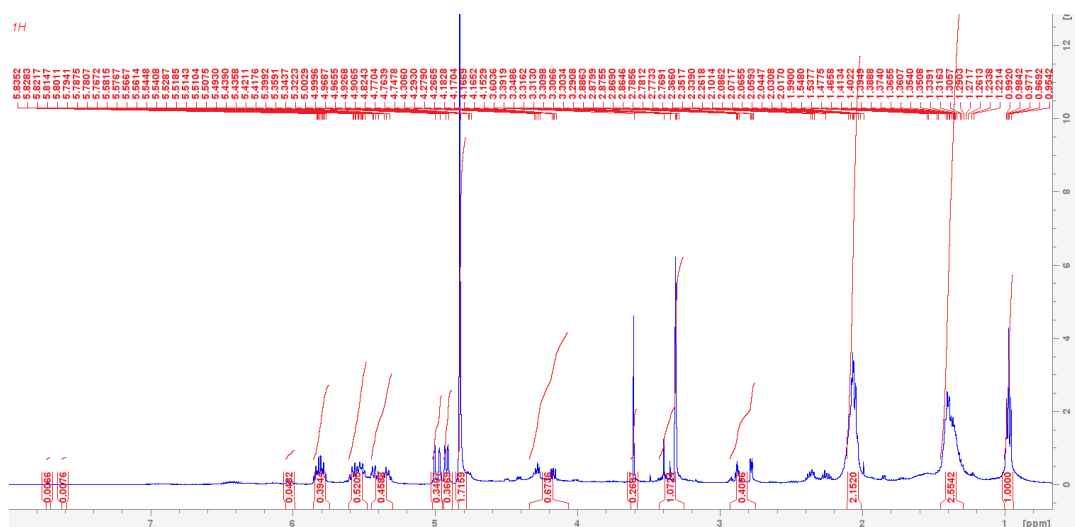


Spectre RMN HMBC (CDCl₃, 500 MHz) de **6**

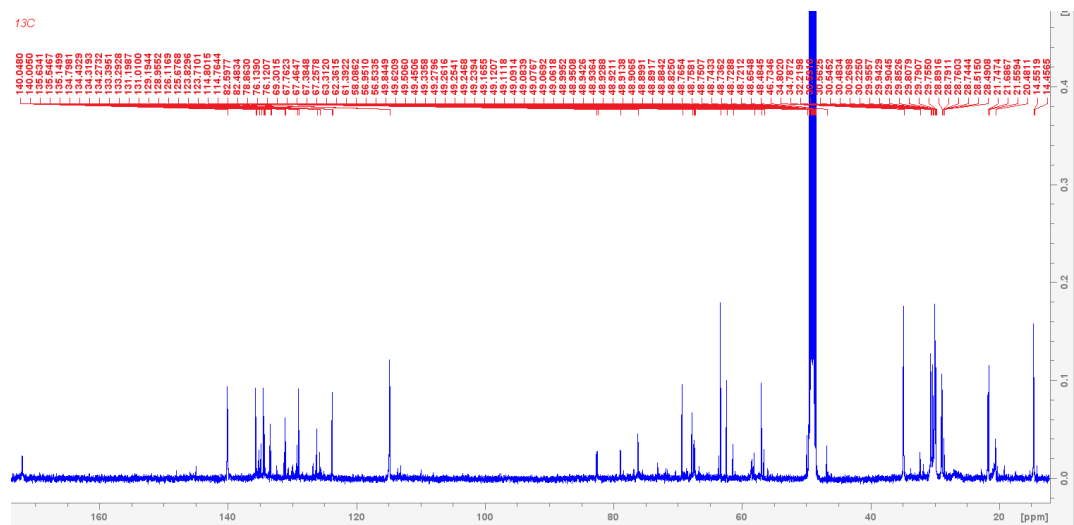
Annexe 5 : Spectres RMN de l'isohamnétine

Tableau de d'assignation de proton et de carbone **11**

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
6	171,9405				
1	147,9208				
13	144,8949				
3	140,048	5,8	br d	15.8	
2	140,005				
11	125,4729	7,72	dd	8.52	2.03
12	123,7101	7,6	dd	8.12	1.58
14	114,8015	6,02	d	8.12	
4	113,0553	4,98	br d	16.0	
10	109,9067	5,54	d	2.03	
15	82,5977	5,37	br s		
7	76,7783				
9	71,8044				
8	66,6421				
5	55,932	3,6	s		



Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **11**

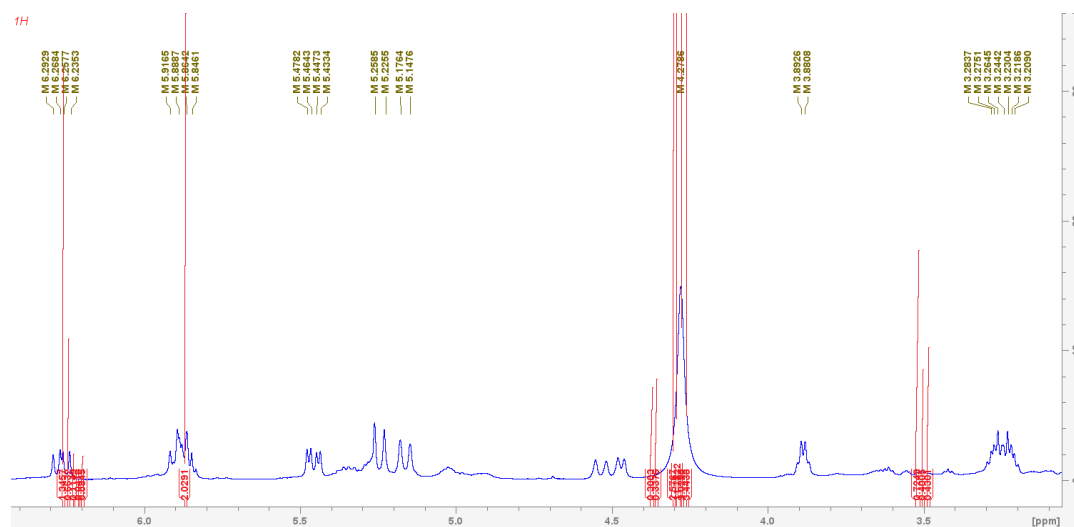


Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) de **11**

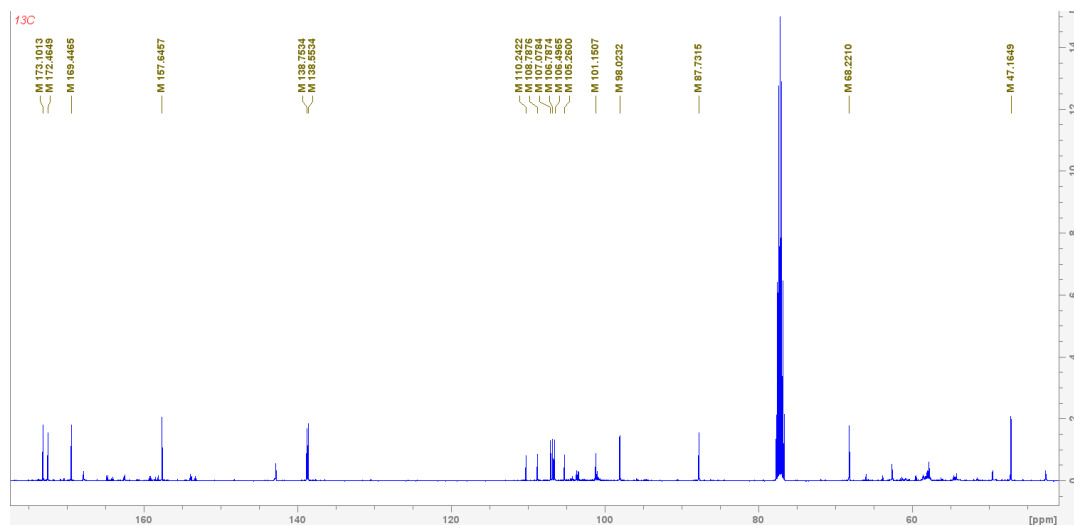
Annexe 6 : Spectres RMN du l'isoscopoletine.

Tableau de d'assignation de proton et de carbone **14**

Position (C)	Carbone (dc)	Proton (dc)	Type	JHH1	JHH2
1	162,5599				
5	160,4898				
6	142,6294	6,45	s (br)		
3	115,5134				
8	113,502	5,91	dd	7,23	8,01
4	145,0038	5,64	dd	7,22	8,13
9	106,83647	4,23	d	7,81	
2	108,0975	3,51	m	8,01	
7	77,7097	2,34	s	8,32	
10	58,2855	3,83	s		

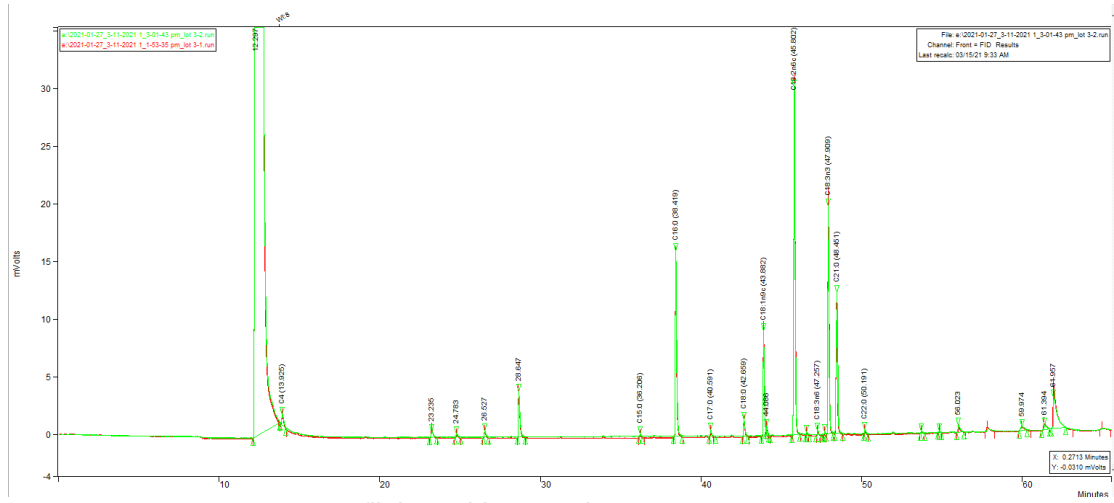


Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de **14**



Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) de **14**

Annexe 7 : Profil des acides gras sur GC-MS



Profil des acide gras obtenu par GC-MS.

