

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° D'ordre :95/D3C/2019
Série :15/Ch/2019

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle
(LMD)**

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

**Option : Analyse Physicochimique, contrôle de qualité et Synthèse de
Substances Bioactives**

Intitulé

**Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires
et évaluation de l'activité biologique d'une espèce de la famille
Scrophulariaceae : *Linaria scariosa* Desf.**

Par :

M^{elle} AHMED CHAOUCH Meroua

Devant le jury :

Pr. Ramdane SEGHIRI	Université frères Mentouri, Constantine 1	Rapporteur
Pr. Ratiba MEKKIOU	Université frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Pr. Ouahiba BOUMAZA	Université frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. Mabrouk BELGHOSI	Université, Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examinateur
MCA. Sabrina BICHA	Université frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice

15 Octobre 2019

Remerciements

Pour commencer, je remercie dieu, le grand miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail.

Le travail faisant l'objet de cette thèse a été réalisé à l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes université Frères Mentouri Constantine 1, sous les orientations de son directeur Professeur SEGHIRI Ramdane, à qui j'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance de m'avoir accueillie au sein de son équipe, l'inlassable soutien qu'il m'a accordée, la facilité de travail qu'il m'a procurée et les précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de mon travail.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de chimie pharmaceutique et toxicologique du département des sciences et des politiques de l'environnement, Université de Milan, Italie, sous la direction de monsieur le professeur BERETTA Giangiacomo. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, m'avoir faite confiance, m'avoir permise de réaliser ce travail dans de meilleures conditions et pour son aide précieuse durant mon stage.

J'exprime mes vifs remerciements à Madame le professeur MEKKIOU Ratiba de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'elle fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat.

Mes remerciements s'adressent également, à Madame le professeur BOUMAZA Ouahiba de l'université frères Mentouri Constantine1, madame BICHA Sabrina maître de conférence de l'université frères Mentouri Constantine1, et monsieur le professeur BELGHOSI Mabrouk de l'université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel, qui m'honorent en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Mes remerciements vont également au docteur BENSOUICI Chawki, directeur de recherche au Centre de recherche en biotechnologie CRBt, Constantine, pour son accueil et son aide afin de réaliser les essais biologiques.

Un remerciement particulier à monsieur CHERIET Thamere, Maître assistant chargé de cours à l'université Mohammed Boudiaf Département de chimie, Faculté des sciences

M'sila, pour le soutien qu'il m'a accordée. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.

Je tiens aussi à remercier Madame le professeur BENAYACHE Fadila, pour ses précieux conseils, son aide et pour sa gentillesse.

Je suis aussi très reconnaissante envers M^{elle} OUELBANI Rayene du Laboratoire de génétique biochimie et biotechnologie végétale, Département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, Université Frères Mentouri Constantine 1, pour la réalisation de l'activité antibactérienne et monsieur le Docteur SARRI Djamel du Département de biologie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, pour l'espèce étudiée qu'il m'a apportée et identifiée.

J'exprime mes sincères remerciements à madame le professeur MANCINI Ines, laboratoire de chimie bio-organique de la faculté de physique de Trento, Italie, pour l'enregistrement des spectres de masse.

J'adresse également mes remerciements à mon amie SEKHARA Ines qui a partagé le bien et le mal avec moi à l'étranger et je lui souhaite une bonne continuité dans ses études.

Je suis aussi très reconnaissante envers toute l'équipe de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (*VARENBIOMOL*) pour leur écoute et leur disponibilité.

Je remercie les ingénieurs : Hichem et Nawel pour leur aide, et leur disponibilité.

Je remercie également tous mes collègues : Imed, Halima, Ouassila, Hanane, Sarah Z, Sarah K, Selma, Ouissem, Wafa et Chema.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, en particulièrement ma mère et mon mari.

Dédicace

A ma chère maman Linda

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre patience et vos innombrables sacrifices. Que ce modeste travail, soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avez fait d'incroyable pour moi. Que le grand miséricordieux vous préserve et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler de joie et de bonheur.

A mon cher époux Abdellah que je remercie énormément pour son soutien le long de mon parcours d'étude et que le bon dieu le garde pour moi.

A mon père Moussa que le bon Dieu ait son âme et que ce travail soit un grand hommage en sa mémoire.

A ma très chère grand-mère : Ghania

A mon frère et mes sœurs : Skander, ma chère Sandrine, Kaouter, Amani et Lina.

A mes grandes sœurs et leurs enfants : Amel, Saousen, Naouel, CHourouk,

A mes amies et collègues

A tous ceux qui me sont chers.

Merci

Meroua

Liste des abréviations

CG/SM	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CLHP	chromatographie liquide haute performance
DAD	diode-array detector
UV	Ultra- Violet
RMN ¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN ¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone treize
COSY	COrelated SpectroscopY
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpcctroseopY
SM	Spectrométrie de Masse
R.Match	Reverse match
TR	temps de rétention
m/z	masse sur charge
EAG	équivalent d'acide gallique
EQ	équivalent de quercétine
λ	longueur d'onde
J	constante de couplage
Hz	Hertz
δ_H	déplacement chimique du proton
δ_C	déplacement chimique du carbone
DMSO-<i>d</i>₆	diméthylsulfoxyde deutéré
ppm	parties par million
s	singulet
d	doublet
dd	doublet de doublets
m	multiplet
IES	ionisation par électrospray
IE	ionisation par impact électronique
Glc	glucose

Na	sodium
Cl	chlore
M	masse moléculaire
Da	Dalton (unité de masse moléculaire)
CD₃OD	méthanol deutéré
CDCl₃	chloroforme deutéré
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
CI₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
µg	Micro-gramme
µL	Micro-litre
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DPPH	1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
BHA	ButylHydroxyAnisole
BHT	ButylHydroxyToluene
A₅₀	Absorbance à 50%
BChE	Butyrylcholinestérase
AChE	Acétylcholinestérase
DTNB	5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)
H₂O	eau distillée
EtOH	éthanol
MeOH	méthanol
AcOEt	acétate d'éthyle
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
CH₂Cl₂	dichlorométhane
CHCl₃	chloroforme
F	Fraction
LIC	extrait dichlorométhane de <i>Linaria scariosa</i>
LIA	extrait acétate d'éthyle de <i>Linaria scariosa</i>
LIN	extrait butanolique de <i>Linaria scariosa</i>
NT	non testé
PA	pas d'absorbance

Table des figures

Figure I.1 : Structure de l'Aureusine 47 et l'Hespéridine 48	16
Figure II.1 : Structure de quelques monoterpènes	25
Figure II.2 : Structure de quelques diterpènes	26
Figure II.3 : Structure du 2,3-époxy-squalène et du squalène.....	26
Figure II.4 : Structure de quelques triterpènes.....	27
Figure II.5 : Noyau perhydrocyclopentanophénanthrène	27
Figure II.6 : Structure du squelette iridane	28
Figure II.7 : Structure de l'iridodial.....	29
Figure II.8 : Structure de quelques iridoïdes glycosilés.....	29
Figure II.9 : Structure de quelques iridoïdes glycosylés.....	30
Figure II.10 : Structure de quelques iridoïdes glycosylés.....	30
Figure II.11 : Structure de quelques iridoïdes simples.....	31
Figure II.12 : Structure du β -Methoxygardendiol.....	31
Figure II.13 : Structure de base des séco-iridoïdes	32
Figure II.14 : Structure de quelques séco-iridoïdes	32
Figure II.15 : Structure de quelques bisiridoïdes	33
Figure II.16 : Structure de quelques bisiridoïdes	33
Figure II.17 : Structure du strycho-side et d'acerifolioside	34
Figure II.18 : Biosynthèse des iridoïdes	36
Figure II.19 : Biosynthèse d'aucubine et du catalpol	37
Figure II.20 : Quelques iridoïdes biologiquement actifs	39
Figure II.21 : Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes de composés phénoliques.....	42
Figure II.22 : Quelques exemples de composés phénoliques	44
Figure II.23 : Squelette de base des flavonoïdes.....	47
Figure II.24 : Les principales classes des flavonoïdes	47
Figure II.25 : Quelques exemples de flavonols et flavones	48
Figure II.26 : Structure de l'aromadendrine et la naringénine.....	49
Figure II.27 : Structure de la génistéine.....	49
Figure II.28 : Les différentes sous-classes d'isoflavonoïdes	50
Figure II.29 : Structure de la phloridzine.....	50
Figure II.30 : La biosynthétique de quelques flavonoïdes les plus connus.....	52
Figure II.31 : Les deux bandes d'adsorption dans les flavonoïdes	53
Figure III.1 : photo sur les parties aériennes de <i>Linaria scarisa</i> Desf.....	70
Figure III.2 : Protocole de l'extraction et de la préparation des extraits de <i>Linaria scariosa</i>	72

Figure III.3 : schéma générale pour les produits obtenus de l'extrait <i>n</i> -butanol	81
Figure III.4 : Protocole de l'activité antibactérienne des extraits.....	87
Figure IV.1 : Structure du composé LIA-6	105
Figure IV.2 : Comparaison du spectre de masse du composé LIA17 avec celui de l'aucubine	106
Figure IV.3 : Structure plane du composé LIA-17.....	118
Figure IV.4 : structure du composé LIA-17	119
Figure IV.5 : structure du composé LIA-22.....	125
Figure IV.6 : Comparaison des spectres de masse du composé LIA-22 et de la pectolarigénine présente dans la bibliothèque commerciale NIST.	125
Figure IV.7 : Structure partielle du composé LIN-1	130
Figure IV.8 : Structure plane du composé LIN-1.....	133
Figure IV.9 : structure du composé LIN-1	135
Figure IV.10 : Structure plane du composé LIN-4.....	144
Figure IV.11 : Structure du composé LIN-4	146
Figure IV.12 : Structure plane du composé LIN-2.....	155
Figure IV.13 : Structure du composé LIN-2	157
Figure IV.14 : Structure partielle du composé LIN-7	163
Figure IV.15 : Structure du composé LIN-7	171
Figure IV.16 : Structure partielle du composé LIN-9	178
Figure IV.17 : Structure du composé LIN-9	185
Figure IV.18 : Structure du composé LIN-10	198
Figure IV.19 : Structure du composé LIN-11	204
Figure IV.20 : zone d'inhibition de LIA contre <i>Morganella morganii</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	210

Table des tableaux

Tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre <i>Linaria</i>	7
Tableau I.2 : Tableau récapitulatif des flavonoïdes 42- 46.....	15
Tableau I.3 : Activés biologiques de quelques produits isolés du genre <i>Linaria</i>	18
Tableau II.1 : Classification des terpénoïdes	24
Tableau II.2 . Les principales classes de composés phénoliques.....	43
Tableau II.3 : Les principaux acides hydroxybenzoïques.....	45
Tableau II.4 . Les principaux acides hydroxycinnamiques.....	46
Tableau II.5 : Tableau récapitulatif des différents enzymes impliqué dans la biosynthèse.....	53
Tableau II.6 : Les principaux déplacements des bandes I et II dans le cas de flavone.....	55
Tableau III.1 : Résultats de la séparation par CLHP de l'extrait acétate d'éthyle de <i>L. scariosa</i>	75
Tableau III.2 : Résultats de la séparation sur colonne de gel de Silice de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. scariosa</i>	77
Tableau III.3 : Fractionnement de la fraction (F ₈) sur colonne de gel de silice.....	78
Tableau III.4 : Fractionnement de la fraction (F ₉) sur colonne de gel de silice.....	78
Tableau III.5 : Fractionnement de la fraction (F ₉₋₇) sur colonne de gel de silice.....	79
Tableau III.6 : Fractionnement de la fraction (F ₁₀) sur colonne de gel de silice.....	80
Tableau IV.1 : Composition chimique de l'extrait dichlorométhane de <i>L. scariosa</i>	94
Tableau IV.2 : Composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle de <i>L. scariosa</i>	94
Tableau IV.3 : Composition chimique de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. scariosa</i>	95
Tableau IV.4 : Les données RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé LIA-6.....	105
Tableau IV.5 : Les données spectroscopique du RMN ¹ H et ¹³ C du LIN-17	120
Tableau IV.6 : les données spectroscopique du RMN ¹ H et ¹³ C du LIN-1	136
Tableau IV.7 : les données spectroscopique RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé LIN-4 ...	145
Tableau IV.8 : les données spectroscopique RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé LIN-2 ...	156
Tableau IV.9 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	163
Tableau IV.10 : Les données relatives aux spectres RMN ¹ H et ¹³ C du composé LIN-7..	170
Tableau IV.11 : Les données spectroscopique d' l'UV du LIN-9	172
Tableau IV.12 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	179
Tableau IV.13 : Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé LIN-9	185
Tableau IV.14 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	192
Tableau IV.15 : Les données relatives aux spectres RMN ¹ H et ¹³ C du composé LIN-10	199
Tableau IV.16 : Les données relatives aux spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé LIN-11	205

Tableau IV. 17 : inhibition du DDPH et ABTS par les extraits de <i>L. scariosa</i>	207
Tableau IV. 18 : inhibition du CUPRAC et le pouvoir réducteur par les extraits de <i>L. scariosa</i>	207
Tableau IV.19 : Activité des extraits de <i>L. scariosa</i> sur les ions chélates.	208
Tableau IV.20 : valeurs des CI_{50} et $A_{0,50}$ pour chaque extrait et standard	208
Tableau IV.21 : Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de <i>L. scariosa</i>	209
Tableau IV.22 : Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de <i>L. scariosa</i>	209
Tableau IV.23 : L'activité antimicrobienne des extraits de <i>L. scariosa</i>	211
Tableau IV.24 : inhibition du DPPH, CUPRAC et ABTS du composé LIA-17	211
Tableau IV.25 : inhibition de l' α -glucosidase des composés LIA-17, LIN-9 et LIN-10..	212

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	3

CHAPITRE I : Le genre *Linaria*, synthèse bibliographique

I.1. Introduction	5
I.2. Description de la famille Scrophulariaceae.....	5
I.3. Description du genre <i>Linaria</i>	6
I.4. Les Métabolites secondaires les plus dominants dans le genre <i>Linaria</i>	6
I.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Linaria</i>	16
I.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle	16
I.5.2. Activités biologiques.....	17
I.5.3. I.5.3. Quelques activités biologiques reconnues pour les produits isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	18
Références bibliographiques.....	19

Chapitre II : Les métabolites secondaires

II.1. Introduction.....	23
II.2. Les terpénoïdes	24
II.2.1. Définition.....	24
II.2.2. Structure et classification des terpénoïdes	24
II.2.2.1. Monoterpènes.....	25
II.2.2.2. Diterpènes	25
II.2.2.3. Triterpènes et stéroïdes	26
II.2.2.4. Les iridoïdes	28
II.2.2.4.1. Définition.....	28
II.2.2.4.2. Classification des iridoïdes	29
II.2.2.4.3. La biosynthèse des iridoïdes.....	34
II.2.2.4.4. Activités biologique des iridoïdes.....	38
II.3. Les composés phénoliques.....	40
II.3.1. Définition.....	40
II.3.2. Origine biosynthétique.....	40
II.3.3. Classification	43
II.3.3.1. Les acides phénoliques	44
II.3.3.1.1. Définition.....	44
II.3.3.1.2. Les différents types d'acides phénoliques	45
II.3.3.2. Les flavonoïdes	46

II.3.3.2.1. Définition.....	46
II.3.3.2.2. Classification	47
II.3.3.2.3. Origine Biosynthétiques des flavonoïdes	51
II.3.3.2.4. Caractéristiques spectrophotométriques UV-visible des flavonoïdes.....	53
II.3.3.2.5. Propriétés des flavonoïdes	56
a. Les fonctions des flavonoïdes dans les plantes.....	56
b. Les activités biologiques des flavonoïdes	56
Références bibliographiques.....	58

Chapitre III : Travaux personnels

III.1. Introduction	69
III.2. Les critères de choix de notre matériel végétal	69
III.3. Classification dans la systématique botanique	69
III.4. Description botanique de <i>Linaria scariosa</i> Desf.	70
III.5. Protocole expérimental.....	70
III.5.1. Récolte du matériel végétal	70
III.5.2. Extraction.....	71
III.5.3. Etude phytochimique des extraits.....	73
III.5.3.1. Analyse des extraits par GC/MS	73
III.5.3.2 Détermination des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux	74
III.5.3.2.1. La teneur en polyphénols totaux.....	74
III.5.3.2.2. La teneur en flavonoïdes totaux.....	74
III.5.3.3. Séparation des composants de <i>L. scariosa</i>	75
III.5.3.3.1. Séparation des composants de l'extrait acétate d'éthyle de <i>L. scariosa</i>	75
III.5.3.3.2. Séparation des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. scariosa</i>	76
a. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	76
b. Etude des fractions de l'extrait <i>n</i> -butanol	77
III.5.4. Etude biologique des extraits.....	81
III.5.4.1. Activité antioxydante (<i>in vitro</i>)	81
III.5.4.1.1. mise en évidence de l'activité anti-radicalaire	81
a. Détermination de l'activité anti-radicalaire par piégeage du DDPH.....	82
b. Détermination de l'activité anti-radicalaire par piégeage de l'ABTS	82
III.5.4.1.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	83
III.5.4.1.3. Pouvoir réducteur.	83
III.5.4.1.4. Chélation des ions métalliques	84
III.5.4.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase (<i>in vitro</i>)	84
III.5.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	86
III.5.4.4. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase.....	87
Références bibliographiques.....	89

Chapitre IV : Résultats et Discussion

IV.1. Introduction	93
IV.2. Le profil GC-MS des trois extraits de <i>L. scariosa</i>	93
IV.3. La détermination des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux	95
IV.4. Elucidation structurale des composés isolés de <i>L. scariosa</i>	95
IV.4.1. Elucidation structurale du composé 1 (LIA-6).....	95
IV.4.2. Elucidation structurale du composé 2 (LIA-17).....	105
IV.4.3. Elucidation structurale du composé 3 (LIA-22).....	122
IV.4.4. Elucidation structurale du composé 4 (LIN-1).....	126
IV.4.5. Elucidation structurale du composé 5 (LIN-4).....	136
IV.4.6. Elucidation structurale du composé 6 (LIN-2).....	146
IV.4.7. Elucidation structurale du composé 7 (LIN-7).....	157
IV.4.8. Elucidation structurale du composé 8 (LIN-9).....	171
IV.4.9. Elucidation structurale du composé 9 (LIN-10).....	186
IV.4.10. Elucidation structurale du composé 10 (LIN-11).....	199
IV.5. Résultats des activités biologiques.....	205
IV.5.1. Activités biologiques des extraits de <i>L. scarisa</i>	205
IV.5.1.1. Activité antioxydante (<i>in vitro</i>).....	205
IV.5.1.2. Activité anti-cholinestérase (<i>in vitro</i>).....	209
IV.5.1.3. Activité antibactérienne (<i>in vitro</i>)	210
IV.5.2. Activités biologiques des nouveaux composés	211
IV.5.2.1. Activité antioxydante (<i>in vitro</i>) du composé LIA-17.....	211
IV.5.2.2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (<i>in vitro</i>) des composés LIA-17, LIN-9 et LIN-10	211
Références bibliographiques.....	213
Conclusion générale	215
Résumé	

Introduction générale

Pour des millénaires, les plantes médicinales ont toujours été employées par l'humanité sous diverses formes pour se soigner. Les laboratoires de chimie et de biologie ont focalisé leurs études vers la médecine traditionnelle en se penchant sur des voies et des moyens divers pour pouvoir défier de diverses pathologies en se basant sur une recherche phytochimique approfondie des plantes médicinales, dans le but est l'isolement et l'identification des substances naturelles biologiquement actives et la compréhension de leur mode d'action pour servir de principes actifs afin de prévenir et traiter divers problèmes de santé.

Il a été estimé qu'environ 120 composés actifs dérivés de plantes sont utilisés en médecine, comprenant environ 25% des médicaments prescrits dans le monde. En outre, et sur le total de 252 médicaments de la liste des médicaments essentiels de l'OMS, 11% sont exclusivement d'origine végétale [1].

De part, et vue sa situation géographique, l'Algérie possède une richesse floristique considérable et très diversifiée, estimée à environ 4000 espèces qui appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont plus de 300 plantes sont endémiques [2]. Ce potentiel de plantes médicinales fait que l'étude de la flore algérienne présente un intérêt scientifique important dans le domaine de la phytochimie et la pharmacologie. C'est ce qui nous a encouragés à entreprendre ce travail afin de rechercher des molécules potentiellement actives.

Dans ce cadre, et vu l'importance et la richesse de la famille Scrophulariaceae en métabolites secondaires, nous nous sommes intéressés à l'investigation phytochimique d'une espèce endémique du Sahara algérien appartenant à cette famille.

Cette thèse est consacrée à l'étude phytochimique et biologique d'une espèce du genre *Linaria* : *Linaria scariosa* Desf. (espèce endémique pour l'Algérie et la Tunisie et qui n'a jamais fait l'objet d'étude auparavant). Les travaux sont répartis en quatre chapitres :

- **CHAPITRE I** : consacré à une présentation botanique de la famille Scrophulariaceae et le genre *Linaria*, ainsi que les métabolites secondaires les plus connus et l'utilisation thérapeutique de ce genre.

- **CHAPITRE II :** décrit les principaux types de métabolites secondaires isolés des plantes du genre *Linaria*. Notamment : les monoterpénoïdes - en particulier les iridoïdes-, les diterpénoïdes, Les stéroïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes.

- **CHAPITRE III :** comprend l'étude phytochimique de *Linaria scariosa* Desf. depuis la macération jusqu'à l'obtention de composés purs, ainsi que les différents protocoles utilisés pour : le screening par GC/MS, la détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits et pour l'évaluation des activités biologiques des extraits et certains composés isolés.

- **CHAPITRE IV :** englobe l'identification structurale des produits isolés. Il comporte également les résultats et discussion de la GC/MS, de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux ainsi que des activités biologiques étudiées.

Référence bibliographique

[1] Sahoo N., Manchikanti P. and Dey S. Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia*. **2010**. 81:462-71.

[2] Yahi N., Vela E., Benhouhou S., De Belair G. and Gharzouli R. Identifying Important Plants Areas (Key Biodiversity Areas for Plants) in northern Algeria. *Jott communication*. **2012**. 4:2753-2765.

CHAPITRE I

**Le genre *Linaria*
synthèse
bibliographique**

I.1. Introduction

L'Algérie est parmi les pays les plus riches en matière de biodiversité en englobant plusieurs milliers d'espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dans deux régions différentes : méditerranéenne et saharienne. Cette richesse impose une investigation approfondie en termes de composition chimique dans le but d'isoler des substances naturelles possédant une activité biologique importante, cela facilite les recherches scientifiques évoluant dans le domaine de la phytothérapie, de la pharmacognosie et de l'investigation phytochimique.

Ce chapitre résume les métabolites secondaires les plus réputés dans le genre *Linaria* ainsi que ses propriétés biologiques et ses usages en médecine traditionnelle.

I.2. Description de la famille Scrophulariaceae

La famille Scrophulariaceae est une famille de plantes herbacées, plus rarement des arbustes ou des arbres [1].

Les feuilles sont simples, alternes ou opposées, sans stipule. Les fleurs sont généralement variées, hermaphrodites et irrégulières à corolle soudée au moins à la base à 4-5 lobes plans ou bilabiés. Les étamines sont au nombre de 2 à 5. Elles sont insérées sur le tube de la corolle. L'ovaire est supère à 2 carpelles soudés entre eux. Le fruit est une capsule, avec différents types de déhiscence ou, plus rarement, indéhiscent [2-3].

Elle comporte environ 3000 espèces réparties en 280 genres, rencontrées abondamment dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [4], notre travail concerne l'étude d'une espèce du genre *Linaria*.

I.3. Description du genre *Linaria*

Le genre *Linaria* appartient à la famille Scrophulariaceae [5] et comprend environ 200 espèces [6] distribuées largement dans L'hémisphère nord, principalement dans le bassin méditerranéen. Il est représenté par 39 espèces en Algérie [2]. Plantes herbacées, annuelles ou vivaces, à feuilles simples et étroites (souvent linéaires) d'où elles tirent leurs noms en évoquant celles du lin cultivé, elles sont directement attachés à la tige. Fleurs groupées en racèmes simples ou capituliformes, ou en racèmes de racèmes présentant ainsi une symétrie bilatérale. Calice à cinq lobes inégaux, souvent courts. Corolle bilabiée à tube renflé, à limbe en gueule, prolongée à la base par un éperon. Le fruit est une capsule polysperme à deux loges [2,6].

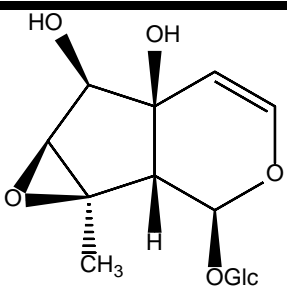
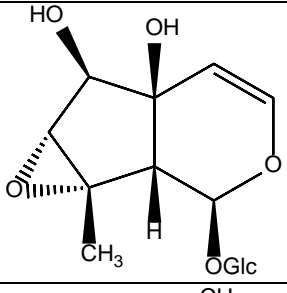
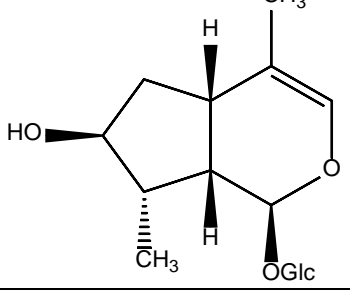
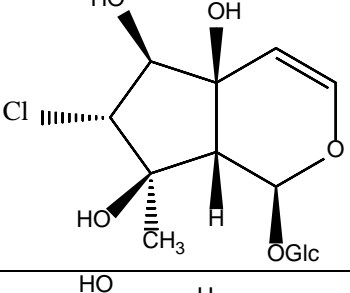
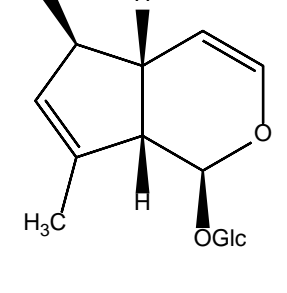
I.4. Les Métabolites secondaires les plus dominants dans le genre *Linaria*

Des travaux antérieurs sur 41 espèces du genre *Linaria* ont permis d'isoler et d'identifier 191 composés naturels tels que les iridoïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les diterpénoïdes et les stéroïdes [7].

