

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



جامعة باجي مختار - عنابة

كلية العلوم

قسم البيولوجيا

Thèse de Doctorat en Science Naturelle

Thème

Etude phytochimique, biologique et chimiométrique des substances naturelles isolées de: *Centaurea pullata* L. d'Algérie et *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* de Grèce

Option : Biologie Végétale

Présentée par
Samah DJEDDI

JURY

Pr. Ali TAHAR	Président	Université d'Annaba
Pr. Ratiba SERIDI	Rapporteur	Université d'Annaba
Pr. Hélène SKALTSA	Co- Rapporteur	Université d'Athènes (Grèce)
Dr. Diamanto LAZARI	Examineur	Université de Thessalonique (Grèce)
Pr. Med Reda DJEBBAR	Examineur	Université d'Annaba
Pr. Belkassem LAGSEIR	Examineur	Université d'Annaba

2007-2008

RESUME

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels, les métabolites secondaires de *Centaurea pullata* L. récoltée en Algérie et of *C. grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* récoltée en Grèce ont été identifiés.

Les parties aériennes des deux espèces ont été extraits avec cyclohexane-MeOH-Et₂O 1:1:1 et MeOH-H₂O 5:1.

Nous avons obtenu de *C. pullata* en plus des sesquiterpènes lactones suivantes: 11 β , 13-dihydrocnicine et 11 β , 13-dihydro-19 désoxycnicine, 11 β , 13 dihydrosaloniténolide, Mélitensine, 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) mélitensine, 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-4-*épi* sonchucarpolide, 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-onopordaldéhyde, un nouveau gémacranolide 8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)-11 β ,13-dihydrocnicin ainsi que deux nouveaux eudesmanolides 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-sonchucarpolide et 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4-*epi*-sonchucarpolide.

De plus quelques flavonoïdes ont été isolés: hispiduline, jaceosidine, desméthoxycentaureidine et 6, 7, 3', 4'-tétraméthoxyflavone.

L'activité antimicrobienne de toutes les sesquiterpènes lactones a été testée contre des bactéries et des champignons, en utilisant la méthode de microdilution. Tous les composés testés ont montré une activité antibactérienne et antifongique modéré. De plus de tous ces composés le mélitensine a montré une activité cytostatique moyenne.

Les sesquiterpènes lactones ont été projetées dans les modèles précalculés ADME suivant: l'absorption des cellules Caco-2, l'affinité aux plasma-protéines, la perméabilité BHE, ainsi que la solubilité thermodynamique.

Il a été conclu que les composés ne peuvent être transportés par les cellules intestinales épithéliales, ils ont une faible affinité avec le plasma-protéine, ils ne peuvent traverser la BHE et ils sont faiblement solubles dans l'eau. Ces résultats sont en accord avec d'autres études effectuées sur des sesquiterpène lactones similaires.

L'espèce *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* qui n'a jamais fait l'objet d'étude, nous avons identifié les sesquiterpènes lactones suivantes: Saloniténolide, cnicine, 8 α -O-[(4-acétoxy-5-hydroxy)-aggeloyl]-saloniténolide, 11 β , 13-déhydromélitensine, 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-

méthylène-butanoyl)-11 β , 13-déhydromélitensine, 8 α -hydroxy-4-*épi*-sonchucarpolide, malacitenolide, 4-*epi*-malacitenolide, 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-sonchucarpolide, 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-4-*épi*-sonchucarpolide, et les flavonoïdes: jaceosidine, salvigenine, 6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone ainsi que les lignanes: arctigénine, diméthylmatairesinol.

Les structures des différents composés ont été élucidées par SM, IR, UV-Vis et 1D & 2D RMN spectroscopie.

La composition des huiles essentielles de *C. pullata* et *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* ont été étudiées. Ces huiles ont été obtenues par hydrodistillation dans un appareil modifié de Clevenger, puis analysées par CG et CG-SM. Les composés majoritaires ont été l'oxyde de caryophyllène (38.5%) pour *C. pullata*, 6,10,14-triméthyl pentadecan-2-one (12.9%), spathulenol (12.2%) et β -eudesmol (10.1%) pour *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*.

Mots clés : *C. pullata*, *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, sesquiterpène lactone, flavonoïde, lignane, activité antimicrobienne, activité cytostatique/cytotoxique, Volsurf.

ABSTRACT

With the aim of discovering new natural therapeutics, we choose to study two *Centaurea* species: *Centaurea pullata* L. collected from Algeria and *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* collected from Greece.

The whole aerial plant material of both species was extracted with cyclohexane-MeOH-Et₂O 1:1:1 and MeOH-H₂O 5:1.

C. pullata afforded in addition to Known sesquiterpene lactones 11 β , 13-dihydrocnicin and 11 β , 13-dihydro-19 desoxycnicin, 11 β , 13 dihydrosalonitenolid, Melitensin, 8 α -O-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyloxy) melitensin, 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-4-*epi* sonchucarpolide, 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-onopordaldehyde, a new germacranolide 8 α -O-(4-acetoxy-5-hydroxy-angeloyl)-11 β ,13-dihydrocnicin and two new eudesmanolides 8 α -O-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-sonchucarpolide and 8 α -O-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4-*epi*-sonchucarpolide.

Some flavonoïds were isolated also: hispiduline, jaceosidine, desmethoxycentaureidine and 6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone.

The *in vitro* antimicrobial activity of all isolated sesquiterpene lactones was tested against bacteria and fungal species, using the micro-dilution method. All the compounds tested showed greater antibacterial and antifungal activities than positive controls. From all compounds tested, melitensine showed a moderate cytostatic activity.

The sesquiterpene lactones were projected on the following pre-calculated ADME models: Caco-2 cell permeability, plasma protein affinity, blood-brain barrier (BBB) permeation and thermodynamic solubility. It was predicted that the studied molecules can not be transported across the intestinal epithelium, can not cross to the BBB, they have low plasma-protein affinity and low aqueous solubility. The results are in agreement with those reported on a previous work related to the VolSurf analysis of pharmacokinetic profile of similar sesquiterpene lactones.

The investigation of *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* which never been studied showed sesquiterpene lactones: Salonitenolide, cnicine, 8 α -O-[(4-acetoxy-5-hydroxy)-aggeloyl]-salonitenolide, 11 β , 13-dehydromelitensine, 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-methylen-butanoyl)-11 β , 13-dehydromelitensine, 8 α -hydroxy-4-*epi*-sonchucarpolide, malacitenolide, 4-*epi*-malacitenolide, 8 α -O-(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylen-butanoyl)-4-*epi*-sonchucarpolide, 8 α -

O-(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylen-butanoyl)-sonchucarpolide, flavonoids: jaceosidine, salvigenine, 6,7,3',4'-tetramethoxyflavone and lignanes: arctigenin, dimethylmatairesinol.

The structures were elucidated by MS, IR, UV-Vis and 1D & 2D NMR spectroscopy.

The volatile compositions of *C. pullata* and *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* have been studied. The essential oils were obtained by hydrodistillation in a modified Clevenger-type apparatus, and their analyses were performed by GC and GC-MS. Their main constituents were caryophyllene oxide (38.5%) for *C. pullata*, 6,10,14-trimethyl pentadecan-2-one (12.9%), spathulenol (12.2%) and β -eudesmol (10.1%) for *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*.

Key words : *C. pullata*, *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, sesquiterpene lactone, flavonoid, lignane, antimicrobial activity, cytostatic/cytotoxic activity, Volsurf.

A mes parents adorés
A mes frères Raouf, Lamine et Adnan
A ma petite soeur Jihen
A ma belle sœur Dorothée

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'état algérien pour l'attribution de la bourse d'étude.

Je remercie Pr. Ali TAHAR qui m'a honoré en acceptant d'être président de ce jury et pour ses précieux conseils.

Je remercie également Pr. Diamanto LAZARI (Laboratoire de Pharmacognosie, Département de Pharmacie, Université d'Aristote, Thessalonique, Grèce), Pr. Med Reda DJEBBAR (Université d'Annaba) et Pr. Belkassem LAGSEIR (Université d'Annaba) pour avoir accepté la charge d'être rapporteurs de cette thèse, pour avoir jugé ce travail et pour leurs conseils importants et pertinents.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma directrice de thèse Pr. Ratiba SERIDI pour la confiance qu'elle m'a témoignée.

J'associe à mes remerciements ma co-directrice de thèse Pr. Hélène Skaltsa (Département de Pharmacognosie et Chimie de produits naturels de la Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes), pour sa précieuse collaboration, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et surtout pour le temps qu'elle a consacré pour diriger, suivre l'évolution du travail expérimental et corriger cette thèse. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation, et d'être présente ici aujourd'hui malgré un emploi de temps surchargé.

Je remercie également le directeur du Département de Pharmacognosie et Chimie de produits naturels, de la Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes, Pr. Anargyros LOUKIS pour ses encouragements.

Je remercie tout particulièrement Dr. Anastasia KARIOTI (Département de Pharmacognosie et Chimie de produits naturels, de la Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes) pour son aide, sa disponibilité et ses conseils tout le long de ce travail de thèse.

Merci à Dr. Catherine KOUKOULITSA (Département de Pharmacognosie et Chimie de produits naturels, de la Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes) pour sa contribution à la réalisation de l'étude chimométrique.

Un merci collectif à tous mes amis, membres du groupe de recherche dirigé par Prof. H. Skaltsa : Katerina ARGIROPOULOU, Christiana GOUSIADOU, Vassiliki SAROGLU, Kyriaki PALTATZIDOU, Alik Chatzopoulos, Evanguelina KAVROULAKI, Marilena PAPADATOU et Nikitas PAHOPOS pour l'ambiance amicale au laboratoire.

Un grand Merci à Dr. Giorgos LIACOPOULOS (Laboratoire de Physiologie et Morphologie végétale, Département de Biotechnologie Agriculaire, Faculté d'Agronomie, Université d'Athènes) pour son aide précieuse lors des analyses par HPLC, sans oublier de remercier le directeur du laboratoire Pr. Giorgos KARABOURNIOTIS et tout l'ensemble des membres du laboratoire de Physiologie végétale.

A la mémoire de Mr. Abdel Kader BELOUED (Institut National d'Agronomie, Alger) pour l'identification de l'espèce algérienne.

Je remercie également Pr. Théophanis CONSTANTINIDIS (Laboratoire de Botanique Systématique, Faculté d'Agronomie, Université d'Athènes) pour l'identification de l'espèce grecque.

Je souhaite remercier Pr. Marina SOKOVIC (Département de Physiologie, Laboratoire de Mycologie, Institut des Recherches Biologiques, Serbie) et Dr. Konstantinos DIMAS (Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacotechnologie, Centre des Sciences, Fondation pour les Recherches Biomédicales de l'Académie d'Athènes) pour leur contribution à la réalisation de l'étude biologique.

Je tiens à remercier l'attachée culturelle M^{lle} Amira HADJ AHMED, Mr HADDOUCHE consul de l'ambassade algérienne à Athènes pour leurs aides précieuses et leurs encouragements, ainsi que tout le personnel de l'ambassade d'Algérie.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études.

Liste des Tableaux

Tableau 1	Sesquiterpène lactones des espèces appartenant à la section Seridia (Juss.) DC.....	15
Tableau 2	Flavonoïdes des espèces appartenant à la section Seridia (Juss.) DC.....	24
Tableau 3	Lignanes des espèces appartenant à la section Seridia (Juss.) DC.....	27
Tableau 4	Composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de <i>C. solstitialis</i>	30
Tableau 5	Composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de <i>C. solstitialis</i>	30
Tableau 6	Sesquiterpène lactones des espèces appartenant à la section Acrolophus (Cass.) DC.....	35
Tableau 7	Flavonoïdes des espèces appartenant à la section Acrolophus (Cass.) DC....	41
Tableau 8	Lignanes des espèces appartenant à la section Acrolophus (Cass.) DC.....	43
Tableau 9	Composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de <i>C. pelia</i> , <i>C. thessala</i> ssp. <i>drakiensis</i> , <i>C. zuccariniana</i>	44
Tableau 10	Utilisation de <i>C. pullata</i> en médecine traditionnelle.....	66
Tableau 11	Utilisation de <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i> en médecine traditionnelle.	67
Tableau 12	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz; CDCl ₃) du composé 1	70
Tableau 13	Valeurs des ¹³ C-RMN du composé 1	71
Tableau 14	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 2	76
Tableau 15	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 3	80
Tableau 16	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 3	81
Tableau 17	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	86
Tableau 18	Valeurs des ¹³ C-RMN (CDCl ₃) du composé 4	87
Tableau 19	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	92
Tableau 20	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 5	93
Tableau 21	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 6	98
Tableau 22	Valeurs de ¹³ C-RMN du composé 6	99
Tableau 23	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 7	104
Tableau 24	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 7	105
Tableau 25	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 8	109
Tableau 26	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 8	110
Tableau 27	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz; CDCl ₃) du composé 9	114
Tableau 28	Valeurs des ¹³ C-RMN (CDCl ₃) du composé 9	115
Tableau 29	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	120
Tableau 30	Valeurs des ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	121
Tableau 31	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 11	125
Tableau 32	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 12	130
Tableau 33	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 12	131
Tableau 34	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 13	137
Tableau 35	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 14	140
Tableau 36	Valeurs des ¹³ C-RMN du composé 14	141
Tableau 37	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 15	145
Tableau 38	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 15	146
Tableau 39	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 16	150
Tableau 40	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 16	151
Tableau 41	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 17	155
Tableau 42	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 18	159
Tableau 43	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 18	160

Tableau 44	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 19	164
Tableau 45	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 19	165
Tableau 46	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 20	168
Tableau 47	Valeurs UV-Vis du composé 21	170
Tableau 48	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz; CDCl ₃) du composé 21	172
Tableau 49	Valeurs UV-Vis du composé 22	174
Tableau 50	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 22	175
Tableau 51	Valeurs UV-Vis du composé 23	177
Tableau 52	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz; CDCl ₃) du composé 23	179
Tableau 53	Valeurs UV-Vis du composé 24	181
Tableau 54	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 24	183
Tableau 55	Valeurs UV-Vis du composé 25	185
Tableau 56	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 25	187
Tableau 57	Valeurs UV-Vis du composé 26	189
Tableau 58	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 26	191
Tableau 59	Valeurs UV-Vis du composé 27	193
Tableau 60	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 27	195
Tableau 61	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 27	196
Tableau 62	Valeurs UV-Vis du composé 28	198
Tableau 63	Valeurs ¹ H-RMN (400 MHz; CD ₄ O) du composé 28	199
Tableau 64	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 29	203
Tableau 65	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 29	204
Tableau 66	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 30	209
Tableau 67	Valeurs des ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 30	210
Tableau 68	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	214
Tableau 69	Valeurs des ¹³ C-RMN du composé 31	215
Tableau 70	Valeurs des ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 32	220
Tableau 71	Valeurs des ¹³ C -RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 32	221
Tableau 72	Composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de <i>Centaurea pullata</i> et de <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i>	226
Tableau 73	Distribution des groupes chimiques de l'huile essentielle de <i>C. pullata</i> et de <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i>	228
Tableau 74	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des composés 1-5, 7-10 . (CMI/CMB, µg/ml).....	232
Tableau 75	Concentrations minimales inhibitrices et fongicides (CMI/CMF, µg/ml) des composés 1-5, 7-10	233
Tableau 76	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles de <i>C. pullata</i> (1) & <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i> (2) (CMI/CMB, µg/ml).....	234
Tableau 77	Concentrations minimales inhibitrices et fongicides (CMI/CMF, µg/mL) des huiles essentielles de <i>C. pullata</i> & <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i> ..	235
Tableau 78	Activité cytotoxique des composés actifs 2 et 5 vis-à-vis des lignés cancéreuses.....	236
Tableau 79	Résultats de la recherche ethnobotanique de <i>C. pullata</i>	246

Liste des Figures

Figure 1	<i>Centaurea pullata</i> L.....	13
Figure 2	Lactones sesquiterpéniques du genre <i>Centaurea</i>	14
Figure 3	Formules types des flavonoïdes.....	23
Figure 4	Flavonoïdes chez la section <i>Seridia</i> (Juss.) DC.....	24
Figure 5	Principaux types des lignanes.....	27
Figure 6	<i>Centaurea grisebachii</i> (Nyman) Heldr. subsp. <i>grisebachii</i>	34
Figure 7	Flavonoïdes chez la section <i>Acrolophus</i> (Cass.) DC.....	42
Figure 8	Situation géographique	49
Figure 9	Processus d'extraction.....	51
Figure 10	Efficacité des substances actives en industrie pharmaceutique	64
Figure 11	Méthode de calcul de l'énergie totale.....	65
Figure 12	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 1	70
Figure 13	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 1	71
Figure 14	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 1	71
Figure 15	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 1	72
Figure 15a,b,c	Détail du spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 1	72-73
Figure 16	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 2	76
Figure 17	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 3	80
Figure 18	Spectre ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 3	81
Figure 19	Spectre COSY (200 MHz, CDCl ₃) du composé 3	82
Figure 20	Spectre HSQC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 3	82
Figure 20a	Détail du spectre HSQC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 3	82
Figure 21	Spectre HMBC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 3	83
Figure 21a	Détail du spectre HMBC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 3	83
Figure 22	Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	86
Figure 23	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	87
Figure 24	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	88
Figure 25	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	88
Figure 26	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	88
Figure 27	Corrélations HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 4	88
Figure 28	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	92
Figure 29	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 5	93
Figure 30	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	94
Figure 31	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	94
Figure 32	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	94
Figure 33	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 5	94
Figure 34	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 6	98
Figure 35	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 6	99
Figure 36	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 6	99
Figure 37	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 6	100
Figure 38	Corrélation HMBC du composé 6	100
Figure 39	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 7	104
Figure 40	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 7	105
Figure 41	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 7	105
Figure 42	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 8	109
Figure 43	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 8	110

Figure 44	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 8	110
Figure 45	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 9	114
Figure 46	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 9	115
Figure 47	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 9	115
Figure 48	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 9	116
Figure 49	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 9	116
Figure 50	Signaux NOE du composé 9	116
Figure 51	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	120
Figure 52	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	121
Figure 53	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	121
Figure 54	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	122
Figure 55	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 10	122
Figure 56	Signaux NOE du composé 10	122
Figure 57	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 11	125
Figure 58	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 12	130
Figure 59	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 12	131
Figure 60	Spectre NOESY (400 MHz, MeOD) du composé 12	132
Figure 61	Signaux NOE du composé 12	132
Figure 62	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 13	136
Figure 63	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 14	140
Figure 64	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 14	141
Figure 65	Spectre HSQC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 14	142
Figure 66	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 15	145
Figure 67	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 15	146
Figure 68	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 16	150
Figure 69	Spectre ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 16	151
Figure 70	Spectre COSY (200 MHz, CDCl ₃) du composé 16	152
Figure 71	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 17	155
Figure 72	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 18	159
Figure 73	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 18	160
Figure 74	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 18	160
Figure 75	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 18	161
Figure 76	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 19	164
Figure 77	Spectre ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 19	165
Figure 78	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 19	166
Figure 79	Signaux NOE du composé 19	166
Figure 80	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 20	168
Figure 81	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 20	169
Figure 82	Signaux NOE du composé 20	169
Figure 83	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 21	172
Figure 84	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 22	175
Figure 85	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 23	179
Figure 86	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 24	183
Figure 87	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 25	187
Figure 88	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 26	191
Figure 89	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 27	195
Figure 90	Spectre ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 27	196
Figure 91	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 27	197
Figure 92	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CD ₄ O) du composé 28	199
Figure 93	Spectre NOESY (400 MHz, CD ₄ O) du composé 28	200

Figure 94	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 29	203
Figure 95	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 29	204
Figure 96	Spectre COSY (200 MHz, CDCl ₃) du composé 29	205
Figure 97	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 29	205
Figure 98	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 29	205
Figure 99	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 30	209
Figure 100	Spectre ¹³ C-NMR (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 30	210
Figure 101	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 30	211
Figure 102	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 30	211
Figure 103	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 30	211
Figure 104	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	214
Figure 105	Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	215
Figure 106	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	216
Figure 107	Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	216
Figure 108	Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃) du composé 31	216
Figure 109	Signaux NOE du composé 31	216
Figure 110	Spectre ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) du composé 32	220
Figure 111	Spectre ¹³ C-RMN (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 32	221
Figure 112	Spectre ¹³ C-RMN/DEPT (50.3 MHz, CDCl ₃) du composé 32	222
Figure 113	Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃) du composé 32	222
Figure 114	Spectre HMBC (200 MHz, CDCl ₃) du composé 32	223
Figure 115	Corrélations HMBC du composé 32	223
Figure 116	Groupes chimiques des composés de l'huile essentielle de <i>C. pullata</i>	230
Figure 117	Groupes chimiques des composés de l'huile essentielle de <i>C. grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i>	230
Figure 118	Action de 5 différentes doses du composé 5 contre les lignés cancéreuses MCF7, SF268 et NCI-H460.....	236
Figure 119	Réponse des cellules MCF7 (A et D), SF268 (B et E) et NCI-H460 (C et F) traitées avec le composé 5	237
Figure 120	Réaction d'alkylation.....	238
Figure 121	Régions hydrophiles du composé 4	239
Figure 122	Régions hydrophobes du composé 4	239
Figure 123	Projection des substances sur le modèle des cellules Caco-2	240
Figure 124	Projection des substances sur le modèle de l'affinité plasma-protéines.....	241
Figure 125	Projection des substances sur le modèle de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.....	242
Figure 126	Projection des substances sur le modèle de la solubilité thermodynamique.	243
Figure 127	Structures des sesquiterpènes lactones isolées de <i>C. pullata</i>	244

Abréviations, Symboles et Conventions

$[a]_D^{20}$: Pouvoir rotatoire.

ATCC : American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes).

AFNOR : Association Française de **NOR**malisation.

AlCl₃ : Chlorure d'**al**uminium.

BuOH: **Bu**tanol.

CC: Chromatographie sur **Co**lonne.

CCM: Chromatographie sur **Co**uche **M**ince.

CBS: Central **b**ureau of the Royal Netherlands Academy of Arts and **S**ciences.

CMB : Concentrations **M**inimales **B**actéricides.

CMF : Concentrations **M**inimales **F**ongicides.

CMI : Concentration **M**inimale **I**nhibitrice.

COSY: ¹H – ¹H **C**orrelation **S**pectroscop**Y**.

δ : déplacement chimique.

d : Doublet (RMN).

dd : Doublet de doublet (RMN).

de: Doublet élargit (RMN).

DCM: Dichlorométhane.

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DSM ou **DSMZ** **DSM** ou **DSMZ**: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

λ_{\max} : longueur d'onde maximale.

$\Delta\lambda$: différence entre les longueurs d'onde.

ε : Coefficient d'extinction molaire (UV).

EI : Ionisation par impact électronique (**E**lectron **I**mpact ionisation).

Et₂O : Diéthyl éther.

EtOAc : Acétate d'éthyle.

ép.: épaulement (UV).

CG: Chromatographie phase **G**azeuse.

CG-SM: Chromatographie phase **G**azeuse – **S**pectre de **M**asse.

GI₅₀: Growth Inhibition 50.

hCRF-BP: **H**umain **C**orticotrophine-**R**eleasing **F**actor-**B**anding **P**rotein.

HMBC: ¹H – ¹³C **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation.

HPLC: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography.

HSQC: **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence.

Hz: **H**ertz.

H₃BO₃: Acide borique.

FID: Flame Ionisation Detector.

IAM : [Institute of Molecular and Cellular Biosciences \(University of Tokyo\)](#).

INA : Institut National d'Agronomie.

IR : **I**nfra-**R**ouge.

Ir : Indice de **R**étention.

J : Constante de couplage.

LB : **L**uria-**B**roth.

LC₅₀ : Lethal Concentration 50.

MA : Malt-agar.

MH : Müller-**H**inton.

MeOH : méthanol.

Table des Matières

INTRODUCTION	01
BUT DU TRAVAIL	04
I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
I.1. Description botanique du genre <i>Centaurea</i>	06
I.1.1. La famille des Asteraceae.....	06
I.1.2. La tribu des Cardueae (Cynareae).....	06
I.1.3. La sous-tribu des Centaureinae.....	06
I.1.4. Le genre <i>Centaurea</i> L.....	07
I.2. Utilisation en médecine traditionnelle	08
I.2.1. Activités biologiques reconnues	09
I.3. Présentation des espèces étudiées.....	10
A. <i>Centaurea pullata</i> L.	10
1.a. Section Seridia (Juss.) DC.....	10
1.b. Section Melanoloma (Cass.) DC.....	11
1.c. Section Pectinastrum (Cass.) DC.....	11
2. Caractéristiques botaniques	11
3. Position systématique.....	12
4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces du groupe Seridia-Melanoloma.....	14
4.1. Sesquiterpènes lactones.....	14
4.1.a. Chez la section Seridia (Juss.) DC.....	15
4.1.b. Chez la section Melanoloma (Cass.) DC.....	21
4.1.c. Activités biologiques des Sesquiterpènes lactones.....	21
4.2. Flavonoïdes.....	22
4.2.a. Chez la section Seridia (Juss.) DC.....	24
4.2.b. Chez la section Melanoloma (Cass.) DC.....	25
4.2.c. Activités biologiques des flavonoïdes.....	25
4.3. Lignanes	26
4.3.a. Chez la section Seridia (Juss.) DC.....	27
4.3.b. Chez la section Melanoloma (Cass.) DC	28
4.4. Huiles essentielles.....	28
4.4.a. Chez la section Seridia (Juss.) DC	29
4.4.b. Chez la section Melanoloma(Cass.) DC	31
4.4.c. Activités anti-microbiennes des huiles essentielles.....	31
B. <i>Centaurea grisebachii</i> (Nyman) Heldr. ssp. <i>grisebachii</i>	32
1. Section Acrolophus (Cass.) DC.....	32
2. Caractéristiques botaniques.....	33
3. Position systématique.....	33
4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces de la section Acrolophus (Cass.) DC.....	35
4.1. Sesquiterpènes lactones.....	35
4.2. Flavonoïdes.....	41
4.3. Lignanes.....	43
4.4. Huiles essentielles.....	43

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel végétal.....	47
II.1.a. <i>Centaurea pullata</i> L.....	47
II.1.b. <i>Centaurea grisebachii</i> (Nyman) Heldr. ssp. <i>grisebachii</i>	47
II.2. Méthodes.....	50
II.2.1. Extraction des substances.....	50
II.2.1.1. Sesquiterpènes lactones.....	50
II.2.1.2. Flavonoïdes.....	51
II.2.1.3. Huile essentielle.....	52
II.3. Méthodes chromatographiques analytiques.....	52
II.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	52
II.3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CG).....	53
II.3.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectre de masse (CG-SM).....	54
II.4. Méthodes chromatographiques préparatives.....	54
II.4.1. Chromatographie liquide basse pression (Vaccum Liquid Chromatography VLC).....	54
II.4.2. Chromatographie sur colonne (CC).....	55
II.4.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	55
II.5. Méthodes spectroscopiques.....	55
II.5.1. Spectre infra-rouge (IR).....	55
II.5.2. Spectre ultraviolet (UV-Vis).....	56
II.5.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	57
II.5.4. Spectre de masse (SM).....	59
II.5.5. Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$	59
II.6. Méthodes biologiques.....	60
II.6.1. Activité antimicrobienne.....	60
II.6.2. Activité cytotoxique/cytostatique.....	60
II.7. Prédiction des propriétés pharmacologiques.....	63
II.7.1. Introduction.....	63
II.7.2. Méthode Volsurf.....	64
II.8. Recherche ethnobotanique.....	66

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Résultats phytochimiques	68
a) Sesquiterpènes lactones isolées de <i>C. pullata</i>	68
Composé 1: 11 β , 13-dihydrosalonitenolide.....	68
Composé 2: 11 β , 13-dihydrocnicine.....	74
Composé 3: 11 β , 13-dihydro-19 désoxycnicine.....	78
Composé 4: 8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)-11 β , 13-dihydrocnicine.....	84
Composé 5: Mélitensine.....	90
Composé 6: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) mélitensine.....	96
Composé 7: 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-4- <i>épi</i> sonchucarpolide.....	102
Composé 8: 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-onopordaldéhyde.....	107
Composé 9: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4- <i>épi</i> -sonchucarpolide.....	112

Composé 10: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-sonchucarpolide	117
b) Sesquiterpènes lactones isolées de <i>C. grisebachii</i>. ssp. <i>grisebachii</i>	123
Composé 11: Salonitenolide	123
Composé 12: Cnicine	127
Composé 13: 8 α -O-[(4-acétoxy-5-hydroxy)-angeloyl]-salonitenolide.....	134
Composé 14: 11 β , 13-déhydromélitensine.....	138
Composé 15: 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)-11 β , 13-déhydromélitensine	143
Composé 16: 8 α -hydroxy-4- <i>épi</i> -sonchucarpolide.....	148
Composé 17: 8 α -O-3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoloxy)-4- <i>épi</i> -sonchucarpolide (Malacitenolide).....	153
Composé 18: 8 α -O-(3, 4 dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)-sonchucarpolide (4- <i>épi</i> -malacitenolide).....	157
Composé 19: 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-4- <i>épi</i> -sonchucarpolide.....	162
Composé 20: 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-sonchucarpolide.....	167
b) Flavonoïdes isolés des deux espèces	170
Composé 21: 5, 7, 4'-trihydroxy-6-diméthoxyflavone (hispiduline).....	170
Composé 22: 5-hydroxy-6, 7, 4'-triméthoxyflavone (salvigénine).....	174
Composé 23: 5, 7, 4'-trihydroxy, 6, 3'-diméthoxyflavone (jacéosidine)	177
Composé 24: 5, 7, 3'-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone; (desméthoxycentaureidine).....	181
Composé 25 : 5,4'-dihydroxy-6, 7, 3'-triméthoxyflavone (cirsilinéol)	185
Composé 26: 5, 3'-dihydroxy-6, 7, 4'-triméthoxyflavone (eupatorine).....	189
Composé 27: 5-hydroxy, 6, 7, 3', 4'-tetraméthoxyflavone.....	193
c) Autre composés isolés des deux espèces	198
Composé 28: 6-hydroxy, 7-méthoxy-coumarine (isoscopolétine).....	198
Composé 29: Arctigénine.....	201
Composé 30: Diméthylmatairésinol	207
Composé 31: (3 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-loliolide.....	213
Composé 32: 4, 4, 6a, 6b, 8a, 12, 14b-heptaméthyle-11-méthylène-docosa-hydro-pikene-3 β -ol [=taraxast-20 (30) ene-3 β -ol].....	218
III.2. Résultats des huiles essentielles.....	224
III.3. Résultats biologiques.....	231
III.3.1. Activité antimicrobienne.....	231
III.3.1.1. Sesquiterpènes lactones.....	231
III.3.1.2. Huiles essentielles.....	233
III.3.2. Activités cytotoxique/cytostatique.....	235
III.4. Résultats chimométriques.....	238
III.4.1. Application des méthodes computationnelles sur les sesquiterpène lactones.....	238

a) Modèle de perméabilité des cellules de la lignée Caco-2.....	240
b) Modèle d'affinité aux plasma-protéines (protein binding model).....	241
c) Modèle de la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	242
d) Modèle de la solubilité thermodynamique (Soly).....	243
III.5. Résultats de la recherche ethnobotanique.....	245
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	247
V. BIBLIOGRAPHIE.....	257
ANNEXE 01: EXTRACTION DES PLANTES.....	284
I. Extraction de <i>Centaurea pullata</i>	284
I.2. Extrait brut CEN (12.7 g).....	284
I.3. Extrait brut CEM (138.0 g).....	289
II. Extraction de <i>Centaurea grisebachii</i> subsp. <i>grisebachii</i>	293
II.1. Extrait brut INN (3.8 g).....	293
II.2. Extrait brut IMM (450.0 mg).....	296

Communications scientifiques

La présente étude a été réalisée de septembre 2003 à juin 2007 au niveau du laboratoire de Chimie, Département de Biologie, Université de Blida et au Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Département de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes, sous la direction de Pr. Ratiba SERIDI et de Pr. Hélène SKAL TSA.

Les résultats de ce présent travail ont été partiellement publiés ou présentés sous forme de posters lors de congrès internationaux :

Publications

1. **Djeddi S.**, Karioti A., Sokovic M., Stojkovic D., Seridi R. and Skaltsa H, Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their Antimicrobial Activity. *J. Nat. Prod.* **2007a**, 70, 1796-1799.
2. **Djeddi S.**, Argyropoulou C. and Skaltsa H., Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp.*grisebachii*. *Biochemical Systematics and Ecology.* **2007b** *in press*.

Posters

1. **Djeddi S.**, Dob T. et Seridi R. Etudes des huiles essentielles des *Centaurea pullata* et *Centaurea calcitrapa*. International Symposium of Environnement, Béjaia, Algérie, 12-14 Juin **2005**.
2. **Djeddi S.**, Karioti A., Koukoulitsa C., Sokovic M., Dimas C., Seridi R., Skaltsa H. Phytochemical investigation of *Centaurea pullata* growing wild in Algeria, antimicrobial & cytostatic activities, prediction of pharmacokinetic properties using computational methods. 13^{ème} séminaire de pharmacie. Athènes, Grèce, 12-14 Mai **2007**.
3. **Djeddi S.**, Karioti A., Skaltsa H. Sesquiterpene lactones of *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* from Greece. 55th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Graz, Autriche, 02-06 Septembre **2007**.
4. **Djeddi S.**, Karioti A., Sokovic M., Stojkovic D., Skaltsa H. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* L., growing wild in Algeria. 55th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Graz, Autriche, 02-06 Septembre **2007**.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'investigation des plantes présente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances (lead compounds), si l'on considère que chaque plante peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires (Hostettmann et Marston, 2002; Hostettmann et *al.*, 1998b). En effet, sur environ les 300 000 à 500 000 espèces végétales (Principe, 1989), seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

Lors de la recherche de ces nouvelles substances biologiquement actives, il est important de prendre en considération certains critères (Chaaib Kouri, 2004):

1. Choix du matériel végétal

Le choix du matériel végétal peut être influencé par les critères suivants:

- Utilisations en médecine traditionnelle
- Observations du matériel végétal sur le terrain
- Aspects botaniques et chimiotaxonomiques
- Littérature
- Hasard

a) Utilisations en médecine traditionnelle

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix, car elles ont plus de chance de fournir des substances bio-actives (Huxtable, 1992); cependant, il faut garder à l'esprit que les résultats obtenus lors des études et l'application en médecine traditionnelle ne doivent pas systématiquement être mis en relation étant donné que les moyens de diagnostic en médecine traditionnelle et en médecine moderne diffèrent largement.

b) Observations du matériel végétal sur le terrain

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires qui lui permettent de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne ou antioxydante par exemple).

c) Aspects botaniques et chimiotaxonomiques

Quand la classification des végétaux en s'appuyant sur les caractères morphologiques fait défaut, l'utilisation des métabolites secondaires pour les classer sera utilisée. C'est ce qu'on appelle classification chimique ou chimiotaxonomique. Actuellement, le recours à la systématique moléculaire est nécessaire pour la classification complète des deux approches précédentes.

Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et qui poussent dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques.

L'endémicité des espèces est aussi à prendre en considération. Sachant que la distribution géographique de telles espèces est restreinte et que des études phytochimiques antérieures effectuées sur ces espèces sont rares, la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules serait grande.

d) La littérature

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt en thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, mais pour laquelle une approche différente serait employée: procédé analytique différent, cibles biologiques différentes, etc. les résultats obtenus peuvent être prometteurs.

e) Le hasard

La grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, constitue un énorme potentiel pour les phytochimistes à fin de trouver de nouveaux produits. De ce fait, le hasard doublé d'une bonne intuition augmente fortement la chance d'aboutir à de nouveaux composés.

2. Choix des extraits et de la méthode de séparation

La séparation des produits purs dépend du choix de la méthode chromatographique de séparation (VLC, CC, HPLC); le but est l'obtention d'un rendement maximum avec un minimum de temps et de coût (Marston et Hostettmann, 1991); l'étape suivante est l'analyse des extraits bruts par RMN qui permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les classes chimiques des extraits à étudier

Criblage biologique

Le criblage biologique est crucial pour guider l'isolement de nouvelles molécules actives; chaque composé nouveau surtout est soumis à une multitude de tests biologiques contre des microorganismes, des insectes ou encore contre des cellules cancéreuses (Geran et *al.*, 1972).

BUT DU TRAVAIL

BUT DU TRAVAIL

Les composés chimiques obtenus des plantes supérieures ont joué un rôle important dans l'histoire de l'homme. De tous temps, l'homme a fait appel aux plantes pour se soigner, un des premiers recueils de médicaments d'origine végétale a été découvert dans les ruines de Nippur en 1953 sous forme de plaquettes d'argiles qui remontent au 3^{ème} millénaire avant J-C gravées en caractères cunéiformes (Verdrager, 1978).

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Par ailleurs, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Selon Newman et *al.*, (2003) les médicaments d'origines naturelles présentaient 5% de l'ensemble des nouvelles entités chimiques découvertes entre 1981-2002.

L'expérience a montré que la richesse de la biodiversité végétale, la connaissance des thérapeutiques traditionnelles sont susceptibles de mener à bien la recherche de nouvelles molécules aux activités biologiques, une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. La recherche de molécules aux propriétés anti-radicalaires dans des plantes de montagne obéit par exemple à cette logique. En effet, celles-ci sont plus exposées aux rayons UV en altitude et ont développé des mécanismes de protection, basés sur des métabolites secondaires spécifiques (Maver et *al.*, 2005).

L'isolement, l'identification, ainsi que l'investigation *in vitro* des activités biologiques des substances naturelles est l'objectif principal du Laboratoire de Pharmacognosie et Chimie des Produits Naturels de la Faculté de Pharmacie de l'Université d'Athènes.

Le présent travail s'inscrit donc dans le cadre de la recherche de nouveaux composés actifs biologiquement. Pour cela, deux espèces appartenant au genre *Centaurea* ont fait l'objet d'investigations approfondies:

- *Centaurea pullata* L. récoltée en Algérie dont la sélection s'est basée d'une part sur son utilisation dans la préparation d'un plat traditionnel à base de couscous et d'herbes sauvages appelé « El Hammama », et d'autre part sur les résultats obtenus par Benayache et *al.* (1992)

qui préconisent que cette plante contient des sesquiterpènes lactones ayant un groupe α -méthyl γ -lactone. Ces résultats nous ont semblé intéressants, sachant que la majorité des espèces appartenant à ce genre possèdent un groupe du type α -méthylène γ -lactone (Aslan et Öksüz, 1999; Bruno et al., 1994, id.1995; Marco et al., 2005; Öksüz et al., 1994a; Skaltsa et al., 1999, id. 2000a; id.2000b).

- *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* récoltée en Grèce, le choix d'étude de cette espèce a été basé sur les données chimiotaxonomiques et bibliographiques, sachant que cette espèce n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique antérieure.

Ainsi, les extraits bruts de cyclohexane-MeOH-Et₂O 1:1:1 et de MeOH-H₂O 5:1 des parties aériennes des deux plantes ont été soumises à une série de techniques analytiques à savoir VLC, CC, CCM, PR-HPLC afin d'isoler leurs métabolites secondaires et suivies des méthodes spectroscopiques RMN, SM, IR et UV-Vis afin de déterminer leurs structures. De plus, les substances volatiles des deux espèces ont été étudiées par CG et CG-SM.

Après l'identification des différentes substances, celles qui nous ont semblées intéressantes, ont été investiguées pour leurs pouvoirs antimicrobiens et cytotoxiques/cytostatiques.

Il est connu que plus de 50% des substances promises pour l'industrie pharmaceutique sont rejetées à cause de leur profil pharmacocinétique insuffisant et leur grande toxicité. Sachant que les propriétés clés pour la découverte des médicaments sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME), nous avons réalisé la prédiction des paramètres pharmacocinétiques des sesquiterpènes lactones isolées de *C. pullata* via la méthode computationnelle Volsurf.

I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. 1. Description botanique du genre *Centaurea*

Dans cette partie nous allons présenter les informations, nécessaires sur la famille des Asteraceae, la tribu des Cardueae, ainsi que sur la sous-tribu des Centaureinae.

I.1.1. La famille des Asteraceae

Cette famille doit son nom aux diverses fleurs en étoile, du grec *astèr*: astre. C'est une famille d'une grande importance tant pour son utilisation en industrie alimentaire qu'en thérapeutique (Bruneton, 1999).

Les représentants de cette famille, répartis en 25000 espèces sont rencontrés dans le monde entier, ces dernières sont essentiellement des plantes herbacées ou vivaces et ont les caractéristiques communes suivantes :

- Des feuilles alternes.
- Des inflorescences en capitule constituées d'un réceptacle sur le quel sont insérées de la base au sommet des bractées vertes stériles.
- Des bractées colorées fertiles axillant chacune une fleur.
- La fleur est petite, possédant un calice très réduit représenté par un bourrelet annulaire, une corolle en tube, un androcée soudé et un gynécée constitué d'un ovaire uniloculaire formé par la soudure de deux carpelles (Guingniard, 2001).

I.1.2. La tribu des Cardueae (Cynareae)

La tribu des Cardueae est composée de 4 sous-tribus (Bremer, 1996):
Carduinae, Carlininae, Centaureinae et Echinopinae.

I.1.3. La sous-tribu des Centaureinae

Les espèces qui appartiennent à cette sous-tribu ont pour centres de concentrations et de distributions les régions du bassin méditerranéen (Wagenitz, 1986), l'orient et le Turkestan (Dittrich, 1977). Selon Hellwig (2004) la sous-tribu des Centaureinae est divisée en plusieurs genres: *Amberboa*, *Carthamus/Carduncellus*, *Centaurea*, *Colymbada*, *Cyanus*, *Klasea*, *Plectocephalus*, *Psephellus*, *Rhaponticoides* et *Rhaponticum*.

I.1.4. Le genre *Centaurea* L.

D'après la mythologie grecque, *Centaurea* a été utilisée pour soigner la blessure au pied du sage Centaure Chiron, l'enseignant du dieu Grec de médecine «Esculape» causée par la flèche d'Hercule (André, 1956; Beloued, 1998; Beniston, 1984; Carnoy, 1959). La douleur de la plaie de Chiron n'avait jamais cessée ni guérie, ce qui a obligé ce dernier à se retirer de son immortalité et mettre fin à ses tourments. D'après Lanzara (1980) Chiron tenait en grande estime cette plante qu'il avait baptisé *Kentaurion*, mais qui n'était pas forcément identique aux Centaurées actuelles

Selon Discordide (Berendes, 1970) les latins ont appelé les Centaurées par les noms "Unefera" ou "Phellerae" qui vient des mots latins "fel" "terrae" qui signifient "bile de la terre"; ce nom lui a été attribué à cause de son amertume.

Le genre botanique *Centaurea* L. (à ne pas confondre avec les espèces du genre *Centaureium* qui appartient à la famille des Gentianaceae) est assez proche des chardons, mais qui s'en distinguent par les feuilles alternes polymorphes non épineuses.

Ce genre regroupe 300 espèces répertoriées à travers le monde (Bremer, 1994; Wagenitz et Hellwig, 1996), ces dernières sont représentées par les sous-groupes suivants: *Acrolophus* (Cass.) DC., *Jacea-Lepteranthus* et *Seridia-Melanoloma* comprenant 30 sections différentes (Hellwig, 2004).

La classification de ce genre a été souvent contestée et peu satisfaisante, néanmoins les premières tentatives de classifications ont été acceptées (Cassini, 1829; Holub, 1973; id., 1974; Löve et Löve, 1961).

Récemment les analyses moléculaires de ce genre combinées avec celles des *Centaureinae*, en association avec les études morphologiques, avec la connaissance du type de pollen ont permis de clarifier les limites naturelles de ce genre (Garci-Jacas et *al.*, 2000; id. 2001; Susanna et *al.*, 1995; Wagenitz et Hellwig, 1996).

Les centaurées sont des plantes annuelles (rarement biannuelles) ou herbacées, comme pour toutes les espèces des *Asteraceae*; leurs fleurs sont disposées en capitule constitué de fleurs centrales tubulaires hermaphrodites et plus ou moins irrégulières et de fleurs périphériques stériles, leurs couleurs varient le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet.

L'involucre peut être ovoïde ou globuleux à bractées inégales imbriquées sur plusieurs rangs par fois surmontées par un appendice. Le réceptacle est garni de soie abondante.

Les anthères sont soudées à la base, le style est à branches courtes, si les aigrettes sont présentes elles peuvent être persistantes ou caduques (Quezel et Santa, 1963).

Selon Mabberley (1997), le genre *Centaurea* est distribué en Asie, Afrique tropicale, Europe et au Nord Américain. En Algérie, le genre *Centaurea* L. est représenté par 45 espèces endémiques (Quezel et Santa, 1963) dont 7 d'entre eux sont localisés au Sahara (Ozenda, 1977).

En Grèce, *Centaurea* est un des plus abondants genres avec 140 espèces et sous-espèces dont la majorité sont endémiques. Certaines d'entre ont des aires de distributions bien précis (Kalpoutzakis et Constantinidis, 2004).

I.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Centaurea* a fait l'objet de nombreuses investigations en raison de sa composition chimique complexe (Aslan et Öksüz, 1999; Barrero et al., 1989; Bruno et al., 1991; id. 1994; id.1995; id.1996; Cardona et al., 1991; id.1994; id.1997; Fernández et al., 1989 ; González et al., 1973; id.1975; id.1984; Gousiadou et Skaltsa, 2003; Kaij-a-Kamb et al., 1991, id. 1992 ; Karioti et al., 2002; Koukoulitsa et al., 2002; Jacupovic et al., 1986; Marco et al., 2005; Medjroubi et al., 1997, id. 2003, id. 2005b ; Merrill et Stevens, 1985; Monya et Racz, 1974; Nowak , 1992; Öksüz et al., 1986, id. 1993, id.1994a, id. 1994b ; Ohno et al., 1997 ; Picher et al., 1984; Saroglou et al., 2005; Seghiri et al., 2006; Skaltsa et al., 1999; id. 2000a, id.2000b; Tortajada et al., 1988; Wang et al., 1991 ; Youssef et al., 1993, id 1994 a,b, id.1996,).

Un certain nombre d'espèces qui appartiennent à ce genre sont utilisées en médecine populaire dans les régions où elles poussent. Elles sont employées seules ou en association avec d'autres plantes (Battandier, 1900; Bianchini et Corbetta, 1975).

Parmi les propriétés thérapeutiques reconnues chez les centaurées nous pouvons citer:

- Des pouvoirs diurétiques et vulnéraires (Baba aissa, 1999; Le Clerc, 1983 et Valnet, 1983).
- Traitement de la jaunisse et des calculs rénaux (Kupchan et al., 1969).

- Un pouvoir anti-diabétique et anti-diarrhéique (Monya et Racz, 1974 ; Viguera Lobo, 1953).
- Un pouvoir anti-rhumatismal (Negrete et *al.*, 1988).

Ce genre est très utilisé en médecine populaire turque, en 2004, Arif et ses collaborateurs ont publié les résultats de leurs recherches sur quelques centaurees. D'après ces auteurs, *C. cyanus* est utilisée comme un anti-diarrhéique, *C. hebens* est utilisée contre les douleurs des menstruations, *C. calcitrapa* et *C. jacea* sont utilisées comme fébrifuges.

En Egypte, *C. pallscens* est utilisée comme stomachique, digestive et diurétique (Ali et *al.*, 1987)

Selon Barrero et *al.*, (1997b) et Orallo et *al.* (1998), les espèces *C. malacitana* et *C. corcubionensis* respectivement, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, digestives, diurétiques, astringentes, cholagogues et peuvent être utilisées seules ou mélangées avec d'autres plantes.

I.2.1. Activités biologiques reconnues

Les sesquiterpènes lactones et les flavonoïdes sont les constituants majoritaires des centaurees (Ismail et *al.*, 1986); le pouvoir anti-inflammatoire de certaines centaurees est attribué à la présence des sesquiterpènes lactones. Ces substances possèdent un groupe α -méthylène γ -lactone qui est à l'origine de ce pouvoir (Negrete et *al.*, 1984).

Selon les résultats obtenus par Barrero et *al.* (2000), les sesquiterpènes lactones costunolide et déhydrocostuslactone possèdent le même effet contre le champignon *Cunninghemalla echinulata*, bien qu'elles aient deux structures différentes.

Certaines squiterpènes lactones ont prouvé leurs activités antibactériennes et antifongiques (Karioti et *al.*, 2002; Saroglou et *al.*, 2005; Skaltsa et *al.*, 2000a; id. 2000b) dont par exemple onopordopicrine une sesquiterpène lactone isolée de *C. sonchifolia* a montré une activité positive contre *Staphylococcus sp.*(Lonergan et *al.*, 1992).

Les flavonoïdes hispiduline, kaempferol, quercétine et taxifoline isolé de *C. floccosa* ont été testés contre les microorganismes suivants *Staphylococcus aureus*, *Escherichi coli*, *Candidas albicans*, *Bacillus subtilis*, ainsi que certaines fractions extraites par l'acétate

d'éthyle, il s'est avéré que le taxifoline et l'un des extraits par l'acétate d'éthyle sont efficaces contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Negrete et al., 1987).

I.3. Présentation des espèces étudiées

A. *Centaurea pullata* L.

Pullatus du latin : noir, selon Beniston (1984) le nom de *C. pullata* est du aux bordures noires des bractées.

Selon Davis (1975), *C. pullata* est très proche de *C. involucrata*. Parmi ses synonymes: *Melanoloma pullatum* L. (Davis, 1975), en deuil ou bordée de noir (Beniston, 1984).

Ses noms arabes sont les suivants: Achbet el Ganfoud, Seguia, Djouz, Achbet Ennça et Chham El Aoud (Trabut, 1935).

Cette espèce est répartie en région méditerranéenne, elle est rencontrée au Nord Africain, en Europe, en Espagne et en France (Davis, 1975; Polunin et Huxley, 1967). Beniston (1984), ainsi que Quezel et Santa (1963) notent que *C. pullata* est ré pondue en Algérie dans la région du Tell, elle se rencontre souvent dans les lieux frais, les pâturages, les talus herbeux et au bord des routes du littoral.

C. pullata appartient au sous-groupe Seridia-Melanoloma, selon Hellwig (2004); ce sous-groupe comprend les sections suivantes: Seridia (Juss.) DC., Melanoloma (Cass.) DC. et Pectinastrum (Cass.) DC.

1.a. Section Seridia (Juss.) DC.

Les plantes qui appartiennent à cette section sont annuelles ou pérennes, leurs feuilles supérieures sont entières, celles inférieures sont entières ou pennatilobées.

Cette section regroupe les espèces suivantes: *C. apera* L., *C. diluta* Aiton, *C. eriophora* L., *C. hermannii* Hermann, *C. idaea* Bioss. & Heldr., *C. melitensis* L., *C. micracantha* Dufour, *C. napifolia* L., *C. nicaensis* All., *C. polyacantha* Willd., *C. seridis* L., *C. solstitialis* L., *C. sonchifolia* L., *C. sphaerocephala* L., *C. sulphurea* Willd. (Dostál, 1976).

1.b. Section Melanoloma (Cass.) DC.

Du grec *melanos* : noir, selon Davis (1975), les espèces qui appartiennent à cette section possèdent des capitules de tailles moyennes et des feuilles polymorphes enveloppant ces dernières.

L'involucre est hémisphérique, les bractées possèdent des bordures noires minces sur les deux faces, se terminant par un appendice avec un long cille. Les fleurs sont roses, pourpres, blanches ou jaunes, les akènes sont de tailles moyennes.

Dostál (1976) signale que cette section comprend seulement l'espèce *Centaurea pullata* L.

1.c. Section Pectinastrum (Cass.) DC.

Aucune information concernant cette section n'a été obtenue.

2. Caractéristiques botaniques

Centaurea pullata L. (**Figure 1**) est une plante annuelle, biannuelle ou vivace, de taille très variable avec :

- Fruits blanchâtres couverts de poils (Belin, 1990).
- Étamines aux nombres de 5 forment un tube autour du style.
- Feuilles velues souvent entières.
- Tiges de 10 à 50 cm de hauteur (Beniston, 1984).
- Involucre hémisphérique de taille 15-19 x 10-13 mm, à bractées vertes bordées de noir (Davis, 1975).
- Fleurs à corolle généralement purpurines, par fois jaune pâle ou blanchâtre (Quezel et Santa, 1963).

I.3.3. Position systématique

Selon Davis (1975); Dostál (1976); Hellwig (2004); Romashchenko et *al.*, (2004) la position systématique de *Centaurea pullata* L. est représentée comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta (Angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Sous-famille : Carduoidae

Tribu : Cardueae (Cynareae)

Sous-tribu : Centaureinae

Genre : *Centaurea* L.

Groupe : Hymenocentron- Saridia-Melanoloma

Sous-groupe : Saridia-Melanoloma

Section : Melanoloma

Espèce : *C. pullata* L.



a) La fleur



b) La feuille



c) La tige



d) La plante entière

Figure 1: *Centaurea pullata* L.

4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces du groupe *Seridia-Melanoloma*

Plusieurs espèces du genre *Ceantaurea* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Néanmoins, vu le nombre d'espèces non encore étudiées, ce genre constitue encore une source importante de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique.

4.1. Sesquiterpènes lactones

Les principes amers ou les sesquiterpènes lactones sont des substances très variées distribuées chez les Champignons, les Bryophytes et les Angiospermes (particulièrement chez les Asteraceae). Chez ces dernières, les sesquiterpènes lactones sont localisées dans des poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges ou des bractées (Bruneton, 1999).

Il existe plusieurs structures de sesquiterpènes lactones, mais toutes se rattachent au produit de la cyclisation du (2*E*, 6*E*)-farnésyl pyrophosphate (Bruneton, 1999).

Le genre *Centaurea* est caractérisé par la présence des lactones sesquiterpéniques type germacranolides **(01)** (Amigo et *al.*, 1984; Öksüz et Ayyildiz, 1986), élémanolides **(02)** (González et *al.*, 1973, id. 1984), guaianolides **(03)** (Öksüz et Puntu, 1983) et eudesmanolides **(04)** (Kaij-a-Kamb et *al.*, 1992) (**Figure 2**).

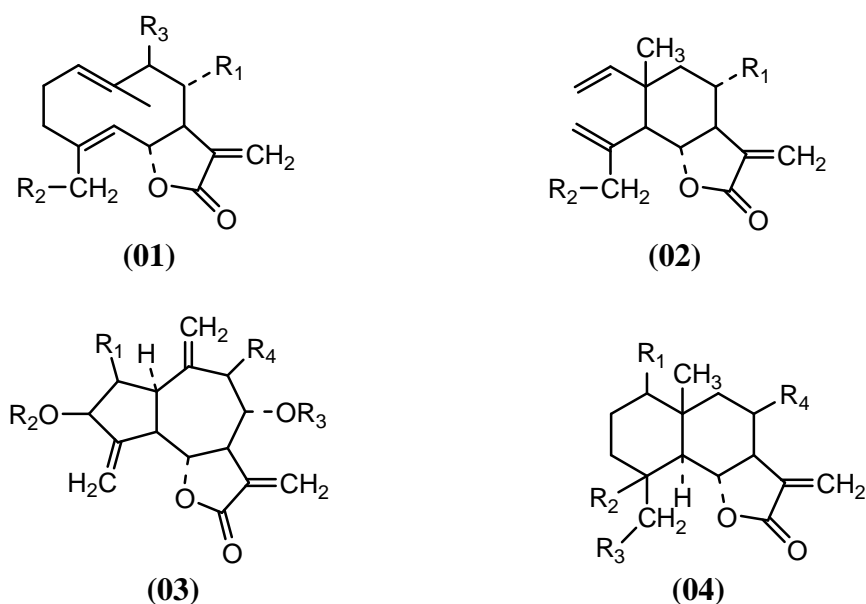


Figure 2 : Lactones sesquiterpéniques du genre *Centaurea* (Kaij-a-Kamb et *al.*, 1992).

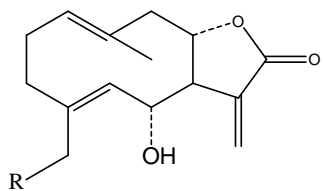
4.1.a. Chez la section *Seridia* (Juss.) DC.

Isolées de plusieurs espèces les sesquiterpènes lactones sont des substances très communes chez le genre *Centaurea*. Le **Tableau 1** regroupe toutes les sesquiterpènes lactones isolées des taxa appartenant à la section *Seridia*.

Tableau 1 : Sesquiterpènes lactones des espèces appartenant à la section *Seridia* (Juss.) DC.

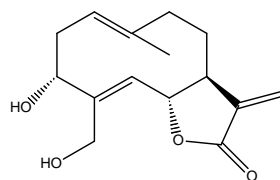
Espèces	Sesquiterpènes lactones	Références
<i>C. aspera</i> L.	- Dihydrosténophyllolide (12) - Isomélitensine (23) - Mélitensine (20) - Sténophyllolide (11) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - (29) - (30)	Cardona et al., 1991
<i>C. aspera</i> L. subsp. <i>aspera</i>	- Cnicine (13) - Gérmacranolide-valine adduct (21) - Onopordopicrine (19)	Geppert et al., 1983 Marco et al., 2005
<i>C. aspera</i> L. var. <i>stenophylla</i>	- Sténophyllolide (11) - Mélitensine (20) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - Mélitensine (20)	Picher et al., 1984 Tortajada et al., 1988
<i>C. eriophora</i> L.	- Cnicine (13) - Salonténolide (09)	Geppert et al., 1983
<i>C. hermannii</i> Hermann	- Chlorojanérine (43) - Cynaropicrine (45) - Janérine (42) - 15-déschloro-15-acétoxychlorojanérine (34) - 15-déschloro-3 β -acétoxy-15-hydroxychlorojanérine (33) - 15-déschloro-15-hydropéroxy chlorohyssopifoline B (31) - 15-déschloro-15-hydropéroxychlorojanérine (32) - 19-désoxy-chlorojanérine (44)	Öksüz et al., 1994a
<i>C. melitensis</i> L.	- Arctiopicrine (18) - Salonténolide (09) - Onopordopicrine (19) - Mélitensine (20) - Mélitensine- β -hydroxyisobutyrate (27) - 11(13)-déhydromélitensine β -hydroxyisobutyrate (24)	Barrero et al., 1989 González et al., 1971 González et al., 1975
<i>C. napifolia</i> L.	- Cnicine (13) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - Mélitensine (20) - 4'-acétoxycnicin (15) - 8-(3-hydroxy-4-acétoxy-2-méthylène-butanoate)-déhydromélitensine (26) - 8-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoate)-déhydromélitensine (25)	Bruno et al., 1995
<i>C. nicaensis</i> All.	- Amarine (16) - Cnicine (13) - Dihydroamarine (17) -(5R, 6R, 7R, 8S, 10S, 11S, 15-hydroxy-8-(1,2-	Bruno et al., 1996

	dihydroxy-éthyl)-acroyloxyéléma-1,3-dien-6,12-olide (28) - Onopordopicrine (19) - Mélitensine (20) - 11 β ,13-dihydrocnicine (14) -11 β ,13-dihydrosaloniténolide (10)	Medjroubi et al., 2003
<i>C. seridis</i> L.	- Artemisiifoline (06) - Salonténolide (09) - C ₁₅ -acétylartémisiifolin (05)	Gonzalez et al., 1973
<i>C. solstitialis</i> L.	- 3-O-acétylsolstitialine A (55) - 13-O-acétylsolstitialine A (50) - Acroptiline (47) - Epoxyrépdiolide (46) - Acroptiline (47) - Cynaropicrine (45) - Répine (48) - Solstitiolide (40) - Subtéolide (39) - Acroptiline (47) - (52) - Centaurepensine (Chlorohyssopifoline A) (37) - Cynaropicrine (45) - Episolstitiolide (41) - Janérine (42) - Linichlorine B (54) - Repine (48) - Solstitialine 3,13-diacétate (51) - Sublutéolide (39) -17-épi-centaurepensine (38) - Repine (48) - Solstitialine A (49) - Solstitiolide (40) - Subtéolide (39) - Cynaropicrine (45) - Solstitialine A (49)	Hamburger, 1992 Jakupovic et al., 1986 Merrill et Stevens 1985 Nowak, 1992 Tesevic et al., 1998b Wang et al., 1991
<i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>schouwii</i>	- Aguerine B (53) - Cynaropicrine (45) - (36) - Guaianolide diol monoacétate (35)	Bruno et al., 1991 Öksüz et al., 1993
<i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>solstitialis</i>	- Chlorojanérine (43) - 13-O-acétylsolstitialine A (50) - Solstitialine A (49)	Yesilada et al., 2004
<i>C. sonchifolia</i> L.	- C ₁₅ -Acétylartémisiifolin (05) - Artémisiifoline (06) - Onopordopicrine (19)	González et al., 1984 Lonergan et al., 1992
<i>C. sphaerocephala</i> L. ssp. <i>lusitanica</i>	- Cnicine (13) - Dihydrocostunolide (07)	Nowak, 1992
<i>C. sphaerocephala</i> L. ssp. <i>sphaerocephala</i>	- Cnicine (13) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - 4'-acétoxycnicin (15) -1(10)-époxy-15-hydroxy-gérmacr-4-en-6,12-olide (08)	Bruno et al., 1994
<i>C. sulphurea</i> Willd.	- Cnicine (13)	Geppert et al., 1983 González et al., 1984

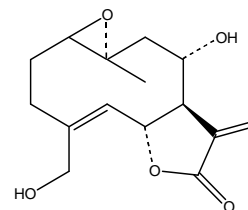


(05) R= OAc

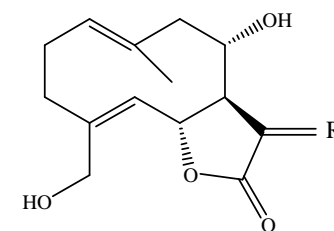
(06) R= OH



(07)

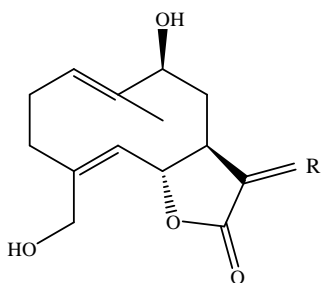


(08)



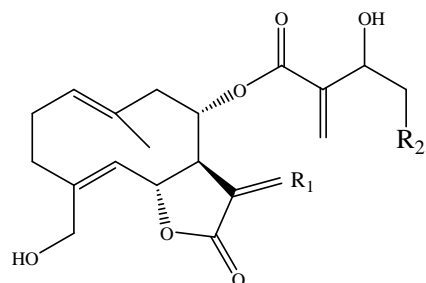
(09) R=CH₂

(10) R=CH₃



(11) R=CH₂

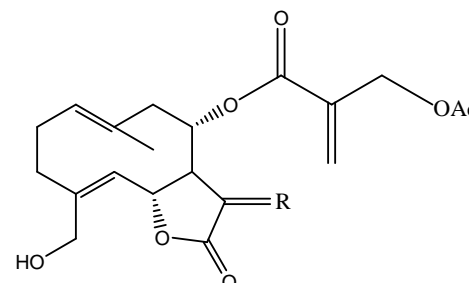
(12) R=CH₃



(13) R₁=CH₂, R₂=OH

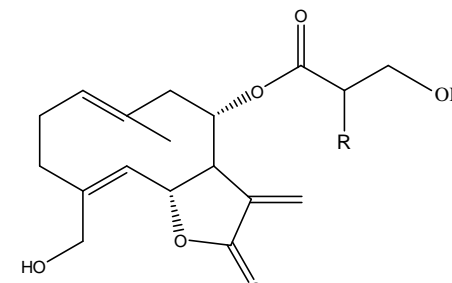
(14) R₁=CH₃, R₂=OH

(15) R₁=CH₂, R₂=OAc



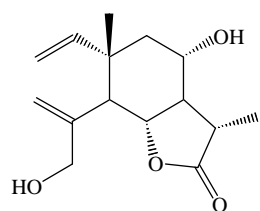
(16) R=CH₂

(17) R=CH₃

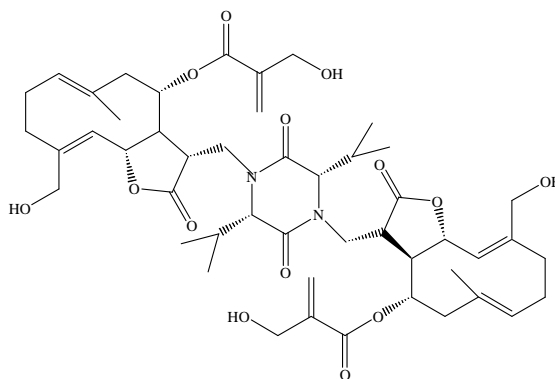


(18) R=CH₃

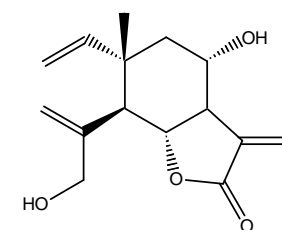
(19) R=CH₂



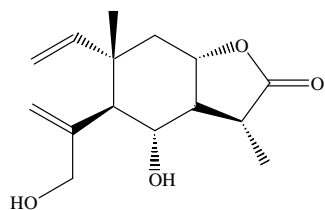
(20)



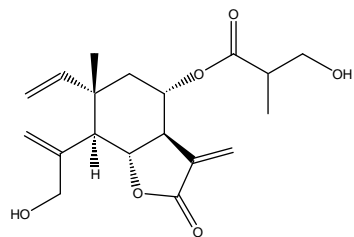
(21)



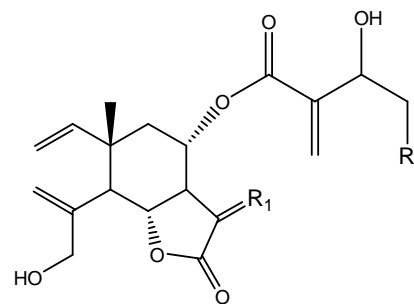
(22)



(23)



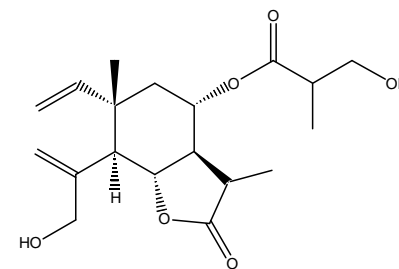
(24)



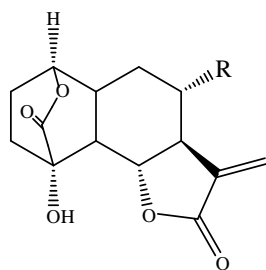
(25) R1=CH₂, R2= OH

(26) R1=CH₂, R2=2OAc

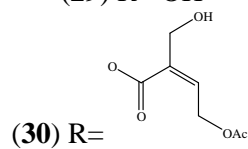
(28) R1=CH₃, R2= OH



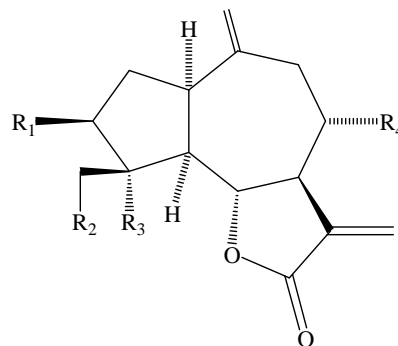
(27)



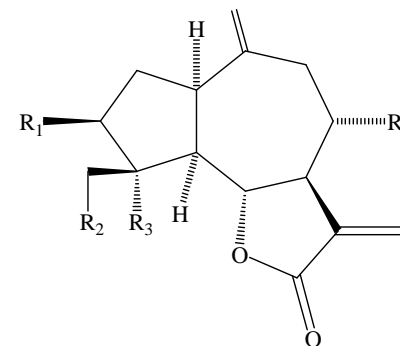
(29) R= OH



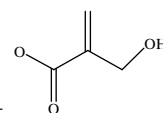
(30) R=



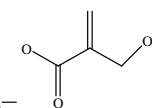
(31) R1= OH, R2=OOH, R3=OH, R4= OH



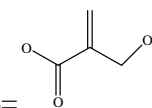
(32) R1= OH, R2=OOH, R3=OH, R4=

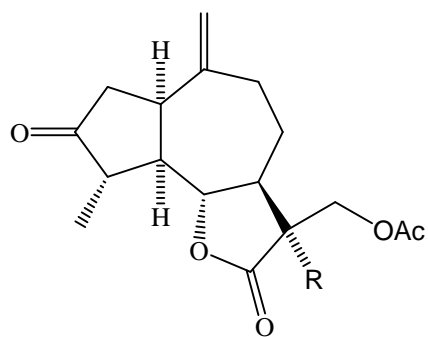


(33) R1= OAc, R2=OH, R3=OH, R4=

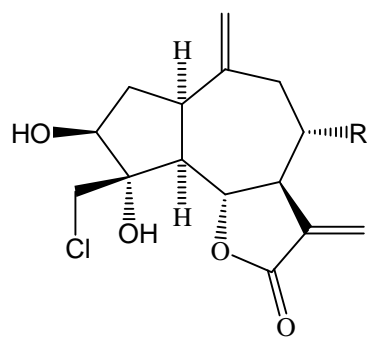


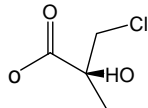
(34) R1= OH, R2=OAc, R3=OH, R4=

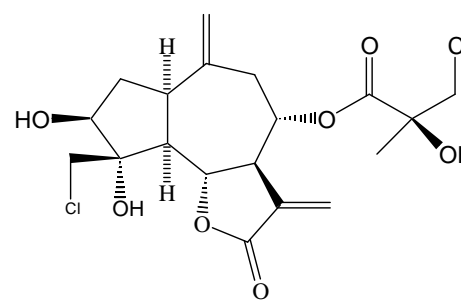




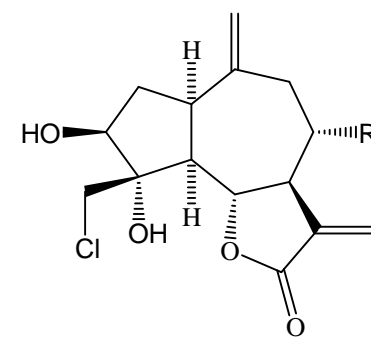
(35) R= OH
 (36) R=OAc

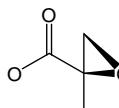


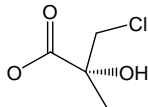
(37) R= 

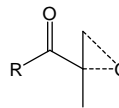


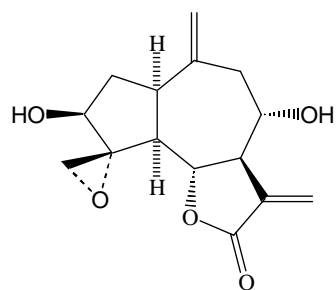
(39)



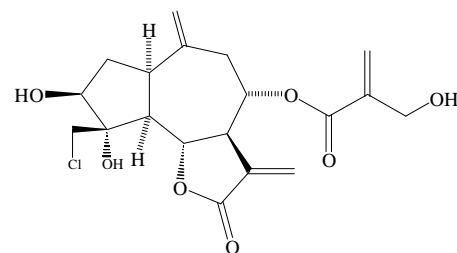
(40) R= 

(38) R= 

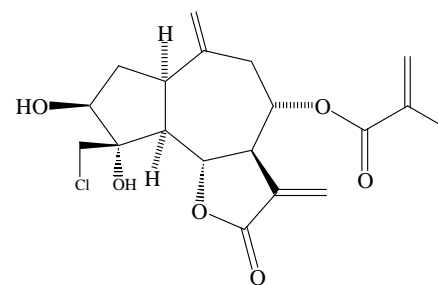
(41) R= 



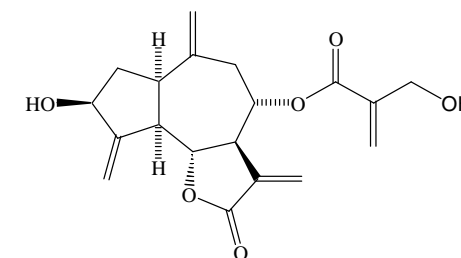
(42)



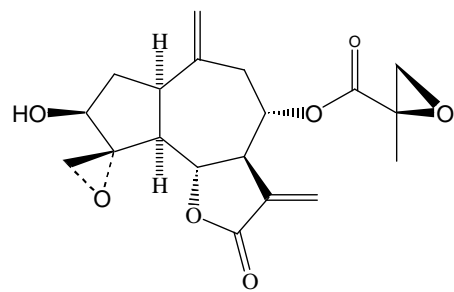
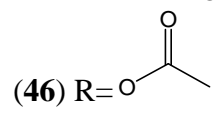
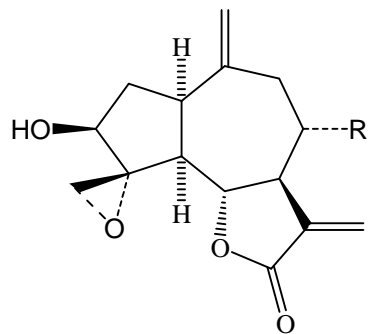
(43)



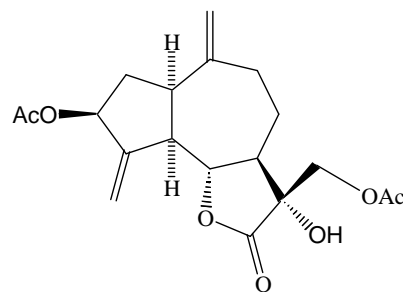
(44)



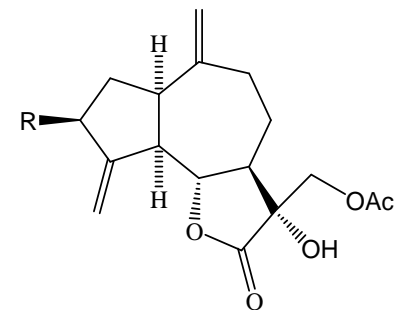
(45)



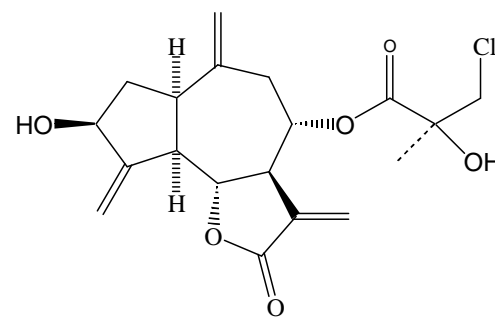
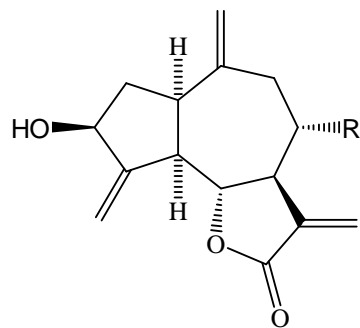
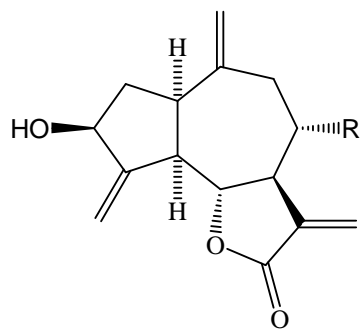
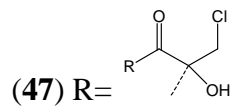
(48)



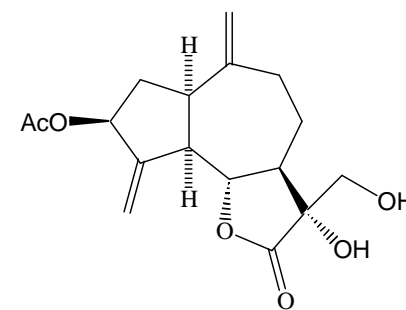
(49)



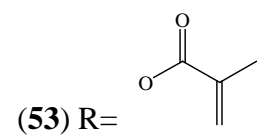
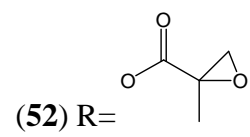
(50) R= OH
(51) R= OAc



(54)



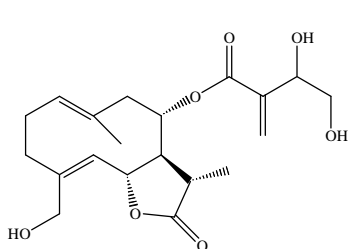
(55)



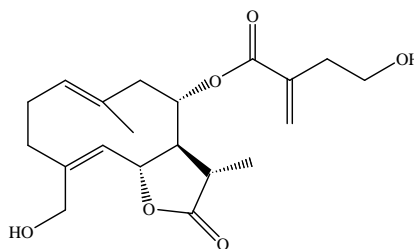
4.1.b. Chez la section *Melanoloma* (Cass.) DC.

Les travaux antérieurs de Benayache et *al.* (1992) effectués sur *C. pullata* récoltée en Algérie ont permis d'isoler les gémacranolides suivants: 11 β , 13-dihydrocnicin (**14**), 11 β , 13-dihydro 19-désoxycnicine (**56**).

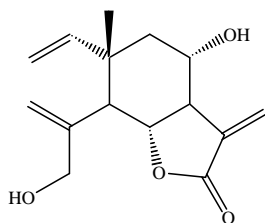
Plusieurs années auparavant, González et ses collaborateurs (1974) avaient isolé 11 β , 13-déhydromélitensine (**22**) et centaurepsine (**37**).



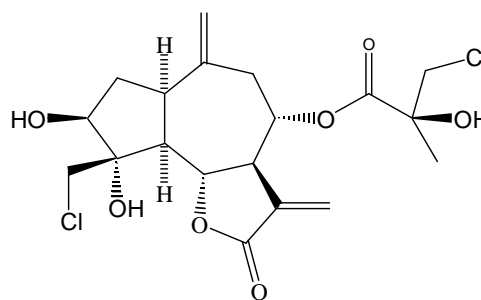
(14)



(56)



(22)



(37)

4.1.c. Activités biologiques des Sesquiterpènes lactones

Les lactones sesquiterpéniques constituent une grande famille de composés chimiques rencontrés chez les Centaurées, ils sont responsables d'un certain nombre d'activités biologiques.

Les sesquiterpènes possédant une fonction γ -lactone et un groupement α - ou β -méthylénique exercent une action cytotoxique et antinéoplastique (Kaij-a-Kamb et *al.*, 1992), ceci a été confirmé par de nombreux travaux, par exemple ceux de Vanhaelen-Fastré (1972), qui a montré que la cnicine a une activité antibiotique et cytotoxique attribuée à la présence de deux groupements méthyléniques exocycliques, situés en position α d'une fonction carbonyle (anneau lactonique et chaîne latérale).