Les terpénoïdes sont des composés très répandus dans le genre *Linaria*. La plupart d'entre eux sont des iridoïdes, l'Antirrhinoside **1** et ces dérivés sont les marqueurs chimiques pour les genres de la tribu Antirrhineae de la famille Scrophulariaceae. Les flavonoïdes sont présents à des niveaux significatifs dans le genre *Linaria*. Ils sont principalement identifiés comme étant des flavones, des flavonols et leurs dérivés hétérosides [7].

Quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Linaria* sont reportés dans le **Tableau I.1**.

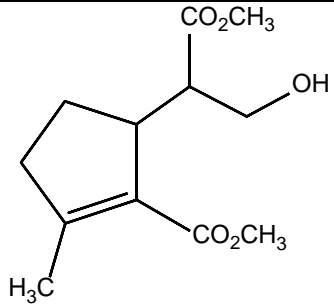
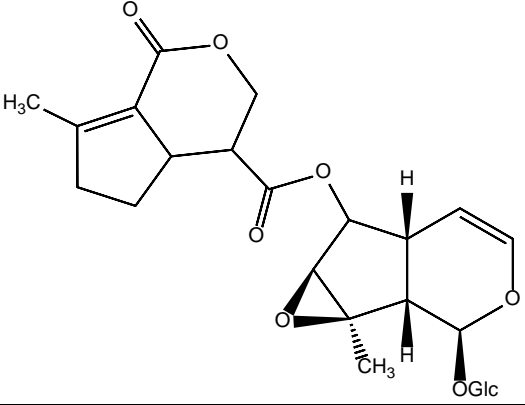
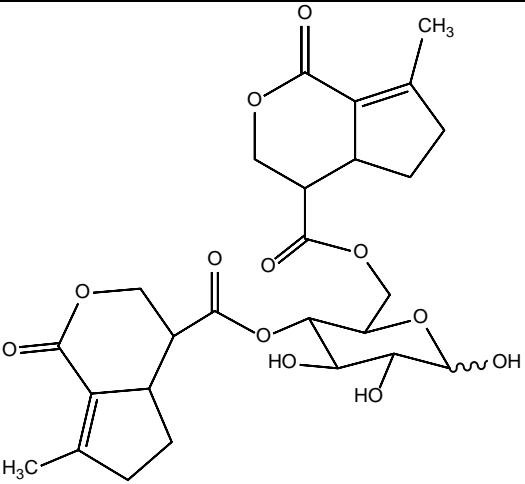
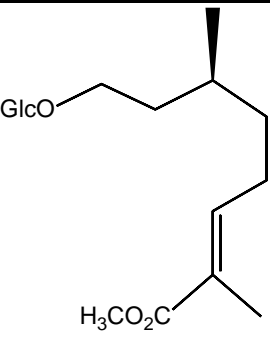
Tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

Espèces	Composés	Structures	Réf
Les iridoïdes			
<i>L. clementei</i>	Antirrhinoside <u>1</u>		[8]
<i>L. heterophylla</i>			[9]
<i>L. reflexa</i>			[10]
<i>L. japonica</i>			[11]
<i>L. genistifolia</i>			[12]
<i>L. capraria</i>			[13]
<i>L. vulgaris</i>		[14]	
<i>L. dalmatica</i>	7,8- <i>epi</i> -antirrhinoside <u>2</u>		[15]
<i>L. japonica</i>	7- β -hydroxy-8- <i>epi</i> -iridodial glucoside <u>3</u>		[11]
<i>L. genistifolia</i>	Linarioside <u>4</u>		[16]
<i>L. vulgaris</i>			[17]
<i>L. aegyptiaca</i>			[18]
<i>L. arcusangeli</i>			[19]
<i>L. flava</i>	Linaride <u>5</u>		[19]
<i>L. japonica</i>			[11]

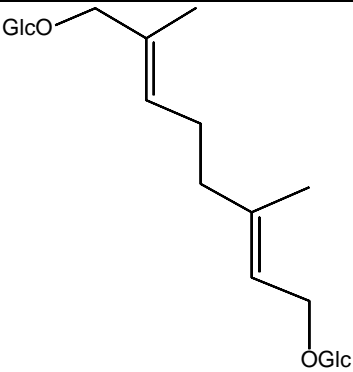
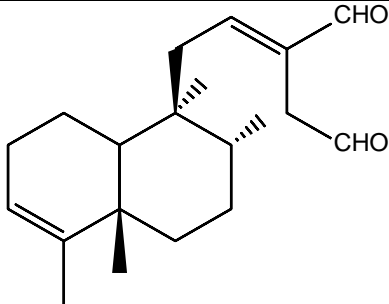
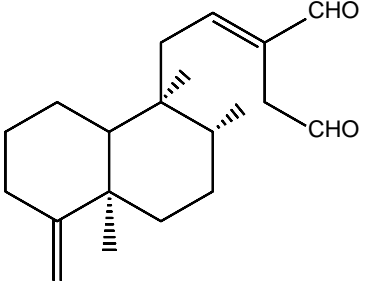
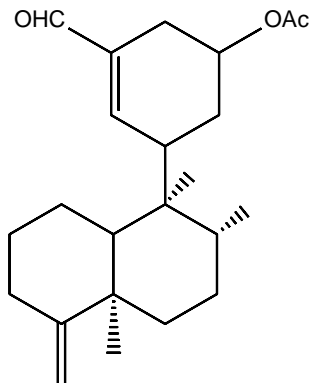
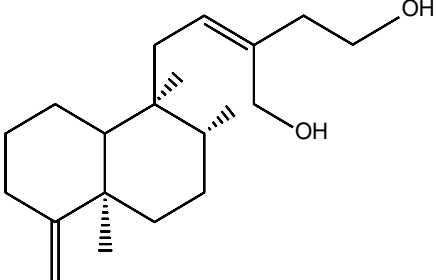
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

<i>L. purpurea</i>	Purpureoside <u>6</u>		[20]
<i>L. arcusangeli</i>	Antirrhide <u>7</u>		[19]
<i>L. japonica</i>			[11]
<i>L. purpurea</i>			[20]
<i>L. arcusangeli</i>			[21]
<i>L. multicaulis</i>			[22]
<i>L. genistifolia</i>	Genestifolioside <u>8</u>		[23]
<i>L. japonica</i>	Seco-linariocide <u>9</u>		[11]
	5-deoxyteuhircoside <u>10</u>		[11]

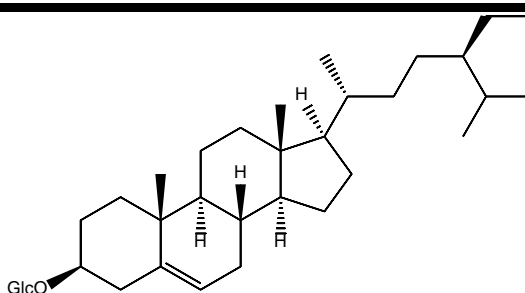
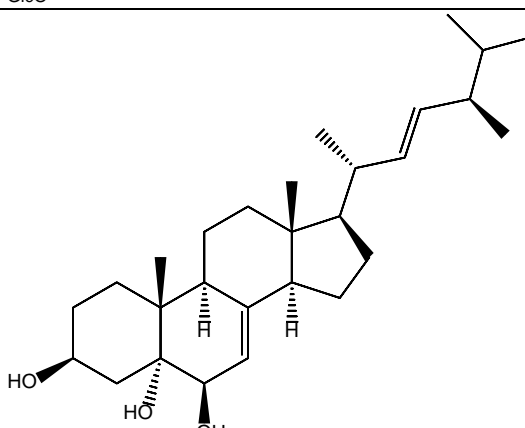
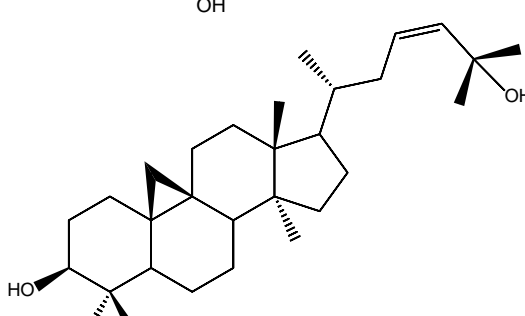
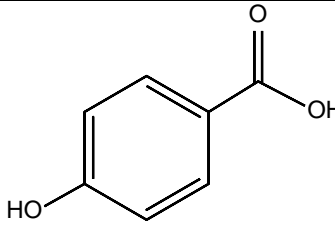
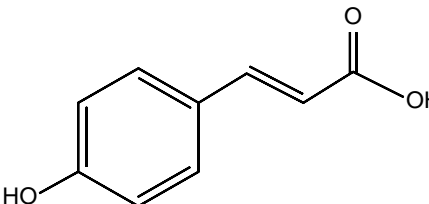
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

<i>L. japonica</i>	Acide 7-deoxyiridolactonique diméthyle ester 11		[24]
<i>L. japonica</i>	Iridolinarine C 12		[25]
<i>L. canadensis</i>	4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose 13		[26]
Les monoterpénoïdes acyclique			
<i>L. japonica</i>	8-O-glucosyl-méthoxy-6,7-dihydrofoliamenthoy 14		[13]

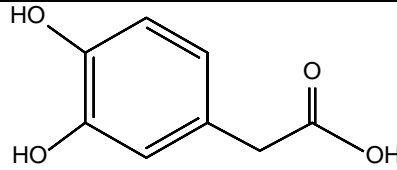
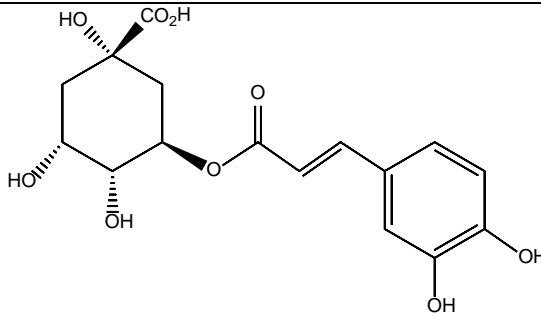
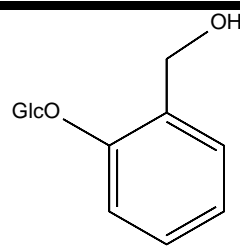
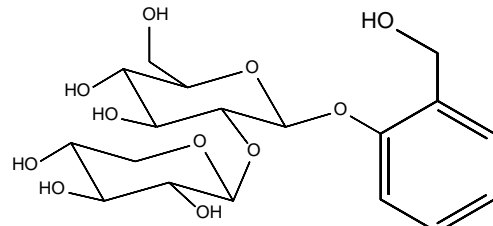
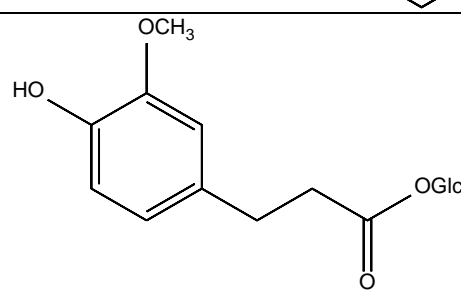
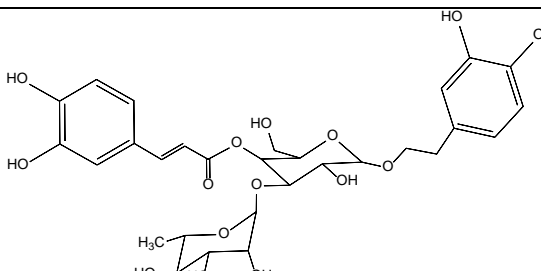
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

<i>L. capraria</i>	10-hydroxygeraniol diglucosylés 15		[27]
Les diterpénoïdes			
<i>L. japonica</i>	Linaridial 16		[28]
<i>L. saxatilis</i>	<i>E</i> -isolinaridial 17		[29]
	15-Acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12-dien-16-al 18		[30]
	Isolaridial 19		[30]

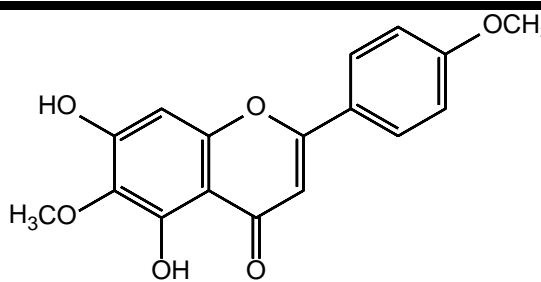
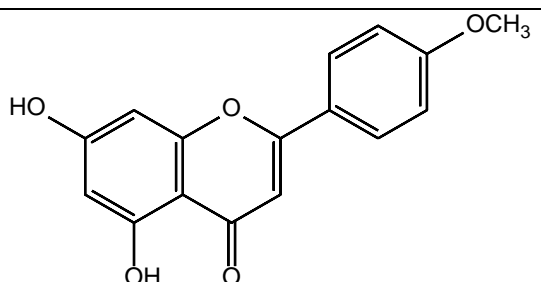
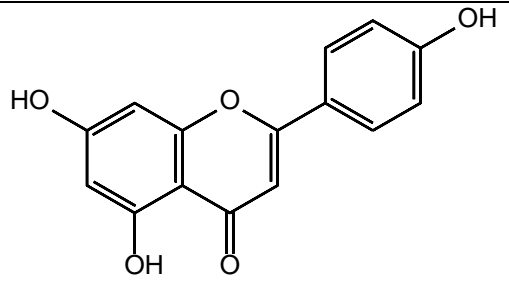
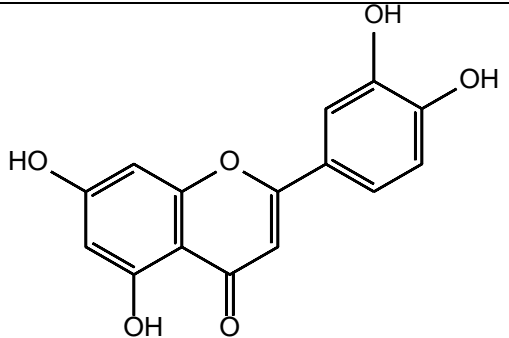
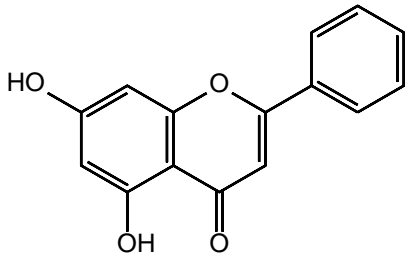
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

Les stéroïdes		
<i>L. reflexa</i>	Daucosterol <u>20</u>	 [10]
<i>L. vulgaris</i>	Ergosta-7,22-diene- 3 β ,5 α ,6 β -triol <u>21</u>	 [31]
	Cycloart-23-ene-3 β ,25- diol <u>22</u>	 [32]
Les acides phénoliques		
<i>L. vulgaris</i>	Acide <i>p</i> - hydroxybenzoïque <u>23</u>	 [33]
	Acide <i>p</i> -coumarique <u>24</u>	 [33]

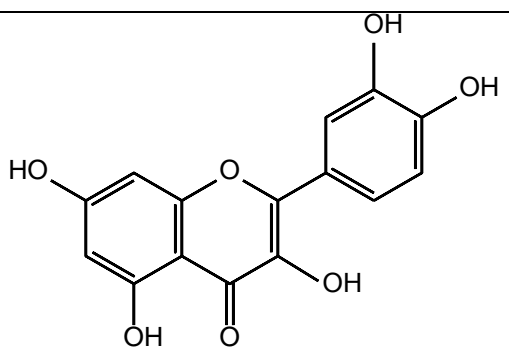
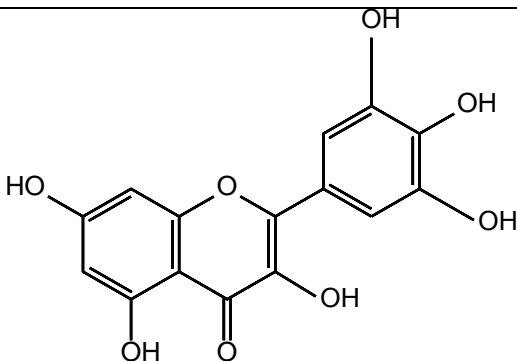
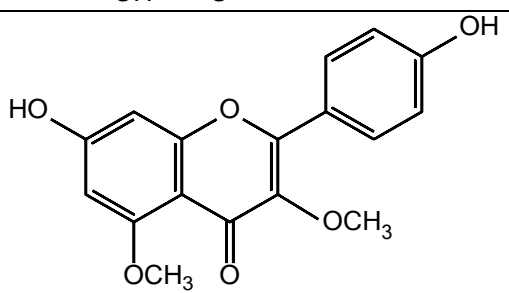
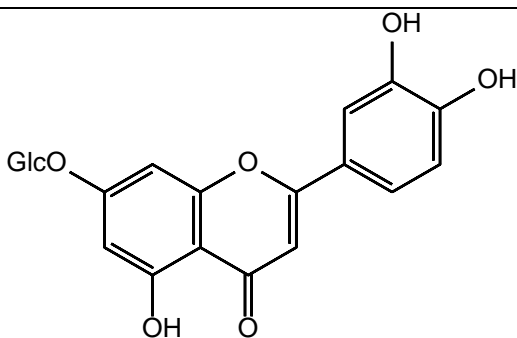
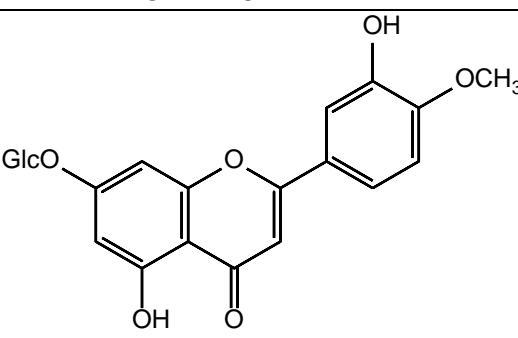
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

<i>L. vulgaris</i>	Homoprotocatechuique <u>25</u>		[33]
<i>L. macroura</i>	Acide chlorogénique <u>26</u>		[34]
Les composés phénoliques glycosilés			
<i>L. vulgaris</i>	Alcool benzylique <i>O</i> - β -D-glucopyranoside <u>27</u>		[17]
	Alcool benzylique β -D-(2'- <i>O</i> - β -xylopyranosyle)-glucopyranoside <u>28</u>		[17]
<i>L. japonica</i>	β -D-glucopyranose-1-féulate <u>29</u>		[11]
<i>L. haelava</i>	Verbascoside <u>30</u>		[35]

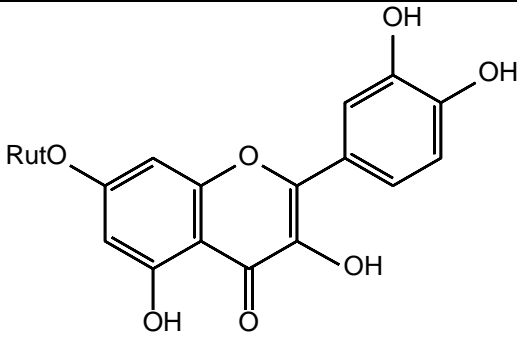
Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

		Les flavonoïdes	
<i>L. vulgaris</i> <i>L. reflexa</i>	Pectolinarigenine <u>31</u>		[36] [4]
<i>L. vulgaris</i> <i>L. aeruginea</i> <i>L. macroura</i>	Acacétine <u>32</u>		[36] [37] [38]
<i>L. macroura</i> <i>L. Canadensis</i> <i>L. reflexa</i>	Apigénine <u>33</u>		[34] [26] [4]
<i>L. Canadensis</i> <i>L. vulgaris</i> <i>L. macroura</i>	Lutéoline <u>34</u>		[26] [36] [34]
<i>L. vulgaris</i>	Chryisine <u>35</u>		[17]

Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

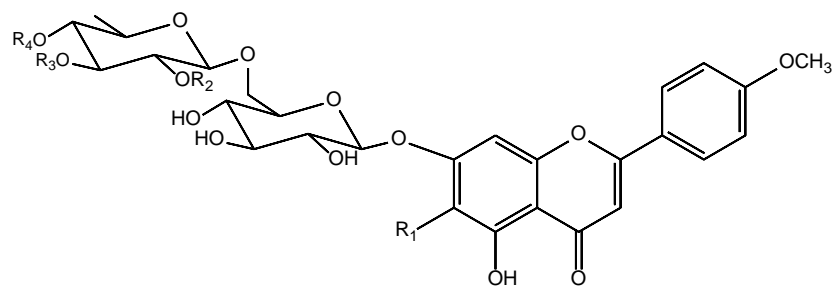
<i>L. macroura</i> <i>L. vulgaris</i>	Quercétine 36		[34] [38]
<i>L. macroura</i>	Myricétine 37		[34]
<i>L. dalmatica</i>	3,5-di- <i>O</i> -méthyle kaempférol 38		[39]
<i>L. canadensis</i> <i>L. macroura</i>	Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside 39		[26] [34]
<i>L. macroura</i>	Diosmétine-7- <i>O</i> -β-D- glucoside 40		[34]

Suite tableau I.1 : Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Linaria*

<i>L. canadensis</i>	Quercétine-7- <i>O</i> -rutinoside 41		[26]
			
<i>L. haelava</i>	Pectolarine 42	Tableau I.3	[35]
<i>L. kurdica</i>			[40]
<i>L. vulgaris</i>			[36]
<i>L. vulgariformis</i>			[40]
<i>L. reflexa</i>			[10]
<i>L. simplex</i>			[15]
<i>L. vulgaris</i>	Linarine 43	Tableau I.3	[41]
<i>L. kurdica</i>			[42]
<i>L. japonica</i>			[43]
<i>L. haelava</i>			[15]
<i>L. japonica</i>	Linariine 44	Tableau I.3	[43]
<i>L. reflexa</i>			[10]
<i>L. aucheri</i>			[44]
<i>L. kurdica</i>			[42]
<i>L. japonica</i>	Isolinariine A 45	Tableau I.3	[43]
<i>L. reflexa</i>	Isolinariine B 46	Tableau I.3	[10]
<i>L. maroccana</i>	Aureusine 47	Figure I.1	[45]
<i>L. vulgaris</i>	Hespéridine 48	Figure I.1	[46]

Les structures des flavonoïdes de **42** à **46**, cités dans le **Tableau I.1** sont reportées dans le **Tableau I.2**.

Tableau I.2 : Tableau récapitulatif des flavonoïdes **42- 46**

Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
	42	OCH ₃	H	H	H
	43	H	H	H	H
	44	OCH ₃	H	H	Ac
	45	OCH ₃	Ac	H	H
	46	OCH ₃	H	Ac	H

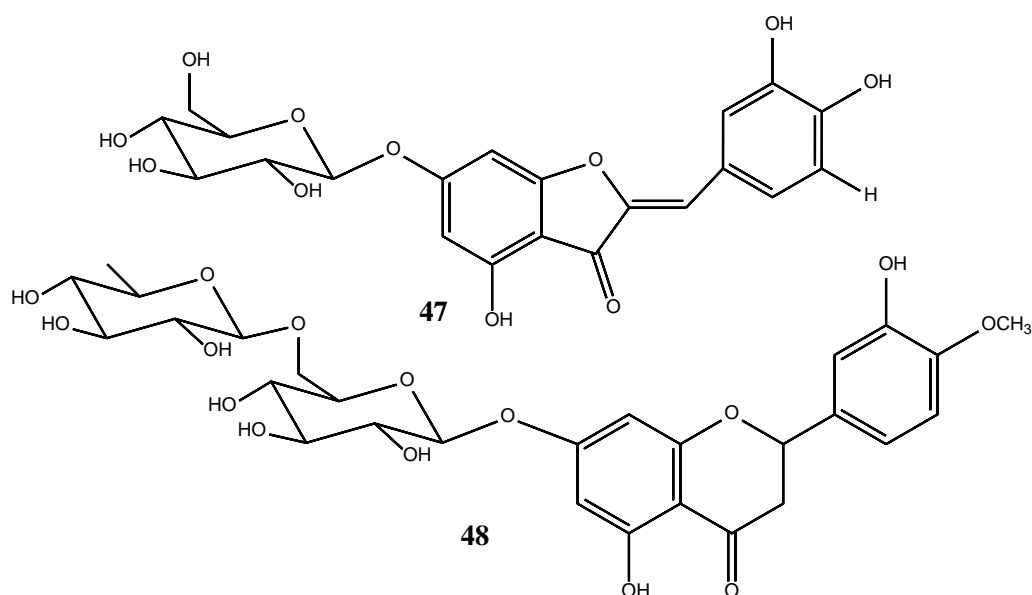


Figure I.1 : Structure de l’Aureusine **47** et l’Hespéridine **48**

I.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre

Linaria

I.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Linaria* ont été utilisées en médecine populaire comme anti-inflammatoires, anti-rhume [47], toniques, laxatifs, antidiabétiques et diurétiques, ainsi que pour le traitement des plaies, des hémorroïdes et des troubles vasculaires [44]. A titre d'exemple :

- *Linaria reflexa*, espèce connue sous le nom “ Oum lajrah” en raison de son pouvoir cicatrisant, est également employée en usage externe dans le traitement de certaines dermatoses [48]. Elle est aussi appliquée dans la médecine folklorique nord-africaine dans le traitement de certaines maladies de la peau [7].
- *Linaria vulgaris*, plante qui grandit en Bulgarie [49], employée en médecine populaire pour ses diverses propriétés : laxative, traitement des inflammations de la vessie, éruptions cutanées ainsi que pour le traitement des hémorroïdes [50]. Elle se trouve également dans le Nord-Est de la chine, utilisée par la population locale dans le traitement de la toux et l’asthme [51].
- *Linaria japonica* est connue sous le nom "Unran" utilisée dans la médecine populaire comme diurétique, purgatif et laxatif [7].