Negrete et *al.* (1984) ont étudié l'activité antimicrobienne de la déhydrocostus et de la 8 α -hydroxy-déhydrocostus, cette dernière a montré une plus grande inhibition vis-à-vis des

souches testées. Selon les résultats de Vanhaelen-Fastré et Vanhaelen (1976), qui préconisent que le pouvoir antimicrobien de la cnicine est dû à la présence de deux groupements méthyléniques exocycliques d'une part, et à la présence d'une fonction alcool primaire en C₁₅, d'autre part.

Quelques sesquiterpènes lactones ont été préconisées dans l'action antifongique. Les travaux de Barrero et *al.*, (2000) mettent en évidence l'action de (+)-costunolide et (-)-déhydrocostuslactone contre *Cunninghamella echinulata*, cela est dû selon les mêmes auteurs à la faible polarité de ces sesquiterpène lactones. Les sesquiterpènes lactones étudiées par Karioti et *al.* (2002), Saroglou et *al.* (2005), Skaltsa et *al.* (2000a; id. 2000b) ont montré une meilleure activité antifongique contre les champignons suivants: *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *Penicillium ochrochloron*, *P. funiculosum*, *Trichoderma viride*, *Cladosporium cladosporioides* et *Alternaria alternata*, que celle de l'antibiotique commercial miconazole.

Negrete et *al.*, (1984) ont mis en évidence l'action antibiotique de certaines sesquiterpène lactones.

Les récents travaux de Yesilada et *al.* (2004) mentionnent que la chlorojanérine et le 13-acétyl solstitialine ont un pouvoir anti-ulcérogène chez les rats.

4.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une grande gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols; ils sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits (Seguin, 2001), généralement rencontrés dans les agrumes, les fruits rouges. Ils peuvent être accompagnés d'autres substances: des saponines, des pectines et des terpènes (Kuhnau, 1976; Seguin, 2001). Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à savoir le 2-phénylchromane et sont regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxygénation du noyau pyranique centrale (Bruneton, 1999) (**Figure 3**):

- 2-phénylbenzopyrylium ou anthocyanes (**57**).
- 2-phénylchromane, tel que les flavones (**58**), flavonols (**59**) et flavanones (**60**).
- 2-phénylchromane, tel que les flavanes (**61**) et flavan-3-ols (**62**) et flavan-3,4-diols (**63**).
- chalcones (**64**).
- 2-benzylidène-coumaranones ou auronnes (**65**).

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxylées sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine (Bruneton, 1999; Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont stockés généralement dans les vacuoles (Grotewold, 2004), cependant quelques flavonoïdes sont accumulés dans les surfaces des feuilles ou des fleurs au niveau des trichomes glandulaires et sont connus sous le nom de flavonoïdes de surface. Les recherches ont montré que ces flavonoïdes de surfaces sont des aglycones très substitués avec des groupes méthyles (Onyilagha et Grotewold, 2004).

80 espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae) ont été investiguées à la recherche de flavonoïdes, ces derniers ont été isolés des parties aériennes, des feuilles et parfois des racines de ces espèces. Généralement, ces flavonoïdes ont été identifiés comme flavones et flavonols substitués à la position C-6, ainsi que leurs *O*- et *C*-glucosides (Bohm et Stuessy, 2001).

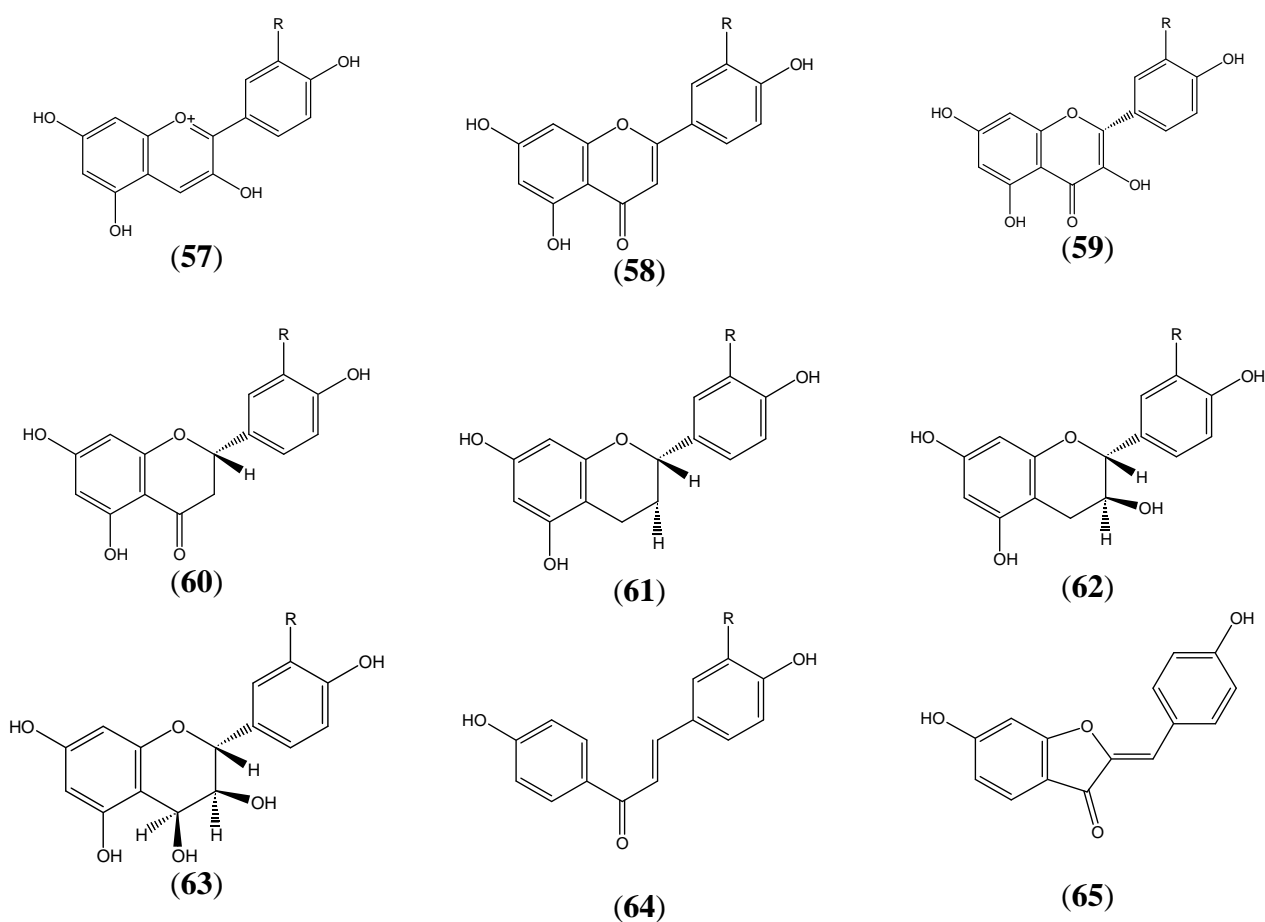


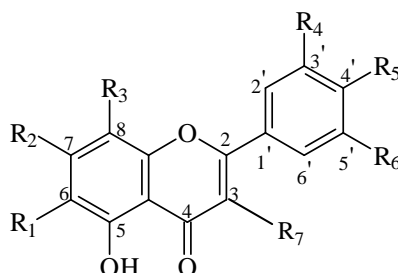
Figure 3 : Formules types des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

4.2.a. Chez la section *Seridia* (Juss.) DC.

Les flavonoïdes suivants ont été isolés des espèces appartenant à cette section (Tableau 2, Figure 4)

Tableau 2 : Flavonoïdes des espèces appartenant à la section *Seridia* (Juss.) DC.

Espèces	Flavonoïdes	Références
<i>C. aspera</i> L.	- Népétine (Eupafoline) (72) - Hispiduline (68) - Jacéosidine (71) - Pectolarigenine (74)	Cardona et al., 1991
<i>C. aspera</i> L. var. <i>stenophylla</i>	- Apigénine (66) - Apigénine-7-O-β-D-éthylglycuronide (67) - Népétine (72)	Picher et al., 1984
<i>C. melitensis</i> L.	- Hispiduline (68)	Negrete et al., 1989
<i>C. solstitialis</i> L.	- Isoquercitrine (70) - Isoorientin (Homoorientine) (69) - Orientine (73) - Quercétine (75) - Quercétine-7-O-β-D- Glucosyle (76) - Sfahtoside (77)	Kamanzi et Raynaud, 1976
<i>C. sulphurea</i> Willd.	- Pectolarigenine (74)	González et al., 1984



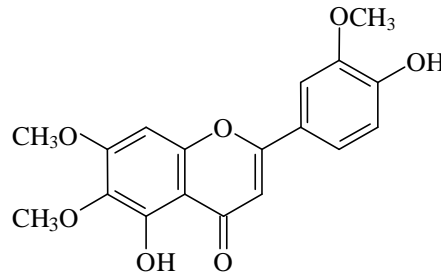
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Apigénine (66)	H	OH	H	H	OH	H	H
Apigénine-7-O-β-D-éthylglycuronide (67)	H	O-éthyl glycu-ronique	H	H	OH	H	H
Hispiduline (68)	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	H
Isoorientine (69)	C-glc	OH	H	OH	OH	H	H
Isoquercitrine (70)	H	OH	H	OH	OH	H	O-glc
Jacéosidine (71)	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	H	H
Népétine (72)	OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	H
Orientine (73)	H	OH	C-glc	H	OH	OH	H
Pectolarigenine (74)	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	H	H
Quercétine (75)	H	OH	H	OH	OH	H	OH
Quercétine -7-O-β-D-Glucosyle (76)	H	O-glu	H	OH	OH	H	OH
Sfahtoside (77)	C-glc	OH	C-ara	H	OH	H	H

ara: arabinose, glc: glucose

Figure 4: Flavonoïdes chez la section *Seridia* (Juss.) DC.

4.2.b. Chez la section *Melanoloma* (Cass.) DC.

Très récemment en 2005a, Medjroubi et ses collaborateurs ont démontré l'existence chez *C. pullata* des flavonoïdes suivants : jacéosidine (71) et cisilinéol (78).



(78)

4.2.c. Activités biologiques des flavonoïdes

- **Chez la plante :** les flavonoïdes sont impliqués dans les mécanismes de réponses contre le stress causé par les radiations élevées des UV-B (Middleton et Teramura, 1993; Reuber et *al.*, 1996).

- **Chez l'homme :** ces métabolites secondaires sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques telles que:

- **Effet antiallergique :** cet effet est attribué à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Cette ATPase Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieure à celui du chromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asme (Di Carlo et *al.*, 1999).

- **Effet anti-inflammatoire :** sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables *in vitro* de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique (Landolfi et *al.*, 1984).

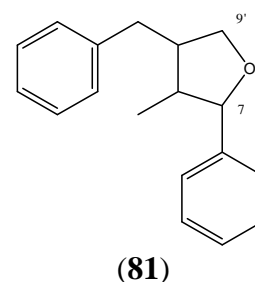
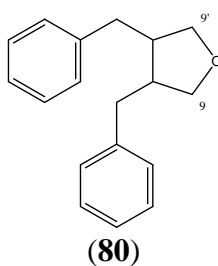
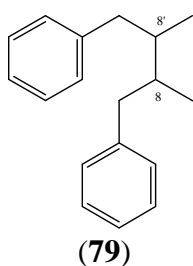
➤ **Effet antiulcéreux** : des études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF qui est un agent ulcérogène potentiel, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes (Izzo, 1996).

➤ **Effet anticancéreux** : présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale (Bracke et *al.*, 1991).

4.3. Lignanes

Les lignanes sont issus de la condensation de deux unités phénylpropaniques. Ces composés sont très répandus dans le règne végétal et possèdent de nombreuses activités biologiques, qui leur confèrent une importance non négligeable en thérapeutique. Ils ont montré des propriétés: antibactérienne, antifongique, antioxydante, antitumorale, antivirale, antihépatotoxique (flavanolignanes des akènes du chardon-Marie), anti-PAF, insecticides et oestrogéniques (Ayres et Loike, 1990).

Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes (**Figure 5**) ont été caractérisés chez différentes familles du règne végétal. Les plus simples sont les dibenzylbutanes (liaison 8-8' (**79**)) qui, par cyclisation, peuvent engendrer trois types de lignanes monofuraniques (cyclisation 9-O-9', 7-O-9', ou 7-O-7' (**80-82**)) et des butyrolactones (**83**), la cyclisation peut impliquer un carbone aromatique (aryl-naphtalène (**84-86**)) ou deux dibenzocyclooctanes (**86**). La double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furanofuraniques (**87**).



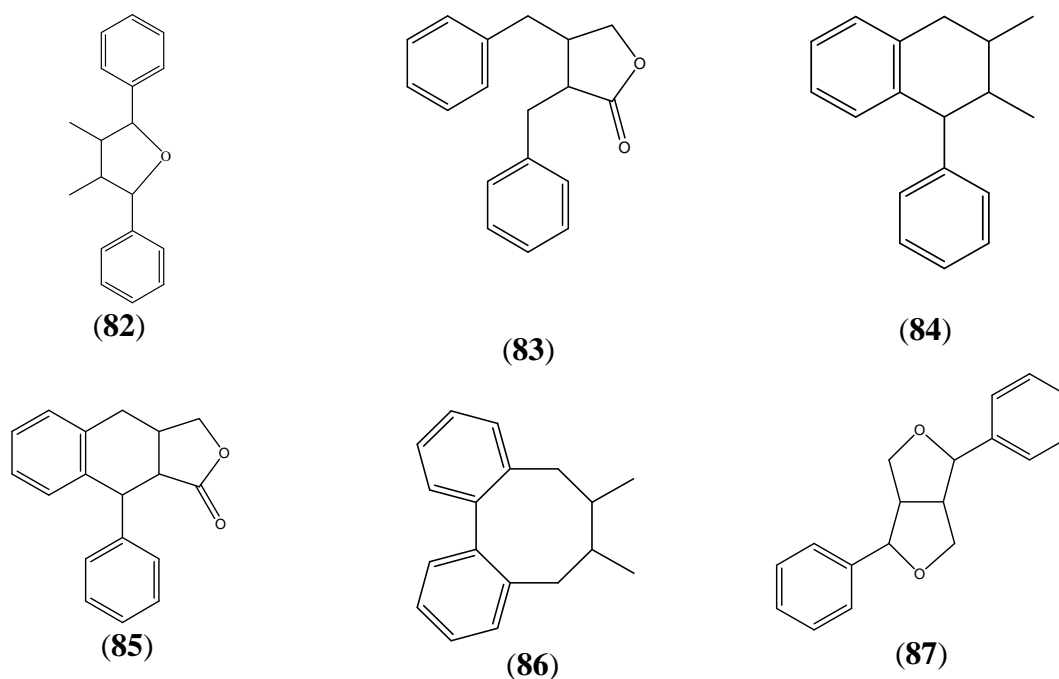


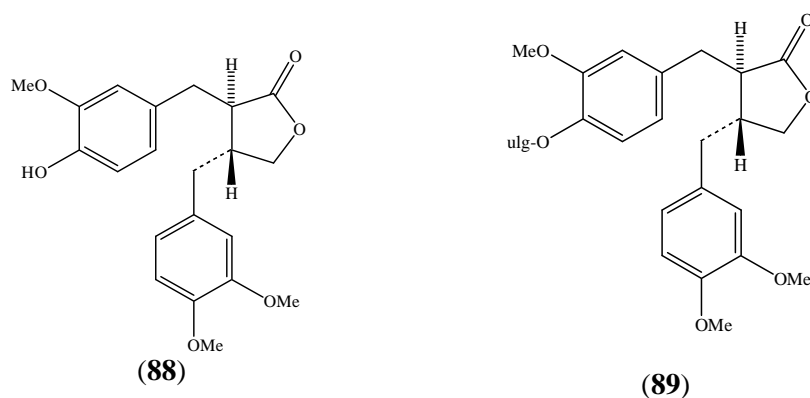
Figure 5 : Principaux types de lignanes (Bruneton, 1999).

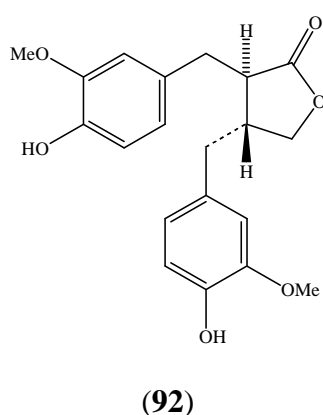
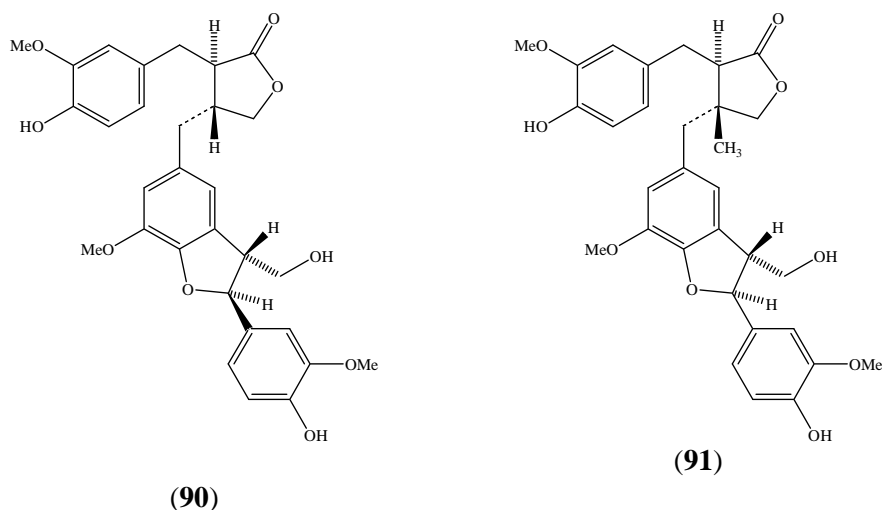
4.3.a. Chez la section *Seridia* (Juss.) DC.

Dans la littérature peu de travaux ont montré la présence de lignanes chez les espèces appartenant à cette section (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Lignanes des espèces appartenant à la section *Seridia* (Juss.) DC.

Espèces	Lignanes	Références
<i>C. aspera</i> L.	- Matairésinol (92)	Marco <i>et al.</i> , 2005
<i>C. melitensis</i> L.	- Arctiine (89)	Negrete <i>et al.</i> , 1989
<i>C. napifolia</i> L.	- Lappaol A (91)	Bruno <i>et al.</i> , 1995
<i>C. nicaensis</i> All.	- Lappaol (90)	Bruno <i>et al.</i> , 1996
<i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>schouwii</i>	- Arctigénine (88) - Matairésinol (92)	Bruno <i>et al.</i> , 1991
<i>C. sphaerocephala</i> L. ssp. <i>polyacantha</i>	- Arctigénine (88) - Arctiine (89) - Lappaol A (91) - Matairésinol (92)	Bastos <i>et al.</i> , 1990





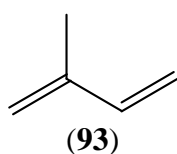
4.3. b. Chez la section *Melanoloma* (Cass.) DC.

Aucune étude n'a été investiguée pour la détermination des lignanes chez *C. pullata*.

4.4. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes et variables, formées de constituants qui appartiennent à deux groupes de molécules: le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (Bruneton, 1999).

a)- Les terpènes (terpénoïdes ou isoprénoïdes) sont des dérivés de l'isoprène (**93**) (2-méthylbutadiènes); chaque groupe de terpènes est issu de la condensation d'un nombre d'unités isopréniques (Ruzicka, 1973).



Les terpènes sont généralement distribués dans tout le règne végétal. Toutes les plantes vertes ont la capacité de produire des terpènes par la voie du mévalonate (Bell et Charlwood, 1980), mais cette spécificité n'est pas absolue car Robbers et *al.* (1996) mentionnent que les terpènes sont rencontrés également chez les champignons, chez certains animaux marins (Spongiaires), ainsi que chez certains insectes sous formes de phéromones sesquiterpéniques.

Les terpénoïdes peuvent être présents sous la forme d'hydrocarbure ou peuvent être oxygénés. Selon le nombre d'unités isopréniques les terpènes sont classés en (Bruneton, 1999; Robbers et *al.*, 1996):

- **Monterpènes (C₁₀)** peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α et γ -terpinène) ou bicycliques (pinène, camphène).
- **Sesquiterpènes (C₁₅)** peuvent être linéaires (farnésol), cycliques (carvacrol)
- **Diterpènes (C₂₀)**.
- **Triterpènes (C₃₀)**.
- **Tétraterpènes** ou caroténoïdes (C₄₀)

Bruneton (1999) et Seguin (2001) préconisent que seuls les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée (mono et sesquiterpènes) sont rencontrés principalement dans la composition des huiles essentielles.

b)- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins présents dans la composition de l'huile essentielle, ils sont classés selon la nature des fonctions qu'ils portent: acide, ester, aldéhyde (Arnaud, 1985; Seguin, 2001).

4.4.a. Chez la section *Seridia* (Juss.) DC.

Dans la littérature peu de taxa appartenant à cette section ont fait l'objet d'investigation pour déterminer leur composition en huile essentielle. Les résultats des travaux entrepris par Buttery et *al.* (1986) et Binder et *al.* (1990a) ont permis de mettre en évidence dans les bourgeons de *C. solstitialis* le germacrene D (61.0 %) (**94**) comme composé majoritaire (**Tableau 4**).

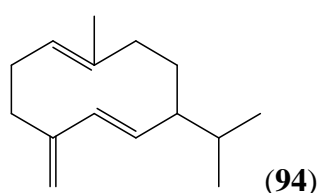
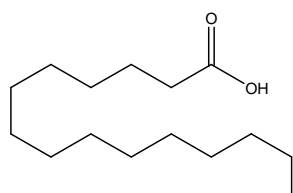
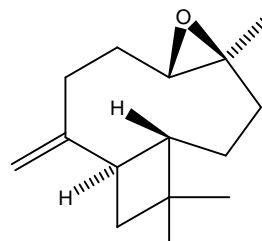


Tableau 4: Composition de l'huile essentielle de *C. solstitialis* (Binder et al. 1990a)

Composés	Indice de rétention (Ir)	Surface du pic (%)
(<i>E</i>)-2-hexenal	1190	0.7
hexanol	1340	0.2
(<i>Z</i>)-3-hexenol	1370	0.4
(<i>Z</i>)-3-hexenyl proponate	1410	0.1
myrcène	1160	0.7
limonène	1180	0.2
(<i>E</i>)- β -ocimène	1250	0.2
<i>p</i> -cymène	1280	0.1
perillène	1310	1.0
α -copaène	1460	0.3
caryophyllène	1570	4.3
(<i>E</i>)- β -farnesène	1650	0.6
germacrène D	1680	61.0
bicyclogermacrène	1690	7.2
2-méthoxytoluène	1390	0.2
1-pentadécène	1540	4.9

Chez la même espèce une étude plus récente a été menée par Akbar et al. (2006) les résultats ont été différents, il s'est avéré que les composés majoritaires étaient: l'acide hexadecanoïque (acide palmitique) (30.8%) (**95**) et le (-)-oxyde de caryophyllène (25.2%) (**96**) (Tableau 5).

**(95)****(96)****Tableau 5:** Composition de l'huile essentielle de *C. solstitialis* (Akbar et al. 2006)

Composés	Ir	Surface du pic (%)	Composés	Ir	Surface du pic (%)
α -pinène	939	0.4	β -caryophyllène	1418	6.2
sabinène	976	0.3	α -humulène	1454	0.4
β -pinène	980	0.8	germacrène D	1480	2.4
myrcène	991	0.3	(<i>E</i>)- β -Ionone	1482	1.1
<i>p</i> -cymène	1026	1.3	(-)-spatulénol	1572	1.1
limonène	1028	3.3	(-)-oxyde de caryophyllène	1577	25.2
1,8-cinéol	1033	9.6	humulène epoxide II	1605	1.1
linalool	1098	0.5	α -cadinol	1654	1.4
α -copaène	1371	0.4	acide hexadecanoïque	1972	30.8

4.4.b. Chez la section *Melanoloma* (Cass.) DC

Aucune étude n'a été effectuée pour la détermination de la composition de l'huile essentielle chez *C. pullata*.

4.4.c. Activités anti-microbiennes des huiles essentielles

Beaucoup d'études ont été menées pour confirmer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles. Deans et Ritchie (1987) par exemple, ont étudié l'action de 50 huiles essentielles à différentes concentrations contre 25 genres de bactéries. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle du thym a inhibé 23 genres de bactéries sur les 25 utilisés; celles de la marjolaine et du géranium ont inhibé 22 genres de bactéries.

D'après les résultats de Kabouche et *al.* (2005) la présence du thymol et du carvacrol parmi les constituants majoritaires des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et *T. numidicus*, est à l'origine de la forte action de ces huiles contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

Les travaux de Giamperi et *al.* (2002) réalisés sur l'action des huiles essentielles d'origan, de thym et de coriandre contre 5 différentes souches fongiques, ces huiles ont inhibé à 100% les souches testées à des concentrations croissantes.

Indépendamment, les équipes de Jirovetz (2003 et 2004) ont également identifié cette action antifongique chez l'huile essentielle d'*Anethum graveolens*.

Il existe également plusieurs études sur le pouvoir antifongique des huiles essentielles, nous pouvons citer par exemple les résultats de Daouk et *al.* (1995) qui ont mis en évidence l'action antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum syriacum* testée contre *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.*

Plus récemment Rakotonirainy et Lavédrine (2005) ont investigué l'activité des constituants majoritaires de plusieurs huiles essentielles, et il est apparu que le linalool présente la plus forte activité antifongique.

B. *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii*

Strid et Tan (1991) préconisent que certaines sous espèces de *C. affinis* Friv. rencontrées en haute altitude au Nord de la Grèce ne peuvent être attribuées à cette espèce car elles sont proche de *C. grisebachii*.

Selon Georgiadis (1983) *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. [= *Centaurea graeca* Boiss & Spruner var. *macedonia* (Griseb)] ressemble morphologiquement à *Centaurea paniculata* L. var. *macedonia* (Griseb).

En Grèce, cette espèce est répartie en région macédonienne (prés de Thessaloniki) et à Chortiatis, et possède deux sous espèces *Centaurea grisebachii* ssp. *confusa* (Halácsy) Dostál et *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. subsp. *grisebachii*, qui est répartie sporadiquement dans les montagnes de plus de 1700 m (Rechinger, 1943; Strid et Tan, 1991).

Selon Dostál (1976) *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* appartient à la section *Acrolophus* (Cass.) DC.

1. Section *Acrolophus* (Cass.) DC.

Les espèces qui appartiennent à cette section sont annuelles ou biannuelles (Dostál, 1976), leurs tiges sont hautes de 20 à 60 cm, les feuilles sont pennatilobées avec des segments étroits, le capitule est petit. Ces espèces sont endémiques en Italie (Pignatti, 1982), au Sud de la France (Arènes, 1951), en Grèce et en Turquie (Davis, 1975).

Cette section regroupe les espèces suivantes (Dostál, 1976): *Centaurea affinis* Friv., *C. aggregata* Fisch. & May, *C. aplolepa* Moretti ssp. *aplolepa*, *C. aplolepa* Moretti ssp. *lunensis* (Fiori) Dostál, *C. arenaria* Bieb. ex Wild. ssp. *arenaria*, *C. arenaria* Bieb. ex Wild. ssp. *odesana* (Pordan) Dostál, *C. arenaria* Bieb. ex Wild. ssp. *majorowii* (Dumbadze) Dostál, *C. attica* Nyman ssp. *attica*, *C. attica* Nyman ssp. *drakiensis* (Freyn, Sint.) Dostál, *C. attica* Nyman ssp. *ossaea* (Halácsy) Dostál (= *C. ossaea* Halácsy), *C. calvescens* Pancić, *C. cineraria* L. ssp. *cineraria*, *C. cineraria* L. var. *circae* Somm., *C. cineraria* L. ssp. *umbrosa* (Lacaita) Pign., *C. crithmifolia* Vis., *C. cuneifolia* Sibth. SM. ssp. *pallida* (Friv.) Hayek, *C. diffusa* Lam., *C. diffusa* Lam. var. *brevispina* Boiss.[= *C. bovina* Velen.], *C. exarata* Boiss. ex Cosson., *C. grisebachii* (Nyman) Form ssp. *confusa* (Halácsy) Dostál, *C. grisebachii* (Nyman) Form ssp. *grisebachii*, *C. kartschiana* Kcop., *C. leucophaea* Jordan ssp. *leucophaea*, *C. maculosa* Lam., *C. mantoudii* Georg., *C. nigra* L., *C. orphanidea* Heldr., *C. Pallidior* Halácsy ssp. *pallidior*, *C. pelia* DC., *C. rhenana* Bereau subs. *savranica* (Kloklow), *C.*

spinosa L., *C. spinosa* L. ssp. *spinosa*, *C. thessala* Hausskn. ssp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg., *C. transiens* Halácsy, *C. tymphaea* Hausskn. ssp. *brevispina* Hausskn (Dostál), *C. tymphaea* Hausskn. ssp. *tymphaea*, *C. vallesiaca* (DC.) Jordan, *C. zuccariniana* DC.

2. Caractéristiques botaniques

C. grisebachii (Nyman) Heldr. (**Figure 6**) est une plante pérenne avec (Davis, 1975):

- Akènes de 2.5 à 3.5 mm de diamètre.
- Feuilles tomenteuses, les feuilles inférieures sont pénatipartites à bipartites, alors que les feuilles supérieures sont simples avec une paire de lobes à la base.
- Involucre hémisphérique de taille 15-19 x 10-13 mm
- Tiges de 20 à 50 cm de hauteur

Chez *C. grisebachii* (Nyman) Heldr. subsp. *grisebachii* la tige est branchée au milieu sa hauteur est entre 30 et 50 cm, les feuilles infères possèdent plus de 5 paires de segments, le diamètre de l'involucre est de 6 à 7 mm (Dostál, 1976).

3. Position systématique

Selon Dostál (1976) et Hellwig (2004) la position systématique de *Centaurea affinis* Friv. est la suivante:

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta (Angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Sous-famille : Carduoidea

Tribu : Cardueae (Cynareae)

Sous-tribu : Centaureinae

Genre : *Centaurea* L.

Sous-groupe : Acrolophus (Cass.) DC.

Section: Acrolophus (Cass.) DC.

Espèce: *C. grisebachii* (Nyman) Form.

Sous espèce: *grisebachii*



a) La plante entière

b) La fleur

Figure 6 : *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii*

4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces de la section *Acrolophus* (Cass.) DC.

4.1. Sesquiterpène lactones

Un grand nombre des représentants de la section *Acrolophus* (Cass.) DC. ont fait l'objet d'investigations à la recherche de sesquiterpènes lactones, selon les résultats obtenus (**Tableau 6**) ces substances sont abondantes chez cette section.

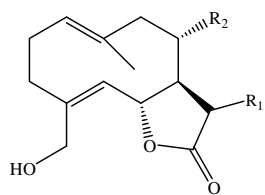
Tableau 6: Sesquiterpène lactones des espèces appartenant à la section *Acrolophus* (Cass.) DC.

Espèces	Sesquiterpène lactones	Références
<i>C. affinis</i> Friv.	- Cnicine (13) - Saloniténolide (09)	Janačkovic et al., 2004
<i>C. aggregata</i> Fisch. et May	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. aplolepa</i> Moretti ssp. <i>aplolepa</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. aplolepa</i> Moretti ssp. <i>lunensis</i> (Fiori) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. arenaria</i> Bieb. ex Wild. ssp. <i>arenaria</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. arenaria</i> Bieb. ex Wild. ssp. <i>odesana</i> (Pordan) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. arenaria</i> Bieb. ex Wild. ssp. <i>majorowii</i> (Dumbadze) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. attica</i> Nyman ssp. <i>attica</i>	- Cnicine (13) - 4'-acétoxycnicin (15) - Méthyl 8 α -(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-6 α , 15-dihydroxyéléma-1,3,11(13)-trien-12-oate (103) - 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-déhydromélitensine (101) - Atticine (116) - 4'-acétoxymalacitanolide (112) - Malacitanolide (111)	Skaltsa et al., 1999 Skaltsa et al., 2000a
<i>C. attica</i> Nyman ssp. <i>drakiensis</i> (Freyn, Sint.) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. attica</i> Nyman ssp. <i>ossaea</i> (Halácsy) Dostál = <i>C. ossaea</i> Halácsy	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. calvescens</i> Pancić	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. cineraria</i> L. ssp.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984

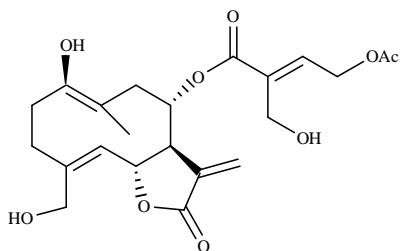
<i>cineraria</i>		
<i>C. cineraria</i> L. var. <i>circae</i> Somm.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. cineraria</i> L. ssp. <i>umbrosa</i> (Lacaita) Pign.	- Cnicine (13) - 4'-acétoxycnicin (15) - 8 α -(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-déhydromélitensine (101)	Bruno et Herz, 1988
<i>C. crithmifolia</i> Vis.	- Saliniténolide (09)	Geppert et al., 1983
<i>C. cuneifolia</i> Sibth. SM.	- Cnicine (13) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - 11 β ,13-déhydromélitensine-8[(2'- α -hydroxy- β -hydrométhyl)-acryloyl] (102)	Aslan et Öksüz, 1999
<i>C. cuneifolia</i> Sibth. SM. ssp. <i>pallida</i> (Friv.) Hayek	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. diffusa</i> Lam.	- Cnicine (13)	Milkova et al., 1993
<i>C. diffusa</i> Lam. var. <i>brevispina</i> Boiss.= <i>C. bovina</i> Velen.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. exarata</i> Boiss. ex Cosson.	- Cynaropicrine (45) - Cnicine (13)	Nowak et al., 1986a Nowak et al., 1984
<i>C. grisebachii</i> (Nyman) Form ssp. <i>grisebachii</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. grisebachii</i> (Nyman) Form ssp. <i>confusa</i> (Halácsy) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. kartschiana</i> Kcop.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. leucophaea</i> Jordan ssp. <i>leucophaea</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. maculosa</i> Lam.	- Cnicine (13)	Kelsey et Locken, 1987
<i>C. mantoudii</i> Georg.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. nigra</i> L.	- 11 β ,13-déhydromélitensine (22) -Centaurepensine (=Chlorohyssopifoline A) (37)	González et al., 1974
<i>C. orphanidea</i> Heldr.	- Saliniténolide (09) - Cnicine (13) - 4'-acétoxycnicin (15) - 8 α -(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-déhydromélitensine (101) - Malacitanolide (111) - 4'-acétoxymalacitanolide (112) - 8 α -O-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide (110) - 8 α -O-(3-hydroxy-4-acétoxy-2méthylènebutanoloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide (114)	Gousiadou et Skaltsa, 2003
<i>C. orphanidea</i> Heldr. Sart. ex Boiss. ssp. <i>orphanidea</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984

<i>C. paniculata</i> L.	- Saliniténolide (09)	Geppert et al., 1983
<i>C. paui</i> Loscos ex Willk.	- 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyl) - 15-oxo-5,7 α H,6,11 β H -éléma-1,3,11(13)-trien-6,12-olide (106) - (3'R)-15-acétoxy-8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoloxy)-6 β H,7 α H-gérmacra-1E,4Z,11(13)-trien-6,12-olide (121) - (3'R)-15- acétoxy -8 α -O-(4- acétoxy -3-hydroxy -2- méthylènebutanoloxy- 6 β H,7 α H - gérmacra -1E,4Z,11(13)- trien -6,12- olide (122) - Cnicine (13) - 4'-acétoxcnicin (15) - Saliniténolide (09) - Stoebénolide (108) - 11 β ,13-déhydromélitensine (22) - 11 β ,13-dihydrosaliniténolide (84) - 8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)-saliniténolide (97) - 8 α -hydroxy-15-oxo-5,7 α H,6,11 β H-éléma-1,3-dien-6,12-olide (104) - 8 α -hydroxy-15-oxo-5,7 α H,6,11 β H -éléma-1,3,11(13)-trien-6,12-olide (105) - Méthyl 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy) -6 α , 15-di-hydroxyéléma-1,3,11(13)-trien-12-oate (103) - 15-acétoxy-1 β ,10 α -époxy-8 α -hydroxy-7 α H,6 β H-gérmacra-4E,11(13)-dien-12,6-olide (120) - 15-acétoxy-8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl-oxy)-1 β -hydroxy-7 α H,6 β H-gérmacra-4E,10(14), 11(13)-trien-12,6-olide (123) - 15-acétoxy-8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl-oxy)-1 β -hydro-péroxy-7 α H,6 β H-gérmacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide (124) -15-acétoxy-1 β ,8 α -dihydroxy-7 α H,6 β H-gérmacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide (118) - 15-acétoxy-1 β -hydropéroxy-8 α -hydroxy-7 α H,6 β H-gérmacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide (119)	Cardona et al., 1994 Cardona et al., 1997
<i>C. pallidior</i> Halácsy ssp. <i>pallidior</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. pelia</i> DC.	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. rhenana</i> Boreau ssp. <i>savranica</i> (Klokow) Dostál	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. spinosa</i> L.	- Cnicine (13) - 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-sonchucarpolide (4- <i>epi</i> -malacitanolide) (115) - 8 α -O-(4-acétoxy-2-hydroxyméthyl-buten-2-	Saroglou et al., 2005

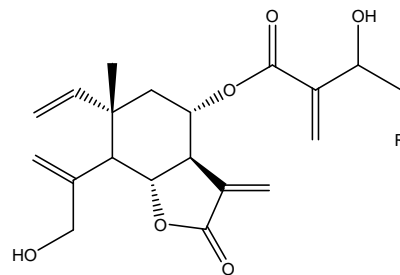
	oyloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide (113) - Malacitanolide (111) - 4'-acétoxymalacitanolide (112) - 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène- butanoyloxy)-déhydromélitensine (101) - 8 α O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène- butanoyloxy)- 15-oxo-5,7 α H,6 β H-éléman- 1,3,11(13)-trien-6,12-olide (107) - 8 α -O-(4-acétoxy-2-hydroxyméthylbuten-2- oyloxy)-saloniténolide (99) - 4'-acétoxycnicin (15) - 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène- butanoyloxy)-6 α ,15-dihydroxyéléma- 1,3,11(13)-trien-12-oate (117)	
<i>C. spinosa</i> L. ssp. <i>spinosa</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. thessala</i> Hausskn. ssp. <i>drakiensis</i> (Freyn & Sint.) Georg.	- Cnicine (13) - 4'-acétoxycnicin (15) - 8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)- saloniténolide (98) -8 α -(3,4-dihydroxy -2- méthylène -butanoyl) déhydromélitensine (101) -8 α -(3- hydroxy -4-acétoxy-2- méthylène - butanoyl) déhydromélitensine (100) -8 α -O-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide (110)	Skaltsa et al., 1999 Skaltsa et al., 2000a
<i>C. transiens</i> Halácsy	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. tymphaea</i> Hausskn. ssp. <i>tymphaea</i>	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. tymphaea</i> Hausskn. ssp. <i>brevispina</i> Hausskn (Dostál)	- Cnicine (13)	Nowak et al., 1984
<i>C. vallesiaca</i> (DC.) Jordan	- Cnicine (13)	Geppert et al., 1983
<i>C. zuccariniana</i> DC.	- 4'-acétoxycnicin (15) -8 α -(3,4-dihydroxy -2- méthylène -butanoyl) déhydromélitensine (101) -8 α -O-hydroxy-4-sonchocarpolide (109) - Cnicine (13)	Koukoulitsa et al., 2002 Nowak et al., 1984



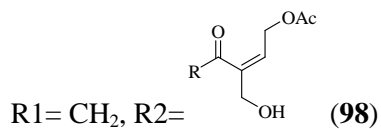
R1= CH₃, R2= OH(97)



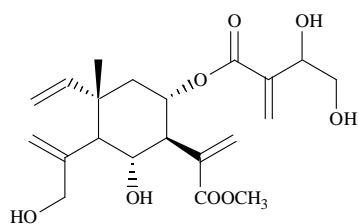
(99)



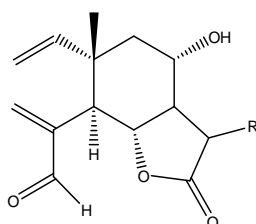
R= OAc (100)
R= OH (101)



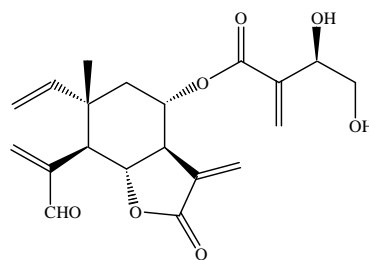
R1= CH₂, R2= (98)



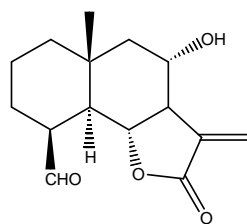
(103)



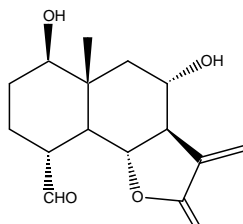
R= CH₃(104)
R= CH₂ (105)



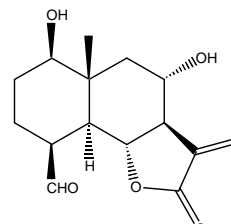
(106)



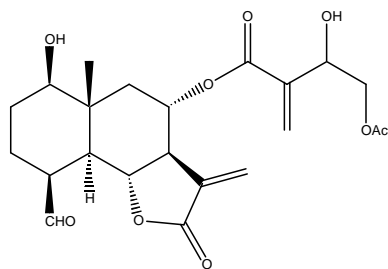
(108)



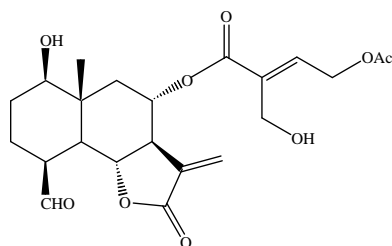
(109)



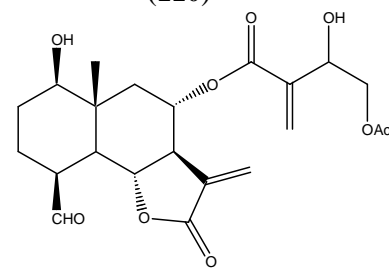
(110)



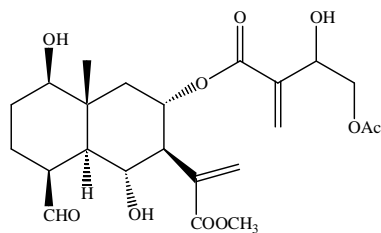
(112)



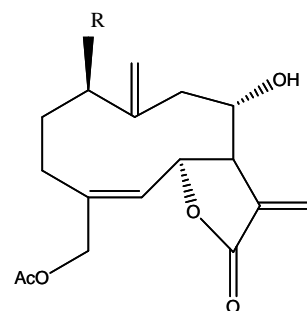
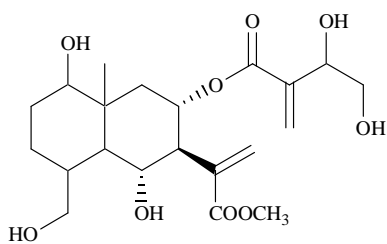
(113)



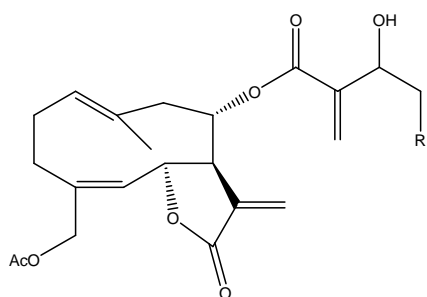
(114)



(116)

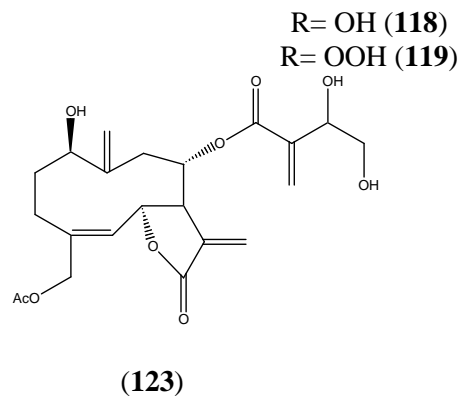


(117)



R= OH (121)

R= OAc (122)



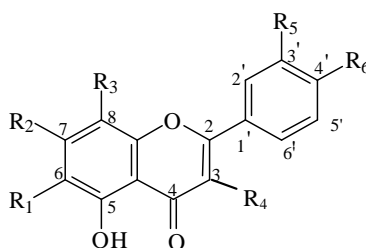
(123)

4.2. Flavonoïdes

Plusieurs travaux ont été effectués sur plusieurs espèces appartenant à la section *Acrolophus* (Cass.) DC. afin d'isoler les flavonoïdes; l'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le **Tableau 7** et la **Figure 7**.

Tableau 7 : Flavonoïdes des espèces appartenant à la section *Acrolophus* (Cass.) DC.

Espèces	Flavonoïdes	Références
<i>C. affinis</i> Friv.	- Apigénine (66) - Eupatorine (131) - Salvigénine (138)	Janačkovic et al., 2004
<i>C. cineraria</i> L. ssp. <i>umbrosa</i> (Lacaita) Pign.	- Salvigénine (138) - 5-hydroxy-6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone (142) - Eupatiline (130) - Jacéosidine (71) - 5,7,4'-trihydroxy- 8-méthoxy-flavone (149)	Bruno et al., 1988 El-Emary, 1983
<i>C. cuneifolia</i> Sibth. SM.	- 4',7-diméthylscutellareïne (140) - Acacétine (125) - Eupatiline (130) - Eupatorine (131) - Jacéosidine (71) - Salvigénine (138) - Acacétine (125) - Eupatiline (130) - Jacéosidine (71) - Kaempférol (133) - Salvigénine (138) - 5-hydroxy-6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone (142) - 5-hydroxy-3',4',7,8-tétraméthoxyflavone (143) - 5,7,4'-trihydroxy-3-méthoxyflavone (150)	Öksüz et al., 1988 Aslan et Öksüz, 1999
<i>C. orphanidea</i> Heldr. Sart. ex Boiss. ssp. <i>orphanidea</i>	- Apigénine (66) - Circimaritine (127) - Lutéoline (135) - 3-méthoxy-kaempférol (144)	Gousiadou et Skaltsa, 2003
<i>C. spinosa</i> L.	- Cirsimaritine (127) - Désmethoxycentauridine (128) - Désmethoxysudachitine (129) - Népétine (72) - Rétusine (137) - Salvigénine (138) - 5,6,4'- trihydroxy-7, 3'-diméthoxyflavone (148) - 5,6,8,3'-tétrahydroxy-7, 4'-diméthoxyflavone (147) - 5,6,8,3',4'-pentahydroxy-7-méthoxyflavone (146)	Saroglou et al., 2005
<i>C. thessala</i> Hausskn. ssp. <i>drakiensis</i> (Freyn & Sint.) Georg.	- Cirsilinéol (78) - Eupatorine (131) - Hispiduline (68) - Jacéosidine (71) - 5-hydroxy-6,7, 3',4'-tétraméthoxyflavone (142)	Gorgiadou, 1999
<i>C. zuccariniana</i> DC.	- Apigénine (66) - Cirsimaritine (127) - Gekwanine (132) - Hispiduline (68) - Apigénine-7-O-β-D-glucoside (126) - 6-hydroxy- apigénine-7-O-β- D- glucoside (139) - Quercétine (75) - Kaempférol -3-O-β-D-glucoside (134) - Lutéoline-7-O-β- D-glucoside (136) - 6-méthoxy-kaempférol -3-O-β-D- glucoside (145)	Koukoulitsa, 2006



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Acacetine (125)	H	OH	H	H	H	OCH ₃
Apigénine-7- <i>O</i> -β-D-glucoside (126)	H	O-Glu	H	H	H	OH
Cirsimaritine (127)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OH
Désmethoxycentaauridine (128)	OCH ₃	OH	H	H	OH	OCH ₃
Désmethoxysudachitine (129)	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	OH
Eupatiline (130)	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	OH
Eupatorine (131)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃
Gekwanine (132)	H	OCH ₃	H	H	H	OH
Kaempférol (133)	H	OH	H	OH	H	OH
Kaempférol -3- <i>O</i> -β-D-glucoside (134)	H	OH	H	O-Glu	H	OH
Lutéoline (135)	H	OH	H	H	OH	OH
Lutéoline-7- <i>O</i> -β-D- glucoside (136)	H	O-Glu	H	H	OH	OH
Rétusine (137)	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Salvigenine (138)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
6-méthoxy-apigénine-7- <i>O</i> -β-D- glucoside (139)	OCH ₃	O-Glu	H	H	H	OH
4', 7-diméthylscutellareine (140)	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
6-hydroxy- apigénine-7- <i>O</i> -β-D-glucoside (141)	OH	O-Glu	H	H	H	OH
5-hydroxy-6,7, 3',4'- tétraméthoxyflavone (142)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃
5-hydroxy-3',4',7, 8-tétraméthoxyflavone (143)	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
3-méthoxy-kaempférol (144)	H	OH	H	OCH ₃	H	OH
6-méthoxy-kaempférol -3- <i>O</i> -β-D-glucoside (145)	OCH ₃	OH	H	O-Glu	H	OH
5,6,8,3',4' pentahydroxy-7-méthoxyflavone (146)	OH	OCH ₃	OH	H	OH	OH
5, 6, 8, 3'-tetrahydroxy 7, 4'-diméthoxyflavone (147)	OH	OCH ₃	OH	H	OH	OCH ₃
5, 6, 4'-trihydroxy-7, 3'-diméthoxyflavone (148)	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
5, 7, 4'-trihydroxy-8-méthoxyflavone (149)	H	OH	OCH ₃	H	H	OH
5,7, 4'-trihydroxy-3-méthoxyflavone (150)	H	OH	H	OCH ₃	H	OH

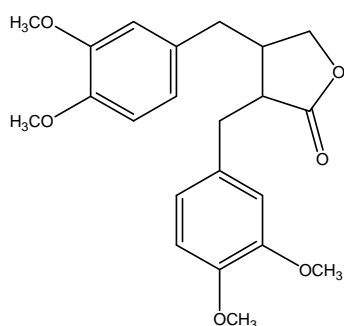
Figure 7: Flavonoïdes chez la section Acrolophus (Cass.) DC.

4.3. Lignanes

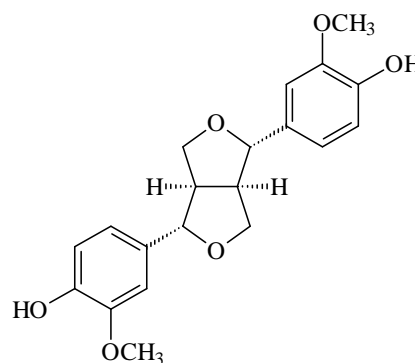
Dans la littérature peu de travaux ont montré la présence de lignanes chez les espèces appartenant à cette section (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Lignanes des espèces appartenant à la section Acrolophus (Cass.) DC.

Espèces	Lignanes	Références
<i>C. affinis</i> Friv.	- Matairésinol (92) - Arctigénine (88)	Janačkovic et al., 2004
<i>C. cuneifolia</i> Sibth. SM.	- Arctigénine (88)	Aslan et Öksüz, 1999
<i>C. orphanidea</i> Heldr.	- Diméthyl-matairésinol (151) - Pinorésinol (152)	Gousiadou et Skaltsa, 2003
<i>C. paui</i> Loscos ex Willk.	- Arctigénine (88) - Pinorésinol (152)	Cardona et al., 1997
<i>C. zuccariniana</i> DC.	-Arctiin (89)	Koukoulitsa, 2006



(151)



(152)

4.4. Huiles essentielles

La composition des huiles essentielles a été mise en évidence dans certaines espèces appartenant à la section *Acrolophus*. Selon les résultats obtenus par Lazari et ses collaborateurs (2000), les composés majoritaires chez *C. pelia*, *C. thessala* ssp. *drakiensis* et *C. zuccariniana* sont l'acide hédécanoïque (15.4%) (**95**), l'hexacosane (22.6%) (**153**) et (-)-oxyde de caryophyllène (6.2%) (**96**) respectivement (**Tableau 9**).



(153)

Tableau 9: Composition de l'huile essentielle de *C. pelia*, *C. thessala* ssp. *drakiensis* et *C. zuccariniana* (Lazari et al., 2000).

Composés	Ir	<i>C. pelia</i>	<i>C. thessala</i> ssp. <i>drakiensis</i>	<i>C. zuccariniana</i>
hexanal	800	0.9	-	-
(<i>E</i>)-2-hexenal	854	0.7	-	-
hexanol	867	0.2	-	-

heptanal	899	0.1	-	-
α -pinène	939	tr	-	-
sabinène	976	-	-	-
β -pinène	980	-	-	-
6-méthyl-5-hepten-2-one	984	0.6	-	-
myrcène	991	-	-	-
octanal	1002	0.3	-	-
(<i>E, E</i>)-2, 4-heptadiénal	1009	0.2	-	-
δ -3-carène	1011	tr	-	-
<i>p</i> -cymène	1026	tr	-	-
limonène	1028	0.1	0.2	tr
1,8-cinéol	1033	-	-	-
(<i>E</i>)-2-octenal	1056	0.2	-	-
γ -terpinène	1062	tr	-	tr
linalool	1098	0.4	-	-
nonanal	1103	1.9	0.3	0.2
(<i>E</i>)-2-nonéanal	1157	0.4	-	-
benzoate d'éthyle	1168	0.1	-	-
1-nonanol	1171	-	0.2	0.2
terpinen-4-ol	1174	tr	tr	tr
salicylate de méthyle	1191	0.3	-	-
dodécane	1200	0.2	-	-
décanal	1204	2.7	0.6	1.4
β -cyclocitral	1217	0.3	-	-
(<i>E</i>)-2-décenal	1259	0.4	0.1	0.2
acide nonanoïque	1275	-	-	0.6
dihydroédulan II	1284	3.6	0.7	0.3
dihydroédulan I	1289	0.8	0.2	0.2
(<i>E, Z</i>)-2, 4-décadiénal	1290	0.3	-	0.1
carvacrol	1292	-	0.7	-
undécanal	1305	0.4	0.2	0.3
(<i>E, E</i>)-2, 4-decadiénal	1313	0.9	0.3	0.5
octadecanal	1361	-	0.1	0.3
cyclosativène	1362	1.2	-	0.2
acide décanoïque	1369	0.2	-	-
α -copaène	1371	-	-	1.8
(<i>Z</i>)- β -damascenone	1380	0.8	0.8	1.1
β -cubebène	1385	-	-	0.4
β -élémine	1387	1.7	0.4	0.1
tétradecane	1400	0.2	0.3	0.2
eugenol	1401	-	-	0.3
dodécanal	1404	0.5	0.2	0.7
α -cedrène	1409	1.0	-	-
<i>cis</i> -caryophyllène	1411	-	0.3	-
<i>trans</i> -caryophyllène	1415	-	0.7	0.9
géranyl acétone	1451	1.3	0.9	1.2
(<i>E</i>)- β -farnésène	1453	-	-	0.2
α -humulène	1454	-	-	-
acide undécanoïque	1465	-	-	0.2
<i>n</i> -dodécanol	1472	-	-	0.4
épi-bicyclosesquiphellandrène	1477	0.2	-	1.1
(-)- <i>ar</i> -curcumène	1478	0.3	-	-
germacrène D	1480	-	-	-
(<i>E</i>)- β -ionone	1482	2.6	-	1.6
β -sélinène	1485	0.2	-	0.3
α -sélinène	1492	-	0.3	-
1-pentadécène	1494	-	-	0.5
α -muurolène	1498	0.3	-	-

tridécane	1504	1.3	0.9	-
γ -cadinène	1509	-	-	0.3
δ -cadinène	1518	0.1	0.7	0.5
dodécanoate de méthyle	1527	-	-	0.2
isopentyl salicylate	1534	0.2	-	-
8,14-cedranoxide	1546	0.5	0.8	-
nérolidol	1560	-	1.3	-
calacorène	1562	-	-	2.0
acide dodécanoïque	1568	7.9	1.0	3.3
(Z)-3-hexenyl benzoate	1570	-	0.1	-
(-)-spathuléol	1572	2.1	3.8	4.2
(-)-oxyde de caryophyllène	1577	4.3	7.8	6.2
(E)-2-hexenyl benzoate	1583	-	-	1.3
viridiforol	1587	-	1.4	1.9
humulène epoxide II	1605	-	-	2.8
tétradécane	1611	1.0	-	1.7
hin α sol	1632	0.5	-	0.2
gossonorol	1640	0.3	-	0.6
<i>épi</i> - α -muurolool	1641	0.4	0.3	1.4
β -eudesmol	1648	0.9	-	-
9-aristolen- α -ol	1651	0.4	0.4	-
α -cadinol	1654	-	-	2.2
acide tridecanoïque	1662	0.4	0.4	1.0
tétradécaneol	1672	-	1.2	-
cadalène	1674	0.4	-	0.5
acorenone	1687	-	-	1.9
pentadécane	1714	1.1	0.4	1.7
(E, Z)-farnésol	1743	0.2	-	-
acide tétradécanoïque	1769	4.2	2.1	4.1
guaiazulène	1772	0.2	-	-
hexadécane	1817	0.2	0.2	0.4
myristate d'isopropyl	1824	-	0.4	0.3
2-pentadécaneone, 6,10,14-triméthyl	1846	2.0	1.4	3.5
acide pentadécanoïque	1865	0.6	0.3	0.6
(E, E)-farnésyl acétone	1919	0.6	0.5	0.7
<i>épi</i> -13-manool	1960	-	0.2	-
acide hexadécanoïque	1972	15.4	7.4	6.5
oxyde de manoyl	1991	0.1	0.3	-
octadécane	1800	-	-	0.3
nonadécane	1900	-	-	0.1
eicosane	2000	0.2	-	0.1
docosane	2200	0.3	5.5	0.2
tricosane	2300	-	0.3	2.3
tétracosane	2400	0.4	0.3	0.7
pentacosane	2500	1.6	-	2.3
hexacosane	2600	0.3	22.6	0.4
héptacosane	2700	5.7	1.5	4.0
octacosane	2800	0.5	1.1	0.4
nonacosane	2900	2.7	0.8	1.9
triacontane	3000	0.3	5.3	0.2
hentriacontane	3100	0.3	-	0.2
octadécaneol	2081	0.2	0.1	-
1-nonadécaneol	2156	-	0.1	-
1-tétracosaneol	2456	-	1.8	-
1-héxacosaneol	2852	-	1.3	-
<i>épi</i> -13-oxyde de manoyl	2013	-	0.2	-
abietatriène	2056	0.2	0.2	0.2

manool	2057	0.1	-	-
déhydro-abietal	2263	tr	tr	-
<i>trans</i> -phytol	2122	0.9	1.8	0.3
10-déméthylsqualène	2830	0.3	-	0.5
acétate d'hexadécyle	2009	0.3	-	-
méthyle octadécanoate	2130	0.7	-	0.2
éthyl ester de 9,12,15-octadécatriénoïque acide	2139	2.2	1.4	0.3

tr: traces

II. MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel végétal

II. 1. a. *Centaurea pullata* L.

La récolte de *Centaurea pullata* L. a été réalisée aléatoirement dans son habitat naturel au niveau du parc national de Chréa (Blida) dans la région appelée Beni Ali à 850 m d'altitude en avril 2006.

Situé à 50 Km au Sud-Ouest d'Alger, avec 1550 m d'altitude ; le parc national de Chréa s'étend sur 26587 ha le long des parties centrales de la chaîne de l'atlas tellien, entre les latitudes Nord 36° 25' 33 39", et les longitudes Est 2° 52' 36 77" (Halimi, 1980 ; Google earth, 2007).

Limité au Nord par la plaine de la Mitidja, le Djebel Chénoua, au Sud par Médéa et les hautes plaines du Titteri, à l'Ouest par le relief montagneux de Chiffa et à l'Est par les hauteurs de la chaîne Kabyle (**Figure 8a**).

Le climat méditerranéen typique du Nord algérien, est caractéristique de la montagne de Chréa. Halimi (1980), attribue la région de Beni Ali à l'étage méditerranéen inférieur (compris entre 250 et 1000 m) qui est constitué de forêts à dominance d'olivier, de pistachier lentisque, et de pin d'Alep.

L'identification de l'espèce *Centaurea pullata* a été réalisée par Mr Abd El Kader BELOUED Technicien Supérieur à l'INA (Alger), un échantillon a été gardé au niveau du laboratoire de Physiologie Végétale et Environnement, Université d'Annaba sous le code : Ann-BV 2006/0010.

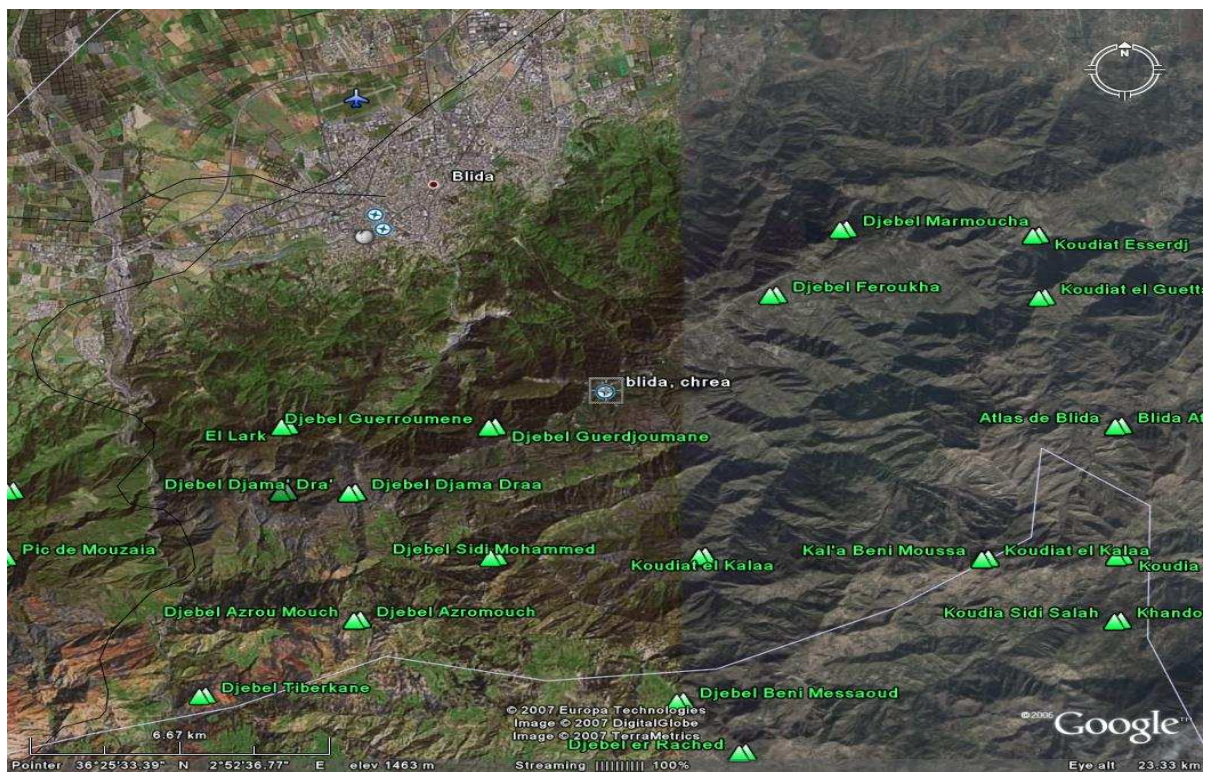
II.1.b. *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii*

La récolte de *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* a été réalisée aléatoirement au niveau du mont Olympus (Olympe) situé à 400 Km d'Athènes à 650 m d'altitude, en juillet 2006.

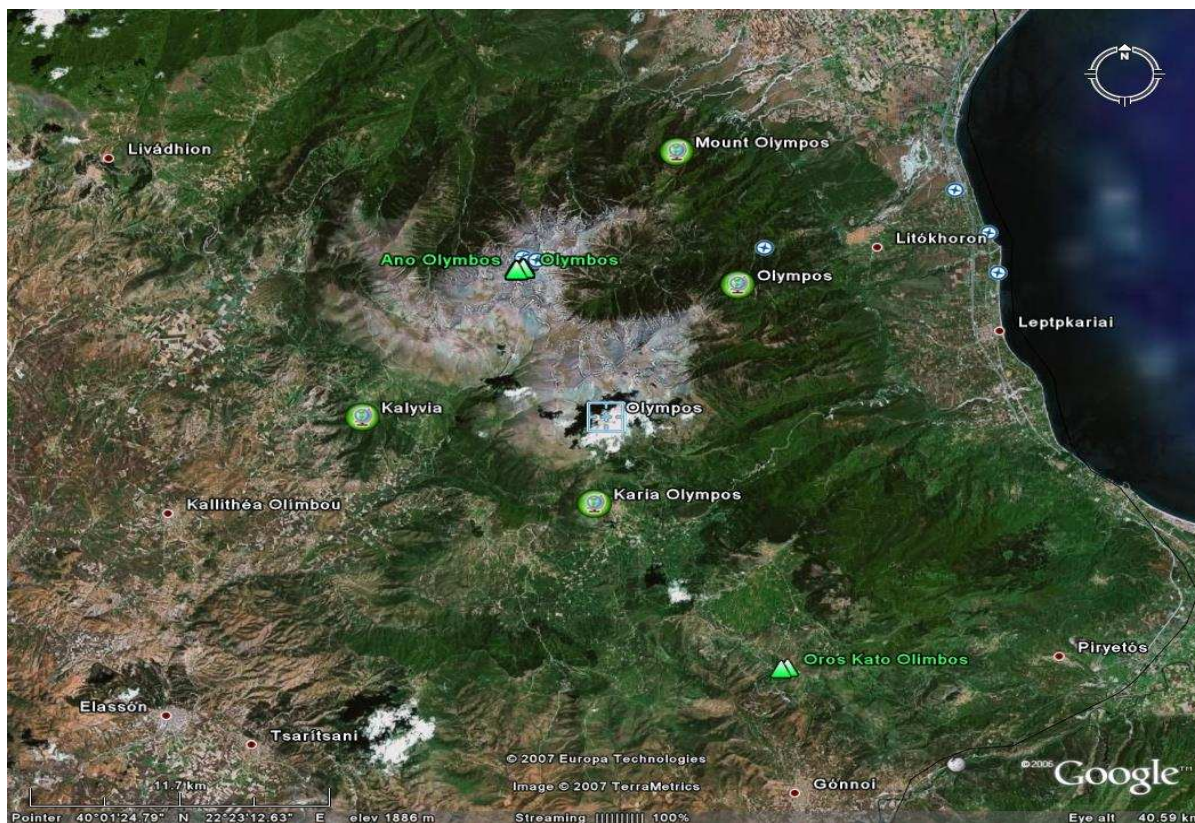
Le mont Olympe (2917 m) s'étend au nord de la Grèce, près de la côte égéenne près de la Thessalie et de la Macédoine entre les latitudes Nord 40° 01' 24 79", et les longitudes Est 22° 23' 12 63" (Google earth, 2007). L'Olympe est une montagne bordée de larges ravins. Densément boisé dans sa partie inférieure, son vaste sommet rocheux est recouvert de neige la majeure partie de l'année (**Figure 8b**).

Le climat méditerranéen est caractéristique de la Grèce. L'été est chaud dans certaines régions les températures peuvent atteindre les 45 °C. Le vent (*meltémi*), peut souffler très fort durant cette période. Les précipitations maximales se situent en décembre, janvier et février, il pleut beaucoup plus sur le versant ouest du pays.

L'identification de l'espèce *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii* a été réalisée par Prof. Assistant Dr. Théophanis CONSTANTINIDIS, Département de Systématique Botanique, Université d'Agronomie (Athènes); un échantillon a été gardé au sous le code: Skaltsa et Argyropoulou 01



a) Le parc national de Chréa (Google earth, 2007).



b) Le mont Olympe (Google earth, 2007).

Figure 8 : Situations géographiques.

II. 2. Méthodes

Notre étude s'est déroulée pendant trois ans au niveau du laboratoire de Chimie du département de Biologie à l'Université de Blida (Algérie) et durant un an et demi au niveau du laboratoire de Pharmacognosie et de chimie des produits naturels à l'Université d'Athènes (Grèce).

II.2.1. Extraction des substances

Dans un premier temps, les espèces récoltées ont été séchées à l'abri de la lumière et du soleil. Le séchage a duré deux semaines pour les deux espèces. Ensuite le matériel végétal a été broyé ainsi, les drogues pulvérisées présentent une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, ce qui permettra d'améliorer le rendement d'extraction (**Annexe 01**).

II.2.1.1. Sesquiterpènes lactones

Pour l'extraction des sesquiterpène lactones nous avons employé la méthode un peu modifiée de Bohlmann et *al.* (1984) (**Figure 9**).

La première étape a été la macération des drogues pendant 24 h avec trois solvants de polarité différentes: cyclohexane-MeOH-Et₂O (1:1:1). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de la matière utilisée (2.5 l du mélange de solvants pour 1Kg de drogue pulvérisée). L'extraction a été effectuée à température ambiante.

La deuxième étape est la séparation : l'extrait récupéré a été filtré et concentré sous pression réduite au rotavapeur, puis dilué dans 1.5 L du même mélange de solvant additionné de 1.5 l de solution NaCl saturée. Deux phases ont été obtenues, la phase aqueuse a été gardée et soumise à son tour à une extraction répétée (3 fois) avec EtOAc. Lors de cette extraction la phase organique (peu polaire), qui contient les sesquiterpènes lactones.

Nous avons obtenus 12.7 g d'extrait brut de *Centaurea pullata* et 3.8 g de *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. Ces deux extraits ont fait l'objet des fractionnements et des analyses ultérieures.

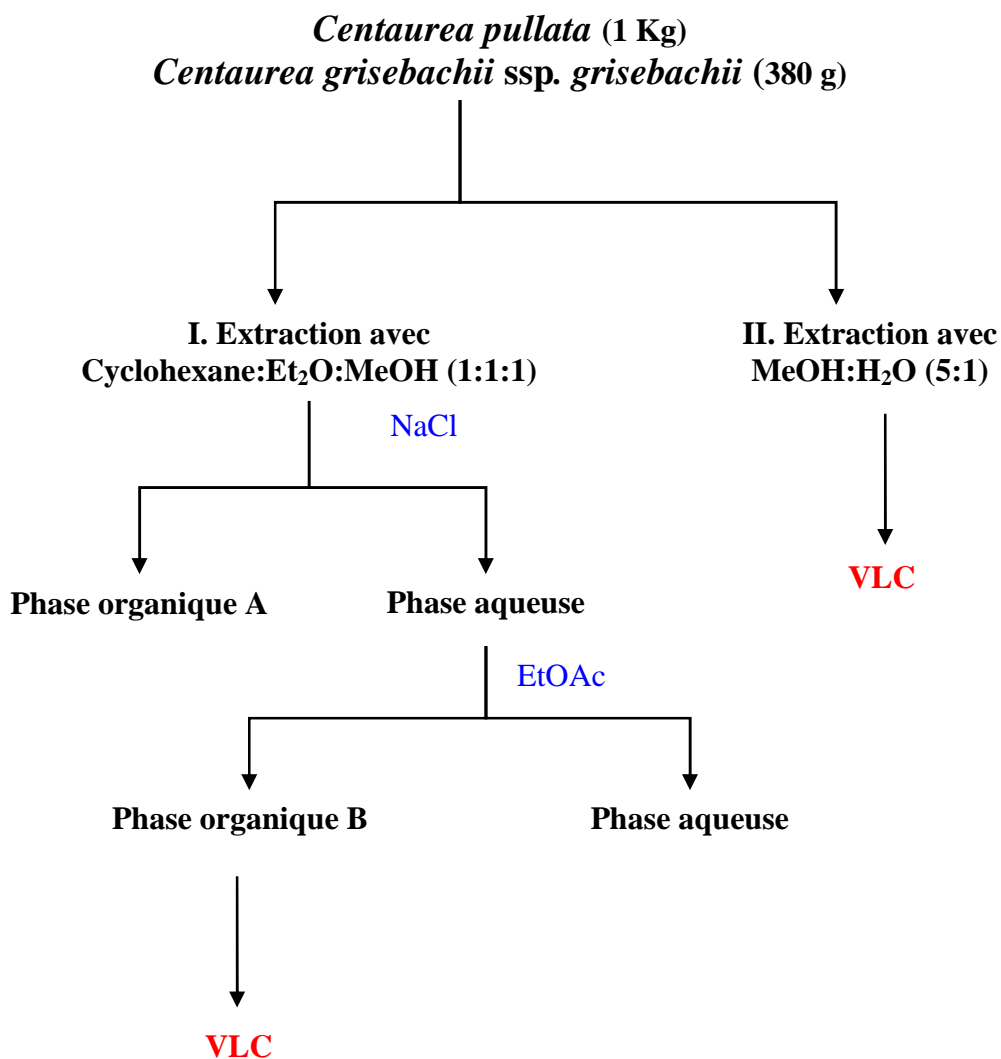


Figure 9 : Processus d'extraction

II.2.1.2. Flavonoïdes

Les drogues récupérées après l'extraction des sesquiterpènes lactones, ont été extraites dans 1l du mélange MeOH-H₂O (5:1); cette extraction a été répétée 3 fois. Après filtration et concentration, nous avons récupéré 130 g d'extrait brut pour *C.pullata* et 30 g pour *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* ces deux extraits ont fait l'objet de fractionnements et d'analyses ultérieures.

II.2.1.3. Huile essentielle

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation selon les recommandations de la Pharmacopée Hellénique (2002).

100 g de matières végétales sèches coupées en petits morceaux, ont été mises dans 500 ml d'eau bouillante pendant 1 h 30, en utilisant un appareil de type Clevenger.

Les huiles essentielles ont été récupérées avec du *n*-pentane (CG-grade) et passées par du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), pour l'élimination de l'humidité, puis stockées à -20°C.

Le rendement a été défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle et la masse de la matière végétale utilisée (Benyoussef et *al.*, 2005).

II.3. Méthodes chromatographiques analytiques

II.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM, TLC en anglais) a été effectuée en phase normale, dans la plupart des cas, avec un des supports suivants :

- Plaque de gel de silice sur feuille d'aluminium (Merck, Art. 5554) avec indice de fluorescence, dont les dimensions sont: 20 x 20 cm, épaisseur de la couche 0.1 mm.
- Plaque de cellulose sur feuille d'aluminium (Merck, Art. 5552) sans indice de fluorescence, dont les dimensions sont : 20 x 20 cm, épaisseur de la couche 0.1mm.

Ces plaques constituent la phase stationnaire, elles ont été ensuite plongées dans des cuves conventionnelles en verre (Camag), remplies à environ 0.5 cm avec une phase mobile, qui est généralement un mélange binaire de solvants, selon le type de séparation recherchée.

Pour l'identification des flavonoïdes, nous avons réalisé des CCM avec deux différents systèmes d'élutions :

*** Solvant de Partridge**

C'est un système peu polaire où les aglycones de flavonoïdes migrent beaucoup en comparaison avec les glucosides qui possèdent des $R_f \leq 0.5$. Il a été préparé en mélangeant *n*-BuOH-acide acétique-eau (4 :1 :5) phase supérieure (Stahl, 1969).

* AcOH-15

Ce système a été préparé en mélangeant 85 ml d'acide acétique glacial avec 15 ml d'eau (Mabry *et al.*, 1970). Les aglycones de flavonoïdes migrent très peu dans ce système.

Après son développement dans un des différents systèmes, la plaque CCM a été observée sous UV à 254 et à 366 nm; ensuite révélée par un réactif de détection en solution selon les substances recherchées, afin de mettre en évidence les constituants présents dans l'extrait. Ainsi, les réactifs utilisés dans le présent travail ont été les suivants:

* Réactif d'anisaldéhyde

Le réactif d'anisaldéhyde a été préparé en mélangeant 0.5 ml de *p*-anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde), 1 ml d'acide sulfurique et 50 ml d'acide acétique glacial. Les CCM ont été traitées dans ce réactif, puis chauffées à 105 °C; l'apparition de taches violettes, visibles à l'oeil nu, indique la présence de sesquiterpènes lactones (Stahl, 1969).

* Réactif de Neu ou Naturstoffreagenz A

Vaporiser une solution méthanolique de l'acide diphénylborique β -aminoéthylester 1% (Neu, 1957) sur les plaques de CCM. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes; selon la couleur obtenue nous avons identifié le type de flavonoïde (Stahl, 1969) :

- Les dérivés d'apigénine présentent une couleur fluorescente sous l'UV jaune verdâtre et après 24h, leurs couleurs à la lumière visible virent au rouge-brun.
- Les dérivés de lutéoline présentent une couleur fluorescente sous l'UV jaune.
- Les dérivés de kaempférol présentent une couleur fluorescente sous l'UV jaune-verdâtre plus intense que celle des dérivés d'apigénine.
- Les dérivés de quercétol présentent une couleur fluorescente sous l'UV orange intense.

II.3.2 Chromatographie en phase gazeuse (CG)

L'analyse par CG a été réalisée en utilisant un appareil de type Perkin Elmer 8500 muni d'un FID, d'une colonne apolaire capillaire à gel de silice fondu DB-5 (30m x 0.25mm, épaisseur du film: 0.25 μ m). La température de la colonne a été réglée à partir de 60°C jusqu'à 250°C avec un flux de 3°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été programmés à 230°C et 280°C, respectivement. L'hélium était le gaz vecteur avec un débit de 1.0 ml/min, le volume de l'injection a été de 2 μ L.

II.3.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectre de masse (CG-SM)

L'analyse par CG-SM a été réalisée par un appareil de type Hewlett-Packard 5973-6890 avec un mode EI (70 eV) équipé par un injecteur split/splitless (220 °C), avec un ratio 1/10, muni de deux colonnes capillaires: une apolaire à gel de silice fondu HP-5 MS (30 m x 0.25 mm, épaisseur du film: 0.25 µm); l'autre polaire HP-Innowax (30 m x 0.25 mm, épaisseur du film: 0.50 µm).