I.5.2. Activités biologiques

Plusieurs recherches ont montré que le genre *Linaria* est caractérisé par de multiples activités biologiques à cause de la diversité des molécules bioactives extraites à partir des différentes espèces.

- Pendant plusieurs années, l'espèce *L. saxatilis* a été étudiée pour sa composition chimique et ses activités biologiques intéressantes [7]. Une étude phytochimique effectuée sur *L. saxatilis* var. *glutinosa* a permis l'obtention de diterpénoïdes à squelette néo-clérodane. Ces derniers ont montré une bonne activité cytotoxique contre une série de cellules cancéreuses [30]. Une autre étude effectuée sur cette sous-espèce a révélé que quelques néo-clérodanes diterpénoïdes ont un effet inhibiteur sur les enzymes impliquées dans les processus inflammatoires [29].
- Une étude de quelques flavones isolés de *L. reflexa* a montré une action antiproliférative contre un ensemble de lignées cellulaires cancéreuses humaines [10]. Une autre étude de l'activité enzymatique Anti-acétylcholinestérase des deux extraits hexane et acétate d'éthyle de cette plante a montré une inhibition de l'AChE plus remarquable dans l'extrait acétate d'éthyle lié à la présence des flavones isolés de cet extrait qui ont montré une bonne activité inhibitrice de l'AChE [52-53].
- Des travaux ont montré que les extraits et les composés isolés de types polyphénoliques de *L. vulgaris* ont des activités anti-inflammatoires, antiallergiques et antitussives [36,54].
- Une étude biologique sur l'extrait éthanolique de *L. corifolia* a montré un effet antibactérien contre les bactéries à Gram+. En outre, le même extrait a montré des effets anti-levures particulièrement contre *Kluyveromyces fragilis* [55].
- Une étude de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase de *L. kurdica* a montré une bonne activité liée à la présence des iridoïdes [42].

I.5.3. Quelques activités biologiques reconnues pour les produits isolés des espèces du genre *Linaria*

Tableau I. 3 : Activés biologiques de quelques produits isolés du genre *Linaria*

Plantes	Produits	Activités biologiques	Réf
<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	15-Acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12-dien-16-al <u>18</u>	activité antitumorale (cellule de leucémie, cellules tumorales du poumon et cellules d'adénocarcinome du colon)	[30]
<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	<i>E</i> -isolinaridial <u>17</u>	activité inflammatoire	[29]
<i>L. reflexa</i>	Pectolarine <u>42</u> Pectolarigenine <u>31</u> Linarine <u>44</u> Isolinarie A <u>45</u> Isolinarie B <u>46</u>	activité antiproliférative	[10]
<i>L. reflexa</i>	Linarie <u>44</u> Isolinarie A <u>45</u> Isolinarie B <u>46</u>	Activité anti-AChE	[53]
<i>L. vulgaris</i>	Acide <i>p</i> -coumarique <u>24</u> Pectolarine <u>42</u> Linarine <u>43</u> Linarine <u>44</u> Acacétine <u>32</u>	activité anti-inflammatoire et antiallergique	[54]
<i>L. vulgaris</i>	Pectolarine <u>42</u> Lutéoline <u>34</u> Acacétine <u>32</u> Pectolarigenine <u>31</u>	activité antitussive et anti-inflammatoire	[36]
<i>L. kurdica</i>	Antirrhinoside <u>1</u> Antirrhide <u>7</u>	activité inhibitrice de l' α glucosidase	[42]

Référence bibliographique

- [1] Ozenda P. Flore du Sahara Septentrional et Central. *CNRS*. **1958**. 386.
- [2] Quezel P. et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS*. Paris. **1963**. Vol 2.
- [3] Olmstead RG., Depamphilis CW., Wolfe AD., Young ND., Elisons WJ. and Reeves PA. Disintegration of the scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. **2001**. 88:348-361.
- [4] Öztürk A., Güney KB., Bani B., Güney K., Karavelioğullari FA., Pinar NM. and Çeter T. Pollen morphology of some *Verbascum* (Scrophulariaceae) taxa in Turkey. *Phytotaxa*. **2018**. 333:209-218.
- [5] The Manulae. A tribe of Scrophulariaceae. *Edinburgh University Press*. Edinburgh. **1994**. 1-212.
- [6] Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Island. *Edinburgh University Press*. Edinburgh. **1978**. 6:825
- [7] Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F. and Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res*. **2015**. 29:1589-1613.
- [8] Marco JL. Iridoid glucosides of *Linaria clementei*. *Phytochemistry*. **1985**. 24:1609-1610.
- [9] Tekaya-Karoui A., Hammami S., Ben Jannet H., Hamza MA., Abreu P. and Mighri Z. Iridoid glycosides from the aerial parts of *Linaria heterophylla* Desf growing in Tunisia. *J de la Societe Algerienne de Chimie*. **2008**. 18:149-158.
- [10] Tundis R., Deguin B., Loizzo MR., Bonesi M., Statti GA., Tillequin F. and Menichini F. Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg Med Chem Lett*. **2005**. 15:4757-4760.
- [11] Otsuka H. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1993**. 33:617-622.
- [12] Ilieva E., Handjieva N., Spassov S. and Popov S. 5-O-allosylantirrhinoside from *Linaria* species. *Phytochemistry*. **1993**. 32:1068-1070.
- [13] Bianco A., Guiso M., Ballero M., Foddai S., Nicoletti M., Piccin A., Serafini M. and Tomassini L. Iridoids in the Flora of Italy: Glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat Prod Res*. **2004**. 18:241-246.
- [14] Guiso M., Tassone G., Nicoletti M., Serafini M. and Bianco A. Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat Prod Res*. **2007**. 21:1212-1216.
- [15] Ilieva E., Handjieva N., Bankova V., Popov S. and Evstatieva L. Iridoid and flavonoid glycosides from *Linaria* species. *Bulgarian Chem Commun*. **1992**. 25:400-406.
- [16] Ilieva E., Handjieva N. and Popov S. Genistifolin and other iridoid glucosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. *Zeitschrift fuer Naturforschung*. **1992**. 47:791-793.
- [17] Hua H., Li X., Xing SE. and Pei YH. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin Pharm J*. **2005**. 40:653-656.
- [18] Ferhat M., Harkat H., Lavaud C., Haba H., Long C. and Benkhaled M. Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum.subsp. *fruticosa*. *Biochem Sys & Ecol*. **2010**. 38:833-835.
- [19] Bianco A., Guiso M., Martino M., Nicoletti M., Serafini M., Tomassini L., Mossa L. and Poli F. Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. *Phytochemistry*. **1996**. 42:89-91.

- [20] Bianco A., Guiso M., Procaccio C., Nicoletti M., Serafini M. and Tomassini L. Iridoids in the flora of Italy. 8. A new methyl-cyclopentanoid monoterpene from *Linaria purpurea*. *Gazzetta Chimica Italiana*. **1997**. 127:407-409.
- [21] Bianco A., Guiso M., Mazzel RA., Piccioni F., Nicoletti M., Serafini M. and Ballero M. Iridoids in the flora of Italy 14. 6'-O-acetylantirrhinoside, a new iridoid glucoside from *Linaria flava* subsp. *sardoa*. *Fitoterapia*. **1996**. 67:364-366.
- [22] Tundis R., Deguin B., Dodaro D., Statti GA., Tillequi F. and Menichini F. Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.) Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). *Bioch Sys & eco*. **2008**. 36:142-145.
- [23] Ahmad VU., Kousar F., Zubair M., Khan A., Ali MS., Choudhary MI. and Sener B. A new iridoid glycoside from *Linaria genistifolia*. *Fitoterapia*. **2006**. 77:12-14.
- [24] Otsuka H. Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1995**. 39:1111-1114.
- [25] Otsuka H. Iridolinarins A, B, and C: iridoid esters of an iridoid glucoside from *Linaria japonica*. *J Nat Prod*. **1994**. 57:357-362.
- [26] Kouichi M., Takashi T., Isao K., Toshihiro F., Yuki Y. and Kanji I. New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J Nat Med*. **2011**. 65:172-175.
- [27] Otsuka H. Linarionosides A-C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1994**. 37:461-465.
- [28] Kitagawa I., Yoshihara M., Tani T. and Yosioka I. Linaridial, a new cis-clerodane-type diterpene dialdehyde from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett*. **1975**. 1:23-26.
- [29] Benrezzouk R., Terencio MC., Ferrandiz ML., San Feliciano A., Gordaliza M., Miguel del Corral JM., de la Puente ML. and Alcaraz MJ. Inhibition of human sPLA₂ and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. *Life Sciences (Pharmacology Letters)*. **1999**. 64:205-211.
- [30] Gordaliza M., Miguel Del Corral JM., de la Puente LM., Garcia-Grávalos MD. and San Feliciano A. Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg Med Chem Lett*. **1997**. 7:1649-1654.
- [31] Hua H., Li X. and Zhang H. Steroids from *Linaria vulgaris* Mill. *J Shenyang Pharm Univ*. **2000**. 17:40-42.
- [32] Hua H., Hou B., Li W., Li X. and Zhang Y. Triterpenes from butter-and-eggs (*Linaria vulgaris*). *Chin Trad Herb Drugs*. **2000**. 31:409-412.
- [33] Sokolowska-Wozniak A., Szewczyk K. and Nowak R. Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L.) Mill. *Herba Polonica*. **2003**. 49:161-165.
- [34] Degot AV., Fursa NS., Zaitsev VG., Chaika EA., Popova TP., Litvinenko VI. And Kornievskii YI. Study of *Linaria macroura*. *Chem Nat Comp*. **1983**. 3:388-389.
- [35] Lahloub MF. Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J Pharm Sci*. **1992**. 8:78-95.
- [36] Hua H., Sun J. and Li X. Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). *Chin Trad Herb Drugs*. **1999**. 30:332-334.
- [37] Harborne JB. and Valdes B. Identification of scutellarein 4'-methyl ether in *Linaria aeruginea*. *Phytochemistry*. **1971**. 10:2850-2851.

- [38] Pethes E., Marczal G., Kery A. and Petho M. Flavonoids as biologically active agents and their occurrence in the Scrophulariaceae family. *Acta Pharmaceutica Hungarica*. **1974**. 44:83-90.
- [39] Kapoor R., Rishi AK. and Atal CK. A rarely methylated new flavonol aglycone from *Linaria dalmatica*. *Fitoterapia*. **1985**. 56:296-297.
- [40] Kuptsova LP. and Bankovskii AI. New flavonoid from some species of *Linaria*. *Khim Prir Soedin*. **1970**. 6:128-129.
- [41] Smirnova LP., Boryaev KI. and Ban'kovskii AI. Acacetin and its glycosides in plants of the genus *Linaria*. *Chem Nat Comp*. **1974**. 10:96-97.
- [42] Aydogdu I., Zihnioglu F., Karayildirim T., Gulcemal D., Alankus-Caliskan O. and Bedir E. α -glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *Eriocalyx*. *Nat Prod Commun*. **2010**. 5:841-844.
- [43] Otsuka H. Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J Nat Prod*. **1992**. 55:1252-1255.
- [44] Ercil D., Sakar MK., Del Olmo E. and San Feliciano A. Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turk J Chem*. **2004**. 28:133-139.
- [45] Harborne JB. Comparative biochemistry of flavonoids. I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry*. **1966**. 5:111-115.
- [46] Guan HF., Liu XQ., Lan Z., Wang RR. and Hua H. Content determination of pectolinarin and hesperidin in *Linaria vulgaris* subsp. *sinensis* (Bebeaux) Hong by HPLC. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*. **2009**. 26:119-122.
- [47] Handjieva NV., Ilieva EI., Spassov SL. and Popov SS. Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron*. **1993**. 49:9261-9266.
- [48] Boukef MK. Médecine traditionnelle et pharmacopée. *ISBN*. **1986**.
- [49] Stojanov Pd., Stefanov B. and Kitanov B. In Flora Bulgaricu. Part II. *Naukai Iskustvo*. Sofia. **1967**, 959.
- [50] Stojanov N. In Our Medicinal Plants, Part II. *Naukai Iskustvo*. Sofia. **1973**, 99.
- [51] Jiangsu College of New Medicine, "A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines". *People's Hygiene Publisher*. Beijing. **1977**.
- [52] Oinonen PP., Jokela JK., Hatakka AI. and Vuorela PM. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia*. **2006**. 77:429-434.
- [53] Loizzo MR., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti GA., Deguin B., Tillequin F., Menichini F. and Houghton PJ. Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat Prod Commun*. **2007**. 2:759-763.
- [54] Kelemen L. and Scedo C. Data about the polyphenol content of *Linaria vulgaris* Mill species. *Farmacica (Bucharest, Romania)*. **2003**. 51:86-89.
- [55] Gonuz A., Dujger B. and Kargioglu M. The Morphological, Anatomical properties and Antimicrobial Activity of Endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pak J Biol Sci*. **2005**. 8:220-336.

CHAPITRE II

Les métabolites secondaires

II.1. Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires [1].

Ces produits chimiques ont été nommés "métabolites secondaires" par **A. Kossel** en 1891. Cette appellation désigne une classe de composés organiques qui ne participent pas directement à la croissance, au développement et à la reproduction des plantes, d'où leur nom de "métabolites secondaires". Ces composés sont utilisés comme marqueurs taxonomiques en raison de leur distribution limitée dans les groupes taxonomiques. Par contraste, les métabolites primaires se trouvent dans tous les tissus des plantes et exercent une activité métabolique nécessaire à la croissance et au développement des plantes [2].

En raison de leurs diverses propriétés biologiques et physico-chimiques, les métabolites secondaires représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans le domaine de la pharmacologie, l'agroalimentaire, la cosmétologie et en dermopharmacie, soit à travers l'emploi des plantes médicinales, ou à travers l'usage de molécules purifiées ou issues d'hémisynthèses chimiques [2-3].

Les métabolites secondaires dépassent 100000 substances identifiées [4], appartiennent à trois classes principales : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Ce chapitre, concerne les terpénoïdes les composés phénoliques.

II.2. Les terpénoïdes

II.2.1. Définition

Les terpénoïdes tirent leurs noms de la térébenthine (*lat. balsamum terebinthinae*), une huile essentielle obtenue par distillation de l'oléorésine de pin dont les composés majeurs sont des terpènes [5].

Les terpénoïdes forment une classe très diversifiée de produits naturels isolés de plantes, microbes et organismes marins [6] dont la majorité ont une origine végétale où ils jouent le rôle de métabolites primaire et secondaire [7], ils représentent une grande famille de molécules qui varie d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbones jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés avec plus de 40 000 composés [8].

II.2.2. Structure et classification des terpénoïdes

La structure carbonée de base des terpénoïdes est constituée de l'assemblage d'un nombre variable d'unités 2-méthylbutane (appelées unités isoprène) avec une formule générale $(C_5H_8)_n$ [9], selon le nombre d'unités isoprène dans leur structure de base ou le nombre de n, les terpénoïdes sont classés en diverses catégories [10], illustrés dans le **Tableau II.1**.

Tableau II.1 : Classification des terpénoïdes

Nombre d'isoprène (n)	Formule brute	Classe
1	C_5H_8	Hémiterpène
2	$(C_5H_8)_2$	Monoterpène
3	$(C_5H_8)_3$	Sesquiterpène
4	$(C_5H_8)_4$	Diterpène
5	$(C_5H_8)_5$	Sesterpène
6	$(C_5H_8)_6$	Triterpène et stéroïde
8	$(C_5H_8)_8$	Tétraterpène
>8	$(C_5H_8)_n$	Polyterpène

II.2.2.1. Monoterpènes

Les Monoterpènes représentent un groupe de composés organiques naturels qui résultent de la fusion de deux unités isoprènes dont la formule moléculaire est $C_{10}H_{16}$. Ils sont généralement isolés des huiles essentielles où ils contribuent pour 90 % de leurs compositions totales [11,12]. Les monoterpènes peuvent être linéaires (acycliques) (myrcène 49 [13]), monocycliques (limonène 50 [13]) ou bicycliques (α -pinène 51 [13]). Ils sont connus par de nombreuses activités biologiques telles que : antimicrobienne, anti-inflammatoire [11,12], hypotensive, antiprurigineuse [11], anti-cancéreuse [12], inhibiteur d'AChE [14] et antidiabétique [15].

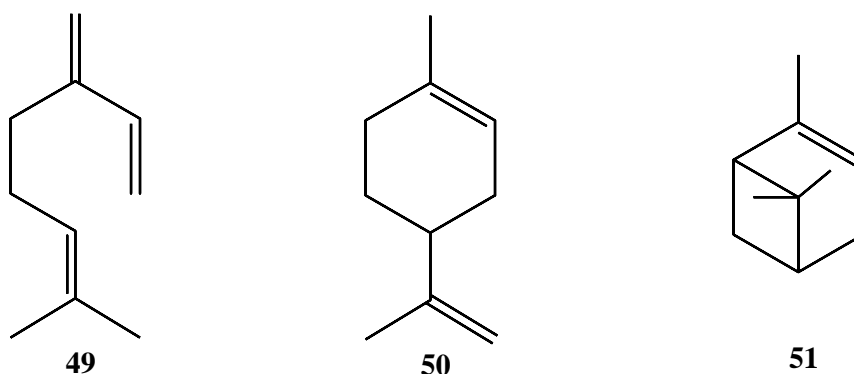


Figure II.1 : Structure de quelques monoterpènes

II.2.2.2. Diterpènes

Les diterpénoïdes sont des dérivés d'hydrocarbures contenant 20 atomes de carbone et issus de la condensation de quatre unités isopréniques [16]. Ils sont surtout répandus chez les végétaux mais ils sont aussi présents chez certains champignons, organismes marins et insectes [17]. En se basant sur le degré de cyclisation du squelette hydrocarboné, les diterpénoïdes peuvent être subdivisés en terpénoïdes acycliques (phytol 52 [18]), bicycliques (Crispene C 53 [19]), tétracycliques (phorbol 54 [20]) et tricycliques (taxol 55 [21]).

Les diterpènes possèdent plusieurs activités biologiques tel que : anti-cancéreuse [22] (réputée surtout par le taxol et le taxotère qui sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l'ovaire, du poumon et du sein), antibactérienne, antitumorale [23], antidiabétique [24], cardiovasculaire [25], anti-inflammatoire [12].

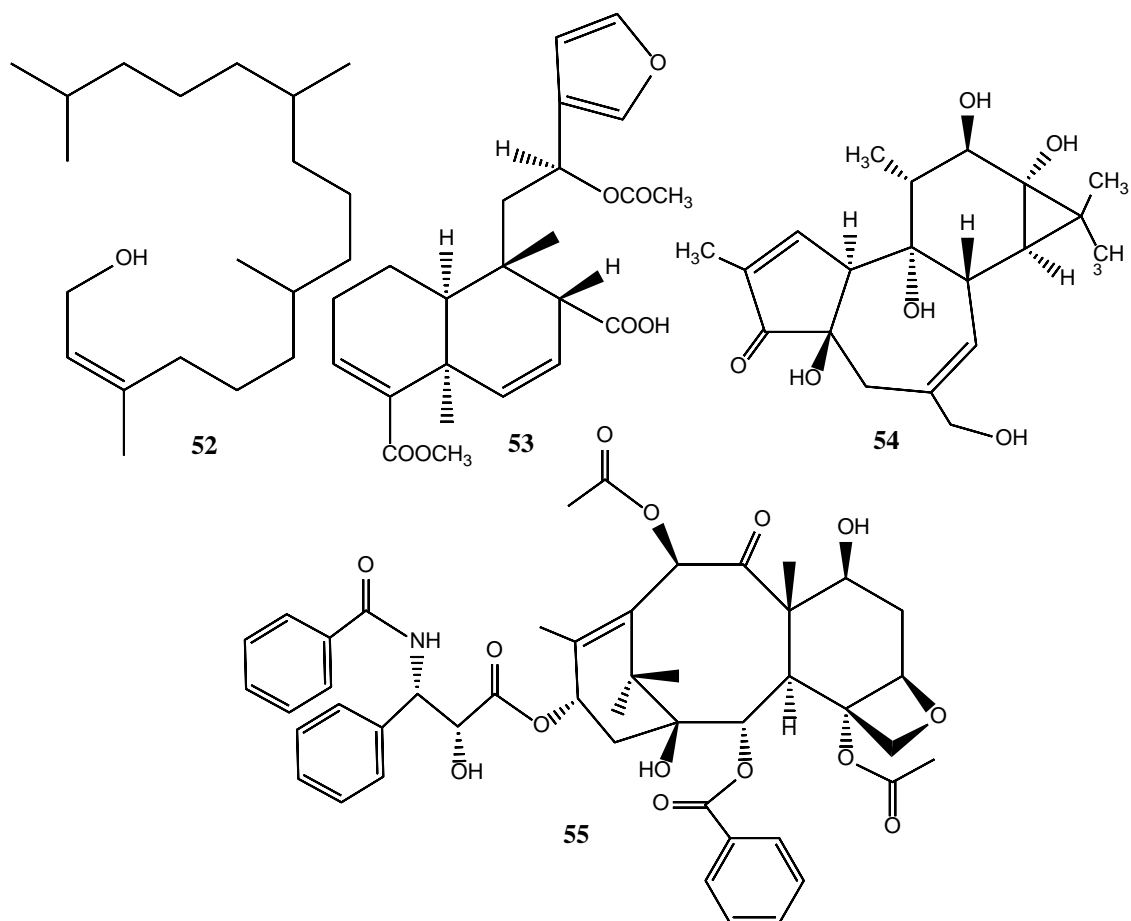


Figure II.2 : Structure de quelques diterpènes

II.2.2.3. Triterpènes et stéroïdes

Les triterpénoïdes constituent une grande famille de terpénoïdes rencontrés dans le règne végétal et animal [26]. Ce sont des composés en C_{30} , qui dérivent du 2,3-époxy-squalène **56** (Figure II.3) ou du squalène **57** lui-même par une variété de cyclisations et d'autres modifications [27].

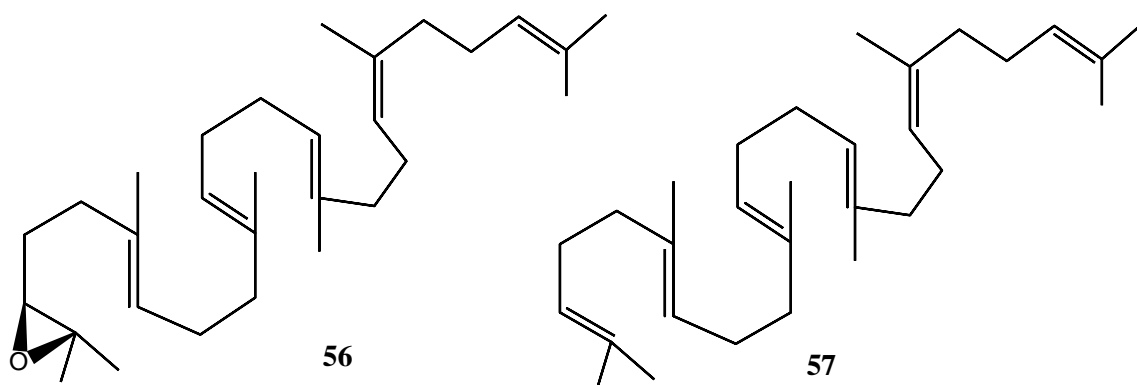


Figure II.3 : Structure du 2,3-époxy-squalène et du squalène

Ils peuvent être classés en trois groupes : acyclique (squalène **57**), tétracyclique (momordicine I **58** [28]) et pentacyclique (oléanane **59** [29]). Parmi ces groupes, la famille des triterpènes tétracycliques présente une importance particulière par son homogénéité et surtout par ses rapports étroits avec les stéroïdes.

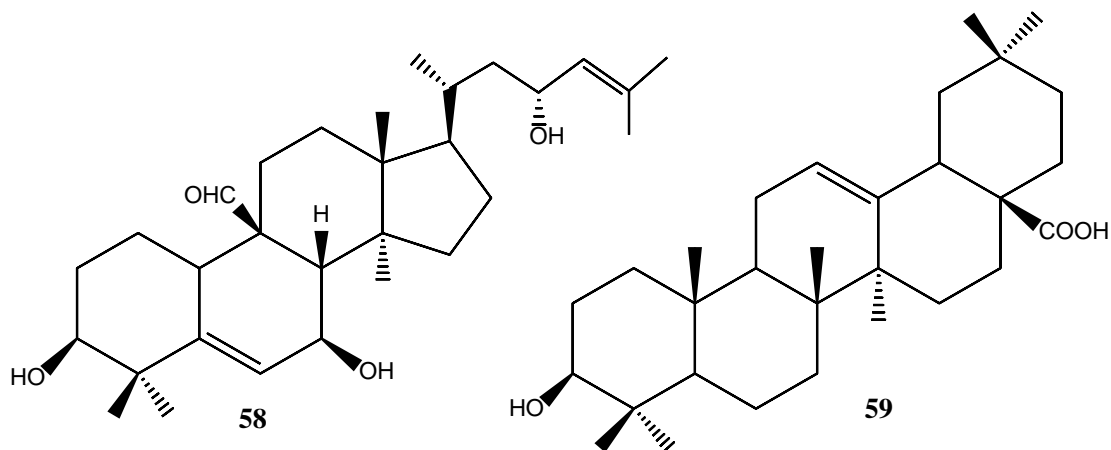


Figure II.4 : Structure de quelques triterpènes

Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles, Ils ont en commun une structure chimique comportant un squelette stérane ou perhydrocyclopentanophénanthrène **60** (Figure II.5).

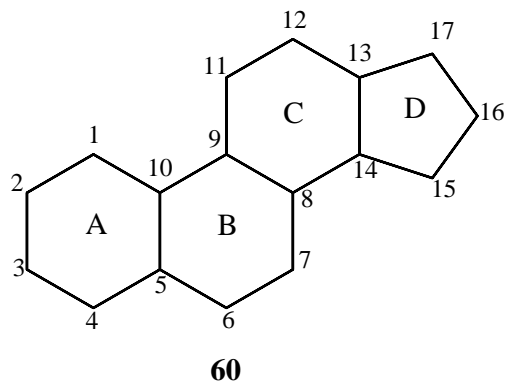


Figure II.5 : Noyau perhydrocyclopentanophénanthrène

Les triterpénoïdes possèdent des propriétés pharmacologiques tel que : anti-inflammatoire [30], antivirale, antitumorale [31], antibactérienne [32], antifongique [33], antiallergique, anticancéreuse, spasmolytique, analgésique, hépatoprotective [34], antioxydante [35], neuroprotective [36] et antiparasitique [37].