La programmation de la température de la colonne HP-5 MS a été réglée à partir de 60 °C pendant 5 min jusqu'à 280 °C avec un débit de 4 °C/min; pour la colonne HP-Innowax de 60 °C à 260 °C avec un débit de 3 °C/min. L'hélium était le gaz vecteur avec un débit de 1.0 ml/min; le volume de l'injection a été de 2 µL.

Les indices de rétentions de tous les composés des huiles essentielles ont été déterminés en utilisant une série d'alcane (C_9 - C_{24}) et calculés selon l'équation proposée par Van den Dool et Kratz (1963), puis comparés avec ceux d'Adams (2001) et Davies (1990).

L'identification des composés des huiles essentielles a été basée sur la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la base donnée Wiley Library et ceux de Massada (1976).

II.4 Méthodes chromatographiques préparatives

II.4.1. Chromatographie liquide basse pression (vacuum liquid chromatography, VLC)

Citée la première fois par Coll et *al.* (1977), la chromatographie liquide basse pression est un mode chromatographique simple rapide et efficace; elle a été utilisée pour la séparation de produits naturels.

Le premier fractionnement des extraits bruts a été effectué dans un entonnoir au fond duquel se trouve un filtre en verre fritté de porosité 4, où nous avons déposé la phase stationnaire, gel de silice 60H pour chromatographie sur couche mince, dimension des granules 70-230 mesh (Merck, Art. 7736), puis tassée par application du vide vu la petite dimension des granules. Ensuite nous avons introduit les échantillons délicatement à la surface sous forme de mélanges secs avec la phase stationnaire (2.5 à 3 fois leur poids).

La polarité de la phase mobile utilisée a été généralement croissante, néanmoins le choix de cette dernière a été déterminé au préalable avec une CCM (Coll et Bowden, 1986; Targett et *al.*, 1979).

II.4.2. Chromatographie sur colonne (CC)

Les fractionnements des extraits étudiés ont été réalisés par chromatographie sur colonne ouverte en utilisant différentes phases stationnaires, qui ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à séparer:

- Gel de silice 60, ASTM (SDS 9385), dimension des granules 40-63 μm (230-400 mesh)
- Séphadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals), dimension des granules: 25-100 μm . Il doit être laissé pendant 24 h avec le solvant d'éluion (méthanol) pour se gonfler.

Les dimensions de chaque colonne (hauteur et diamètre) ont été choisies en fonction de la quantité de l'extrait à disposition. Les systèmes d'éluion utilisés ont été composés de différents gradients avec des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation. Les échantillons ont été introduits sous forme solide en les mélangeant avec de 2.5 à 3 fois leur poids avec une quantité de la phase stationnaire.

II.4.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Un système HPLC Jasco analytique/semi-préparatif équipé d'une pompe Jasco PU-980 et d'un détecteur RI-930 Jasco (refractive index) a été utilisé.

La séparation a été réalisée sur une colonne Kromasil C18 semi-préparative (10 μm , 250 mm \times 10 mm). Nous avons utilisé un injecteur manuel de type Rhéodyne 7725i (Rohnhert Park), muni d'une boucle d'injection de 500 μl . Un système d'éluion MeOH : H₂O à des proportions variables selon l'échantillon, avec un débit de 1.7 ml/min a été utilisé. La concentration des échantillons était de 7 mg/ml. Les fractions ont été collectées manuellement.

Les solvants utilisés ont été de qualité HPLC filtrés (0,45 μm) et dégazés avec l'hélium.

II.5 Méthodes spectroscopiques

II.5.1 Spectre infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouges des composés ont été mesurés par un appareil de type Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer Paragon 500. Pour cela, une quantité de chaque échantillon a été diluée avec le MeOH et appliqué sur cristaux CaF₂. Le balayage des nombres d'onde a été fait entre 4000 et 625 cm^{-1} .

II.5.2 Spectre ultraviolet (UV-Vis)

Les spectres UV-Vis des composés isolés ont été mesurés en solution méthanolique à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis de type Shimadzu UV-160 A, selon les consignes de Mabry *et al.* (1970); Markham, (1981); Mears et Mabry, (1972).

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme: λ_{\max} (**log ϵ**), où λ_{\max} représente les longueurs d'onde des maxima en nm. ϵ est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde, la couche de solution traversée (***b***) est exprimée en centimètres et la concentration (***c***) en moles par litre dans la formule suivante (loi de Beer-Lambert):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Les réactifs de déplacement d'après Mabry *et al.* (1970) ont été utilisés pour la confirmation partielle de la structure des flavonoïdes par spectrophotométrie UV.

Les réactifs suivants ont été ajoutés :

* **NaOMe** (base forte)

Ajouter 3 gouttes d'une solution de NaOMe (2.5 g de sodium métallique dans 100 ml de MeOH) à la solution méthanolique du flavonoïde. Ce réactif déprotone tous les groupes hydroxyles phénoliques.

* **NaOAc** (base faible)

Ajouter une quantité de NaOAc anhydre à la solution méthanolique de flavonoïde jusqu'à la formation d'un précipité de 2 mm. Ce réactif ne déprotone que les groupes hydroxyles les plus acides (OH-4' et OH-7).

* **NaOAc + H₃BO₃**

Ajouter une quantité d'acide borique jusqu'à la formation d'un précipité de 1 mm à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée de NaOAc. Ce réactif entraîne la formation de complexes avec les groupes *ortho*-dihydroxyles.

* **AlCl₃**

Ajouter 6 gouttes d'une solution méthanolique d'AlCl₃ 5 % à la solution méthanolique du flavonoïde. Ce réactif entraîne la formation de complexes acido-résistants entre les

hydroxyles et les fonctions cétones voisines, et des complexes acido-labiles avec les groupes *ortho*-dihydroxyles.

* **AlCl₃/HCl**

Ajouter 3 gouttes d' HCl solution aqueuse (50% v/v) à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée d'AlCl₃. Ce réactif entraîne la formation de complexes hydroxy-cétoniques et la destruction des complexes acido-labiles.

II.5.3 Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ¹H, le carbone ¹³C, le phosphore ³¹P et l'azote ¹⁵N.

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (¹H, ¹³C) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin» (Laszlo et Stang, 1972)

La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate.

Les échantillons ont été dissous dans les solvants suivants : le chloroforme deutéré CDCl₃ (7.24 ppm pour ¹H-NMR et 77.0 ppm pour ¹³C-NMR) et le méthanol deutéré CD₃OD (3.31 ppm pour ¹H-NMR et 49.5 ppm pour ¹³C-NMR), le tube contenant l'échantillon a été soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'élucidation structurale.

Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), celles des constantes de couplages (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les spectres RMN ont été mesurés sur deux appareils, l'un est de type Bruker AC 200 (200.13 MHz pour ¹H-NMR et 50.3 MHz pour ¹³C-NMR) et l'autre est de type Bruker DRX

400 (399.95 MHz pour ^1H -NMR, contenant une sonde multi-nucléaire (5 mm). Les programmes de séquences impulsionnelles fournies par le même fabricant ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, HMBC, HSQC et NOESY. La caractérisation de la multiplicité des signaux ^{13}C -NMR (expériences DEPT) a été effectuée sous des angles θ de 90° (signaux CH positifs) et 135° (signaux CH et CH_3 positifs, CH_2 négatifs).

II.5.3.1. RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)

a) RMN proton (^1H) et RMN carbone (^{13}C)

Ces spectres sont des méthodes puissantes utilisées dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Ils fournissent de nombreuses informations. Le spectre RMN du proton fournit des informations telles que les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

Le spectre RMN du carbone permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone.

b) Expérience DEPT 135°

Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaires (CH). Les carbones quaternaires ne sont pas détectés avec le DEPT.

II.5.3.2. RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage.

a) Corrélations homonucléaires

➤ **COSY** (COrrélation SpectroscopY) (^1H - ^1H): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J entre les protons voisins.

➤ **NOESY** (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**) ($^1\text{H}-^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

b) Corrélations hétéronucléaires

➤ **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation) ($^2J_{\text{H-C}}$, $^3J_{\text{H-C}}$): cette technique permet la détection des couplages longue distance $^2J_{\text{H-C}}$, $^3J_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons voisins.

➤ **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) ($^1J_{\text{H-C}}$): cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

II.5.4. Spectre de masse (SM)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus en modes d'ionisation par impacte électronique (ESI). L'appareillage utilisé a été:

➤ Un spectromètre de masse à haute résolution du type PerSeptive Biosystems Voyager-DE time of flight (Université de Notre Dame, Département de Chimie et Biochimie, Notre Dame, Indiana, USA).

➤ Un spectromètre de masse à haute résolution du type Thermo LTQ Orbitrap (FT-MSⁿ) (Université de Florence, Italie).

➤ Un spectromètre de masse à basse résolution Hewlett Packard 6890 (70 eV).

II.5.5. Pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$

Le pouvoir rotatoire des composés présentant un ou plusieurs carbones asymétriques a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type Perkin-Elmer 341, avec une solution MeOH ou CH_2Cl_2 (g/100 ml).

La mesure a été réalisée dans une cuve de 10 cm de longueur, à température ambiante, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. La valeur de $[\alpha]_{\text{D}}$, exprimée en degré, a été calculée au moyen de la formule suivante:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times 1000}{l \times c}$$

Avec : α : angle de rotation en degrés lu sur le polarimètre.
 c : concentration de la solution mesurée en g/l.
 l : longueur de la cuve de mesure en dm.

Les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en g/100 ml.

II. 6. Méthodes biologiques

II.6.1. Activité antimicrobienne

Dans le but d'investiguer l'activité antimicrobienne des sesquiterpènes lactones isolées à des quantités suffisantes de *C. pullata*, ainsi que celles des huiles essentielles des deux plantes, la méthode de microdilution modifiée a été utilisée (Daouk et al., 1995; Hanel et Raether, 1988).

Les sesquiterpène lactones de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* ont été déjà étudiées pour leur activité antimicrobienne dans des travaux antérieurs (Karioti et al., 2002; Saroglou et al., 2005; Skaltsa et al., 2000a; id. 2000b).

Les flavonoïdes n'ont pas fait l'objet d'études antimicrobiennes car ils ne possèdent pas une activité importante (Konstantinopoulou et al., 2003; Panagouleas et al., 2003).

Les microorganismes utilisés ont été obtenus du Laboratoire de Mycologie, Département de Physiologie végétale, Institut des recherches biologiques "Siniša Stanković" à Belgrade, Serbie.

Les souches bactériennes suivantes ont été utilisées:

Bacillus subtilis (ATCC 10907), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) (Gram-positifs).

Pseudomonas tolaasii (isolé d'*Agaricus bisporus*), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) (Gram-négatifs).

Les champignons suivants ont été utilisés :

Alternaria alternata (DSM 2006), *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), *A. niger* (ATCC 6275), *A. ochraceus* (ATCC 12066), *Fusarium tricinctum* (CBS 514478), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112), *Trichoderma viride* (IAM 5061).

Les microorganismes testés ont été conservés dans le milieu d'agar de Müller-Hinton (MH agar) et stockées à +4° C, puis réensemencés une fois par mois (Booth, 1971). En suite, ils ont été lavés de la surface des boîtes en utilisant un mélange d'une solution saline stérile 0.85% et de Tween 80 0.1% (v/v) (Yamada et *al.*, 1993).

L'inoculum obtenu a été ajusté avec la même solution saline stérile jusqu'à une concentration approximative de 1.0×10^5 microorganisme/ml. Les inocula ont été réensemencés dans le milieu d'agar de Müller-Hinton pour vérifier leurs validités (absence des contaminations) (Hanson et Stevens, 1992).

Dans le but de réactiver les souches bactériennes testées, elles ont été transférées dans le milieu LB (Luria Broth) pendant 24 h pour se développer à 37 ° C.

Les champignons utilisés ont été réactivés dans le milieu Malt extract Broth pendant 36 h pour se développer à 28 ° C.

Les échantillons investigués ont été dissous dans le DMSO (1.0 mg/ml). De cette concentration, on utilise pour la dilution initiale 5 µl. On ajoute 85 µl du milieu de culture plus 10 µl d'inoculum (1.0×10^5 cellules/ml).

Nous avons réalisé une série de dilutions à partir du puits initial en utilisant chaque fois 5 µl du contenu précédant dans le puits suivant, qui contenait déjà 85 µl du milieu de culture plus 10 µl d'inoculum.

Les microplaques (plaque de 96 puits) ont été incubées pendant 48 h à 37° C pour les bactéries et 72 h à 28° C pour les champignons.

DMSO a été utilisé comme un contrôle négatif, alors que streptomycine (0.1 µl/ml) et le fongicide commercial miconazole (5 µl/ml) ont été utilisés comme contrôles positifs. Tous les tests ont été réalisés *in triplicata*. L'antibiotique ampicilline et le fongicide bifonazole ont été utilisés comme contrôles positifs.

La concentration minimale qui a inhibé le développement des microorganismes (visible au microscope binoculaire) a été définie comme **CMI** (Concentration Minimale Inhibitrice) cette valeur caractérise l'effet bactériostatique des substances testées. Les concentrations minimales bactéricides **CMB** (Concentration Minimale Bactéricide) et fongicides **CMF** ont été définies comme les plus faibles concentrations détruisant 99.9% de l'inoculum (effet bactéricide des substances testées).

II.6.2. Activité cytotoxique/cytostatique

Nous avons investigé l'activité cytotoxique des sesquiterpènes lactones isolées de *C. pullata*, en utilisant le Test sulforhodamine B (SRB). Ceux de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* ont fait l'objet d'études antérieures (Karioti *et al.*, 2002; Saraglou *et al.*, 2005).

Il s'agit d'une méthode basée sur la coloration des protéines cellulaires par la sulforhodamine B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990).

Les lignées de cellules cancéreuses utilisées sont les suivantes : DLD1 (coloréctales), SF268 (glioblastomes=cancer du système nerveux central), MCF7 (mammaires), H460 (pulmonaires) et OVCAR3 (adénocarcinome ovariens). Elles ont été obtenues de l'Institut National de Cancérologie, NIH (Bethesda, USA).

Au début de chaque expérience la viabilité des cellules a été contrôlée en utilisant la coloration d'exclusion par « le bleu de trypan » qui permet la différenciation des cellules viables (incolores) et non viables (colorées en bleu); lors du dénombrement cellulaire la viabilité doit dépasser 95%.

Les tests ont été réalisés en triplicat, les résultats ont été analysés statistiquement par le test *t* de student, en utilisant le logiciel SPSS pour Windows (Version11.0.0, SPSS Inc., USA), la différence a été considérée significative quand $p < 0.05$.

Les cellules cancéreuses ont été déposées dans 100 µl de milieu à une concentration de 5000 cellules/puits dans des plaques de culture à 96-puits.

Les plaques ont été incubées 24 h pour permettre aux cellules de reprendre la croissance avant l'addition des composés à tester.

A fin de déterminer l'activité des substances **1-10**, elles ont été dissoutes dans le DMSO et préparés en 10 dilutions (de 100 à 0.01 µM) ajoutés aux cellules puis incubées durant 48 h.

5-FU (Fluorouracil) a été utilisé comme contrôle positif CV<15%; c'est un analogue de pyrimidine, il est transformé à l'intérieur de la cellule en différents métabolites cytotoxiques, qui sont alors incorporés à l'ADN et l'ARN, induisant l'arrêt de la synthèse de l'ADN. Il est un médicament spécifique.

Les cellules ont été fixées avec l'acide trichloracétique (TCA) pendant 1 h à 4°C. Après rinçage à l'eau, les protéines cellulaires sont colorées par une solution de SRB (100

µl/puits) diluée dans l'acide acétique 1%. L'absorbance a été mesurée à 490 nm dans un appareil de type EL-311 BIOTEK (microelisa reader; BioTek, Winooski, VT, USA)

Les paramètres suivants ont été déterminés : GI₅₀, TGI, LC₅₀ (Maswadeh et *al.*, 2000).

- **GI₅₀** : la concentration où $\frac{T - T_0}{C - T_0} \times 100 = 50$; elle mesure le pouvoir inhibiteur du développement des composés testés.
- **TGI** : la concentration des composés testés, où $\frac{T - T_0}{C - T_0} \times 100 = 0$; elle mesure l'effet cytostatique des composés.
- **LC₅₀** : la concentration des composés testés, où $\frac{T}{T - T_0} \times 100 = -50$.
- **T** : la densité optique des puits, après une période d'exposition aux composés testés de 48 h.
- **T₀** : est la densité optique des populations cellulaires au temps 0 (lors de l'ajout du composé).
- **C** : la densité optique des puits de contrôle, où les cellules ont été incubées durant 48h, et représente l'activité cytotoxique des composés.

II.7. Prédiction des propriétés pharmacologiques

II.7.1. Introduction

Les composés naturels d'origine végétale ou animale constituent traditionnellement une source majeure dans la découverte de médicaments (Bindseil et *al.*, 2001 ; Lee et Schneider, 2001), alors que selon Kennedy (1997) et Prentis et *al.* (1998) plus de 50% de ces substances promises pour l'industrie pharmaceutique sont rejetées à cause de leur profil pharmacocinétique insuffisant et leur grande toxicité (**Figure 10**).

En 1972 une étude approfondie menée par Hansch présentait la relation qui existe entre les structures et les propriétés pharmacocinétiques des substances naturelles, ceci en rassemblant de la littérature une base de données sur leurs activités *in vivo*.

De nos jours, il est intéressant d'appliquer sur ces composés des méthodes de criblage virtuelles (cible-ligand), qui sont de nouvelles techniques bien établies pour l'identification des nouvelles substances-conductrices (lead-compounds) (Green, 2003 ; Walters et *al.*, 1998).

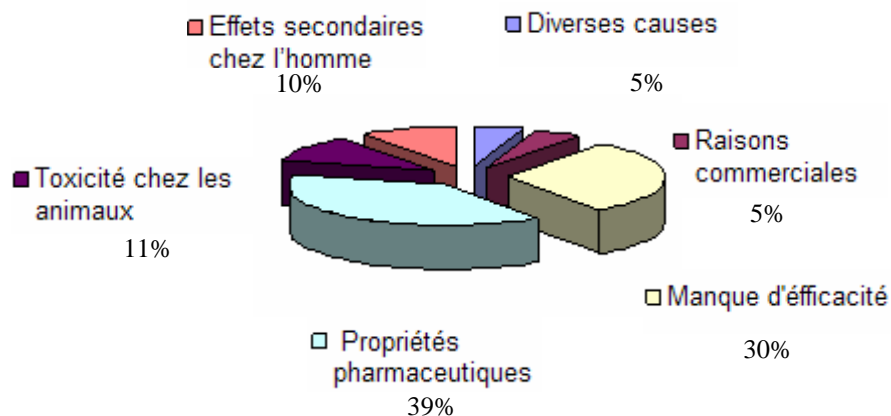


Figure 10. Efficacité des substances actives en industrie pharmaceutique (Kennedy, 1997)

Sachant que les propriétés clefs pour la découverte des médicaments sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME), ces dernières doivent être précisées et optimisées. Il est nécessaire de filtrer ces paramètres par un criblage virtuel, pour pouvoir les optimiser (Lipinski et *al.*, 1997).

Récemment, dans le domaine de la computation, les efforts établis ont été réalisés dans le but d'obtenir des modèles, qui décrivent et prévoient le comportement pharmacocinétique d'un composé (Ekins et *al.*, 2000; Van De Waterbeemd et *al.*, 1996).

Dans la littérature la méthode computationnelle la plus utilisée est la méthode Volsurf (Crivori et *al.*, 2000 ; Cruciani et *al.*, 2000a, id 2000b ; Hu, 2006 ; Koukoulitsa et *al.*, 2005 ; Menezes et *al.*, 2003)

II.7.2. Méthode Volsurf

Volsurf est une méthode computationnelle, qui a été désignée spécifiquement pour produire des descripteurs relatifs aux propriétés pharmacocinétiques des substances étudiées (Cruciani et *al.*, 2000a).

Nous avons commencé par un créer fichier de la carte de la molécule (en 3D), dans la procédure standard GRID (interactions de champs) (Goodford, 1985) (**Figure 11**). Ces descripteurs ont été calculés autour de la molécule.

La molécule est mise ensuite théoriquement à l'intérieur d'une sonde (sous forme de cube). On calcule l'énergie totale entre les atomes de la molécule et du probe choisi [eau (OH₂)/ hydrophobique (DRY) / H-liaison carbonyle] à un point précis par ses coordinations x,y, z.

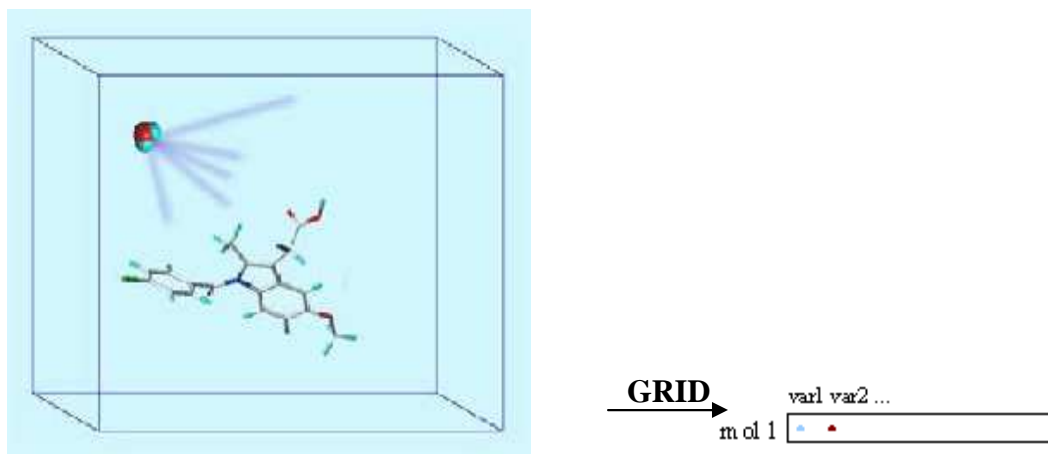


Figure 11. Méthode de calcul de l'énergie totale

Le principe de base de Volsurf est la compression de la grille d'informations présentes en 3D, en quelques descripteurs numériques en 2D, qui sont plus simple à comprendre et à interpréter. Les descripteurs moléculaires obtenus se réfèrent aux tailles et formes de la molécule.

Les modèles ADME inclus dans le logiciel Volsurf prédisent :

- les absorptions des cellules Caco-2 (ligné de cellules épithéliales obtenues d'un cancer colorectal) (Cruciani et *al.*, 2000a).
- liaison protéinique (Cruciani et *al.*, 2000b).
- la perméabilité barrière-sang-cerveau (Barrière Hémato-Encéphale ou BHE) (Crivori et *al.*, 2000).
- la solubilité de la substance dans l'eau (Cruciani et *al.*, 2003).
- la solubilité de la substance dans le DMSO.
- la stabilité métabolique (Crivori et *al.*, 2004).
- hERG (human Ether-a-go-go Related Gene) inhibition.
- volume de distribution des hERG (Koukukitsa et *al.*, 2005).

La méthode s'applique aux molécules des diverses dimensions, petites, moyennes et grandes, ainsi qu'aux polymères: ADN, peptides et protéines.

a) Base de données

La base de données a été constituée de 10 sesquiterpène lactones isolées de *C. pullata*, celles isolées de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* n'ont pas fait l'objet d'étude car elles ont déjà fait partie d'une étude antérieure (Koukoulitsa et al., 2005).

b) Génération de la structure en 3D

Les structures ont été générées en utilisant un logiciel de modelage moléculaire SYBYL (Sybyl Molecular Modeling System, version 6.8), qui fonctionne dans un poste de travail Linux sur un système d'opération Fedora. Leurs énergies ont été optimisées en utilisant la méthode Powell avec critère de convergence fourni par les forces du fichier Tripos (Vinter et al., 1987)

c) Méthode computationnelle

La perméabilité des cellules Caco-2, l'affinité plasma-protéines, la perméabilité BHE, ainsi que la solubilité thermodynamique des composés étudiés ont été prédit en utilisant Volsurf version 4 (www.moldiscovery.com). Nous avons utilisé les sondes (sous formes de cubes) suivantes: eau (H₂O), hydrophobique (DRY) et H-liaison carbonyle (O) à fin de générer l'énergie de l'interaction en 3D dans un espace grille de 0.5 Å.

Le système graphique moléculaire Gview (www.moldiscovery.com) a été utilisé pour visualiser la projection de la molécule étudiée dans les différents modèles.

II.8. Recherche ethnobotanique

Lors de notre recherche ethnobotanique sur l'utilisation de *C. pullata* (**Tableau 10**) et de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* (**Tableau 11**) en médecine traditionnelle, nous avons dressé les questionnaires suivants (Cheriti et al., 1995) :

Tableau 10: Utilisation de *C. pullata* en médecine traditionnelle

Questionnaire N°.....	
Age :.....	
Métier exercé :.....	
Nom vernaculaire de la plante (Arabe, Français ou berbère):	
Partie de la plante utilisée :	
<input type="checkbox"/> Feuille	<input type="checkbox"/> Fleur
<input type="checkbox"/> Fruit	<input type="checkbox"/> Graine
<input type="checkbox"/> Tige	<input type="checkbox"/> Racine
<input type="checkbox"/> Partie aérienne	<input type="checkbox"/> Plante entière
Méthode d'utilisation:.....	
Effets secondaires :.....	
Nous vous remercions pour votre collaboration	

Tableau 11: *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* en médecine traditionnelle

Ερωτηματολόγιο Ν°.....	
Ηλικία :.....	
Επάγγελμα :.....	
Τοπική ονομασία του φυτού:	
Μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται :	
<input type="checkbox"/> Φύλλα	<input type="checkbox"/> Άνθη
<input type="checkbox"/> Καρπός	<input type="checkbox"/> Σπέρματα
<input type="checkbox"/> Βλαστός	<input type="checkbox"/> Ρίζα
<input type="checkbox"/> Υπέργειο μήμα φυτού	<input type="checkbox"/> Υπόγειο μήμα φυτού
Τρόπος χρήσης :.....	
Ανεπιθύμητες ενέργειες :.....	
Σας ευχαριστούμε πολύ για το χρόνο και τη συνεργασία σας	

Nous avons choisi la période de floraison des deux plantes avril et mai respectivement pour la réalisation du questionnaire, les plantes ont été présentées fraîches lors des interviews. Les questions ont été posées aux personnes dans plusieurs sites :

➤ Pour *C. pullata* nous avons choisi trois sites il s'agit des wilayas suivantes : Alger, Blida et Boumerdes.

➤ Pour *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* nous avons choisi un seul site : le village Karya (Mont Olympe).

Sachant que souvent les connaissances traditionnelles des vertus des plantes sont exclusivement réservées aux personnes âgées et plus particulièrement aux femmes qui détiennent un savoir important, nous avons choisi la réalisation d'entretiens directs :

➤ Pour *C. pullata* nous avons interrogé 52 personnes (dont 12 hommes et 40 femmes) appartenant à une tranche d'âge entre 45 et 90 ans, certains d'entre eux exercent le métier herboriste.

➤ Pour *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* nous avons interrogé 13 personnes (dont 3 hommes et 10 femmes) appartenant à une tranche d'âge entre 35 et 50 ans.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

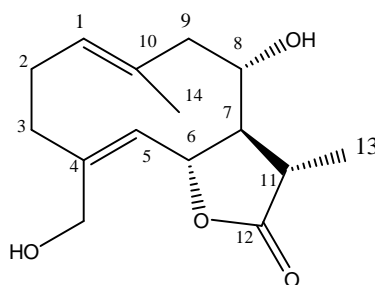
III.1. Résultats phytochimiques

a) Sesquiterpènes lactones isolées de *C. pullata*

Plusieurs sesquiterpènes lactones ont été isolées, les constantes de couplages J et les déplacements chimiques δ sont présentés en Hz et ppm respectivement.

Composé 1 : 11 β , 13-dihydrosaloniténolide.

Le composé 1 se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} + 16.00^\circ$ (CHCl₃; c 0.25).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3372$ (OH), 1758 (C=O, γ -lactone, ester), 1660 et 1640 cm⁻¹ (doubles liaisons).

EI-MS (70eV): m/z 266 (C₁₅H₂₂O₄).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 12**) nous a permis de constater qu'il s'agit d'un gérmacranolide portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et al., 1970).

Au niveau du même spectre, nous avons constaté l'absence dans la région du bas champ des signaux correspondants aux protons oléfiniques d'un groupe exométhylène typique de l'anneau α -méthylène γ -lactone. Ces signaux sont remplacés par un signal doublé à δ 1.42 ($J= 6.7$) caractéristique du groupe α -méthyle γ -lactone (H-13).

Les valeurs de déplacements et les constantes de couplages (**Tableau 12**), ainsi que les spectres de corrélations à deux dimensions: homonucléaire (COSY, **Figure 13**) et hétéronucléaires (HSQC, **Figure 14** et HMBC, **Figure 15**), nous ont permis d'enregistrer la position de tous les protons.

➤ Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 4.94 ($J= 5.1, 11.7$) déblindé à cause de la présence de la double liaison $\Delta^{(10)}$ et élargi à cause de sa conjugaison avec ses protons voisins.

Dans la même région, nous avons distingué :

➤ Un doublet dédoublé à δ 4.85 ($J = 9.0, 9.8$) qui a été attribué au proton H-6. Les grandes constantes de couplage nous indiquent que le proton H-6 et ses protons voisins H-5 et H-7 ont une position entre eux *trans*-diaxiale. De plus, les constantes de couplage entre les protons H-7 et H-8 indiquent qu'ils tiennent une position entre eux *trans*-diaxiale. Sachant que le proton H-7 tient une α -conformation pour des raisons biosynthétiques (Kupchan et *al.*, 1967) par conséquent, ses protons voisins H-6 et H-8 doivent tenir une β -conformation.

➤ Un doublet à δ 4.70 ($J = 9.8$) attribué au proton H-5, qui se conjugue avec son proton voisin H-6.

Selon le spectre COSY, dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée, nous avons distingué :

➤ Deux doublets élargis correspondants aux protons géminaux H-15a et H-15b à δ 4.25 ($J= 13.7$) et à δ 4.02 ($J= 13.7$), respectivement.

➤ Un triplet dédoublé à δ 3.92 ($J= 2.4, 10.9$) attribué au proton H-8, qui se conjugue avec les protons H-9b et H-7. Ceci a été confirmé par le spectre COSY.

Selon le même spectre dans la région des hauts champs, nous avons observé les signaux suivants :

➤ Un quadruplet dédoublé à δ 2.74 ($J= 6.7, 10.9$) attribué au proton H-11 qui se conjugue avec le doublet des protons H-13.

➤ Un doublet de doublets de doublets dédoublés à δ 2.08 ($J= 4.7, 5.1, 12.1, 12.5$) attribué au proton H-2b, suggérant sa conjugaison avec les protons H-1, H-3b, H-3a et son géminale H-2a.

➤ Un doublet de doublets dédoublés à δ 2.50 ($J= 2.3, 7.8, 12.5$) a été attribué au proton H-3a, qui se conjugue avec son géminale H-3b et les protons de la position C-2 .

➤ Un triplet à δ 2.37 ($J= 12.5$) attribué au proton H-9b, qui se conjugue avec le proton H-8 et son géminale H-9a.

➤ Un singulet intégrant pour 3 protons détectés à δ 1.37 correspondant au méthyle de la position C-14 placé sur le C-10 (HMBC). Cette valeur du déplacement chimique est indicative du groupe des germacranolides sans chaîne latérale à l'hydroxyle en position C-8. Le reste des protons apparaissent dans la même région sous forme de multiplets.

Tableau 12 : Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz; CDCl_3) du composé **1**

δ (ppm)	n°H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.94	1	<i>dd</i> ($J= 5.1, 11.7$)	H-1
2.25-2.15	1	<i>m</i>	H-2a
2.08	1	<i>dddd</i> ($J= 4.7, 5.1, 12.1, 12.5$)	H-2b
2.50	1	<i>ddd</i> ($J= 2.3, 7.8, 12.5$)	H-3a
4.70	1	<i>d</i> ($J= 9.8$)	H-5
4.85	1	<i>dd</i> ($J= 9.0, 9.8$)	H-6
1.86-1.97	2	<i>m</i>	H-7, H-3b
2.74	1	<i>qd</i> ($J= 6.7, 10.9$)	H-11
3.92	1	<i>td</i> ($J= 2.4, 10.9$)	H-8
2.57-2.51	1	<i>m</i>	H-9a
2.37	1	<i>t</i> ($J= 12.5$)	H-9b
1.42	3	<i>d</i> ($J= 6.7$)	H-13
1.37	3	<i>s</i>	H-14
4.25	1	<i>d</i> ($J= 13.7$)	H-15a
4.02	1	<i>d</i> ($J= 13.7$)	H-15b

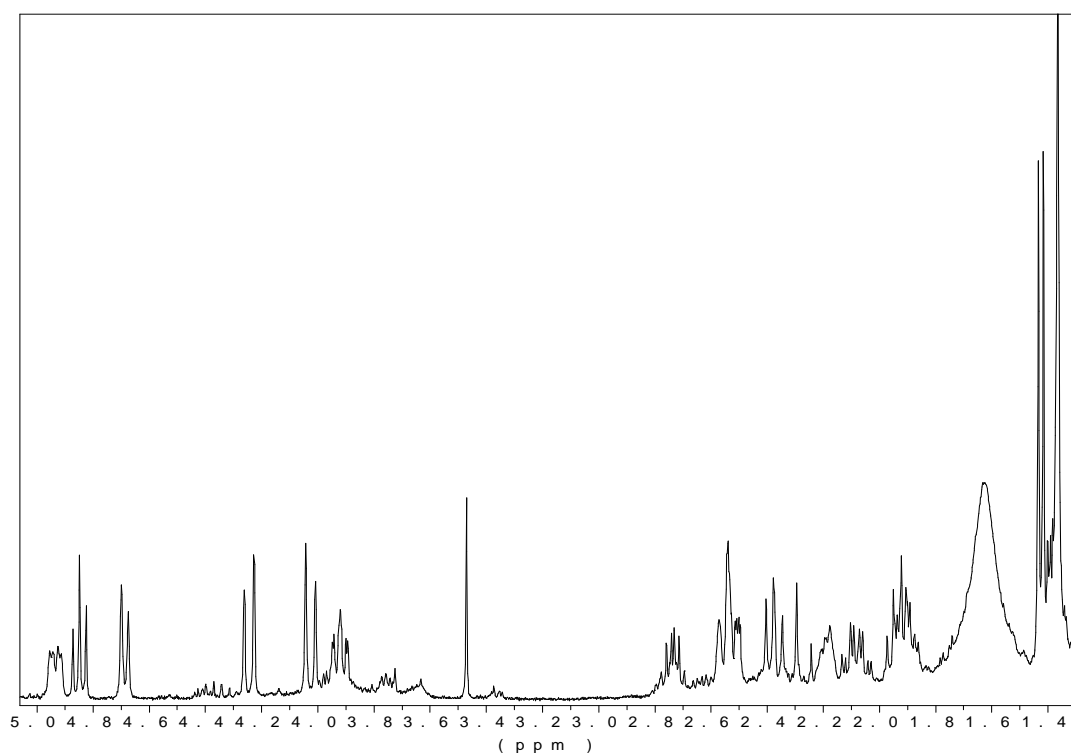


Figure 12 : Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **1**.

Tableau 13: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **1***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
128.6	CH	C-1
26.1	CH ₂	C-2
34.7	CH ₂	C-3
141.9	C	C-4
129.2	CH	C-5
75.3	CH	C-6
59.5	CH	C-7
72.2	CH	C-8
52.5	CH ₂	C-9
133.5	C	C-10
40.5	CH	C-11
178.8	C	C-12
17.2	CH ₃	C-13
16.7	CH ₃	C-14
61.5	CH ₂	C-15

* Assignements faits à l'aide de HSQC et HMBC

Les déplacements des carbones déduits par les spectres HSQC et HMBC sont en accord avec les valeurs décrites dans la littérature (Marco *et al.*, 1992).

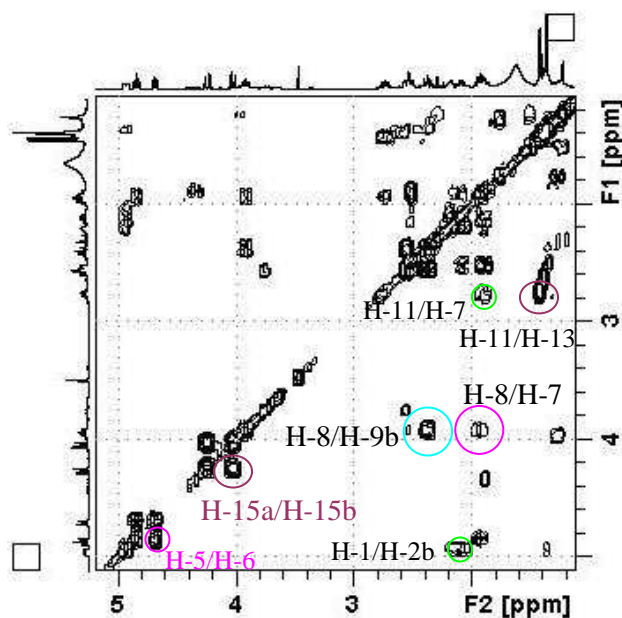


Figure 13: Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé **1**

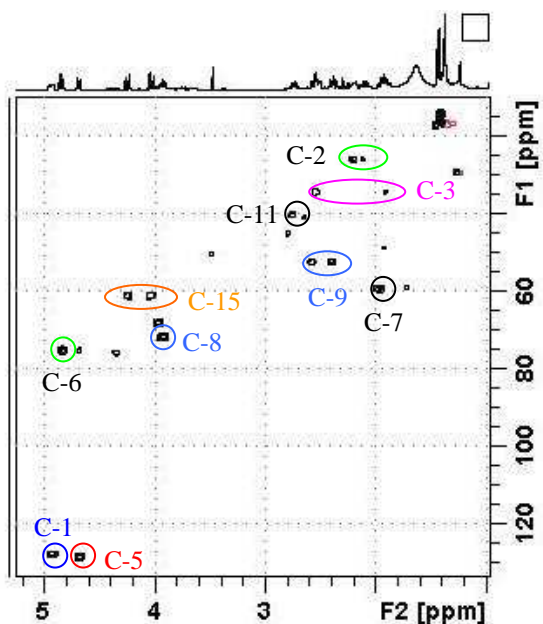


Figure 14: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé **1**

Selon le spectre HMBC (**Figure 15**) nous avons noté les signaux de corrélations entre :

- le méthyle de la tête CH₃-14 (1.37) avec les carbones : C-10 (133.5), C-1 (128.6) et C-9 (52.5).
- le méthyle exocyclique CH₃-13 (1.42) avec les carbones : C-11 (40.5), C-7 (59.5) et C-12 (178.8).
- le proton H-7 (1.94) avec les carbones : C-8 (72.2) et C-5 (129.2).
- les protons géminaux 15a,b (4.25 et 4.02) avec C-4 (141.9).

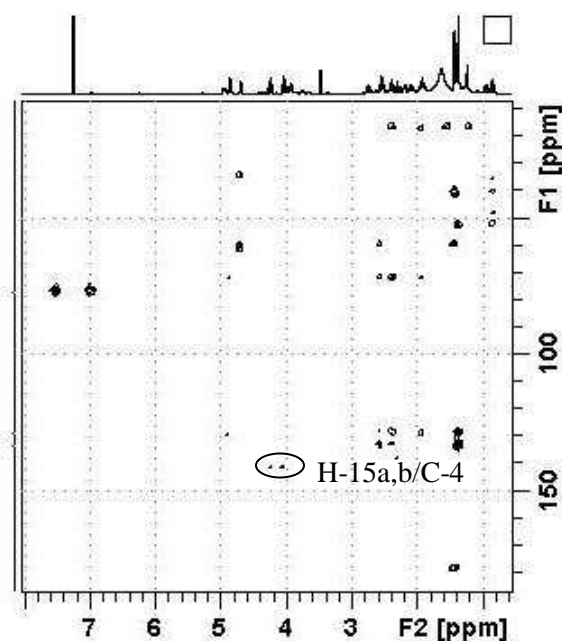


Figure 15. Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé **1**

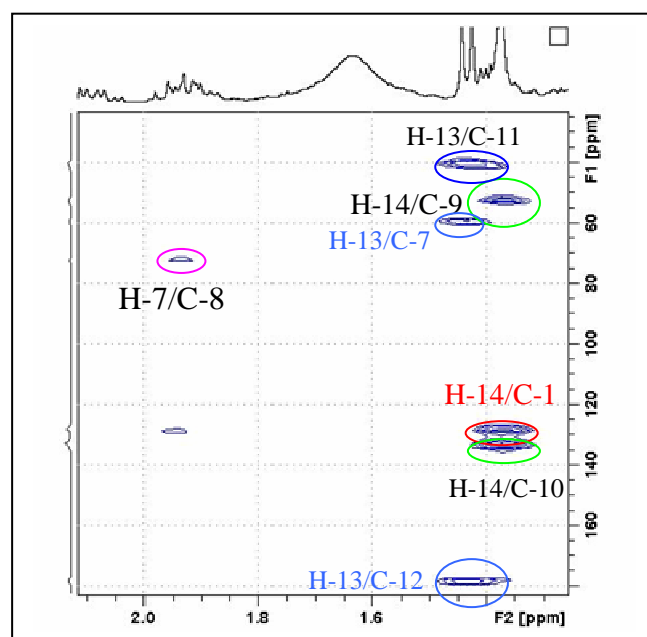


Figure 15a. Détail du spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé **1**

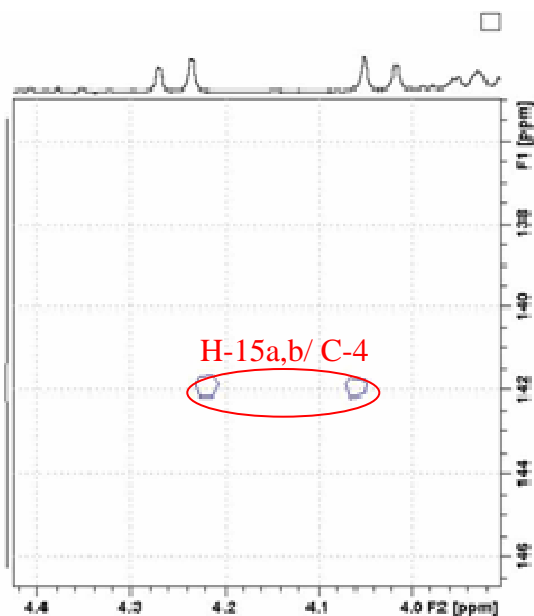


Figure 15b. Détail du spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé **1**

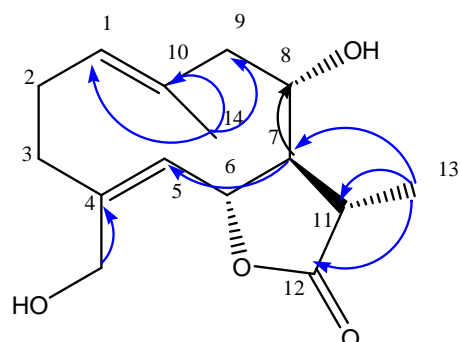
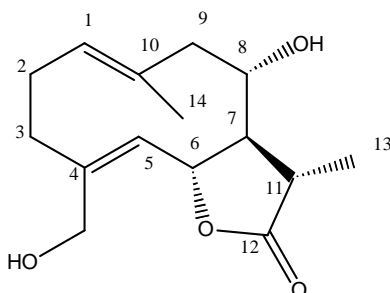


Figure 15c Corrélations HMBC du composé **1**

Par comparaison des résultats de 1D & 2D-RMN avec ceux de la littérature (Marco et al., 1992) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



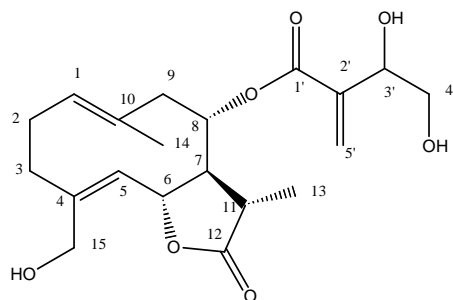
Composé 1

Il s'agit du 11 β , 13-dihydrosaloniténolide, un gémacranolide décrit pour la première fois comme dérivé de réduction de cnicine avec NaBH₄ (Barrero et al., 1988). Comme produit naturel, il a été isolé pour la première fois de *C. calcitrapa* (Marco et al., 1992), par la suite le composé **1** a été isolé des espèces suivantes du genre *Centaurea*: *C. achaia* (Skaltsa et al., 2000a), *C. alba* (Fernández et al., 1995), *C. maroccana* (Barrero et al., 2000), *C. nicaensis* (Medjroubi et al., 2003).

Chez la même famille, ce composé a été également isolé chez: *Onopordon sibthorpiun* et *O. laconicum* (Lazari et al., 1998).

Composé 2 : 11 β , 13-dihydrocnicine

Le composé **2** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +10.0^\circ$ (MeOH; c 0.10).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3372$ (OH), 1776 (C=O, γ -lactone), 1638 cm^{-1} (C=O, chaîne latérale).

EI-MS (70eV): m/z 380 (C₂₀H₂₈O₇).

Au spectre ¹H-RMN (**Tableau 14**), nous avons constaté la présence d'un anneau germacrane portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently *et al.*, 1970).

Le squelette central et la conformation du composé **2** sont identiques avec ceux du composé **1**:

Dans la région oléfinique (**Figure 16**), nous avons constaté l'absence des signaux sous forme de deux doublets caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone, dans la même région, les signaux suivants ont été observés:

- un doublet dédoublé à δ 4.95 ($J = 7.4, 13.2$) attribué au proton H-1.
- un triplet dédoublé à δ 5.22 ($J = 2.8, 9.0$) attribué au proton H-8. Malgré que ce proton ne soit pas oléfinique, il se trouve dans cette région, parce qu'il est déblindé à cause de la chaîne latérale qu'il porte.
- un triplet à δ 5.01 ($J = 9.4$) attribué au proton H-6, un peu superposé par le proton H-1. Malgré que le proton H-6 ne soit pas oléfinique, il apparaît déblindé à cause de sa position allylique par rapport à la double liaison Δ^4 et de son voisinage à une fonction oxygénée.
- un doublet à δ 4.72 ($J = 9.3$) attribué au proton H-5.

Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée, nous avons distingué: deux doublets possédant la même constante de couplage ($J = 14.0$) à δ 4.27 et δ 4.07 et attribués aux protons géminaux H-15a et H-15b, respectivement.

Dans la région du haut champ nous avons constaté la présence d'un doublet à δ 1.35 ($J= 7.0$) attribué au proton H-13 et d'un singulet attribué au CH₃-14, qui résonne à δ 1.46.

Par comparaison au composé **1**, des signaux additionnels attribués aux protons de la chaîne latérale sont aperçus:

➤ Dans la région oléfinique, les protons géminaux H-5'a et H-5'b comme deux singulets à δ 6.32 et 6.03, respectivement.

➤ Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée, un doublet dédoublé à δ 4.58 ($J= 3.5, 6.2$) attribué au proton H-3' et deux doublets dédoublés à δ 3.83 ($J= 6.6, 10.9$) et à δ 3.59 ($J= 3.5, 11.3$) attribués aux protons géminaux H-4'a et H-4'b, respectivement.

Tableau 14: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **2**

δ (ppm)	n $^\circ$ H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.95	1	<i>dd</i> ($J = 7.4, 13.2$)	H-1
2.20-2.10	2	<i>m</i>	H-2a, H-2b
2.40-2.60	3	<i>m</i>	H-3a, H-9a, H-9b
1.93	1	<i>ddd</i> ($J = 6.6, 12.1$)	H-3b
4.72	1	<i>d</i> ($J = 9.3$)	H-5
5.01	1	<i>t</i> ($J = 9.4$)	H-6
2.35	1	<i>m</i>	H-7
5.22	1	<i>td</i> ($J = 2.8, 9.0$)	H-8
2.55	1	<i>m</i>	H-11
1.35	3	<i>d</i> ($J = 7.0$)	H-13
1.46	3	<i>s</i>	H-14
4.27	1	<i>d</i> ($J = 14.0$)	H-15a
4.07	1	<i>d</i> ($J = 14.0$)	H-15b
4.58	1	<i>dd</i> ($J = 3.5, 6.2$)	H-3'
3.83	1	<i>dd</i> ($J = 3.5, 11.3$)	H-4'a
3.59	1	<i>dd</i> ($J = 6.6, 10.9$)	H-4'b
6.32	1	<i>s</i>	H-5'a
6.03	1	<i>s</i>	H-5'b

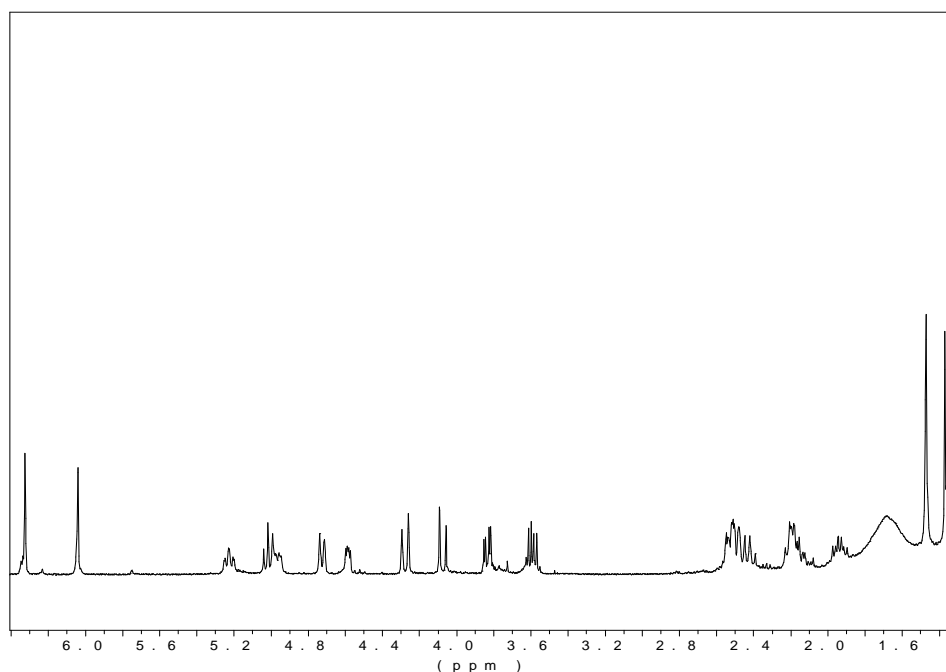
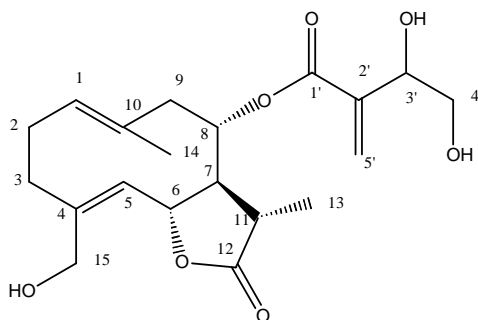


Figure 16: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **2**

Par comparaison des données $^1\text{H-RMN}$ avec ceux de la littérature (Benayache et *al.*, 1992) la structure suivante a été attribuée à ce composé :

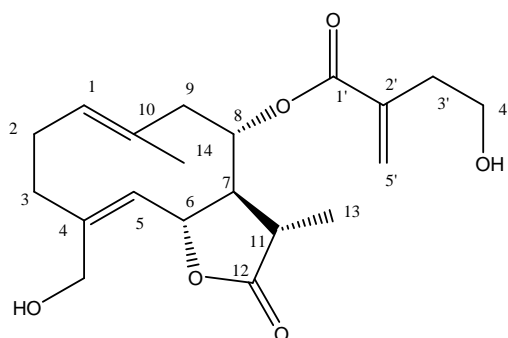


Composé 2

Il s'agit du 11β , 13-dihydrocnicine, un gémacranolide isolé pour la première fois de *C. pullata* par Benayache et *al.* (1992) et par la suite chez *C. nicaensis* (Bruno et *al.*, 1996; Medjroubi et *al.*, 2003).

Composé 3 : 11 β , 13-dihydro-19 désoxycnicine

Le composé **3** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +26.79^\circ$ (MeOH; c 0.11).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3380$ (OH), 1759 (C=O, γ -lactone), 1705 cm^{-1} (C=O, chaîne latérale).

EI-MS (70eV): m/z 364 (C₂₀H₂₈O₆).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Tableau 15**) nous a indiqué la présence d'un anneau gémacrane portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et al., 1970).

Le squelette central et la conformation du composé **3** sont identiques avec ceux du composé **1**:

Dans la région oléfinique (**Figure 17**), nous avons constaté l'absence des signaux sous forme de deux doublets caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone, dans la même région les protons suivants ont été observés:

- Le proton H-1 comme un doublet dédoublé à δ 4.94 ($J = 5.0, 10.9$).
- Le proton H-8, malgré qu'il ne soit pas oléfinique, comme un triplet dédoublé à δ 5.19 ($J = 2.3, 8.6$); son déblindage est dû à la présence de la chaîne latérale qu'il porte.
- Le proton H-6 comme un triplet à δ 5.00 ($J = 9.8$) un peu superposé par le proton H-1.
- Le proton H-5 comme un doublet à δ 4.71 ($J = 10.2$).

Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée nous avons distingué deux doublets à δ 4.26 ($J = 14.0$) et δ 4.02 ($J = 14.0$) qui ont été attribués aux protons géminaux H-15a et H-15b, respectivement.

Dans la région du haut champ, nous avons constaté la présence d'un doublet à δ 1.34 ($J = 6.6$) qui a été attribué au méthyle CH₃-13 et d'un singulet à δ 1.46 qui a été attribué au méthyle CH₃-14.

Par comparaison au composé **1**, des signaux additionnels attribués aux protons de la chaîne latérale ont été aperçus:

- Les protons géminaux du méthylène de la chaîne latérale H-5'a et H-5'b comme singulets élargis à δ 6.21 et 5.74, respectivement.
- Les protons géminaux H-3'a, H-3'b à δ 2.58 comme doublet dédoublé ($J= 6.6, 14.5$)
- Les protons géminaux H-4'a et H-4'b à δ 3.75 comme doublet dédoublé ($J= 5.9, 6.2$).

Le reste des protons apparaissaient dans la même région sous forme de multiplets.

L'analyse des spectres hétéro-nucléaires (HSQC, **Figure 20** & HMBC, **Figure 21**), nous a permis de constater sans ambiguïté les positions des carbones au spectre ^{13}C -RMN (**Tableau 16**).

Tableau 15: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **3**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.94	1	<i>dd</i> ($J= 5.0, 10.9$)	H-1
2.21-2.10	2	<i>m</i>	H-2a, H-2b
1.91	1	<i>ddd</i> ($J= 6.6, 12.1, 11.7$)	H-3b
4.71	1	<i>d</i> ($J= 10.2$)	H-5
5.00	1	<i>t</i> ($J= 9.8$)	H-6
2.48-2.36	1	<i>m</i>	H-7
5.19	1	<i>td</i> ($J= 2.3, 8.6$)	H-8
2.60-2.50	3	<i>m</i>	H-3a, H-9a, H-9b
2.64-2.54	1	<i>m</i>	H-11
1.34	3	<i>d</i> ($J= 6.6$)	H-13
1.46	3	<i>s</i>	H-14
4.26	1	<i>d</i> ($J= 14.0$)	H-15a
4.02	1	<i>d</i> ($J= 14.0$)	H-15b
2.58	2	<i>dd</i> ($J= 6.6, 14.5$)*	H-3'a, H-3'b
3.75	2	<i>dd</i> ($J= 5.9, 6.2$) *	H-4'a, H-4'b
6.21	1	<i>se</i>	H-5'a
5.74	1	<i>se</i>	H-5'b

*signaux superposés

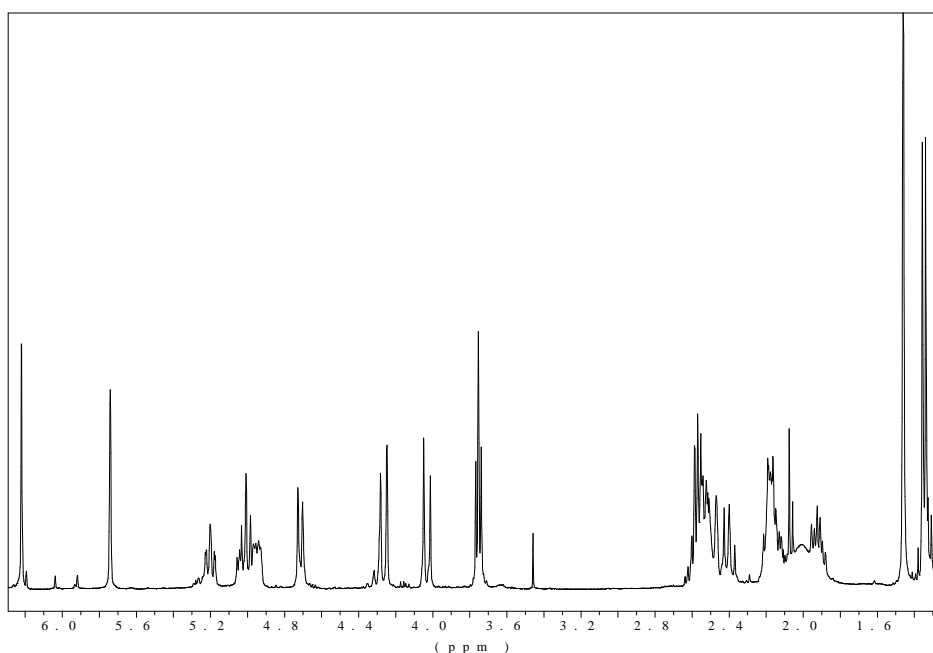


Figure 17: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **3**.

Tableau 16: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **3**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
129.0	CH	C-1
26.1	CH_2	C-2
34.7	CH_2	C-3
143.0	C	C-4
129.4	CH	C-5
76.2	CH	C-6
58.3	CH	C-7
73.7	CH	C-8
49.0	CH_2	C-9
132.7	C	C-10
40.1	CH	C-11
178.3	C	C-12
17.0	CH_3	C-13
16.6	CH_3	C-14
61.2	CH_2	C-15
166.3	C	C-1'
137.4	C	C-2'
35.4	CH_2	C-3'
61.5	CH_2	C-4'
127.7	CH_2	C-5'

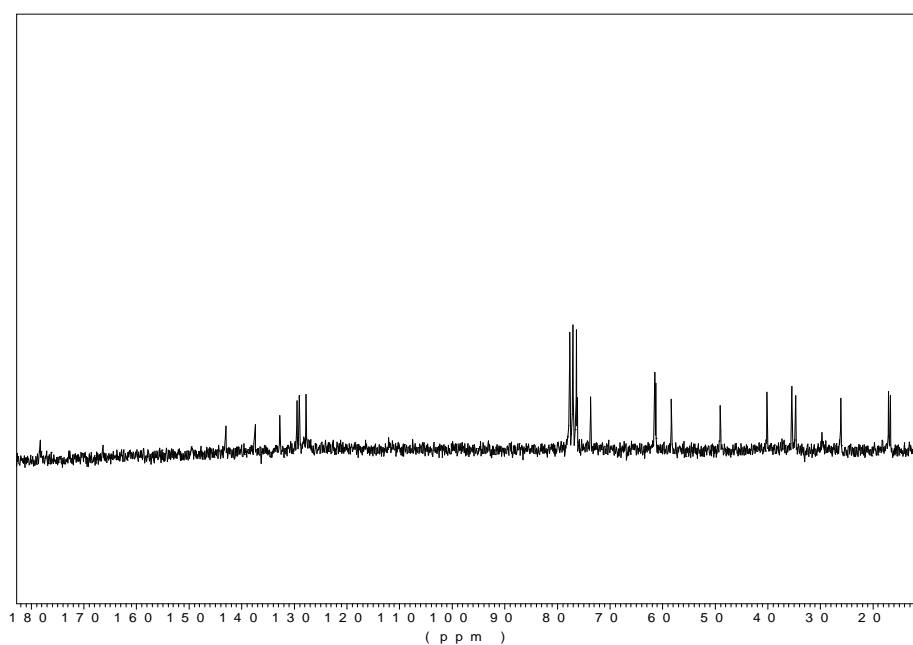


Figure 18: Spectre ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **3**

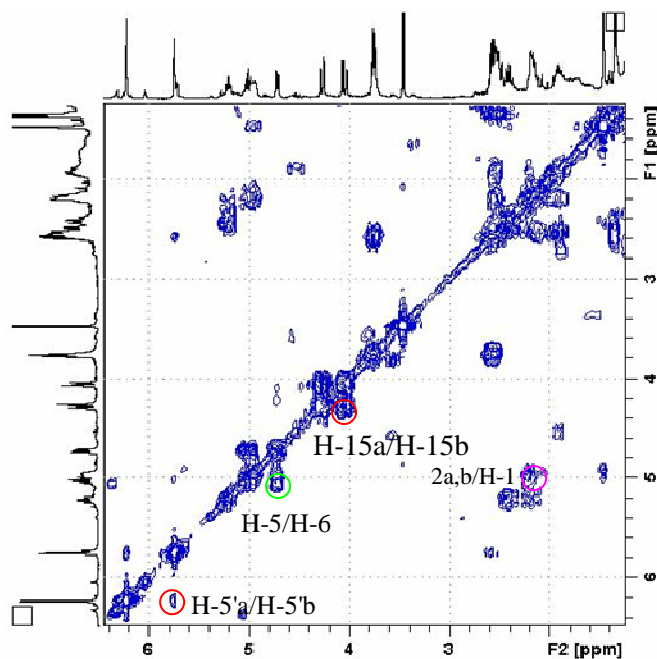


Figure 19: Spectre COSY (200 MHz, CDCl_3) du composé 3

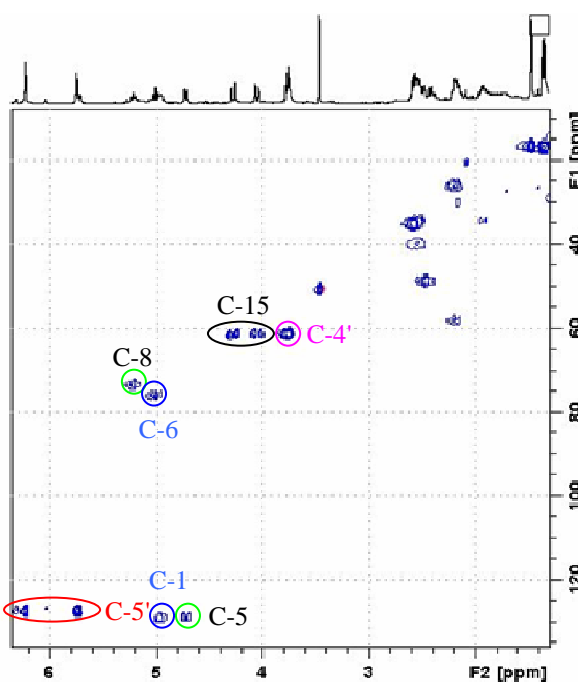


Figure 20: Spectre HSQC (200 MHz, CDCl_3) du composé 3

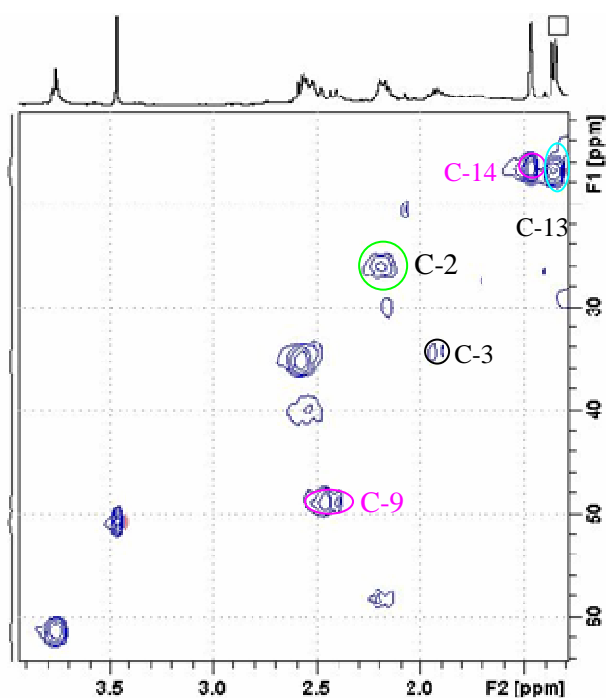


Figure 20a: Détail du spectre HSQC (200 MHz, CDCl_3) du composé 3

Selon le spectre HMBC (Figure X) nous avons noté les signaux de corrélations entre :

- le méthyle de la tête CH_3 -14 (1.46) avec les carbones : C-10 (132.7) et C-9 (49.0).

➤ le méthyle éxocyclique CH₃-13 (1.34) avec les carbones : C-11 (40.1), C-7 (58.3) et C-12 (178.3).

➤ les protons géminaux H-15a, H-15b (4.26, 4.02) avec les carbones : C-4 (143.0) et C-5 (129.4).

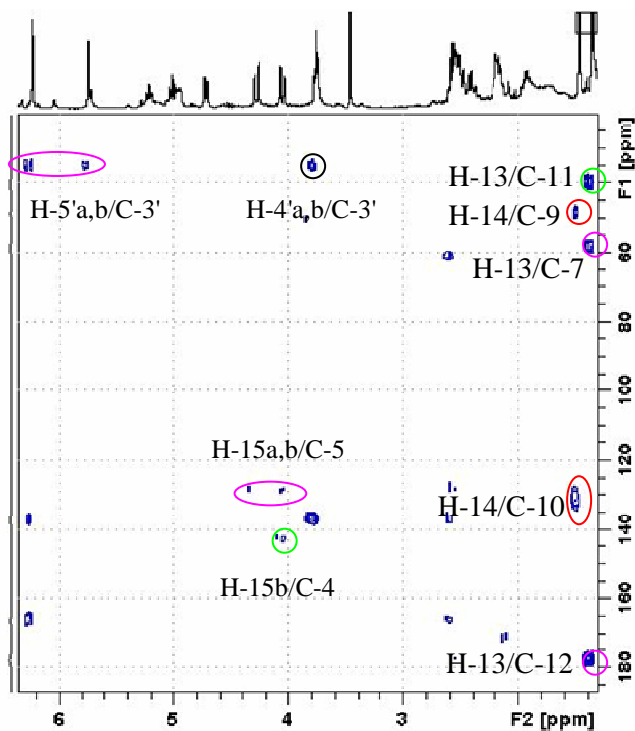


Figure 21: Spectre HMBC (200 MHz, CDCl₃) du composé **3**

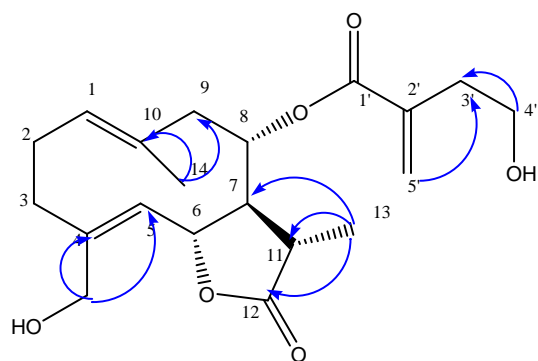
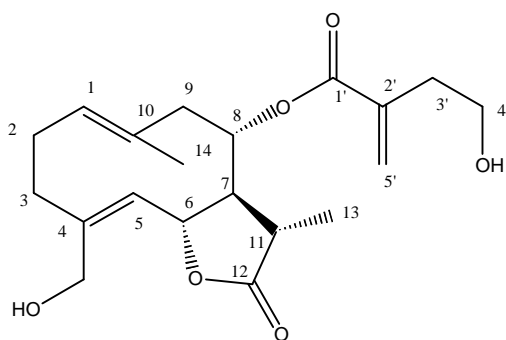


Figure 21a: Corrélations HMBC du composé **3**

L'interprétation des spectres 1D & 2D-RMN nous a permis d'attribuer au composé la structure suivante:

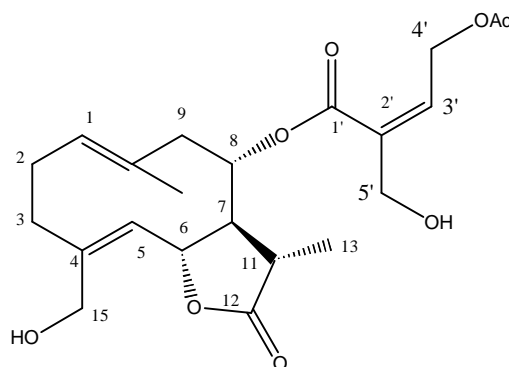


Composé 3

Il s'agit du 11 β , 13-dihydro-19 désoxycnicine, un gémacranolide déjà isolé de *C. pullata* par Benayache et al. (1992).

Composé 4: 8 α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)-11 β , 13-dihydrocnicine [4-acetoxy-2-hydroxymethyl-but-2-enoic acid 9-formyl-6-hydroxy-3,5a-dimethyl-oxo-dodecahydro-naphthol [1,2-b]furan-4-yl ester

Le composé **4** se présentait sous forme huileuse incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} + 30.64^\circ$ (MeOH; c 0.1180)

MALDI-HR-MS: $[M+H]^+$ à m/z 438.1967, compatible avec la formule moléculaire suivante : $C_{22}H_{30}O_9$ (438.1890).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3600-3300$ (OH), 1764 (C=O, γ -lactone, ester), 1712 cm^{-1} (C=O, acétate).

L'analyse des spectres de 1D (**Figure 22, Tableau 17**) & 2D RMN (**Figure 23-26**) nous a permis de constater qu'il s'agit d'un gémacranolide portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et al., 1970).

Le squelette central et la conformation du composé **4** sont identiques à ceux du composé **1**:

Dans la région oléfinique, nous avons constaté l'absence des signaux sous forme de deux doublets caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone.

Un signal caractéristique pour le type de sesquiterpène lactones ayant un groupe α -méthyle γ -lactone est celui du méthyle CH₃-13, qui apparaît dans la région du haut champ comme un doublet à δ 1.32 ($J = 7.0$).

Par conséquent de l'absence de la double liaison exo-cyclique 11-13, le proton H-7 apparaît sous forme de multiplet plus blindé (par rapport aux lactones sesquiterpéniques ayant le groupe α -méthylène γ -lactone) à δ 2.17. Les positions de ces protons ont été déterminées à partir du spectre COSY où le système spin H-13/H-11/H-7 a été observé.

Au spectre COSY (**Figure 23**), nous avons détecté les systèmes spin suivants (squelette central): H-1/H-2a,b/H-3a,b (système spin A), H-5/H-6/H-7/H-8/H-9a,b (système spin B), H-7/H-11/H-13 (système spin C) et H-15a/H-15b (système spin D).

Dans la région oléfinique, deux protons ont été identifiés à δ 4.96 (*dd*, $J = 4.5, 11.4$, H-1) et 4.71 (*d*, $J = 9.8$, H-5), correspondants aux carbones oléfiniques à δ 129.3 (C-1) et 128.7 (C-5) (spectres HMBC & HSQC).

De plus, dans la même région les protons suivants ont été observés:

- Le proton H-8 comme un triplet dédoublé à δ 5.28 ($J = 4.3, 9.4$), déblindé à cause de la chaîne latérale qu'il porte.
- Le proton H-6 comme un triplet à δ 5.00 ($J = 11.7$) un peu superposé par les protons H-4'a & H-4'b.

Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée nous avons distingué :

- Deux doublets à δ 4.27 ($J = 14.5$) et δ 4.05 ($J = 14.1$) qui ont été attribués aux protons géminaux H-15a et H-15b, respectivement.

Dans la région du haut champ, nous avons aussi constaté la présence d'un singulet à δ 1.46, qui a été attribué au méthyle CH₃-14 (signal HMBC avec C-10).

Dans le spectre HMBC, nous avons observé les signaux entre: C-10/H-1, H-9, H-14 & C-4/H-3, H-5, H-6, H-15.

Les signaux NOE entre CH₃-14/H-8/H-6 nous ont indiqué qu'ils tiennent la même orientation dans la molécule; de plus les interactions NOE entre H-7/CH₃-13 indiquent que ces derniers possèdent une orientation opposée.

Par comparaison au composé **1**, des signaux additionnels attribués aux protons de la chaîne latérale ont été aperçus:

- Un doublet à δ 5.6 ($J = 5.4$) attribué aux protons géminaux H-4'a et H-4'b.
- Un triplet à δ 4.43 ($J = 13.7$) attribué aux protons géminaux H-5'a et H-5'b.
- Un doublet dédoublé à δ 6.36 ($J = 5.1, 5.4$), attribué aux protons géminaux H-3'a et H-3'b.

Le reste des protons apparaissent dans la même région sous forme de multiplets.

Dans le spectre HMBC (**Figure 25**), nous avons observé les signaux entre les protons H-4'a, H-4'b et les carbones : C-2' (à δ 131.5), C-3' (à δ 140.4), ainsi qu'avec le carbonyle à δ 170.6 appartenant au groupe acétyle (à δ 2.08).

Au niveau du même spectre, nous avons observé les signaux entre les protons H-5'a, H-5'b (à δ 4.43) et les carbones : C-2' (à δ 131.5), C-3' (à δ 140.4).

Tableau 17: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **4**

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.96	1	<i>dd</i> ($J= 4.5, 11.4$)	H-1
2.24-2.12	1	<i>m</i>	H-2
2.53	1	<i>m</i>	H-3a
1.92	1	<i>td</i> ($J= 6.2, 12.1$)	H-3b
4.71	1	<i>d</i> ($J= 9.8$)	H-5
5.00	1	<i>t</i> ($J= 11.7$)	H-6
2.17	1	<i>m</i>	H-7
5.28	1	<i>td</i> ($J= 4.3, 9.4$)	H-8
2.55-2.41	1	<i>m</i>	H-9a
2.57	1	<i>m</i>	H-11
1.32	3	<i>d</i> ($J= 7.0$)	H-13
1.46	3	<i>s</i>	H-14
4.27	1	<i>d</i> ($J= 14.5$)	H-15a
4.05	1	<i>d</i> ($J= 14.1$)	H-15b
6.36	2	<i>dd</i> ($J= 5.1, 5.4$)	H-3'a, H-3'b
5.06	2	<i>d</i> ($J= 5.4$)	H-4'a, H-4'b
4.43	2	<i>t</i> ($J= 13.7$)	H-5'a, H-5'b
2.08	3	<i>s</i>	CH_3COO

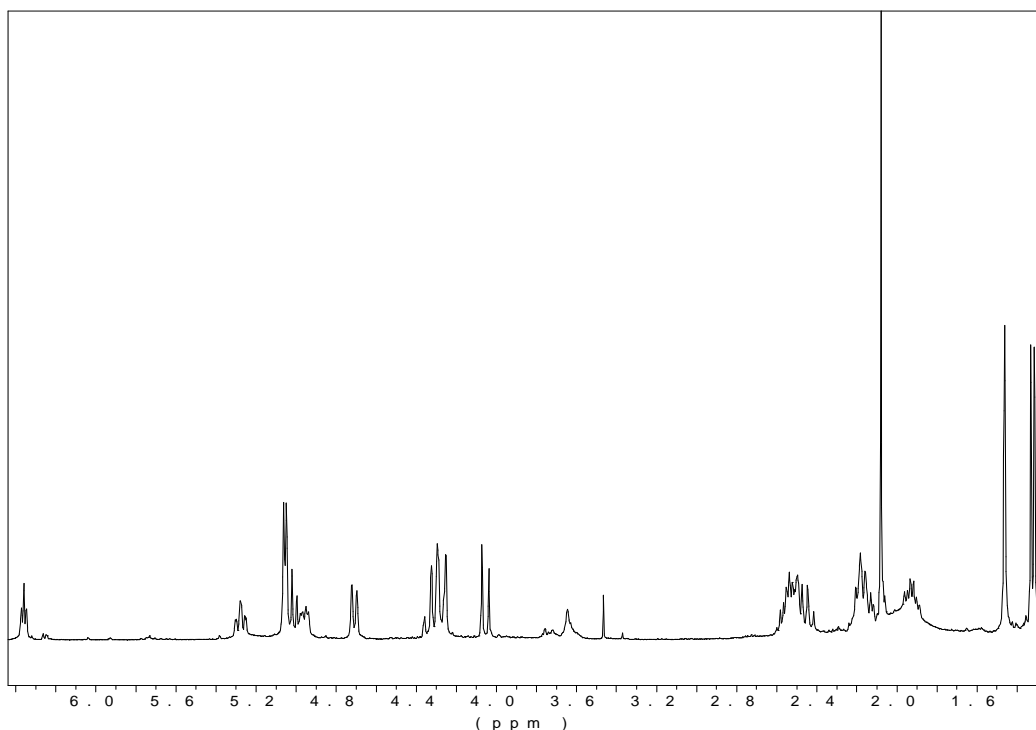


Figure 22: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **4**.