II.2.2.4. Les iridoïdes

II.2.2.4.1. Définition

Les iridoïdes sont des métabolites secondaires appartenant à la classe des terpénoïdes [38]. Ce sont des monoterpènes généralement d'origine végétale, rarement chez certains animaux. Structuellement, les iridoïdes sont généralement constitués d'un cycle cyclopentane fusionné à un hétérocycle à oxygène à six chaînons [39]. Cependant, Ils ont un squelette cyclopentane [c] pyranique appelé iridane (*cis*-2-oxabicyclo [4, 3, 0]-nonane) (Figure II.6) [40]. Très souvent, ils se présentent sous forme d'hétérosides d'iridoïdes (principalement avec une unité de glucose) [41].

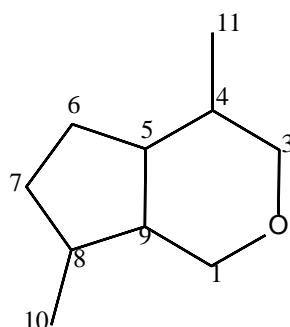


Figure II.6 : Structure du squelette iridane

Les iridoïdes d'origine végétal sont présents chez les dicotylédones en particulier chez les Asteridae : Dipsacales, Gentianales, Lamiales, Plantaginales, Rubiales, Scrophulariales. Biogénétiquement et chimiotaxonomiquement, leur intérêt vient du fait que ce sont des intermédiaires principaux dans la biosynthèse des alcaloïdes, ils sont aussi utilisés comme marqueurs de plusieurs genres dans diverses familles de plantes, tels que : aucubine de *Plantago* (Plantaginaceae), asperuloside de *Galium* (Rubiaceae) et harpagide de *Scrophularia* (Scrophulariaceae) [42-44].

Les iridoïdes tirent leur nom de celui des fourmis du genre *Iridomyrmex* à partir desquelles ont été isolées des substances de défense propre à ces insectes en 1956 [45]. Le premier iridoïde isolé est l'iridodial **61**, un 1,5-dialdéhyde en équilibre avec la forme lactol **62** (Figure II.7) [46], représentant la structure de base des iridoïdes.

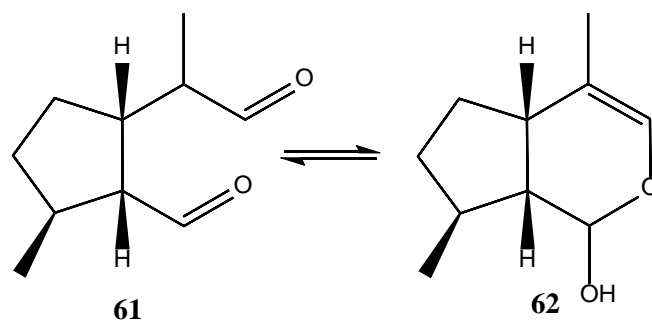


Figure II.7 : Structure de l'iridodial

En 1963, **Briggs** a considéré que cette classe dérive de l'iridodial et propose l'appellation « iridoïde » [47] qui a été définitivement admis en 1969 par **Bobbit** et **Segebarth**. Cette classe comporte actuellement plus de 3000 composés identifiés [48] appartenant à différentes sous classes.

II.2.2.4.2. Classification des iridoïdes

Les iridoïdes constituent une grande classe de monoterpènes, à cause de leurs diversités structurales ils peuvent être divisés en quatre groupes principaux :

- Les iridoïdes glycosylés

Les iridoïdes se trouvent généralement sous forme des glycosides, particulièrement des glucosides où le glucose se fixe en position C₁ par une liaison hétéroside tel que le Procumbide **63** [49]. La partie osidique peut être un oligosaccharide (3'-O-β-glucopyranosylstilbericoside **64** [50]), un arabinose (jioglutoside A **65** [51]), ou un rhamnose (5,6-β-époxy-7β-hydroxy-8β-méthyl-1β-D-rhamnosidal iridoïde **66** [52]).

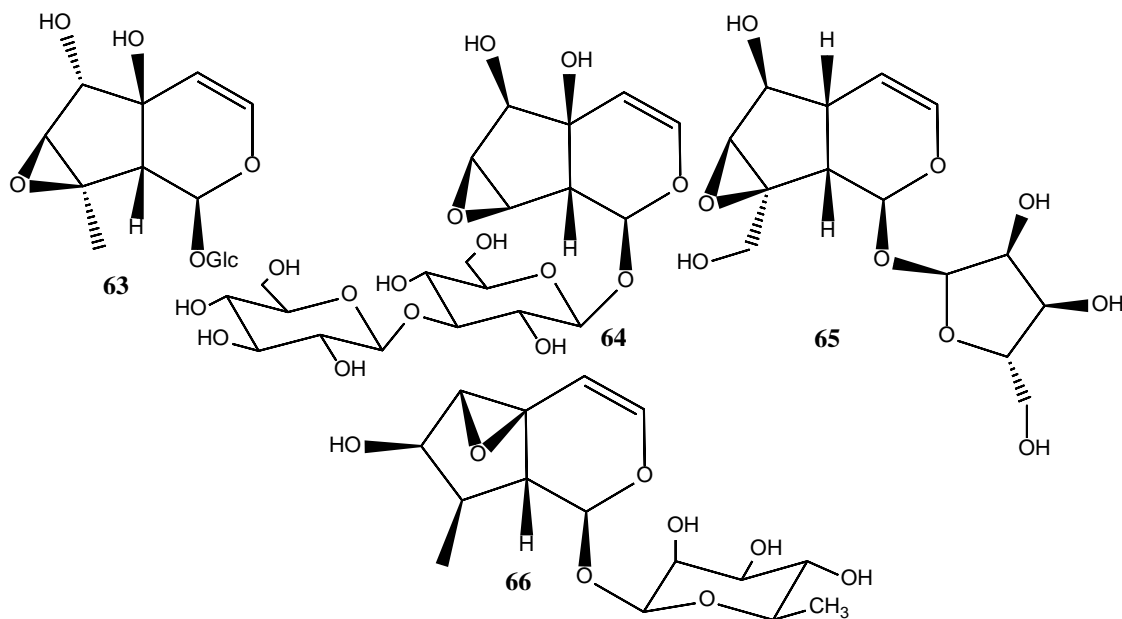


Figure II.8 : Structure de quelques iridoïdes glycosylés

La liaison hétérosidique peut s'établir entre l'hydroxyle situé en position C₆ comme dans l'Harpagide 6-*O*-β-glucoside **67** [53] ou en position C₁₁ comme dans Kankanoside N **68** [54].

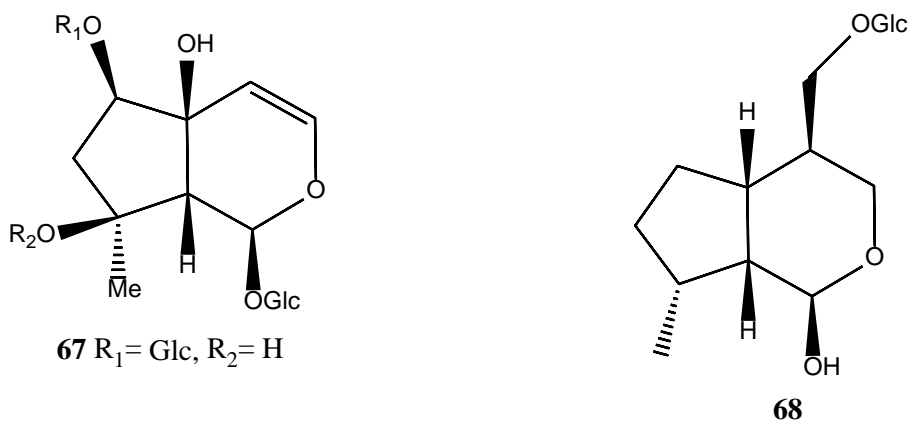


Figure II.9 : Structure de quelques iridoïdes glycosylés

Les iridoïdes glycosylés peuvent être polycycliques comme dans le (*E*)-Uenfoside **69** [55]. Le cycle pyranique peut se transformer en un cycle lactonique dans quelques iridoïdes glycosylés comme dans le Nepetaracemoside A **70** [56]. Le clivage du cycle pyranique produit des dérivés spécifiques des iridoïdes glycosylés tel que le Lantanoside **71** [57].

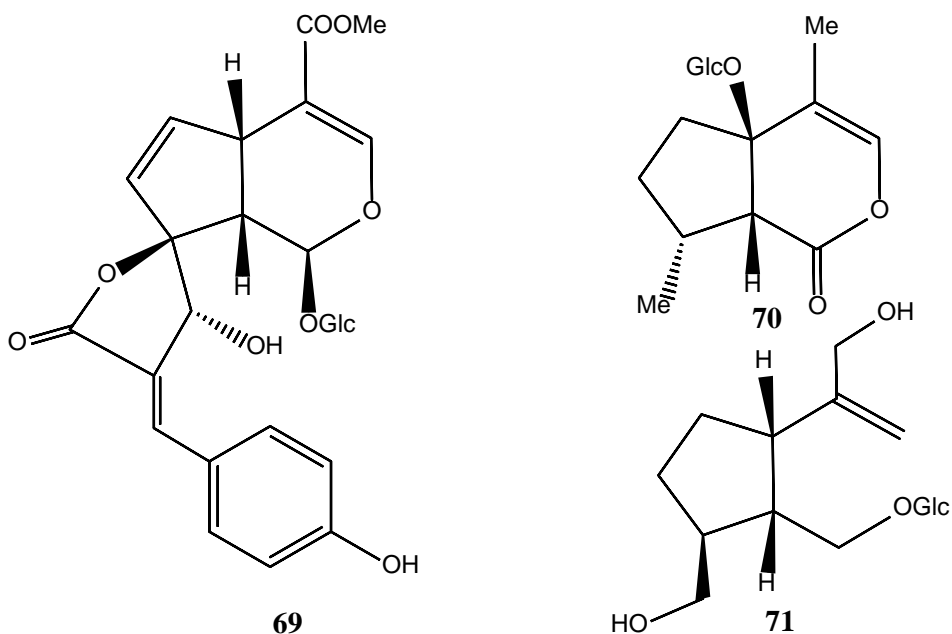


Figure II.10 : Structure de quelques iridoïdes glycosylés

- Les iridoïdes simples (non hétérosidiques)

Les iridoïdes simple sont des iridoïdes dépourvus d'un groupement glycosylé tel que le cachinol **72** [58], Il existe dans ce groupe des iridoïdes avec un cycle pyranique ouvert comme dans le cas du crescentine I **73** [59] ou des iridoïdes polycycliques comme le prismatomérine **74** [60].

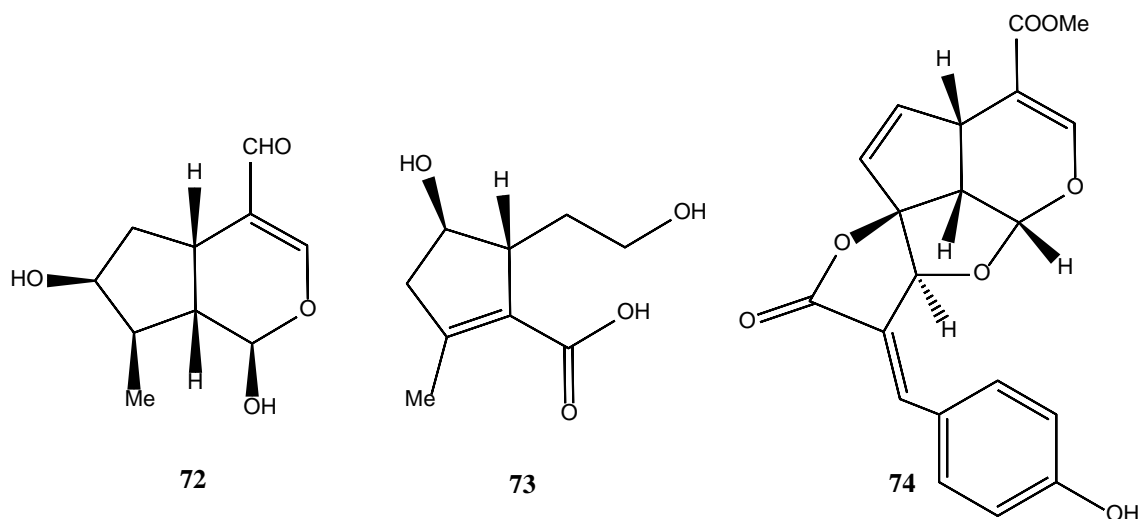


Figure II.11 : Structure de quelques iridoïdes simples

Il existe également des iridoïdes non glycosylé dont le cycle pyranique est transformé en un cycle lactonique tel que le β -Methoxygardendiol **75** [61].

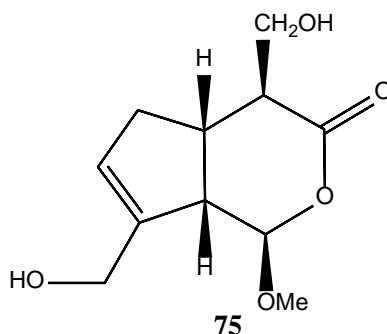


Figure II.12 : Structure du β -Methoxygardendiol

- Les séco- iridoïdes

Les séco-iridoïdes renferment une large gamme de molécules issues d'un clivage oxydative enzymatique de la liaison C7—C6 du noyau cyclopentanique des iridoïdes, ils sont donc considérés comme des dérivées de ces derniers [62].

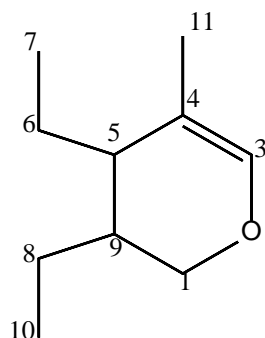


Figure II.13 : Structure de base des séco-iridoïdes

Cette classe d'iridoïdes renferme une variété de molécule selon les groupe de fonctions attachées à la génine tel que le Hydramacroside A **76** [63], Secostrychnosine **77** [64], Diderroside methyl ester **78** [65], gentianine **79** [66].

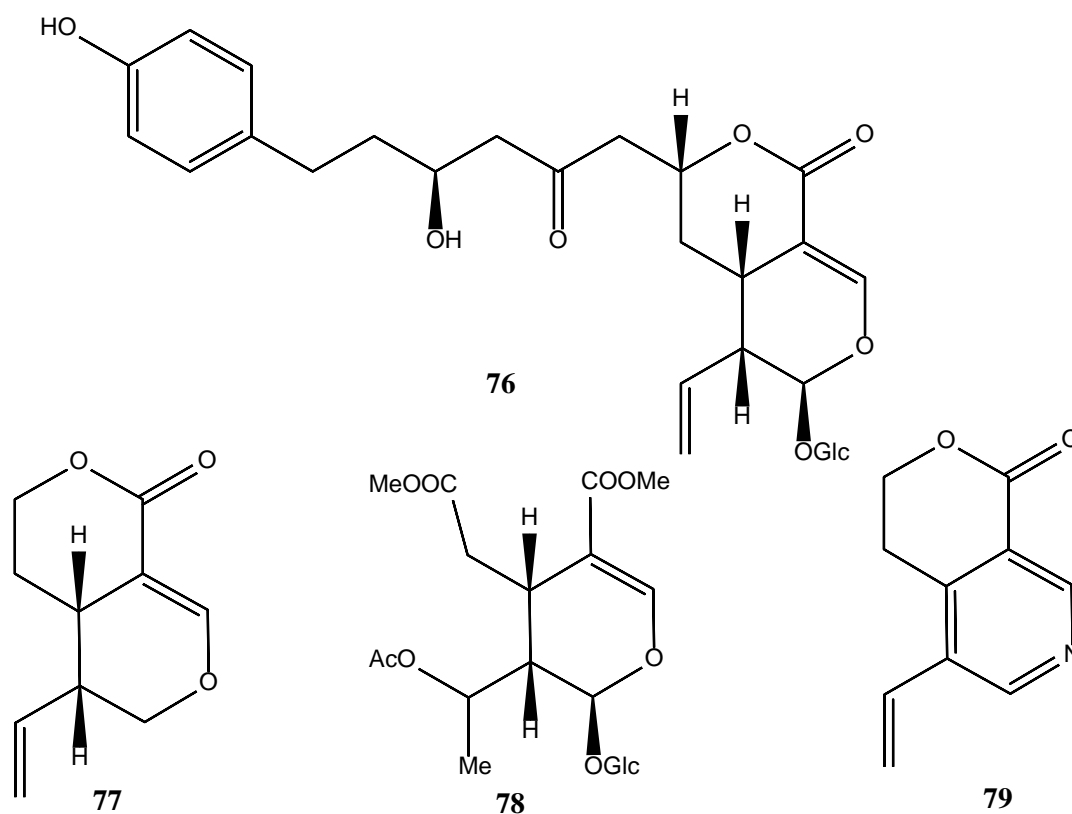


Figure II.14 : Structure de quelques séco-iridoïdes

- Les bisiridoïdes

Les bisiridoïdes sont des molécules issues de la dimérisation de deux iridoïdes. Ces deux entités sont liés directement, généralement par une liaison ester comme dans le Randinoside **80** [67], le Blumeoside B **81** [68], Globuloside A **82** [69].

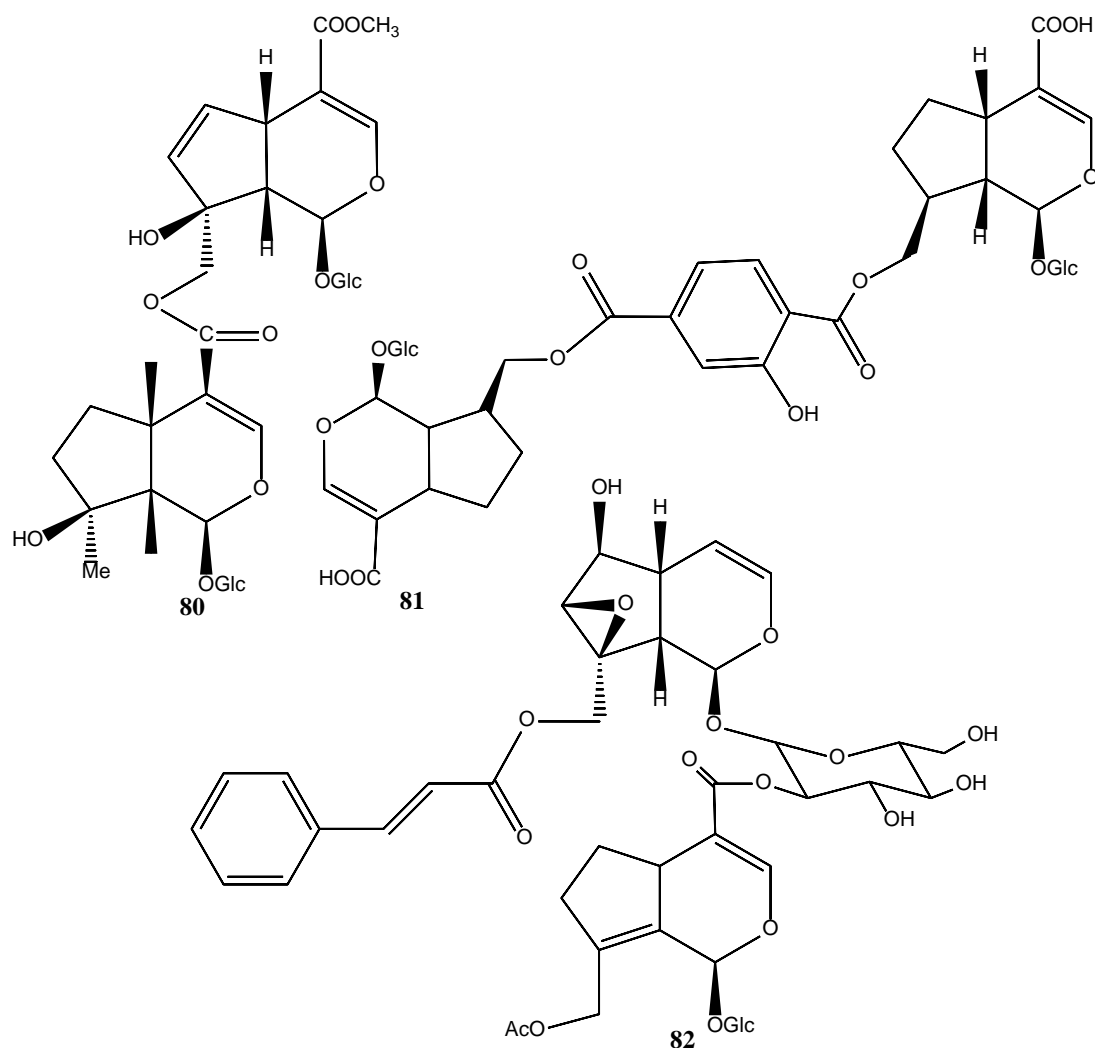


Figure II.15 : Structure de quelques bisiridoïdes

Cette dimérisation peut se réaliser entre deux séco-iridoïdes (Jaspolyanthoside **83** [70]) ou entre un iridoïdes et un séco-iridoïde (cantleyoside diméthylacétal **84** [71]).

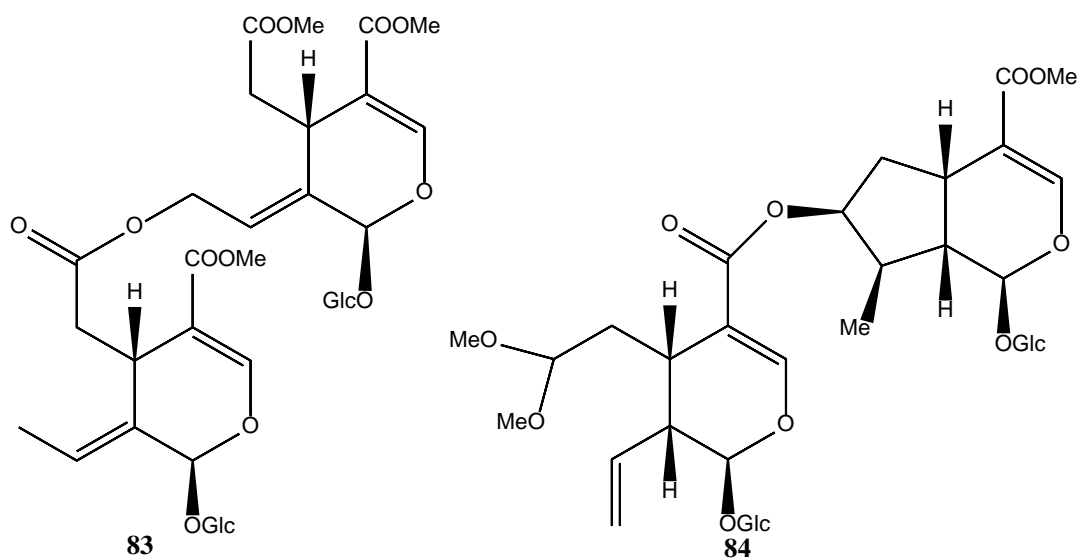


Figure II.16 : Structure de quelques bisiridoïdes

La condensation peut s'effectuer entre trois iridoïdes tel que l'acerifolioside **85** [72] ou même entre quatre iridoïdes (Strychoside B **86** [73]).

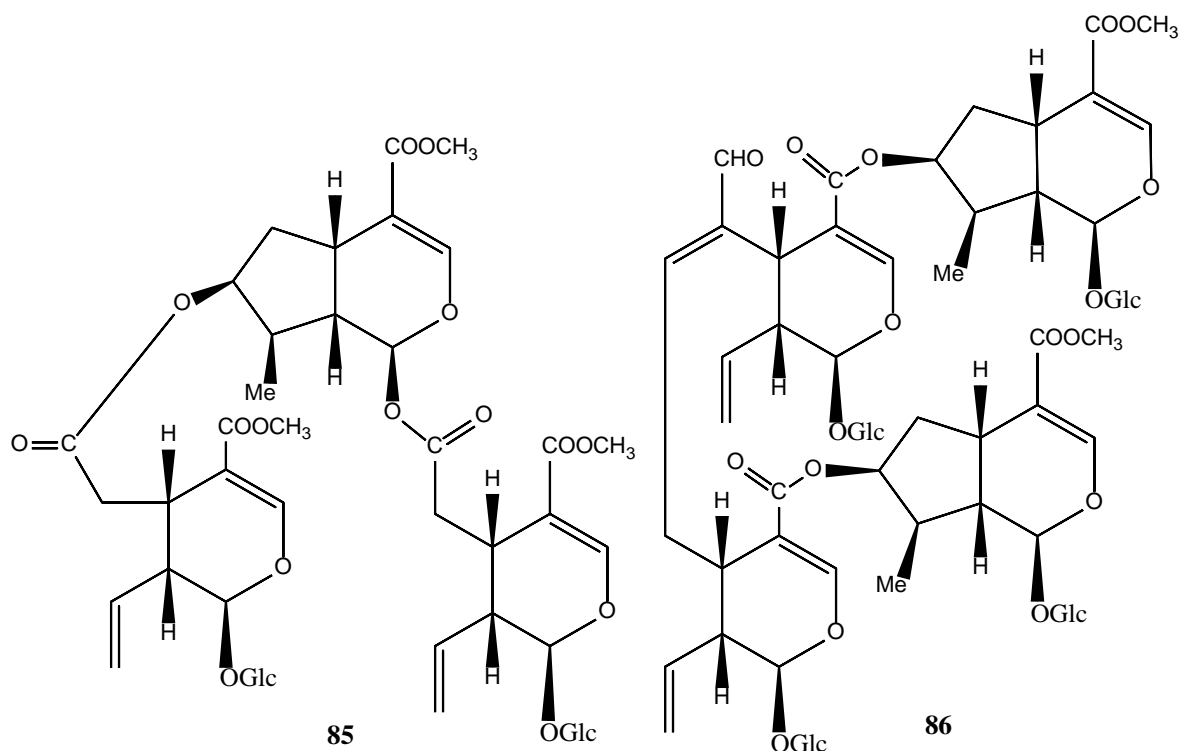


Figure II.17 : Structure du strychoside et d'acerifolioside

II.2.2.4.3. La biosynthèse des iridoïdes

Le précurseur de base pour la biosynthèse de tous les terpénoïdes est l'isopentenyl diphosphate (IPP), il est produit soit par la voie mévalonate ou par une autre voie récemment découverte triose phosphate / pyruvate, l'isopentenyl diphosphate (IPP) donne ensuite le géraniol pyrophosphate (GPP), impliqué dans la biosynthèse des iridoïdes [74-76].