Tableau 18: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **4***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
129.3	CH	C-1
26.0	CH ₂	C-2
34.5	CH ₂	C-3
142.9	CH	C-4
128.7	CH	C-5
75.9	CH	C-6
57.9	CH	C7
73.6	CH	C-8
49.0	CH ₂	C-9
132.6	C	C-10
39.8	CH	C-11
177.8	C	C-12
16.9	CH ₃	C-13
16.5	CH ₃	C-14
61.3	CH	C-15
164.5	C	C-1'
131.5	C	C-2'
140.4	CH ₂	C-3'
62.7	CH ₂	C-4'
62.4	CH ₂	C-5'
170.6	C	COOCH ₃
20.7	CH ₃	COOCH ₃

* Assignements faits à l'aide de HSQC et HMBC

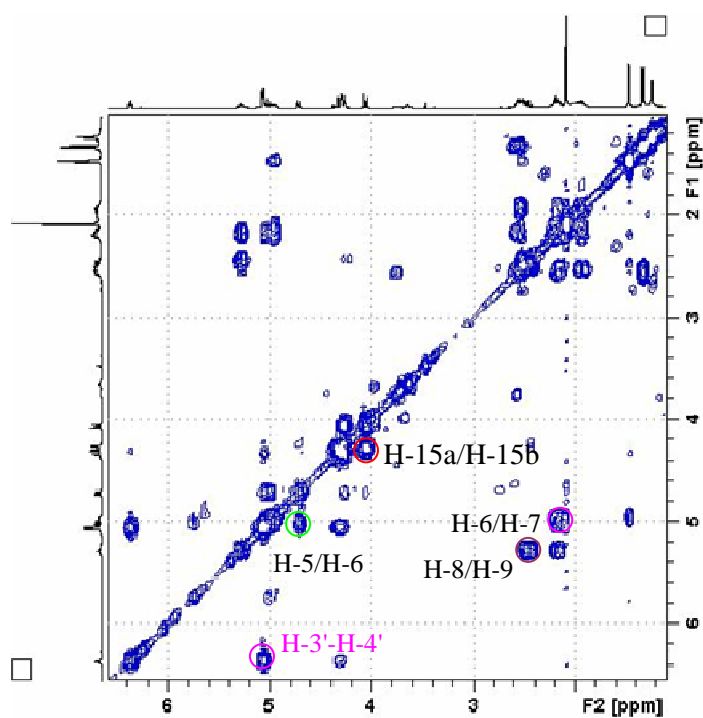


Figure 23: Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé **4**

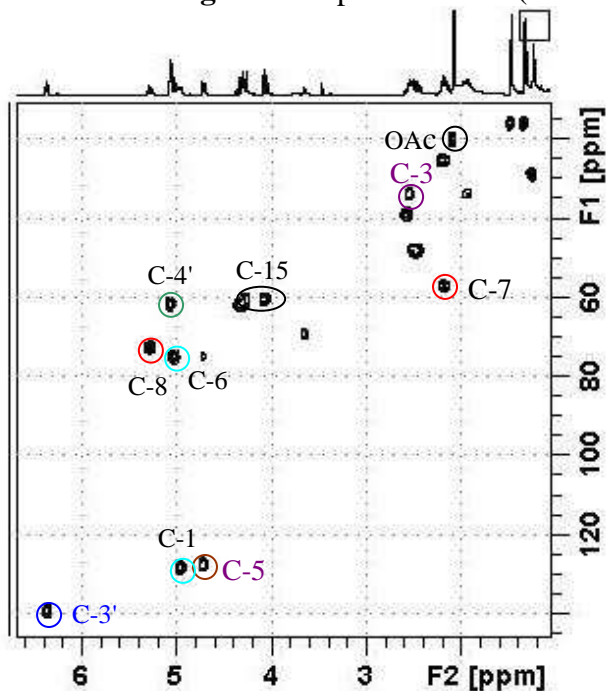


Figure 24: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé **4**

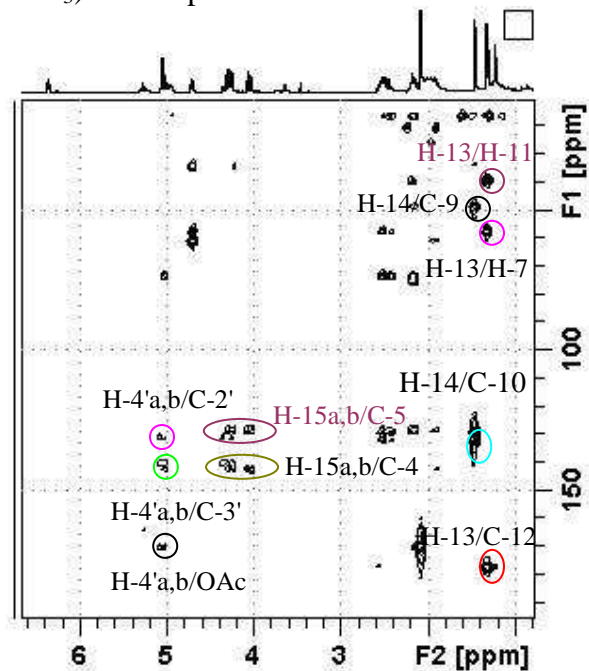


Figure 25: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé **4**

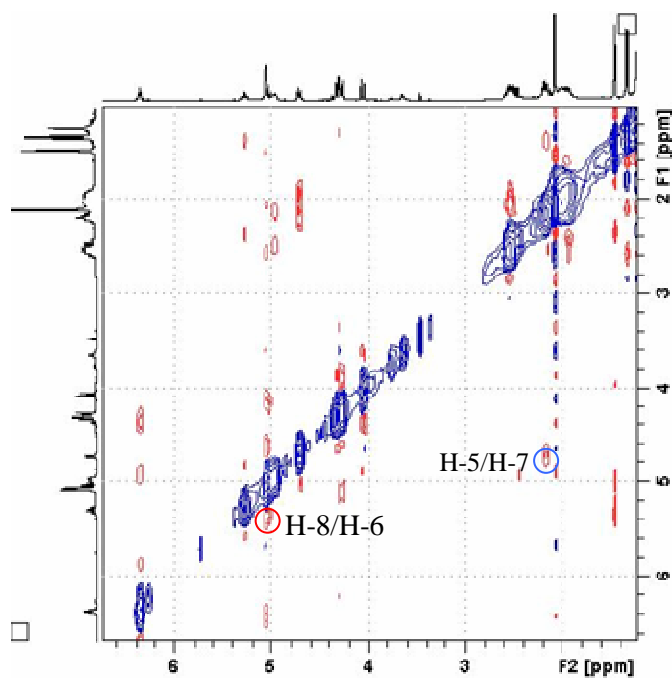


Figure 26: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl₃) du composé **4**

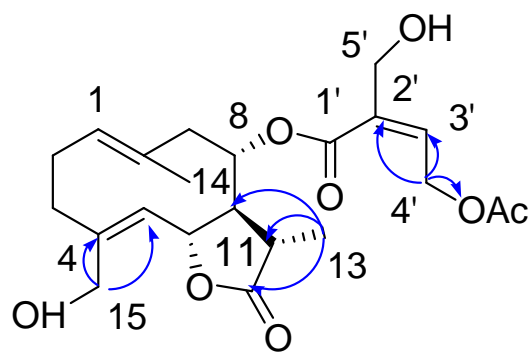
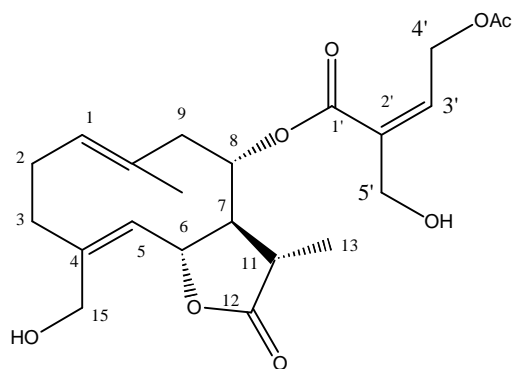


Figure 27: Corrélations HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé **4**

L'analyse des spectres nous a conduit à la structure suivante:

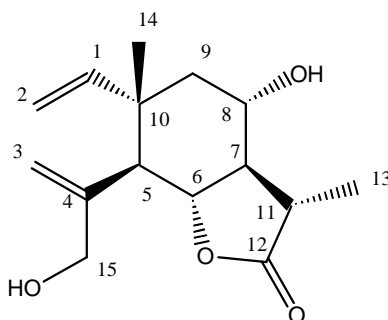


Composé 4

Il s'agit du 8α -O-(4-acétoxy-5-hydroxy-angeloyl)- 11β , 13-dihydrocnicine. Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. C'est donc un nouveau produit naturel (Djeddi et *al.*, 2007a).

Composé 5: Mélitensine

Le composé **5** se présentait sous forme de cristaux blancs soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +32.31^\circ$ (MeOH; c 0.08).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3400 (OH), 3090 (=C-H), 1747 (C=O, γ -lactone, ester), 1640 cm⁻¹ (C=C).

EI-MS (70eV): m/z 266 (C₁₅H₂₂O₄).

Au spectre ¹H-RMN (**Tableau 19**) nous avons constaté la présence de deux signaux singulets élargis typiques pour le squelette des élémanolides à δ 5.37 et 4.93 valant pour H-3a et H-3b, respectivement.

Dans la région oléfinique (**Figure 28**) apparaissent les signaux caractéristiques d'un groupe vinylique -CH=CH₂:

➤ Le proton H-1 sous forme de doublet dédoublé à δ 5.74 (J = 10.9, 17.6), qui se conjugue avec ses protons voisins H-2a (d , J = 11.0, *cis*-conjugaison) et H-2b (d , J = 17.6, *trans*-conjugaison).

➤ Le proton H-6 apparaît comme un triplet à δ 4.14 (J = 11.4). Son déplacement chimique indique la présence d'une fonction oxygénée au carbone correspondant.

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 3.95 (J = 3.9, 10.2).

➤ Le signal du proton H-7 apparaît comme un triplet de triplet à δ 1.73 (J = 10.5, 12.1) qui est une forme typique chez les élémanolides. Il se conjugue avec ses voisins H-6 et H-8 ayant deux grandes constantes de couplage; ce qui indique qu'il se trouve entre deux protons qui ont la même conformation dans l'espace (*trans*-diaxiale).

➤ Dans la même région deux doublets caractéristiques à δ 4.05 (J = 13.7) et 3.96 (J = 13.7) correspondent aux protons géminaux H-15a et H-15b respectivement.

➤ Le singulet intense qui intègre pour 3 protons à δ 1.09 avait été attribué au méthyle de la tête CH₃-14 lié au carbone C-10 du squelette.

L'analyse des spectres des 2D nous a permis de confirmer qu'il s'agit de mélitensine et pas de son isomère (iso-mélitensine), alors il est évident que la lactonisation est entre les carbones C-6 et C-12. Par la combinaison des informations des spectres COSY (**Figure 30**) et HSQC (**Figure 31**), il est évident que le carbone le plus déblindé est celui qui est entre deux méthines (C-5 & C-7) et pas entre un méthine (C-7) et un méthylène (C-9).

Les valeurs des constantes de couplages à partir du proton H-5 jusqu'au proton H-8 nous indiquent que les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 ont une *trans*-disposition. Cela a été confirmé par le spectre NOESY (**Figure 33**) où les signaux suivants ont été observés:

- CH₃-14/H-2a, CH₃-14/H-3b, CH₃-14/H-6
- H-7/H-5
- H-5/H-9a, H-5/H-15b
- H-6/H-11, H-6/H-15a
- H-11/H-13

Tableau 19: Valeurs ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**

δ (ppm)	n $^\circ\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
5.74	1	<i>dd</i> ($J = 10.9, 17.6$)	H-1
5.00	1	<i>d</i> ($J = 11.0$)	H-2a
4.97	1	<i>d</i> ($J = 17.6$)	H-2b
5.37	1	<i>s</i>	H-3a
4.93	1	<i>s</i>	H-3b
2.38	1	<i>d</i> ($J = 11.7$)	H-5
4.14	1	<i>t</i> ($J = 11.4$)	H-6
1.73	1	<i>tt</i> ($J = 10.5, 12.1$)	H-7
3.95	1	<i>td</i> ($J = 3.9, 10.2$)	H-8
1.81	1	<i>dd</i> ($J = 3.9, 12.9$)	H-9a
1.59	1	<i>dd</i> ($J = 10.9, 12.5$)	H-9b
2.59	1	<i>dd</i> ($J = 12.0, 12.1$)	H-11
1.37	1	<i>d</i> ($J = 6.7$)	H-13
1.09	3	<i>s</i>	H-14
4.05	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15a
3.96	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15b

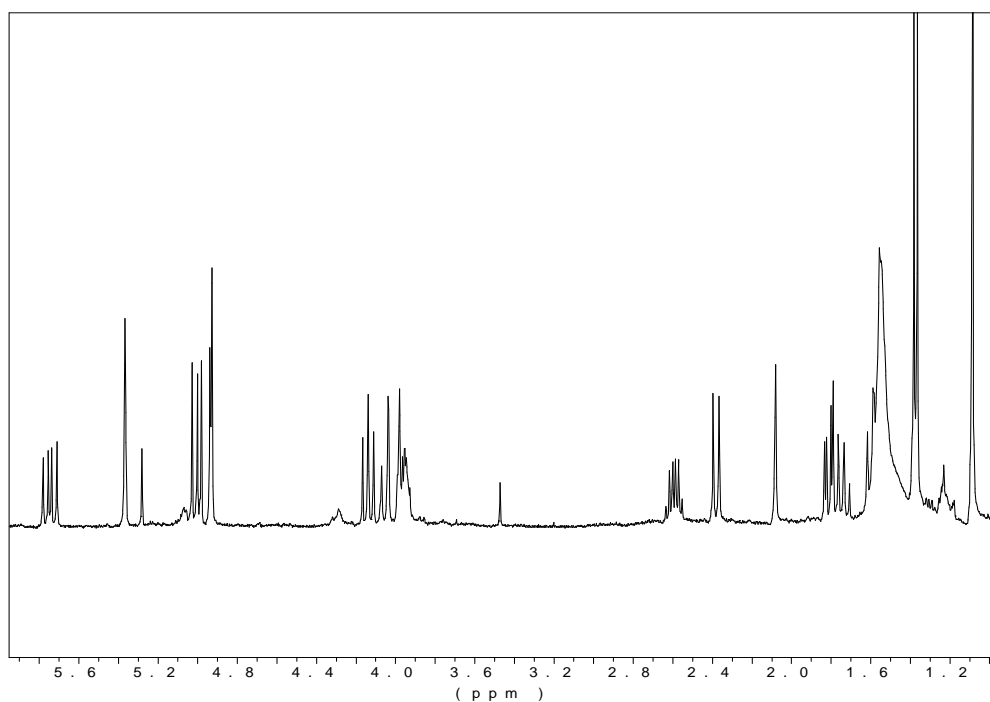


Figure 28: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**.

Tableau 20: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **5**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
145.9	CH	C-1
112.5	CH_2	C-2
114.5	CH_2	C-3
144.4	C	C-4
50.3	CH	C-5
78.7	CH	C-6
58.3	CH	C7
68.8	CH	C-8
49.4	CH_2	C-9
41.5	C	C-10
41.1	CH	C-11
178.9	C	C-12
14.1	CH_3	C-13
19.1	CH_3	C-14
67.3	CH_2	C-15

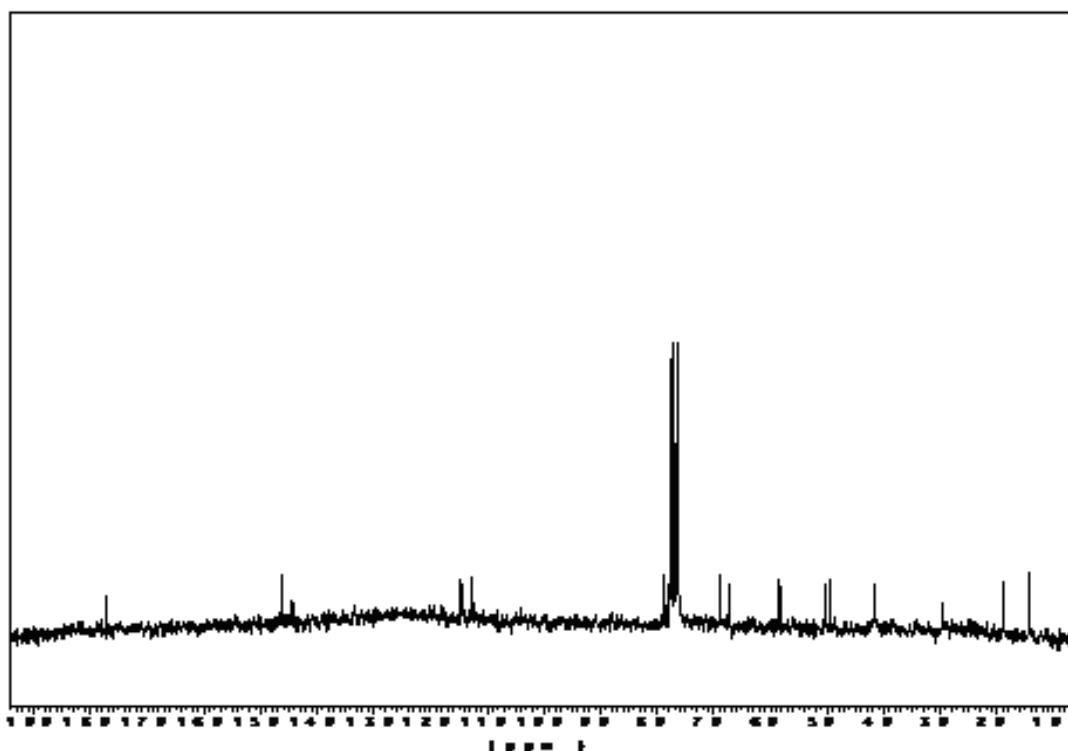


Figure 29: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **5**

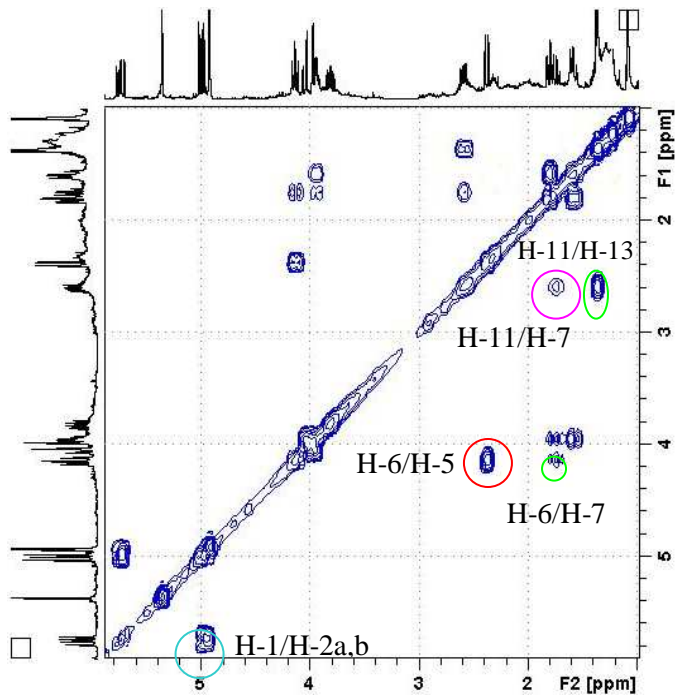


Figure 30: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**

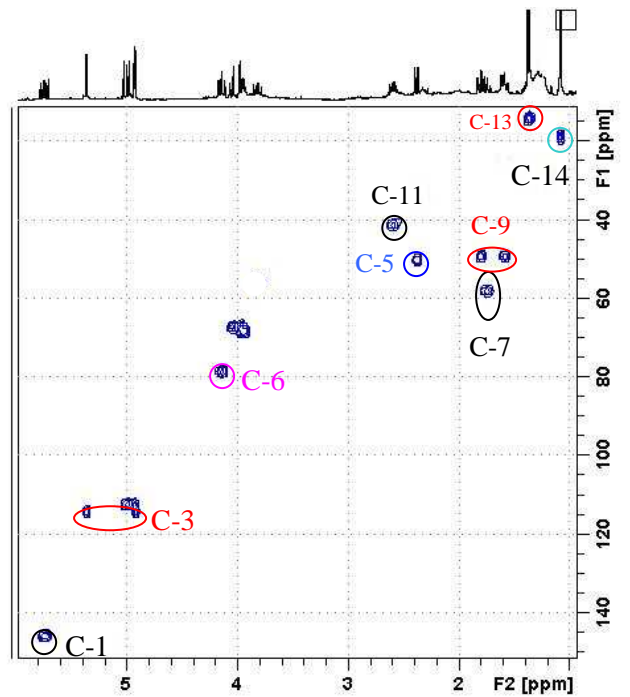


Figure 31: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**

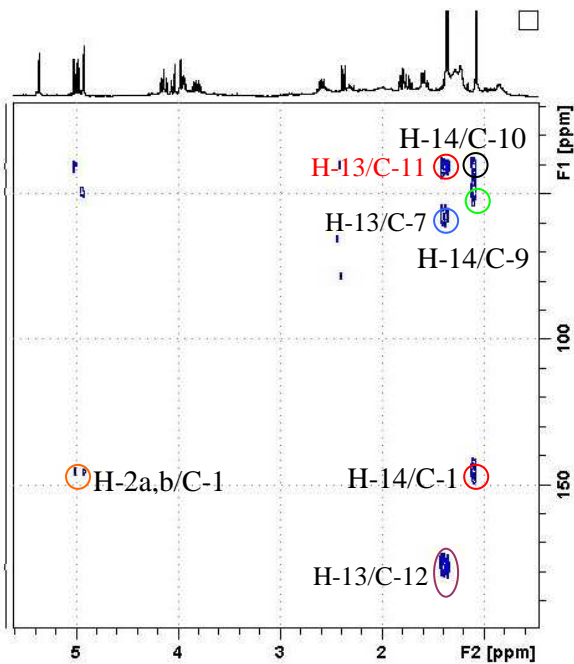


Figure 32: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**

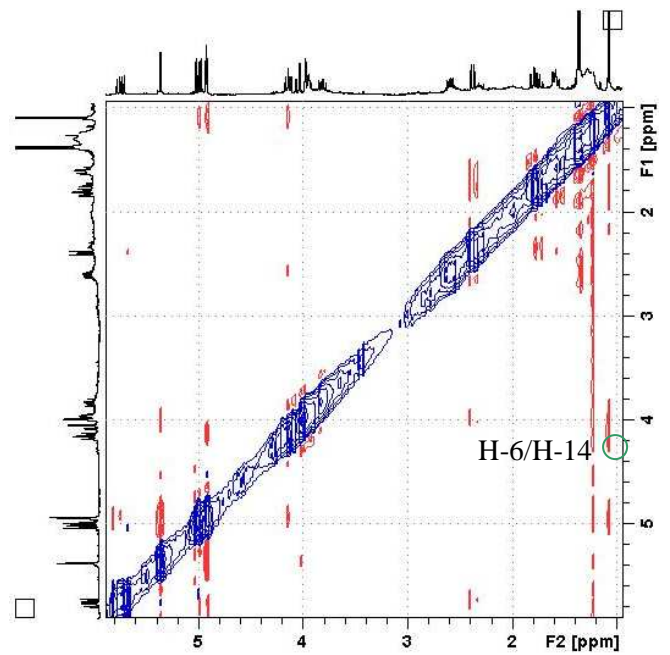
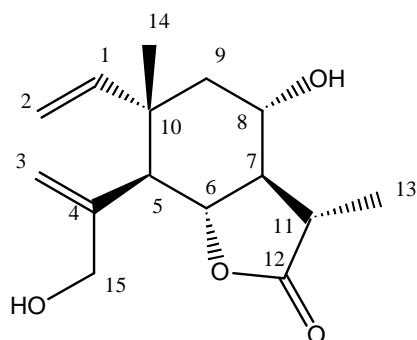


Figure 33: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **5**

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats avec ceux de la littérature (González et *al.*, 1974) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



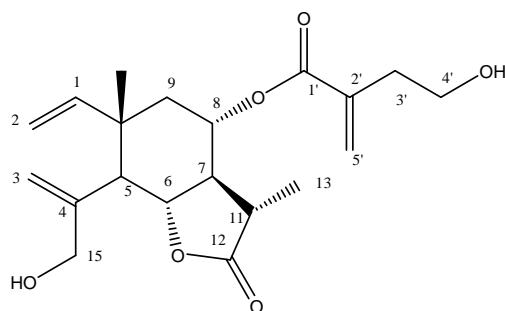
Composé 5

Il s'agit du mélitensine, ce composé a été isolé la première fois chez *Centaurea melitensis* par González et *al.* (1974), par la suite il a été isolé de *C. aspera* (Cardona et *al.*, 1991), *C. napifolia* (Bruno et *al.*, 1995), *C. calcitrapa* (Marco et *al.*, 1992), *C. nicaensis* (Medjroubi et *al.*, 2003), *C. aspera* var. *stenophylla* (Tortajada et *al.*, 1988) et de *C. phrygia* (Tsankova et Ognyanov, 1985).

Composé 6: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) mélitensine

[(3*S*,3*aR*,4*S*,6*S*,7*aR*)-7-(1-hydroxyprop-2-en-2-yl)-3,6-diméthyl-2-oxo-6-vinyl-octahydro-benzofuran-4-yl 4-hydroxy-2-méthylènebutanoate]

Le composé **6** se présentait sous forme huileuse de couleur violette très claire soluble dans le chloroforme.



$[a]_D^{20} +15.0^\circ$ (MeOH; *c* 0.10)

IR (CaF₂): ν_{\max} = 2911 (OH), 1757 (C=O, γ -lactone, ester)

HR-ESI-MS m/z 387.1777 [M+Na]⁺, compatible avec la formule moléculaire suivante:

C₂₀H₂₈O₆ [calculé 364.1878 [M]⁺, 387.1776 [M+Na]⁺ (Δ : + 0.01 mmu)]

Au spectre ¹H-RMN (**Figure 21**) nous avons constaté la présence de deux signaux singulets élargis typiques pour le squelette des élémanolides à δ 5.39 et 4.96 valant pour H-3a et H-3b, respectivement. Dans la région oléfinique apparaissent les signaux caractéristiques d'un groupe vinylique –CH=CH₂:

➤ Le proton H-1 apparaît sous forme de doublet dédoublé à δ 5.74 (J = 11.0, 17.2) et se conjugue avec les protons H-2a (J = 11.0, *cis*-conjugaison) et H-2b (J = 16.8, *trans*-conjugaison); ces derniers apparaissent comme des doublets à δ 5.03 et 4.98, respectivement.

➤ Le proton H-6 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 4.25 (J = 11.0, 11.3). Le déplacement du proton H-6 indique la présence d'une fonction oxygénée au carbone correspondant.

➤ Le signal du proton H-7 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.00 (J = 10.9, 11.8). Ce proton se conjugue avec ses voisins H-6 et H-8 ayant la même constante de couplage, qui montre que les angles diédral entre les protons H-6 et H-7 d'une part et les protons H-8 et H-7 d'autre part ont la même valeur. Par conséquence le proton H-7 se trouve entre deux protons (H-6 et H-8) qui ont la même conformation dans l'espace (J = 11.8, *trans*-diaxiale).

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.17 ($J= 3.9, 11.0$). Son déplacement indique aussi la présence d'une fonction oxygénée au carbone correspondant. Dans la même région, deux doublets caractéristiques à δ 4.07 ($J= 14.1$, H-15a) et à δ 3.96 ($J= 13.7$, H-15b) ont été attribués aux protons géminaux H-15a et H-15b du groupe hydroxyméthyle.

Le singulet intense à champ bas (δ 1.16), qui intègre pour 3 protons, a été attribué au méthyle de la tête CH₃-14 lié au carbone C-10 du squelette.

Les protons de la chaîne latérale apparaissent:

- Les protons géminaux H-3'a, H-3'b à δ 2.56 comme doublet dédoublé ($J= 6.2, 5.8\text{Hz}$)
- Les protons géminaux H-4'a et H-4'b à δ 3.76 comme doublet dédoublé ($J= 6.3, 5.7\text{Hz}$)
- Les protons H-5'a et H-5'b comme singulets à δ 6.25 et 5.73, respectivement.

Tableau 21: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **6**.

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
5.74	1	<i>dd</i> ($J = 11.0, 17.2$)	H-1
5.03	1	<i>d</i> ($J = 11.0$)	H-2a
4.98	1	<i>d</i> ($J = 16.8$)	H-2b
5.39	1	<i>se</i>	H-3a
4.96	1	<i>se</i>	H-3b
2.43	1	<i>d</i> ($J = 11.8$)	H-5
4.25	1	<i>dd</i> ($J = 11.0, 11.3$)	H-6
2.00	1	<i>dd</i> ($J = 10.9, 11.8$)	H-7
5.17	1	<i>td</i> ($J = 3.9, 11.0$)	H-8
1.92	1	<i>dd</i> ($J = 3.9, 12.5$)	H-9a
1.67	1	<i>dd</i> ($J = 11.7, 12.5$)	H-9b
2.63	1	<i>dq</i> ($J = 6.6, 12.1$)	H-11
1.22	3	<i>d</i> ($J = 6.6$)	H-13
1.16	3	<i>s</i>	H-14
4.07	1	<i>d</i> ($J = 14.1$)	H-15a
3.96	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15b
2.56	2	<i>dd</i> ($J = 6.2, 5.8$)	H-3'a, H-3'b
3.75	2	<i>dd</i> ($J = 6.3, 5.7$)	H-4'a, H-4'b
6.25	1	<i>se</i>	H-5'a
5.73	1	<i>se</i>	H-5'b

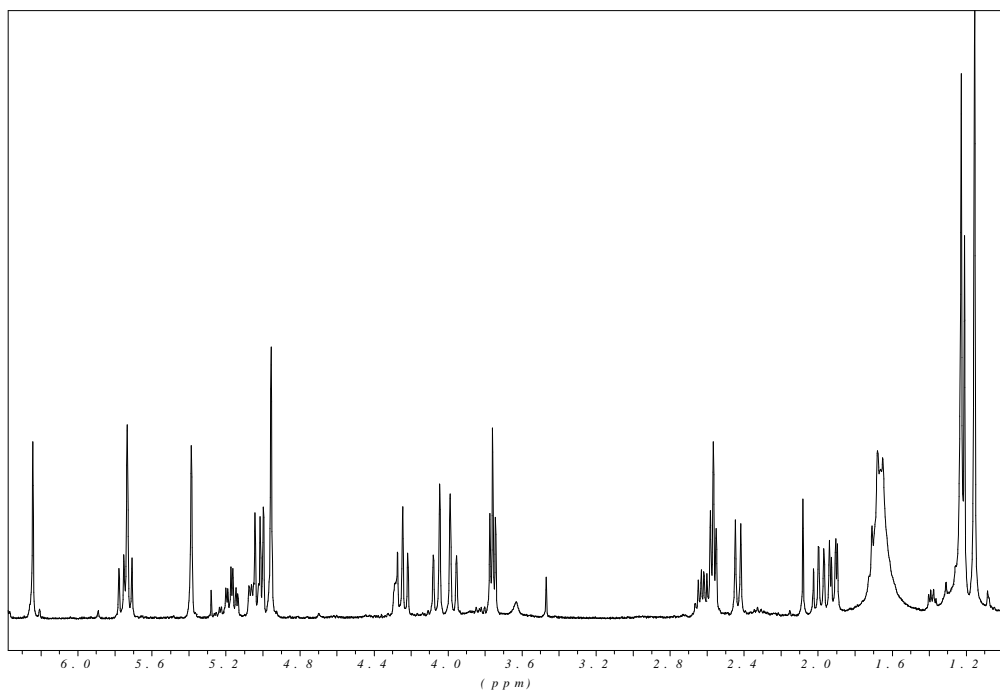


Figure 34: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **6**

Tableau 22: Valeurs de ^{13}C -RMN du composé **6***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
145.6	CH	C-1
112.8	CH ₂	C-2
114.6	CH ₂	C-3
144.0	C	C-4
50.1	CH	C-5
78.2	CH	C-6
55.9	CH	C-7
70.4	CH	C-8
44.8	CH ₂	C-9
41.1	C	C-10
40.8	CH	C-11
178.1	C	C-12
13.8	CH ₃	C-13
18.5	CH ₃	C-14
67.1	CH ₂	C-15
166.0	C	C-1'
136.6	C	C-2'
35.0	CH ₂	C-3'
61.3	CH ₂	C-4'
127.8	CH ₂	C-5'

*Assignements faits à l'aide de HSQC & HMBC.

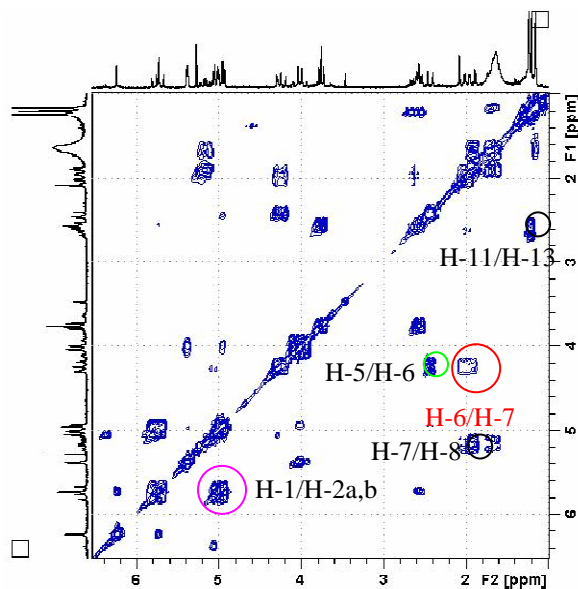


Figure 35: Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé **6**

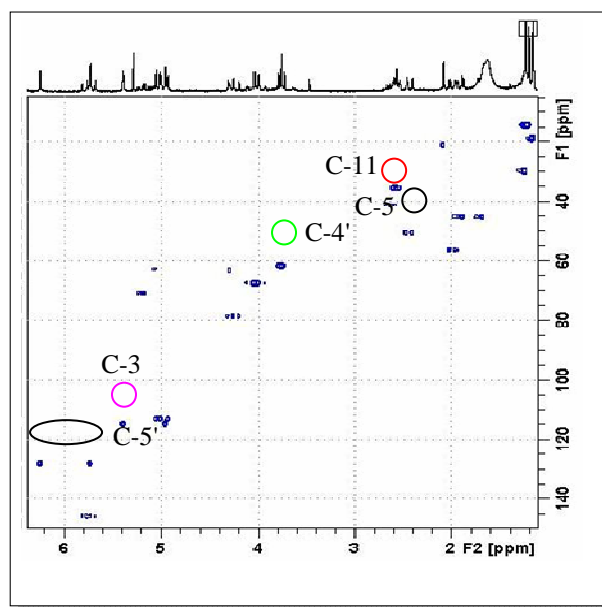
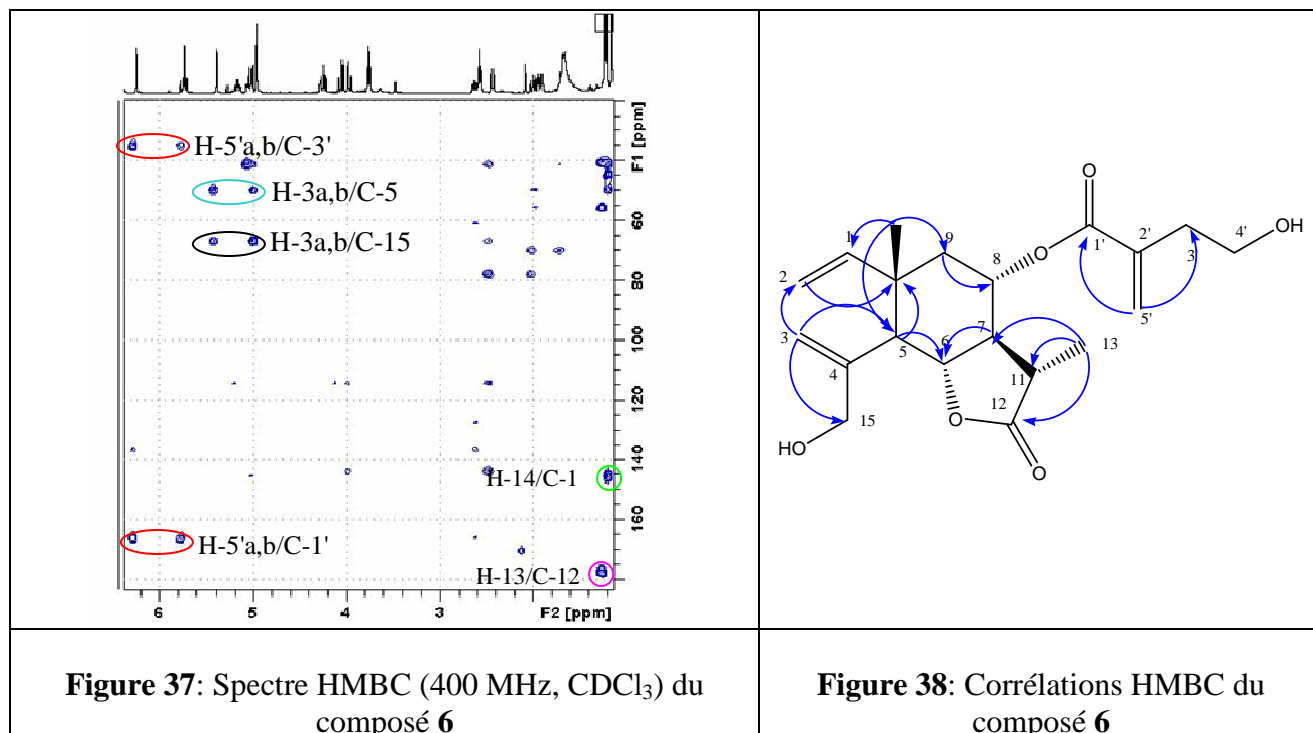


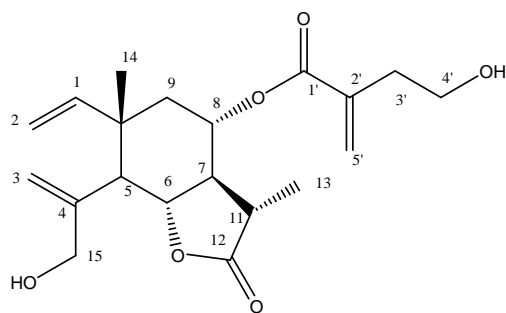
Figure 36: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé **6**.



Selon le spectre HMBC (**Figure 37**), nous avons noté les signaux de corrélations entre :

- Le méthyle CH_3 -14 (1.16) avec les carbones C-1 (145.6), C-5 (50.1) et C-9 (44.8).
- Le méthyle CH_3 -13 (1.22) avec les carbones C-7 (55.9), C-11 (40.8) et C-12 (178.1).
- Les protons H-2a, 2b (5.03, 4.98) avec le carbone C-10 (41.1).
- Les protons H-3a, 3b (5.39, 4.96) avec les carbones C-5 (50.1) et C-15 (67.1).
- Le proton H-5 (2.43) avec les carbones C-3 (114.6), C-6 (78.2) et C-10 (41.1).
- Le proton H-7 (2.00) avec le carbone C-6 (78.2).
- Les protons H-9a, 9b (1.92, 1.67) avec le carbone C-8 (70.4).
- Les protons H-15a, 15b (4.07, 3.96) avec le carbone C-3 (114.6).
- Les protons H-3a', 3b' (2.56) avec le carbone C-2' (136.6).
- Les protons H-5a', 5b' (6.25, 5.73) avec les carbones C-1' (166.0) et C-3' (35.0).

L'analyse des spectres nous a conduit à la structure suivante:

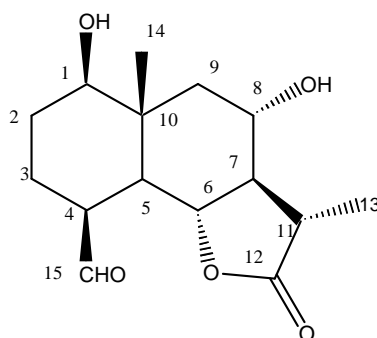


Composé 6

Il s'agit de la 8α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy) mélitensine. Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. C'est donc un nouveau produit naturel.

Composé 7: 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-4- ϵ pi sonchucarpolide

Le composé 7 se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +38.18^\circ$ (MeOH; c 0.11)

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3590 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 1769 cm^{-1} (C=O, γ -lactone), 1708 cm^{-1} (CHO).

EI-MS (70eV): m/z 282 (C₁₅H₂₂O₅).

Les spectres ¹H-RMN (**Figure 39** et **Tableau 23**) et ¹³C-RMN (**Tableau 24**) nous ont fourni des indications sur la présence d'une décaline qui contient un anneau lactonique (Garcia et *al.*, 1996; Kasymov, 1982; Rustaiyan et *al.*, 1986).

Les signaux suivants ont été observés:

➤ Par les spectres ¹³C-NMR et HSQC nous avons constaté que le C-6 (δ 76.0) est plus déblindé que le C-8 (δ 68.9); ces valeurs sont révélatrices que la lactonisation a lieu entre les carbones des positions C-6 & C-12.

➤ Le méthyle de la tête de l'eudesmanolide (CH₃-14) apparaît comme un singulet intégrant pour trois protons à δ 0.83.

➤ Le proton du groupe aldéhyde attaché au carbone C-4 apparaît comme un singulet à δ 9.92. L'absence d'une conjugaison avec le proton H-4, nous indique que le groupe aldéhyde est placé axialement.

➤ Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 3.36 ($J = 4.3, 11.4$). Son déplacement chimique est indicatif de la présence d'une fonction oxygénée au C-1.

➤ Le proton H-4 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.73 ($J = 5.8, 6.7$)

A la région oléfinique, les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone sont absents. Un doublet dans la région du haut champ à δ 1.39 ($J = 6.6 \text{ Hz}$) intégrant pour trois protons est indicatif de la présence d'un méthyle sur méthine caractéristique du groupe α -méthyle γ -lactone.

➤ Le proton H-7 (C-7 δ 59.0) apparaît comme un multiplet à δ 1.66 à cause de sa conjugaison avec les protons H-6, H-8 et H-11. Le proton H-6 (C-6 δ 76.0) apparaît comme un triplet dédoublé à δ 4.41 ($J= 10.6, 12.1$), car il se conjugue avec ses protons voisins H-5 et H-7

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet de triplet à δ 3.96 ($J= 4.3, 10.6$) à cause de sa conjugaison avec les protons H-7, H-9a et H-9b.

Le proton H-8 est blindé par rapport au proton H-6; cela est dû d'une part à l'absence d'une chaîne latérale et d'autre part au fait que la lactonisation est entre C-6 & C-12.

➤ Le proton H-5 (C-5 δ 48.1) apparaît comme un doublet dédoublé à δ 1.87 ($J= 5.8, 12.1$) et se conjugue avec ses protons voisins H-4 et H-6. Ces conjugaisons sont confirmées par COSY (**Figure 40**).

Les valeurs des constantes de couplages à partir du proton H-5 jusqu'au proton H-8 nous indiquent que les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 ont une *trans*-disposition.

Par les spectres ^{13}C -NMR (Tableau C-7) et HSQC, nous avons dénombré 15 carbones (2C, 8CH, 3CH₂ et 2CH₃).

Dans la région où apparaissent les carbones voisins à une fonction oxygénée trois signaux sont aperçus : C-1 (δ 77.9), C-6 (δ 76.0), C-8 (δ 68.9). Le signal à δ 201.1 est indicatif d'un groupe aldéhyde (C-15).

Tableau 23: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **7**

δ (ppm)	n $^\circ\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.36	1	<i>dd</i> ($J = 4.3, 11.4$)	H-1
1.70	1	<i>dd</i> ($J = 3.9, 10.6$)	H-2a
1.59	1	<i>d</i> ($J = 3.9$)	H-2b
2.41	1	<i>dq</i> ($J = 11.6, 4.3$)	H-3a
1.54	1	<i>dd</i> ($J = 4.3, 11.3$)	H-3b
2.73	1	<i>dd</i> ($J = 5.8, 6.7$)	H-4
1.87	1	<i>dd</i> ($J = 5.8, 12.1$)	H-5
4.41	1	<i>td</i> ($J = 10.6, 12.1$)	H-6
1.66	1	<i>m</i>	H-7
3.96	1	<i>tt</i> ($J = 4.3, 10.6$)	H-8
2.28	1	<i>dd</i> ($J = 4.3, 12.9$)	H-9a
1.23	1	<i>t</i> ($J = 12.1$)	H-9b
2.64	1	<i>dq</i> ($J = 6.6, 12.1$)	H-11
1.39	3	<i>d</i> ($J = 6.6$)	H-13
0.83	3	<i>s</i>	H-14
9.92	1	<i>s</i>	H-15

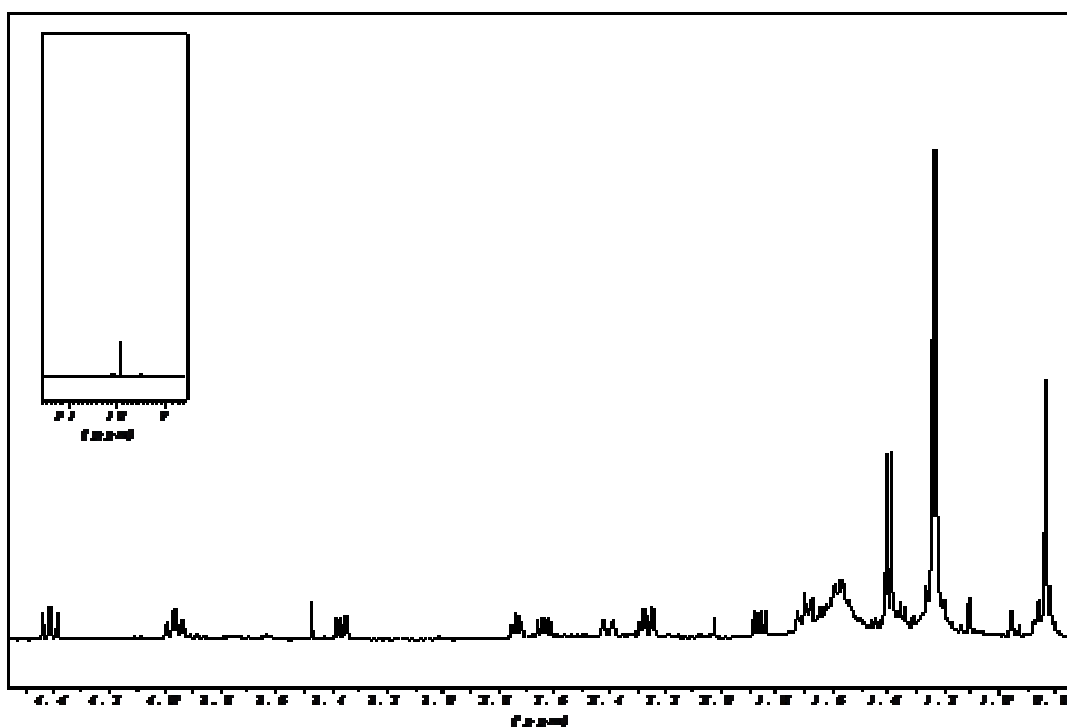


Figure 39: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **7**.

Tableau 24: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **7***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
77.9	CH	C-1
27.3	CH ₂	C-2
22.2	CH ₂	C-3
45.2	CH	C-4
48.1	CH	C-5
76.0	CH	C-6
59.0	CH	C7
68.9	CH	C-8
48.2	CH ₂	C-9
41.0	C	C-10
41.6	CH	C-11
178.5	C	C-12
14.6	CH ₃	C-13
13.7	CH ₃	C-14
201.1	CH	C-15

* Assignements faits à l'aide de HSQC et HMBC.

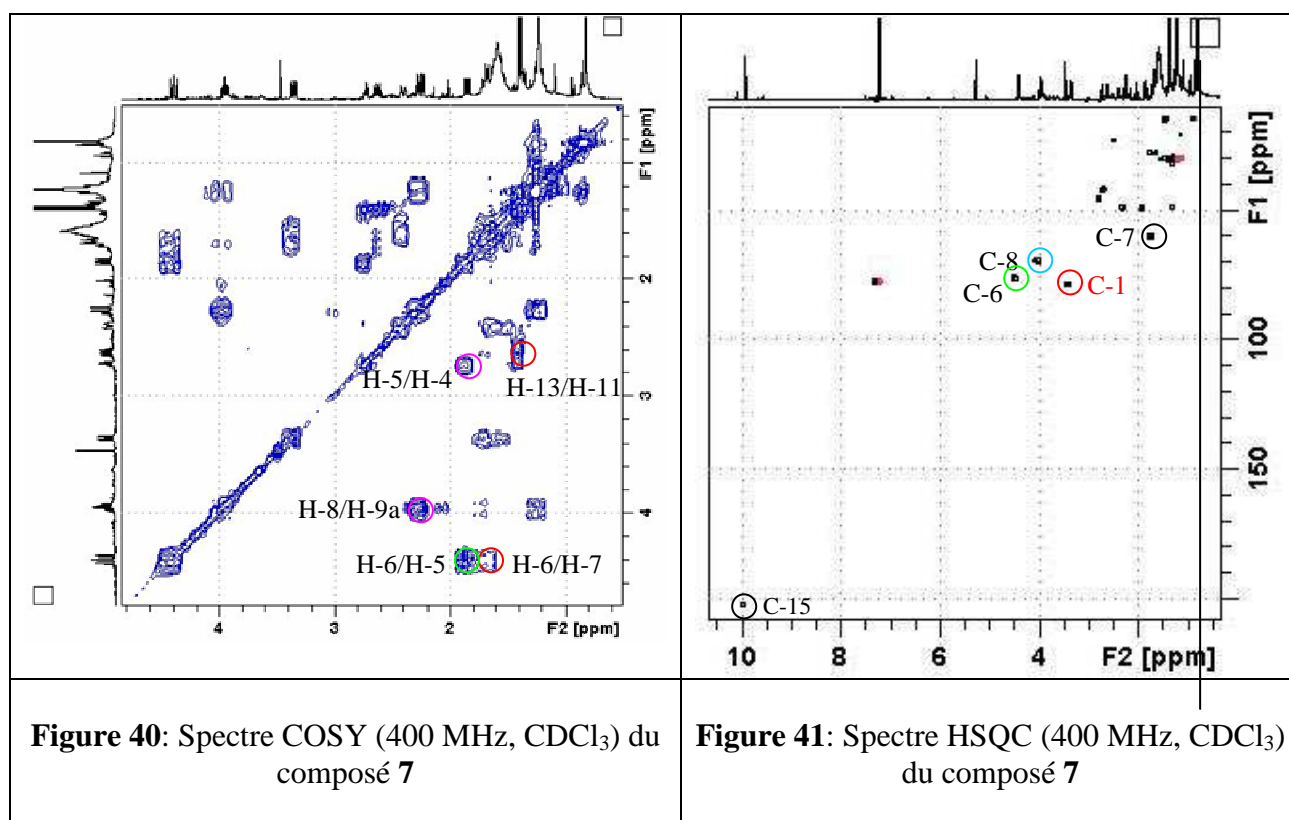
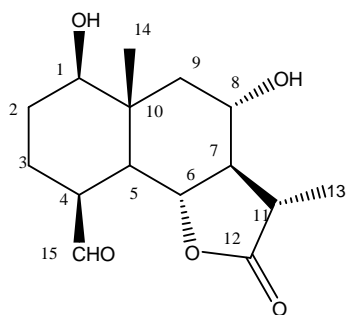


Figure 40: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **7**

Figure 41: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **7**

L'analyse des spectres nous a permis d'attribuer au composé **7** la structure suivante:

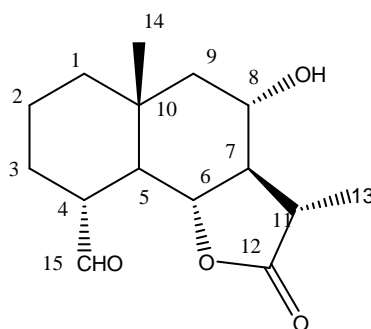


Composé 7

Il s'agit du 8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-4-*épi*-sonchucarpolide, un eudesmanolide isolé pour la première fois de *Onopordum sibthorpiatum* (Lazari et al., 1998).

Composé 8: 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-onopordaldéhyde

Le composé **8** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +2.73^\circ$ (MeOH; c 0.11).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3346 \text{ cm}^{-1}$ (-OH), 1770 cm^{-1} (γ -lactone), 1707 cm^{-1} (aldéhyde).

EI-MS (70eV): m/z 282 (C₁₅H₂₂O₅).

Les spectres ¹H-RMN (**Figure 42** et **Tableau 25**) et ¹³C-RMN (**Tableau 26**) nous ont fourni des indications sur la présence d'une décaline portant d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982).

Les signaux suivants ont été observés:

➤ Par les spectres ¹³C-NMR et HSQC (**Figure 44**), nous avons constaté que le C-6 (δ 79.1) est plus déblindé que le C-8 (δ 68.2); ces valeurs sont révélatrices que la lactonisation a lieu entre les carbones des positions C-6 & C-12.

➤ A la région oléfinique du spectre ¹H-NMR, les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone sont absents. Un doublet dans la région du haut champ à δ 1.35 ($J= 5.9$ Hz) intégrant pour trois protons est indicatif de la présence d'un méthyle sur méthine et il est caractéristique du groupe α -méthyle γ -lactone.

➤ Le méthyle de la tête de l'eudesmanolide (CH₃-14) apparaît aussi dans la région du haut champ à δ 0.97 comme un singulet intégrant pour trois protons.

➤ Le proton du groupe aldéhyde au carbone C-4 apparaît comme un doublet ($J= 4.3$) à δ 9.54 (au cas de la substance **7**, ce proton apparaît comme singulet à δ 9.92). Cette petite constante de couplage ($J=4.3$) est due au fait que l'aldéhyde tient une orientation équatoriale, et cela lui permet de présenter une conjugaison avec le proton H-4 (placé axialement) (Rustaiyan et *al.*, 1986; Mahmoud et *al.*, 1983).

➤ Les protons géminaux H-1a & H-1b (C-1 δ 25.9) apparaissent dans la région du haut champ comme deux multiplets à δ 1.71 et 1.42. Leurs déplacements chimiques montrent que le carbone C-1 ne porte pas une fonction oxygénée.

➤ Le proton H-4 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.42 ($J= 4.3, 12.1$) à cause de sa conjugaison avec les protons H-5 et H-15 de l'aldéhyde attaché au C-4. Ces conjugaisons sont confirmées par COSY (**Figure 43**).

➤ Le proton H-5 (C-5 δ 48.0) apparaît comme un doublet dédoublé à δ 1.43 ($J= 4.3, 11.7$) et se conjugue avec ses protons voisins H-4 et H-6 (COSY, **Figure 43**).

➤ Le proton H-7 (C-7 δ 59.2) apparaît comme un multiplet à δ 1.75 à cause de sa conjugaison avec les protons H-6, H-8 et H-11 (COSY, **Figure 43**).

➤ Le proton H-6 (C-6 δ 79.1) apparaît comme un triplet à δ 3.78 ($J= 10.9$); il se conjugue avec ses protons voisins H-5 et H-7 (COSY, **Figure 43**).

➤ Le proton H-8 (C-8 δ 68.2) apparaît comme un triplet dédoublé à δ 3.98 ($J= 3.9, 10.9$) à cause de sa conjugaison avec les protons H-7, H-9a et H-9b.

Les valeurs des constantes de couplages à partir du proton H-5 jusqu'au proton H-8 nous indiquent que les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 ont une *trans*-disposition entre eux.

Par les spectres ^{13}C -NMR (Tableau C-8) et HSQC, nous avons dénombré 15 carbones (2C, 8CH, 3CH₂ et 2CH₃).

Dans la région où apparaissent les carbones voisins à une fonction oxygénée deux signaux sont aperçus : C-6 (δ 79.1) et C-8 (δ 68.2). Le signal à δ 202.0 est indicatif d'un groupe aldéhyde (C-15).

Tableau 25: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **8**

δ (ppm)	n $^\circ$ H	Multiplicité, J (Hz)	Position
1.71	1	<i>m</i>	H-1a
1.42	1	<i>m</i>	H-1b
1.67	2	<i>m</i>	H-2a, H-2b
*	1	<i>m</i>	H-3a
1.28	1	<i>m</i>	H-3b
2.42	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 12.1$)	H-4
1.43	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 11.7$)	H-5
3.78	1	<i>t</i> ($J= 10.9$)	H-6
1.75	1	<i>m</i>	H-7
3.98	1	<i>td</i> ($J= 3.9, 10.9$)	H-8
1.85	1	<i>dd</i> ($J= 3.9, 12.5$)	H-9a
1.31	1	<i>de</i> ($J= 11.7$)	H-9b
2.51	1	<i>d</i> ($J= 6.3$)	H-11
1.35	3	<i>d</i> ($J= 5.9$)	H-13
0.97	3	<i>s</i>	H-14
9.54	1	<i>d</i> ($J= 4.3$)	H-15

* Signal non distingué

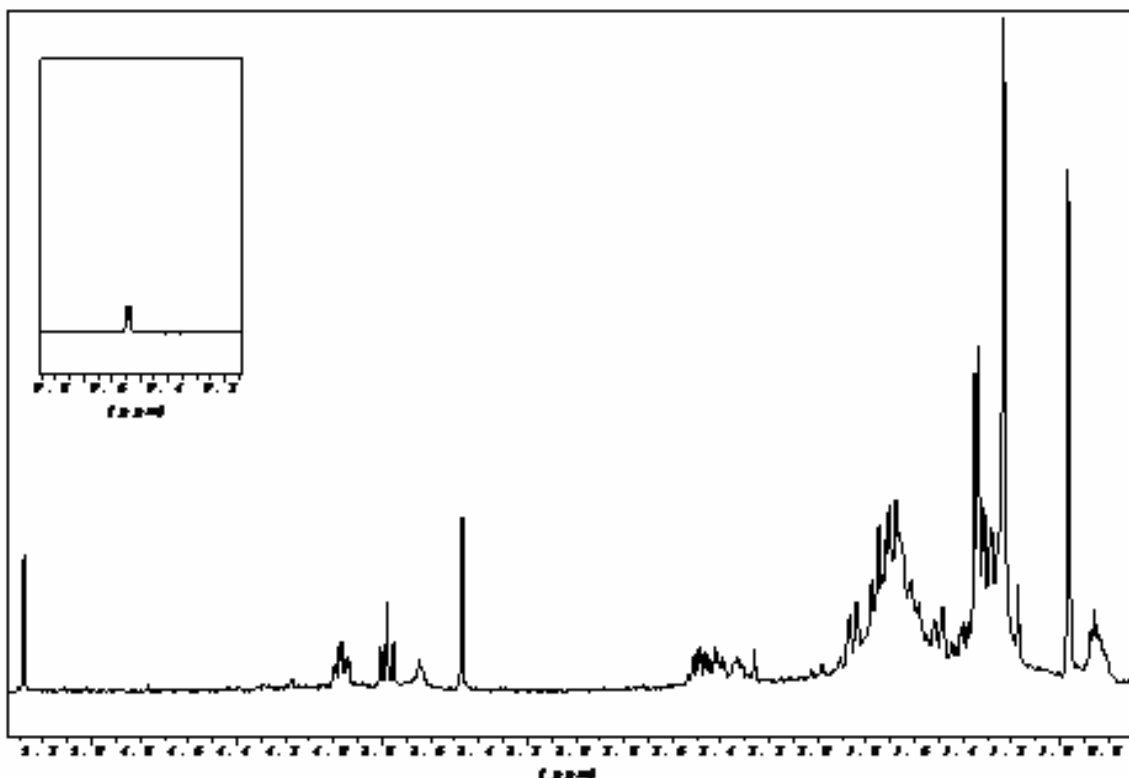


Figure 42: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **8**.

Tableau 26: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **8***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
25.9	CH	C-1
19.1	CH_2	C-2
40.2	CH_2	C-3
48.7	CH	C-4
48.0	CH	C-5
79.1	CH	C-6
59.2	CH	C7
68.2	CH	C-8
51.2	CH_2	C-9
-	C	C-10
41.2	CH	C-11
-	C	C-12
14.3	CH_3	C-13
19.1	CH_3	C-14
202.0	CH	C-15

* Assignements faits à l'aide de HSQC (C-10 et C-12 ne peuvent être observés, puisqu'ils sont quaternaires).

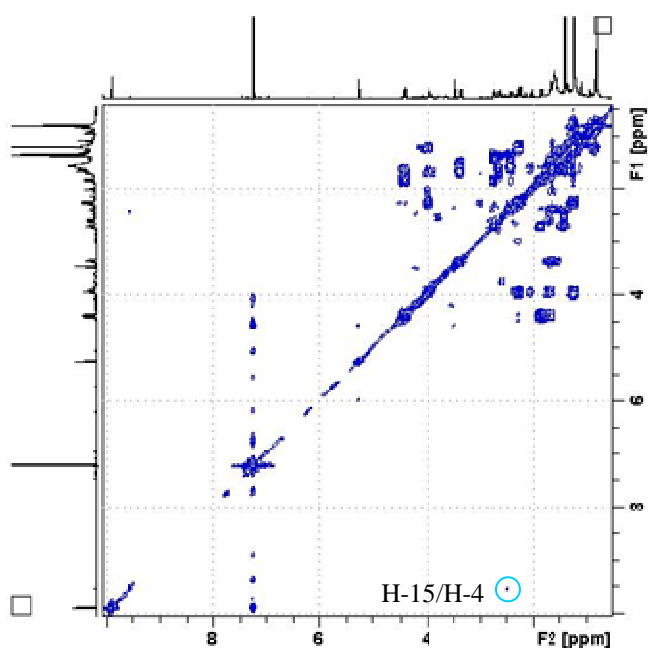


Figure 43: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **8**.

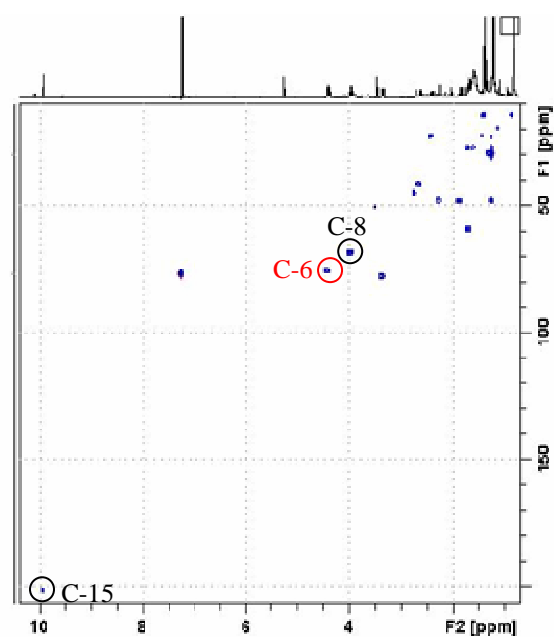
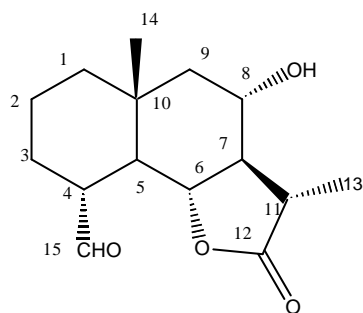


Figure 44: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **8**

Par analyse des résultats de 1D & 2D-RMN la structure suivante a été attribuée à ce composé:



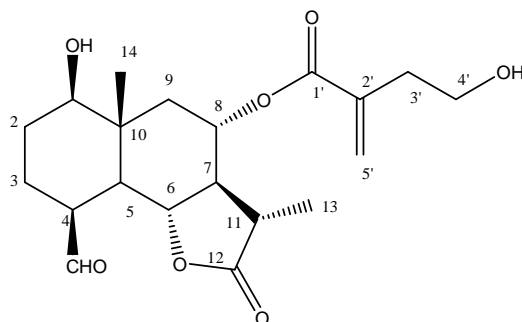
Composé 8

Il s'agit du 8α -hydroxy- 11β , 13-dihydro onopordaldéhyde, un eudesmanolide isolé pour la première fois de *Centaurea granata* (Medjroubi et *al.*, 1998).

Composé 9: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4-épi-sonchucarpolide

[(3*S*, 3*a* *R*,4*S*, 5*a* *R*, 6*R*, 9*S*, 9*b* *R*)-9-formyl-6-hydroxy-3,5 a-diméthyl-2-oxo-dodecahydronaphthol (1,2-b)furan-4-hydroxy-2-méthylènebutanoate]

Le composé **9** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} + 15.00^\circ$ (MeOH; *c* 0.1200).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3600-3300 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 1772 cm^{-1} , (C=O, γ -lactone, ester), 1721 cm^{-1} (C=O, aldéhyde).

HR-ESI-MS *m/z* 403.1730 [M+Na]⁺, compatible avec la formule moléculaire suivante : C₂₀H₂₈O₇ [calculé 380.1827]

Les spectres ¹H-RMN (**Tableau 27**) et ¹³C-RMN (**Tableau 28**) nous ont fourni des indications sur la présence d'une décaline portante d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982). La région oléfinique est pauvre en signaux, tandis que la région du haut champ présente un grand nombre des signaux.

Il est évident qu'à la région oléfinique au spectre ¹H-RMN, les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone sont absents. Un doublet dans la région du haut champ à δ 1.19 (*J*= 7.0) intégrant pour trois protons est indicatif de la présence d'un méthyle sur méthine et il est caractéristique du groupe α -méthyle γ -lactone.

Plus précisément, dans le spectre ¹³C-RMN, des carbones oléfiniques n'existent pas, par contre des méthines et des méthylènes sont présents dans la région des carbones saturés.

➤ Selon les spectres ¹³C-NMR et HSQC nous avons constaté que le C-6 (δ 75.7) est plus déblindé que le C-8 (δ 70.1); ces valeurs sont révélatrices que la lactonisation a lieu entre les carbones des positions C-6 & C-12.

➤ Le carbonyle de l'anneau lactonique a été détecté au δ 177.4 selon le spectre HMBC où le signal entre ce carbonyle et le proton H-13 a été évident.

➤ Le proton H-4 se présente sous forme d'un triplet à δ 2.75 ($J= 5.1$), comme il se conjugue avec le proton H-3b (à δ 1.24) et le proton H-5 (à δ 1.89) ceci a été confirmé par le spectre COSY (**Figure 46**).

➤ Le proton H-15 du groupe aldéhyde apparaît comme un singulet à δ 9.93; la présence du groupe aldéhyde est confirmée par le spectre HSQC (**Figure 47**) où le carbone correspondant apparaît à δ 201.7.

➤ Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 3.57 ($J= 4.7, 11.3$). Son déplacement chimique montre que le carbone C-1 est oxygéné, confirmé par le spectre HSQC (δ 77.7).

➤ Le proton H-6 apparaît sous forme d'un doublet dédoublé à δ 4.53 ($J= 11.0, 11.7$). Il se conjugue avec les protons H-5 et H-7.

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.21 ($J= 4.3, 10.9$) assez déblindé à cause de la chaîne latérale qu'il porte.

➤ Les protons géminaux du méthylène de la chaîne latérale H-5'a et H-5'b apparaissent comme deux singulets élargis à δ 6.23 et δ 5.72, respectivement.

➤ Les signaux des protons géminaux H-3'a et H-3'b apparaissent sous forme de triplets superposés à δ 2.56 ($J= 6.1$).

➤ Les signaux des protons géminaux H-4'a et H-4'b apparaissent sous forme de triplets superposés à δ 3.76 ($J= 6.3$)

➤ Le méthyle de la tête de l'eudesmanolide (CH₃-14) apparaît comme un singulet intégrant pour trois protons à δ 0.90.

Dans le spectre NOESY (**Figure 49**), les signaux NOE suivants sont aperçus entre: Les protons H-1 et H-5; les protons H-6 et H-8; l'aldéhyde groupe et le proton H-6; l'aldéhyde groupe et le CH₃-14. Alors, l'aldéhyde groupe et les protons H-6, H-8 tiennent la même orientation, tandis que les protons H-1 et H-5 tiennent l'orientation opposée.

Tableau 27: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz; CDCl_3) du composé **9**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.57	1	<i>dd</i> ($J= 4.7, 11.3$)	H-1
1.72	1	<i>m</i>	H-2a
1.60	1	<i>m</i>	H-2b
1.38	1	<i>m</i>	H-3a
1.24	1	<i>m</i>	H-3b
2.75	1	<i>t</i> ($J= 5.1$)	H-4
1.89	1	<i>m</i>	H-5
4.53	1	<i>dd</i> ($J= 11.0, 11.7$)	H-6
1.91	1	<i>m</i>	H-7
5.21	1	<i>td</i> ($J= 4.3, 10.9$)	H-8
2.36	1	<i>dd</i> ($J= 4.1, 12.9$)	H-9a
1.35	1	<i>m</i>	H-9b
2.55	1	<i>m</i>	H-11
1.19	1	<i>d</i> ($J=7.0$)	H-13
0.90	1	<i>s</i>	H-14
9.93	1	<i>s</i>	H-15
2.56	2	<i>t</i> ($J= 6.1$)	H-3'a, H-3'b
3.76	2	<i>t</i> ($J= 6.3$)	H-4'a, H-4'b
6.23	1	<i>se</i>	H-5'a
5.72	1	<i>se</i>	H-5'b

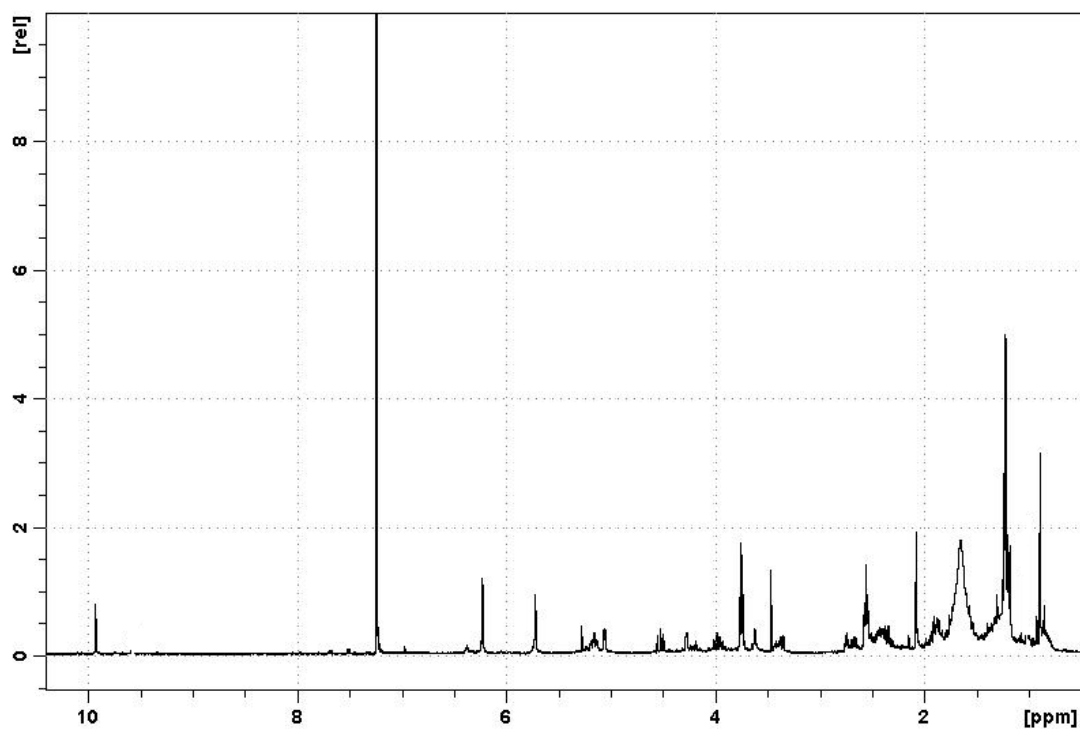


Figure 45: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **9**.

Tableau 28: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **9***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
77.7	CH	C-1
27.6	CH ₂	C-2
23.6	CH ₂	C-3
45.0	CH	C-4
48.4	CH	C-5
75.7	CH	C-6
56.9	CH	C7
70.1	CH	C-8
43.5	CH ₂	C-9
40.8	C	C-10
40.1	CH	C-11
177.4	C	C-12
13.8	CH ₃	C-13
13.9	CH ₃	C-14
201.7	CH	C-15
165.9	C	C-1'
137.0	C	C-2'
35.0	CH ₂	C-3'
61.4	CH ₂	C-4'
127.3	CH ₂	C-5'

* Assignements faits à l'aide de HSQC et HMBC

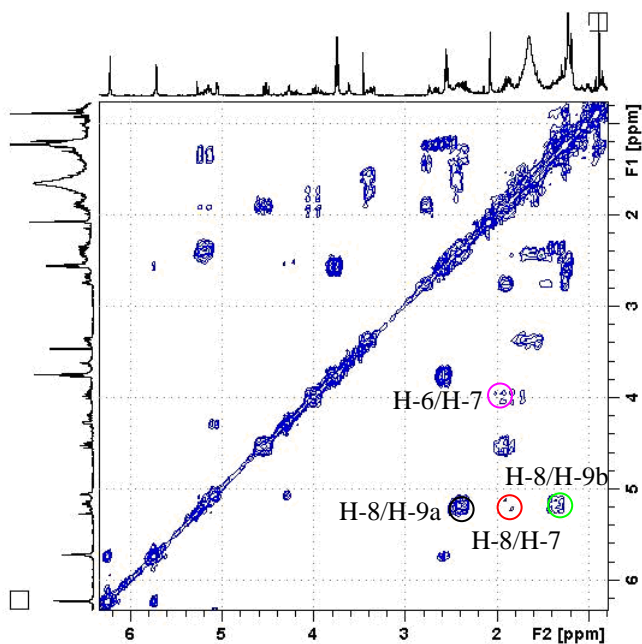


Figure 46: Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé **9**

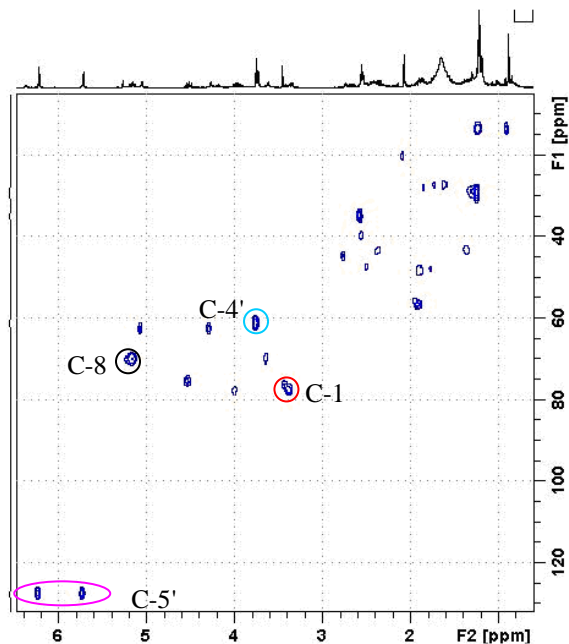


Figure 47: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé **9**

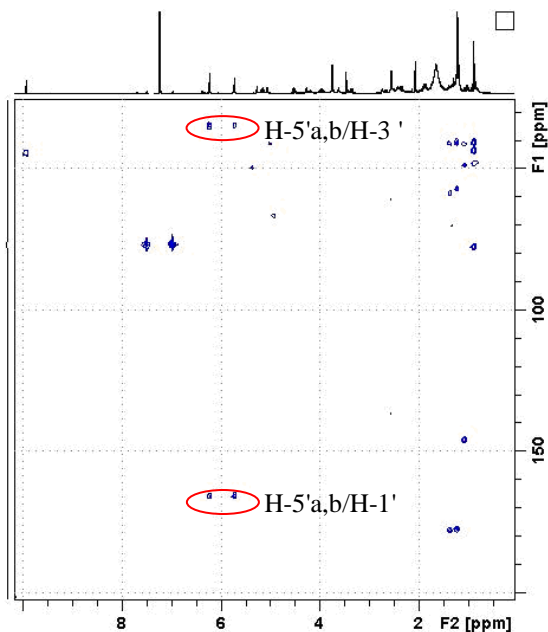


Figure 48: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **9**

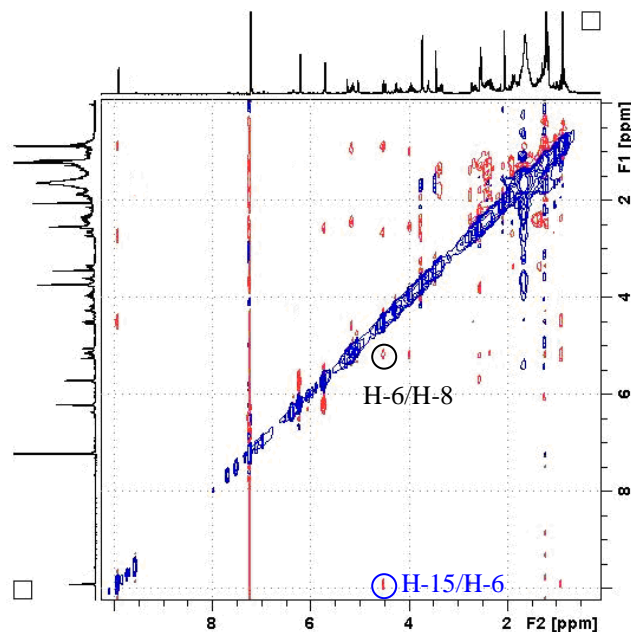


Figure 49: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **9**

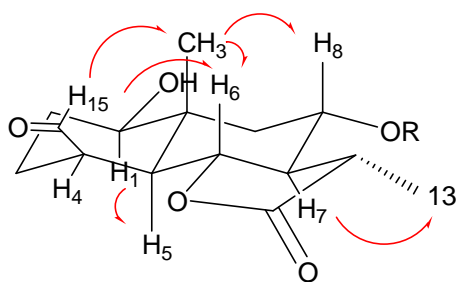
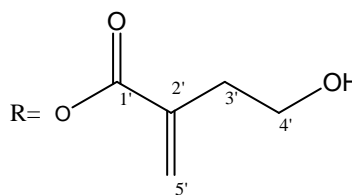
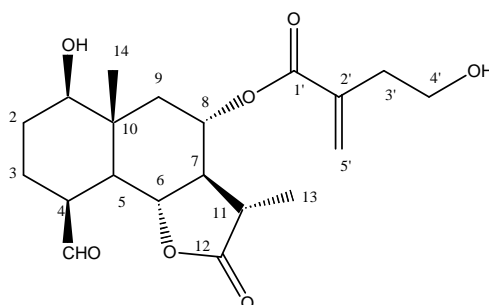


Figure 50. Signaux NOE du composé **9**.



L'analyse des différents spectres nous a conduits à la structure suivante:



Composé 9

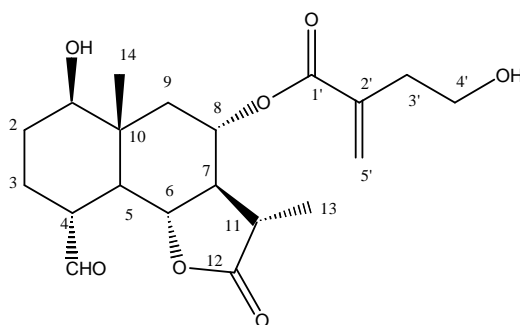
Il s'agit du 8α -*O*-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)- $11\beta,13$ -dihydro-4-épi-sonchucarpolide.

Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. C'est donc un nouveau produit naturel (Djeddi et *al.*, 2007a).

Composé 10: 8 α -O-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-11 β , 13-dihydro-sonchucarpolide

[(3*S*, 3*a* *R*, 4*S*, 5*a* *R*, 6*R*, 9*S*, 9*b* *R*)-9-formyl-6-hydroxy-3,5 a-diméthyl-2-oxo-dodecahydronaphthol (1,2-b)furan-4-yl 4-hydroxy-2-méthylènebutanoate]

Le composé **10** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} + 5.29^\circ$ (MeOH; *c* 0.17).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3600-3300$ (OH), 1776 (C=O, γ -lactone, ester), 1717 (C=O, aldéhyde) cm⁻¹.

HR-ESI-MS *m/z*: 381.1908 [M+1]⁺, compatible avec la formule moléculaire suivante: C₂₀H₂₈O₇ [calculé 380.1827].

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 51 & Tableau 29**) nous a permis de distinguer la présence d'une décaline portant d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982).

➤ Il faut noter que dans la région oléfinique les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone (H-13a et H-13b) sont absents et sont remplacés par le signal typique du groupe α -méthyle γ -lactone sous forme de doublet à δ 1.19 (*J*= 7.0).

➤ Selon les spectres HSQC, (**Figure 53**) HMBC (**Figure 54**) et l'expérience DEPT 135°, 20 signaux ont été observés: 4 carbones quaternaires, 7 méthines, 6 méthylènes (l'un d'eux est oléfinique) et deux méthyles.

➤ Le carbonyle de l'anneau lactonique (C-12) a été détecté au δ 176.3 selon le spectre HMBC où il est évident le signal entre ce carbonyle et le méthyle CH₃-13.

➤ Par les spectres ¹³C-NMR et HSQC nous avons constaté que le C-6 (δ 78.1) est plus déblindé que le C-8 (δ 70.3). Ces valeurs sont révélatrices que la lactonisation a lieu entre les carbones des positions C-6-12.

➤ A δ 9.58 apparaît comme un doublet le proton du groupe aldéhyde (*J*= 3.9). Il faut noter qu'au cas de la substance **9** ce proton apparaît comme singulet plus déblindé à δ 9.93.

Dans le spectre HMBC (**Figure 54**), nous avons constaté le signal entre le proton du groupe aldéhyde et le carbone C-4.

➤ Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 3.42 ($J= 4.3, 11.0$). Son déplacement chimique montre que le carbone C-1 est oxygéné cela a été confirmé par le spectre HSQC (δ 76.9).

➤ Les protons H-5 et H-6 apparaissent comme deux triplets à δ 1.76 ($J= 11.3$) et à δ 3.99 ($J= 11.0$), respectivement. Ces deux protons se conjuguent entre eux (COSY, **Figure 52**). Le proton H-5 est lié au carbone aliphatique C-5 (47.7) et il est plus blindé que celui du composé **9**. Il se conjugue aussi avec le proton H-4 qui apparaît à δ 2.49, qui a son tour se conjugue avec les protons géminaux H-3a et H-3b. Le proton H-6 se conjugue aussi avec le proton H-7.

➤ Le proton H-8 n'est pas oléfinique, mais il apparaît dans cette région comme un triplet dédoublé à δ 5.17 ($J= 4.7, 11.0$) à cause de la chaîne latérale qu'il porte. De plus sa conjugaison avec le proton H-7, il se conjugue aussi avec les protons géminaux H-9a et H-9b qui apparaissent à δ 2.44 ($J = 4.3, 12.3$) et à δ 1.34 ($J = 11.7, 12.5$), respectivement. Au niveau du spectre COSY le proton H-7 se conjugue avec les deux protons H-6 et H-8, qui sont liés aux carbones oxygénés à δ 78.1 (C-6) et δ 70.3 (C-8).

➤ Les valeurs des constantes de couplages à partir du proton H-5 jusqu'au proton H-8 nous indiquent que les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 ont une *trans*-disposition entre eux. Le spectre NOESY (**Figure 55**) nous a confirmé la *trans*-conformation de l'eudesmanolide. Les signaux NOE entre CH₃-14/H-8/H-6 et H-6/H-4 indiquent qu'ils ont la même orientation dans la molécule, alors que les interactions NOE entre H-1/H-2a, H-5, H-9b; H-7/H-9b; H-7/CH₃-13 indiquent qu'ils ont l'orientation opposée.

➤ Le méthyle de la tête du eudesmanolide (CH₃-14) apparaît comme un singulet intégrant pour trois protons à δ 1.03 plus déblindé que celui de la substance **9**.

➤ Le reste des couplages entre H-3/H-2 et H-2a,b/H-1 a complété le noyau de la décaline. Le déplacement chimique enregistré au niveau du C-1 (δ 76.9) nous indique la présence d'un groupe oxygéné à cette position.

Au spectre COSY (**Figure 52**) un second spin système a été observé. Ce dernier appartient à la chaîne latérale. L'identification de la chaîne latérale comme 4-hydroxyle-2-méthylène butanoyloxy ester a été déduite par les valeurs des déplacements chimiques des protons correspondants, ainsi que par leurs corrélations aux 2D spectres:

- Les protons géminaux du méthylène de la chaîne latérale H-5'a et H-5'b apparaissent dans la région oléfinique comme singulets élargis à δ 6.23 et δ 5.73, respectivement (C-5' à δ 128.3).
- Les protons géminaux H-3'a et H-3'b apparaissent sous forme de triplets superposés à δ 2.56 ($J= 6.2$ Hz).
- Les protons géminaux H-4'a et H-4'b apparaissent sous forme de triplets superposés à δ 3.76 ($J= 6.2$ Hz). Leur déplacement chimique est indicatif de la présence d'une fonction oxygénée sur le carbone C-4' (δ 61.3).

Tableau 29: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.42	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 11.0$)	H-1
1.86	1	<i>m</i>	H-2a
1.57	1	*	H-2b
1.72	1	*	H-3a
1.54	1	*	H-3b
2.49	1	*	H-4
1.76	1	<i>t</i> ($J= 11.3$)	H-5
3.99	1	<i>t</i> ($J= 11.0$)	H-6
1.94	1	<i>dd</i> ($J= 10.9, 11.5$)	H-7
5.17	1	<i>td</i> ($J= 4.7, 11.0$)	H-8
2.44	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 12.3$)	H-9a
1.34	1	<i>dd</i> ($J= 11.7, 12.5$)	H-9b
2.53	1	*	H-11
1.19	3	<i>d</i> ($J= 7.0$)	H-13
1.03	3	<i>s</i>	H-14
9.58	1	<i>d</i> ($J= 3.9$)	H-15
2.56	2	<i>t</i> ($J= 6.2$)	H-3'a, H-3'b
3.76	2	<i>t</i> ($J= 6.2$)	H-4'a, H-4'b
6.23	1	<i>se</i>	H-5'a
5.73	1	<i>se</i>	H-5'b

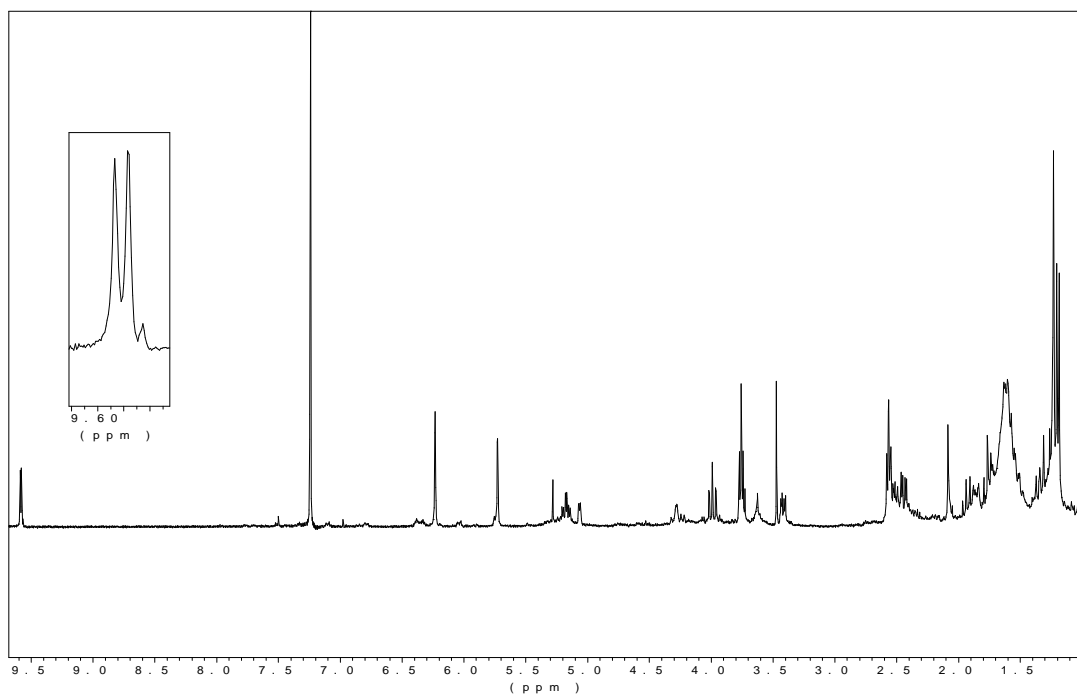


Figure 51: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**.

Tableau 30: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **10***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
76.9	CH	C-1
28.1	CH_2	C-2
24.1	CH_2	C-3
47.6	CH	C-4
47.7	CH	C-5
78.1	CH	C-6
56.3	CH	C7
70.3	CH	C-8
42.3	CH_2	C-9
40.5	C	C-10
40.3	CH	C-11
176.3	C	C-12
13.8	CH_3	C-13
12.7	CH_3	C-14
202.0	CH	C-15
166.1	C	C-1'
136.6	C	C-2'
35.1	CH_2	C-3'
61.3	CH_2	C-4'
128.3	CH_2	C-5'

* Assignements faits à l'aide de HSQC et HMBC

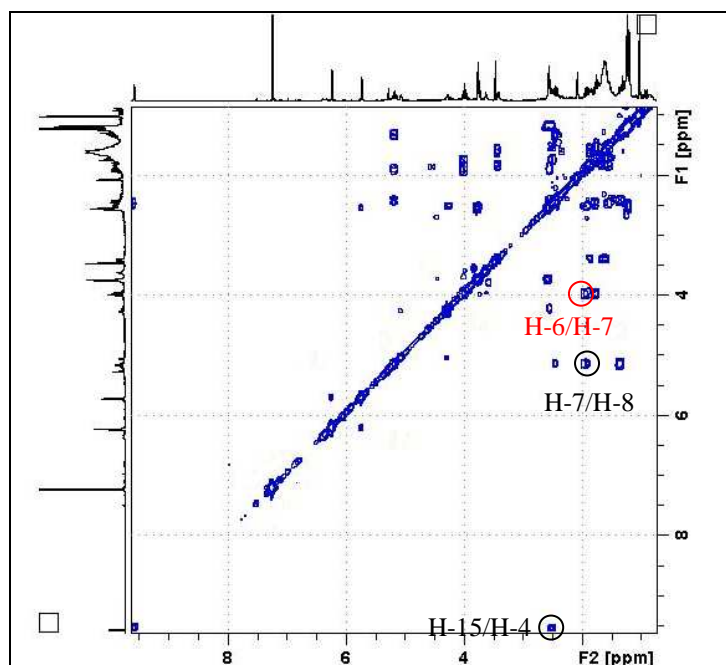


Figure 52: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**.

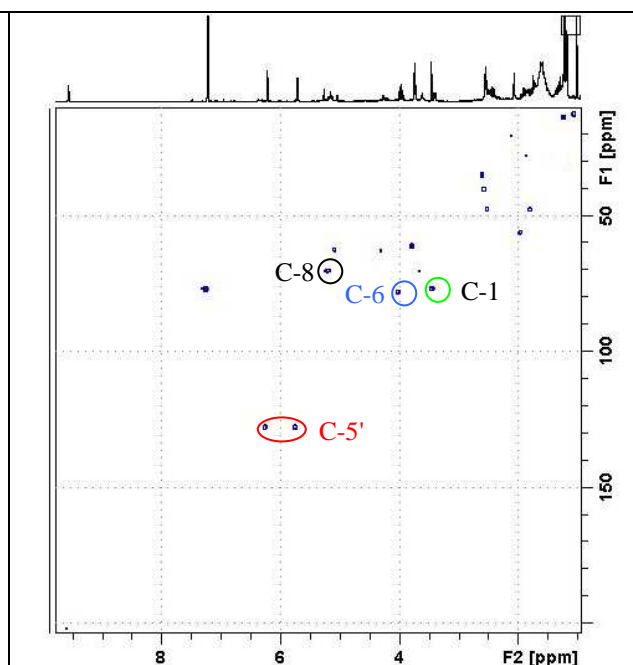


Figure 53: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**

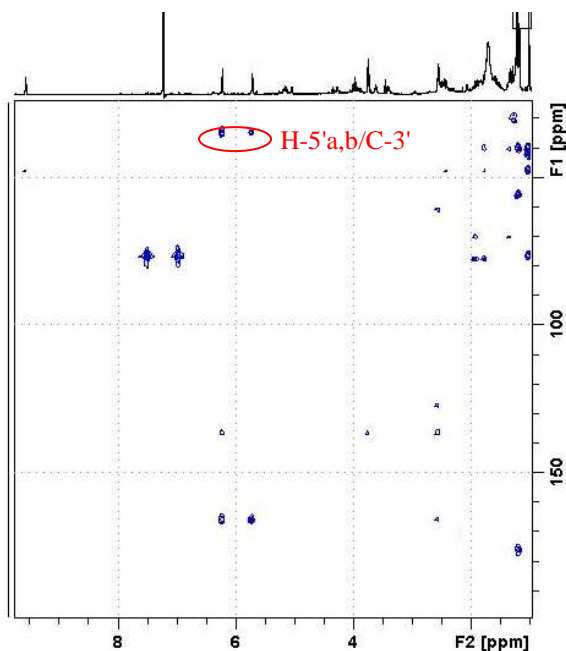


Figure 54: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**

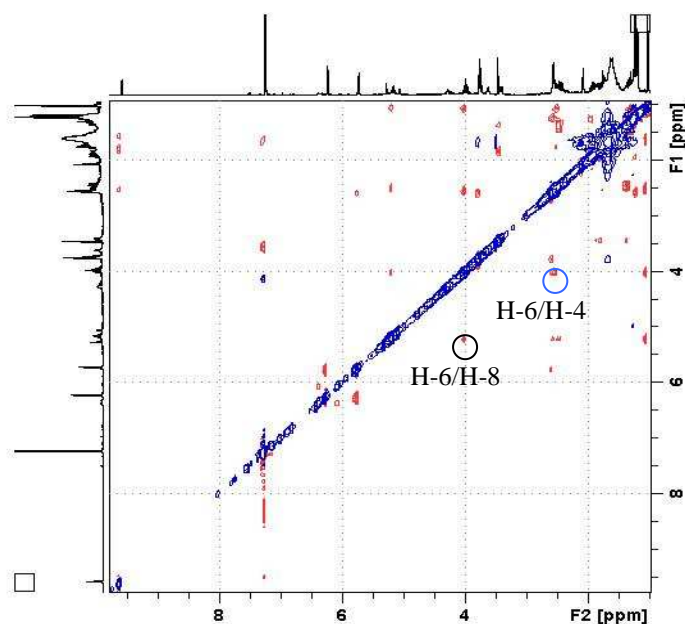


Figure 55: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **10**

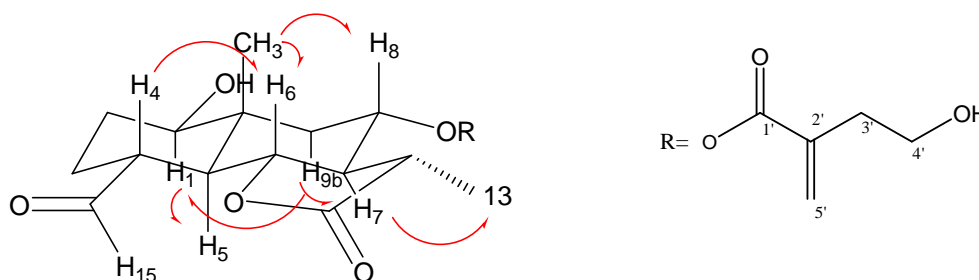
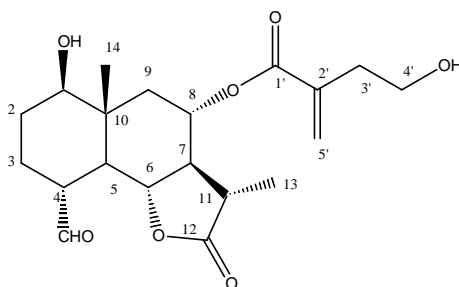


Figure 56: Signaux NOE du composé **10**

L'analyse des spectres nous a conduits à la structure suivante:



Composé 10

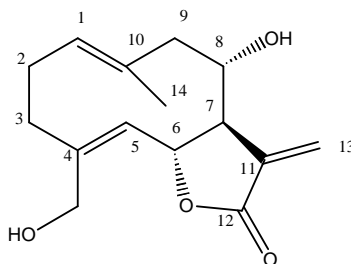
Il s'agit du 8α -*O*-(4-hydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)- 11β , 13dihydro-sonchucarpolide.

Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. C'est donc un nouveau produit naturel, (Djeddi et *al.*, 2007a).

b) Sesquiterpènes lactones isolées de *C. grisebachii*. ssp. *grisebachii* (Djeddi et al., 2007b)

Composé 11: Saloniténolide

Le composé **11** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.



$[\alpha]_D^{20} + 3.66^\circ$ (CHCl₃; *c* 0.16).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3300$ (OH), 1760 (C=O, γ -lactone, ester), 1660 et 1640 cm⁻¹(doubles liaisons).

EI-MS (70eV) : *m/z* 264 (C₁₅H₂₀O₄).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Tableau 31**) nous a permis de constater qu'il s'agit d'un gémacranolide de type salonitenolide portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et al., 1970).

Dans la région du bas champ, nous avons constaté les signaux typiques correspondants aux protons oléfiniques d'une double liaison caractéristique du groupe α -méthylène γ -lactone : comme doublets dédoublés à δ 6.37 (*J*= 1.2, 3.3, H-13a) et à δ 6.34 (*J*= 1.2, 2.9, H-13b). Ils se conjuguent entre eux avec une petite constante de couplage (*J*= 1.2 Hz) et avec le proton H-7, qui se trouve en position allylique (*J*= 3.3, *trans*-position, H-13a; *J* = 2.9; *cis*-position, H-13b), (Samek, 1970).

Le déplacement paramagnétique typique du proton H-13a, ainsi que son couplage géminel sont expliqués par l'effet Van Der Waals de l'OH-8 sur son orbitale liante (Yoshioka et al., 1970).

Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé élargi à δ 4.94 (*J* = 4.8, 11.6) à cause de sa conjugaison avec ses protons voisins H-2a,b et avec le méthyle CH₃-14, qui se trouve en position allylique.

Dans la même région, nous avons distingué :

➤ Un triplet à δ 4.85 ($J= 9.1$) attribué au proton H-6, qui se conjugue avec ses protons voisins.

➤ Un doublet à δ 4.70 ($J= 9.8$ Hz) attribué au proton H-5, qui se conjugue avec le proton H-6.

Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée, nous avons distingué:

➤ Deux doublets élargis correspondants aux protons géminaux de la position C-15: à δ 4.25 ($J = 13.7$ Hz, H-15a) et à δ 4.02 ($J = 13.7$, H-15b).

➤ Un doublet de doublets dédoublés à δ 3.90 ($J= 3.7, 8.6, 10.7$) attribué au proton H-8, qui se conjugue avec les protons voisins.

Dans la région du haut champ nous avons observé les signaux suivants:

➤ Un doublet de doublets de doublets dédoublés à δ 2.06 ($J= 4.5, 11.6, 12.0, 12.4$) attribué au proton H-2b, qui se conjugue avec les protons H-1, H-3b, H-3a et son géminale H-2a.

➤ Un doublet de doublets dédoublés à δ 2.50 ($J= 2.3, 4.5, 12.0$) attribué au proton H-3a, qui se conjugue avec son géminale H-3b et avec ses protons voisins H-2a,b.

➤ Un triplet dédoublé à δ 1.90 ($J= 5.4, 12.0$) attribué au proton H-3b, qui se conjugue avec son géminale H-3a et avec ses protons voisins H-2a,b.

➤ Un doublet dédoublé à δ 2.37 ($J= 10.7, 12.8$) attribué au proton H-9a qui se conjugue avec le proton H-8 et avec son géminale H-9b.

➤ Un singulet (intégrant pour 3 protons) caractéristique chez les sesquiterpène lactones a été détecté à δ 1.36 correspondant au méthyle de la position C-14, qui se place sur le C-10. Ce déplacement est indicatif du groupe des gérmanolides sans chaîne latérale à hydroxyle en position C-8.

Le reste des protons apparaissent dans la même région sous forme de multiplets. Les valeurs des constantes de couplages à partir du proton H-5 jusqu'au proton H-8 nous indiquent que les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 ont une *trans*-disposition.

Tableau 31: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **11**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.94	1	<i>dd</i> ($J = 4.8, 11.6$)	H-1
2.30 - 2.15	1	<i>m</i>	H-2a
2.06	1	<i>dddd</i> ($J = 4.5, 11.6, 12.0, 12.4$)	H-2b
2.50	1	<i>ddd</i> ($J = 2.3, 4.5, 12.0$)	H-3a
1.90	1	<i>td</i> ($J = 5.4, 12.0$)	H-3b
4.70	1	<i>d</i> ($J = 9.8$)	H-5
4.85	1	<i>t</i> ($J = 9.1$)	H-6
2.80	1	<i>dddd</i> ($J = 3.2, 3.6, 8.2, 8.6$)	H-7
3.90	1	<i>ddd</i> ($J = 3.7, 8.6, 10.7$)	H-8
2.37	1	<i>dd</i> ($J = 10.7, 12.8$)	H-9a
2.66	1	<i>d</i> ($J = 12.8$)	H-9b
6.37	1	<i>dd</i> ($J = 1.2, 3.3$)	H-13a
6.34	1	<i>dd</i> ($J = 1.2, 2.9$)	H-13b
1.36	3	<i>s</i>	H-14
4.25	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15a
4.02	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15b

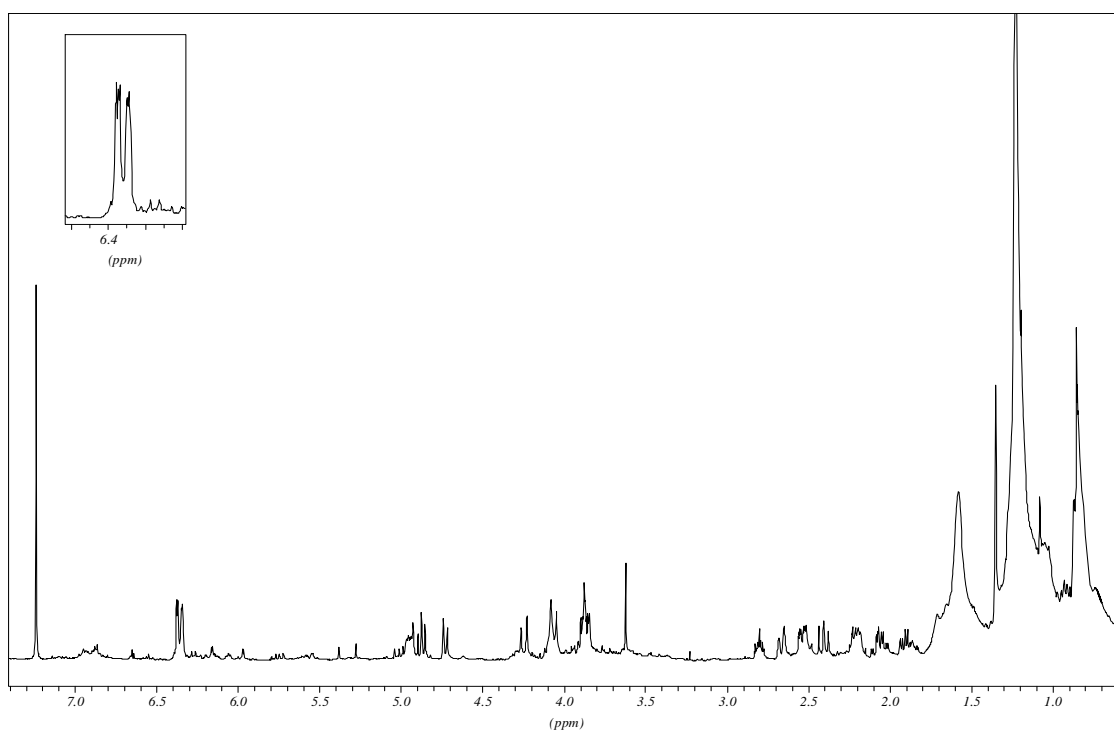
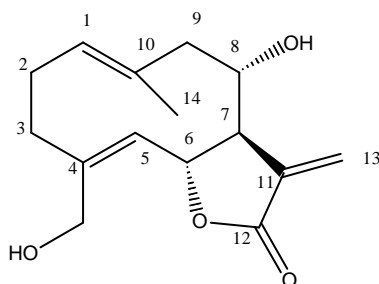


Figure 57: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **11**.

Par l'analyse des données spectroscopiques nous avons attribué la structure suivante à ce composé:

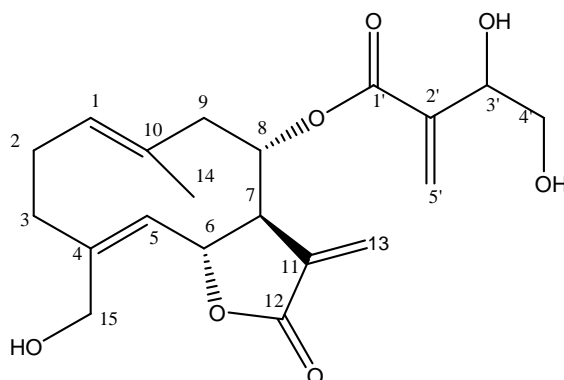


Composé 11

Il s'agit du salomoniténolide, un gémacranolide décrit chez les espèces suivantes : *Centaurea melitensis* (Barrero et al., 1989), *C. salonitana* (Daniewski et al., 1992, id. 1993b), *C. paui* (Cardona et al., 1997), *C. crithmifolia*, *C. eriophora*, *C. paniculata* (Geppert et al., 1983), *C. seridis* (González et al., 1973), *C. orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003), *C. iberica* (Sham'yanov et al., 1998) et chez *C. pseudomaculosa* (Turdybekov et al., 1989). Ce gémacranolide possède des activités anti-cancéreuses et cytotoxiques (Harborne et Baxter, 1993).

Composé 12: Cnicine

Le composé **12** se présentait sous forme de cristaux blanchâtres solubles dans le chloroforme. Sa structure a été déterminée par différentes méthodes spectroscopiques.



$[\alpha]_D^{20} +24.98^\circ$ (MeOH; c 0.05).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3654 (OH), 1770 (C=O, γ -lactone, ester).

EI-MS (70eV): m/z 378 (C₂₀H₂₆O₇).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 58 & Tableau 32**), nous a permis de constater qu'il s'agit d'un gémacranolide portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et *al.*, 1970).

Un signal caractéristique pour ce type de sesquiterpène lactones ayant un groupe α -méthylène γ -lactone est celui du proton H-7, qui apparaît comme un multiplet à δ 3.07 à cause de sa conjugaison avec les méthines des positions C-6, C-8 et avec les protons géminaux H-13a, H-13b (Samek, 1970).

Au niveau de la région oléfinique apparaissent les signaux de 8 protons :

- Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 4.98 ($J = 6.3, 11.1$).
- Le proton H-5 apparaît comme un doublet à δ 4.81 ($J = 9.8$).
- Le proton H-6 apparaît comme un triplet à δ 5.00 ($J = 9.0$), bien qu'il ne soit pas oléfinique, il apparaît dans cette région à cause de sa position allylique par rapport à la double liaison Δ^4 ; il faut noter qu'il apparaît un peu superposé par le proton H-1.
- Le proton H-8 n'est pas oléfinique, mais il apparaît dans cette région comme un triplet à δ 5.15 ($J = 9.0$ Hz) à cause de la chaîne latérale qu'il porte.
- Des signaux (sous forme de deux doublets) caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactones ont été attribués au méthylène exocyclique et à δ 6.26 ($J = 3.1$, H-13a) et à δ 5.72

($J = 2.7$, H-13b). Dans ce cas, le couplage géminal ne s'aperçoit pas, mais seulement le couplage allylique avec le proton H-7 (Samek, 1970).

➤ Les protons géminaux du méthylène de la chaîne latérale H-5'a et H-5'b apparaissent comme singulets élargis à δ 6.37 et δ 6.06, respectivement.

Lors de l'analyse du spectre ^{13}C -RMN (**Figure 59** & **Tableau 33**), nous avons constaté :

➤ La présence de huit carbones oléfiniques indiquant la présence de quatre doubles liaisons qui apparaissent à δ :

- 129.9 (C-1), 144.2 (C-4), 128.4 (C-5) et 132.1 (C-10) pour l'anneau central (gérmacradiène).

- 135.2 (C-11) et 125.3 (C-13) pour la double liaison exocyclique de l'anneau lactonique

- 139.2 (C-2') et 127.4 (C-5') pour la double liaison de la chaîne latérale.

➤ Deux carbonyles qui apparaissent à δ 169.9 (anneau lactonique) et à 165.2 (chaîne latérale).

➤ Deux carbones oxygénés apparaissent à δ 76.7 (C-6) et à δ 73.2 (C-8). Le déblindage du C-6 indique que la lactonisation se trouve entre les C-6 et C-12.

➤ Dans la même région apparaissent 3 signaux à δ 71.3, 65.8 et 61.4, qui correspondent aux : C-3' (CH), C-4' (CH₂) et C-15 (CH₂), respectivement.

Les protons de ces derniers carbones apparaissent comme suit:

➤ Un doublet dédoublé à δ 4.55 ($J = 3.5, 6.6$) qui a été attribué au proton H-3'.

➤ Deux doublets dédoublés à δ 3.81 ($J = 3.5, 11.4$) et à δ 3.57 ($J = 7.0, 11.3$) correspondant aux protons géminaux H-4'a et H-4'b, respectivement.

➤ Deux doublets dont les constantes de couplages sont égales ($J = 13.5$) apparaissent à δ 4.22 et δ 3.97 attribuées aux protons géminaux H-15a et H-15b, respectivement.

Dans la région aliphatique du spectre ^1H -RMN apparaissent sous forme de multiplets les protons : H-3a superposé par les protons géminaux H-9a et H-9b, les protons géminaux H-2a, H-2b et H-3b.

Le méthyle de la tête du gérmacranolide (CH₃-14) apparaît comme un singulet intégrant pour trois protons à δ 1.49.

L'analyse du spectre NOESY (**Figure 60**), nous a permis de confirmer les suggestions selon la valeur de la constante de couplage du proton H-6 ($J = 9.0$), que ce proton se trouve à une position *trans*-diaxiale par rapport à ses protons voisins H-5, H-7 et par conséquence

l'anneau lactonique est *trans*. A cause de cette conformation, les protons H-5 et H-7 s'approchent dans l'espace et donnent des signaux NOE (**Figure 61**) au spectre NOESY de la substance, ainsi que les protons H-6 et H-8.

Le méthyle de la tête (CH₃-14) ne donne pas de signal NOE avec le proton H-1, qui s'observerait au cas où ce méthyle était placé à la position *cis* par rapport au proton H-1. Par conséquent la double liaison $\Delta^{1(10)}$ est *trans*.

De cette façon nous avons constaté que la substance appartient au groupe de *trans-trans* gémacranolides (gémacrolides).

Tableau 32: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **12**

δ (ppm)	n $^\circ$ H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.98	1	dd ($J = 6.3, 11.1$)	H-1
2.30 - 2.10	2	m	H-2a, H-2b
2.10 - 1.90	1	m	H-3b
4.81	1	d ($J = 9.8$)	H-5
5.00	1	t ($J = 9.0$)	H-6
3.07	1	m	H-7
5.15	1	t ($J = 9.0$)	H-8
2.60 - 2.40	3	m	H-3a, H-9a, H-9b
6.26	1	d ($J = 3.1$)	H-13a
5.72	1	d ($J = 2.7\text{Hz}$)	H-13b
1.49	3	s	H-14
4.22	1	d ($J = 13.5$)	H-15a
3.97	1	d ($J = 13.5$)	H-15b
4.55	1	dd ($J = 3.5, 6.6$)	H-3'
3.81	1	dd ($J = 3.5, 11.4$)	H-4'a
3.57	1	dd ($J = 7.0, 11.3$)	H-4'b
6.37	1	s	H-5'a
6.06	1	s	H-5'b

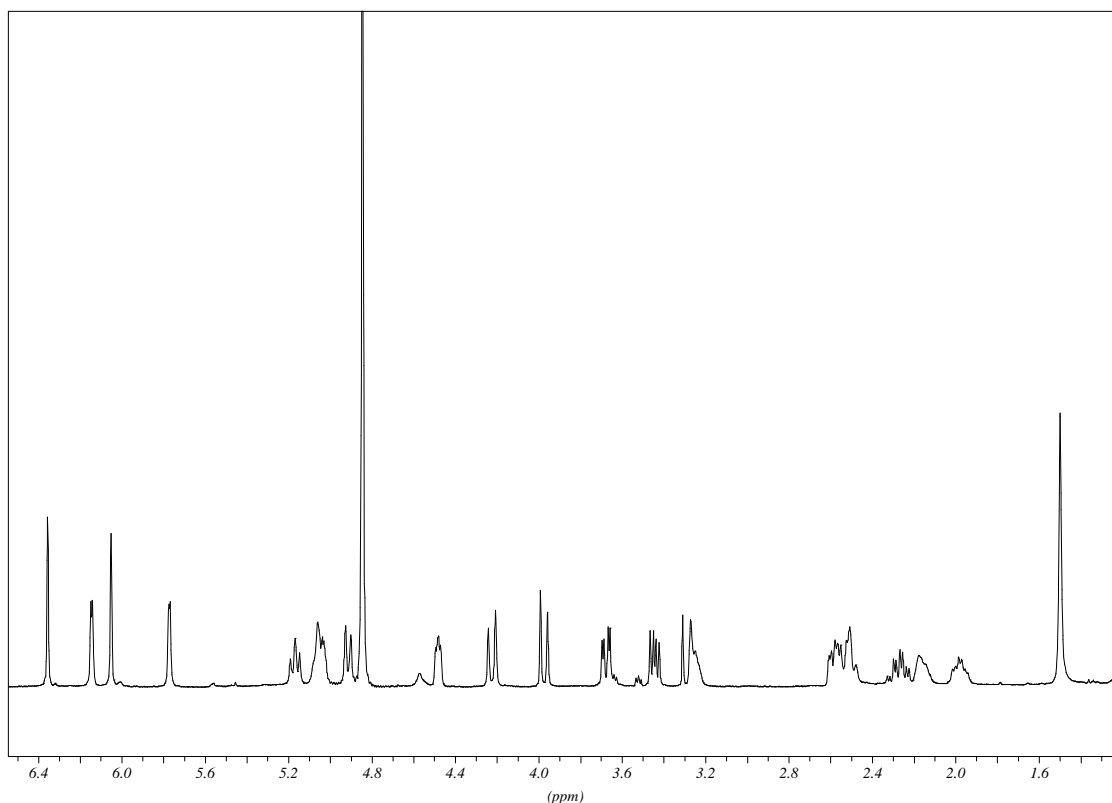


Figure 58: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **12**

Tableau 33: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **12**

δ (ppm)	Types de carbones	Position
129.9	CH	C-1
26.1	CH_2	C-2
34.7	CH_2	C-3
144.2	C	C-4
128.4	CH	C-5
76.7	CH	C-6
52.9	CH	C7
73.2	CH	C-8
48.5	CH_2	C-9
132.1	C	C-10
135.2	C	C-11
169.9	C	C-12
125.3	CH_2	C-13
16.8	CH_3	C-14
61.4	CH_2	C-15
165.2	C	C-1'
139.2	C	C-2'
71.3	CH	C-3'
65.8	CH_2	C-4'
127.4	CH_2	C-5'

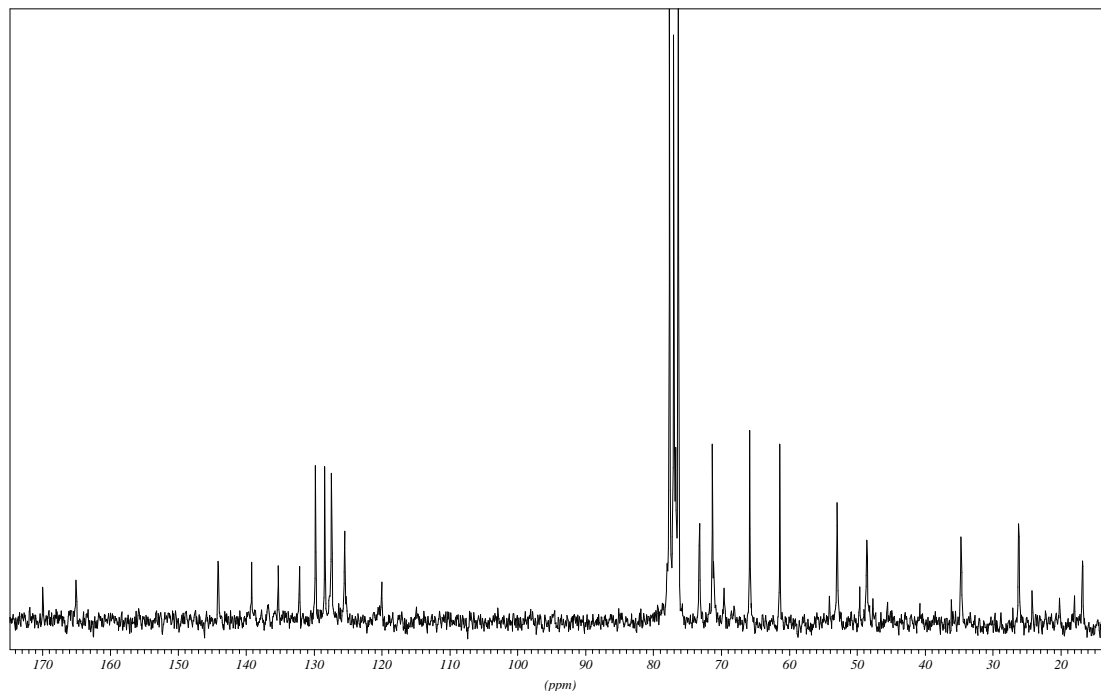


Figure 59: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **12**

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations NOESY.

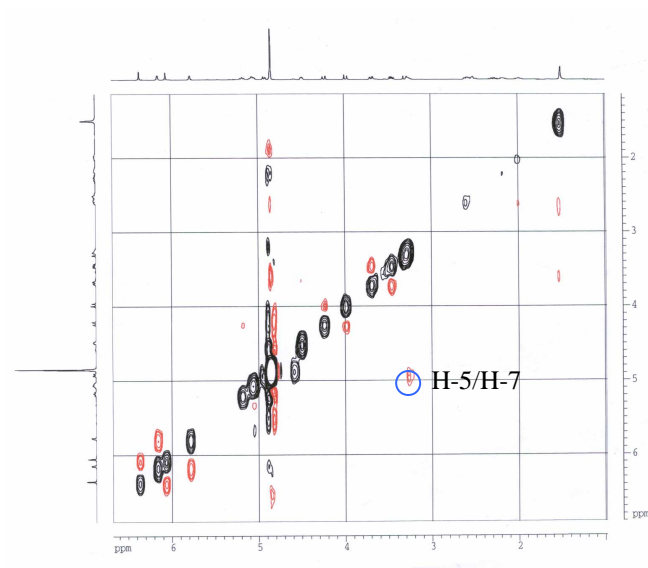


Figure 60: Spectre NOESY (400 MHz, MeOD) du composé **12**.

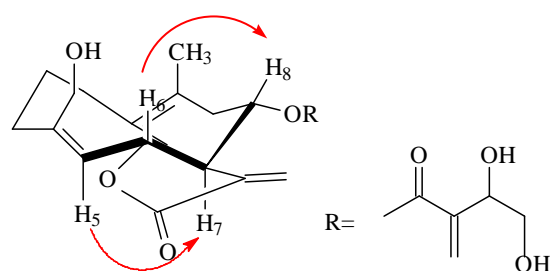
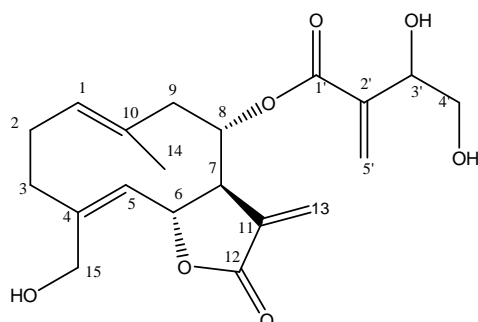


Figure 61: Signaux NOE du composé **12**.

Par l'analyse des données spectroscopiques et par comparaison des données ^1H -RMN avec ceux de la littérature (Rustaiyan *et al.*, 1982) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



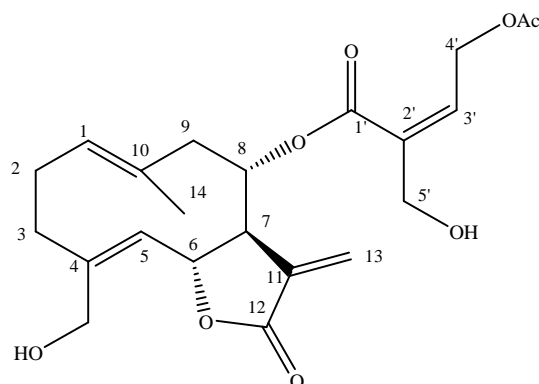
Composé 12

Il s'agit du cnicine une sesquiterpène lactone type gérmacranolide. Cette substance est très commune au genre *Centaurea*, elle a été isolée la première fois en 1837 (Bisset, 1994), puis identifiée chez les espèces suivantes: *C. cuneifolia* (Asaln et Öksüz, 1999), *C. malacitana*, *C. napifolia* (Barrero *et al.*, 1995), *C. cineraria* ssp. *umbrosa* (Bruno et Herz,

1988), *C. nicaensis* (Bruno et al., 1996), *C. paui* (Cardona et al., 1994), *C. araneosa* (Farrag et al., 1993), *C. alba* (Fernandez et al., 1995), *C. aspera* ssp. *aspera*, *C. calcitrata*, *C. eriophora*, *C. rochelian*, *C. sphaerocephala* ssp. *lusitanica*, *C. vallesiaca* (Geppert et al., 1983), *C. sulphurea* (Geppert et al., 1983; González et al., 1984), *C. orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003), *C. bruguierana* (Harraz et al., 1994), *C. stoebe* (Huneck et al., 1986), *C. alexandrina* (Ismail et al., 1986), *C. deusta* (Karioti et al., 2002) *C. maculosa* (Kelsey et Locken, 1987), *C. zuccariniana* (Koukoulitsa et al., 2002), *C. diffusa* (Milkova et al., 1993), *C. aggregate*, *C. aplolepa* ssp. *aplolepa*, *C. aplolepa* ssp. *lunensis*, *C. arenaria* ssp. *arenaria*, *C. arenaria* ssp. *majorowii*, *C. arenaria* ssp. *odesana*, *C. attica* ssp. *drakiensis*, *C. attica* ssp. *ossaea*, *C. calvescens*, *C. cineraria* ssp. *cineraria*, *C. cineraria* var. *circae*, *C. cuneifolia* ssp. *pallida*, *C. diffusa* var. *brevispina*, *C. exarata*, *C. grisebachii* ssp. *confusa*, *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, *C. kartschiana*, *C. leucophaea* ssp. *leucophaea*, *C. mantoudii*, *C. orphanidea* ssp. *orphanidea*, *C. pallidior* ssp. *pallidior*, *C. pelia*, *C. rhenana* ssp. *savranica*, *C. sphaerocephala* ssp. *sphaerocephala*, *C. transiens*, *C. tymphaea* ssp. *brevispina*, *C. tymphaea* ssp. *tymphaea*, *C. zuccariniana* (Nowak et al., 1984), *C. raphanina* ssp. *mixata* (Panagouleas et al., 2003), *C. bruguierana* (Rustaiyan et al., 1982), *C. rothmalerana* (Santos et al., 1995), *C. spinosa* (Saroglou et al., 2005), *C. attica* ssp. *attica* et *C. thessala* ssp. *drakiensis* (Skaltsa et al., 1999), *C. squarrosa* (Tarasov et al., 1973) *C. derventana* (Tesevic et al., 1998a), *C. pallescens* (Youssef et al., 1987).

Composé 13: 8 α -O-[(4-acétoxy-5-hydroxy)-angeloyl]-saloniténolide

Le composé 3 se présentait sous forme huileuse incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +10.10^\circ$ (MeOH, c 0.25).

IR (CaF₂): ν_{\max} =3436 (OH), 1648 (C=O, γ -lactone, ester).

EI-MS (70eV): m/z 408 (C₂₁H₂₈O₈).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 62** & **Tableau 34**), nous a permis de constater qu'il s'agit d'un gémacranolide de type salonitenolide portant deux doubles liaisons $\Delta^{1(10)}$ et Δ^4 (Bently et *al.*, 1970).

Un signal caractéristique pour ce type de sesquiterpène lactones ayant un groupe α -méthylène γ -lactone est celui du proton H-7, qui apparaît comme un multiplet à δ 3.07, à cause de sa conjugaison avec les méthines des positions C-6, C-8 et avec les protons géminaux H-13a, H-13b (Samek, 1970).

Au niveau de la région oléfinique apparaissent les signaux de 6 protons:

- Le proton H-1 apparaît comme un multiplet à δ 4.99.
- Le proton H-5 apparaît comme un doublet à δ 4.82 ($J= 10.0$ Hz).
- Bien que le proton H-6 ne soit pas oléfinique, il apparaît comme un doublet dédoublé à δ 5.12 ($J= 8.8, 10.0$ Hz) dans cette région à cause de sa position allylique par rapport à la double liaison.
- Le proton H-8 n'est pas oléfinique également, mais il apparaît dans cette région comme un doublet dédoublé à δ 5.19 ($J= 8.8, 10.0$ Hz) plus déblindé que le proton H-6 à cause de la chaîne latérale qu'il porte.

➤ Les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone ont été attribués aux méthylènes exocycliques H-13a et H-13b à δ 6.28 ($J= 3.6$ Hz) et à δ 5.69 ($J= 2.8$ Hz) respectivement.

En plus, dans le spectre ^1H -RMN, 5 signaux correspondant aux protons de la chaîne latérale ont été observés :

➤ Un signal doublet de doublets dédoublés à δ 6.38 ($J= 1.4, 4.8, 5.2$ Hz, H-3'), qui indique une conjugaison avec deux autres protons qui apparaissent comme deux doublets dédoublés élargis : l'un à δ 5.08 ($J= 4.8, 16.0$ Hz) et l'autre à δ 5.01 ($J= 5.6, 16.0$ Hz). La plus petite constante de couplage (4.8 Hz) est attribuée à une conjugaison homo-allylique, tandis que la grande constante (16.0 Hz) indique la présence de deux protons géminaux au même carbone. Par conséquent, ces protons correspondent aux positions H-3' (δ 6.38), H-4'a (δ 5.08) et H-4'b (δ 5.01).

➤ Deux doublets élargis à δ 4.33 ($J= 13.6$ Hz, H-5'a) et 4.30 ($J= 13.6$ Hz, H-5'b) correspondent à deux autres protons géminaux présentant encore un système AB.

Il est important de noter que les protons géminaux de la position C-4' sont plus déblindés par rapports aux autres protons géminaux de la position C-5', à cause de la présence d'un groupe acétylé voisin (4' $\text{CH}_2\text{-CH}_3\text{COO}$).

Tableau 34: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **13**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
4.99	1	<i>m</i>	H-1
2.58 - 2.46	1	<i>m</i>	H-2a
2.28 - 2.16	1	<i>m</i>	H-2b
2.57	1	<i>ddd</i> ($J = 3.1, 6.0, 11.6$)	H-3a
2.04 - 1.92	1	<i>m</i>	H-3b
4.82	1	<i>d</i> ($J = 10.0$)	H-5
5.12	1	<i>dd</i> ($J = 8.8, 10.0$)	H-6
3.07	1	<i>m</i>	H-7
5.19	1	<i>dd</i> ($J = 8.8, 10.0$)	H-8
2.60	1	<i>d</i> ($J = 13.2$)	H-9a
2.50	1	<i>t</i> ($J = 12.0$)	H-9b
6.28	1	<i>d</i> ($J = 3.6$)	H-13a
5.69	1	<i>d</i> ($J = 2.8$)	H-13b
1.49	3	<i>s</i>	H-14
4.28	1	<i>d</i> ($J = 14.0$)	H-15a
4.09	1	<i>d</i> ($J = 14.0$)	H-15b
6.38	1	<i>ddd</i> ($J = 1.4, 4.8, 5.2$)	H-3'
5.08	1	<i>dd</i> ($J = 4.8, 16.0$)	H-4'a
5.01	1	<i>dd</i> ($J = 5.6, 16.0$)	H-4'b
4.33	1	<i>d</i> ($J = 13.6$)	H-5'a
4.30	1	<i>d</i> ($J = 13.6$)	H-5'b
2.09	3	<i>s</i>	CH_3COO

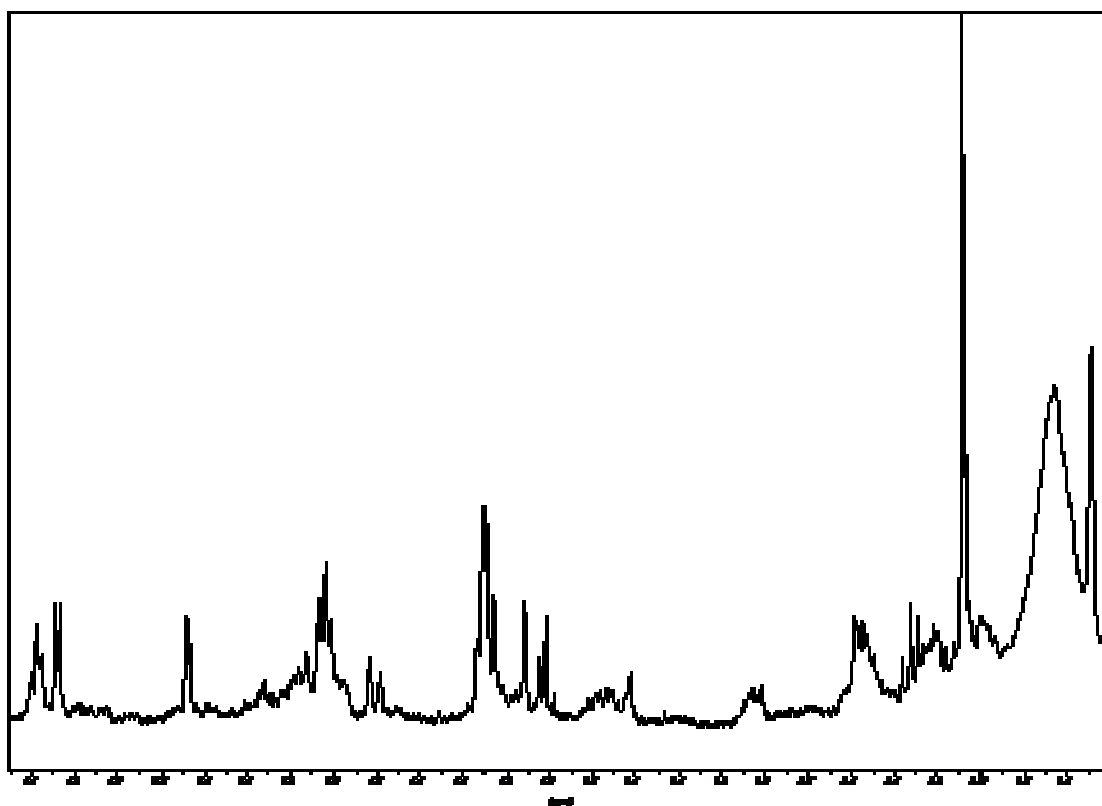
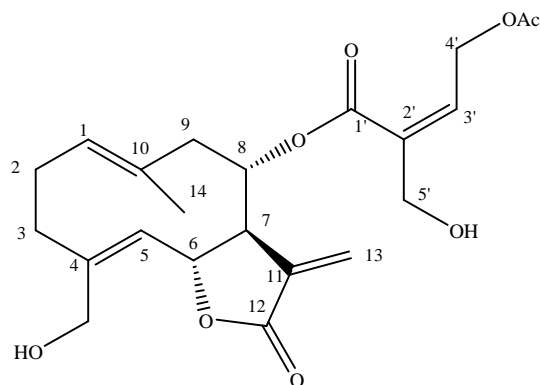


Figure 62: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **13**

Par comparaison des résultats de $^1\text{H-RMN}$ avec ceux de la littérature (Huneck *et al.*, 1986) la structure suivante a été attribuée à ce composé:

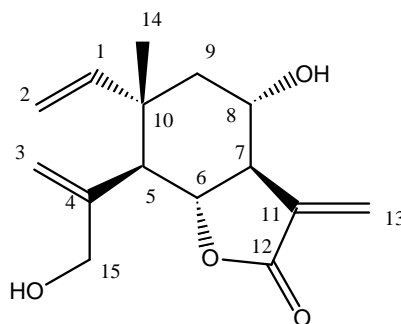


Composé 13

Il s'agit du $8\alpha\text{-O-}[(4\text{-acétoxy-5-hydroxy})\text{-angeloyl}]\text{-saloniténolide}$. Ce composé a été isolé la première fois chez *Centaurea stoebe* (Huneck *et al.*, 1986), par la suite il a été isolé des espèces suivantes: *C. alba* (Fernández *et al.*, 1995), *C. paui* (Cardona *et al.*, 1997), *C. derventana* (Tešević *et al.*, 1998a), *C. thessala ssp. drakiensis* (Skaltsa *et al.*, 1999).

Composé 14: 11 β , 13-déhydromélitensine

Le composé **14** se présentait sous forme d'huile soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +19.51^\circ$ (MeOH; c 0.01).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3400-3300 (OH), 1770 (C=O, γ -lactone).

EI-MS (70eV): m/z 264 (C₁₅H₂₀O₄).

Au spectre ¹H-RMN (**Figure 63 & Tableau 35**), nous avons constaté la présence de deux singulets élargis typiques pour les squelettes des élémanolides à δ 5.38 et 4.92 valant pour H-3a et H-3b, respectivement.

Dans la région oléfinique apparaissent les signaux caractéristiques d'un groupe vinylique (–CH=CH₂) :

➤ Le proton H-1 apparaît sous forme de doublet dédoublé à δ 5.76 et il se conjugue avec les protons géminaux H-2a (J = 10.7, *cis*-conjugaison) et H-2b (J = 17.2, *trans*-conjugaison); ces derniers apparaissent comme deux doublets à δ 5.04 et 4.98, respectivement.

➤ Les protons du méthylène exocyclique apparaissent aussi à la région oléfinique comme deux doublets à δ 6.15 (J = 3.1, H-13a) et à δ 5.56 (J = 2.8, H-13b).

➤ Le proton H-6 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 4.11 (J = 11.3, 11.6) indiquant son interférence avec un second proton voisin à une position *trans*-diaxiale, qui apparaît comme un doublet à δ 2.49 (J = 12.1, H-5). Le déplacement du proton H-6 indique la présence d'une fonction oxygénée au carbone correspondant.

➤ Le signal du proton H-7 apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.61 (J = 3.1, 11.0), qui est une forme typique chez les élémanolides. Il se conjugue avec ses protons voisins H-6 et H-8 ayant la même constante de couplage, qui montre que l'angle diédral entre les protons H-6 et H-7 d'une part et les protons H-8 et H-7 d'autre part est le même. Par conséquent, le proton H-7 se trouve entre deux protons (H-6 et H-8), qui ont la même orientation dans

l'espace ($J= 11.0$, *trans*-diaxiale), alors que la petite constante de couplage ($J= 3.1$) est due à sa conjugaison avec l'un des deux protons géminaux de la position C-13 ($J = 3.1$, H-13a), qui s'approche de ce proton.

➤ Le méthine de la position C-8 apparaît partiellement superposé par le proton H-15b et son assignement a été fait à l'aide du spectre HSQC (**Figure 65**).

➤ Les protons géminaux H-15a et H-15b du groupe hydroxyméthyle attaché au carbone C-4 apparaissent comme deux doublets caractéristiques à δ 4.13 ($J = 11.3$) et 3.98 ($J = 11.7$), respectivement.

➤ Le singulet intense qui intègre pour 3 protons à δ 1.08 a été attribué au méthyle de la tête CH₃-14 lié au carbone C-10 du squelette.

Tableau 35: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **14**

δ (ppm)	$n^{\circ}\text{H}$	Multiplicité, $J(\text{Hz})$	Position
5.76	1	$dd (J = 10.7, 17.2)$	H-1
5.02	1	$d (J = 10.5)$	H-2a
4.96	1	$d (J = 17.2)$	H-2b
5.38	1	s	H-3a
4.92	1	s	H-3b
2.49	1	$d (J = 12.1)$	H-5
4.11	1	$dd (J = 11.3, 11.6)$	H-6
2.61	1	$tt (J = 3.1, 11.0)$	H-7
4.00	1	$dd (J = 11.0, *)$	H-8
1.84	1	$dd (J = 3.9, 12.9)$	H-9a
1.63	1	$dd (J = 10.6, 12.1)$	H-9b
6.15	1	$d (J = 3.1)$	H-13a
5.96	1	$d (J = 2.8)$	H-13b
1.08	3	s	H-14
4.13	1	$d (J = 11.3)$	H-15a
3.98	1	$d (J = 11.7)$	H-15b

* L'assignement du proton H-8 a été fait à l'aide de HSQC.

Il est partiellement superposé par H-15b.

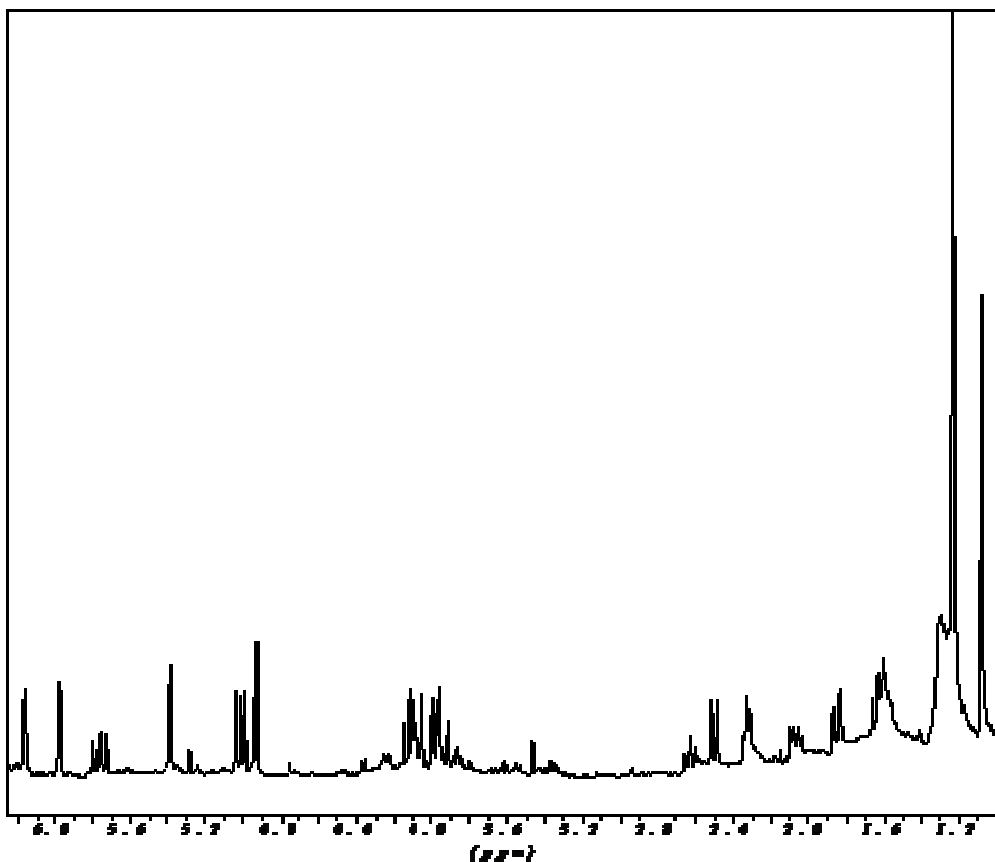


Figure 63: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **14**.

Tableau 36: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **14**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
145.9	CH	C-1
112.6	CH_2	C-2
113.9	CH_2	C-3
143.9	C	C-4
50.5	CH	C-5
78.5	CH	C-6
54.8	CH	C7
67.1	CH	C-8
49.5	CH_2	C-9
41.9	C	C-10
137.4	C	C-11
169.7	C	C-12
119.9	CH_2	C-13
19.1	CH_3	C-14
67.3	CH_2	C-15

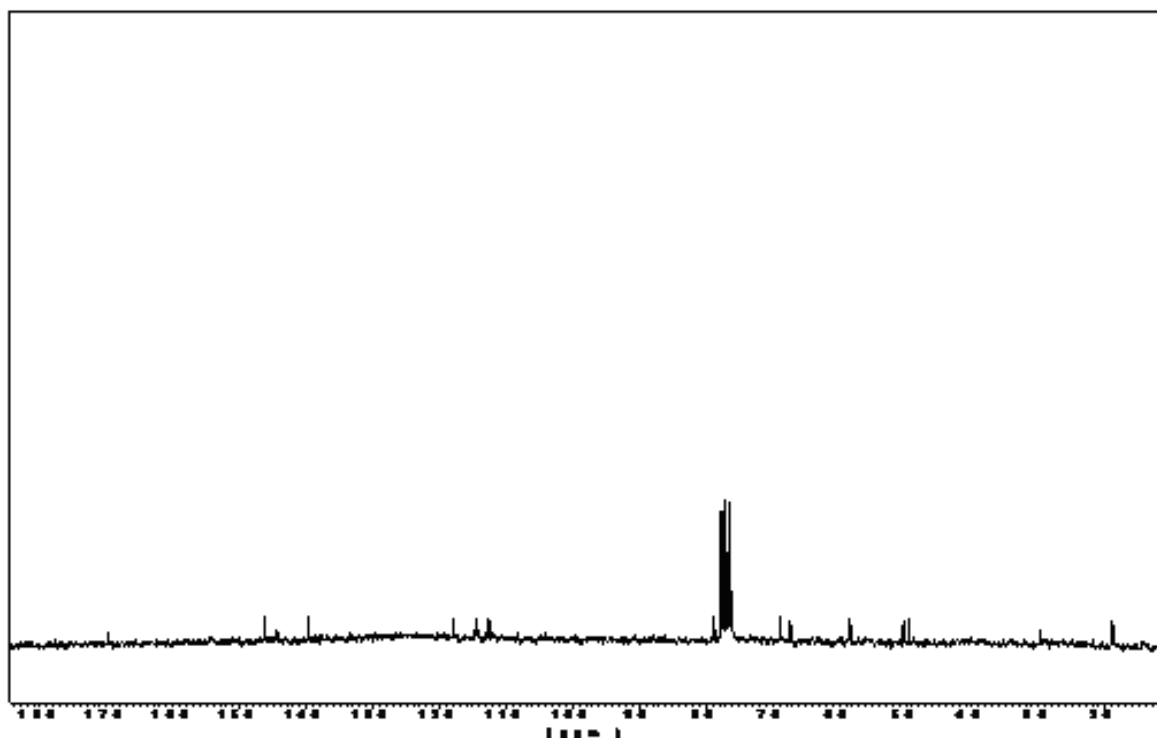


Figure 64: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **14**

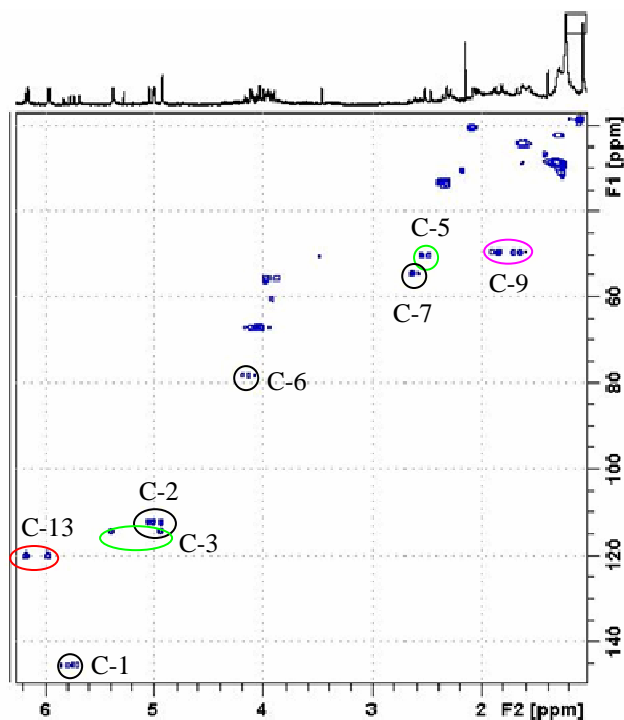
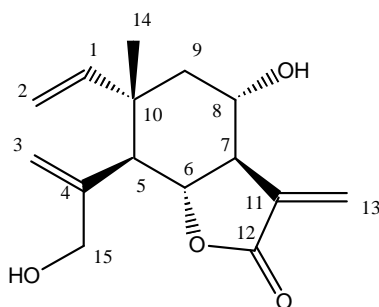


Figure 65: Spectre HSQC (200 MHz, CDCl_3) du composé **14**

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats de ^1H -RMN avec ceux de González et *al.*, (1974) et de ^{13}C -RMN avec ceux de Cardona et *al.*, (1989), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



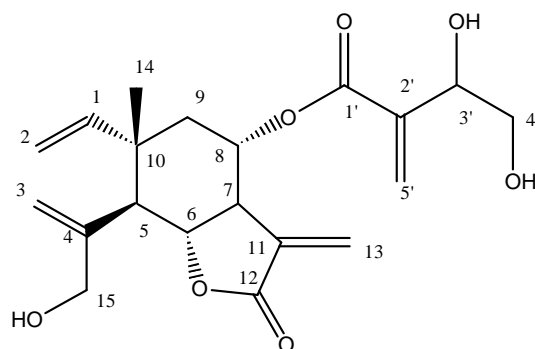
Composé 14

Il s'agit du 11β , 13-déhydromélitensine. Ce composé a été isolé la première fois chez *Centaurea pullata* (González et *al.*, 1974) par la suite il a été isolé de: *C. cuneifolia* (Aslan et Öksüz, 1999), *C. sphaerocephala* ssp. *sphaerocephala* (Bruno et *al.*, 1994), *C. napifolia* (Bruno et *al.*, 1995), *C. aspera* (Cardona et *al.*, 1991), *C. paui* (Cardona et *al.*, 1997), *C. castellana* (González et *al.*, 1974), et de *C. aspera* var. *stenophylla* (Picher et *al.*, 1984).

Cette substance a été également isolée chez *Onopordon corymbosum* (Cardona et *al.*, 1989), un taxon voisin aux centaurees.

Composé 15: 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)-11 β , 13-déhydromélitensine

Le composé **15** se présentait sous forme d'huile soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +22.20^\circ$ (MeOH; c 0.09).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3356 (OH), 1768 (C=O, γ -lactone, ester).

EI-MS (70eV): m/z 378 (C₂₀H₂₆O₇).

L'étude du spectre ¹H-RMN (**Figure 66** & **Tableau 37**), nous a informé sur la présence d'un squelette de sesquiterpène type élémanolide.

Dans la région oléfinique apparaissent les signaux caractéristiques d'un groupe vinylique (–CH=CH₂): le proton H-1 sous forme de doublet dédoublé à δ 5.74 (J = 10.5, 17.2) qui se conjugue avec les protons géminaux H-2a (J = 10.5, *cis*-conjugaison) et H-2b (J = 17.2 Hz, *trans*-conjugaison), qui apparaissent comme doublets à δ 5.04 et 4.98 respectivement.

➤ Deux signaux singulets élargis typiques pour les squelettes des élémanolides ont été attribués aux protons géminaux H-3a et H-3b, qui apparaissent à δ 5.40 et 4.95, respectivement.

➤ Les protons du méthylène exocyclique apparaissent dans la région oléfinique comme deux doublets à δ 6.13 (J = 3.1, H-13a) et à δ 5.53 (J = 3.1, H-13b).

➤ Le signal du proton H-7 apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.95 (J = 3.1, 11.0), qui est une forme typique chez les élémanolides. Ce proton se conjugue avec ses voisins H-6 et H-8 ayant la même constante de couplage qui montre que l'angle diédral entre les protons H-6 et H-7 d'une part et les protons H-8 et H-7 d'autre part est le même. Par conséquent le proton H-7 se trouve entre deux protons (H-6 et H-8), qui ont la même orientation dans l'espace (J = 11.0, *trans*-diaxiale).

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.27 ($J= 3.9, 11.0$). Le déblindage noté pour cette substance par comparaison avec 11 β , 13-déhydromélitensine (composé **14**) dont le proton H-8 apparaît à δ 4.00 indique la présence d'un ester au carbone C-8 (chaîne latérale).

➤ Un singulet intense, qui intègre pour 3 protons, à δ 1.16 a été attribué au méthyle de la tête CH₃-14 lié au carbone C-10 du squelette.

Dans la région des protons attachés aux carbones liés à une fonction oxygénée nous avons observé les protons suivants:

➤ Le proton H-6 apparaît comme un triplet à δ 4.21 ($J= 11.3$) indiquant la présence d'un second proton voisin à une position *trans*-diaxiale, qui apparaît comme un doublet à δ 2.56 ($J= 11.7, H-5$). Le déplacement du proton H-6 indique la présence d'une fonction oxygénée au carbone correspondant. Ceci est en accord avec le signal du C-6 au spectre ¹³C-RMN à δ 78.4.

➤ Deux doublets caractéristiques à δ 4.07 ($J= 13.7$) et 3.99 ($J= 13.7$) ont été attribués aux protons géminaux H-15a et H-15b du groupe hydroxyméthyle attaché au carbone C-4 (143.2 ppm).

Les signaux suivants de la chaîne latérale montrent que l'acide, qui estérifie l'hydroxyle à la position C-8, est le 3,4-dihydroxy-2-méthylène butanoïque :

- Un doublet de doublet à δ 4.62 ($J= 3.5, 6.6$) a été attribué au proton H-3'.
- Deux doublets dédoublés à δ 3.82 ($J= 3.5, 11.0, H-4'a$) et à δ 3.59 ($J = 6.6, 11.3, H-4'b$).
- Deux singulets à δ 6.36 et 6.04 ont été attribués aux protons H-5'a et H-5'b.

Au spectre ¹³C-RMN (**Figure 67 & Tableau 38**), dans la région oléfinique huit signaux ont été identifiés, qui indiquent la présence de quatre doubles liaisons:

- Deux sur le squelette central entre C-1 (145.5) et C-2 (115.0), entre C-3 (113.2) et C-4 (143.5).
- Une sur l'anneau lactonique entre C-11 (136.5) et C-13 (120.8).
- Une sur la chaîne latérale entre C-2' (138.6) et C-5' (127.4).

Au même spectre, un signal à δ 169.6 a été attribué au carbonyle de l'anneau lactonique, un autre signal à δ 165.1 caractéristique d'un second carbonyle a été attribué à C-1'.

Tableau 37: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **15**.

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, $J(\text{Hz})$	Position
5.74	1	<i>dd</i> ($J = 10.5, 17.2$)	H-1
5.04	1	<i>d</i> ($J = 10.5$)	H-2a
4.98	1	<i>d</i> ($J = 17.2$)	H-2b
5.40	1	<i>s</i>	H-3a
4.95	1	<i>s</i>	H-3b
2.56	1	<i>d</i> ($J = 11.7$)	H-5
4.21	1	<i>t</i> ($J = 11.3$)	H-6
2.95	1	<i>tt</i> ($J = 3.1, 11.0$)	H-7
5.27	1	<i>dt</i> ($J = 3.9, 11.0$)	H-8
2.05	1	<i>dd</i> ($J = 4.0, 13.6$)	H-9a
1.71	1	<i>dd</i> ($J = 10.9, 13.6$)	H-9b
6.13	1	<i>d</i> ($J = 3.1$)	H-13a
5.52	1	<i>d</i> ($J = 3.1$)	H-13b
1.15	3	<i>s</i>	H-14
4.07	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15a
3.99	1	<i>d</i> ($J = 13.7$)	H-15b
4.62	1	<i>dd</i> ($J = 3.5, 6.6$)	H-3'
3.82	1	<i>dd</i> ($J = 3.5, 11.0$)	H-4'a
3.59	1	<i>dd</i> ($J = 6.6, 11.3$)	H-4'b
6.36	1	<i>s</i>	H-5'a
6.04	1	<i>s</i>	H-5'b

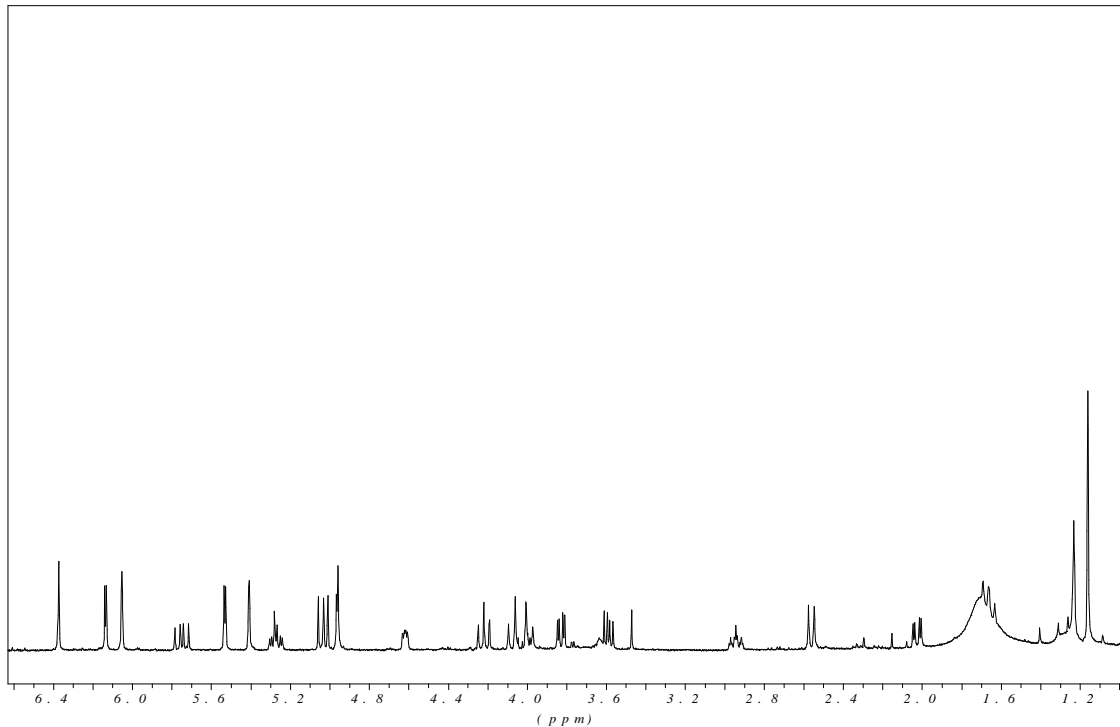


Figure 66: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **15**.

Tableau 38: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **15**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
145.5	CH	C-1
115.0	CH_2	C-2
113.2	CH_2	C-3
143.5	C	C-4
50.2	CH	C-5
78.4	CH	C-6
52.1	CH	C7
71.3	CH	C-8
44.7	CH_2	C-9
41.9	C	C-10
136.5	C	C-11
169.6	C	C-12
120.8	CH_3	C-13
12.8	CH_3	C-14
18.5	CH_2	C-15
165.1	C	C-1'
138.6	C	C-2'
69.4	CH	C-3'
65.2	CH_2	C-4'
127.4	CH_2	C-5'

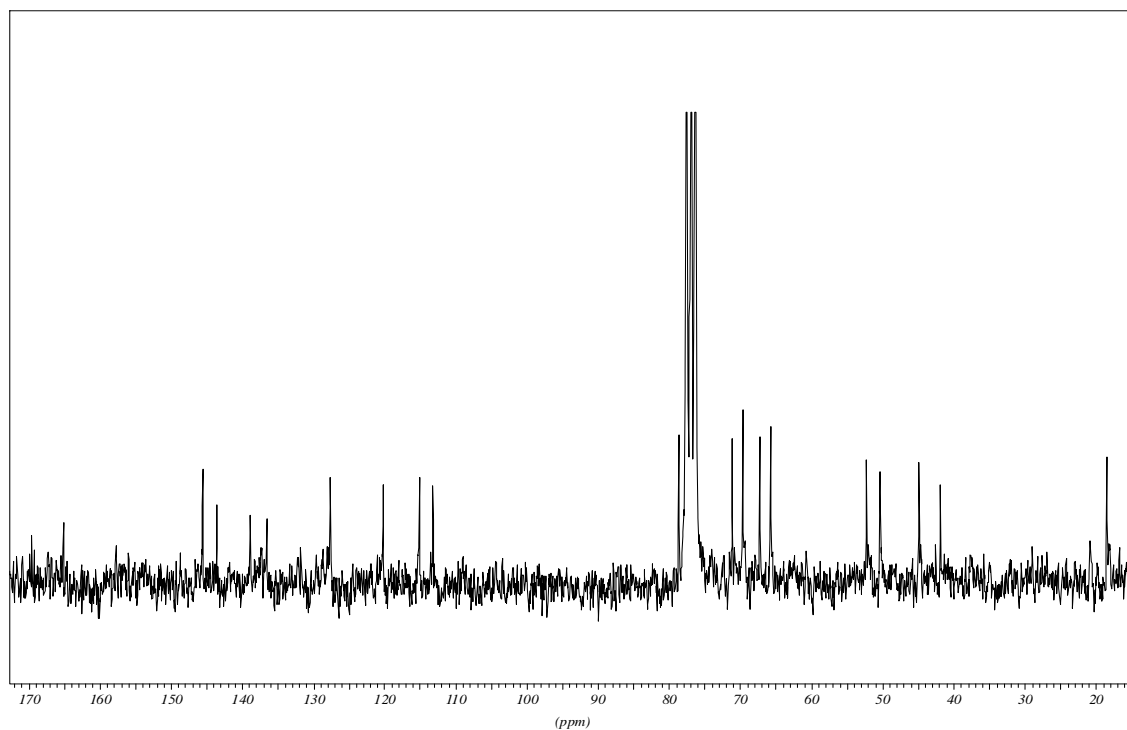
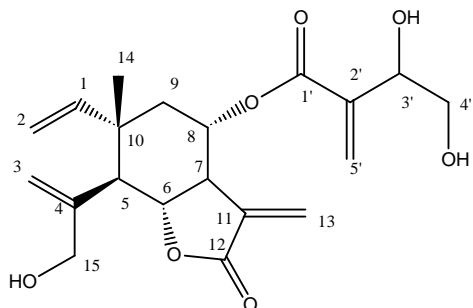


Figure 67: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **15**

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats de ^1H -RMN et de ^{13}C -RMN avec ceux de la littérature (Bruno *et al.*, 1988), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



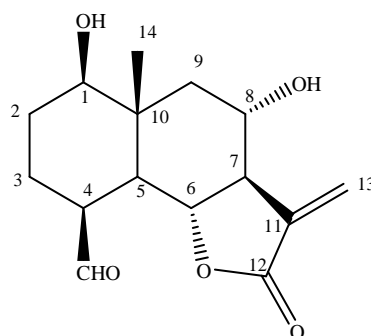
Composé 15

Il s'agit du 8α -*O*-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)- 11β ,13-déhydromélitensine, un gérmacranolide qui a été isolé chez les espèces suivantes de la famille des Asteraceae: *Centaurea cineraria* ssp. *umbrosa* (Bruno *et al.*, 1988), *C. napifolia* (Bruno *et al.*, 1995), *C. malacitana* (Barrero *et al.*, 1988), *C. napifolia* (Bruno *et al.*, 1995), *C. orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003), *C. deusta* (Karioti *et al.*, 2002), *C. zuccariniana* (Koukoulitsa *et al.*, 2002), *C. attica* ssp. *attica* (Skaltsa *et al.*, 1999), *C. thessala* ssp. *drakiensis* (Skaltsa *et al.*, 2000b) et de *Cnicus benedictus* (Tsanakova *et al.*, 1994).