Dans la première étape de la biosynthèse des iridoïdes, le géraniol qui dérive du géraniol pyrophosphate (GPP) est hydroxylé en 10-hydroxygéraniol avec une enzyme la géraniol-10-hydroxylase, suivie d'une oxydation pour donner 10-oxogéraniol [75-78], puis une cyclisation qui s'effectue par un mécanisme d'addition de Michael sur les carbones insaturés [79-80] mène à l'obtention de l'iridodial [76,81] qui joue un rôle important dans la biosynthèse des iridoïdes.

L'iridodial s'oxyde en iridotrial qui se cyclise formant ainsi le squelette méthylcyclopentapyranique caractéristique des iridoïdes. L'oxydation de l'aldéhyde iridotrial en acide carboxylique suivie d'une estérification et d'une glucosylation donne le deoxyloganine,

l'hydroxylation de cette dernière en C-7 mène à la loganine, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes [75,76,82].

L'ouverture du cycle pentanique de la loganine par un mécanisme enzymatique radicalaire conduit à la sécologanine, précurseur des séco-iridoïdes [82], et par voie de conséquence les alcaloïdes indoliques sont produits [75]. Toutes les étapes de la biosynthèse sont rassemblées dans la **figure II.18**.

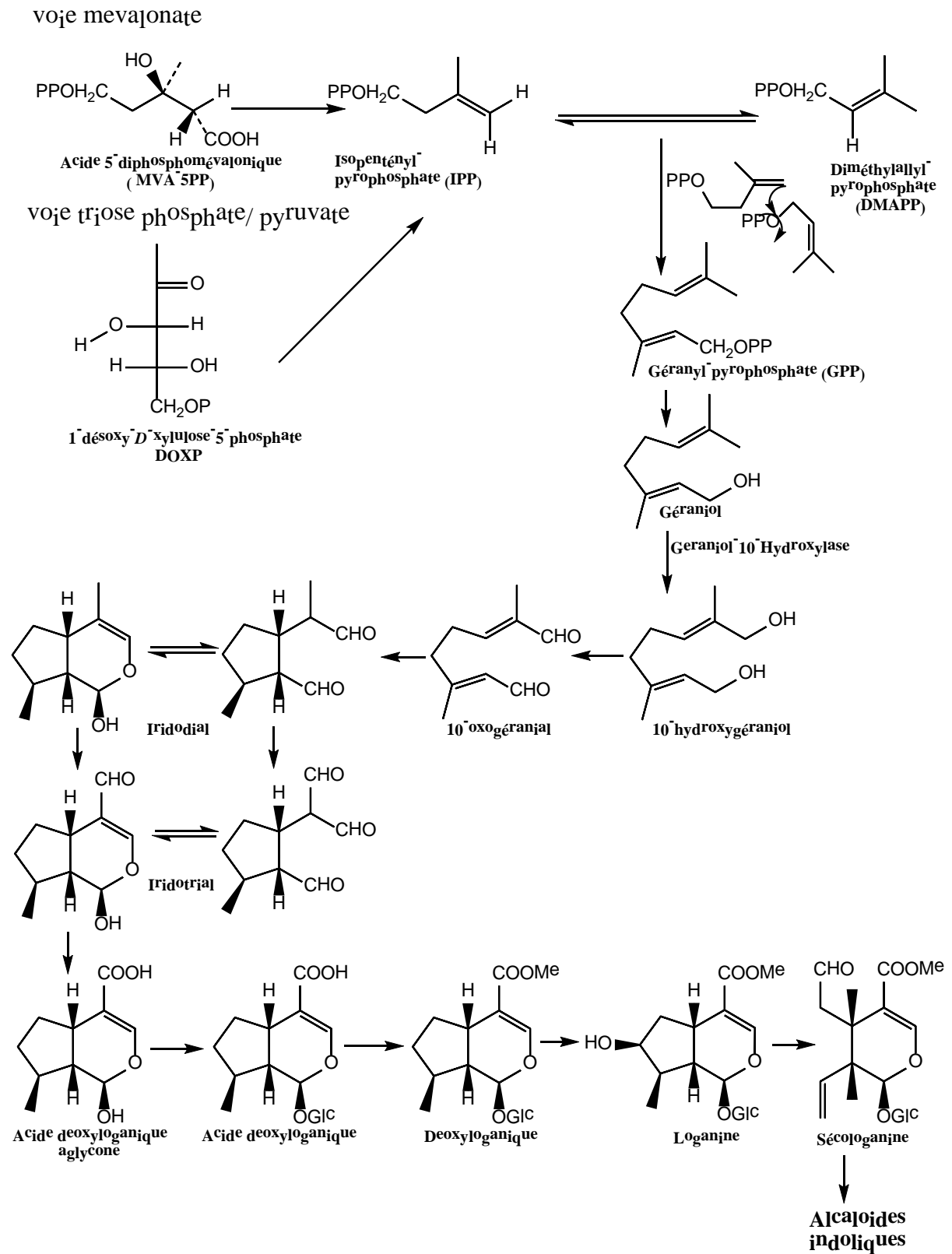


Figure II.18 : Biosynthèse des iridoïdes

Une autre voie de biosynthèse implique le 8-épi-iridodial, un stéréo-isomère de l'iridodial, cette voie concerne généralement les iridoïdes non carboxyliques tel que l'aucubine **87** et le catalpol **88** [83] (Figure II.19).

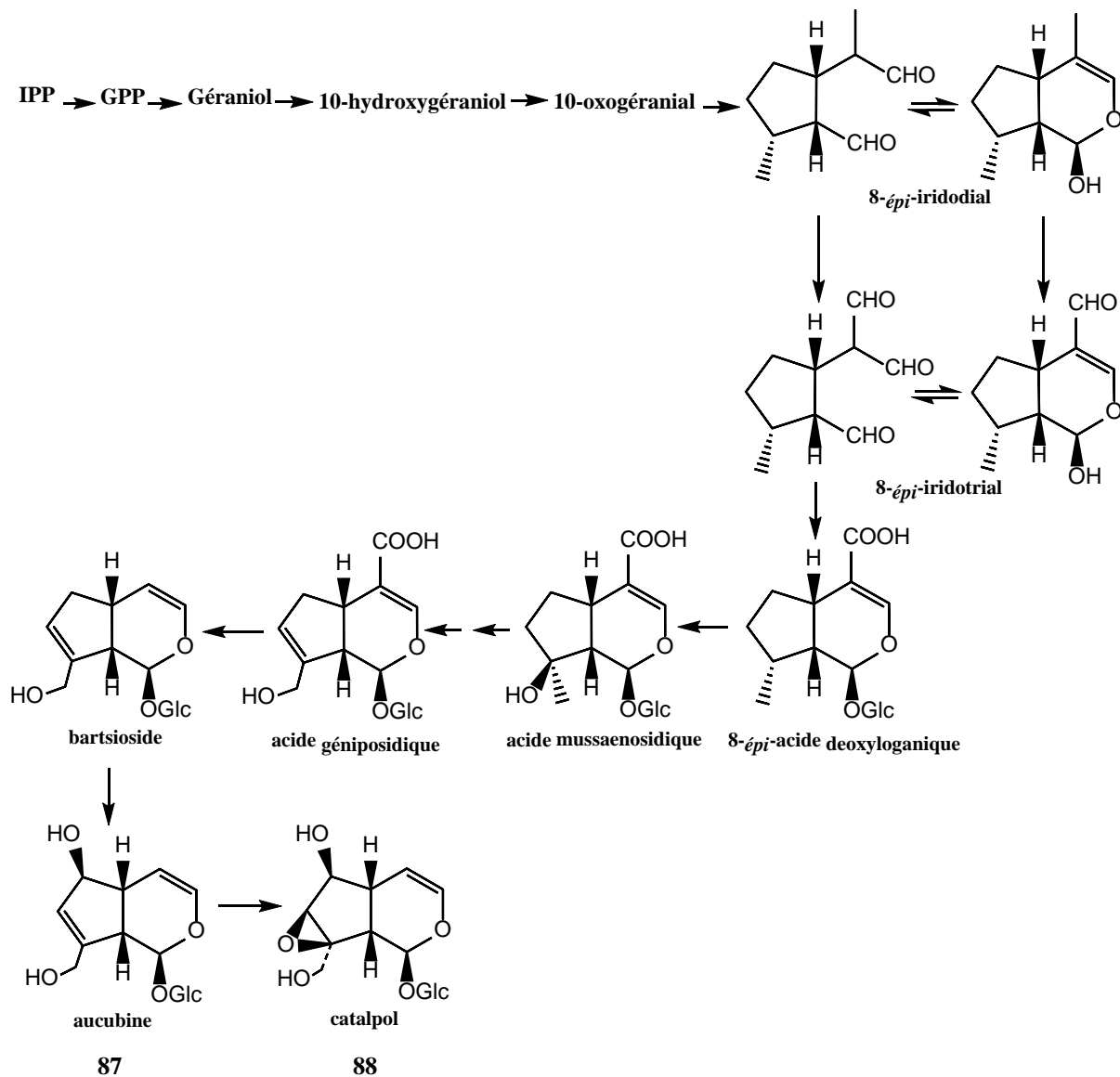


Figure II.19 : Biosynthèse d'aucubine et du catalpol

II.2.2.4.4. Activités biologique des iridoïdes

Un certain nombre de plantes contenant des iridoïdes sont utilisés en médecine folklorique comme toniques amers, sédatifs, antipyrétiques, médicaments contre la toux, remèdes cytotoxiques pour les maladies de la peau et comme hypotenseurs [42]. A titre d'exemple :

- ✓ En Europe, les racines de l' harpagophyton appelé la griffe du diable (*Harpagophytum procumbens*, Pedaliaceae) est principalement utilisée pour le traitement de l'arthrose [84].
- ✓ Dans la médecine traditionnelle italienne, Les racines de la gentiane (*Gentiana lutea*, Gentianacea) macérées dans l'alcool ont été utilisées comme des remèdes antirhumatismaux et anti-névralgiques appliqué sur la zone touchée [85].
- ✓ *Chiococca alba* HITCH (Rubiaceae), un arbuste endémique à L'Amérique est utilisé dans la médecine populaire comme un tonique pour l'inflammation des ganglions [86].
- ✓ Les racines de *Scrophularia ningpoensis* (Scrophulariaceae) ont été utilisées en Chine pour le traitement de l'hypertension, de l'inflammation, de la toux sèche et la tuberculose pulmonaire [87].

Les usages traditionnels des plantes réputés par l'accumulation des iridoïdes ont encouragé l'étude approfondie de leurs bioactivité, révélant ainsi que les iridoïdes ont une diversité dans leurs activités biologiques y compris : Activité antiallergique (hydramaroside A 76) [63], Activité anti-arthritique (8-*p*-coumaroylharpagide 89) [88], Activité antibactérienne (cantleyoside diméthylacétal 84 [71], le swertiamarin 90 [89]), Activité antifongique (6 β - hydroxy-7-epigardoside methyl ester 91 [90]), Activité anticancéreuse (prismatomérine 74 [60]), Activité anticoagulante (cachinol 72 [58]), Activité antioxydante (mussaenoside 92 [91]), Activité immunomodulatrice (aucubine 87 [92]), Activité de cicatrisation des plaies (scopolioside A 93 [93]), Activité neuroprotectrice (8-*O-E-p*-méthoxycinnamoylharpagide 2 94 [94]), Activité antidiabétique (Catalpol 88 [95]) et Activité hépatoprotectrice (swertiamarin 90 [96]).

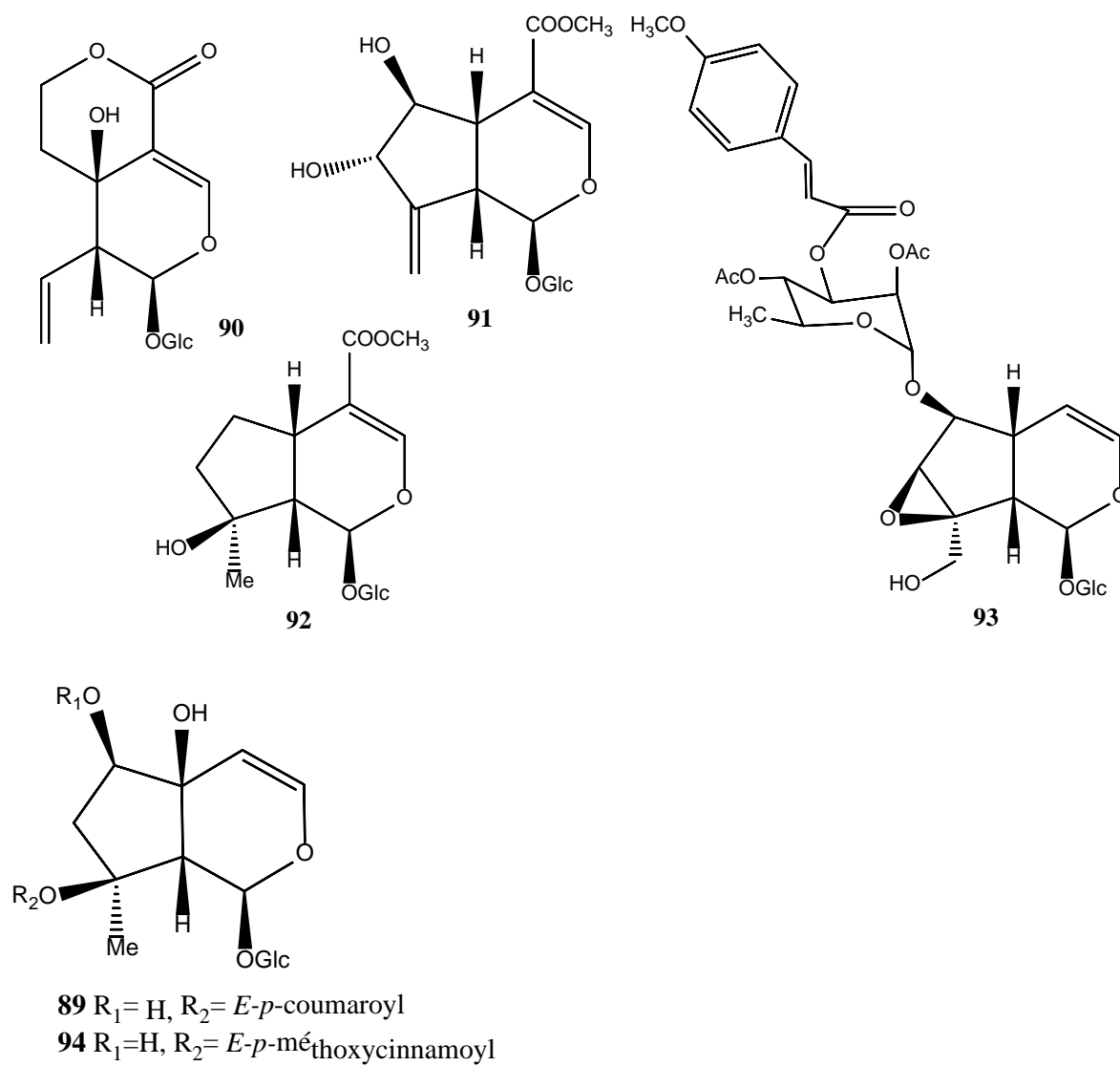


Figure II.20 : Quelques iridoïdes biologiquement actifs

II.3. Les composés phénoliques

II.3.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal, notamment dans les végétaux comestibles, comme les fruits, les légumes, les céréales, et les légumineuses, ainsi que dans les boissons d'origine végétale, comme le thé et le café, ils sont responsables des principales propriétés organoleptiques, notamment la couleur et le goût [97-99]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside [100-101].

Dans les plantes, Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction [101], ils sont aussi impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou agression par des agents pathogènes [97]. Ils présentent un large éventail de propriétés biologiques telles que : antioxydante, anti-allergénique, anti-athérogène, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antithrombotiques, anti-cancérigène, vasodilatateurs et cardioprotecteur [99,101-103].

II.3.2. Origine biosynthétique

Les composés phénoliques sont biosynthétisés par deux grandes voies métaboliques : la voie de shikimate et la voie de l'acétate/malonate.

La voie de shikimate est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques telle que la phénylalanine qui sert de précurseur d'une importante classe des composés phénoliques et les phénylpropanoïdes, ainsi que plusieurs d'autres classes des composés phénoliques [104].

La jonction entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes se fait par l'enzyme Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL) responsable de la désamination de la phénylalanine conduisant ainsi à la formation d'acide *trans*-cinnamique.

L'acide *t*-cinnamique est ensuite transformé en acide *p*-coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'action des enzymes cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et CoA-ligase (4CL). Cette étape conduit directement à la synthèse des différents composés phénoliques (**Figure II.21**) [105]. Une grande diversité caractérise ces phénylpropanoïdes spécifiques du règne végétal. Le squelette carboné subit, de manière régio-spécifique, des réactions d'hydroxylation, de méthylation, de glycosylation, d'acylation, de prénylation ou encore de sulfatation.

Une deuxième voie de biosynthèse consiste à la cyclisation des chaînes polycétonique, elles-mêmes obtenus par condensation de groupement acétates. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl CoA en malonyl CoA catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase [106].

La diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies (du shikimate et de l'acétate) dans l'élaboration de composés d'origine mixte, comme les flavonoïdes.

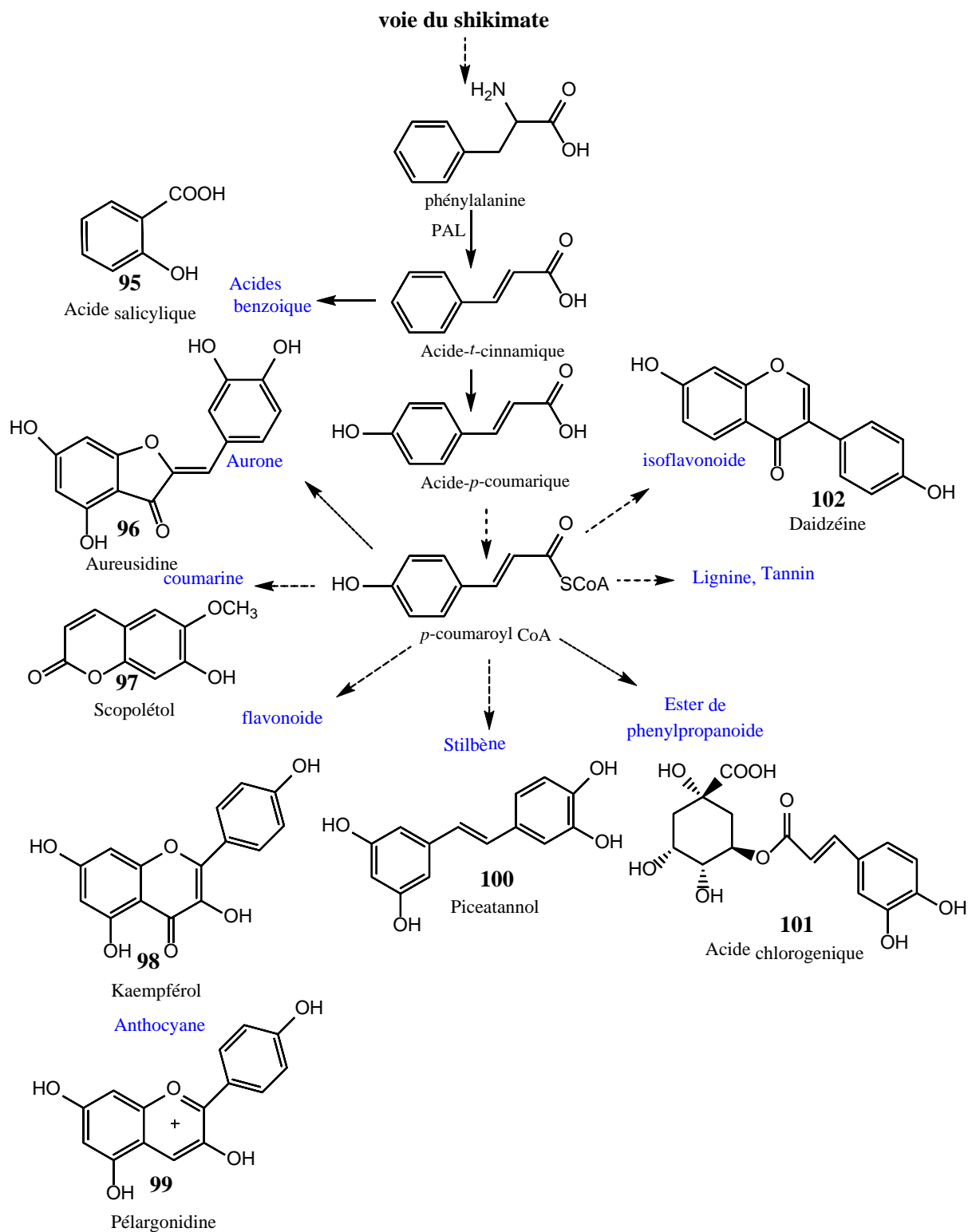


Figure II.21 : Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes de composés phénoliques.

II.3.3. Classification

A cause de leur diversité structurelle, les composés polyphénolique peuvent être classés en se basant sur le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base, le **tableau II.2** regroupe les classes principales de ces composés.

Tableau II.2. Les principales classes de composés phénoliques [101].

Nombre d'atomes de carbone	Squelette carboné	Classe	Exemple
6	C ₆	Phénols simples	Catéchol 103 [107]
7	C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acide salicylique 95 [108]
9	C ₆ -C ₃	Acide hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique 104 [109] Scopolétole 97 [110]
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone 105 [111]
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Cassiaxanthone 106 [112]
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Piceatannol 100 [113]
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides Isoflavonoides	Kaempférol 98 [114] Daidzéine 102 [115]
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol 107 [116]
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Kayaflavone 108 [117]
n	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Lignines Flavolanes (Tannins condensés)	

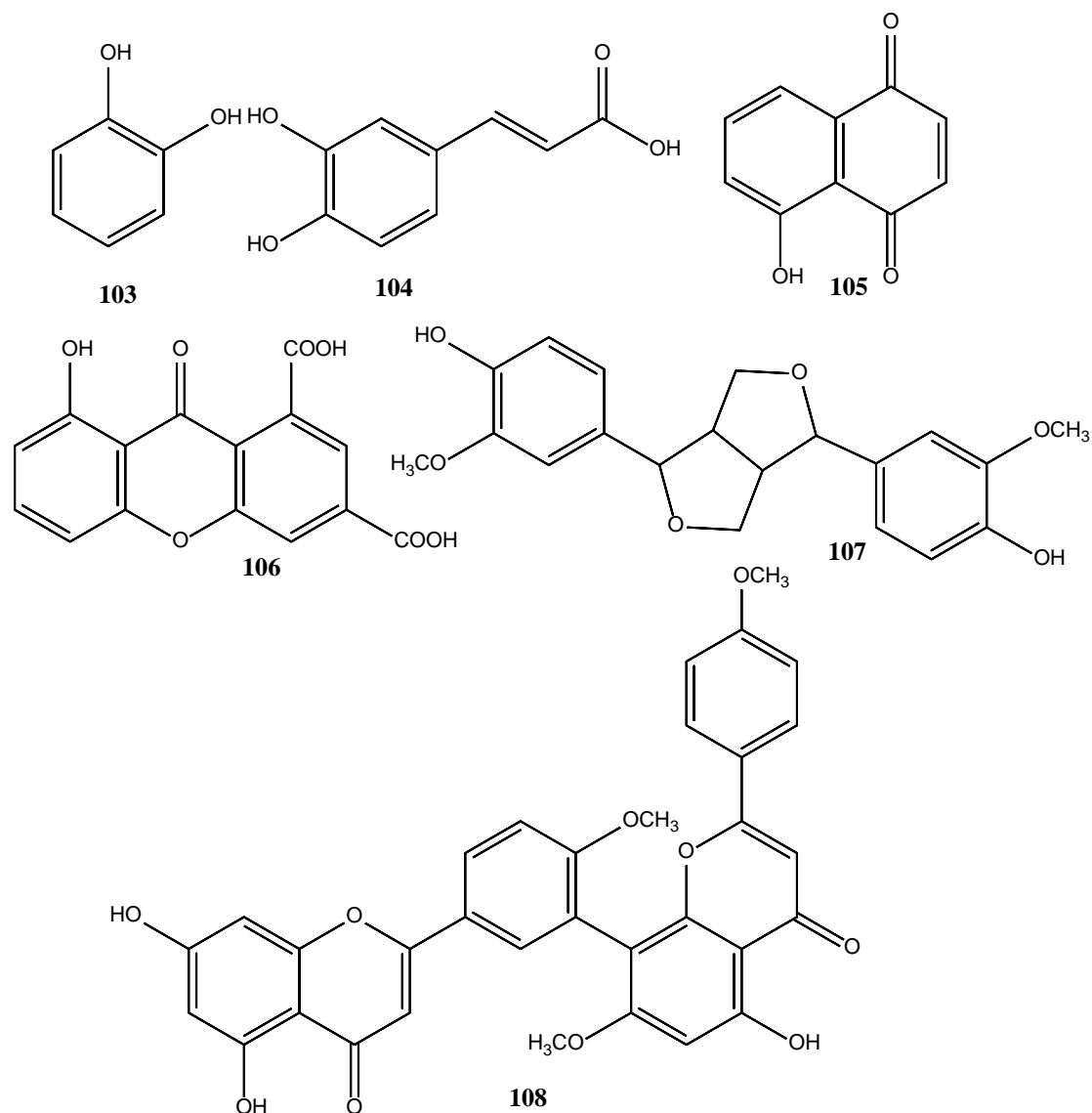


Figure II.22 : Quelques exemples de composés phénoliques

Notre intérêt est essentiellement focalisé sur les acides phénoliques et les flavonoïdes, les deux principaux types de polyphénols les plus fréquents dans les plantes en générale [99], et dans le genre *Linaria* en particulier.