Selon les résultats obtenus par Koukoulitsa *et al.* (2002), ce composé possède *in vitro* une forte activité cytotoxique et cytostatique contre les cellules cancéreuses.

Composé 16: 8 α -hydroxy-4-*épi*-sonchucarpolide

Le composé **16** se présentait sous forme huileuse incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +31.80^\circ$ (MeOH; c 0.20).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3400 (OH), 1640 (C=O, γ -lactone, ester) et 1718 cm⁻¹ (C=O, aldéhyde).

EI-MS (70eV): m/z 280 (C₁₅H₂₀O₅).

Les spectres ¹H-RMN, et ¹³C-RMN (**Figure 69 & Tableau 40**), nous ont fourni des indications sur la présence d'une décaline portant d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982).

Au niveau du spectre ¹H-RMN (**Figure 68 & Tableau 39**), un singulet trop déblindé dans la région du bas champ à δ 9.91 nous a indiqué la présence d'un aldéhyde. De plus, nous avons constaté les signaux correspondant au groupe α -méthylène γ -lactone:

➤ les protons géminaux de la position C-13 comme deux doublets à δ 6.20 ($J= 3.1$, H-13a) et à δ 5.97 ($J= 3.1$, H-13b) (δ 136.5, C-11 et 119.2, C-13), qui présentent une conjugaison avec le proton H-7. Ce dernier apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.53 ($J= 3.1$, 10.6). Il présente une conjugaison avec le proton lactonique H-6, qui apparaît comme un triplet à δ 4.39 ($J= 11.4$), et également avec le proton H-8, qui est proche d'une fonction oxygénée et apparaît comme un triplet de triplet à δ 4.09 ($J= 4.3$, 10.6).

Le squelette du composé **16** est surtout conclu par les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage des protons H-9 et H-5 et par l'apparition d'un singulet à δ 0.82. Ce dernier intégrant pour 3 protons correspond au méthyle de la tête de la sesquiterpène lactone.

Le carbone C-10 est saturé (41.2 ppm), alors il s'agit soit d'un élémanolide soit d'un eudesmanolide. Dans le spectre ¹H-RMN seulement les protons oléfiniques de la double

liaison exocyclique sont observés, alors l'absence d'autres protons oléfiniques rejette la possibilité d'un squelette élémanolide.

Le proton H-9a apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.28 ($J = 4.3, 12.2$) et le proton H-9b apparaît à δ 1.29 comme un multiplet.

La *trans*-conformation entre les deux chaises de la décaline est conclue par le signal du proton H-5, qui apparaît à δ 1.97 comme un doublet dédoublé ($J = 5.1, 11.7$). La grande constante de couplage ($J = 11.7$) avec le proton H-6 montre que leurs positions sont *trans-diaxiale*. Alors que la petite constante de couplage ($J = 5.1$) montre la présence d'un autre proton vicinal au C-4 et indique que les conformations relatives entre H-5/H-4 sont *axiale-equatoriale*; par conséquence le substituant au C-4 doit être *axial*.

Les constantes de couplages $J_{6,7}$ et $J_{7,8}$ indiquent une conformation relative entre eux *trans-diaxiale*, par conséquence le composé porte un anneau lactonique en position *trans* par rapport au squelette central (décaline). Sachant que le proton H-7 tient une α -conformation pour des raisons biosynthétiques (Kupchan *et al.*, 1967) le H-8 doit tenir une β -conformation et alors OH-8 est placé en position α .

Le déplacement chimique du proton H-4 à δ 2.77 ($J = 5.5$) indique la présence d'un substituant au même carbone qui le déblindé; ce substituant est le groupe aldéhyde (H-15). Par le spectre ^{13}C -NMR, nous avons dénombré 15 carbones (3C, 7CH, 4CH₂ et 1CH₃).

Dans la région où apparaissent les carbones voisins à une fonction oxygénée trois signaux ont été aperçus: C-1 (δ 76.4), C-6 (δ 74.4) et C-8 (δ 65.8).

Dans la région des carbones saturés apparaissent les signaux suivants: C-2 (δ 25.6), C-3 (δ 20.6), C-4 (δ 43.8), C-5 (δ 46.7), C-7 (δ 55.0), C-9 (δ 47.3), C-10 (δ 41.2) et C-14 (δ 11.8).

De plus, les signaux des carbonyles suivants ont été observés : C-12 (δ 172.5) et C-15 (δ 200.1).

Tableau 39: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **16**.

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, $J(\text{Hz})$	Position
3.35	1	<i>dd</i> ($J = 4.4, 10.6$)	H-1
1.69	1	<i>m</i>	H-2a
1.57	1	<i>m</i>	H-2b
2.41	1	<i>de</i> ($J = 14.1$)	H-3a
1.40	1	<i>m</i>	H-3b
2.77	1	<i>t</i> ($J = 5.5$)	H-4
1.97	1	<i>dd</i> ($J = 5.1, 11.7$)	H-5
4.39	1	<i>t</i> ($J = 11.4$)	H-6
2.53	1	<i>tt</i> ($J = 3.1, 10.6$)	H-7
4.09	1	<i>tt</i> ($J = 4.3, 10.6$)	H-8
2.28	1	<i>dd</i> ($J = 4.3, 12.2$)	H-9a
1.29	1	<i>m</i>	H-9b
6.20	1	<i>d</i> ($J = 3.1$)	H-13a
5.97	1	<i>d</i> ($J = 3.1$)	H-13b
0.82	3	<i>s</i>	H-14
9.91	1	<i>s</i>	H-15

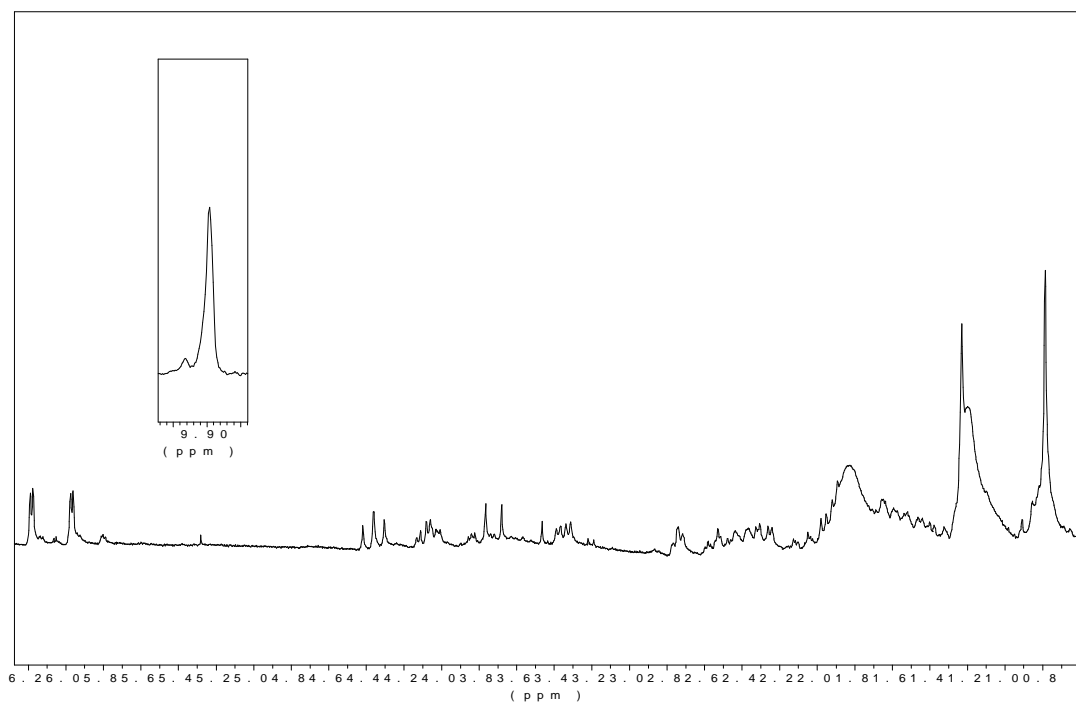


Figure 68: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **16**.

Tableau 40: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **16**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
76.4	CH	C-1
25.6	CH_2	C-2
20.6	CH_2	C-3
43.8	CH	C-4
46.7	CH	C-5
74.4	CH	C-6
55.0	CH	C7
65.8	CH	C-8
47.3	CH_2	C-9
41.2	C	C-10
136.5	C	C-11
172.5	C	C-12
119.2	CH_2	C-13
11.8	CH_3	C-14
200.1	CH	C-15

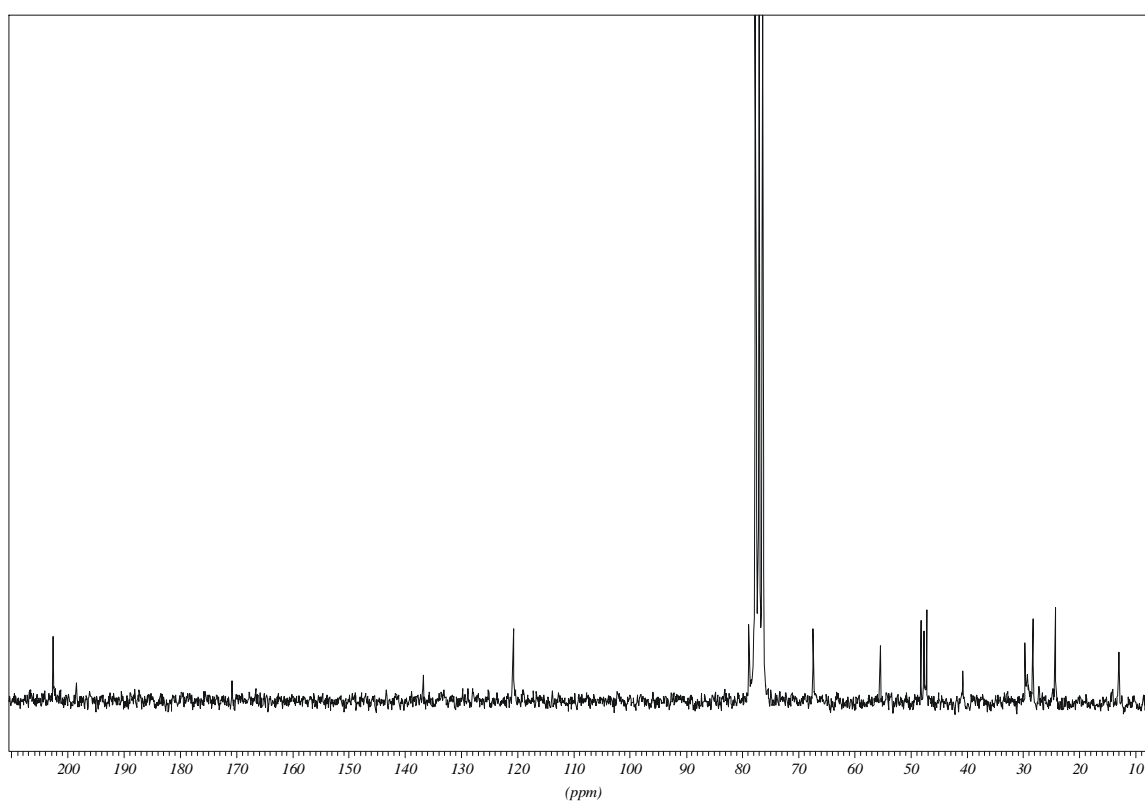


Figure 69: Spectre ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **16**.

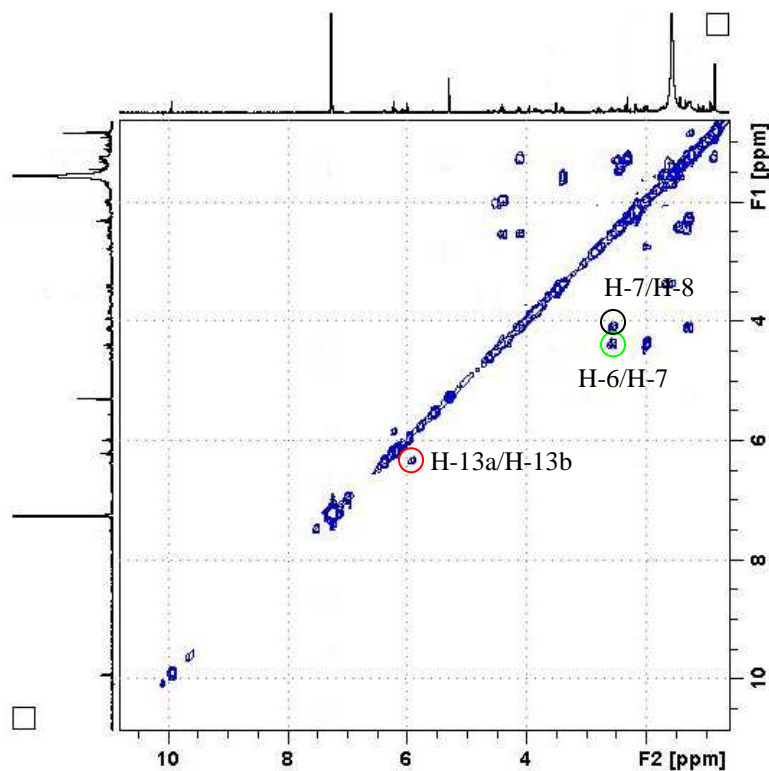
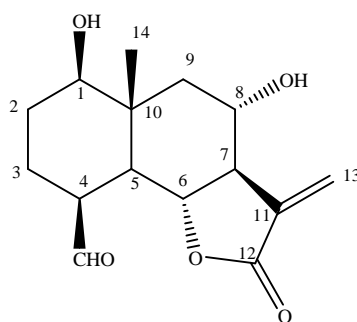


Figure 70: Spectre COSY (200 MHz, CDCl_3) du composé **16**.

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats des spectres ^1H -RMN et ^{13}C -RMN avec ceux de la littérature (Skaltsa et *al.*, 2000b), la structure suivante a été attribuée à ce composé:

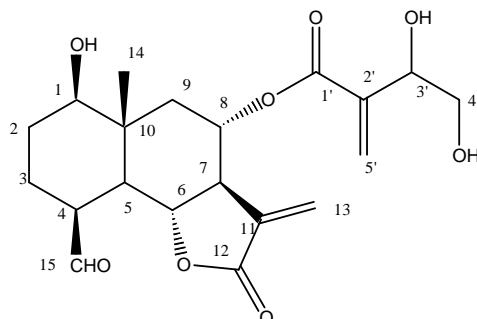


Composé 16

Il s'agit du 8 α -hydroxy-4-épi-sonchucarpolide, un eudesmanolide isolé pour la première fois chez *Centaurea tessala* ssp. *drakiensis* (Skaltsa et *al.*, 2000b), par la suite il a été isolé de *C. orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003).

Composé 17: 8 α -O-3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoloxy)-4-épi-sonchucarpolide (Malaciténolide)

Le composé 17 se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +25.53^\circ$ (MeOH; c 1.05).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3420 (OH), 1640 (C=O, γ -lactone, ester).

EI-MS (70eV): m/z 394 (C₂₀H₂₆O₈).

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 71 & Tableau 41**) du composé 17 nous a permis de distinguer la présence d'une décaline portante d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982). Son squelette central et sa conformation sont identiques à ceux du composé 16; en plus il porte une chaîne latérale, qui estérifie l'hydroxyle à la position C-8.

Les deux signaux oléfiniques des protons géminaux du méthylène exocyclique à la position C-13 apparaissent comme deux doublets à δ 6.16 (J = 3.1, H-13a) et à δ 5.51 (J = 3.2, H-13b).

Un signal caractéristique pour les sesquiterpène lactones ayant un groupe α -méthylène γ -lactone a été détecté et attribué au proton H-7, qui apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.83 (J = 3.1, 11.0 Hz) à cause de sa conjugaison avec les méthines des positions C-6, C-8 et avec les protons géminaux H-13a, H-13b.

Il faut signaler qu'également dans le cas des eudesmanolides le couplage entre le proton H-7 et les protons géminaux du méthylène exocyclique est en bonne concordance avec la règle de Samek (1970).

➤ Le proton H-4 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.78 (J = 1.2, 5.1) à cause de sa conjugaison avec les protons H-3a et H-3b, ainsi qu'avec le proton H-5.

➤ Ce dernier (H-5) apparaît comme doublet dédoublé assez blindé à δ 2.00 ($J= 5.7, 11.7$). La petite valeur de la constante de couplage nous indique que les protons H-4, H-5 tiennent une position *axiale-équatoriale* entre eux; la grande valeur de la constante de couplage est due à sa conjugaison avec le proton H-6 et nous indique que les protons H-5, H-6 se trouvent en position *trans-diaxiale*.

➤ Le proton H-6 apparaît sous forme d'un triplet à δ 4.50 ($J = 11.3$) et se conjugue avec ses protons voisins H-5 et H-7 et indique qu'ils se trouvent en position *trans-diaxiale*.

➤ Le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.28 ($J= 4.7, 10.5$) plus déblindé que le proton H-6 et cela est expliqué par l'influence de la chaîne latérale qu'il porte. Les grandes valeurs des constantes de couplage entre les protons H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 confirme que ces protons sont placés entre eux en position *axiale* et *anti*-parallèle et par conséquence les deux chaises de la décaline tiennent une *trans* conformation entre eux.

➤ Un singulet trop déblindé dans la région du bas champ à δ 9.92, nous a indiqué la présence d'un aldéhyde. L'absence d'une conjugaison avec le proton H-4 nous indique que le groupe aldéhyde est placé axialement. Par contre, chez la substance précédente (**16**), le proton H-15 apparaît comme un doublet à δ 9.64 ($J= 3.9$) à cause de sa conjugaison avec le proton H-4 (-CHO est placé équatorialement).

Les signaux de la chaîne latérale ont été détectés comme suit:

Dans la région où apparaissent les protons voisins à une fonction oxygénée:

➤ Un doublet dédoublé à δ 4.61 ($J = 3.1, 6.2$) qui a été attribué au proton H-3'.

➤ Deux doublets dédoublés à δ 3.83 ($J = 3.5, 11.3$) et à δ 3.58 ($J = 6.6, 11.0$) correspondant aux protons géminaux H-4'a et H-4'b, respectivement.

Dans la région oléfinique :

➤ Deux singulets élargis à δ 6.36 et δ 6.04, correspondant aux protons géminaux, H-5'a et H-5'b, respectivement.

En plus, dans la région du haut champ nous avons identifié le reste des protons:

➤ Le méthyle de la tête (CH₃-14) apparaît comme un singulet intégrant pour trois protons à δ 0.90.

➤ Le proton H-1 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 3.38 ($J= 4.2, 11.3$ Hz).

➤ Le proton H-4 apparaît comme un doublet dédoublé à δ 2.78 ($J= 1.2, 5.1$ Hz).

➤ Le proton H-9a comme un doublet dédoublé à δ 2.46 ($J = 4.0, 11.1$ Hz).

➤ Les protons géminaux H-2a et H-2b, H-3a et H-3b, ainsi que le proton H-9b apparaissent comme multiplets.

Tableau 41: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé 17

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.38	1	<i>dd</i> ($J= 4.2, 11.3$)	H-1
1.75-1.55	2	<i>m</i>	H-2a, H-2b
1.85-1.60	2	<i>m</i>	H-3a, H-3b
2.78	1	<i>dd</i> ($J= 1.2, 5.1$)	H-4
2.00	1	<i>dd</i> ($J= 5.5, 11.7$)	H-5
4.50	1	<i>t</i> ($J= 11.3$)	H-6
2.83	1	<i>tt</i> ($J= 3.1, 11.0$)	H-7
5.28	1	<i>td</i> ($J= 4.7, 10.5$)	H-8
2.46	1	<i>dd</i> ($J= 4.7, 12.9$)	H-9a
6.16	1	<i>d</i> ($J= 3.1$)	H-13a
5.51	1	<i>d</i> ($J= 3.2$)	H-13b
0.90	3	<i>s</i>	H-14
9.92	1	<i>s</i>	H-15
4.61	1	<i>dd</i> ($J= 3.1, 6.2$)	H-3'
3.83	1	<i>dd</i> ($J= 3.5, 11.3$)	H-4'a
3.58	1	<i>dd</i> ($J= 6.6, 11.0$)	H-4'b
6.36	1	<i>s</i>	H-5'a
6.04	1	<i>s</i>	H-5'b

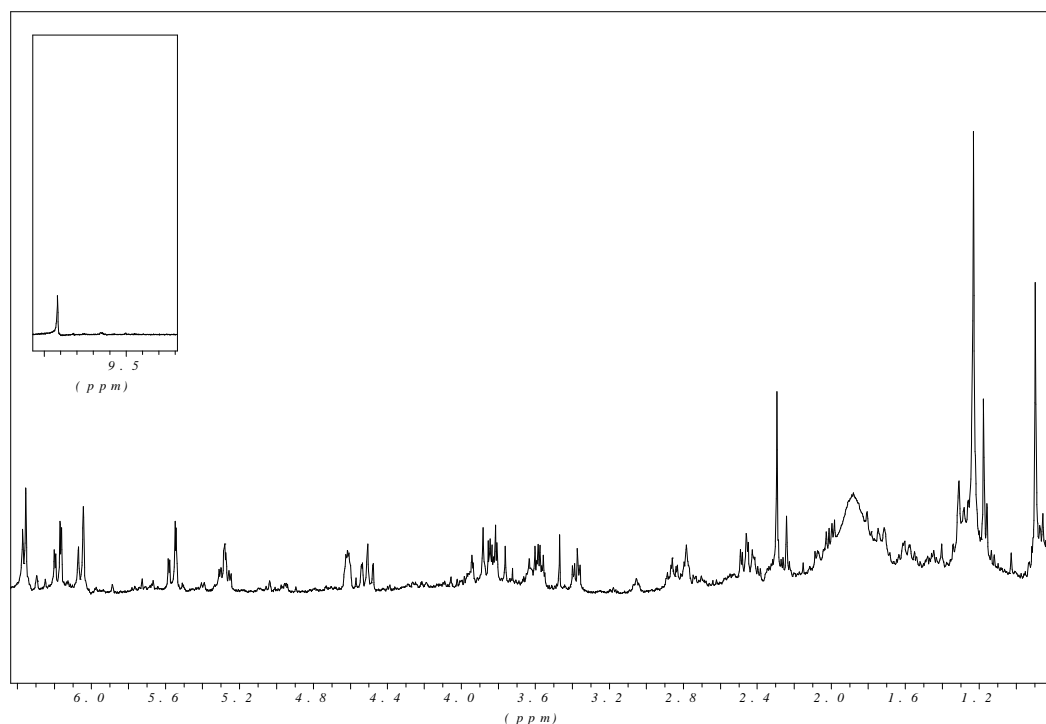
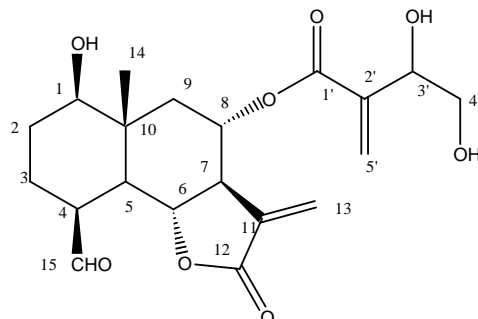


Figure 71: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé 17.

Par comparaison des résultats de $^1\text{H-RMN}$ avec ceux de la littérature (Barrero *et al*, 1997a) la structure suivante a été attribuée à ce composé :



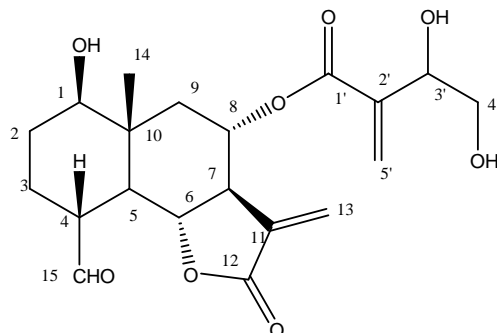
Composé 17

Il s'agit du $8\alpha\text{-O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoloxy)-4-épi-sonchucarpolide}$ (malaciténolide), isolé pour la première fois par *Centaurea malacitana* (Barrero *et al*, 1997a); par la suite il a été isolé par les espèces grecques *C. attica* ssp. *attica* (Skaltsa *et al.*, 1999), *C. orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003) et *C. spinosa* (Saraglou *et al.*, 2005).

Composé 18: 8 α -O-(3, 4 dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)-sonchucarpolide

(4-*épi*-malacitenolide)

Le composé **18** se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +25.90^\circ$ (MeOH; c 0.04).

IR (CaF₂): $\nu_{\max} = 3600-3300 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 2917 cm^{-1} (vibration de tention C-H), 1769 cm^{-1} (C=O, γ -lactone, ester), 1723.5 cm^{-1} (C=O chaîne latérale).

EI-MS (70eV): m/z 394 (C₂₀H₂₆O₈).

Les spectres ¹H-RMN (**Figure 72 & Tableau 42**) et ¹³C-RMN (**Tableau 43**) nous ont fourni des indications sur la présence d'une décaline portant d'un anneau lactonique (Kasymov, 1982).

Les signaux suivants ont été observés :

➤ Par les valeurs des ¹³C-NMR et HSQC (**Figure 74**) nous avons constaté que le C-6 (δ 78.8) est plus déblindé que le C-8 (δ 69.5). Ces valeurs sont révélatrices que la lactonisation a lieu entre les carbones des positions C-6 et C-12.

➤ A δ 9.64 apparaît comme un doublet le proton du groupe aldéhyde au carbone C-4, avec une constante de couplage $J = 3.9$ (au cas de la substance **17** ce proton apparaît comme singulet à δ 9.92).

Cette petite constante de couplage est due au fait que l'aldéhyde tient une orientation équatoriale, et cela lui permet de présenter une conjugaison avec le proton H-4 (placé axialement).

➤ A la région oléfinique les signaux caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone sont aperçus: H-13a et H-13b (C-13 δ 120.2) apparaissent comme deux doublets à δ 6.11 ($J =$

2.8) et 5.52 ($J= 2.8$) à cause de leurs conjugaisons avec le proton H-7. Cette conjugaison a été révélée par le spectre COSY (**Figure 73**).

De plus les valeurs des constantes de couplage entre le proton H-7 ($J= 2.7, 10.6$) et le proton H-8 ($J= 3.2, 9.4$) nous indiquent une position *trans* du groupe α -méthylène γ -lactone (Cadona *et al.*, 1997).

➤ Le proton H-7 (C-7 δ 55.3) apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.88 ($J= 2.7, 10.6$) à cause de sa conjugaison avec les protons géminaux H-13a, H-13b et les protons H-6 et H-8.

➤ Le proton H-6 (C-6 δ 78.8) apparaît comme un triplet à δ 3.97 ($J = 11.3$) et se conjugue avec ses protons voisins H-5 et H-7 (*trans*-diaxiale conformation), alors que le proton H-8 apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.27 ($J= 3.2, 9.4$) à cause de sa conjugaison avec les protons H-7, H-9a et H-9b.

➤ Le proton H-8 est déblindé par rapport au proton H-6 cela est dû à la chaîne latérale qu'il porte.

➤ Le proton H-5 (C-5 δ 48.1) apparaît comme un triplet à δ 1.88 ($J= 11.4$) et se conjugue avec ses protons voisins H-4 et H-6 (*trans*-diaxiale conformation). Ces conjugaisons sont confirmées par COSY (**Figure 73**).

A l'aide du spectre NOESY la stéréochimie relative de la substance a été approuvée:

➤ Le groupe aldéhyde au carbone C-15 est placé équatorialement parce que le proton H-15 donne un signal NOE avec le proton H-5.

➤ Le proton H-7 donne un signal NOE avec le proton H-5; ce dernier donne un signal NOE avec le proton H-1.

➤ Les protons du méthyle-14 (qui apparaissent comme un singulet à δ 1.02) donnent des signaux NOE avec les protons H-6 et H-8, mais pas avec le proton H-1.

➤ Le proton H-4 donne des signaux NOE avec les protons H-6 et le CH₃-14.

Ces données en combinaison avec les grandes valeurs des constantes de couplages entre les protons H-4/H-5, H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 confirme que ces protons sont placés entre eux en position *axiale* et *anti*-parallèle.

Tableau 42: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **18**.

δ (ppm)	$n^{\circ}\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.42	1	dd ($J = 4.3, 10.9$)	H-1
1.73	1	m	H-2a
1.56	1	m	H-2b
1.83	1	m	H-3a
1.59	1	m	H-3b
2.49	1	tt ($J = 4.0, 11.6$)	H-4
1.88	1	t ($J = 11.4$)	H-5
3.97	1	t ($J = 11.3$)	H-6
2.88	1	tt ($J = 2.7, 10.6$)	H-7
5.27	1	dt ($J = 3.2, 9.4$)	H-8
2.55	1	dd ($J = 4.5, 12.9$)	H-9a
1.31	1	dd ($J = 4.8, 13.2$)	H-9b
6.11	1	d ($J = 2.8$)	H-13a
5.52	1	d ($J = 2.8$ Hz)	H-13b
0.95	3	s	H-14
9.64	1	d ($J = 3.9$)	H-15
4.61	1	dd ($J = 3.7, 6.4$)	H-3'
3.83	1	dd ($J = 3.7, 11, 1$)	H-4'a
3.59	1	dd ($J = 6.6, 11, 1$)	H-4'b
6.35	1	s	H-5'a
6.04	1	s	H-5'b

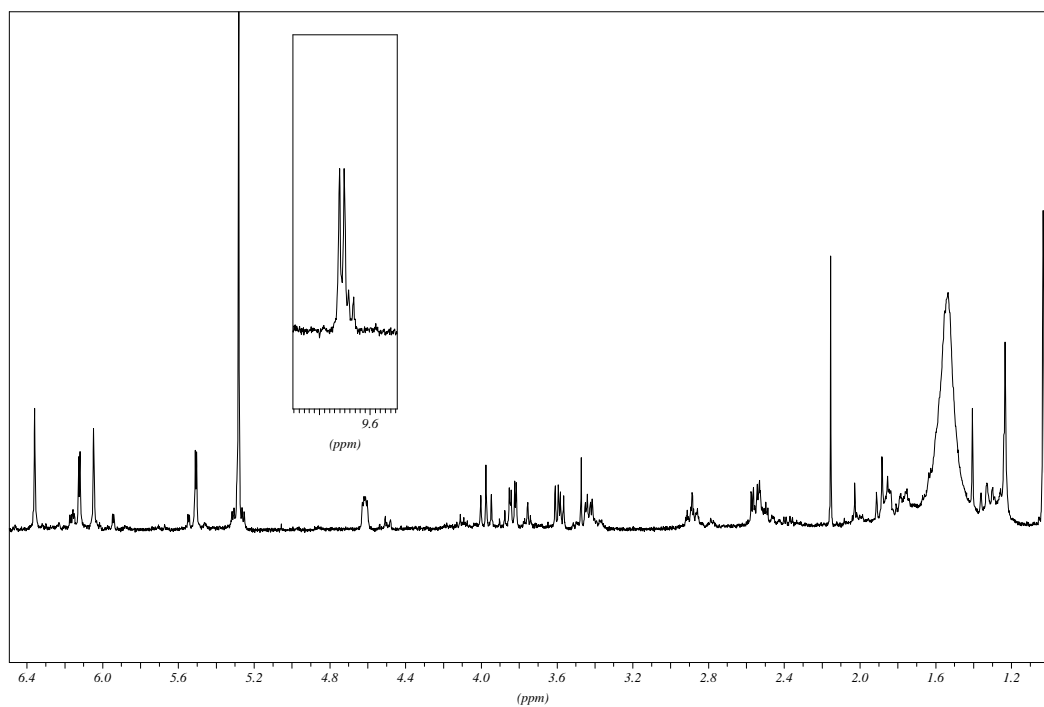


Figure 72: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **18**.

Tableau 43: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **18***

δ (ppm)	Types de carbones	Position
76.9	CH	C-1
24.6	CH ₂	C-2
23.1	CH ₂	C-3
47.8	CH	C-4
48.1	CH	C-5
78.8	CH	C-6
55.3	CH	C7
69.5	CH	C-8
43.5	CH ₂	C-9
41.9	C	C-10
136.6	C	C-11
170.2	C	C-12
120.2	CH ₂	C-13
12.8	CH ₃	C-14
202.2	CH	C-15
166.5	C	C-1'
72.4	C	C-2'
71.5	CH	C-3'
65.9	CH ₂	C-4'
128.1	CH ₂	C-5'

*Assignements faits à l'aide des spectres HSQC et HMBC.

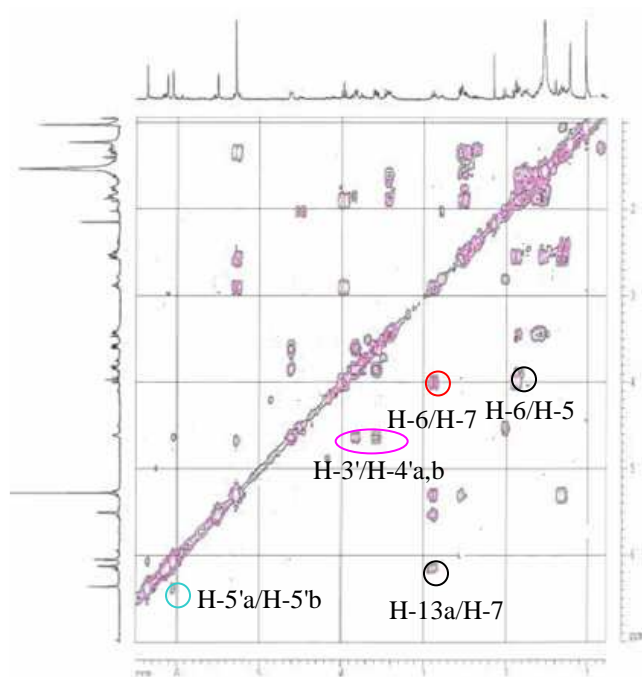


Figure 73: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **18**.

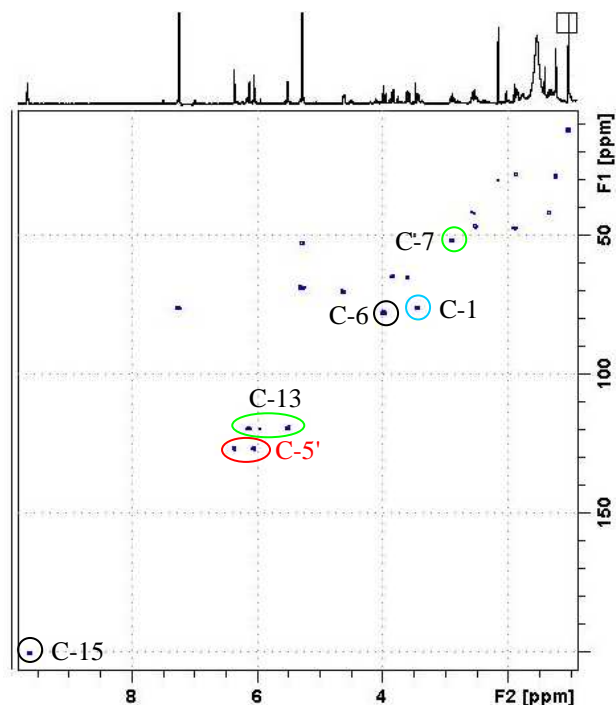


Figure 74: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **18**.

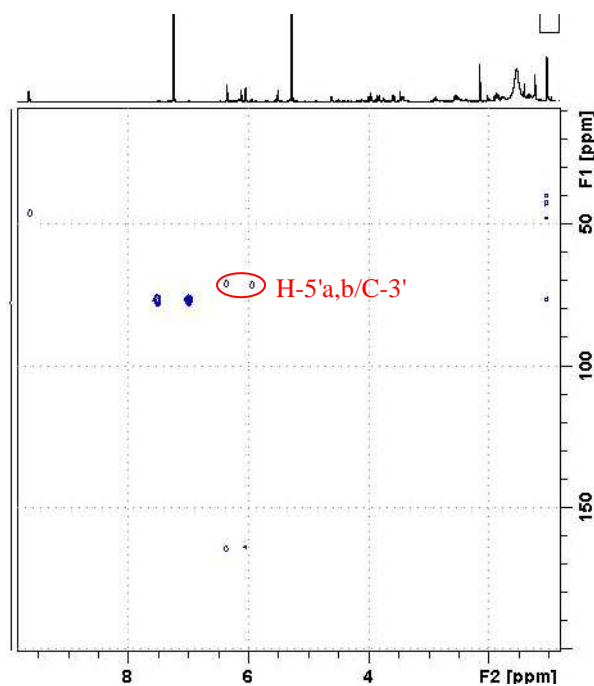
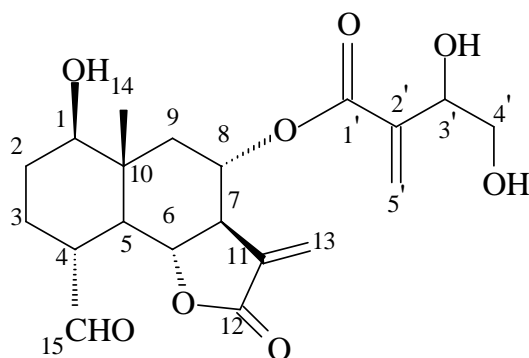


Figure 75: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **18**.

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats de ^1H -RMN et de ^{13}C -RMN avec ceux de la littérature (Saraglou et *al.*, 2005) la structure suivante a été attribuée à ce composé:

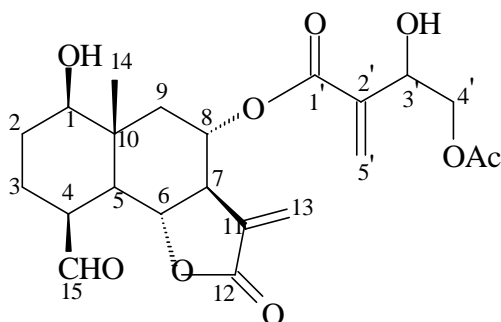


Composé 18

Il s'agit du 8α -O-(3,4 dihydroxy-2-méthylène-butanoyle)-sonchucarpolide (4-épi-malacitenolide), un eudesmanolide isolé pour la première fois chez *Centaurea spinosa* (Saraglou et *al.*, 2005).

Composé 19: 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylènebutanoyl)-4-épi-sonchucarpolide

Le composé **19** se présentait sous forme huileuse incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +21.02^\circ$ (MeOH; c 0.07).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3411 (OH), 1632, (C=O, γ -lactone), 1766 cm⁻¹ (C=O, ester), 1720 cm⁻¹ (C=O, aldéhyde) et 1710 cm⁻¹ (C=O, acétyle).

EI-MS (70eV): m/z 436 (C₂₂H₂₈O₉)

L'analyse des spectres ¹H-RMN (**Figure 76 & Tableau 44**) et ¹³C-RMN (**Figure 77 & Tableau 45**) nous a indiqué la présence d'un eudesmanolide ayant un anneau lactonique entre les positions C-6 et C-12 et un groupe aldéhyde à la position C-4 (Kasymov, 1982). D'autres informations ont été recueillies:

- Un singulet à δ 9.92 a été attribué au proton du groupe aldéhyde dont le signal du carbone apparaît à δ 201.8.
- A la région oléfinique apparaissent les signaux des protons H-13a, H-13b, comme deux doublets avec des valeurs de constantes identiques ($J= 2.7$) à δ 6.17 et 5.58, respectivement. Ces protons sont caractéristiques du groupe α -méthylène γ -lactone et se conjuguent avec le proton H-7, qui apparaît comme un triplet de triplet à δ 2.85 ($J= 2.7, 11.2$). Cette conjugaison est confirmée par le spectre COSY.

Au niveau des mêmes spectres, dans la région du haut champ nous avons observé la présence de plusieurs signaux, à l'inverse de la région oléfinique, qui apparaît pauvre en signaux; ceci nous indique que la substance porte un squelette central saturé (décaline).

- Le proton H-4 apparaît comme un triplet à δ 2.78 ($J = 5.1$) et se conjugue avec le proton H-3b (confirmé par le spectre COSY) et avec le proton H-5, qui apparaît assez blindé à δ 1.99 ($J= 5.4, 12.5$). La grande constante de couplage de ce dernier indique une conformation

trans-diaxiale avec son autre proton voisin H-6, qui apparaît comme un triplet à δ 4.51 avec une grande constante de couplage ($J = 11.8$) indicative de la présence d'un autre proton voisin en position *trans-diaxiale* (H-7).

➤ Le proton H-7 se conjugue avec le proton H-8, qui apparaît comme un triplet dédoublé à δ 5.28 ($J = 3.5, 11.7$). La grande constante de couplage indique que ces deux protons sont en position *trans-diaxiale* entre eux.

Le spectre NOESY (**Figure 78**) confirme ces données. Nous avons aperçu les signaux NOE entre les protons suivants:

➤ Le proton H-7 avec le proton H-5. Le proton H-9b avec les protons H-7 et H-1. Par conclusion les protons H-1, H-5, H-7 et H-9b possèdent la même orientation dans l'espace que le proton H-7, qui tient une α -conformation (Kupchan *et al.*, 1967).

➤ Le proton H-8 avec le proton H-6.

Comme les protons H-5/H-6, H-6/ H-7, H-7/H-8 sont placés en position *trans-diaxiale* et anti-parallèle, donc les protons H-6 et H-8 tiennent une β -conformation.

➤ Le proton H-15 (groupe-CHO) avec le proton H-6. Par conséquent ce groupe-CHO tient une orientation β par rapport au carbone C-4 et une position *axiale*, car le proton H-4 comme nous l'avons déjà décrit est en position *équatoriale* par rapport au proton H-5.

➤ Le déplacement paramagnétique du H-1 à δ 3.38 est révélateur de la présence d'un substituant oxygéné (-OH). De plus le carbone C-1 apparaît à la région des carbones oxygénés à δ 77.8.

➤ Un singulet intégrant pour trois protons à δ 0.90 a été attribué au méthyle de la tête (C₁₀-CH₃). Par le spectre NOESY, il est évident que ce méthyle donne des signaux NOE avec les protons H-9a et H-6, mais pas avec le proton H-1. Alors nous pouvons conclure que le méthyle tient une β -orientation, tandis que le proton H-1 tient une α -orientation; par conséquent, l'hydroxyle de la position H-1 tient une β -orientation.

➤ Le déplacement chimique du proton H-8 qui est plus déblindé par rapport au proton H-6 indique la présence d'un ester à C-8. L'acide qui estérifie le 8-OH est le 4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoïque dont les signaux sont les suivants:

➤ A δ 6.37 et 6.05 deux singulets élargis attribués aux protons H-5'a et H-5'b, respectivement.

➤ A δ 2.07 un singulet intégrant pour 3 protons correspondant au méthyle de l'acétyle.

➤ A δ 4.73 ($J = 3.9, 6.7$) un doublet dédoublé attribué au proton H-3'.

➤ A δ 4.31 ($J= 3.9, 11.7$) et 4.17 ($J= 6.7, 11.4$) deux doublets dédoublés correspondant aux protons H-4'a et H-4'b, respectivement. Il faut noter qu'il y a un déplacement paramagnétique par rapport au composé **17** (3.83 & 3.58) à cause de l'acétyle.

Tableau 44: Valeurs des $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) du composé **19**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
3.38	1	<i>dd</i> ($J = 4.3, 11.4$)	H-1
1.71	1	<i>m</i>	H-2a
1.60-1.56	1	<i>m</i>	H-2b
2.45-2.40	1	<i>m</i>	H-3a
1.46-1.43	1	<i>m</i>	H-3b
2.78	1	<i>t</i> ($J= 5.1$)	H-4
1.99	1	<i>dd</i> ($J = 5.4, 12.5$)	H-5
4.51	1	<i>t</i> ($J = 11.8$)	H-6
2.85	1	<i>tt</i> ($J = 2.7, 11.2$)	H-7
5.28	1	<i>td</i> ($J = 3.5, 11.7$)	H-8
2.48	1	<i>dd</i> ($J = 4.2, 13.0$)	H-9a
1.29	1	<i>m</i>	H-9b
6.16	1	<i>d</i> ($J = 2.7$)	H-13a
5.58	1	<i>d</i> ($J = 2.7$)	H-13b
0.90	3	<i>s</i>	H-14
9.92	1	<i>s</i>	H-15
4.73	1	<i>dd</i> ($J = 3.9, 6.7$)	H-3'
4.31	1	<i>dd</i> ($J = 3.9, 11.7$)	H-4'a
4.17	1	<i>dd</i> ($J = 6.7, 11.4$)	H-4'b
6.37	1	<i>se</i>	H-5'a
6.05	1	<i>se</i>	H-5'b
2.07	3	<i>s</i>	CH ₃ COO

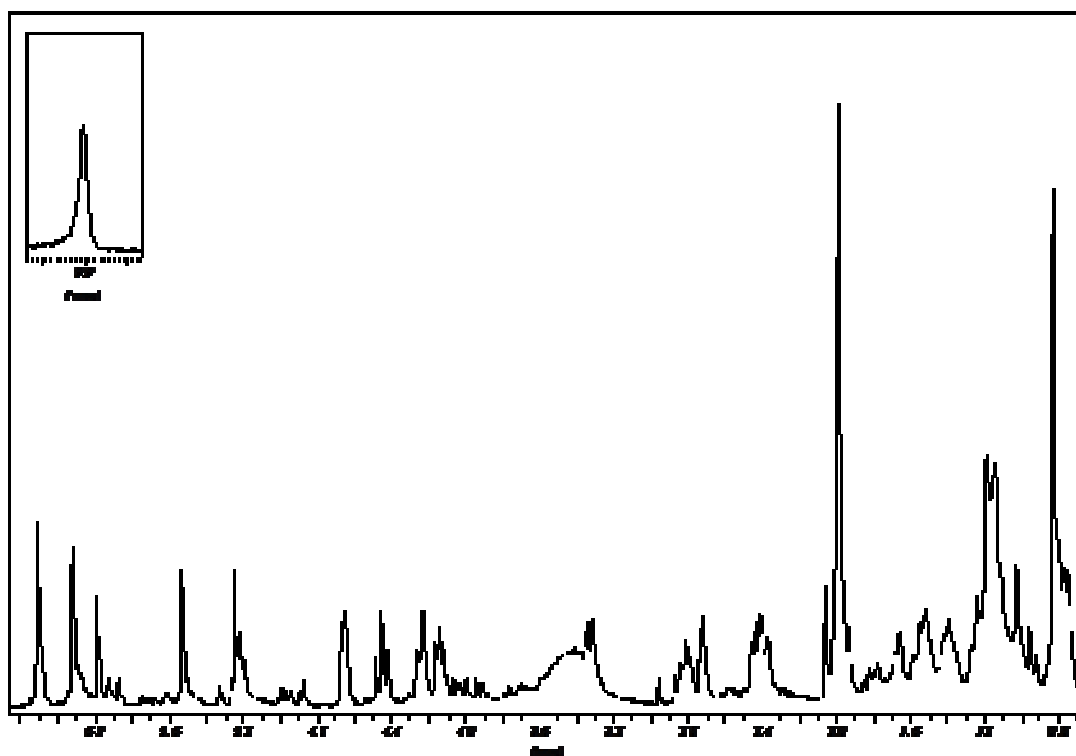


Figure 76: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **19**.
Tableau 45: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **19**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
77.8	CH	C-1
27.3	CH_2	C-2
22.4	CH_2	C-3
44.9	CH	C-4
48.6	CH	C-5
76.3	CH	C-6
53.7	CH	C-7
69.7	CH	C-8
43.8	CH_2	C-9
41.4	C	C-10
136.4	C	C-11
171.2	C	C-12
120.0	CH_2	C-13
13.9	CH_3	C-14
201.8	CH	C-15
164.6	C	C-1'
138.3	C	C-2'
69.7	CH	C-3'
67.1	CH_2	C-4'
128.1	CH_2	C-5'

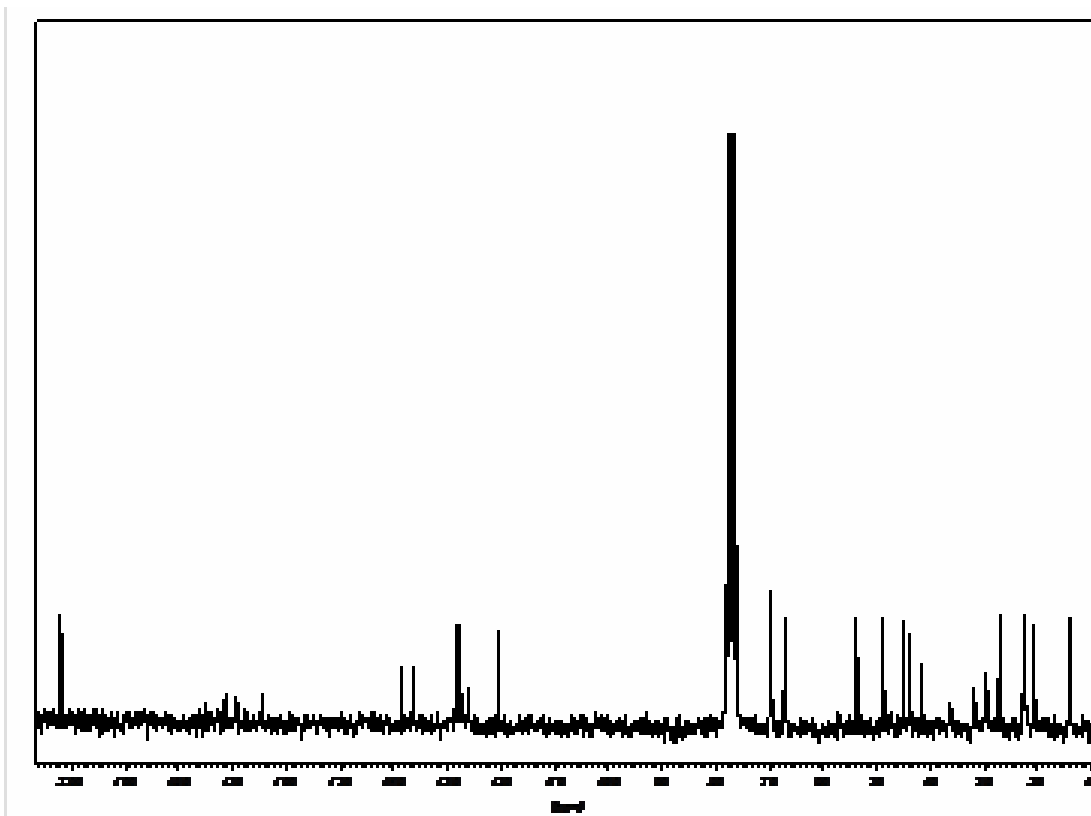


Figure 77: Spectre ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **19**.

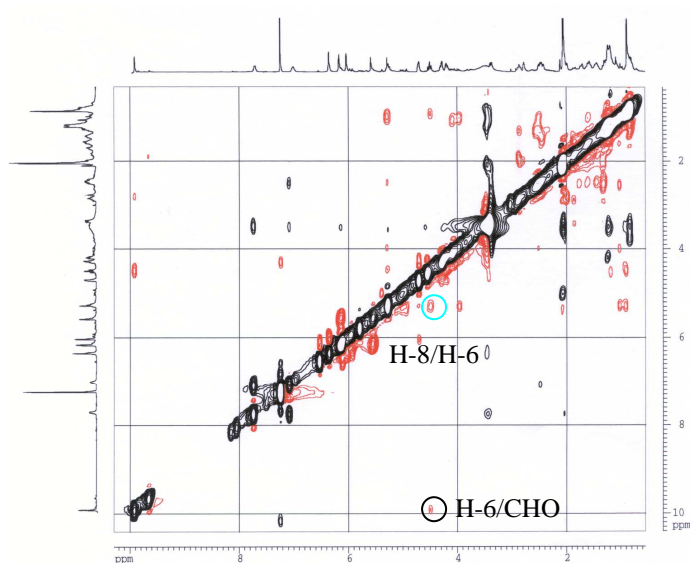


Figure 78: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **19**.

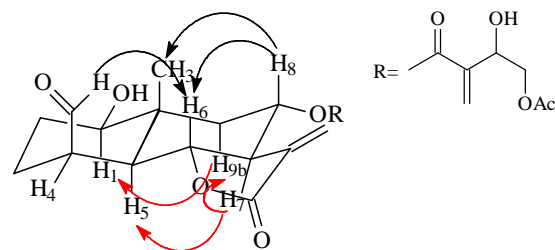
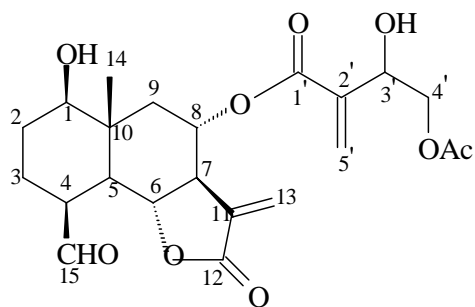


Figure 79: Signaux NOE du composé **19**

Par l'analyse des spectres et par comparaison des résultats de ^1H -RMN et de ^{13}C -RMN avec ceux de la littérature (Skaltsa *et al.*, 2000b) la structure suivante a été attribuée à ce composé:

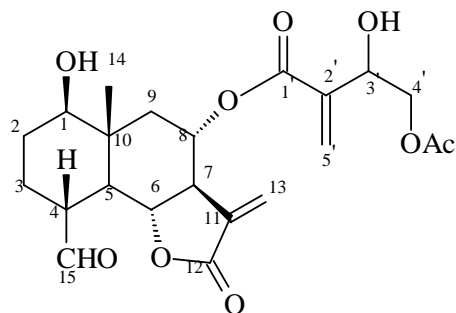


Composé 19

Il s'agit du 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-4-épi-sonchucarpolide, isolé pour la première fois par *Centaurea attica* ssp. *attica* (Skaltsa *et al.*, 2000b), puis de *C. deusta* (Karioti *et al.*, 2002).

Composé 20 : 8 α -O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyl)-sonchucarpolide

Le composé **20** se présentait sous forme huileuse incolore soluble dans le chloroforme.



$[\alpha]_D^{20} +10.35^\circ$ (MeOH; c 0.08).

IR (CaF₂): ν_{\max} = 3389 (OH), 1764, (C=O, γ -lactone), 1760 cm⁻¹ (C=O, ester), 1720 cm⁻¹ (C=O, aldéhyde) et 1701 cm⁻¹ (C=O, acétyle).

EI-MS (70eV): m/z 436 (C₂₂H₂₈O₉)

Le spectre ¹H-RMN (**Figure 80** & **Tableau 46**) révèle plusieurs similarités avec celui du composé **19**. Nous avons observé les différences suivantes :

➤ Le proton H-15 du groupe aldéhyde est un peu blindé à δ 9.65 et apparaît comme un doublet ($J= 3.9$) à cause de sa conjugaison avec le proton H-4.

➤ Le proton H-4 apparaît à δ 2.53 comme un doublet dédoublé ($J= 4.3, 12.5$) à cause de sa conjugaison avec les protons H-5 et H-15. Par rapport au composé **19**, il est blindé (0.25 ppm).

Comme nous pouvons observer par la valeur de la constante de couplage les protons H-4 et H-5 se trouvent en position *trans-diaxiale* entre eux. Par conséquent, le groupe -CHO de la position C-4 a changé d'orientation comparé à celui de la substance **19** et il est placé équatorialement.

A cause de ces changements le proton H-5 apparaît comme un triplet ($J= 11.2$) au lieu d'apparaître comme un doublet de doublet et de plus il y a un déplacement diamagnétique à δ 1.87 (1.99 ppm à la substance **19**).

Tableau 46: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **20**.

δ (ppm)	n°H	Multiplicité, $J(\text{Hz})$	Position
3.44	1	<i>dd</i> ($J= 3.5, 10.1$)	H-1
1.84-1.50	1	<i>m</i>	H-2a, H-2b, H-3b
1.83	1	<i>m</i>	H-3a
2.53	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 12.5$)	H-4
1.87	1	<i>t</i> ($J= 11.2$)	H-5
3.97	1	<i>t</i> ($J= 11.0$)	H-6
2.88	1	<i>td</i> ($J= 2.7, 11.0$)	H-7
5.28	1	<i>dt</i> ($J= 4.6, 10.8$)	H-8
2.51	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 11.3$)	H-9a
1.31	1	<i>m</i>	H-9b
6.12	1	<i>d</i> ($J= 2.8$)	H-13a
5.54	1	<i>d</i> ($J= 3.1$)	H-13b
1.02	3	<i>s</i>	H-14
9.65	1	<i>d</i> ($J= 3.9$)	H-15
4.71	1	<i>m</i>	H-3'
4.30	1	<i>dd</i> ($J= 3.9, 11.7$)	H-4'a
4.19	1	<i>dd</i> ($J= 6.6, 11.3$)	H-4'b
6.36	1	<i>s</i>	H-5'a
6.04	1	<i>s</i>	H-5'b
2.06	3	<i>s</i>	CH_3COO

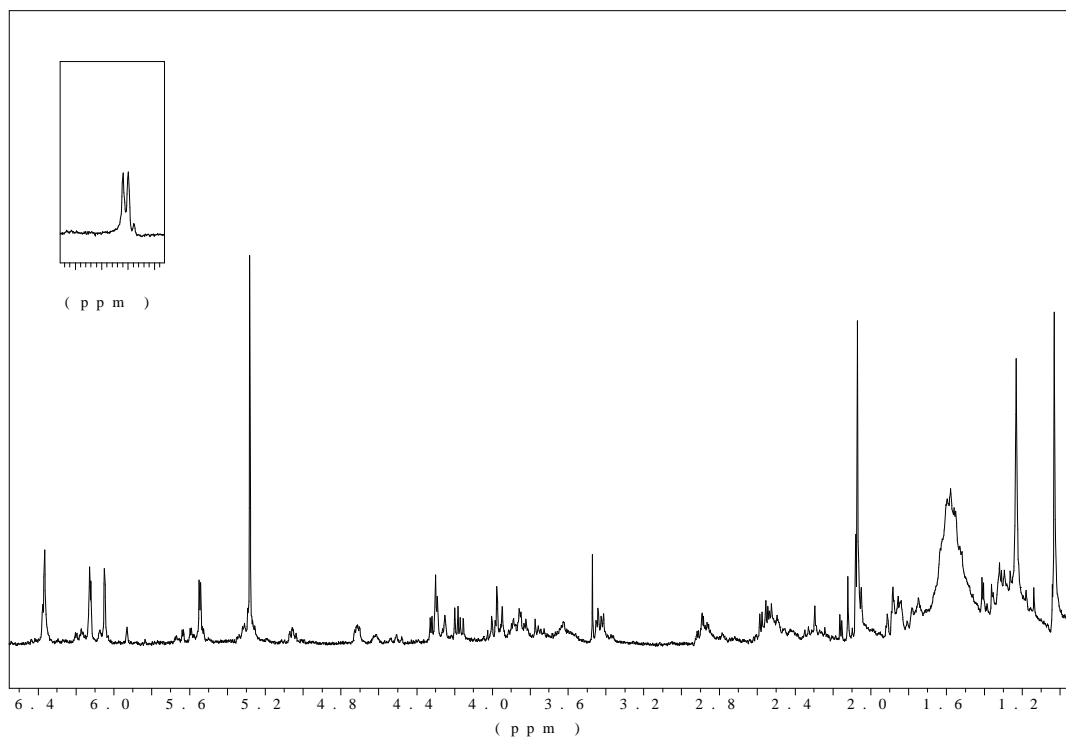


Figure 80: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **20**.

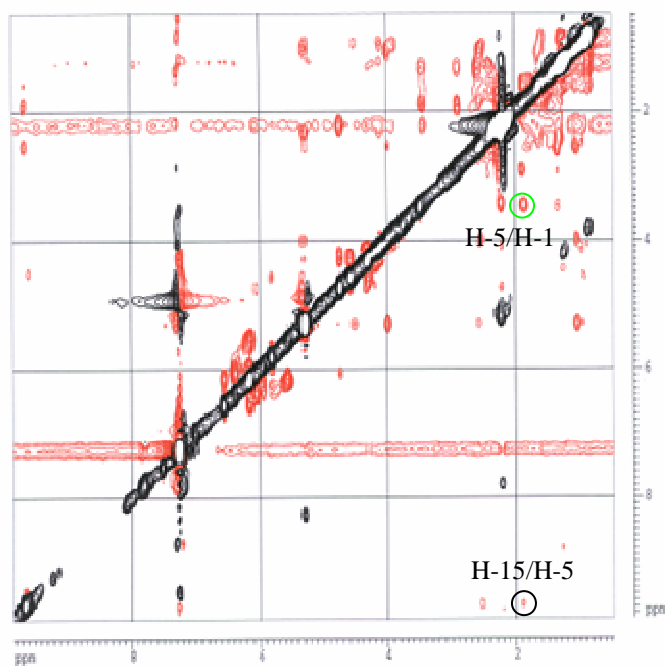


Figure 81: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **20**.

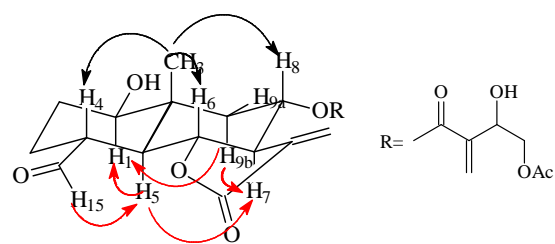
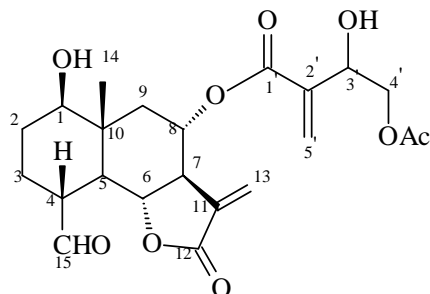


Figure 82: Signaux NOE du composé **20**.

L'analyse des spectres et la comparaison des résultats de ^1H -RMN avec ceux de la littérature (Karioti et *al.*, 2002) nous ont permis d'attribuer la structure suivante à ce composé:



Composé 20

Il s'agit du *8α*-O-(4-acétoxy-3-hydroxy-2-méthylène-butanoyle)-sonchucarpolide, un eudesmanolide isolé pour la première fois chez *C. deusta* (Karioti et *al.*, 2002).

c) Flavonoïdes isolés des deux espèces

Les composés se présentaient comme des tâches obscures sous l'UV à 365 nm, qui devenaient jaune-verdâtre avec le réactif de Neu (1957).

Afin de déterminer la structure de ces composés, une analyse par spectrophotométrie UV-Vis à l'aide des différents réactifs de déplacement a été menée d'après Mabry et *al.* (1970).

Composé 21: 5, 7, 4'-trihydroxy-6-diméthoxyflavone (6-méthoxy-apigénine; hispiduline)

Le composé **21** a été isolé de *C. pullata*. Il se présentait sous forme de poudre de couleur blanchâtre, soluble dans le dichlorométhane.

Selon les valeurs des *R_f* enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.1 cm) et le solvant de Partridge (0.92cm) nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 47**.

Tableau 47: Valeurs UV-Vis du composé **21**

	Bande II			Bande I			
		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$		Ib λ_{\max} (nm)	Ia λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$ (Ia)
MeOH		274				333	
MeONa		276.5		302,	309 ép., 331 ép.	389.5↑	+56.5
AlCl ₃	262 ép.	272		302		362	+29
AlCl ₃ /HCl	261 ép.	273		300		351	+18
NaOAc		272	-2		306 ép. 331 ép.	369	
NaOAc/H ₃ BO ₃		272				333	

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **21** possède deux bandes d'absorption λ_{\max} 333 (bande I) et 274 nm (bande II), caractéristiques d'un flavonoïde de type apigénine (Mabry et al., 1970).

➤ Avec le MeONa le déplacement bathochromique (+56.5 nm) accompagné d'une hyperchromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I indique la présence d'un hydroxyle libre à la position C-4' (Mabry et al., 1970).

➤ Au niveau de la bande I, les valeurs de déplacements bathochromiques avec AlCl₃ (+29 nm) et après l'addition du HCl (+18 nm), nous ont informé sur l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et al., 1970).

➤ La présence d'un groupe oxygéné à la position C-6 est détecté grâce au déplacement bathochromique de (+18 nm) avec le AlCl₃ / HCl au niveau de la bande I (Mears et Mabry, 1972; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ Malgré que le déplacement hypsochromique de la bande II avec NaOAc, il ressort que l'hydroxyle à la position C-7 est libre; cela est expliqué par la substitution à la position C-6 par un groupe oxygéné (Farkas et al., 1966).

➤ Lors de l'ajout successif de H₃BO₃ aucun déplacement n'a été enregistré au niveau de la bande I, expliquant l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'étude du spectre ¹H-RMN (**Figure 83** & **Tableau 48**) du composé **21** a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence de protons à δ 7.85 (*d*, *J*= 8.6, H-2', H-6') et à δ 6.92 (*d*, *J* = 8.6, H-3', H-5') dont les constantes de couplage indiquent la présence d'un système AA' BB' sur le noyau B. Par ailleurs, deux singulets intégrant chacun pour un proton à δ 6.61 (H-8) et δ 6.57 (H-3) on été notés.

Dans la région du haut champ, un singulet à δ 3.97 intégrant pour 3 protons, indiquant la présence d'un groupe méthoxyle a été enregistrée.

La combinaison des résultats des spectres ^1H -RMN avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ce méthoxyle est positionné au C-6.

Tableau 48: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz; CDCl_3) du composé **21**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.85	2	d ($J=8.6$)	H-2', H-6'
6.92	2	d ($J=8.6$)	H-3', H-5'
6.61	1	s	H-8
6.57	1	s	H-3
3.97	3	s	OCH_3

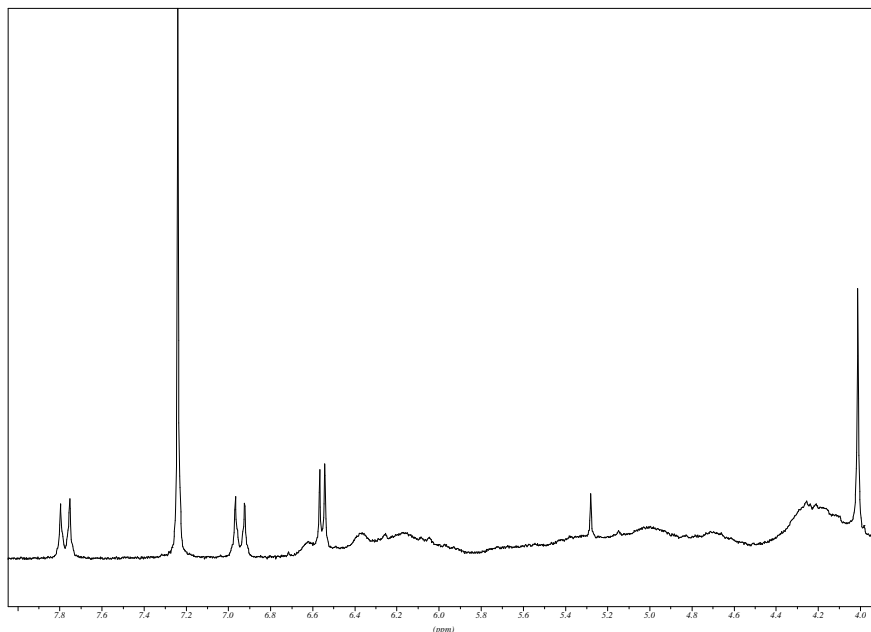
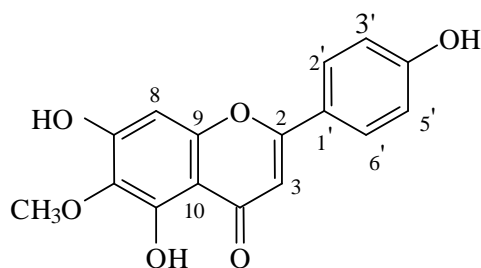


Figure 83: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **21**

Par comparaison des résultats de ^1H -RMN et de l'UV-Vis avec ceux de la littérature (Seghiri *et al.*, 2006), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Composé 21

Il s'agit du 5,7,4'-trihydroxy, 6-méthoxyflavone (hispiduline). Ce composé est un flavonoïde de surface (Wollenweber *et al.*, 2003); il a été isolé pour la première fois chez *Ambrosia hispidula* (Asteraceae) (Herz et Sumi, 1964), par la suite il a été isolé chez plusieurs espèces appartenant à cette famille: *Ambrosia ambrosioides* (Herz *et al.*, 1969), *Iva hayesiana* (Herz et Sudarsanam, 1970), *I. frutescens* (Herz *et al.*, 1972), *Eupatorium cuneifolium* et *E. rotundifolium* (Kupchan *et al.*, 1969), *Brickellia californica* (Mues *et al.*, 1979), *Flourensia cernua* (Rao *et al.*, 1970).

Dans le genre *Centaurea*, il est présent chez les espèces suivantes: *C. furfuracea* (Akkal et al., 2003), *C. nervosa* et *C. phrygia* (Christensen et Lam, 1991), *C. bracteata* (Flamini et al., 2001), dans les partie aériennes de *C. arguta* (Gadeschi et al., 1989), *C. hierapolitana* (Karamenderes et al., 2007), *C. floccosa* (Negrete et al., 1987) *C. chilensis* (Negrete et al., 1988), *C. melitensis* (Negrete et al., 1989), *C. inermis*, *C. virgata* (Öksüz et al., 1984), *C. africana* (Seghiri et al., 2006) et chez *C. phyllocephala* (Twaij et al., 1983). Selon Harborne et Baxter (1993), ce flavonoïde possède une activité anti-hépatotoxique.

Composé 22: 5-hydroxy-6, 7, 4'-triméthoxyflavone (salvigénine)

Le composé **22** a été isolé de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. Il se présentait sous forme de poudre de couleur jaune pâle, soluble dans le dichlorométhane.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.10 cm) et le solvant de Partridge (0.91 cm), nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 49**.

Tableau 49: Valeurs UV-Vis du composé **22**

	Bande II			Bande I			
		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$		Ib λ_{\max} (nm)	Ia λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$ (Ia)
MeOH		276		299 ép.		329	
MeONa		277		297 ép.		328.5↓	-0.5
AlCl ₃	263 ép.	290 ép.		302		348	+19
AlCl ₃ /HCl	261 ép.	290 ép.		302		348.5	+19.5
NaOAc		272	-2			327.5	
NaOAc/H ₃ BO ₃		272				327.5	

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **22** possède deux bandes d'absorption λ_{\max} 329 (bande I) et 276 nm (bande II), caractéristiques d'un flavonoïde du type apigénine (Mabry et al., 1970).

➤ Lors de l'ajout du MeONa, il apparaît un très faible déplacement hypsochromique de (-0.5 nm) accompagné d'une hypochromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I; ceci a expliqué la substitution de l'hydroxyle à la position C-4' (Mabry et al., 1970).

➤ Les valeurs bathochromiques de (+19 et +19.5 nm) avec AlCl₃ et AlCl₃/HCl, respectivement au niveau de la bande I, ont expliqué l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et al., 1970).

➤ De plus, le déplacement bathochromique de +19.5 nm avec AlCl₃/HCl au niveau de la même bande a révélé la présence d'un substituant oxygéné à la position C-6 (Mears et Mabry, 1972 ; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ Le déplacement hypsochromique de -1 nm au niveau de la bande II avec NaOAc nous informe sur la substitution à la position C-7 (Mabry et al., 1970).

➤ Lors de l'ajout successif de H₃BO₃, un très faible déplacement hypsochromique a été induit au niveau de la bande I (-1.5 nm), qui explique l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 84 & Tableau 50**) a confirmé la présence dans la région aromatique d'un système AA' BB' sur le noyau B confirmé par deux doublets à δ 7.83 ($J= 9.0$, H-2', H-6') et à δ 7.00 ($J= 9.0$, H-3', H-5'). Par ailleurs, deux singlets intégrants chacun pour un proton à δ 6.58 (H-8) et δ 6.53 (H-3) ont été notés.

Dans la région du haut champ, trois singulets, typiques de groupes de méthoxyles, résonnant à δ 3.95, 3.90 et 3.87 intégrant chacun pour 3 protons ont été révélés.

La combinaison des résultats des spectres ^1H -RMN avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ces méthoxyles ont été positionnés aux C-6, C-7 et C-4', respectivement.

Tableau 50: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **22**

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.83	2	d ($J = 9.0$)	H-2', H-6'
7.00	2	d ($J = 9.0$)	H-3', H-5'
6.58	1	s	H-8
6.53	1	s	H-3
3.95	3	s	OCH_3
3.90	3	s	OCH_3
3.87	3	s	OCH_3

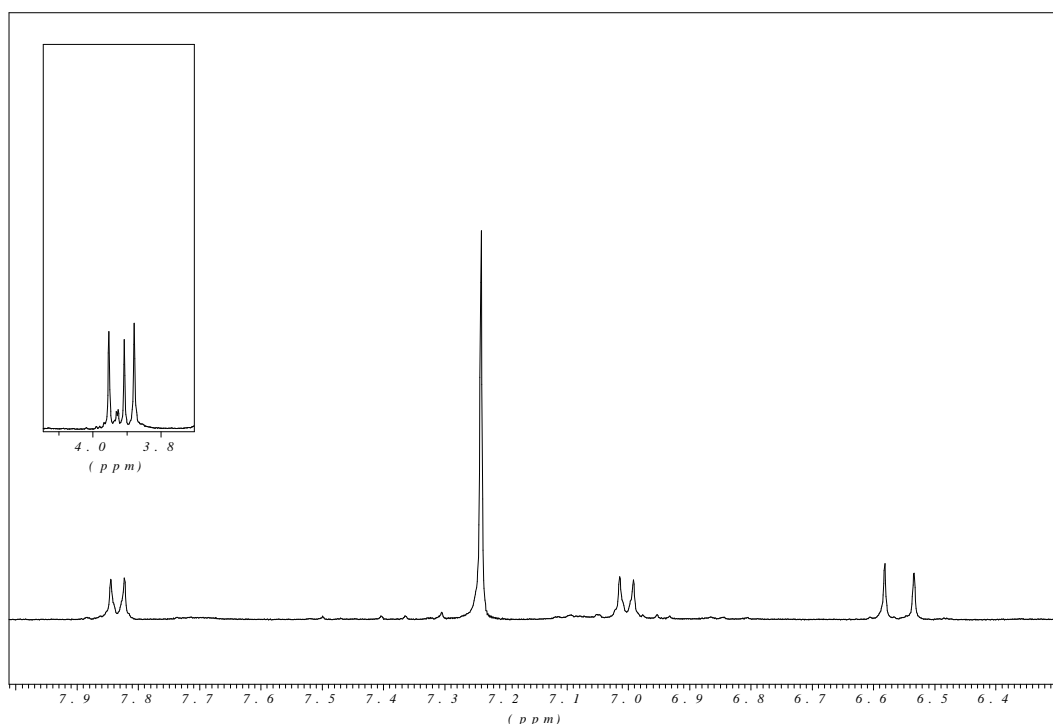
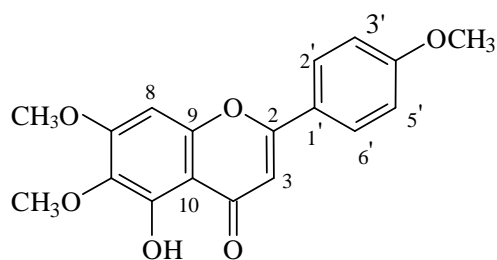


Figure 84: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **22**

Sur la base de ces résultats et par comparaison avec les données de ^1H -RMN et de UV-Vis de la littérature (Finnegan et *al.*, 1972; Tillequin et *al.*, 1977), la structure suivante a été établie:



Composé 22

Il s'agit du 5-hydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone (salvigénine) un flavonoïde de surface (Grayer et *al.*, 1996; Wollenweber et *al.*, 2003), ce flavonoïde a été identifié chez la famille des Asteraceae dans les espèces suivantes: *Eupatorium salvia* (González et *al.*, 1990), *Ageratina gilbertii* (Herz et Gibaja, 1972), *Brickellia dentata* (Ulebelen et *al.*, 1980), *Achillea schischkinii* (Ulebelen et *al.*, 1987) et de *Achillea sibirica* ssp. *mongolica* (Valant-Vetsera et *al.*, 1999). Dans le genre *Centaurea*, il a été isolé de *C. cineraria* ssp. *umbrosa* (Bruno et Herz, 1988) et de *C. cuneifolia* (Aslan et Öksüz, 1999 ; Öksüz et *al.*, 1988).

Composé 23: 5, 7, 4'-trihydroxy, 6, 3'-diméthoxyflavone (6- méthoxy, 3'-méthyl-lutéoline; jacéosidine)

Le composé **23** a été isolé des deux espèces étudiées. Il se présentait sous forme de poudre jaunâtre, soluble dans le méthanol et le dichlorométhane.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.09 cm) et le solvant de Partridge (0.88 cm), nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 51**.

Tableau 51: Valeurs UV-Vis du composé **23**

	Bande II		Bande I		
		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH		274		346	
MeONa		274		334 ép., 406↑	+60
AlCl ₃		283, 294 ép.		370	+24
AlCl ₃ / HCl	258 ép.	284		362	+16
NaOAc		275	+1	319 ép., 383	
NaOAc/H ₃ BO ₃		278		348	+2

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **23** possède deux bandes d'absorption: λ_{\max} 274 (bande I) et 346 nm (bande II), caractéristiques d'un flavonoïde de type lutéoline (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Le déplacement bathochromique (+60 nm) suite à l'ajout de la base forte MeONa accompagné d'une hyperchromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I, a expliqué la présence d'un hydroxyle libre à la position C-4' (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Au niveau de la bande I, les valeurs de déplacements bathochromiques avec AlCl₃ et après l'addition du HCl, nous ont informé sur l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et *al.*, 1970).

➤ La présence d'un groupe oxygéné à la position C-6 a été détectée avec le déplacement bathochromique de +16 nm avec le AlCl₃ / HCl au niveau de la bande I (Mears et Mabry, 1972; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ Malgré que le déplacement de la bande II a été augmenté seulement de (+1 nm) avec NaOAc (base faible), il ressort que l'hydroxyle à la position C-7 est libre; cela a été expliqué par la présence à la position C-6 d'un groupe oxygéné, qui diminue l'acidité de hydroxyle à la position C-7 (Farkas et *al.*, 1966).

➤ Lors de l'ajout successif de H₃BO₃, un très faible déplacement bathochromique a été induit au niveau de la bande I (+2 nm), expliquant l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'étude du spectre ^1H -RMN (**Figure 85 & Tableau 52**) du composé **23** a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence des protons à δ 7.46 (*dd*, $J=1.6, 8.6$, H-6'), à 7.31 (*d*, $J=1.9$, H-2') et à δ 7.02 (*d*, $J=8.4$, H-5') dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta et *ortho*, respectivement (système ABX). Par ailleurs, deux singulets intégrant chacun pour un proton à δ 6.58 (H-8) et δ 6.54 (H-3) ont été notés.

Dans la région du haut champ, deux singulets à δ 4.02 et à δ 3.98 intégrant pour 3 protons chacun ont été enregistrés, ont indiqué la présence de deux groupes de méthoxyles.

La combinaison des résultats des spectres ^1H -RMN avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ces méthoxyles sont positionnés aux C-6 et C-3', respectivement.

Tableau 52: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz; CDCl_3) du composé **23**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.46	1	<i>dd</i> ($J=1.6, 8.6$)	H-6'
7.31	1	<i>d</i> ($J=1.9$)	H-2'
7.02	1	<i>d</i> ($J=8.4$)	H-5'
6.58	1	<i>s</i>	H-8

6.54	1	<i>s</i>	H-3
4.02	3	<i>s</i>	OCH ₃
3.98	3	<i>s</i>	OCH ₃

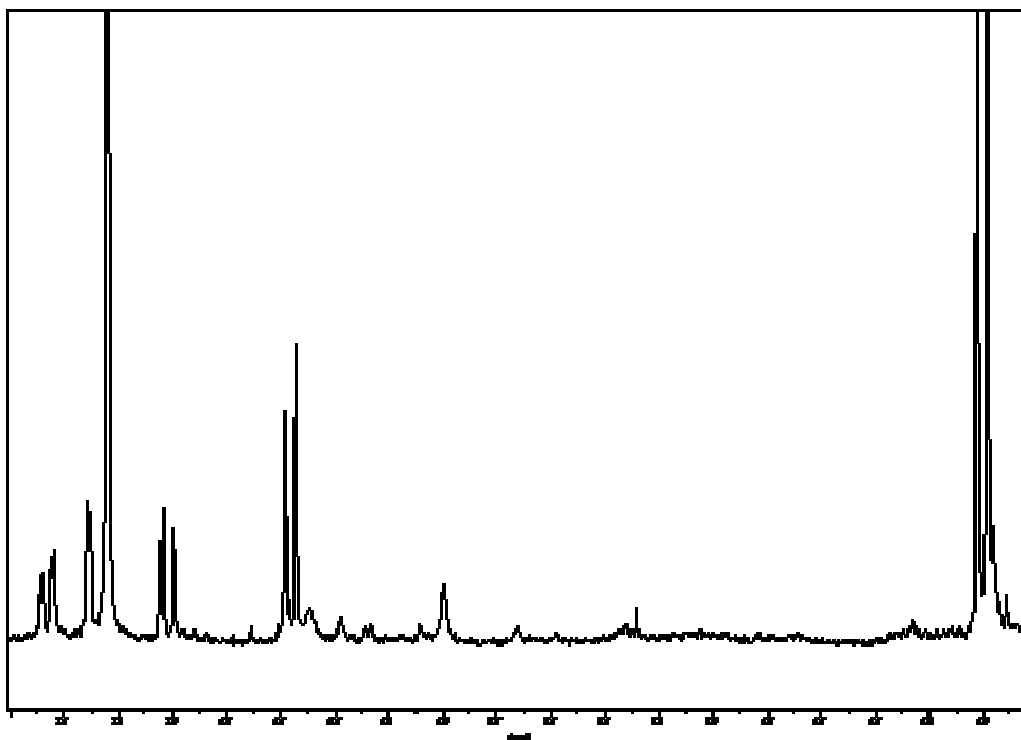
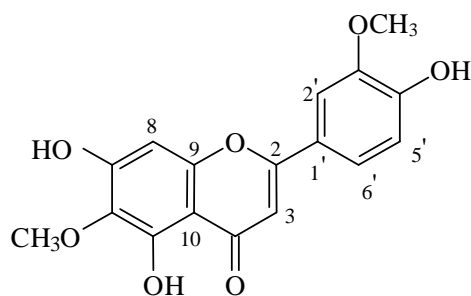


Figure 85: Spectre ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) du composé **23**

Par comparaison des résultats de ¹H-RMN avec ceux de la littérature (Martinez et *al.*, 1987 ; Nacer, et *al.*, 2006) et ceux de l'UV-Vis (Christensen et Lam, 1991; Li et *al.*, 1988; Medjroubi et *al.*, 2005a) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Composé 23

Il s'agit du 5, 7, 4'-trihydroxy-3', 6'-diméthoxyflavone (jacéosidine), un flavonoïde de surface (Onyilagha et Grotewold, 2004).

La littérature mentionne la présence de ce flavonoïde dans le genre *Centaurea* (Asteraceae). Il a été isolé de: *C. pallescens* (Ali et *al.*, 1987), *C. alexandrina* (Amer et *al.*,

1984; Ismail et al., 1986), *C. cuneifolia* (Aslan et Öksüz, 1999), *C. cineraria* ssp. *umbrosa* (Bruno et Herz, 1988), *C. aspera* var. *subinermis* (Cardona et al., 1991), *C. nervosa* et *C. phrygia* (Christensen et Lam, 1991), *C. thessala* ssp. *drakiensis* (Gousiadou et Skaltsa, 2003), des racines de *C. jacea* (Harborne et Baxter, 1999), *C. arguta* (Gadeschi et al., 1989), de *C. hierapolitana* une espèce endémique turque (Karamenderes et al., 2007), *C. tougouriensis* (Nacer et al., 2006), *C. inermis*, *C. kilaea* et *C. virgata* (Öksüz et al., 1984), des fleurs de *C. ruthenica* (Tamaki et al., 2006) et de *C. phyllocephala* (Twaij et al., 1983).

Dans l'espèce étudiée, il a été identifié pour la première fois par Medjroubi et al. (2005a).

Chez la même famille, cette substance a été identifiée chez une plante australienne *Helichrysum viscosum* var. *bracteatum* par Geissman et al. (1967); chez *Helenium radiatum* (Herz et al. 1968) chez *Artemisia arctica* récoltée en Arizona (Herz et al., 1970).

Des propriétés anti-rhumatismales et anti-inflammatoires ont été attribuées à ce flavonoïde. Li et al. (1979) et Zhao et al. (2001) indiquent l'utilisation de jacéosidine dans la médecine chinoise.

Composé 24: 5, 7, 3'-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (desméthoxycentaureidine)

Le composé **24** a été isolé de *C. pullata*. Il se présentait sous forme de poudre de couleur jaunâtre, soluble dans le dichlorométhane.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.04 cm) et le solvant de Partridge (0.82 cm), nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 53**.

Tableau 53: Valeurs UV-Vis du composé **24**

	Bande II			Bande I		
		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH		271			341	
MeONa		274			389↓	+48
AlCl ₃	263 ép.	279			370	+29
AlCl ₃ / HCl		281			364	+23
NaOAc		274	+3	312 ép.	385	
NaOAc/H ₃ BO ₃		276			340	- 1

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **24** possède deux bandes d'absorption à 271 (bande I) et 341 nm (bande II) caractéristiques d'un flavonoïde de type lutéoline (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Lors de l'ajout du MeONa, il apparaît un fort déplacement bathochromique de +48 nm accompagné d'une hypochromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I, ce qui a expliqué la substitution de l'hydroxyle à la position C-4' (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Selon les valeurs de déplacements bathochromiques au niveau de la bande I avec AlCl₃ (+29 nm) et avec HCl (+23 nm), nous avons noté l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et *al.*, 1970).

➤ De plus, le déplacement bathochromique de +23 nm avec AlCl₃ / HCl au niveau de la même bande a révélé la présence d'un groupe oxygéné à la position C-6 (Mears et Mabry, 1972; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ L'hydroxyle à la position C-7 n'est pas substitué, malgré que l'addition de NaOAc (base faible) a provoqué un déplacement bathochromique de 3 nm seulement. Cela a été expliqué par la présence à la position C-6 d'un groupe oxygéné (Farkas et *al.*, 1966).

➤ L'ajout du H₃BO₃ a induit un très faible déplacement hypsochromique au niveau de la bande I (-1 nm), confirmant les résultats obtenus avec AlCl₃ / HCl sur l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'étude du spectre ¹H-RMN (**Figure 86 & Tableau 54**) du composé **24** a permis de mettre en évidence dans la région aromatique les protons suivants: à δ 7.46 (*dd*, $J = 1.5, 8.2$,

H-6'), à δ 7.31 (*d*, $J= 1.5$, H-2') et à δ 7.01 (*d*, $J= 8.2$, H-5') dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta et *ortho*, respectivement. Par ailleurs, deux singulets intégrant chacun pour un proton à δ 6.58 (H-8) et δ 6.54 (H-3) ont été notés.

Dans la région du haut champ, deux singulets à δ 4.02 et à δ 3.98, intégrant pour 3 protons chacun, ont été enregistrés, indiquant la présence de deux groupes méthoxyles.

La combinaison des résultats des spectres $^1\text{H-RMN}$ avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ces méthoxyles sont positionnés aux C-6 et C- 4', respectivement.

Tableau 54: Valeurs des $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) du composé **24**

δ (ppm)	n°H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.46	1	<i>dd</i> ($J=1.5$, 8.2)	H-6'
7.31	1	<i>d</i> ($J=1.5$)	H-2'
7.01	1	<i>d</i> ($J= 8.2$)	H-5'
6.58	1	<i>s</i>	H-8
6.54	1	<i>s</i>	H-3

4.02	3	<i>s</i>	OCH ₃
3.98	3	<i>s</i>	OCH ₃

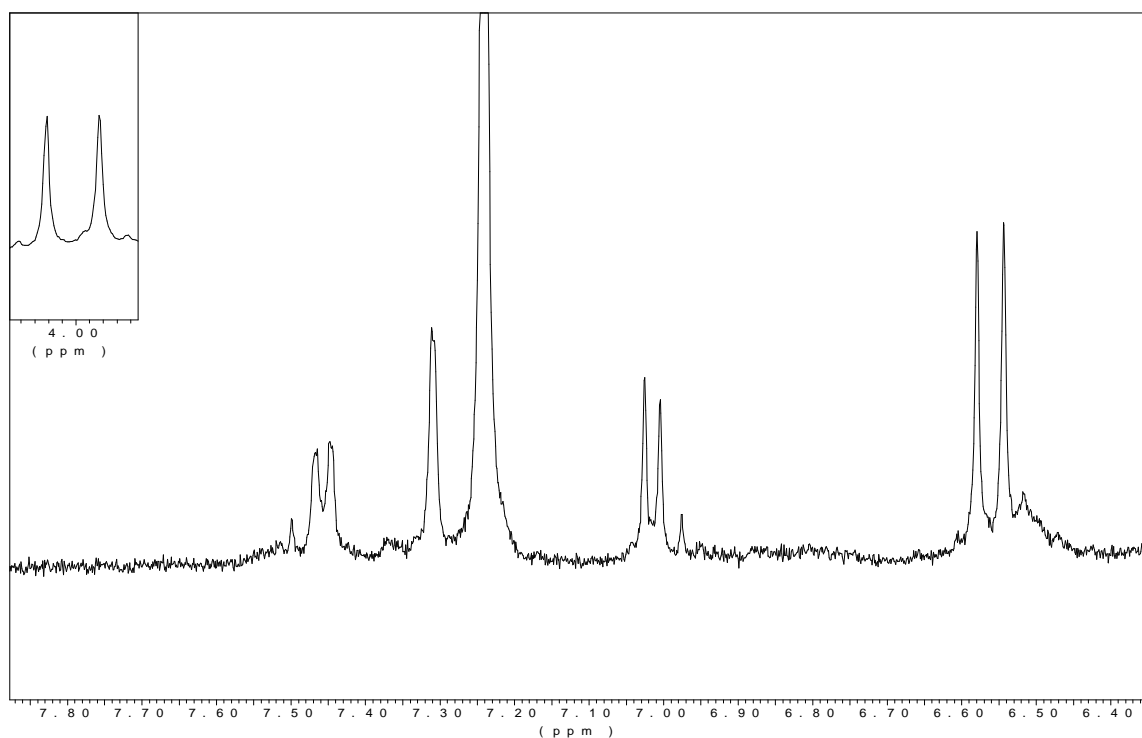
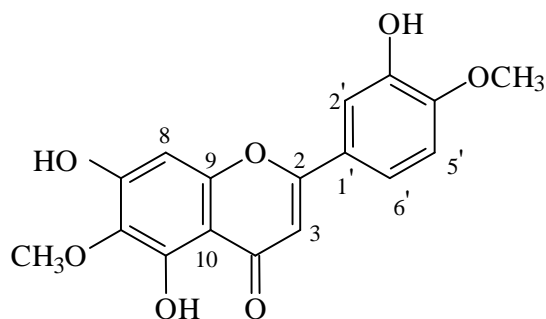


Figure 86: Spectre ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) du composé **24**.

Par comparaison avec les résultats de l'UV-Vis citées dans la littérature (Harborne et Mabry, 1982; Mues et *al.*, 1979; Voirin, 1983), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Composé 24

Il s'agit du 5, 7, 3'-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (desmethoxycentaureidine). Chez le genre *Centaurea* (Asteraceae), ce composé est rencontré dans un nombre très réduit d'espèces (Christensen et Lam, 1991); il a été isolé de *C. nigrescens* et *C. phrygia* (Harborne et Baxter, 1999) et de *C. spinosa* (Saraglou et *al.*, 2005).

Dans la même famille, ce composé a été isolé des feuilles de *Brickellia californica* (Mues et *al.*, 1979) et de *Brickellia laciniata* (Timmermann et *al.*, 1979).

Composé 25 : 5,4'-dihydroxy-6, 7, 3'-triméthoxyflavone (Cirsilinéol)

Le composé **25** a été isolé de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii*. Il se présentait sous forme de poudre de couleur jaune, soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.12 cm) et le réactif de Partridge (0.94 cm), nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 55**.

Tableau 55: Valeurs UV-Vis du composé **25**

	Bande II			Bande I	
	ép.	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	251	269		338	
MeONa		274		348↓	+10
AlCl ₃	262	286	+17	348	+10
AlCl ₃ / HCl	260	279	+10	348	+10
NaOAc		275	-1	348.5	
NaOAc/H ₃ BO ₃		270		340	+2

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **25** possède deux bandes d'absorption entre 269nm (bande I) et 338 nm (bande II) caractéristiques d'un flavonoïde de type lutéoline.

➤ Lors de l'ajout du MeONa, il apparaît un déplacement bathochromique de (+10 nm) accompagné d'une hypsochromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I, qui a expliqué que l'hydroxyle à la position C-4' est libre (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Les déplacements bathochromiques de (+10 nm) avec AlCl₃ et AlCl₃ / HCl au niveau de la bande I, ont expliqué l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et *al.*, 1970).

➤ De plus, le déplacement bathochromique de (+10 nm) avec AlCl₃ / HCl au niveau de la même bande révèle la présence d'un substituant oxygéné à la position C-6 (Mears et Mabry, 1972; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ Selon les valeurs de déplacement bathochromique avec AlCl₃ et AlCl₃/HCl (+17 et +10 nm, respectivement) au niveau de la bande II, il apparaît que l'hydroxyle à la position C-5 est libre (Mabry et *al.*, 1970; Voirin, 1983).

➤ Le déplacement bathochromique de (-1 nm) au niveau de la bande II avec NaOAc nous informe sur la substitution à la position C-7 (Mabry et *al.*, 1970).

➤ L'ajout de H₃BO₃ induit un très faible déplacement bathochromique +2 nm au niveau de la bande I, qui indique l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 87 & Tableau 56**) a confirmé la présence dans la région aromatique de protons à δ 7.42 (*dd*, $J = 2.0, 8.2$, H-6'), 7.46 (*d*, $J = 2.4$, H-2') et à δ 6.94 (*d*, $J = 8.2$, H-5') dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta et *ortho*, respectivement. Par ailleurs, deux singulets intégrant chacun pour un proton à δ 6.56 (H-8) et 6.53 (H-3) ont été notés.

Dans la région du haut champ, trois singulets à δ 3.97, 3.95 et 3.91 intégrant chacun pour 3 protons, typiques de groupes de méthoxyles, ont été enregistrés.

La combinaison des résultats des spectres $^1\text{H-RMN}$ avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ces méthoxyles sont positionnés aux C-6, C-7 et C-3'.

Tableau 56: Valeurs des $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) du composé **25**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.46	1	d ($J= 2.4$)	H-2'
7.42	1	dd ($J= 2.0, 8.2$)	H-6'
6.94	1	d ($J= 8.2$)	H-5'
6.56	1	s	H-8
6.53	1	s	H-3
3.97	3	s	OCH_3
3.95	3	s	OCH_3
3.91	3	s	OCH_3

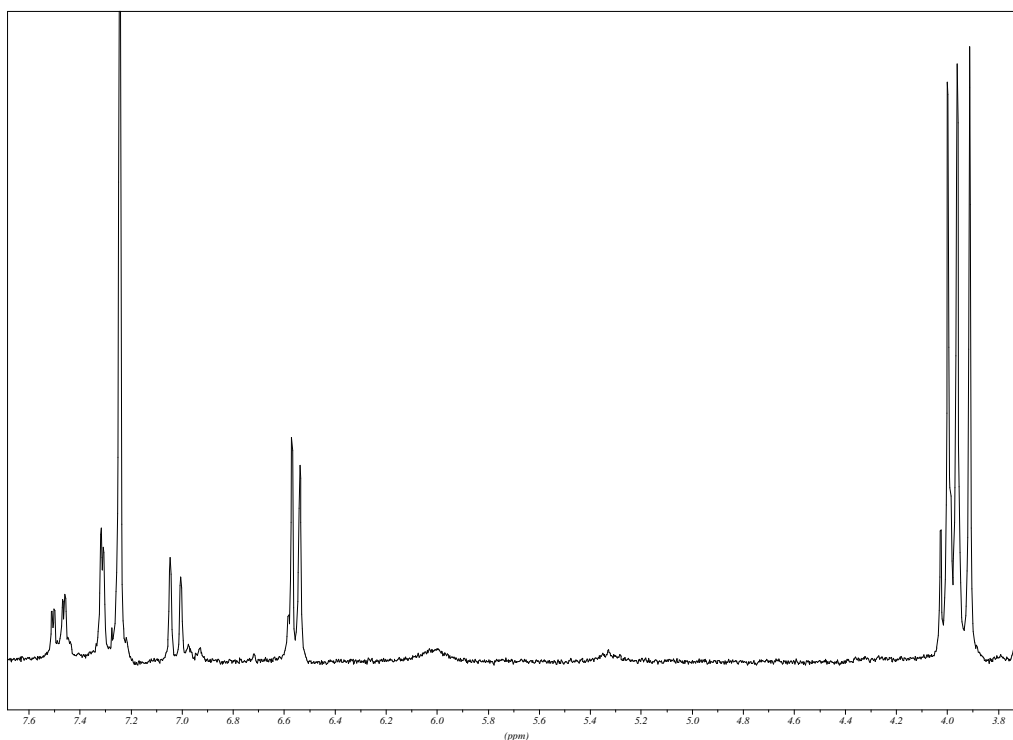
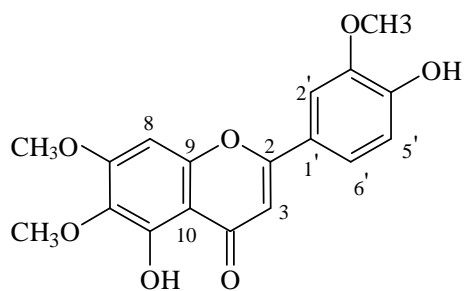


Figure 87: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **25**.

Par comparaison des résultats de ^1H -RMN et ceux de l'UV-Vis avec ceux de la littérature (Medjroubi et *al.*, 2005a), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Composé 25

Ce composé est 5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone (cirsilinéol). Il s'agit d'un flavonoïde de surface (Wollenweber et *al.*, 2003), isolé de *Centaurea pullata* (Medjroubi et *al.*, 2005a).

Composé 26: 5, 3'-dihydroxy-6, 7, 4'-triméthoxyflavone (eupatorine)

Le composé **26** a été isolé des deux espèces étudiées. Il se présentait sous forme de poudre de couleur jaune, soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.07 cm) et le solvant de Partridge (0.86 cm), nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 57**.

Tableau 57: Valeurs UV-Vis du composé **26**

	Bande II		Bande I	
	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	275		341	
MeONa	276		395↓	+54

AlCl ₃		282	+7	361	+25
AlCl ₃ / HCl	254 ép.	285	+10	357	+21
NaOAc		276	+1	319 ép., 376	
NaOAc / H ₃ BO ₃		277		340	+4

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **26** possède deux bandes d'absorption entre 275nm (bande I) et 341 nm (bande II) caractéristiques d'un flavonoïde de type lutéoline (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Lors de l'ajout du MeONa, il apparaît un fort déplacement bathochromique de +54 nm accompagné d'une hypochromie de l'intensité du spectre au niveau de la bande I, qui a expliqué la substitution de l'hydroxyle à la position C-4' (Mabry et *al.*, 1970).

➤ Les valeurs bathochromiques de (+25 et +21 nm) avec AlCl₃ et AlCl₃/HCl, respectivement, au niveau de la bande I ont expliqué l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B (Mabry et *al.*, 1970).

➤ De plus, le déplacement bathochromique de +21 nm avec AlCl₃ / HCl au niveau de la même bande a révélé la présence d'un substituant oxygéné à la position C-6 (Mears et Mabry, 1972; Sakakibara et Mabry, 1977).

➤ Selon les valeurs de déplacement bathochromique avec AlCl₃ et AlCl₃/HCl +7 et +10 nm respectivement au niveau de la bande II, il apparaît que l'hydroxyle à la position C-5 est libre (Mabry et *al.*, 1970; Voirin, 1983).

➤ Le déplacement bathochromique de (+1 nm) au niveau de la bande II avec NaOAc nous informe sur la substitution à la position C-7 (Mabry et *al.*, 1970).

➤ L'ajout successif de H₃BO₃ induit un faible déplacement bathochromique (+4 nm) au niveau de la bande I, qui explique l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'analyse du spectre ¹H-RMN (**Figure 88 & Tableau 58**) a confirmé la présence dans la région aromatique de protons à δ 7.48 (*de*, $J=8.24$, H-6'), 7.31 (*se* H-2') et à δ 6.94 (*d*, $J = 8.6$, H-5') dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta et *ortho*, respectivement. Par ailleurs, deux singulets intégrant chacun pour un proton à δ 6.55 (H-8) et δ 6.53 ppm (H-3) ont été notés.

Dans la région du haut champ, trois singulets résonnant à δ 4.02, 3.95 et 3.94 intégrant chacun pour 3 protons, typiques de groupes de méthoxyles, ont été enregistrés.

La combinaison des résultats des spectres ^1H -RMN avec ceux des spectres UV-Vis nous indiquent que ces méthoxyles sont positionnés aux C-6, C-7 et C-4'.

Tableau 58: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **26**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.48	1	<i>de</i> ($J = 8.24$)	H-6'
7.29	1	<i>se</i>	H-2'
6.94	1	<i>d</i> ($J = 8.6$)	H-5'
6.55	1	<i>s</i>	H-8
6.53	1	<i>s</i>	H-3
4.02	3	<i>s</i>	OCH_3
3.95	3	<i>s</i>	OCH_3
3.94	3	<i>s</i>	OCH_3

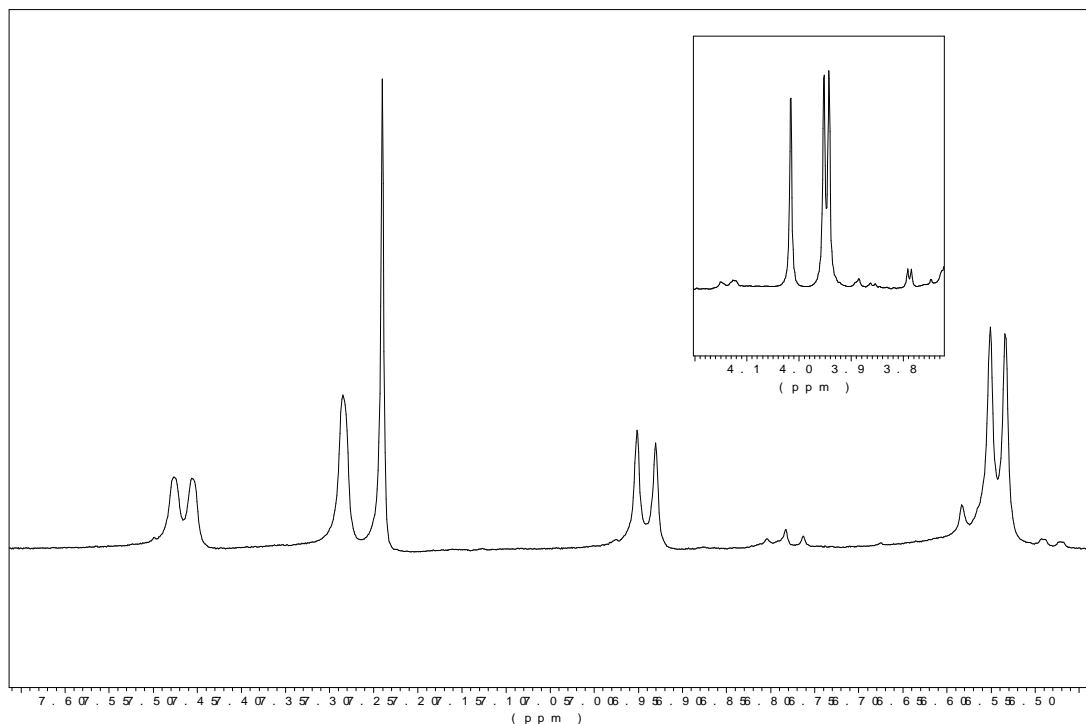
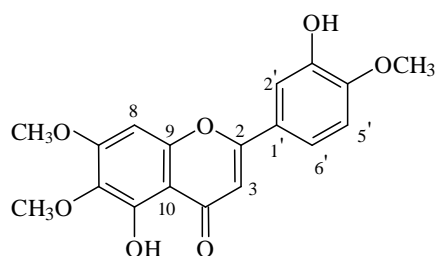


Figure 88: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **26**

Sur la base de ces résultats et par comparaison avec les résultats de ^1H -RMN et de UV-Vis obtenus par (Timmermann et *al.*, 1979), la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Composé 26

Ce composé est 5, 3'-dihydroxy 6, 7, 4'-triméthoxyflavone (eupatorine), un flavonoïde de surface (Grayer et *al.*, 1996), isolé dans la famille des Asteraceae pour la première fois chez *Eupatorium semiserratum* (Kupchan et *al.*, 1969a).

Dans le genre *Centaurea*, il a été identifié chez *C. cineraria* (Bruno et Herz, 1988), *C. inermis*, *C. virgata* (Öksüz et *al.*, 1984), *C. cuneifolia* (Öksüz et *al.*, 1988), *C. thessala* ssp.

drakiensis (Georgiadou, 1999); il a été également isolé sous forme de composé minoritaire chez *C. aggregata* (Zapesochnaya et al., 1977)

Ce composé a été également isolé d'autres genres botaniques : des feuilles de *Brickellia laciniata* du Texas (Timmermann et al., 1979), de *Lourteigia stoechadifolia* du Vénézuéla (Triana, 1995), de *Stevia satureiaefolia* (Sosa et al., 1984) et de *Brickellia dentata* (Ulubelen et al., 1980).

Composé 27: 5-hydroxy, 6, 7, 3', 4'-tetraméthoxyflavone

Le composé **27** a été isolé des deux espèces étudiées. Il a été isolé sous forme de poudre de couleur jaune, soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.

Selon les valeurs des R_f enregistrées sur CCM (Cellulose) avec AcOH-15 (0.08 cm) et le solvant de Partridge (0.84 cm) nous constatons clairement qu'il s'agit d'aglycone de flavonoïde. Les résultats obtenus avec les différents réactifs de déplacement sont présentés dans le **Tableau 59**.

Tableau 59: Valeurs UV-Vis du composé **27**

	Bande II			Bande I		
		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$		λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	241 ép., 251 ép.	279			338	

MeONa	241 ép., 251 ép	276			369↓	+31
AlCl ₃	262, ép.	282	+3		365	+27
AlCl ₃ / HCl		282	+3		360	+22
NaOAc		277	-2	314 ép.	365	
NaOAc/H ₃ BO ₃		278			340	+2

➤ Le spectre UV-Vis pris au MeOH du composé **27** possède deux bandes d'absorption λ_{\max} 279 (bande I) et 338 nm (bande II), caractéristiques d'un flavonoïde de type lutéoline.

➤ Le déplacement bathochromique de (+31 nm) accompagné d'une hypochromie de l'intensité du spectre avec MeONa enregistré au niveau de la bande I indique la substitution de l'hydroxyle à la position 4' (Mabry et al., 1970).

➤ Le déplacement bathochromique de (+27 nm) au niveau de la bande I lors de l'ajout de AlCl₃, qui reste stable après l'addition du HCl (+22 nm), nous a informé sur l'absence au niveau du noyau B d'un système *ortho*-hydroxyles (Mabry et al., 1970).

➤ De plus, ce déplacement bathochromique au niveau de la bande I avec AlCl₃ / HCl nous a indiqué une substitution à la position C-6 par un groupe oxygéné (Mears et Mabry, 1972).

➤ La présence d'un hydroxyle à la position C-5 a été confirmé par les valeurs de déplacement bathochromique avec AlCl₃ / HCl au niveau de la bande II (Mabry et al., 1970; Voirin, 1983).

➤ Le déplacement hypsochromique de (-2 nm) au niveau de la bande II avec NaOAc nous informe que l'hydroxyle à la position 7 est substitué (Mabry et al., 1970).

➤ L'ajout de H₃BO₃ provoque un déplacement bathochromique de (+2 nm) au niveau de la bande I et indique l'absence d'un système *ortho*-hydroxyles au niveau du noyau B.

L'analyse des spectres ¹H-RMN (**Figure 89 & Tableau 60**) a révélé la présence dans la région aromatique de protons à δ 7.50 (*dd*, $J=2.0, 8.6$, H-6'), 7.31 (*d*, $J=2.0$, H-2') et à δ 6.95 (*d*, $J= 8.6$, H-5'), dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta et *ortho*, respectivement, confirmant la présence d'un système ABX sur le noyau B. Par ailleurs, deux singulets intégrants chacun pour un proton à δ 6.60 (H-8) et 6.54 (H-3) ont été enregistrés.

Dans la région du haut champ, quatre singulets à δ 3.97, 3.96, 3.94 et à δ 3.90 intégrants chacun pour 3 protons typiques de groupes de méthoxyles.

La combinaison des résultats des spectres ¹H-RMN avec ceux du spectre NOESY (**Figure 91**) nous indiquent que ces méthoxyles sont positionnés aux C-3', C-7, C- 4', C-6.

Tableau 60: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **27**

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J(Hz)	Position
7.50	1	<i>dd</i> ($J = 2.0, 8.6$)	H-6'
7.31	1	<i>d</i> ($J = 2.0$)	H-2'
6.95	1	<i>d</i> ($J = 8.6$)	H-5'
6.60	1	<i>s</i>	H-8
6.54	1	<i>s</i>	H-3
3.97	3	<i>s</i>	3'-OCH ₃
3.96	3	<i>s</i>	7-OCH ₃
3.94	3	<i>s</i>	4'-OCH ₃
3.90	3	<i>s</i>	6-OCH ₃

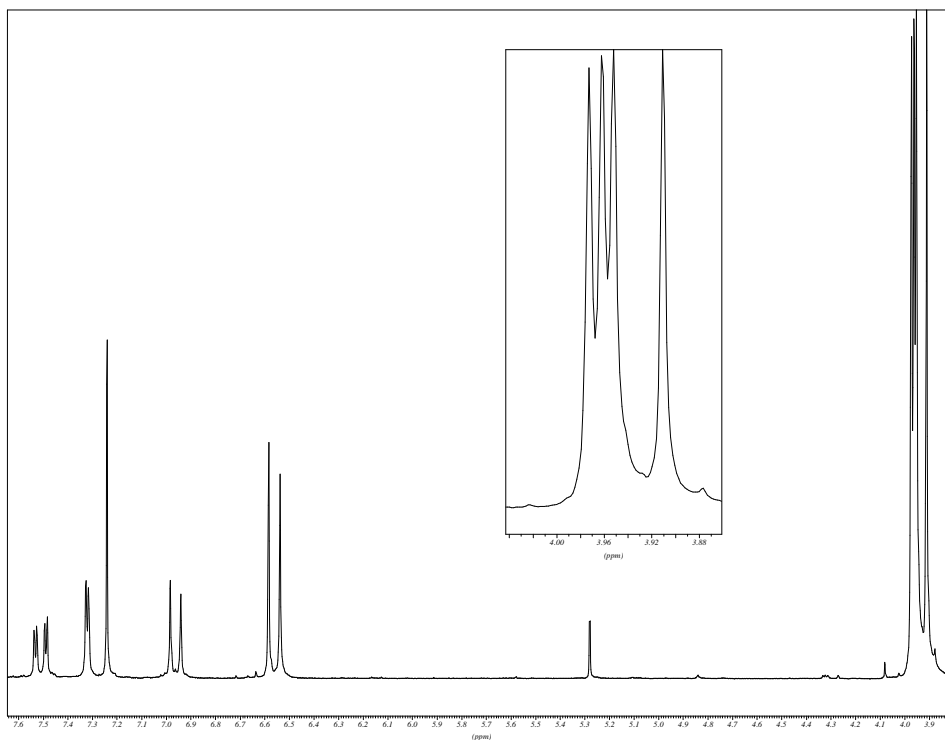


Figure 89: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **27**.

Tableau 61: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **27**

δ (ppm)	Types de carbones	Position
164.0	C	C-2
104.5	CH	C-3
182.6	C	C-4
153.1	C	C-5
132.6	C	C-6
158.7	C	C7
90.6	CH	C-8
152.3	C	C-9
108.7	C	C-10
132.8	C	C-1'

120.1	CH	C-2'
149.3	C	C-3'
153.0	C	C-4'
111.1	CH	C-5'
120.1	CH	C-6'
60.9	CH ₃	OCH ₃
56.3	CH ₃	OCH ₃
56.1	CH ₃	(OCH ₃) x 2

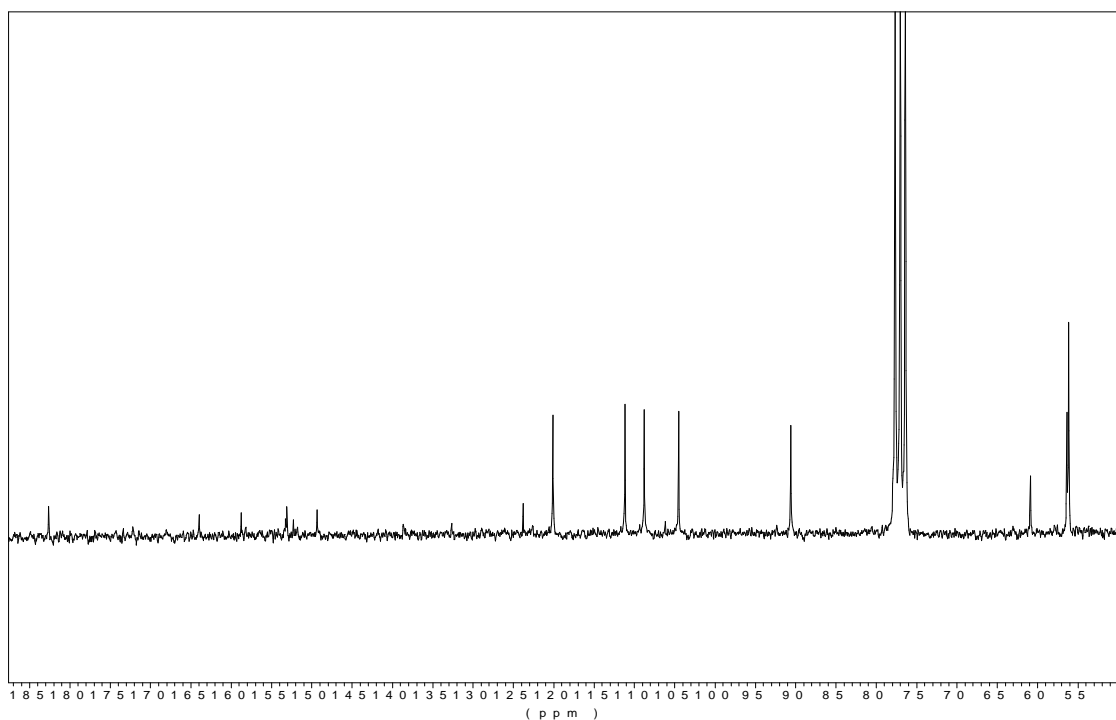


Figure 90: Spectre ¹³C-RMN (50.3 MHz, CDCl₃) du composé **27**.

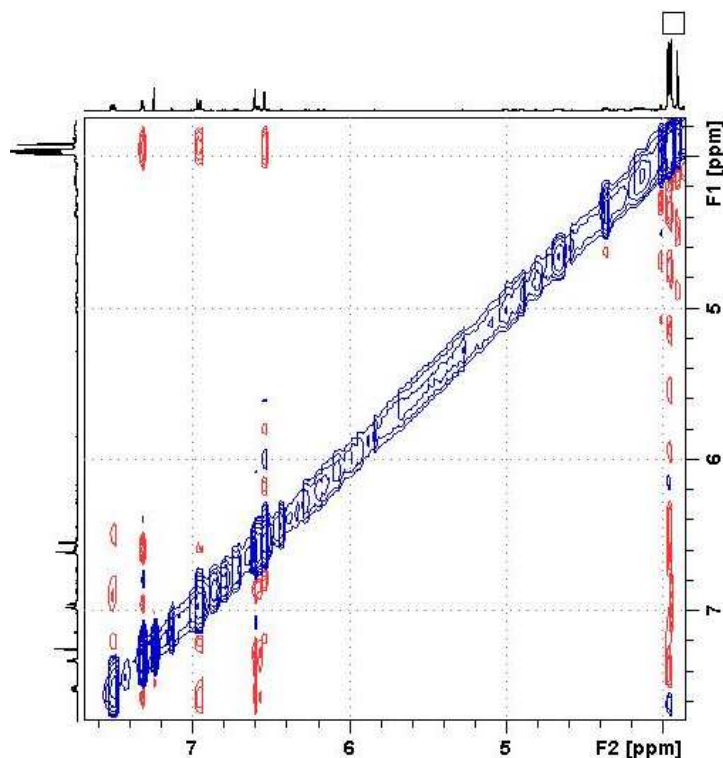
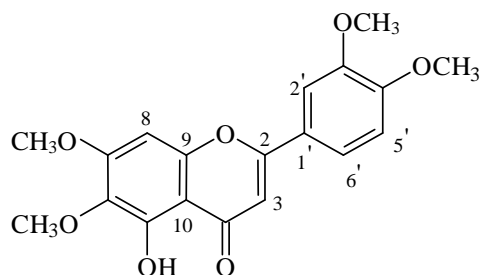


Figure 91: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **27**

Par comparaison avec les données de la littérature (Harborne et Mabry, 1982; Martinez *et al.*, 1987) avec ceux du composé **27**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



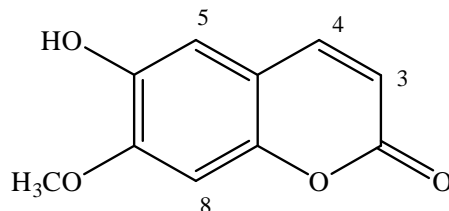
Composé 27

Il s'agit du 5-hydroxy, 6, 7, 3', 4'-tetraméthoxy flavone, un dérivé de lutéoline. Chez la famille des Asteraceae, il a été isolé de *Lourteigia stoechadifolia* (Triana, 1995). Chez le genre *Centaurea* il a été isolé de *C. iberica* (Ahmed et Bibi, 1979), *C. cineraria* ssp. *umbrosa* (Bruno *et al.*, 1988), de *C. granata* (Medjroubi *et al.*, 1998), *C. brugueriana* (Rustaiyan *et al.*, 1982) et de *C. cuneifolia* (Salan et Öksüz, 1999).

d) Autres composés isolés des deux espèces

Composé 28: Isoscopoléatine [6-hydroxy, 7-méthoxy -coumarin]

Le composé **28** a été isolé de *C. pullata*. Il se présentait sous forme de poudre jaune, soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.



$$[\alpha]_D^{20} = -5.33 \text{ (MeOH, } c, 0.15)$$

Ce composé présentait une couleur bleue fluorescente sous l'UV à 365 nm, qui devient bleu-verdâtre avec le réactif de Neu (1957).

Tableau 62: Valeurs UV-Vis du composé **28**

	λ_{\max} (nm)
MeOH	256 ép., 228, 295, 342
NaOH 5%	240, 280, 392

Les résultats obtenus avec les spectres UV-Vis (**Tableau 62**) et $^1\text{H-NMR}$ (**Figure 92** & **Tableau 63**), nous ont indiqué que ce composé appartient au groupe des coumarines.

Dans la région des protons aromatiques apparaissent deux singulets attribués aux protons H-5 et H-8 à δ 7.12 et 6.77, respectivement.

Les protons oléfiniques H-4 et H-3 apparaissent comme doublets à δ 7.85 ($J= 9.1$) et δ 6.20 ($J= 9.6$), respectivement.

Dans la région du haut champ, un singulet à δ 3.91, intégrant pour 3 protons, a indiqué la présence d'un groupe méthoxyle.

Le site d'attachement du méthoxyle avec le groupe d' α -pyrone a été conclu par le signal NOE entre le $-\text{OCH}_3$ et le proton H-8 donc le groupe méthoxyle se trouve à la position H-7 (**Figure 93**).

Tableau 63: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz; CD_4O) du composé **28**.

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
7.85	1	$d (J = 9.1)$	H-4
7.12	1	s	H-5
6.77	1	s	H-8
6.20	1	$d (J = 9.6)$	H-3
3.91	3	s	-OCH ₃

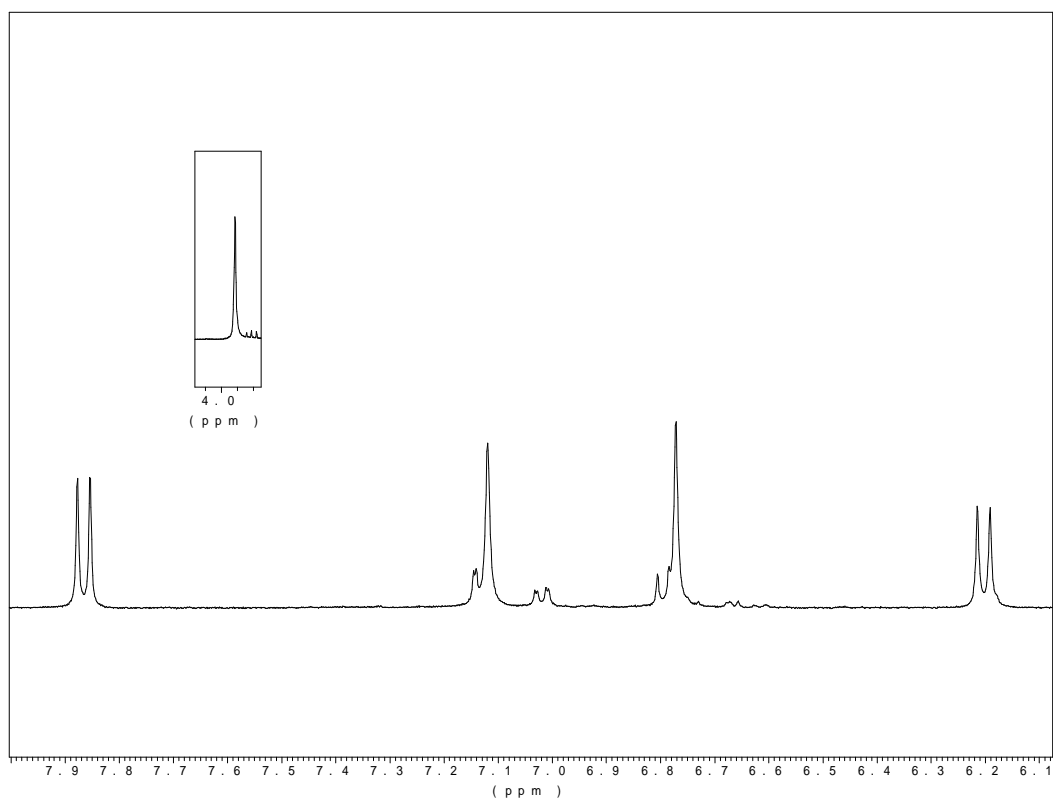


Figure 92: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CD_4O) du composé **28**.

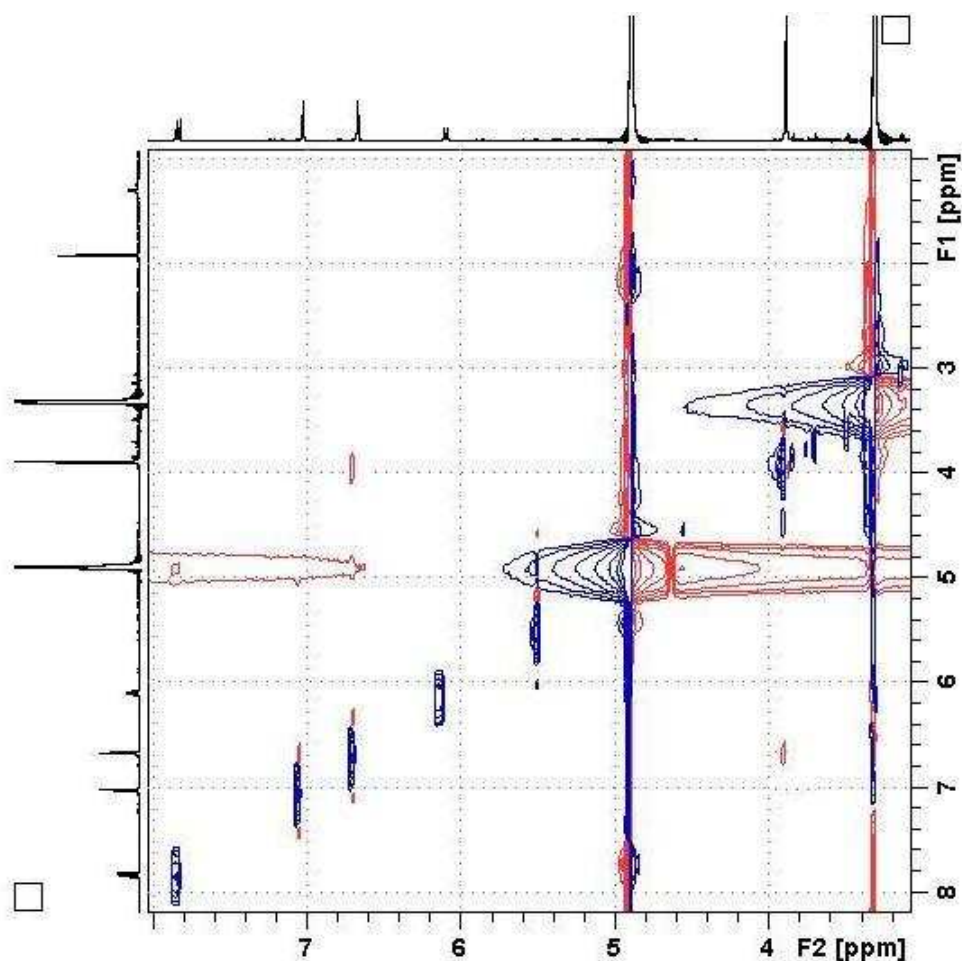
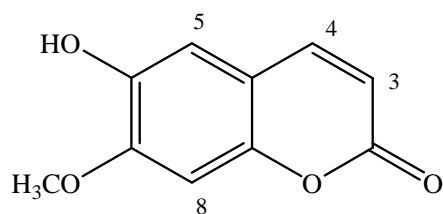


Figure 93: Spectre NOESY (400 MHz, CD₄O) du composé **28**

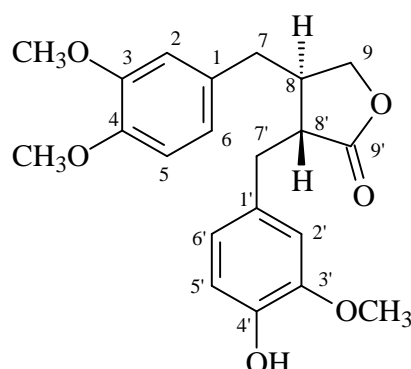
Par comparaison des résultats de ¹H-RMN et de l'UV-Vis avec ceux de la littérature, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Il s'agit de l'isoscoupolétine, une coumarine rencontrée chez plusieurs espèces appartenant à des familles différentes; chez les Asteraceae, elle a été isolée de *Artemisia tridentata* (Browin et al., 1975; Shafizadeh et Melnikoff, 1970).

Composé 29: Arctigénine

Le composé **29** a été isolé de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. Il se présentait sous forme incolore, soluble dans le chloroforme.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20.91 \text{ (MeOH; } c, 0.19).$$

EI-MS (70eV): m/z 372 (C₂₁H₂₄O₆)

Dans le spectre ¹H-RMN (**Figure 94** & **Tableau 64**), trois singulets intégrant pour trois protons chacun à δ 3.83, 3.80 et 3.97 attribuables à trois OCH₃ ont été notés.

Dans la région des protons aromatiques 6 protons ont été distingués :

➤ Deux doublets à δ 6.80 ($J = 7.8$ Hz) et à 6.72 ($J = 8.2$) attribués à H-5' et H-5 à cause de leur *ortho*-conjugaison avec les protons H-6' et H-6 respectivement, qui à leurs tours apparaissent comme deux doublets dédoublés à δ 6.58 ($J = 2.0, 7.8, \text{H-6'}$) et à δ 6.52 ($J = 2.0, 8.2, \text{H-6}$). Ces protons tiennent une petite constante de couplage à cause de leur *mé*ta-conjugaison avec les protons H-2' et H-2.

➤ Deux doublets ont été identifiés à δ 6.61 et 6.43 possédant la même constante de couplage ($J = 2.0$) attribués aux protons H-2' et H-2.

Dans la région du haut champ apparaissent:

- Les protons de la conjonction des deux benzyles avec l'anneau lactonique
- Les protons géminaux H-7a et H-7b sous forme de triplets ($J = 7.4$) à δ 2.61 et δ 2.43, respectivement.
- Les protons géminaux H-7'a et H-7'b sous forme de doublet dédoublés à δ 2.93 ($J = 5.1, 14.1$) et δ 2.87 ($J = 7.4, 14.1$), respectivement.
- Un proton à δ 2.62 sous forme de triplet dédoublé ($J = 5.8, 12.9$) qui a été attribué au proton H-8'. Ce proton se conjugue avec H-7'a et H-7'b.

➤ Un proton à δ 2.50 sous forme de triplet dédoublé ($J= 7.4, 13.0$) qui a été attribué au proton H-8. Ce proton se conjugue avec H-7a et H-7b.

➤ A δ 4.12 un doublet dédoublé a été distingué ($J= 7.4, 9.0$) et attribué au proton H-9a de l'anneau lactonique, qui se conjugue avec son géminale H-9b et son proton voisin H-8.

Par l'étude du spectre ^{13}C -RMN (**Tableau 65 & Figure 95**) la présence d'un carbonyle a été détectée (C-9) à δ 178.5.

➤ A δ 71.3 apparaît le signal du carbone C-9 adjacent à un oxygène.

➤ A la région du bas champ, les carbones suivants ont été détectés: C3-C3' et C4-C4' à δ 148.0, 147.6, 146.6, 144.3, respectivement.

➤ A la région des carbones aliphatiques ont été observés les carbones: C-7, C-7', C-8, C-8' à δ 38.1, 34.5, 40.9 et 46.6, respectivement.

Tableau 64: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **29**

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, $J(\text{Hz})$	Position
6.80	1	$d (J= 7.8)$	H-5'
6.72	1	$d (J= 8.2)$	H-5
6.61	1	$d (J= 2.0)$	H-2'
6.58	1	$dd (J= 2.0, 7.8)$	H-6'
6.52	1	$dd (J= 2.0, 8.2)$	H-6
6.43	1	$d (J= 2.0)$	H-2
4.12	1	$dd (J= 7.4, 9.0)$	H-9a
3.86	1	$dd (J= 7.4, 9.0)$	H-9b
3.83	3	s	OCH_3
3.80	3	s	OCH_3
3.79	3	s	OCH_3
2.93	1	$dd (J = 5.1, 14.1)$	H-7'a
2.87	1	$dd (J = 7.4, 14.1)$	H-7'b
2.62	1	$td (J = 5.8, 12.9)$	H-8'
2.61	1	$t (J = 7.4)$	H-7a
2.50	1	$td (J = 7.4, 13.0)$	H-8
2.43	1	$t (J = 7.4)$	H-7b

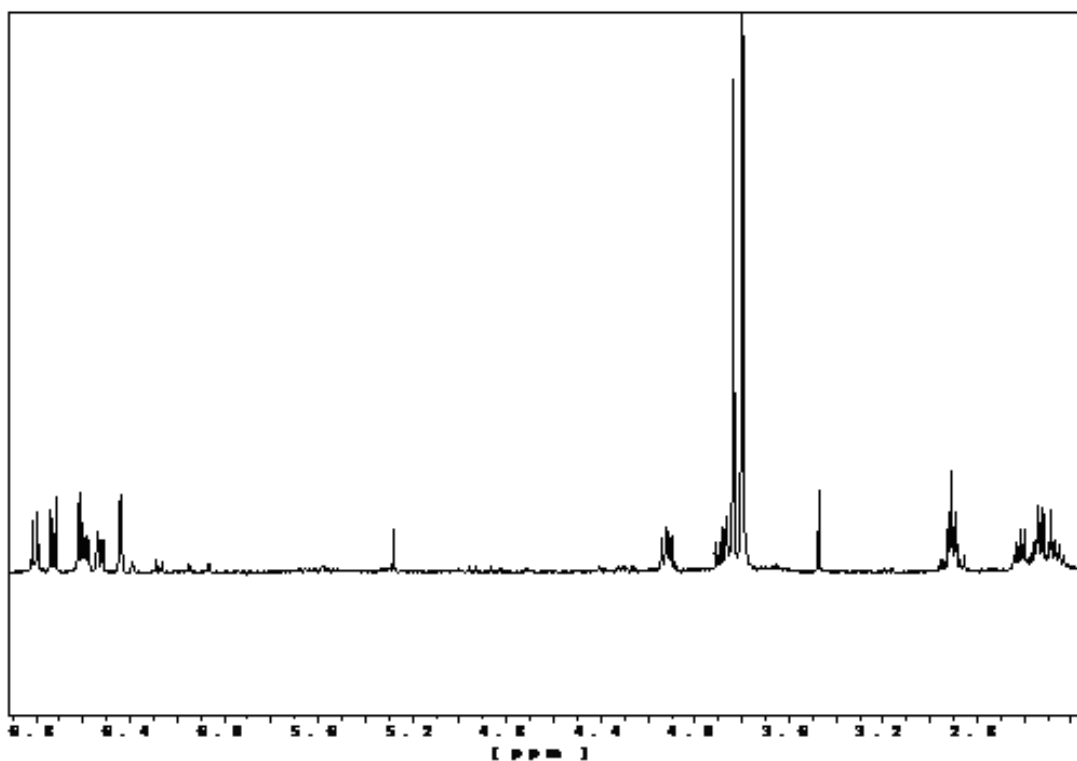


Figure 94: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **29**

Tableau 65: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **29**

δ (ppm)	Types de carbons	Position
178.5	C=O	C-9'
148.0	C	C-3
147.6	C	C-3'
146.6	C	C-4
144.3	C	C-4'
130.1	C	C-1
129.4	C	C-1'
122.0	CH	C-6'
120.5	CH	C-6
114.1	CH	C-5'
111.7	CH	C-2'
111.5	CH	C-2
111.2	CH	C-5
71.3	CH_2	C-9
55.8	CH_3	$\text{OCH}_3 \times 3$
46.6	CH	C-8'
40.9	CH	C-8
38.1	CH_2	C-7
34.5	CH_2	C-7'

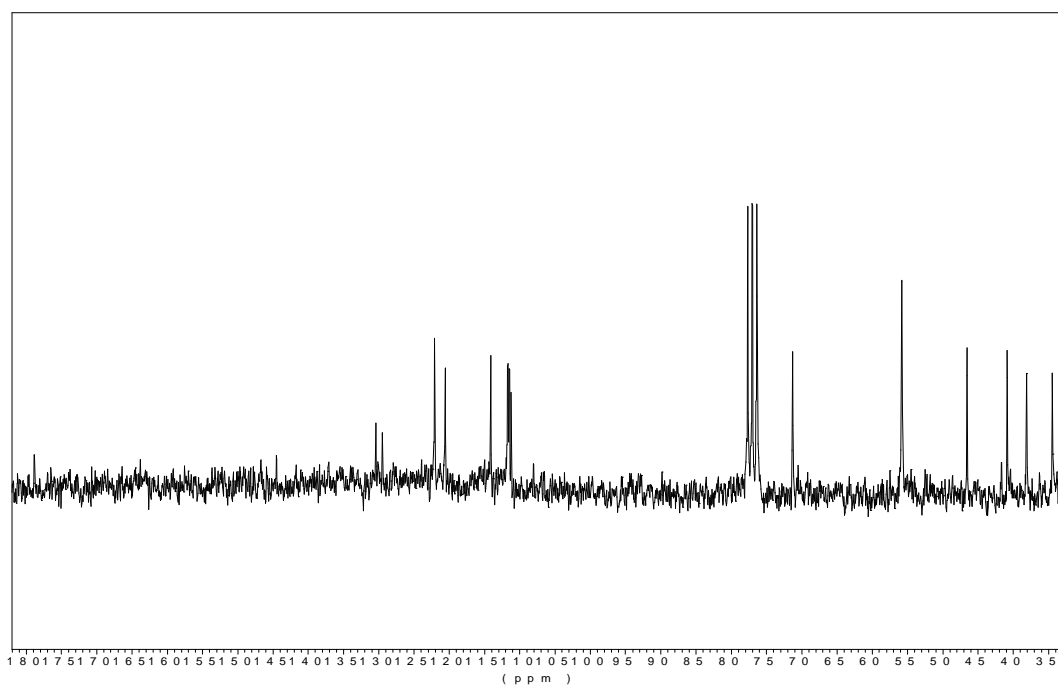


Figure 95: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **29**

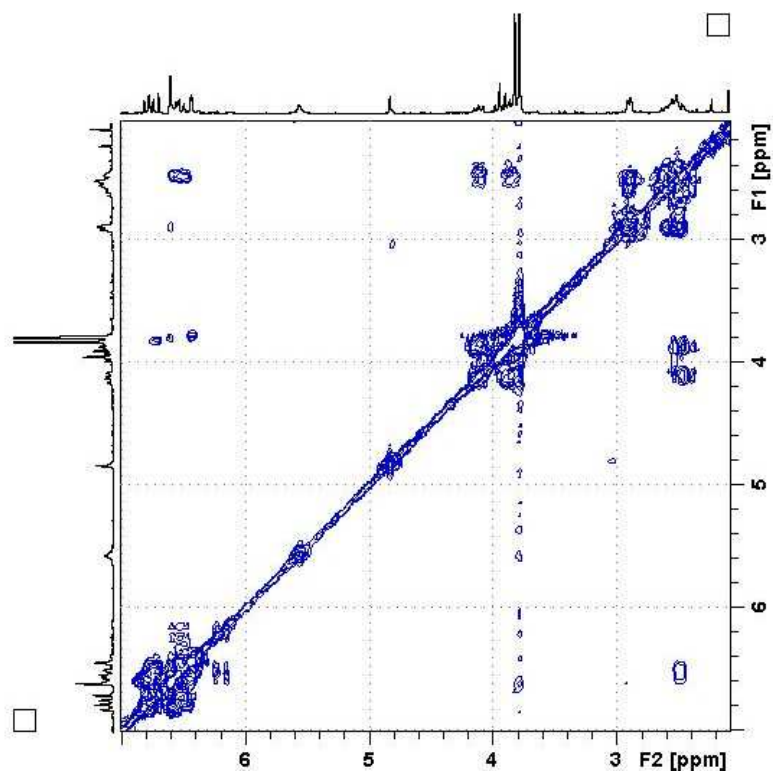


Figure 96: Spectre COSY (200 MHz, CDCl_3) du composé **29**

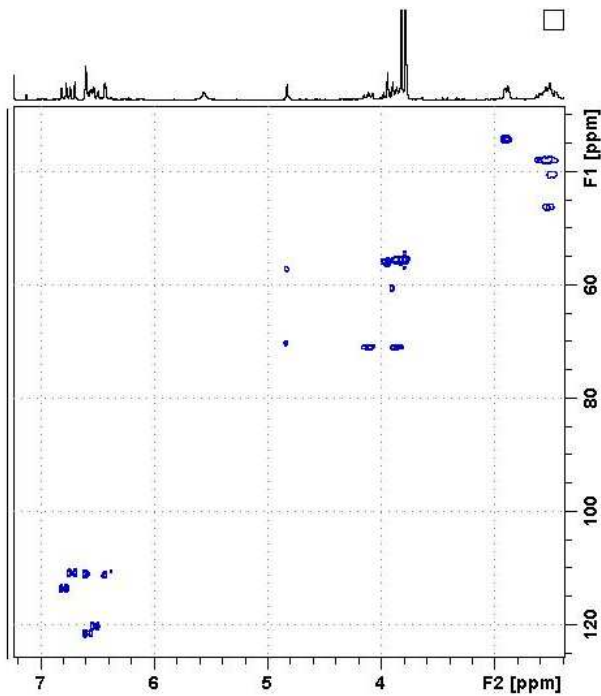


Figure 97: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **29**

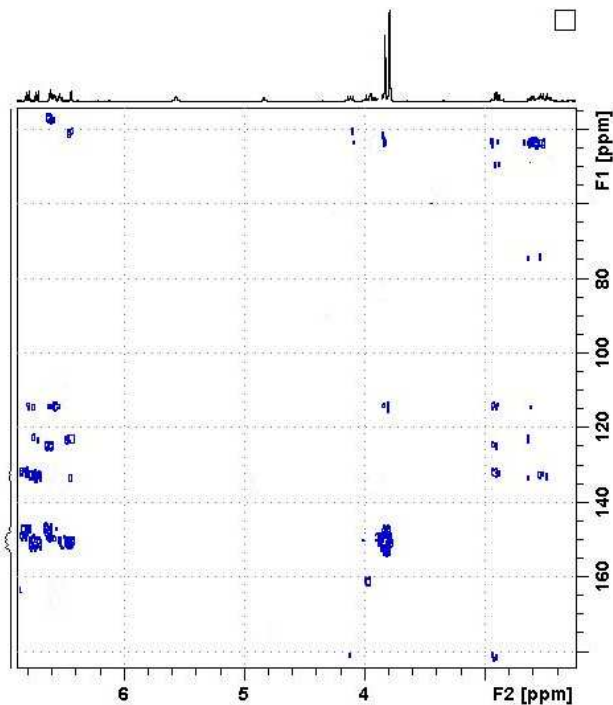
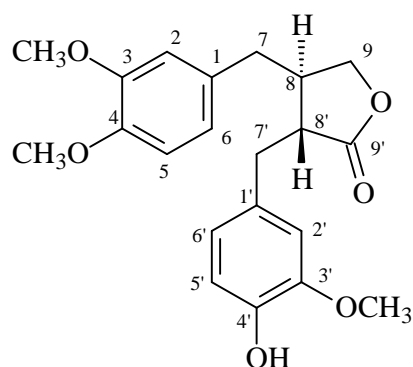


Figure 98: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **29**

Selon les spectres $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, COSY (**Figure 96**), HSQC (**Figure 97**) et HMBC (**Figure 98**), par comparaison avec les données de la littérature, il est évident que le composé **29** appartient au groupe des dibenzylbutyrolactones, formé par la liaison 8-8' *trans* entre deux unités phénylpropanoïques substituées aux positions 3, 4 et 3' et avec la présence d'un anneau lactonique.

Par comparaison des résultats de la littérature (Aslan et Öksüz, 1999; Rahman *et al.*, 1990c) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Il s'agit de l'arctigénine, un lignane de type diarylbutyrolactone. Il a été isolé pour la première fois en 1929 (Shinoda *et al.* 1929) avec son glucoside (arctiine) par les semences de *Arctium lappa* L. (Liu *et al.*, 2003 ; Umehara *et al.*, 1993).

Par la suite, il a été aussi isolé de: *Onopordon acaulon* (Cardona *et al.*, 1992b), *Cupressus lusitanica* (Cowan *et al.*, 2000), *Ipomoea cairica* (De A.Lima *et al.*, 1997, Lin et Chou, 1997), *Arctium lappa* (Han *et al.*, 1994 ; Han, 1995 ; Hirose *et al.*, 2000; Li et Lue, 1995 ; Moritani *et al.*, 1996; Nose *et al.*, 1992, id. 1993; Shinoda *et al.*, 1929; Umehara *et al.*, 1993, id. 1996), *Trachelospermum asiaticum* var. *indicu* (Inagaki *et al.*, 1971, Nishibe *et al.*, 1971, id. 1972), *T. axillare* (Nishibe *et al.*, 1993), *Carthamus tinctorius* (Nose *et al.*, 1993), *Cynara cardunculus* (Koubaa *et al.*, 1999), *Forsythia intermedia* (Rahman *et al.*, 1990a, id. 1990b, id. 1990c), *Jurinella moschus* (Rustaiyan et Ganji, 1987), *Saussurea medusa* (Takasaki *et al.*, 2000) et de *Carduus micropterus* ssp. *persinospus* (Tundis *et al.*, 2000).

Chez le genre *Centaurea* il a été isolé de: *C. cuneifolia* (Aslan et Öksüz, 1999), *Centaurea dimorpha* (Damak *et al.*, 2000), *C. glomerata* (El-Masry *et al.*, 1985), *C. diffusa* (Fortuna *et al.*, 2001), *C. calcitrapa* (Marco *et al.*, 1992), *C. macrocephala* (Ribeiro *et al.*, 2002), *C. dealbata* (Shoeb *et al.*, 2006), *C. regia* (Ulubelen *et al.*, 1988).

Dans la région des protons aromatiques les signaux suivants ont été observés :

- A δ 6.75 un doublet ($J= 7.9$) attribué au proton H-5', qui tient une *ortho* conjugaison avec le proton H-6'.
- A δ 6.73 également un doublet ($J= 7.8$, H-5), qui est du à une *ortho* conjugaison avec le proton H-6.
- A δ 6.64 un doublet dédoublé attribué au proton H-6', qui tient une *ortho* conjugaison avec le proton H-5' ($J=7.1$) et une *méta* conjugaison avec le H-2' ($J= 1.9$).
- A δ 6.62 un doublet ($J= 1.9$) attribué au proton H-2', qui tient une *meta* conjugaison avec le proton H-6'.
- A δ 6.51 un doublet dédoublé attribué au proton H-6, qui tient une *ortho* conjugaison avec le proton H-5 ($J= 8.2$) et à une *meta* conjugaison avec le proton H-2 ($J= 1.9$).
- A δ 6.45 un doublet ($J= 2.2$) du proton H-2, qui donne une *méta* conjugaison avec le proton H-6.

La combinaison de ces données avec ceux du spectre HMBC (**Figure 103**), nous a conduit à la conclusion que les carbones C-1 et C-1' s'attachent avec les carbones C-7 et C-7', respectivement. Par conséquence, les 4 groupes méthoxylés sont les substituants des carbones: C-3, C-4, C-3' et C-4'.

- Le proton H-9a a donné un doublet dédoublé ($J= 7.1, 9.3$ Hz) à δ 4.10, à cause de sa conjugaison avec les protons H-8 et son géminale H-9b, respectivement. Aussi le proton H-9b a donné un doublet dédoublé ($J= 7.6, 9.3$ Hz) à δ 3.85 à cause de sa conjugaison avec les protons H-8 et H-9a, respectivement.
- Le proton H-7'a se présente sous forme d'un doublet dédoublé à δ 2.95, qui est du à sa conjugaison avec les protons H-7'b ($J= 14.2$ Hz) et H-8' ($J= 5.4$ Hz); aussi le proton H-7'b a donné un doublet dédoublé à δ 2.90, qui est du à sa conjugaison avec les protons H-7'a ($J= 14.2$ Hz) et H-8' ($J= 6.6$ Hz).
- Les protons H-7a, H-7b, H-8 et H-8' apparaissent comme multiplet dans la région de δ 2.45 jusqu'à δ 2.65.

Les spectres HSQC, HMBC et COSY (**Figure 101**), nous ont aidé à l'interprétation des données des spectres ^1H -RMN et ^{13}C -RMN. Plus précisément par le spectre HMBC, il était évident que le carbonyle se trouve à la position 9', car il a donné un signal avec le proton H-7'a (conjugaison J_3).

Tableau 66: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

δ (ppm)	n ^o H	Multiplicité, J (Hz)	Position
6.45	1	d ($J=2.2$)	H-2
6.73	1	d ($J=7.9$)	H-5
6.51	1	dd ($J=1.9, 8.2$)	H-6
2.45-2.65	4	m	H-7a, H-8, H-7b, H-8'
4.10	1	dd ($J=7.1, 9.3$)	H-9a
3.85	1	dd ($J=7.6, 9.3$)	H-9b
6.62	1	d ($J=1.9$)	H-2'
6.75	1	d ($J=7.9$)	H-5'
6.64	1	dd ($J=1.9, 7.1$)	H-6'
2.95	1	dd ($J=5.4, 14.2$)	H-7'a
2.90	1	dd ($J=6.6, 14.2$)	H-7'b
3.84	3	s	OCH_3
3.83	3	s	OCH_3
3.81	3	s	OCH_3
3.80	3	s	OCH_3

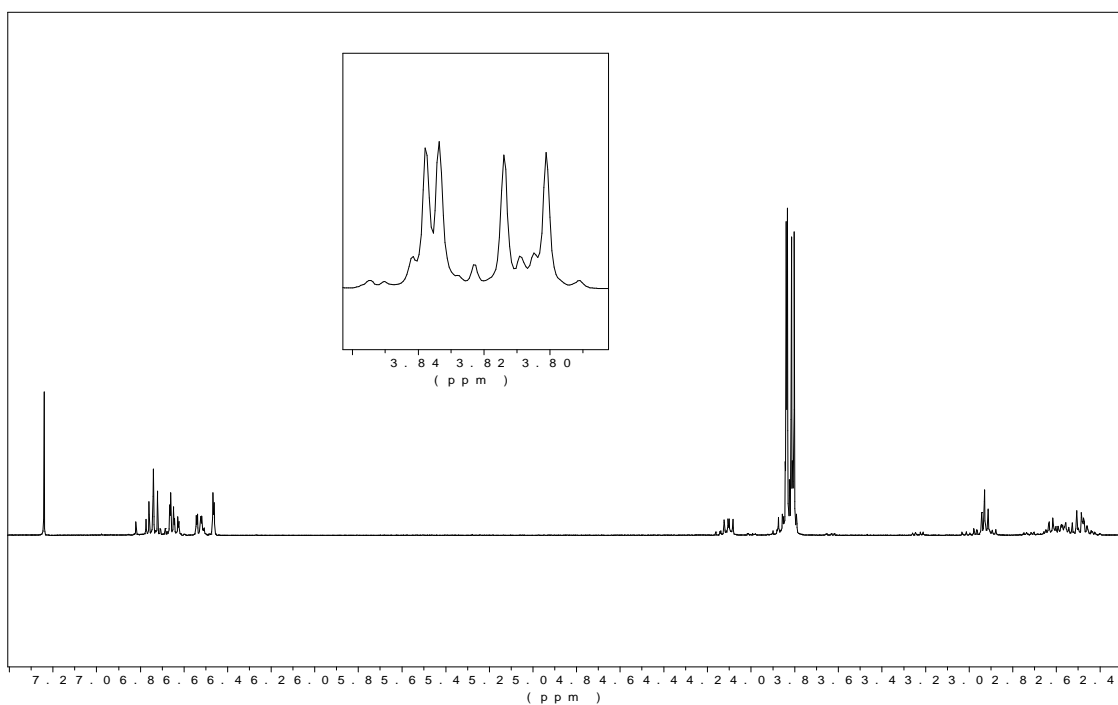


Figure 99: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **30**

Tableau 67: Valeurs des ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

δ (ppm)	Types de carbones	Position
130.4	C	C-1
111.8	CH	C-2
149.0	C	C-3
147.9	C	C-4
111.3	CH	C-5
120.5	CH	C-6
38.2	CH_2	C-7
41.0	CH	C-8
71.3	CH_2	C-9
130.2	C	C-1'
112.3	CH	C-2'
149.0	C	C-3'
147.7	C	C-4'
111.0	CH	C-5'
121.3	CH	C-6'
34.7	CH_2	C-7'
46.7	CH	C-8'
178.9	CO	C-9'
55.9	CH_3	$-\text{CH}_3\text{O} \times 4$

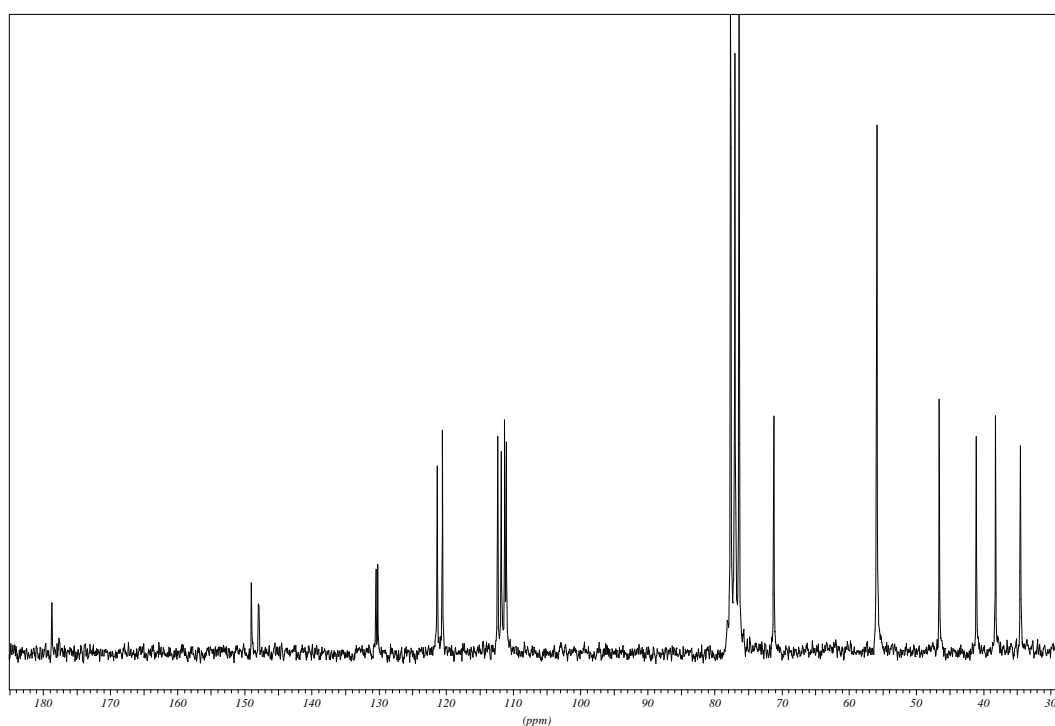


Figure 100: Spectre ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

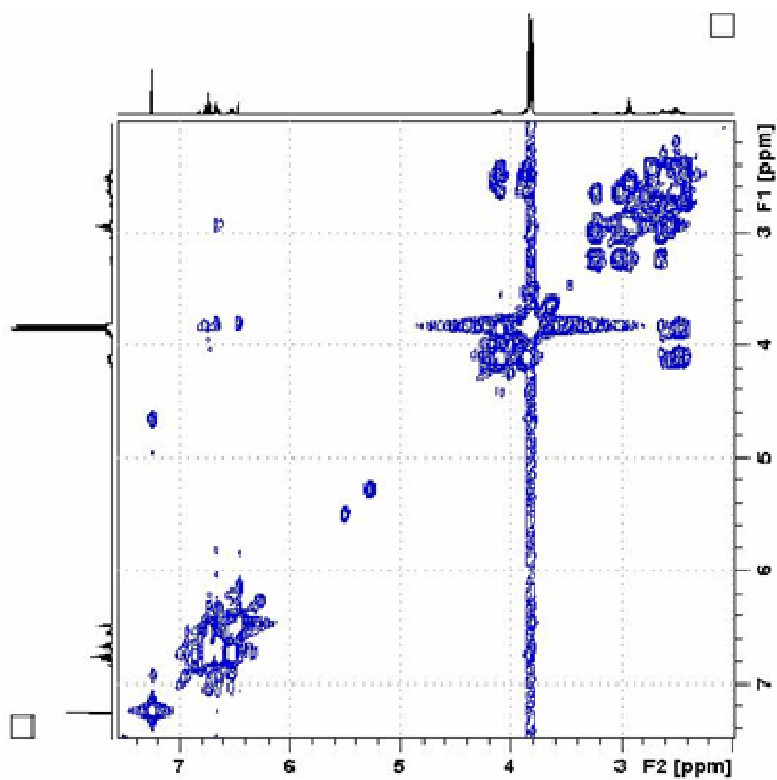


Figure 101: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

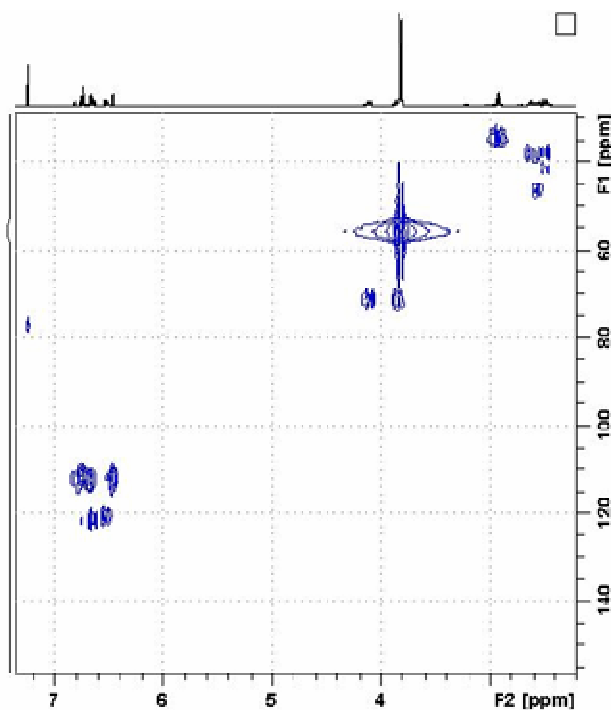


Figure 102: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

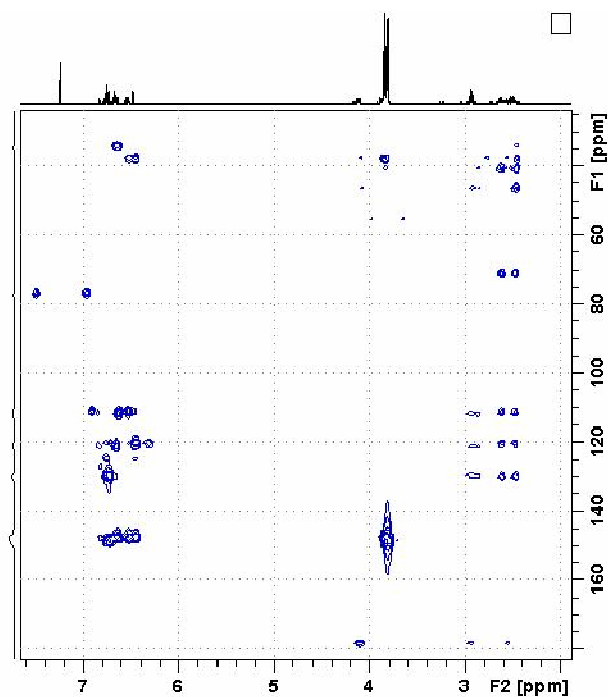
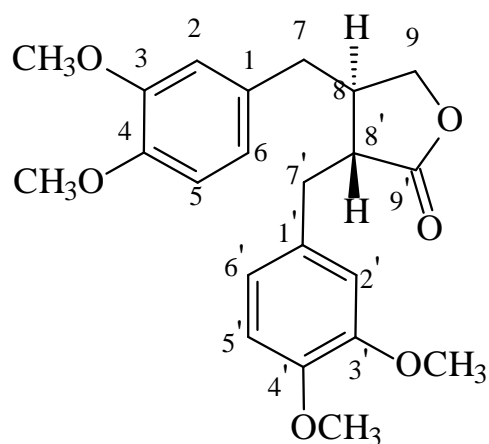


Figure 103: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **30**.