II.3.3.1. Les acides phénoliques

II.3.3.1.1. Définition

Un acide phénolique (ou acide-phénol) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, ils font partie des formes les plus simples des composés phénoliques. Deux classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées : les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique [97].

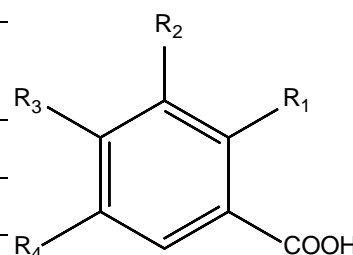
II.3.3.1.2. Les différents types d'acides phénoliques

- **Les acides hydroxybenzoïques**

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque **109**, ils ont une formule de base de type C₆-C₁. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxybenzoïque **23**, protocatéchique **110**, vanillique **111**, gallique **112**, syringique **113** et salicylique **95** [101]. La teneur en acide hydroxybenzoïque dans les plantes comestibles est généralement très faible, à l'exception de certains fruits rouges, radis noir et des oignons, qui peuvent avoir des concentrations de plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de poids frais. Le thé est une source importante d'acide gallique : les feuilles de thé peuvent contenir jusqu'à 4,5 g/kg d'acide gallique [97].

Tableau II.3 : Les principaux acides hydroxybenzoïques

Acides hydroxybenzoïques				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide benzoïque <u>109</u>	H	H	H	H
Acide <i>p</i>-hydroxybenzoïque <u>23</u>	H	H	OH	H
Acide protocatéchique <u>110</u>	H	OH	OH	H
Acide vanillique <u>111</u>	H	OCH ₃	OH	H
Acide gallique <u>112</u>	H	OH	OH	OH
Acide syringique <u>113</u>	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique <u>95</u>	O H	H	H	H



- **Les acides hydroxycinnamiques**

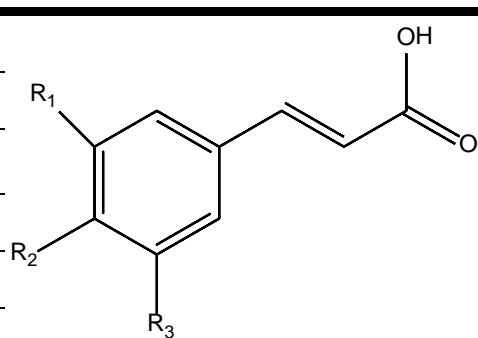
Les acides hydroxycinnamiques sont dérivés de l'acide cinnamique **114** dont la structure de base est constituée d'une chaîne latérale à trois atomes de carbones liés à un noyau aromatique (C₆-C₃) [101].

Les acides hydroxycinnamiques consistent principalement en acide *p*-coumarique **24**, caféique **115**, férulique **116** et sinapique **117** [101]. Ces acides sont rarement trouvés à l'état libre et existent généralement sous forme d'hétéroside ou d'ester de l'acide quinique, shikimique ou tartrique. L'acide caféique et l'acide quinique se combinent pour former de

l'acide chlorogénique **101**, que l'on trouve dans de nombreux types de fruits et en fortes concentrations dans le café. Parmi les fruits les plus riches en acides hydroxycinnamiques sont : les myrtilles, kiwis, prunes, cerises, pommes, elles contiennent de 0,5 à 2,0 g d'acide hydroxycinnamique /kg de poids frais [97].

Tableau II.4. Les principaux acides hydroxycinnamiques.

Acides hydrocinnamiques			
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide cinnamique 114	H	H	H
Acide <i>p</i> -coumarique 24	H	OH	H
Acide caféique 115	OH	OH	H
Acide férulique 116	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique 117	OCH ₃	OH	OCH ₃



II.3.3.2. Les flavonoïdes

II.3.3.2.1. Définition

Dans les années 1930, les scientifiques **Hongrois Rusznyak** et **Szent Györgi** ont identifiés une substance à partir d'écorces de citron considérée comme un agent fortement réducteur et impliquée dans le traitement de la maladie de purpura (une lésion hémorragique de la peau ou des muqueuses) qui était résistante au traitement à la vitamine C. Ils ont appelé cette substance "vitamine P". Plus tard, **Bruckner** et **Szent-Györgyi** ont rapporté que cette "vitamine "P" (ou citrine) n'était pas une substance pure mais constituée d'un mélange des flavonoïdes hespéridine et eriodictyol glucosylé [118]. Depuis, le nombre des flavonoïdes isolés et identifiés n'a cessé de croître, en effet, plus de 9000 structures ont été rapportés jusqu'à présent [119].

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols et largement répandus dans le règne végétal [120]. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [121]. Structuralement, tous les flavonoïdes possèdent un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B),

reliés par une chaîne en C₃ soit un système C₆-C₃-C₆ [104,119], comme le montre la **figure II.23**. Ils existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme glycosylée ou estérifiée [119].

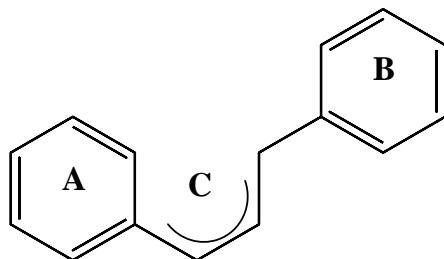


Figure II.23 : Squelette de base des flavonoïdes

II.3.3.2.2. Classification

Les classes de flavonoïdes diffèrent en fonction du degré d'oxydation et de la substitution du cycle C comme le montre la **figure II.24**, tandis que les composés de chaque classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (hydroxylation, alkylation, glycosylation, acylation) sur les deux cycles A et B [101,122].

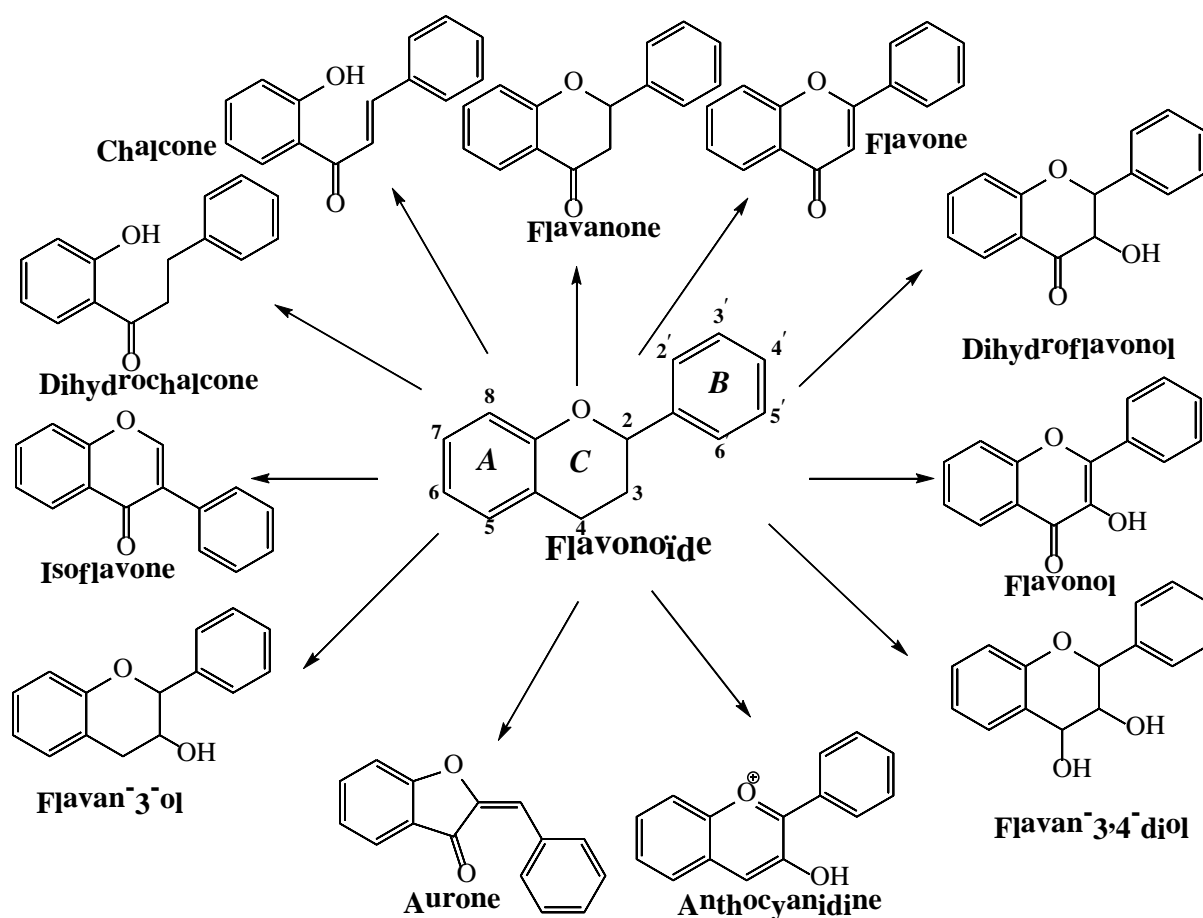


Figure II.24 : Les principales classes des flavonoïdes

- **Flavones et flavonols**

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en positions C₂-C₃, d'une cétone en C₄ et d'un groupement hydroxyle en C₃. Elles représentent les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal. Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en C₃ [123]. Le cycle A des flavones et flavonols, dans plus de 90% des cas, est substitué par deux hydroxyles en C₅ et en C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, même pour l'hydroxyle de la position 3 des flavonols. L'implication du C₆ et/ou C₈ dans une liaison carbone-carbone avec un sucre peut être. Le cycle B, dans 80% des cas, est substitué en C_{4'} ou di substitué en C_{3'} et C_{4'}, ou moins fréquemment trisubstitué en C_{3'}, C_{4'} et C_{5'}. Ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles ou des groupements méthoxyles. Les positions C_{2'} et C_{6'} ne sont qu'exceptionnellement substitués [122-124].

Les flavonols les plus connus sont la quercétine **118**, le kaempférol **98** et la myricétine **37**, tandis que l'apigénine **33** et la lutéoline **34** sont les flavones les plus connus [125].

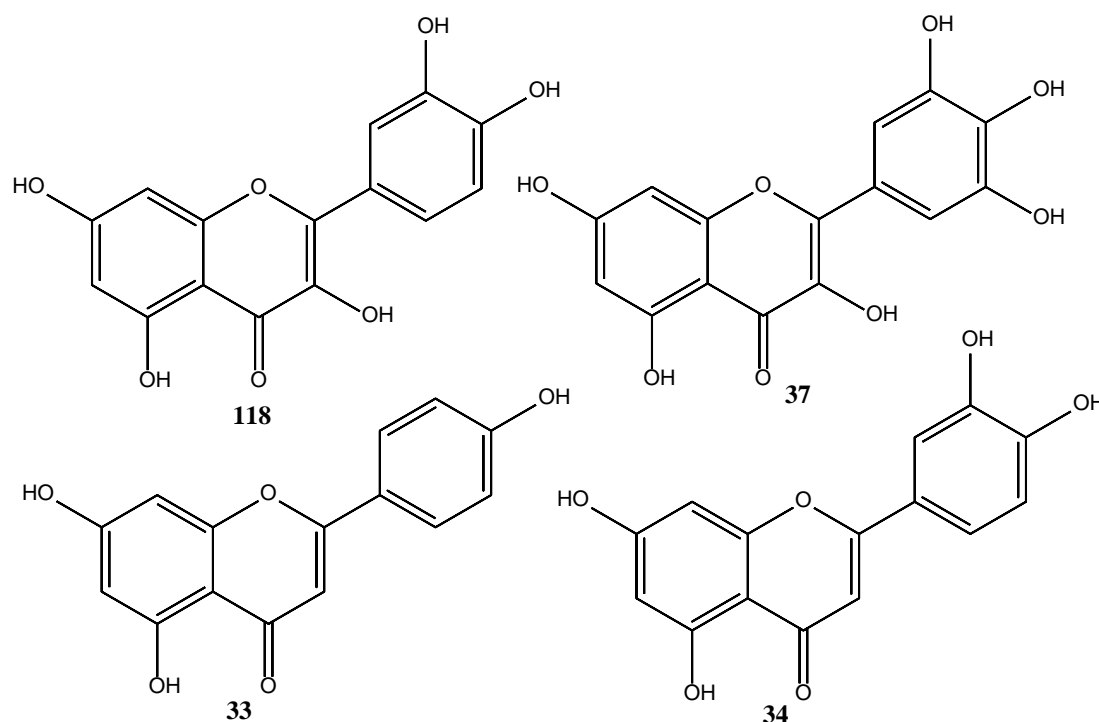


Figure II.25 : Quelques exemples de flavonols et flavones

- **Flavanones et dihydroflavonols**

Les flavanones et les dihydroflavonols jouent un rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des flavonoïdes [126]. Ils sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre le C₂ et le C₃ et par la présence de centres asymétriques. Les variations structurales sont

ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols (aromadendrine **119** [127]) se distinguent des flavanones (naringénine **120** [128]) par l'hydroxylation de la position C₃ [123,129].

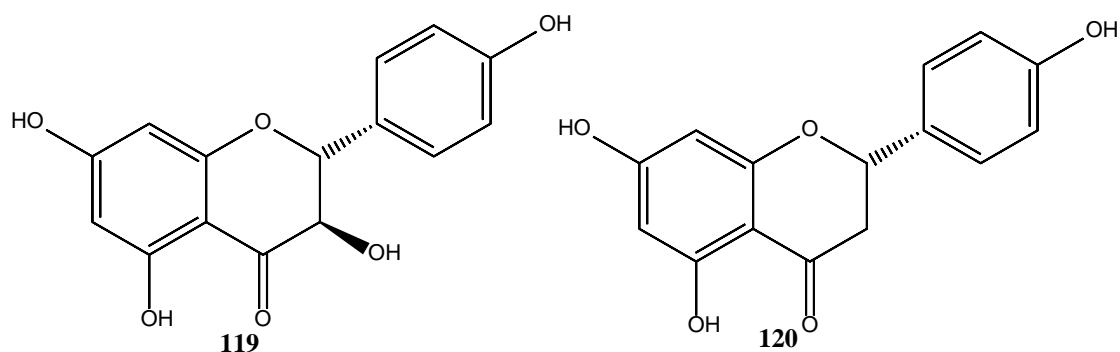


Figure II.26 : Structure de l'aromadendrine et la naringénine

Cette classe des flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols. Mais, Au cours des 15 dernières années, le nombre de flavanones et dihydroflavonols a considérablement augmenté [123], dont environ 350 flavanones aglycones, 150 dihydroflavonols aglycones, 100 flavanones glycosides et 70 dihydroflavonols glycosides ont été reportés [129].

- **Isoflavonoïdes**

Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B attaché en position C₃ plutôt que la position C₂. Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (**Figure II.28**) regroupent environ 300 types d'isoflavones, parmi ces sous-classes, la génistéine **121** et la daïdzéine **102** [130] sont les plus communes. La présence d'isoflavonoïdes se concentre principalement dans la famille des Leguminosae (environ 85%) [123,129].

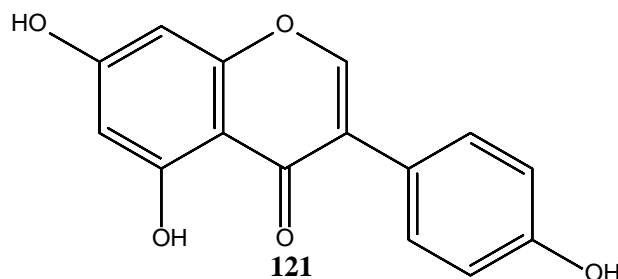


Figure II.27 : Structure de la génistéine

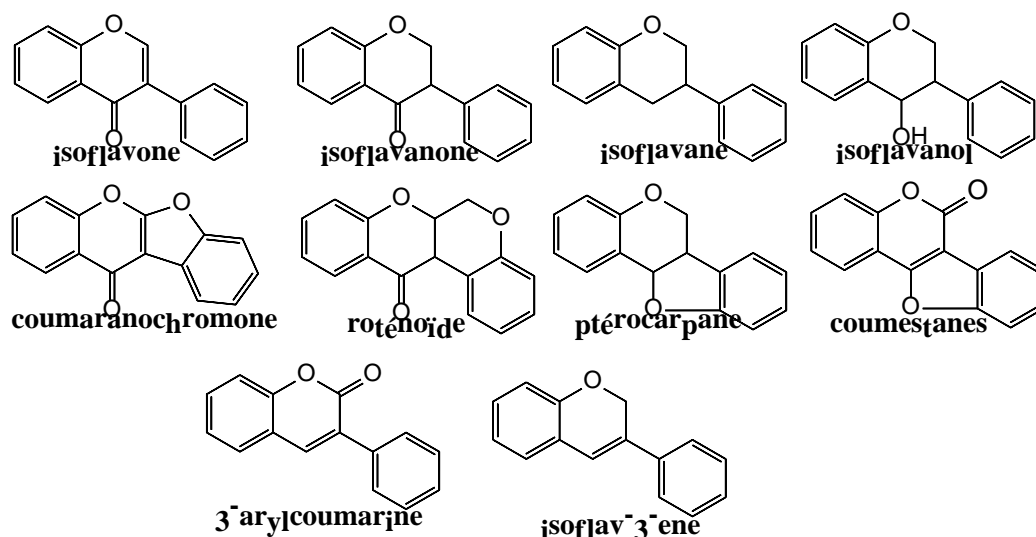


Figure II.28 : Les différentes sous-classes d'isoflavonoïdes

- **Chalcones et aures**

Les chalcones (phloridzine **122** [131]) sont caractérisés par un noyau pyranique central ouvert, ils sont constitués de deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée cétonique (Figure II.24). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aures (aureusidine **96** [132]) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone (Figure II.24) [123,129].

Environ 250 et 18 aglycones de chalcones et aures, respectivement et environ 60 et 27 de glycosides de chalcones et d'aures, respectivement ont été reportés [129].

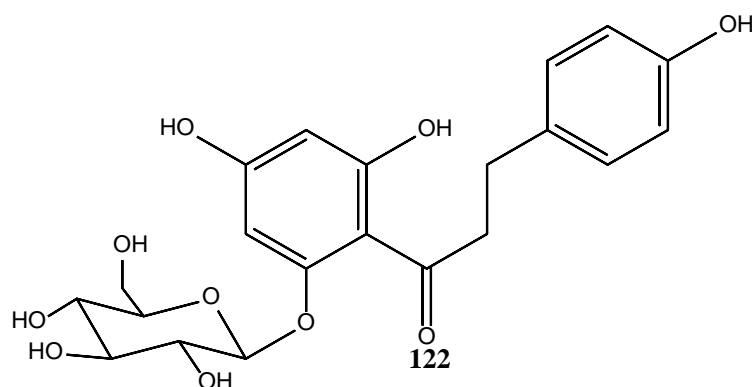


Figure II.29 : Structure de la phloridzine

II.3.3.2.3. Origine biosynthétique des flavonoïdes

Comme il a été précisé auparavant, les flavonoïdes possèdent un squelette de base commun à quinze atomes de carbone, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. L'étape clé de cette biosynthèse est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en générale le 4-coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2', 4', 6'-tetrahydrochalcone, cette réaction enzymatique est catalysée par la chalcone synthase (CHS) [120].

La cyclisation stéréospécifique des chalcones, catalysée par la chalcone isomérase (également connue sous le nom de chalcone-flavanone isomérase, CHI) conduit aux 2S-flavanones. Les chalcones peuvent également se cycliser en aurones [133-134].

La flavone synthase (FS) et la flavanone-3-hydroxylase (F3H) réagissent directement sur les flavanones pour donner les flavones, et les dihydroflavonols, respectivement. Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C₃ [133-134].

Les dihydroflavonols sont considérés comme un intermédiaire direct pour la synthèse des flavonols, par introduction d'une double liaison entre les carbones C₂ et C₃. La réaction est catalysée par la flavonol synthase (FLS), tandis que les dihydroflavonols catalysée par la dihydroflavonol réductase (DRF) conduisent à la production des flavan-3, 4-diols (les leuco-anthocyanidines). Ces derniers sont des intermédiaires biosynthétique dans la formation des anthocyanidines [120].

L'oxydation des flavanones suivi d'un réarrangement du groupement aryle de C₂ à C₃ en présence d'enzyme Isoflavone synthase (IFS) conduit à la formation d'isoflavones [135].

Les étapes de la biosynthétique de quelques flavonoïdes et les enzymes impliquées sont rassemblés dans la figure II.30 et tableau II.5.

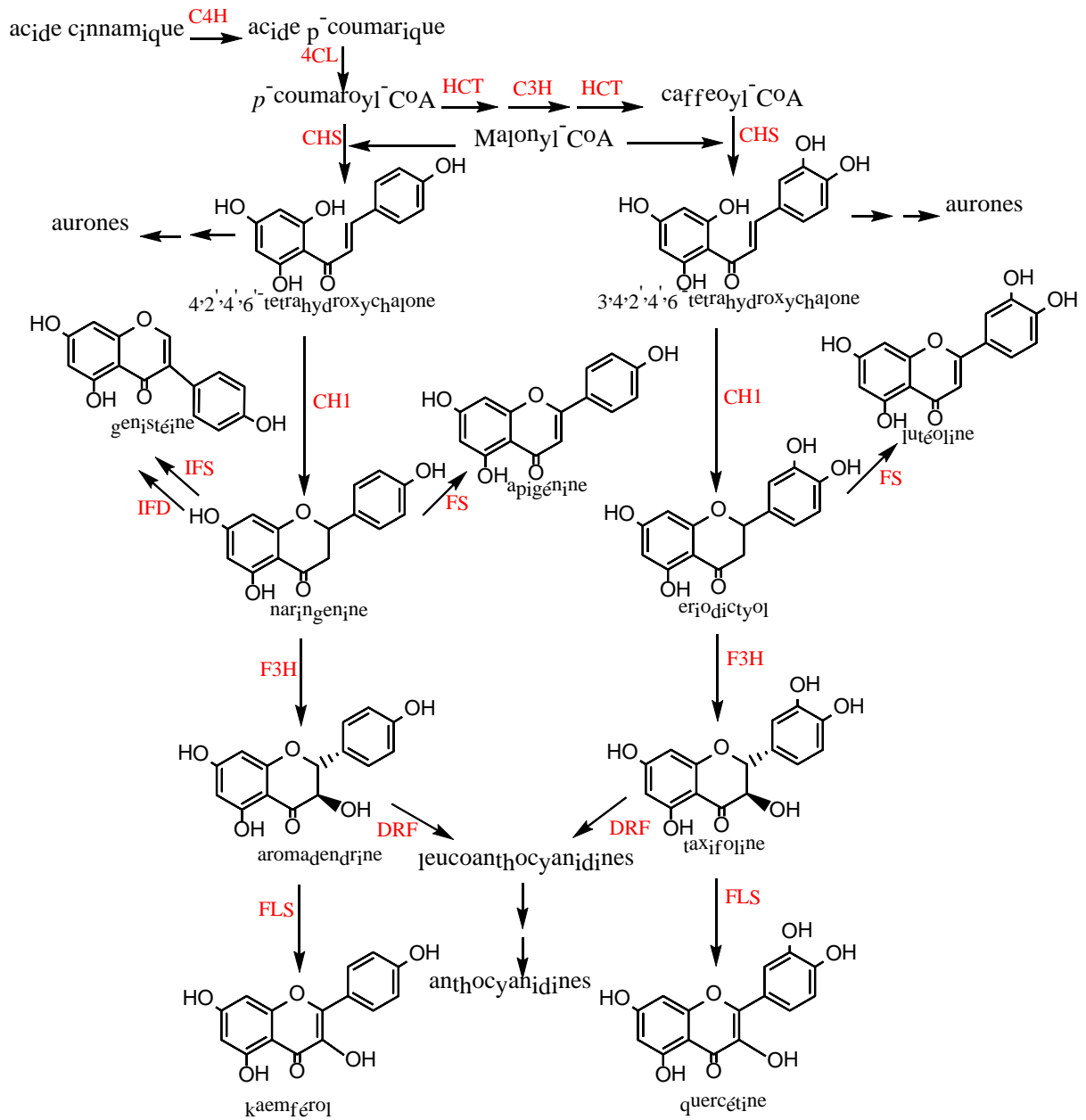


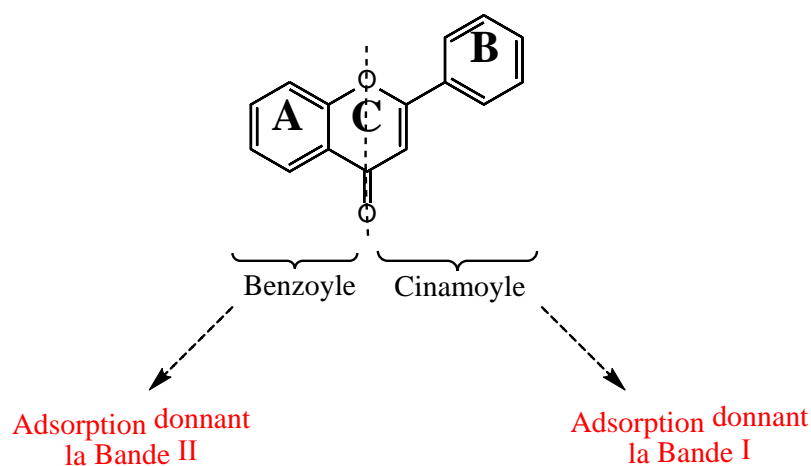
Figure II.30 : La biosynthétique de quelques flavonoïdes les plus connus

Tableau II.5 : Tableau récapitulatif des différents enzymes impliqués dans la biosynthèse

Enzyme	Acronyme
Cinnamate 4-Hydroxylase	C4H
4-Coumarate: CoA Ligase	4CL
p-Hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinatase	HCT
p-hydroxyCinnamoylTransferase	C3H
p-Coumarate 3-Hydroxylase	C3H
CHalcone Synthase	CHS
CHalcone Isomérase	CHI
Flavone Synthase	FS
2-HydroxyIsoFlavone Synthase	IFS
2-HydroxyIsoFlavone Déshydratase	IFD
Flavanone 3-Hydroxylase	F3H
FlavonoL Synthase	FLS
DihydroFlavonol 4-Réductase	DFR

II.3.3.2.4. Caractéristiques spectrophotométriques UV-visible des flavonoïdes

La spectrophotométrie UV-Visible est une technique très importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanolique) caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II (**Figure II. 31**) [136].

**Figure II.31** : Les deux bandes d'adsorption dans les flavonoïdes

Les spectres d'absorption UV-Visible des flavones et des flavonols en milieu méthanolique présentent deux grandes bandes d'absorption: La bande I [(320-350nm) et (352-385 nm), respectivement] attribuée à l'absorption du système cinamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C₂-C₃) et le noyau B, tandis que la bande II [(250-270nm)et (250-280 nm), respectivement] correspond à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A. Le spectre méthanolique des flavanones est caractérisé par l'apparition de la bande I sous forme d'un épaulement entre 300 et 330 nm due à l'absence de la conjugaison entre la double liaison (C₂-C₃) et le noyau B, et d'un très fort maximum d'absorption en Bande II entre 270 et 295 nm [122,136-138]. Les isoflavonoïdes sont également caractérisé par l'apparition de la bande I sous forme d'un épaulement à cause de l'absence de la conjugaison entre le groupement carbonyle et le noyau B [139].

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [137,140].

Les deux bandes d'absorption caractéristique d'un spectre UV-Visible d'un squelette flavonique sont susceptibles d'être modifiés par addition de réactifs tels que NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromes ou hypsochromes des bandes d'absorption par rapport au spectre méthanolique, dans le but de localiser des hydroxyles libres sur le squelette flavonique [140,141]. Le tableau II.6 récapitule les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs dans le cas des flavones et flavonols.

Tableau II.6 : Les principaux déplacements des bandes I et II dans le cas de flavone

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	Flavones
	328-357	250-280	Flavonols 3-OR
NaOMe (NaOH)	- Stable + 45 à +65		4'-OH
	1- augmentation de l'intensité / MeOH.		
	2- Diminution ou stabilité de l'intensité / MeOH.		4'-OR; 3-OH
	-Diminution de l'intensité avec le temps et décomposition.		3, 4'-OH; Ortho di-OH sur A (6, 7) ou (7, 8).
	Nouvelle bande par rapport au spectre MeOH entre [320-335]		7-OH
NaOAc/MeOH	+5 à +20		7-OH
	déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8 .		
	Pas de déplacement ou très faible.		7-OR
	Spectre qui se décompose avec le temps.		5, 6, 7-tri-OH ou 5, 7, 8 tri-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃ /MeOH	+12 à +36		Ortho di-OH sur B
	+05 à +10		Ortho di-OH sur A (6, 7) ou (7, 8) .
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430.		Ortho di-OH sur B avec 5-OH
(AlCl ₃ + HCl) /MeOH	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6 .
	+35 à +55		5-OH et 3-OCH₃
(AlCl ₃ +HCl) / AlCl ₃	-20 à -40		Ortho di-OH sur B .
	avec un sommet ou épaulement entre [350-360].		Ortho di-OH sur A et ortho di-OH sur B ou tri-OH sur B .
	-20 à -25		

/ = par rapport à.

(-) = hypsochrome.

(+) = bathochrome

II.3.3.2.5. Propriétés des flavonoïdes

a) Les fonctions des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction et la fertilité [142], de la symbiose [104,143] et de la pathogénèse [144]. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles [142]. Les flavonoïdes contribuent à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs [104] et jouent cependant un rôle important dans les interactions avec les insectes [144]. Les flavonoïdes sont également impliqués dans le mécanisme d'intervention contre l'infection par des micro-organismes ou l'attaque par les herbivores [142].

b) Les activités biologiques des flavonoïdes

✓ **Activité antioxydante**

Le stress oxydatif est considéré comme un facteur important, ou même crucial, dans l'apparition et le développement de nombreuses affections et maladies actuelles, notamment l'inflammation, les maladies auto-immunes, le cancer, la maladie de Parkinson, l'artériosclérose, le vieillissement, les maladies cardiaques et les maladies neurodégénératives. Les antioxydants sont des substances qui retardent ou empêchent considérablement l'oxydation d'un substrat oxydable protégeant ainsi les cellules humaines, animales et végétales contre les effets néfastes des radicaux libres (espèces réactives oxygénées, ROS).

Les flavonoïdes sont bien connus pour leur activité antioxydante, ils font partie des antioxydants produits par les plantes pour leur subsistance [104,120].

L'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur structure, où les résultats obtenus par des études appropriées ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants [145-147] :

- Une double liaison en C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction oxo en C₄.
- La présence d'une hydroxylation en C₃ en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ Une ortho-dihydroxylation du cycle B.
- Une dihydroxylation en C₅ et C₇ du cycle A.

Des études concernant l'activité antioxydante des flavonoïdes et leurs formes glycosylés ont montré que la glycosylation diminue largement l'activité antioxydante. La O-méthylation a donné des résultats semblables.

Un autre intérêt a été accordé aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes attribuées à leur pouvoir de chélater les ions métalliques [145,148]. Les trois principaux sites de complexité avec des métaux sont [147]:

- Entre l'hydroxyle en C₅ et le carbonyle en C₄.
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en C₄.
- Entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

✓ **Autres activités biologiques des flavonoïdes**

Comme il a été démontré par de nombreux travaux, les flavonoïdes sont des molécules de défense contre les organismes pathogènes, ce qui leur confère un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. De plus, les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leur action antioxydante en combattant les radicaux libres mises en cause dans de nombreux processus dégénératifs ce qui explique un certain nombre de leurs propriétés thérapeutiques.

Pour cela, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-inflammatoires [120,149], antivirales [120,150,151], anti-tumorales [120,152], anti carcinogènes [152,153], antiallergiques [154], antifongiques [120,155,156], antiulcéreux [154,157], antibactériens [120,158]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [120,159], ils ont également des actions positives sur le diabète [120,160], et contre la dégénérescence des neurones principalement dans le cas de la maladie de Parkinson [161] et la maladie d'Alzheimer [162]. Certains flavonoïdes sont supposés apporter un intérêt contre l'obésité [163].

Référence bibliographique

- [1] Bessam FZ. and Mehdadi Z. Evaluation of the Antibacterial and Antifongigal Activity of different extracts of Flavonoïques *Silybum Marianum* L. *Advances in Environmental Biology*. **2014**. 8:1-9.
- [2] Ahmed E., Arshad M., Khan MZ., Amjad MS., Sadaf HM., Riaz I., Sabir S. and Nabila Ahmad A. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **2017**. 6: 205-214.
- [3] Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **2001**. 161:839-851.
- [4] John SA. and Annadurai A. GC-MS screening of active secondary metabolites present in the *Cleome gynandra*. *International Journal of Phytopharmacy*. **2015**. 5:47-52.
- [5] Phillips MA. and Croteau RB. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci*. **1999**. 4:184-190.
- [6] Martin VJ., Pitera DJ., Withers ST., Newman JD. and Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*. **2003**. 21:796-802.
- [7] Goto T., Takahashi N., Hirai S. and Kawada T. Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism. *PPAR Res*. **2010**. 10:1-9.
- [8] Black CA., Parker M., Siebert TE., Capone DL. and Francis IL. Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **2015**. 21:582-600.
- [9] Bohlmann J. and Keeling CI. Terpenoid biomaterials. *Plant J*. **2008**. 54:656-669.
- [10] McGarvey DJ. and Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*. **1995**. 7:1015-1026.
- [11] Guimarães AG., Quintans JSS. and Quintans-Júnior LJ. Monoterpenes with analgesic Activity-A systematic review. *Phytother Res*. **2012**. 27:1-15.
- [12] Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytekan M. and Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp*. **2007**. 55:315-327.
- [13] Kanko C., Oussou RK., Akcah J., Boti JB., Seri-Kouassi BP. and Casanova J. Structure des composés majoritaires et activité insecticide des huiles essentielles extraites de sept plantes aromatiques de Côte D'ivoire. *International Journal of Engineering and Applied Sciences*. **2017**. 4:27-34.
- [14] Zhou W., Fukumoto S. and Yokogoshi H. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. *Nutr Neurosci*. **2009**. 12:57-64.
- [15] Murali R. and Saravanan R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Preven Nutri*. **2012**. 2:269-275.
- [16] Devappa RK., Makkar HPS. and Becker K. *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc*. **2011**. 88:301-22.
- [17] Kataev VE., Khaybullin RN., Sharipova RR. and Strobykina IY. Ent-Kaurane Diterpenoids and Glycosides: Isolation, Properties, and Chemical Transformations. *Review Journal of Chemistry*. **2011**. 1:93-160.

- [18] Xiao XH., Yuan ZQ. and Li GK. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*. **2013**. 104:284-289.
- [19] Hossen F., Ahasan R., Haque MR., Begum B. and Hasan CM. Crispene A, B, C and D, Four New Clerodane Type Furanoid Diterpenes from *Tinospora crispa* (L.). *Pharmacogn Mag*. **2016**. 12:37-41.
- [20] Staniszevska J., Szymański M. and Ignatowicz E. Antitumor and immunomodulatory activity of *Inonotus obliquus*. *Botanical to Medical Research*. **2017**. 63: 48-58.
- [21] Heinig U. and Jennewein S. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African Journal of Biotechnology*. **2009**. 8:1370-1385.
- [22] Jian B., Zhang H., Han C. and Liu J. Anti-Cancer Activities of Diterpenoids Derived from *Euphorbia fischeriana* Steud. *Molecules*. **2018**. 23:387.
- [23] Topçuağ G. and Gören AC. Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants. *Rec Nat Prod*. **2007**. 1:1-16.
- [24] Nagarajan A. and Brindha P. Diterpenes-A Review on Therapeutic uses with special emphasis on Antidiabetic Activity. *Journal of Pharmacy Research*. **2012**. 5:4530-4540.
- [25] Tirapelli CR., Ambrosio SR., da Costa FB. and de Oliveira AM. Diterpenes: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*. **2008**. 3:1-8.
- [26] Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I. and Król W. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules*. **2015**. 20:1610-1625.
- [27] Wang Z., Guhling O., Yao R., Li F., Yeats TH., Rose JKC. and Jetter R. Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit Cuticular Triterpenoids. *Plant Physiol*. **2011**. 155:540-552.
- [28] Ma J., Whittaker P., Keller AC., Mazzola EP., Pawar RS., White KD., Callahan JH., Kennelly EJ., Krynitsky AJ. and Rader JI. Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia*. *Planta Med*. **2010**. 76:1758-1761.
- [29] Sun H., Fang WS., Wang WZ. and Hu C. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type Triterpenoids. *Botanical Studies*. **2006**. 47:339-368.
- [30] Fu L., Zhang S., Li N., Wang J., Zhao M., Sakai J., Hasegawa T., Mitsui T., Kataoka T., Oka S., Kiuchi M., Hirose K. and Ando M. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J Nat Prod*. **2005**. 68:198-206.
- [31] Kuo RY., Qian K., Morris-Natschke SL. and Lee KH. Plant derived triterpenes and analogues as antitumor and anti HIV agents. *Nat Prod Rep*. **2009**. 26:1321-1344.
- [32] Katerere DR., Gray AI., Nash RJ. and Waigh RD. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*. **2003**. 63:81-88.
- [33] Yuan WH., Yi YH., Xue M., Zhang HW. and La MP. Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chin J Nat Med*. **2008**. 6:105-108.
- [34] Bishayee A., Ahmed S., Brankov N. and Perloff M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci*. **2011**. 16:980-996.
- [35] D'Abrosca B., Florentino A., Monaco P. and Pacifico S. Radical-scavenging activities of new hydroxylated ursane triterpenes from cv. Annurca apples. *Chem Biodiv*. **2005**. 2:953-958.

- [36] Lee MK. and Kim YC. Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J Nat Prod.* **2001.** 64:328-331.
- [37] Danelli MGM., Soares DC., Abreu HS., Pecanha LMT. and Saraiva EM. Leishmanicidal effect of LLD-3, a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry.* **2009.** 70:608-614.
- [38] Jensen SR. and Schripsema J. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, L & Albert V. *Eds Cambridge University Press.* **2002.** 573-584.
- [39] Refaeya MS., Hassanein AMM., Mostafa MAH., Wanas AS. and Ali AA. Two new iridoid glycosides from *Odontonema cuspidatum* and their bioactivities. *Phytochemistry Letters.* **2017.** 22:27-32.
- [40] Ghisalberti EL. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine.* **1998.** 5:147-163.
- [41] Song JL., Wang R., Shi YP. and Qi HY. Iridoids from the flowers of *Gardenia jasminoides* Ellis and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology.* **2014.** 56:267-270.
- [42] Dinda B., Debnath S. and Harigaya Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* **2007.** 55:159-222.
- [43] Rivière C., Goossens L., Guerardel Y., Maes E., Garénaux E., Pommery J., Pommery N., Désiré O., Lemoine A., Telliez A., Delelis A. and Hénichart JP. Chemotaxonomic interest of iridoids isolated from a Malagasy species: *Perichlaena richardii*. *Biochemical Systematics and Ecology.* **2011.** 39:797-825.
- [44] Bruneton J. Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes Médicinales), **4ème Ed.** *Tech & Doc, Paris.* **2009.** 707-729.
- [45] Cavill G., Ford D. and Locksley H. The chemistry of ants. I. Terpenoid constituents of some Australian Iridomyrmex species. *Aust J Chem.* **1956.** 9:288.
- [46] Cavill G. and Ford D. The Chemistry of Ants. III. Structure and Reactions of Iridodial. *Aust J Chem.* **1960.** 13:295.
- [47] Briggs LH., Cain BF., Le Quesne PW. and Shoolery JN. The structure of asperuloside. *Tet Lett.* **1963.** 4:69-74.
- [48] Dinda B. and Debnath S. Monoterpenes: Iridoids. In Ramawat K, Mérillon J (Eds). *Natural Products.* Berlin Heidelberg: Springer, **2013.** 3009-3067.
- [49] Ilieva E., Khandzheva N. and Popov S. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry.* **1992.** 31:1040-1041.
- [50] Kanchanapoom T., Kasai R. and Yamasaki K. Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia*. *Phytochemistry.* **2002.** 60:769-771.
- [51] Morota T., Sasaki H., Nishimura H., Sugama K., Chin M. and Mitsunashi H. Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry.* **1989.** 28:2149-2153.
- [52] Boros CA. and Stermitz FR. Iridoids. An Updated Review, Part I. *Journal of Natural Products.* **1990.** 53:1061.
- [53] Manguro LOA., Ogur JA., Okora DM., Wagai SO. and Lemmen P. Further flavonol and iridoid glycosides from *Ajuga remota* aerial parts. *J Asian Nat Prod Res.* **2007.** 9:617-629.
- [54] Morikawa T., Pan Y., Ninomiya K., Imura K., Yuan D., Yoshikawa M., Hayakawa T. and Muraoka O. Iridoid and Acyclic Monoterpene Glycosides, Kankanosides L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem Pharm Bull.* **2010.** 58:1403-1407.

- [55] Schripsema J., Caprini GP., van der Heijden R., Bino R., de Vos R. and Dagnino D. Iridoids from *Pentas lanceolata*. *J Nat Prod.* **2007.** 70:1495-1498.
- [56] Takeda Y., Kiba Y., Masuda T., Otsuka H., Honda G., Tagawa M., Sezik E. and Yesilada E. Nepetaracemosides A and B, Iridoid Glucosides from *Nepeta racemosa*, *Chem Pharm Bull.* **1999.** 47: 1433-1435.
- [57] Calis I., Yuruker A., Ruegger H., Wright AD. and Sticher O. Lantanoside, a monocyclic C10 iridoid glucoside from *viburnum lantana*. *Phytochemistry.* **1995.** 38:163-165.
- [58] Jin JL., Lee S., Lee YY., Heo JE., Kim JM. and Yun-Choi HS. Two new non-glycosidic iridoids from the leaves of *Campsis grandiflora*. *Planta Med.* **2005.** 71:578-580.
- [59] Kaneko T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. and Duc NM. Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry.* **1997.** 45:907-910.
- [60] Krohn K., Gehle D., Dey SK., Nahar N., Mosihuzzaman M., Sultana N., Sohrab MH., Stephens PJ., Pan JJ. and Sasse F. Prismatomerin, a new iridoid from *Prismatomeris tetrandra*. Structure elucidation, determination of absolute configuration, and cytotoxicity. *J Nat Prod.* **2007.** 70:1339-1343.
- [61] Dai JQ., Liu ZL. and Yang L. Non-glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica*. *Phytochemistry.* **2002.** 59:537-542.
- [62] Dinda B., Debnath S. and Harigaya Y. Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* **2007.** 55:689-728.
- [63] Yoshikawa M., Ueda T., Matsuda H., Yamahara J. and Murakami N. absolute stereostructures of hydramarosides A and B, new bioactives secoiridoid glucoside complexes from the leaves of *hydrangea macrophylla* seringe var. *thunbergii* makino. *Chem Pharm Bull.* **1994.** 42:1691-1693.
- [64] Cheng MJ., Tsai IL. and Chen IS. Chemical Constituents from *Strychnos Cathayensis*. *J Chin Chem Soc.* **2001.** 48:235-239.
- [65] Zuleta LMC., Cavalheiro AJ., Silva DHS., Furlan M., Young MCM., Albuquerque S., Castro-Gamboa I. and Bolzani VDS. seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* **2003.** 64:549-553.
- [66] Jensen SR., Franzyk H. and Wallander E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry.* **2002.** 60:213-231.
- [67] Hamerski L., Furlan M., Silva DHS., Cavalheiro AJ., Eberlin MN., Tomazela DM. and Bolzani VDS. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* **2003.** 63:397-400.
- [68] Cuender M., Hostettmann K., Potterat O. and Dyatmiko W. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta.* **1997.** 80:1144-1152.
- [69] Calis I., Kirmizibekmez H. and Sticher O. Iridoid glycosides from *Globularia trichosantha*. *J Nat Prod.* **2001.** 64:60-64.
- [70] Tanahashi T., Takenaka Y. and Nagakura N. two dimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum polyanthum*. *Phytochemistry.* **1996.** 41:1341-1345.
- [71] Graikou K., Aligiannis N., Chinou IB. and Harvala C. Cantleyoside-dimethyl-acetal and Other Iridoid Glucosides from *Pterocephalus perennis* - Antimicrobial Activities. *Z Naturforsch.* **2002.** 57:95-99.

- [72] Muller AA. and Weigend M. iridoids from *Loasa acerifolia*. *Phytochemistry*. **1998**. 49:131-135.
- [73] Itoh A., Oya N., Kawaguchi E., Nishio S., Tanaka Y., Kawachi E., Akita T., Nishi T. and Tanahashi T. Secoiridoid Glucosides from *Strychnos spinosa*. *J Nat Prod*. **2005**. 68:1434-1436.
- [74] Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D. and Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*. **2004**. 61:1401-1426.
- [75] O'Connor SE. and Maresh JJ. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep*. **2006**. 23:532-547.
- [76] Contin A., van der Heijden R., Lefeber AW. and Verpoorte R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett*. **1998**. 434:413-416.
- [77] Collu G., Unver N., Peltenburg-Looman AMG., van der Heijden R., Verpoorte R. and Memelink J. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett*. **2001**. 508:215-220.
- [78] Collu G., Garcia AA., van der Heijden R. and Verpoorte R. Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures. *Plant Sc*. **2002**. 162:165-172.
- [79] Inouye H., Ueda S. and Uesato S. Intermediacy of iridodial in the biosynthesis of some iridoid glucosides. *Phytochemistry*. **1977**. 16:1669-1675.
- [80] Mann J., Davidson R., Hobbs J., Banthorpe D. and Harborne JB. *Natural products: their chemistry and biological significance*. Longman Scientific & Technical: **1994**.
- [81] Sampaio-Santos MI. and Kaplan MAC. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2001**. 12:144-153.
- [82] Dewick PM. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural product reports*. **2002**. 19:181-222.
- [83] Sun P., Song S., Zhou L., Zhang B., Qi J. and Li X. Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*. *International journal of molecular sciences*. **2012**. 13:13748-13763.
- [84] Wegener T. and Lüpke NP. Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens* DC.). *Phytother Res*. **2003**. 17:1165-1172.
- [85] Mirzaee F., Hosseini A., Jouybari HB., Davoodi A. and Azadbakht M. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. *J Tradit Complement Med*. **2017**. 7:400-408.
- [86] Carbonezi CA., Martins D., Young MCM., Lopes MN., Furlan M., Filho ER. and Bolzani VdS. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. **1999**. 51:781-785.
- [87] Chena B., Liu Y., Liuc HW., Wanga NL., Yang BF. and Yao XS. Iridoid and Aromatic Glycosides from *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. And Their Inhibition of $[Ca^{+2}]_i$ Increase Induced by KCl. *chemistry and biodiversity*. **2008**. 5:1723-1735.
- [88] Boje K., Lechtenberg M. and Nahrstedt A. New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. *Planta Medica*. **2003**. 69:820-825.

- [89] Kumarasamy Y., Nahar L., Cox PJ., Jaspars M. and Sarker SD. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine*. **2003**. 10:344-347.
- [90] da Silva VC., Giannini MJSM., Carbone V., Piacente S., Pizza C., Bolzani VdS. and Lopes MN. New Antifungal Terpenoid Glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). *Helv Chim Acta*. **2008**. 91:1355-1362.
- [91] Cuendet M., Potterat O. and Hostettmann K. Iridoid glucosides, phenylpropanoid derivatives and flavonoids from *Bartsia alpina*. *Pharmaceutical Biology*. **1999**. 37:318-320.
- [92] Chiang LC., Ng LT., Chiang W., Chang MY. and Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med*. **2003**. 69: 600-604.
- [93] Stevenson PC., Simmonds MSJ., Sampson J., Houghton PJ. and Grice P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. *Phytother Res*. **2002**. 16:33-35.
- [94] Kim SR., Lee KY., Koo KA., Sung SH., Lee NG. and Kim JW. Four new neuroprotective iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* roots. *J Nat Prod*. **2002**. 65:1696-1699.
- [95] Huang WJ., Niu HS., Lin MH., Cheng JT. and Hsu FL. Antihyperglycemic Effect of Catalpol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nat Prod*. **2010**. 73:1170-1172.
- [96] Jaishree V., Badami S. and Krishnamurthy PT. Antioxidant and hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Enicostemma axillare* (Lam). Raynal against CCL4-induced liver injury in rats. *Indian J Exp Biol*. **2010**. 48:896-904.
- [97] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. **2004**. 79:727-747.
- [98] Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. **2005**. 81:223-229.
- [99] Scalbert A., Manach C., Morand C. and Rémésy C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2005**. 45:287-306.
- [100] Bruneton J. Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales), **3ème Ed**, Paris. **1998**.
- [101] Balasundram N., Kalyana Sundram K. and Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **2006**. 99:191-203.
- [102] Wong CC., Li HB., Cheng KW. and Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*. **2006**. 97:705-711.
- [103] Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. and Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **2007**. 45:244-249.
- [104] Ghasemzadeh A. and Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2011**. 5:6697-6703.
- [105] Kuete V. Phenylpropanoids and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. **2013**. 251-260.

- [106] Fleeger JL. and Flipse IJ. Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J Dairy Sci.* **1964.** 47: 535-8.
- [107] Huang S., Zhang CP., Li GQ., Sun YY., Wang K. and Hu FL. Identification of Catechol as a New Marker for Detecting Propolis Adulteration. *Molecules.* **2014.** 19:10208-10217.
- [108] Takač MJM. and Topić D. FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives. *Acta Pharm.* **2004.** 54:177-191.
- [109] Exarchou V., Troganis A., Gerotheranassis IP., Tsimidou M. and Boskou D. Identification and Quantification of Caffeic and Rosmarinic Acid in Complex Plant Extracts by the Use of Variable-Temperature Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem.* **2001.** 49:2-8.
- [110] Mehul KB., Dholwani Kishor KD. and Ajay KS. Isolation and structure elucidation of Scopoletin from *Ipomoea reniformis* (Convolvulaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* **2011.** 01:138-144.
- [111] Marion Meyer JJ., Van der Kooy F. and Joubert A. Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC. *South African Journal of Botany.* **2007.** 73:654-656.
- [112] Nair MSR., Mcmorris TC. and Anchel M. Cassiixanthone, a hydroxyxanthone dicarboxylic acid from *cassia* species. *Phytobmishy.* **1970.** 9:1153-1155.
- [113] Sano S., Sugiyama K., Ito T., Katano Y. and Ishihata A. Identification of the Strong Vasorelaxing Substance Scirpusin B, a Dimer of Piceatannol, from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds. *J Agric Food Chem.* **2011.** 59:6209-6213.
- [114] Wahab A., Tahira., Begum S., Ayub A., Mahmood I., Mahmood T., Ahmad A. and Fayyaz N. Luteolin and kaempferol from *cassia alata*, antimicrobial and antioxidant activity of its methanolic extracts. *Fuuast J Biol.* **2014.** 4:1-5.
- [115] Andres S., Hansen U., Niemann B., Palavinskas R. and Lampen A. Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover. *Food Funct.* **2015.** 6:2017-2025.
- [116] Mistrzak P., Celejewska-Marciniak H., Szypuła WJ., Olszowska O. and Kiss AK. Identification and quantitative determination of pinoresinol in *Taxus media* Rehder needles, cell suspension and shoot cultures. *Acta Soc Bot Pol.* **2014.** 84:125-132.
- [117] Setyawan AD. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Nusantara Bioscience.* **2011.** 3:44-58
- [118] Geleijnse JM. and Hollman PC. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms. *Am J Clin Nutr.* **2008.** 88:12-13.
- [119] Wang TY., Li Q. and Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2018.** 13:12-23.
- [120] Hayat M., Abbas M., Munir F., Hayat MQ., Keyani R. and Amir R. Potential of plant flavonoids in pharmaceuticals and nutraceuticals. *J Biomol Biochem.* **2017.** 1:12-17.
- [121] Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E. and Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2001.** 12:707-15.
- [122] Kumar S. and Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal.* **2013.** 2013:1-16.