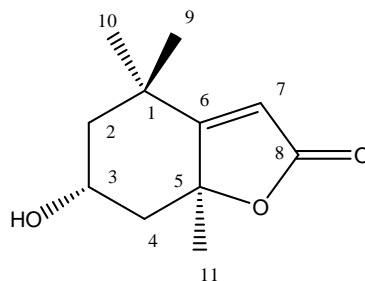
Par conclusion la substance **30** est une dibenzylbutyrolactone, qui se forme par la liaison entre 8-8' de deux unités phénylpropanes avec un pont lactonique. Par comparaison avec les données de la bibliographie (Nishibe *et al.*, 1973; Taafrout *et al.*, 1984) il s'agit d'une structure symétrique substitué aux positions 3, 4 et 3', 4' des noyaux aromatiques.



Cette substance a été isolée chez différentes espèces appartenant à plusieurs familles: *Zanthoxylum lemairie* (Adesina *et al.*, 1997), *Centaurea orphanidea* (Gousiadou et Skaltsa, 2003), *Virola sebifera* (Lopes *et al.*, 1983), *V. elongata* (Kato *et al.*, 1990), *V. michellii* (Vidigal *et al.*, 1995), *Chaerophyllum maculatum* (Mikaya *et al.*, 1980), *Trachelospermum asiaticum* var. *intermedium* (Nishibe *et al.*, 1973), *Ptelea trifoliata* (Reisch *et al.*, 1969), *Steganotaenia araliacea* (Taafrout *et al.*, 1984), *Cinnamomum camphora* (Takaoka *et al.*, 1975), *Forsythia suspensa* (Takizawa *et al.*, 1981).

Composé 31 : (3*S*, 5*R*)-Loliolide

Le composé **31** a été isolé de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. Il se présentait sous forme d'huile incolore soluble dans le chloroforme.



$$[\alpha]_D^{20} = -0.15^\circ (\text{MeOH}, c 3.10).$$

EI-MS (70eV): m/z 196 (C₁₁H₁₆O₃)

L'étude du spectre ¹H-RMN (**Figure 104** & **Tableau 68**) a révélé les signaux suivants:

Dans la région oléfinique apparaissent:

- Le proton H-7 comme un singulet à δ 5.68. Ce proton est assez déblindé à cause du carbonyle voisin.
- Le proton H-3 résonne à δ 4.31 comme un quintuplet ($J= 3.5$). La valeur de ce déplacement chimique indique l'existence d'un oxygène au carbone correspondant. Ceci a été confirmé par le spectre HSQC (**Figure 16**) où le C-3 apparaît dans la région des carbones oxygénés à δ 66.9. Le proton H-3 se conjugue avec 4 autres protons voisins (H-2a, H-2b, H-4a, H-4b) dont les carbones sont : C-2 à δ 47.5 et C-4 à δ 45.6.

Dans la région du haut champ apparaissent:

- Les deux protons géminaux H-2a et H-2b comme un triplet dédoublé à δ 1.95 ($J= 2.8, 14.8$, H-2a) et comme un doublet dédoublé à δ 1.52 ($J= 3.9, 14.8$, H-2b).
- A δ 2.43 apparaît le proton H-4a comme un triplet dédoublé ($J= 2.8, 14.0$), son proton géminale H-4b apparaît à δ 1.76 comme un doublet dédoublé ($J= 4.3, 14.0$).
- A δ 1.25, 1.45 et 1.76 trois singulets intégrants pour 3 protons chacun. Au spectre HMBC les méthyles à δ 1.25 et δ 1.45 donnent des signaux avec les carbones quaternaires à δ 35.9 (C-1) et à δ 182.5 (C-6) et le carbone C-2 à δ 47.5.

Au spectre NOESY (**Figure 108**), les méthyles à δ 1.76 et δ 1.45 donnent des signaux avec le proton H-3 (méthine oxygéné).

Au spectre HMBC (**Figure 107**) le méthyle à δ 1.25 donne un signal avec les carbones C-4 (J_3), C-5 (J_2) et C-6 (J_3). Au spectre NOESY ce méthyle donne un seul signal avec le proton le plus déblindé (H-7), ceci indique que le méthyle a une position équatoriale par rapport au noyau.

La combinaison de ces données nous a amené à la l'interprétation des positons des différents méthyles.

Tableau 68: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé 31

δ (ppm)	$n^\circ\text{H}$	Multiplicité, J (Hz)	Position
1.95	1	<i>td</i> ($J= 2.8, 14.8$)	H-2a
1.52	1	<i>dd</i> ($J= 3.9, 14.8$)	H-2b
4.31	1	<i>q</i> ($J= 3.5$)	H-3
2.43	1	<i>td</i> ($J= 2.8, 14.0$)	H-4a
1.76	1	<i>dd</i> ($J= 4.3, 14.0$)	H-4b
5.68	1	<i>s</i>	H-7
1.76	3	<i>s</i>	11- CH_3
1.45	3	<i>s</i>	10- CH_3
1.25	3	<i>s</i>	9- CH_3

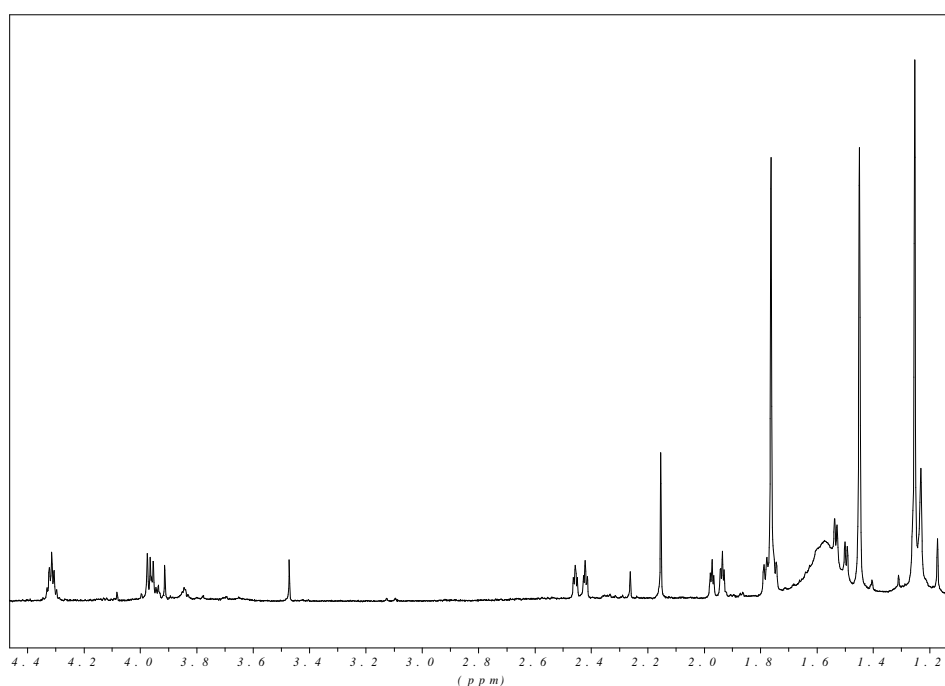


Figure 104: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé 31

Tableau 69: Valeurs des ^{13}C -RMN du composé **31***

δ (ppm)	Types de carbons	Position
35.9	C	C-1
47.5	CH_2	C-2
66.9	CH	C-3
45.6	CH_2	C-4
87.0	C	C-5
182.5	C	C-6
113.2	CH	C7
172.0	C	C-8
30.0	CH_3	C-9
26.8	CH_3	C-10
27.0	CH_3	C-11

* Assignement fait à partir des spectres HSQC et HMBC.

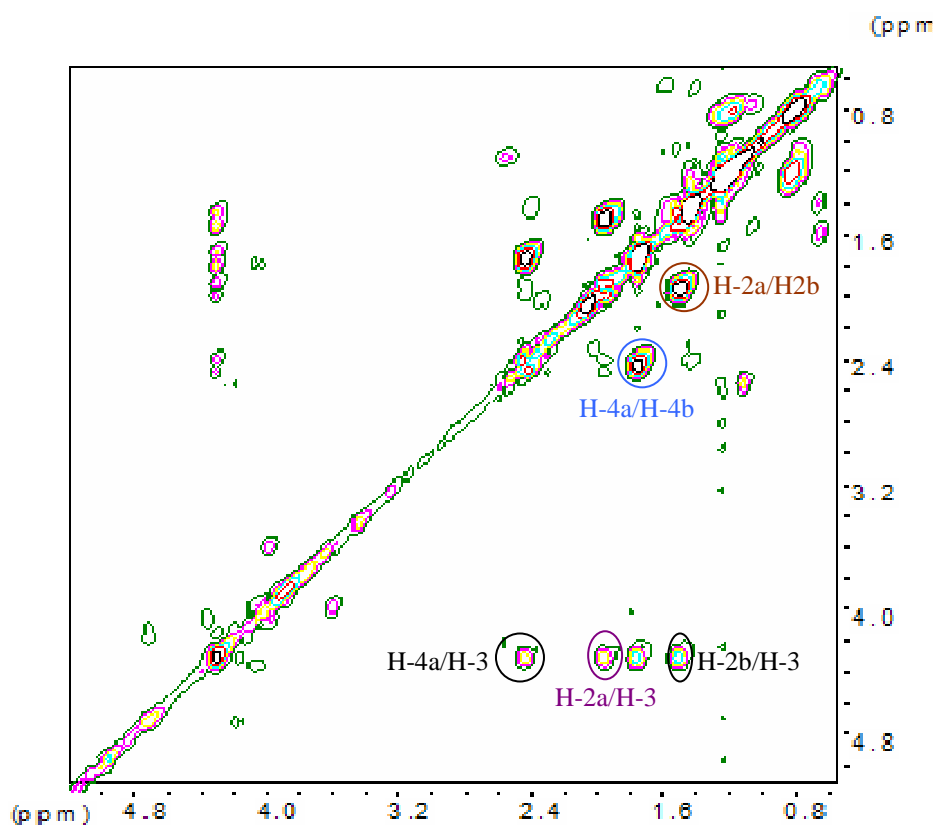


Figure 105: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé **31**.

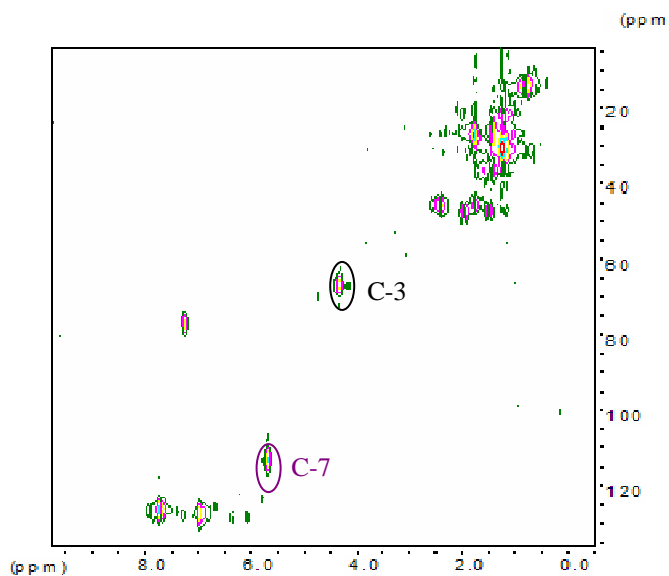


Figure 106: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **31**.

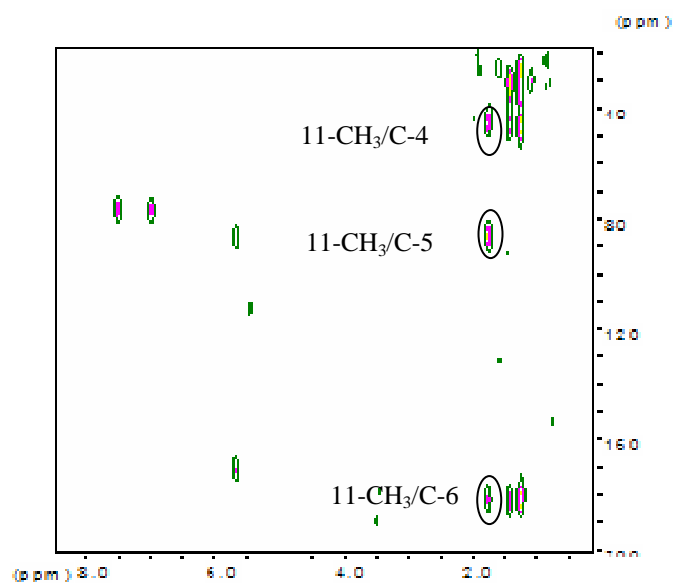


Figure 107: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3) du composé **31**.

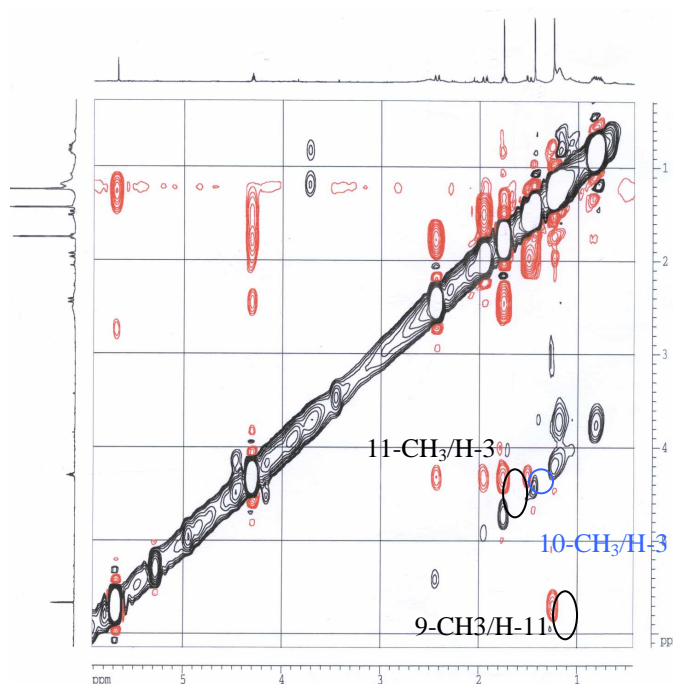


Figure 108: Spectre NOESY (400 MHz, CDCl_3) du composé **31**.

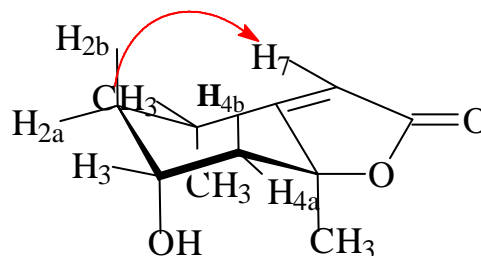
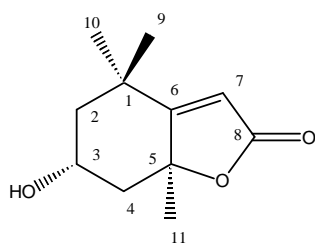


Figure 109: Signaux NOE du composé **31**.

Par comparaison des résultats du ^1H -RMN et du ^{13}C -RMN avec ceux de la littérature (Hodges et Portes, 1964; Jones et *al.*, 2000) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Il s'agit du *nor*-isoprénoïde (3*S*, 5*R*)-loliolide, qui est une substance très répandue dans le règne végétal et chez les organismes marins; quelques fois elle est rencontrée sous le nom de calendine isolé de *Calendula officinalis*.

Selon les données bibliographiques deux autres épimères sont isolés: le 3-*épi*-loliolide (3*R*, 5*S*) (Borkosky *et al.*, 1996) et l'*iso*-loliolide (3*S*, 5*S*) (Klock *et al.*, 1984).

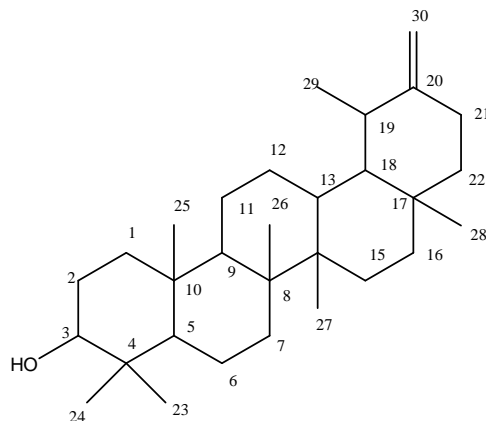
(3*S*, 5*R*)-Loliolide a été isolé chez différentes familles. Chez la famille des Asteraceae, il a été isolé de *Synedrellopsis grisebachii* (Hernandez *et al.*, 1996), de *Arnica montana* (Holub *et al.*, 1975) et de *Calendula officinalis* (Willuhn *et al.*, 1987).

Chez le genre *Centaurea* il a été isolé de: *C. salmantica* (Fernández *et al.*, 1993) et de *C. deusta* (Karioti *et al.*, 2002).

Ce composé est aussi présenté chez: *Cystophora moniliformis* (Cystoseiraceae) (Ravi *et al.*, 1982), *Canscora decussate* (Gentianaceae) (Ghosal *et al.*, 1976), *Lythrum salicaria* (Lythraceae) (Fujita *et al.*, 1972), *Cocculus carolinus* (Menispermaceae) (Slatkin *et al.*, 1972), *Menyanthes trifoliata* (Menyanthaceae) (Sakan *et al.*, 1969), *Lolium perenne* (Poaceae) (Hodges *et al.*, 1964), *Rosa taiwanensis* (Rosaceae) (Yang *et al.*, 1995) et *Nicandra physaloides* (Begley *et al.*, 1976) (Solanaceae).

Composé 32 : 4, 4, 6a, 6b, 8a, 12, 14b-heptaméthyle-11-méthylène-docosa-hydro-pikene-3-ol [=taraxast-20 (30)ene-3 β -ol].

Le composé **32** a été isolé de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. Il se présentait sous forme huileuse soluble dans le chloroforme.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +40.16^{\circ} \text{ (MeOH, } c, 0.03\text{)}.$$

EI-MS (70eV): m/z 426 (C₃₀H₅₀O).

Nous avons constaté la présence de 30 carbones au spectre ¹³C-RMN (**Figure 111** & **Tableau 71**); ceci indique que la substance **32** est un triterpène.

Selon l'expérience DEPT (**Figure 112**), 7 carbones sont des méthyles, 11 sont des méthylènes, 6 des méthines dont un est oxygéné et 6 quaternaires, parmi eux deux sont oléfiniques.

Au spectre COSY nous avons observé 5 séquences :

➤ Le méthylène CH₂-1 est lié avec le méthylène CH₂-2, ce dernier est lié à son tour avec le méthine CH-3. Le proton H-3 est déblindé à cause de l'existence d'un hydroxyle sur le carbone correspondant. Alors le carbone C-3 raisonne à δ 79.0; cette valeur est caractéristique de carbone oxygéné.

➤ Le méthine CH-5 est lié avec le méthylène CH₂-6 et ce dernier avec le méthylène CH₂-7.

➤ Le méthine CH-9 est lié avec le méthylène CH₂-11; celui-ci avec le méthylène CH₂-12, ce dernier est lié avec le méthine CH-13, qui est lié avec le méthine CH-18; celui-ci se conjugue avec le méthine CH-19.

➤ Le méthylène CH₂-21 est lié avec le méthylène CH₂-22.

- Le méthylène CH₂-15 est lié avec le méthylène CH₂-16.

Selon le même spectre ces séquences sont interrompues à cause de la présence de carbones quaternaires qui portent des méthyles, à l'exception du C-20 et du C-30 liés entre eux avec une double liaison exocyclique.

Au spectre HMBC (**Figure 114**), le carbone quaternaire C-10 donne des signaux avec les protons H-1a, H-1b, H-9 et avec le méthyle CH₃-25.

- Le carbone C-4 donne des signaux avec les méthyles CH₃-23 et CH₃-24 et aussi avec H-6a et H-6b, alors que le carbone C-8 donne des signaux avec les méthyles CH₃-26 et CH₃-27 et avec les protons H-7 et H-9.

- Le carbone C-14 donne des signaux avec le méthyle CH₃-27 et les protons H-13, H-15a et H-15b. En même temps, le carbone quaternaire C-17 donne des signaux avec le méthyle CH₃-28 et les protons H-16a, H-16b, H-18, H-22a et H-22b.

- Aussi, le carbone C-19 donne des signaux avec le méthyle CH₃-29, H-21a et avec les protons de la double liaison exocyclique H-30a et H-30b. Ces protons sont oléfiniques et apparaissent sous forme de multiplet à δ 4.58 à cause de l'existence de la double liaison.

- A cause de l'existence de cette double liaison les protons H-19 et H-21 apparaissent déblindés à δ 2.11 et à δ 2.21-2.42, respectivement, comme multiplets.

- Le reste des protons donne un multiplet dans la région 0.75-1.70.

Tableau 70: Valeurs des ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **32**

δ (ppm)	n $^\circ$ H	Multiplicité, J (Hz)	Position
0.95	1	<i>m</i>	H-1a
1.69	1	<i>m</i>	H-1b
1.59	1	<i>m</i>	H-2a
1.63	1	<i>d</i> ($J= 2.8$)	H-2b
3.18	1	<i>dd</i> ($J= 5.1, 11.4$)	H-3
0.74	1	<i>d</i> ($J= 10.0$)	H-5
1.39	1	<i>m</i>	H-6a
1.52	1	<i>m</i>	H-6b
1.35	1	<i>m</i>	H-7
1.33	1	*	H-9
1.28	1	<i>m</i>	H-11a
1.54	1	<i>m</i>	H-11b
1.11	1	<i>m</i>	H-12a
1.70	1	<i>m</i>	H-12b
1.60	1	<i>m</i>	H-13
0.95	1	<i>m</i>	H-15a
1.68	1	<i>m</i>	H-15b
1.17	1	<i>m</i>	H-16a
1.28	1	<i>m</i>	H-16b
2.13	1	<i>m</i>	H-19
2.21	1	<i>m</i>	H-21a
2.42	1	<i>m</i>	H-21b
1.38	1	<i>m</i>	H-22a
1.42	1	<i>m</i>	H-22b
0.97	3	<i>s</i>	CH ₃ -23
0.75	3	<i>s</i>	CH ₃ -24
0.84	3	<i>s</i>	CH ₃ -25
1.00	3	<i>s</i>	CH ₃ -26
0.94	3	<i>s</i>	CH ₃ -27
0.85	3	<i>s</i>	CH ₃ -28
0.99	3	<i>s</i>	CH ₃ -29
4.58	2	<i>m</i>	H-30a, H-30b

*le signal de ce proton est superposé par les protons H-6a et H-7.

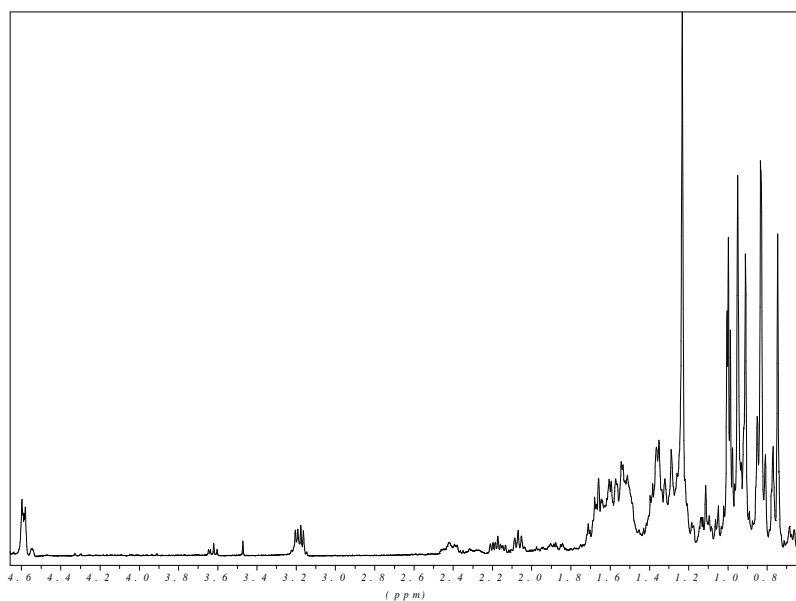


Figure 110: Spectre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **32**.

Tableau 71: Valeurs des ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3) du composé **32**

δ (ppm)	Types de carbons	Position
38.8	CH_2	C-1
27.3	CH_2	C-2
79.0	CH	C-3
38.8	C	C-4
55.3	CH	H-5
18.2	CH_2	C-6
34.0	CH_2	C-7
40.8	C	C-8
50.4	CH	H-9
37.1	C	C-10
21.4	CH_2	C-11
26.1	CH_2	C-12
39.1	CH	C-13
42.0	C	C-14
26.6	CH_2	C-15
38.3	CH_2	C-16
34.5	C	C-17
48.6	CH	C-18
39.4	CH	C-19
151.3	C	C-20
25.6	CH_2	C-21
38.9	CH_2	C-22
28.0	CH_3	CH_3 -23
15.4	CH_3	CH_3 -24
16.7	CH_3	CH_3 -25
15.8	CH_3	CH_3 -28
14.7	CH_3	CH_3 -27
19.5	CH_3	CH_3 -26
25.5	CH_3	CH_3 -29
107.1	CH_2	C-30

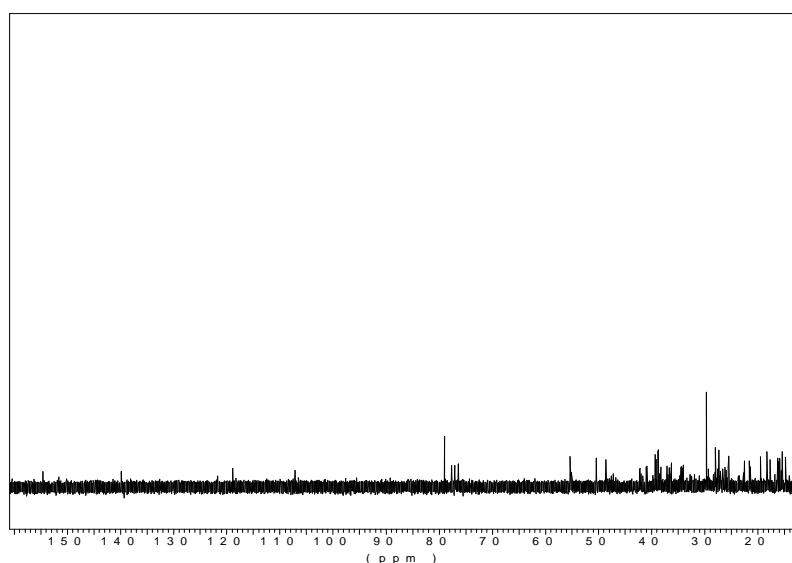


Figure 111: Spectre ^{13}C -RMN (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **32**.

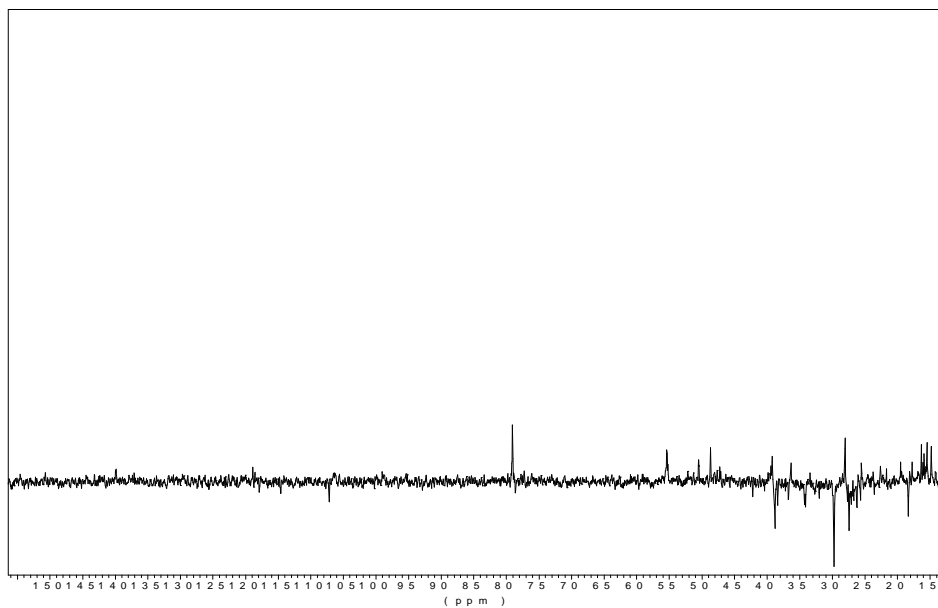


Figure 112: Spectre ^{13}C -RMN/DEPT (50.3 MHz, CDCl_3) du composé **32**.

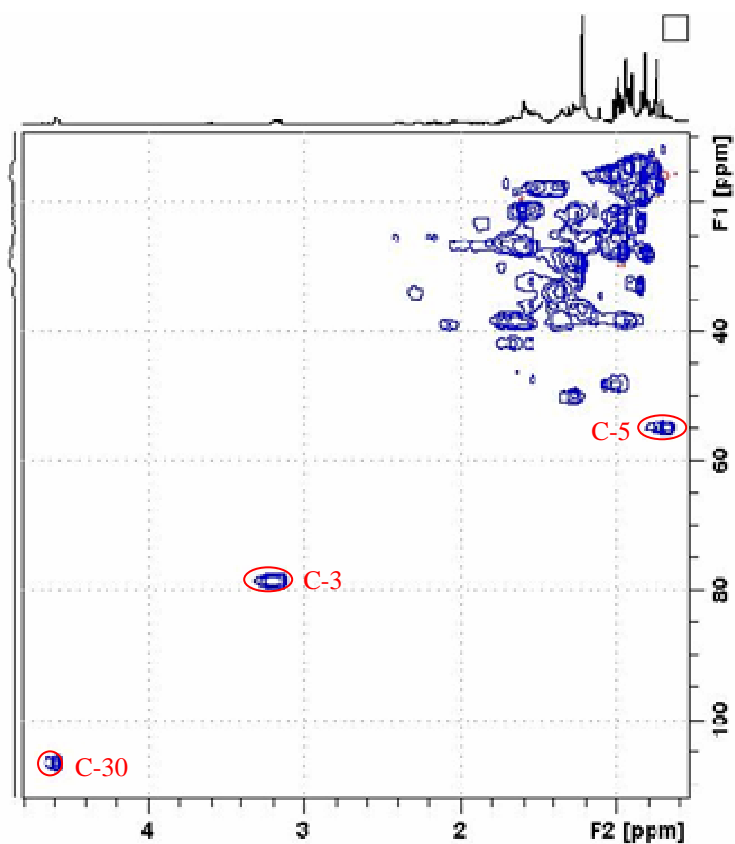


Figure 113: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé **32**.

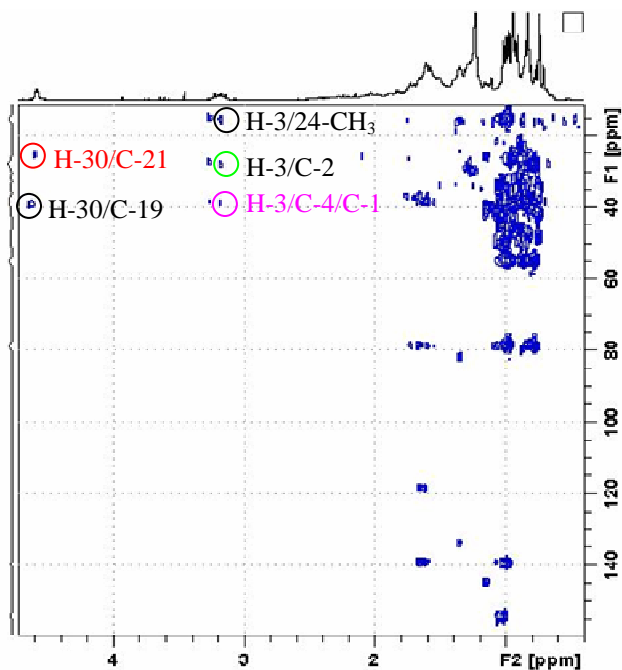


Figure 114: Spectre HMBC (200 MHz, CDCl_3) du composé **32**.

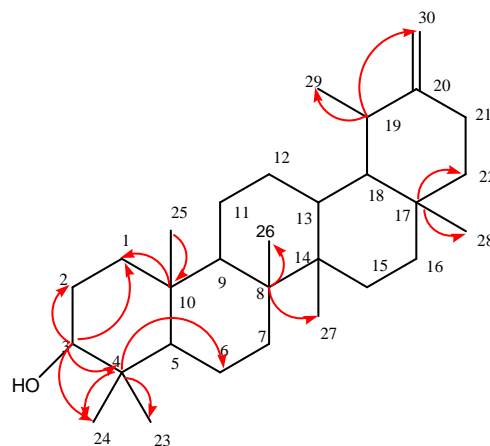
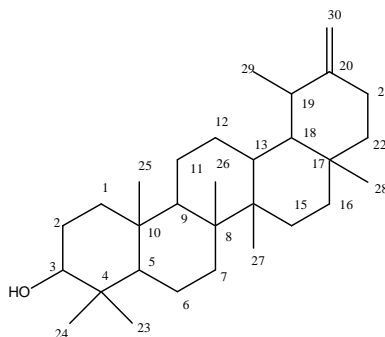


Figure 115: Corrélations HMBC du composé **32**.

Par comparaison des résultats de 1D & 2D-RMN avec ceux de la littérature (Reynolds *et al.*, 1986) la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Il s'agit du taraxast-20 (30) ene-3 β -ol. Cette substance a été isolée chez plusieurs espèces végétales. Quant à la famille des Asteraceae, elle a été identifiée chez plusieurs taxa, parmi eux: *Richandria tingitana* (Abdel-Mogib *et al.*, 1993), *Carthamus tinctorius*, *Chrysanthemum morifolium*, *Helianthus annuus* (Akihisa *et al.*, 1996), *Osteospermum sp* (Bohlmann *et al.*, 1982), *Cirsium texanum* (Dominguez *et al.*, 1974), *Cirsium arvense* (Dutta *et al.*, 1972), *Pluchea quitoc* (Guilhon *et al.*, 1996), *Liatris ohlingerae* (Lu *et al.*, 1994), *Bahia schaffneri var. aristata* (Perez *et al.*, 1993), *Anthemis melanolepis* (Saraglou *et al.*, 2007), *A. auriculata* (Theodori *et al.*, 2006), *Inula grantioides* (Viqar *et al.*, 1990), *Tanacetum vulgare* (Wilkomirski *et al.*, 1992).

III.2. Résultats des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues des deux espèces, *C. pullata* et de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, avaient un rendement peu différent 0.03% et 0.01%, avec des pouvoirs rotatoires : $[a]_D^{20}$ -2.75 (CH₂Cl₂. c. 0.073) et $[a]_D^{20}$ +1.0 (CH₂Cl₂. c. 0.040), respectivement. Elles étaient de couleur jaune et celle de *C. pullata* possédait une odeur spécifique.

Ces huiles ont été analysées par GC (colonne polaire) et GC-MS en utilisant deux types de colonnes capillaires: HP-5 (apolaire) et HP-Innowax (polaire). Les composés identifiés ont été cités en ordre d'élution dans la colonne HP-5; leurs indices de rétention aux deux colonnes et leurs pourcentages ainsi que les pourcentages des différents groupes chimiques sont présentées dans le **Tableau 72** et **73** respectivement.

L'huile essentielle de *C. pullata* est constituée d'un mélange de différents groupes chimiques. Un total de 53 composés qui représentaient 93.6 % de l'huile ont été identifiés. Les sesquiterpènes oxygénés (45.2%) comptent comme constituants majoritaires, parmi eux l'oxyde de caryophyllène (38.5%) se révèle le plus abondant. Les hydrocarbures (36.5%) constituent aussi bien un groupe important, parmi eux les aldéhydes (16.3%) dont le benzaldéhyde (5.0%) est le composé le plus important, suivis du groupe des alcanes, alcènes (16.1%) avec l' heneicosane (8.6%) comme constituant majoritaire (**Tableau 73, Figures 116 & 117**).

L'huile essentielle de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* était pauvre en composés. Un total de 26 composés, qui représentaient 82.4% de l'huile, ont été identifiés. Le groupe des sesquiterpènes oxygénés était le plus abondant (47.3%) dont le spathulénol (12.2%) et le β -eudésmol (10.1%) étaient les composés majoritaires, suivit par le groupe des hydrocarbures (28.6 %) dont le 6,10,14-triméthyl pentadécane-2-one (12.9 %) était le composé majoritaire.

Les groupes des hydrocarbures sesquiterpéniques et des phényl propanoïdes ont été absents chez *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, alors que le groupe des hydrocarbures monoterpéniques était absent chez les deux espèces. La même remarque a été faite chez les huiles essentielles des espèces *C. zuccariniana* (Lazari et al., 2000), *C. raphanina* ssp. *mixta* (Lazari et al., 1999), *C. calcitrapa* (Binder et al., 1990b), *C. solsititialis* (Binder et al., 1990a; Buttery et al., 1986) . Ce groupe chimique a été trouvé sous forme de trace chez *C. Kotschy* var. *decumbens* (Ertugrul et al., 2003).

Il faut noter que les deux huiles essentielles comprennent des hydrocarbures en séries homologues: alcanes, alcènes, alcools aliphatiques, aldéhydes et cétones. Des différents acides gras sont aussi présents; ceci a été noté aussi pour les huiles essentielles des espèces grecques appartenant à la section Acrolophus: *C. pelia*, *C. thessala* ssp. *drakiensis*, *C. zuccariniana* (Lazari et al., 2000). Ces composés appartiennent plutôt aux constituants typiques des cires épicuticulaires des parties aériennes qu'aux huiles essentielles au sens strict (Nahrstedt et al., 1981; Engel et al., 1993).

En examinant la littérature relative à la composition des huiles essentielles chez le genre *Centaurea*, il en ressort que l'unique espèce représentative de la section Melanoloma (*C. pullata*) n'a pas fait l'objet d'études antérieures, ce qui nous a emmené à comparer nos résultats avec ceux de l'ensemble des centaurées.

L'oxyde de caryophyllène était le composé majoritaire chez *C. pullata* (38.5%) et chez d'autres espèces : *C. aladagensis* (6.6%) (Bülent Köse et al., 2007), *C. aucheri* (19.44%) (Asadipour et al., 2005), *C. behen* (9.9%) (Mirza et al., 2003), *C. chrysantha* (9.5%) (Dural et al., 2003), *C. cineraria* (3.2%) (Senatore et al., 2003), *C. dichroa* (9.8%) (Altintas et al., 2004), *C. huber-morathii* (3.3%) (Başer et al., 2006), *C. raphanina* ssp. *mixta* (10.31%) (Lazari et al., 1999), *C. sessilis* (10.0%) (Yayli et al., 2005), *C. solstitialis* (25.2%) (Akbar et al., 2006), *C. thessala* ssp. *drakiensis* (7.8%) et *C. zuccariniana* (6.2%) (Lazari et al., 2000).

A l'inverse chez *C. kotschy* var. *decumbens* ce composé a été identifié comme composé minoritaire (1.9%) (Ertugrul et al., 2003).

Dans la section Seridia, proche de la section Melanoloma, peu d'huiles essentielles ont été investiguées. Néanmoins, celle étudiée de *C. solstitialis* (Akber, 2006; Binder et al., 1990a; Buttery et al., 1986) ne contenait aucun composé majoritaire commun avec *C. pullata*.

Le composé majoritaire dans l'huile essentielle de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*, 6,10,14-triméthyl pentadécan-2-one (12.9%), a été identifié comme un composé majoritaire chez *C. depressa* (7.4%) (Akbar et al., 2005), et comme composé de faible pourcentage chez *C. sessilis* (3.1%) et *C. armena* (5.7%) qui appartient à une autre section (Yayli et al., 2005).

La même observation a été faite pour le spathulénol (12.2%) qui a été identifié chez *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* comme composé majoritaire, alors qu'il était minoritaire chez *C. mucronifera* (1.5%) et *C. chrysantha* (3.8%) (Dural et al., 2003), *C. sessilis* (4.9%) et *C. armena* (3.9%) (Yayli et al., 2005), *C. pseudoscabiosa* ssp. *pseudoscabiosa* (2.8%) et *C.*

hadimensis (3.5%) (Flamini et al., 2002), *C. raphanina* ssp. *mixta* (3.97%) *C. spruneri* (0.92%) (Lazari et al., 1999), *C. pelia* (2.1%) et *C. thessala* ssp. *drakiensis* (3.8%) (Lazari et al., 2000).

Le dernier composé majoritaire chez *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* était le β -eudésmol (10.1%), il l'était également chez *C. mucronifera* (17.4%) (Dural et al., 2003), *C. sessilis* (12.4%) et *C. armena* (19.3) (Yayli et al., 2005).

Par contre, il a été signalé comme composé de faible pourcentage chez *C. spruneri* (2.96%) (Lazari et al., 1999), comme composé minoritaire chez *C. pelia* (0.9%) (Lazari et al., 2000) et totalement absent chez les espèces suivantes *C. thessala* ssp. *drakiensis*, (Lazari et al., 2000) et *C. chrysantha* (Dural et al., 2003).

Tableau 72: Composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Centaurea pullata* (1) et de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* (2)

	Composé	IR ¹	IR ²	Surface du pic (%)	
				1	2
1	heptanal	910	1188	0.1	-
2	benzaldéhyde	965	1190	5.0	-
3	1-octen-3-ol	987	1209	0.3	-
4	<i>n</i> -octanal	1015	1290	0.4	-
5	benzène acétaldéhyde	1051	1282	2.5	-
6	<i>n</i> -octanol	1077	1318	0.3	-
7	linalool	1097	1537	0.2	-
8	<i>n</i> -nonanal	1098	1390	3.7	-
9	camphre	1150	1518	0.1	-
10	2(<i>E</i>), 6(<i>Z</i>)-nonadienal	1159	1400	0.1	-
11	nonyl alcool	1178	1406	0.2	-
12	α -terpinéol	1196	1436	0.2	-
13	safranal	1198	1444	0.5	-
14	décanal	1201	1493	2.7	-
15	pulégone	1231	1457	0.4	-
16	acide benzène acétique, éthyle ester	1243	1466	0.1	-
17	(<i>E</i>)-décenal-2	1261	1510	0.1	-
18	1-tridécène	1290	1541	0.2	-
19	2(<i>E</i>), 4(<i>Z</i>)-décadienal	1296	1548	0.3	-
20	carvacrol	1305	-	-	1.2
21	undécanal	1311	-	0.1	-
22	2(<i>E</i>), 4(<i>E</i>)-décadienal	1312	1816	0.5	-
23	eugénol	1358	1605	0.9	-
24	2- méthyle undécanal	1365	1610	0.3	-
25	α -copaène	1369	1617	0.2	-
26	β -cubébène	1391	1624	0.5	-
27	<i>n</i> -tétradécane	1400		0.4	-

28	β -caryphyllène	1416	1661	2.5	-
29	α -humulène	1445	1663	0.3	-
30	géranyle acétone	1450	1859	0.7	-
31	gérmacrène D	1467	1727	0.3	-
32	(<i>E</i>)- β -ionone	1482	1944	2.4	2.8
33	pentadécane	1500		2.5	-
34	β -bisabolène	1501	1725	0.2	-
35	tridécanal	1503	-	-	0.9
36	γ -cadinène	1510	1758	0.8	-
37	δ -cadinène	1517	1756	0.1	-
38	β -sesquiphellandrène	1523	1787	0.7	-
39	1,5-époxy-salvial-4(14)-ene	1560	-	-	0.8
40	acide dodécanoïque	1567	-	-	1.1
41	spathulénol	1577	2129	0.6	12.2
42	oxyde de caryophyllène	1582	1987	38.5	8.0
43	vidiflorol	1590	-	-	3.8
44	widdrol	1599	-	-	2.9
45	salvial-4-(14)-en-1-one	1595	2013	1.1	-
46	<i>n</i> -hexadecane	1600		2.3	-
47	<i>épi</i> -cedrol	1616	-	-	3.7
48	caryophylla-4-(14),8(15)-dien-5 α -ol	1641	1940	2.1	1.1
49	<i>epoxy- allo</i> alloaromadendrene	1641	-	-	4.2
50	β -eudesmol	1649	-	-	10.1
51	vulgarol B	1650	-	-	1.3
52	α -cadinol	1650	2236	0.7	-
53	(<i>Z</i>)- α -santalol	1677	-	2.2	-
54	(2 <i>Z</i> , 2 <i>E</i>)-farnésol	1701	-	-	3.9
55	pentadécanal	1712	-	-	2.0
56	(2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i>)-farnesol	1740	2183	0.4	-
57	hexadécanal	1816	-	0.5	1.1
58	6,10,14-triméthyle pentadecan-2-one	1845	-	1.8	12.9
59	<i>n</i> -nonadecane	1900		0.1	-
60	(<i>E</i> , <i>E</i>)-farnésyle acétone	1918	2287	0.4	1.8
61	acide hexadécanoïque	1978	2173	1.5	-
62	<i>n</i> -eicosane	2000		0.2	-
63	heneicosane	2100		8.6	0.5
64	docosane	2200		-	0.6
65	tricosane	2300		-	2.4
66	tetracosane	2400		-	0.6
67	pentacosane	2500		1.0	0.9
68	heptacosane	2700		0.8	1.1
69	nonacosane	2900		-	0.5
Total				93.6	82.4

- Les composés sont présentés par ordre d'éluion dans la colonne HP-5MS.

- RI (indices de Kováts) calculés en comparant les temps de rétention des substances avec ceux des étalons C₉-C₂₄ *n*-alkanes dans les colonnes capillaires: HP 5MS (RI¹) et HP Innowax (RI²), respectivement.

Tableau 73: Distribution des groupes chimiques de l'huile essentielle de *Centaurea pullata* (1) et de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii* (2)

Composés	Surface du pic (%)	
	1	2
Hydrocarbures		
<i>(a) Alcanes, alcènes</i>		
1-tridécène	0.2	-
<i>n</i> -tetradécane	0.4	-
pentadécane	2.5	-
<i>n</i> -hexadécane	2.3	-
<i>n</i> -nonadécane	0.1	-
<i>n</i> -eicosane	0.2	-
heneicosane	8.6	0.5
docosane	-	0.6
tricosane	-	2.4
tetracosane	-	0.6
pentacosane	1.0	0.9
heptacosane	0.8	0.5
nonacosane	-	0.5
Total	16.1	6.0
<i>(b) Alcools</i>		
1-octen-3-ol	0.3	-
<i>n</i> -octanol	0.3	-
nonyl alcohol	0.2	-
(2 <i>Z</i> , 2 <i>E</i>)-farnésol	-	3.9
(2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i>)-farnésol	0.4	-
Total	1.2	3.9
<i>(c) Aldéhydes</i>		
heptenal	0.1	-
benzaldéhyde	5.0	-
<i>n</i> -octanal	0.4	-
benzène acétaldéhyde	2.5	-
<i>n</i> -nonanal	3.7	-
2, 6 nonadiénal	0.1	-
décanal	2.7	-
2 <i>E</i> -décenal	0.1	-
(2 <i>E</i> , 4 <i>Z</i>)-décadienal	0.3	-
undécanal	0.1	-
(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)-décadienal	0.5	-
2- methyl undécanal	0.3	-
tridécanal	-	0.9
pentadécanal	0.5	2.0
hexadécanal	-	1.1
Total	16.3	4.0
<i>(d) cétones</i>		
géranyle acétone	0.7	-
6,10,14-triméthyle pentadécane-2-one	1.8	12.9
(<i>E</i> , <i>E</i>)-farnésyle acétone	0.4	1.8
Total	2.9	14.7
Phényl propanoïdes		

acide benzène acétique, éthyle ester	0.1	-
eugénol	0.9	-
Total	1.0	0.0
Terpénoïdes		
<i>(a) Hydrocarbures sesquiterpéniques</i>		
α -copaène	0.2	-
β -cubébène	0.5	-
β -caryophyllène	2.5	-
α -humulène	0.3	-
gérmacrène D	0.3	-
β -bisabolène	0.2	-
γ -cadinène	0.8	-
δ -cadinène	0.1	-
β -sesquiphellandrène	0.7	-
Total	5.6	0.0
<i>(b) Monoterpènes oxygénés</i>		
linalool	0.2	-
camphre	0.1	-
α -terpinéol	0.2	-
safranal	0.5	-
pulégone	0.4	-
carvacrol	-	1.2
1,5-époxy-salvial-4(14)-ène	-	0.8
Total	1.4	2.0
<i>(c) Sesquiterpènes oxygénés</i>		
spathuléol	0.6	12.2
oxyde de caryophyllène	38.5	8.0
vidiflrol	-	3.8
salvial-4-(14)-en-1-one	1.1	-
widdrol	-	2.9
<i>épi</i> -cedrol	-	3.7
caryophylla-4-(14),8(15)-dien-5 α -ol	2.1	1.1
<i>epoxy- allo</i> -alloaromadendrène	-	4.2
β -eudésmol	-	10.1
α -cadinol	0.7	-
vulgarol B	-	1.3
<i>Z</i> - α -santalol	2.2	-
Total	45.2	47.3
Composés avec C-13		
<i>(E)</i> - β -ionone	2.4	2.8
Total	2.4	2.8
Acides gras		
acide dodécanoïque	-	1.1
acide hexadécanoïque	1.5	-
Total	1.5	1.1

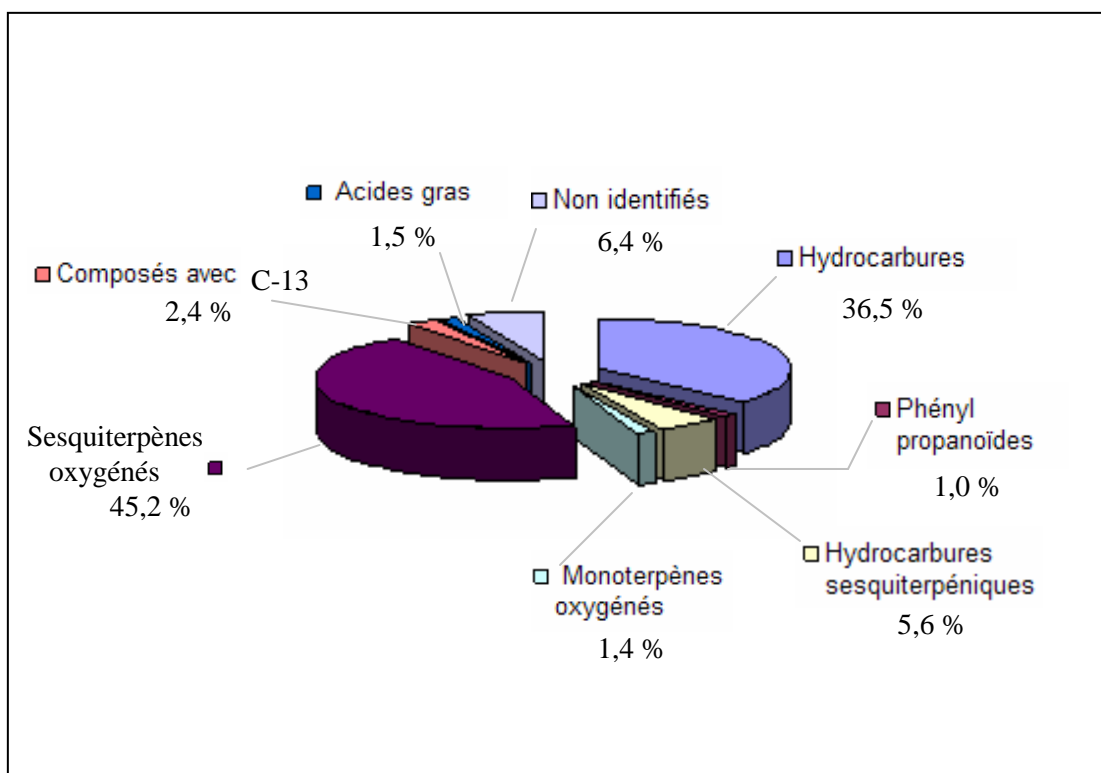


Figure 116 : Groupes chimiques des composés de l'huile essentielle de *C. pullata*

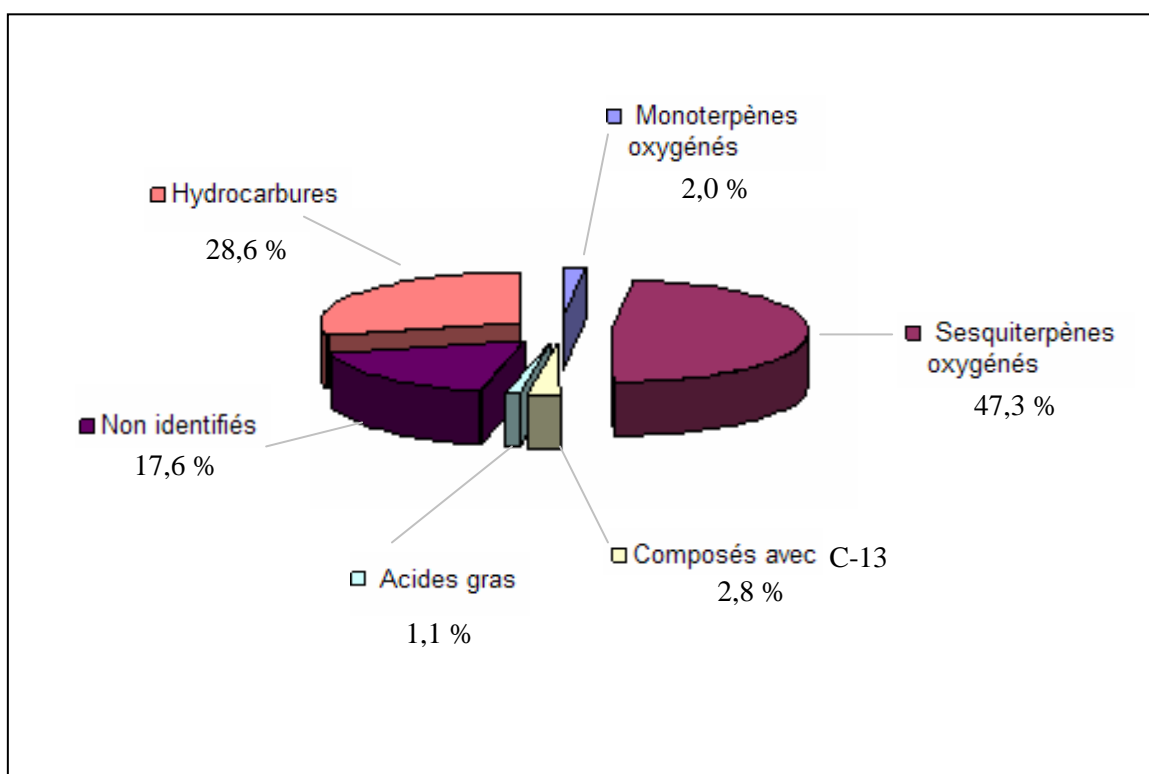


Figure 117 : Groupes chimiques des composés de l'huile essentielle de *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*

III.3. Résultats biologiques

III.3.1. Activité antimicrobienne

III.3.1.1. Sesquiterpènes lactones

Selon les résultats obtenus (**Tableau 74**), les sesquiterpènes lactones investiguées ont possédé une activité antimicrobienne plus élevée par rapport au contrôle testé Stréptomycine. Parmi eux, les gérmanolides **1-4** ont été les plus actifs avec des valeurs de CMI entre 0.20-0.40 µg/ml et CMB entre 0.20-0.50 µg/ml, les bactéries *B. subtilis* et *P. tolaasii* ont été les plus sensibles à ces composés, alors que *S. enteritidis* et *S. epidermidis* ont été les plus résistantes.

L'élémanolide **5** a présenté une activité modérée par rapport à celle du Stréptomycine avec des CMI entre 0.40-0.60 µg/ml et des CMB= 0.60 µg/ml, *B. subtilis* a été la bactérie la plus sensible alors que *M. flavus* a été la plus résistante.

L'eudesmanolides **7-10** ont présentés des activités contre les différentes bactéries testées avec des MIC entre 0.10-0.40 µg/ml et des CMB entre 0.15-0.50 µg/ml. *B. subtilis* et *S. enteritidis* ont été les plus sensibles, alors que *P. tolaasii* et *S. epidermidis* ont été les plus résistantes.

L'ampiciline utilisé comme contrôle avec des CMI entre 0.10-0.30 µg/ml, et des CMB entre 0.15-0.50 µg/ml, a montré une activité antimicrobienne modérée par rapport aux composés testés.

D'une manière générale les résultats obtenus confirment l'hypothèse d'une relation inverse entre la polarité et l'activité antimicrobienne chez les sesquiterpène lactones (Inoue et al., 1995; Barrero et al., 2000). Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus par Karioti et al., (2002), Saroglou et al. (2005) et Skaltsa et al. (2000a,b) sur des structures similaires de sesquiterpènes lactones.

Selon leurs temps de rétentions dans la colonne RP-18, leurs polarités diminuent en ordre d'élution eudesmanolides > élémanolides > gérmanolides. Alors, il semble que les gérmanolides étant plus lipophiles obtiennent un degré supérieur de perméabilité à travers les membranes des microorganismes.

Il semble également que la présence d'un groupe α -méthyl- γ lactone au lieu d'un groupe α -méthylène- γ lactone induit une légère diminution de l'activité antimicrobienne (Skaltsa et al. 2000a; id. 2000b).

Tableau 74 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des composés 1-5, 7-10. (CMI/CMB, $\mu\text{g/ml}$).

Bactéries	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB	CMI CMB
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	Strépto mycine	Ampicil ine	
<i>B. subtilis</i>	0.20 0.30	0.20 0.20	0.20 0.20	0.20 0.30	0.40 0.60	0.10 0.15	0.20 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.50 0.50	0.10 0.15	
<i>M. flavus</i>	0.30 0.30	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.30	0.60 0.60	0.15 0.20	0.20 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.50 1.00	0.10 0.15	
<i>S. epidermidis</i>	0.40 0.50	0.40 0.40	0.40 0.40	0.40 0.50	0.60 0.60	0.20 0.30	0.30 0.40	0.40 0.50	0.40 0.50	1.00 1.00	0.10 0.15	
<i>S. enteritidis</i>	0.30 0.40	0.30 0.30	0.30 0.30	0.30 0.30	0.60 0.60	0.10 0.15	0.20 0.30	0.40 0.40	0.40 0.40	1.00 1.00	0.15 0.20	
<i>E. coli</i>	0.40 0.50	0.20 0.30	0.20 0.20	0.30 0.30	0.60 0.60	0.15 0.20	0.30 0.40	0.40 0.40	0.40 0.40	0.50 1.00	0.15 0.30	
<i>P. tolaasii</i>	0.20 0.20	0.20 0.30	0.30 0.30	0.20 0.30	0.60 0.60	0.20 0.30	0.20 0.20	0.20 0.30	0.40 0.50	1.00 2.00	0.30 0.50	

Les résultats de l'activité antifongique sont présentés dans le **Tableau 75**. Les différents sesquiterpènes testés ont présenté des activités antifongiques meilleures que celle du contrôle Miconazole CMI entre 0.20-2.00 $\mu\text{g/ml}$ et CMF entre 1.00-5.00 $\mu\text{g/ml}$.

Le contrôle Bifonazole a montré plus forte que celles des substances testées, avec des CMI et CMF entre 0.10-0.20 $\mu\text{g/ml}$ et 0.10-0.25 $\mu\text{g/ml}$.

A. flavus a été le champignon moyennement sensible, alors que le reste des champignons testés ont été résistants contre les 9 sesquiterpènes lactones testées.

Tableau 75 : Concentrations minimales inhibitrices et fongicides (CMI/CMF, µg/ml) des composés **1-5, 7-10**.

	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF	CMI CMF
Champignons	1	2	3	4	5	7	8	9	10	Miconazole	Bifonazole
<i>A. flavus</i>	0.10 0.20	0.10 0.20	0.10 0.20	0.20 0.20	0.20 0.20	0.05 0.10	0.10 0.10	0.20 0.30	0.20 0.30	0.50 2.00	0.15 0.20
<i>A. niger</i>	0.20 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.20	0.15 0.15	0.10 0.10	0.20 0.30	0.20 0.30	1.50 4.00	0.15 0.20
<i>A. ochraceus</i>	0.20 0.20	0.10 0.20	0.10 0.20	0.10 0.20	0.20 0.20	0.10 0.10	0.10 0.10	0.20 0.30	0.20 0.30	1.50 4.00	0.15 0.15
<i>A. alternata</i>	0.20 0.20	0.10 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.20	0.05 0.05	0.10 0.10	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 1.00	0.10 0.10
<i>F. tricinctum</i>	0.20 0.20	0.10 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.20	0.05 0.10	0.10 0.10	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 1.00	0.10 0.10
<i>P. funiculosum</i>	0.20 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.20	0.10 0.15	0.20 0.20	0.30 0.40	0.30 0.40	2.00 5.00	0.15 0.20
<i>P. ochrachloron</i>	0.20 0.20	0.10 0.20	0.10 0.20	0.10 0.20	0.20 0.20	0.10 0.10	0.20 0.10	0.30 0.40	0.30 0.40	2.00 5.00	0.15 0.20
<i>T. viride</i>	0.10 0.20	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.30	0.20 0.10	0.10 0.10	0.20 0.20	0.40 0.50	0.30 0.40	2.00 2.00	0.20 0.25

III.3.1.2. Huiles essentielles

Les valeurs enregistrées par la méthode de microdilution concernant les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles de *C. pullata* et *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* sont présentées dans les **Tableaux 76**.

L'huile essentielle de *C. pullata* possédait les mêmes valeurs de CMI contre les bactéries Gram-positif *M. flavus* et *B. subtilis* (0.2 µg/ml). Cette valeur est révélatrice de la faible activité de l'huile contre ces microorganismes comparée à la valeur du Streptomycine (0.0005µg/ml).

Alors que les valeurs de la CMI chez les bactéries Gram-positif *S. enteritidis* et *S. epidermidis* (0.3µg/ml et 0.4 µg/ml), respectivement sont équivalentes à celles des bactéries Gram-négatif *P. tolaasii* et *E. coli*, ces valeurs sont 300 & 400 fois plus grandes que celle du contrôle.

La même remarque peut être exprimé pour les valeurs des CMI et des CMB à l'exception de l'action de l'huile essentielle contre *E. coli* (0.5µg/ml).

D'une manière générale cette huile possède une faible activité microbienne vis-à-vis des différentes bactéries utilisées dans ce test. En comparaison avec les résultats de Bülent

Köse et des collaborateurs (2007) obtenus sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. aladagensis* dont le composé majoritaire est l'oxyde de caryophyllène, cette huile possède une activité proche ce celle de *C. pullata* ceci est expliqué par la présence d'un composé majoritaire commun.

L'huile essentielle de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* a montré une bonne activité antimicrobienne contre toutes les espèces bactériennes. Les CMI sont entre 0.10-0.20 µg/ml, alors que les CMB sont comprises entre 0.10-0.30 µg/ml. *B. subtilis* a montré la plus grande sensibilité à cette huile.

P. tolaasii a été la bactérie la plus résistante à l'huile avec des valeurs de CMI et CMB entre 0.20-0.30 µg/ml.

L'ampicilin utilisé comme contrôle a montré une faible activité par rapport à celle de l'huile, avec des valeurs de CMI et CMB entre 0.10-0.30 µg/ml et 0.15-0.50 µg/ml respectivement. Cette huile a montré une meilleure activité antimicrobienne que l'ampicilin contre : *B. subtilis*, *P. tolaasii* et *S. enteritidis*.

Tableau 76 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles de *C. pullata* (1) & *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* (2) (CMI/CMB, µg/ml).

Bactéries	CMI	CMI	CMI	CMI
	CMB	CMB	CMB	CMB
	1	2	Streptomycine	Ampiciline
<i>Bacillus subtilis</i>	0.2	0.10	0.0005	0.10
	0.2	0.10	0.0005	0.15
<i>Micrococcus flavus</i>	0.2	0.10	0.0005	0.10
	0.2	0.15	0.001	0.15
<i>Salmonella. enteritidis</i>	0.3	0.10	0.0005	0.15
	0.3	0.20	0.001	0.30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.4	0.10	0.001	0.10
	0.5	0.20	0.001	0.15
<i>Escherichia coli</i>	0.4	0.15	0.001	0.15
	0.5	0.20	0.001	0.20
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0.3	0.20	0.001	0.30
	0.3	0.30	0.002	0.50

Selon le **Tableau 77** les valeurs des concentrations minimales inhibitrices et fongicides de l'huile essentielle de *C. pullata* ont été identiques (0.3µg/ml). Cette valeur comparée aux valeurs du contrôle, nous a montré que l'huile avait une forte action contre *P. funiculosum* et *T. viride*, une action moyenne contre *A. flavus* et une action très faible contre *A. alternata* et *F. tricinctum*

Toutes les espèces fongiques ont été sensibles à l'huile de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii*, avec des valeurs de CMI entre 0.05-0.10 µg/ml, et CMF entre 0.10-0.20 µg/ml.

Par rapport au contrôle Bifonazole *A. alternata* et *F. tricinctum* ont été les plus sensibles à l'action de l'huile, alors que les espèces du genre *Penicillium* ont été les plus résistantes. Bifonazole a montré une faible activité antifongique par rapport à l'huile, avec CMI entre 0.10-0.20 µg/ml et CMF entre 0.10-0.25 µg/ml.

Tableau 77 : Concentrations minimales inhibitrices et fongicides (CMI/CMF, µg/ml) des huiles essentielles de *C. pullata* (1) & *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* (2)

Champignons	CMI	CMI	CMI	CMI
	CMB	CMB	CMB	CMB
	1	2	Miconazole	Bifonazole
<i>Aspergillus flavus</i>	0.3	0.10	0.0005	0.15
	0.3	0.15	0.002	0.20
<i>Aspergillus niger</i>	0.3	0.10	0.0015	0.15
	0.3	0.15	0.004	0.20
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.3	0.10	0.0015	0.15
	0.3	0.15	0.004	0.15
<i>Alternaria alternata</i>	0.2	0.05	0.0002	0.10
	0.3	0.10	0.001	0.10
<i>Fusarium tricinctum</i>	0.3	0.05	0.0002	0.10
	0.3	0.10	0.001	0.10
<i>Penicillium funiculosum</i>	0.3	0.10	0.002	0.15
	0.3	0.20	0.005	0.20
<i>Penicillium ochrochloron</i>	0.3	0.10	0.002	0.15
	0.3	0.20	0.005	0.20
<i>Trichoderma viride</i>	0.3	0.10	0.002	0.20
	0.3	0.10	0.005	0.25

III.3.2. Activités cytotoxique/cytostatique

Les composés **1-10** ont été évalués pour leur activité cytotoxique/cytostatique contre 5 lignées de cellules cancéreuses. Parmi eux, seuls les composés **5** et **2** sont actifs en ordre décroissant d'activité. Les résultats sont présentés au **Tableau 78**.

Selon Scotti et *al.*, 2007, la différence de l'activité cytotoxique chez les sesquiterpènes lactones est expliquée par la variation du nombre des éléments d'alkylations. Toute fois d'autres facteurs tel la lipophilie, la stéréochimie de la molécule ainsi que l'environnement chimique peuvent également influencer cette activité.

Le composé **5** est un élémanolide, le résultat obtenu est en accord avec des travaux antérieurs sur les même lignées cancéreuses où les élémanolides ont été prouvés les plus actifs (Koukoulitsa et *al.*, 2002; Saraglou et *al.*, 2005). Il semble que la conformation du squelette central est importante (Kupchan et *al.*, 1970), les élémanolides étant les plus flexibles ils ont été les plus actifs, suivis des gérmanolides, tandis que les eudesmanolides ayant un anneau

central rigide ont été prouvés toujours inactifs. De plus, l'ouverture de l'anneau lactonique induit la diminution de l'activité (Koukoulitsa et *al.*, 2002). L'étude présente nous amène à conclure que la présence de l'anneau lactonique est indispensable pour l'activité cytotoxique des sesquiterpène lactones, même au cas où le groupe α -méthylène γ -lactone est remplacé par le groupe α -méthyle γ -lactone.

Tableau 78 : Activité cytotoxique des composés actifs **2** et **5** vis-à-vis des lignés cancéreuses.

	2			5			5-FU		
	<i>GI50</i>	<i>TGI</i>	<i>LG50</i>	<i>GI50</i>	<i>TGI</i>	<i>LG50</i>	<i>GI50</i>	<i>TGI</i>	<i>LC50</i>
NCI-H460	*	*	*	66.9	*	*	1.0	50.0	*
MCF7	51.8	*	*	33.9	63.8	93.8	2.0	31.0	*
SF268	*	*	*	40.3	81.1	*	50.0	*	*
DLD1	*	*	*	*	*	*	-	-	-
OVCAR3	*	*	*	*	*	*	-	-	-

* Non actif aux concentrations >100 μ M

- Non étudié

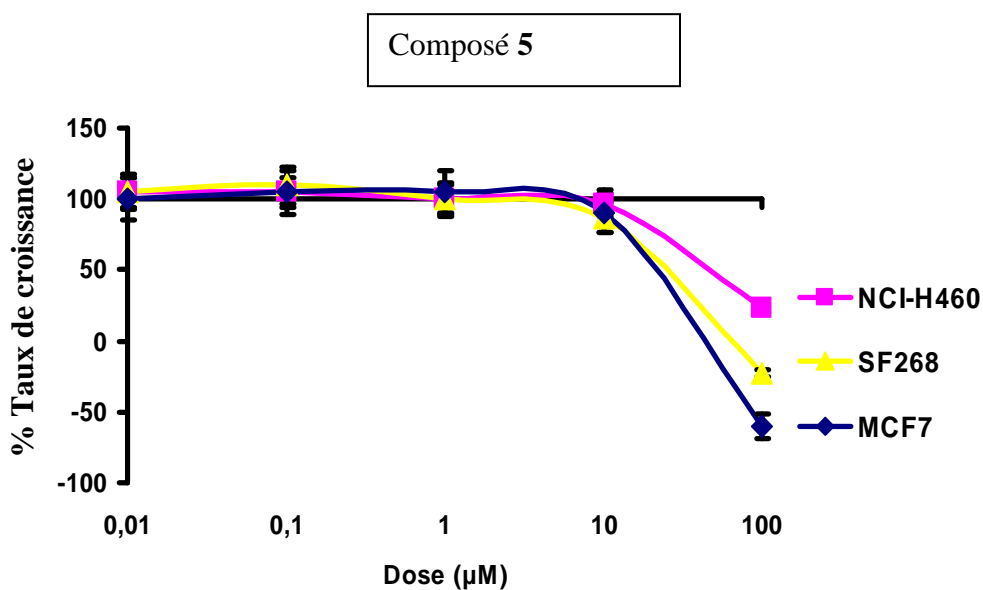
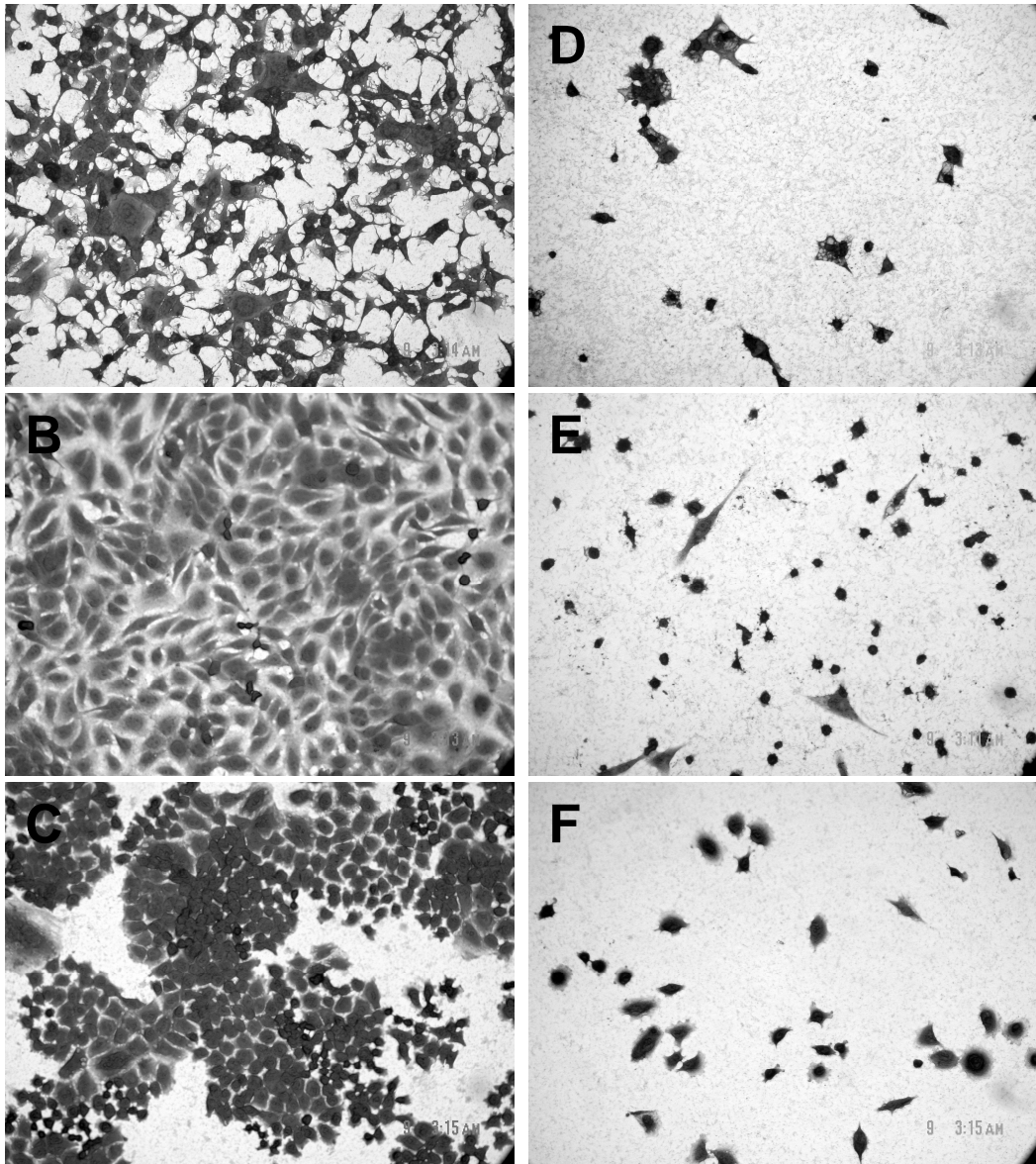


Figure 118. Action de 5 différentes doses du composé **5** contre les lignés cancéreuses MCF7, SF268 et NCI-H460.



A-C: Cellules non traitées.

D-F: Cellules traitées avec 100µM du composé **5** durant 48h colorées avec SRB à la fin de l'incubation.

Figure 119. Réponse des cellules MCF7 (A et D), SF268 (B et E) et NCI-H460 (C et F) traitées avec le composé **5**.