- [123] Panche AN., Diwan AD. and Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* **2016.** 5:1-15.
- [124] Seghiri R. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine. **2007.**
- [125] Brodowska KM. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research.* **2017.** 7:108-123.
- [126] Halbwirth H. the Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *Int J Mol Sci.* **2010.** 11:595-621.
- [127] Bachheti RK., Pandey DP., Joshi A. and Rana V. Chemical Analysis of Aerial Parts of *Justicia gendarussa*. *International Journal of Chem Tech Research.* **2011.** 3:244-247.
- [128] Sangpheak W., Kicuntod J., Schuster R., Rungrotmongkol T., Wolschann P., Kungwan N., Viernstein H., Mueller M. and Pongsawasdi P. Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated β -cyclodextrin. *Beilstein J Org Chem.* **2015.** 11:2763-2773.
- [129] Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res.* **2000.** 113:287-299.
- [130] Luan F., Tang LL., Chen XX. and Liu HT. Simultaneous Determination of Daidzein, Genistein and Formononetin in Coffee by Capillary Zone Electrophoresis. *Separations.* **2017.** 4:1-8.
- [131] Raja M. and Kinne RKH. Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie.* **2015.** 115:187-193.
- [132] Nakayama T., Sato T., Fukui Y., Yonekura-Sakakibara K., Hayashi H., Tanaka Y., Kusumi T. and Nishino T. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.* **2001.** 499:107-111.
- [133] Morreel K., Goeminne G., Storme V., Sterck L., Ralph J., Coppieters W., Breyne P., Steenackers M., Georges M., Messens E. and Boerjan W. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *The Plant Journal.* **2006.** 47:224-237.
- [134] Ngameni B., Fotso GW., Kamga J., Ambassa P., Abdou T., Fankam AG., Voukeng IK., Ngadjui BT., Abegaz BM. and Kuete V. 9 – Flavonoids and related compounds from the medicinal plants of Africa. In: Kuete V., editor. *Medicinal Plant Research in Africa.* Elsevier; Oxford. **2013.** 301-350.
- [135] Kochs G. and Grisebach H. Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur J Biochem.* **1986.** 155:311-318.
- [136] Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G. and Oreopoulou V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules.* **2007.** 12:593-606.
- [137] Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U. and Caristi C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules.* **2007.** 12:1641-1673.
- [138] Markham KR. Technique of flavonoides identification, *Academic press*, London. **1982.**
- [139] Mabry TJ., Markham KR. and Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag*, New York, Heidelberg. Berlin. **1970.** 254.

- [140] Markham KR. Flavones, Flavonols and their Glycosides. *Methods in plant biochemistry*. **1989**. 1:197-235.
- [141] Harborne JB., Mabry TJ. and Mabry H. The Flavonoids. *Academic Press*, New York. **1975**.
- [142] Falcone Ferreyra ML., Rius SP. and Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. **2012**. 3:1-15.
- [143] Shirley BW. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*. **1996**. 1:377-382.
- [144] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*. **2005**. 7:581-591.
- [145] Halbwirth H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *Int J Molec Sci*. **2010**. 11:595-621.
- [146] Kale A., Gawande S. and Kotwal S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*. **2008**. 22:567-577.
- [147] Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. **2010**. 49:963-975.
- [148] Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **2010**. 125:288-306.
- [149] Park HH., Lee S., Son HY., Park SB., Kim MS., Choi EJ., Singh TS., Ha JH., Lee MG., Kim JE., Hyun MC., Kwon TK., Kim YH. and Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res*. **2008**. 31:1303-1311.
- [150] Andres A., Donovan SM. and Kuhlenschmidt MS. Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2009**. 20:563-569.
- [151] Khan MTH., Ather A., Thompson KD. and Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. **2005**. 67:107-119.
- [152] Kale A., Gawande S. and Kotwal S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*. **2008**. 22:567-577.
- [153] Alvarez A., Real R., Perez M., Mendoza G., Prieto JG. and Merino G. Modulation of the activity of ABC Transporters (P-Glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharmac Sci*. **2010**. 99:598-617.
- [154] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo AA. and Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci*. **1999**. 65:337-353.
- [155] Grayer RJ. and Harborne JB. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. **1994**. 37:19-42.
- [156] Kuster RM., Arnold N. and Wessjohann L. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem Syst Ecol*. **2009**. 37:63-65.
- [157] Izzo AA. PAF and the digestive tract. A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1996**. 48:1103-1111.
- [158] Cushnie TP. and Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. **2005**. 26:343-356.

- [159] Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. **2010**. 49:963-975.
- [160] Lean ME., Noroozi M., Kelly I., Burns J., Talwar D., Sattar N. and Crozier A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*. **1999**. 48:176-181.
- [161] Chen HQ., Jin ZY., Wang XJ., Xu XM., Deng L. and Zhao JW. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci Lett*. **2008**. 448:175-179.
- [162] Bakhtiari M., Panahi Y., Ameli J. and Darvishi B. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother*. **2017**. 93:218-229.
- [163] Morikawa K., Nonaka M., Mochizuki H., Handa K., Hanada H. and Hirota K. Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J Agric Food Chem*. **2008**. 56:11030-11037.

CHAPITRE III

Travaux personnels

III.1. Introduction

La phytochimie a pour but principal de trouver de nouvelles voies d'applications dans les domaines de la pharmacie, de la cosmétologie et autres, en se basant sur la recherche et l'isolement de nouvelles molécules naturelles pouvant servir de modèles pour la synthèse de médicaments et produits cosmétiques. Cependant il est important de sélectionner les plantes à étudiées soigneusement. Pour cela, et à cause de la richesse et la diversité du genre *Linaria* en matière de métabolites secondaires et d'activités biologiques, la plante *Linaria scariosa* Desf. à fait l'objet de notre travail.

III.2. Les critères de choix de notre matériel végétal

Les critères de choix de *Linaria scariosa* Desf., reposent essentiellement sur :

- L'endémisme de cette espèce pour l'Algérie et la Tunisie, et son origine saharien qui rend les plantes de ces régions susceptibles d'accumuler des métabolites secondaires aidant à la survie à cause de l'insuffisance hydrique et la chaleur.
- L'absence des études phytochimiques ou biologiques sur cette espèce jusqu'à ce jour.
- Les espèces de ce genre sont connues par la richesse et la diversité en métabolites secondaires de types polyphénoliques, terpénoïdes, elles sont également réputées par plusieurs activités biologiques [1].

III.3. Classification dans la systématique botanique

Règne: Plantae

Embranchement: Viridaeplantae

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Scrophulariales

Famille: Scrophulariaceae

Sous-famille: Scrophularioidea

Tribu: Antirrhineae

Genre: *Linaria*

Espèce: *Linaria scariosa* Desf.

III.4. Description botanique de *Linaria scariosa* Desf.

C'est une plante très hispide à tiges veloutées. Feuilles 3 à 5 fois plus longues que larges, ovales irrégulièrement dentées à la base. Pédicelles 2 à 4 mm. Corolle hispide de 5 à 7 mm. Divisions du calice largement scarieuses. C'est une espèce très rare distribuée dans les Pâturages désertiques et qui se trouve essentiellement dans la région de Biskra et confins tunisiens (endémique Algérien Tunisien) [2].



Figure III.1 : photo sur les parties aériennes de *Linaria scariosa* Desf.

III.5. Protocole expérimental

III.5.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté de la région du M'sila durant le mois de mars 2016. La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par le Dr. Sarri Djamel, du département de biologie, Université de M'Sila. Un spécimen (N° 03/2016/SLS) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires.

III.5.2. Extraction

Les parties aériennes (500 g) ont été broyées et mises en macération à la température de la chambre sous agitation magnétique dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O 80/20). Cette macération a été répétée 3 fois pour une période de 48 heures. Après filtration, le filtrat hydroalcoolique a été évaporé à 38°C et sous pression réduite jusqu'à la concentration de l'extrait. Ce dernier a été dilué avec l'eau distillée (400 mL d'eau distillée pour 1Kg de matière végétale). Après une filtration sous pression réduite, le filtrat a subi une extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Cela nous a permis d'obtenir les trois extraits brutes : extrait dichlorométhane (LIC, m=1,93g), extrait acétate d'éthyle (LIA, m=2,72g), extrait *n*-butanol (LIN, m = 13,08g). La **figure III.2** résume les différentes étapes d'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

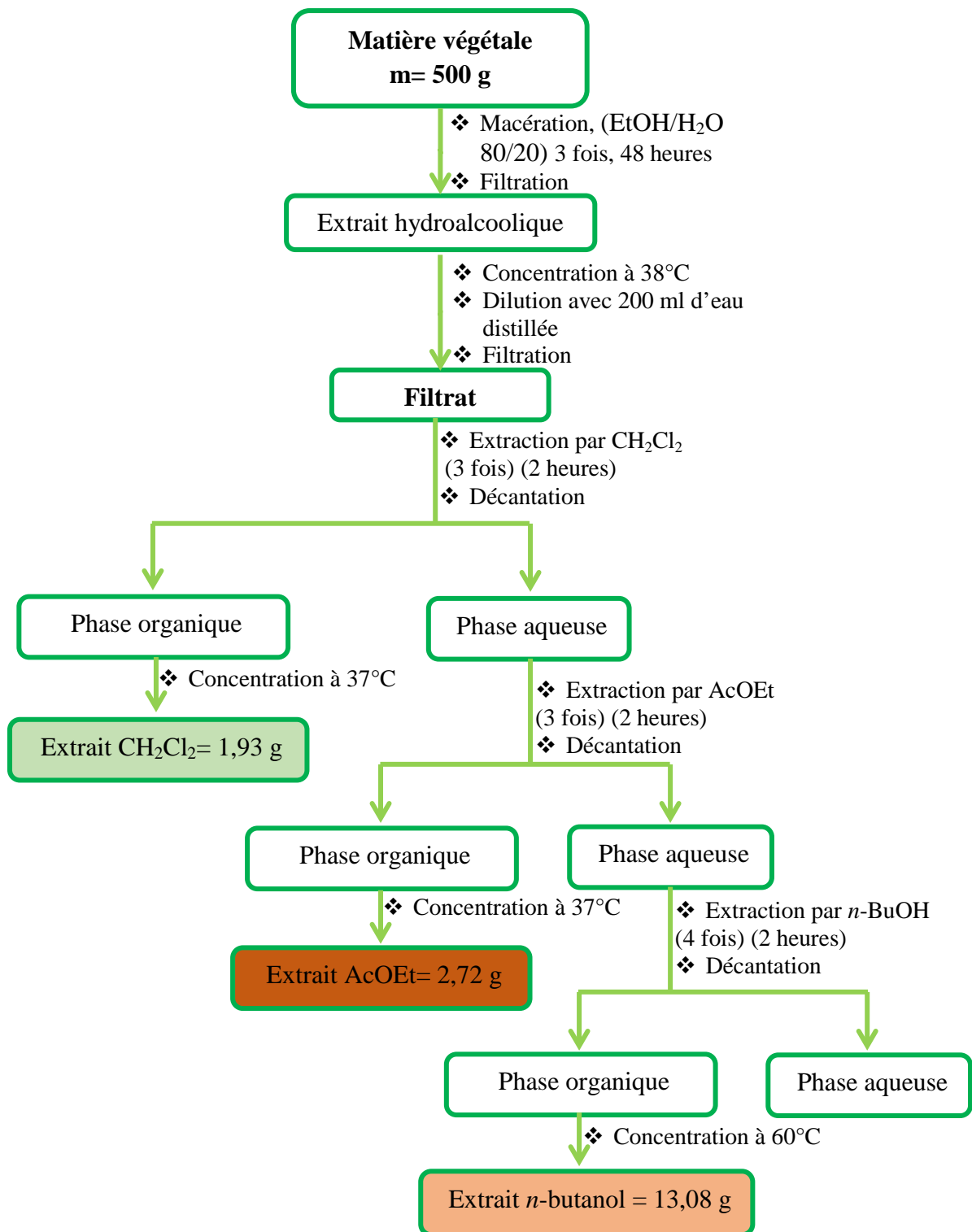


Figure III.2 : Protocole de l'extraction et de la préparation des extraits de *Linaria scariosa*

III.5.3. Etude phytochimique des extraits

III.5.3.1. Analyse des extraits par CG/SM

Une étude des trois extraits de *L. scariosa* a été réalisée par GC/MS dans le but de la caractérisation et la clarification de l'empreinte digitale de chaque extrait par la détermination de la composition chimique, la nature et le type des métabolites secondaires accumulés dans chaque extrait.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un instrument Bruker Scion SQ (Bruker Daltonics, Macerata, Italy) équipé d'une colonne factor four VARIAN (VF- 5 ms, 30 m; 0,25 mm i.d., film thickness 0,25 µm) couplé à un SQ détecteur (single quadrupole) programmé à partir d'une température initiale de 60°C maintenue pendant 3 min, cette température augmente par gradient jusqu'à 120°C (1 min) avec un débit 8°C/min et de 120°C jusqu'à 280°C (1,50 min) avec un débit de 4°C/min et enfin de 280°C jusqu'à 380°C (2 min) avec un débit de 10°C/min. La température de l'injection était 280°C. Le débit de la colonne était 1 mL/min. L'ionisation du spectre de masse a été réglée en mode impacte électronique avec une énergie de 70 eV. Les extraits ont été soumis à l'analyse GC/MS après une silylation.

Pour préparer l'échantillon à injecté, 1 mg d'extrait sec avait réagi pendant 3 heures à 70°C avec 30 µL de pyridine + 70 µL de bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) dans 100 µL d'acétate d'éthyle. Un volume de 1 µL a été prélevé, injecté et analysé avec CG/SM.

Les pics ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs fragments de masse avec ceux des standards authentiques lorsqu'ils sont disponibles, une confirmation finale a été achevée en combinant leurs données de spectrométrie de masse avec celles présentes dans la bibliothèque commerciale NIST (vers 2.0 g; 2011). Le RMatch (Reverse match) indiqué dans les **tableaux IV.1, IV.2 et IV.3** est une valeur numérique allant de 1 à 999, plus cette valeur est élevée, plus l'identification du composant est élevée, avec une bonne identification si cette valeur est supérieure à 750.

III.5.3.2 Détermination des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux

III.5.3.2.1. La teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) (Singleton et Rossi, 1965) [3] selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et al. (2010) [4].

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol. Un volume de 100 μ L de FCR dilué (1:10) et 75 μ L de solution de carbonate de sodium (7,5%) a été ajouté dans des puits d'une microplaque à 96 puits contenant 20 μ L d'échantillon. Le mélange a été laissé dans le noir pendant 2 heures à la température ambiante. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol). L'absorption du mélange a été évaluée à 765 nm dans le lecteur de microplaques (Perkin Elmer, Enspire). La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en équivalent d'acide gallique en mg/g d'extrait en utilisant une courbe d'étalonnage (l'acide gallique a été utilisé comme étalon).

III.5.3.2.2. La teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. La méthode de Topçu et al. (2007) [5] est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits.

1 mg d'extrait a été dissous dans 1 mL de méthanol. On mélange 50 μ L de cette solution méthanolique avec 130 μ L de méthanol, 10 μ L d'acétate de potassium (CH_3COOK) et 10 μ L de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) dans les puits de la microplaque. Après 40 minutes à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 415 nm. La teneur totale en flavonoïdes a été calculée en équivalent de quercétine en mg/g d'extrait en utilisant une courbe d'étalonnage (la quercétine a été utilisée comme standard).

III.5.3.3. Séparation des composants de *L. scariosa*

Les trois extraits sont soumis à un traitement par chromatographie analytique, sur CLHP/DAD (chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à un détecteur DAD (diode-array detector)), afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits. Notre choix s'est porté sur les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol, vu leur rendement et leur richesse en composés majoritaires notamment des composés phénoliques de type flavonique.

III.5.3.3.1. Séparation des composants de l'extrait acétate d'éthyle de *L. scariosa*

La séparation a été réalisée à l'aide d'une CLHP semi-préparative en utilisant un système Varian LC-940 (Varian, Turin, Italie) équipé d'une pompe binaire, d'un injecteur automatique, d'un collecteur de fraction et d'un détecteur UV-DAD.

L'élution a été réalisée avec un système en gradient de solvant ((A) eau+0,05% acide formique, (B) méthanol) (le système qui a donné la meilleure séparation selon les résultats de nos tests analytiques sur CLHP) avec un débit de 20mL/min en utilisant une colonne Kinetex C-18 (100 mm x 21,2 mm, taille de pores 100 Å, diamètre de particule 5 µm) maintenue à la température ambiante. Un volume de 3000 µL (100 mg d'extrait dans 3 mL de méthanol) a été injecté. La détection a été à 254 nm et les données ont été analysées et traitées en utilisant le logiciel GALAXY. Les tubes qui correspondent au même pic du chromatogramme obtenu sont rassemblés pour donner 8 fractions (**Tableau III.1**), leur analyse spectrale par RMN ¹H a montré que les fractions 6, 17 et 22 correspondent à des produits purs nommés LIA-6 (6 mg), LIA-17 (8 mg) et LIA-22 (4 mg).

Tableau III.1 : Résultats de la séparation par CLHP de l'extrait acétate d'éthyle de *L. scariosa*

Fractions	Temps de rétention	Maximum absorption (nm)	Classe de métabolites
LIA-4	15,57	299	Acide phénolique
LIA-6	16,33	292-330 (épaulement)	Flavanone
LIA-7	16,99	292-330 (épaulement)	Flavanone
LIA-14	23,85	280	Terpénoïde
LIA-17	25,71	282	Terpénoïde
LIA-19	26,79	274-321	Acide phénolique
LIA-20	28,32	307	Acide phénolique
LIA-22	30,28	275-331	Flavone

*III.5.3.3.2. Séparation des composants de l'extrait n-butanol de L. scariosa***a) Fractionnement de l'extrait n-butanol**

Selon les résultats de nos tests analytiques sur couche mince de gel de silice, le meilleur système d'éluion donnant une meilleure séparation est le dichlorométhane/ méthanol (8 : 2). Ainsi une masse d'environ 10 g de l'extrait a été déposée (dépôt solide) sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), préparée dans le dichlorométhane. La masse de gel de silice utilisée est de 400 g. L'éluion a été effectuée par le dichlorométhane enrichi progressivement avec le méthanol (système de gradient de polarité) avec un fractionnement tous les 250 mL. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par des plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes appropriés, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 1 min à 100°C, les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau III.2**.

Tableau III.2 : Résultats de la séparation sur colonne de gel de Silice de l'extrait *n*-butanol de *L. scariosa*

Lots	Fractions	Système d'élution %		Poids de la fraction (mg)
		Dichlorométhane	MeOH	
1-4	F ₁	100	0	55,86
5-8	F ₂	100	0	44,79
9-12	F ₃	95	5	44,35
13-16	F ₄	95	5	59,80
17-20	F ₅	90	10	57,97
21-24	F ₆	90	10	84,79
25-28	F ₇	85	15	52,22
29-32	F ₈	85	15	535,77
33-36	F ₉	80	20	1389,50
37-40	F ₁₀	80	20	1853,0
41-44	F ₁₁	75	25	729,46
45-48	F ₁₂	75	25	700,82
49-52	F ₁₃	70	30	598,00
53-56	F ₁₄	70	30	400,00
57-60	F ₁₅	70	30	449,79
61-64	F ₁₆	65	35	279,89
65-68	F ₁₇	65	35	207,45
69-72	F ₁₈	60	40	186,31
73-76	F ₁₉	60	40	159,79
77-80	F ₂₀	55	45	171,98
81-84	F ₂₁	55	45	152,81
85-88	F ₂₂	50	50	193,08
89-92	F ₂₃	50	50	93,70
93-96	F ₂₄	40	60	96,92
97-100	F ₂₅	30	70	95,11
101-104	F ₂₆	20	80	99,04
105-108	F ₂₇	10	90	105,11
109-111	F ₂₈	0	100	114,93

b) Etude des fractions de l'extrait *n*-butanol

Parmi les 28 fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des fractions F₈, F₉, F₁₀ et F₁₂, à cause de leurs poids relativement important, en addition leur profile chromatographique a montré la simplicité de leur composition et la présence de composés majoritaires.

➤ *Etude de la fraction F₈*

Cette fraction a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice, éluee par un système isocratique : chloroforme/MeOH/eau (4/1/0,1). Des fractions de 25 mL ont été

récupérées et rassemblées en fonction de leurs profils chromatographiques pour donner 7 sous fractions. Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le **Tableau III.3**. Une partie de la sous fraction F₈₋₅ (201,48 mg) a subi une séparation sur plaques analytiques de gel de silice éluées par le système chloroforme/MeOH/eau (8:1,4:0,8), pour donner le composé F₈₋₆₋₁ invisible sous la lampe UV (254 et 365 nm) et donnant une couleur marron claire après révélation avec l'anisaldéhyde, ce composé est nommé LIN-1 (15 mg).

Tableau III.3 : Fractionnement de la fraction (F₈) sur colonne de gel de silice

Lots	Fractions	Poids de la fraction (mg)
1-3	F ₈₋₁	21,05
4-5	F ₈₋₂	76,08
6-8	F ₈₋₃	92,44
9-11	F ₈₋₄	70,46
12-20	F ₈₋₅	201,48
21-25	F ₈₋₆	14,10
26-29	F ₈₋₇	30,16

➤ *Etude de la fraction F₉*

La fraction F₉ a subi un premier fractionnement sur une colonne de gel de silice en utilisant un système chloroforme/ méthanol en gradient de polarité. Ce qui nous a permis l'obtention de 11 sous-fractions (**Tableau III.4**).

Tableau III.4 : Fractionnement de la fraction (F₉) sur colonne de gel de silice

Lots	Fractions	Système d'éluion %		Poids de la fraction (mg)
		CHCl ₃	MeOH	
1-20	F ₉₋₁	100	0	21,47
21-34		95	5	
35-44		95	5	
45-47	F ₉₋₂	90	10	17,41
48-52	F ₉₋₃	90	10	23,40
53-58	F ₉₋₄	85	15	35,56
59-61	F ₉₋₅	85	15	41,40
62-70	F ₉₋₆	80	20	411,90
71-90	F ₉₋₇	80	20	382,10
91-105	F ₉₋₈	70	30	114,10
106-124	F ₉₋₉	60	40	44,90
125-138	F ₉₋₁₀	50	50	65,50
139-159	F ₉₋₁₁	100	0	84,90

Une partie de la sous fraction F_{9.4} a subi une séparation sur des plaques CCM éluées par le système chloroforme/MeOH/eau (4:1:0,1) pour donner un composé dont la comparaison sur CCM a montré que c'est le composé LIN-1 séparé précédemment de la fraction F₈ (10 mg), alors que la sous fraction F_{9.7} a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice, éluée par un système isocratique : acétate d'éthyle/MeOH/eau (8/1/1) (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Fractionnement de la fraction (F_{9.7}) sur colonne de gel de silice

Lots	Fractions	Poids de la fraction (mg)	Remarque
1-3	F _{9.7-1}	17,92	Formation d'un précipité
4-7	F _{9.7-2}	26,06	Formation d'un précipité
8-10	F _{9.7-3}	138,08	Formation d'un précipité de deux flavonoïdes
11-13	F _{9.7-4}	71,08	Un mélange de produits séparables
14-20	F _{9.7-5}	26,65	Tache majoritaire avec des traces de produits
21	F _{9.7-6}	70,00	Tache unique
22-25	F _{9.7-7}	11,90	Tache majoritaire avec des traces de produits

- ✓ Durant la concentration de la sous fraction F_{9.7-2}, nous avons remarqué la formation d'un précipité sous forme d'une poudre de couleur jaune pâle. Ce précipité a été lavé au méthanol pour donner le composé F_{9.7-2-a} nommé LIN-7 (10 mg).
- ✓ Une partie de la sous fraction F_{9.7-4} a subi une séparation sur plaques CCM éluées par le système chloroforme/MeOH/eau (6,2:3,2:0,6), pour donner le composé F_{9.7-4-b} sous forme d'une cire de couleur transparente, invisible sous la lampes UV (254 et 366 nm) et donnant une couleur noir après révélation avec l'anisaldéhyde, représente le composé LIN-2 (50 mg).
- ✓ La sous fraction F_{9.7-6} a donné un produit pur sous forme d'une cire de couleur marron claire, invisible sous la lampes UV (254 et 365 nm) et donnant une couleur marron après révélation avec l'anisaldéhyde, représente le composé LIN-4 (70 mg).
- ✓ Il est a noté que la fraction F_{9.7-1} a montré la formation d'un précipité blanc, visible sous la lampe 254 nm et donnant une couleur orangée sous la lampe 365 nm, correspond au composé séparé précédemment de la phase acétate d'éthyle LIA-6.

➤ *Etude de la fraction F₁₀*

La chromatographie de la fraction F₁₀ sur colonne de gel de silice éluée par un système isocratique : chloroforme/MeOH (9/1), a permis l'obtention de 9 fractions (**Tableau III.6**), la fraction F₁₀₋₆ renferme un composé majoritaire sous-forme de poudre jaune, qui après plusieurs lavages avec du méthanol, a permis l'obtention du composé LIN-9 (50 mg).

Tableau III.6 : Fractionnement de la fraction (F₁₀) sur colonne de gel de silice

Lots	Fractions	Système d'éluion %		Poids de la fraction (mg)
		Dichlorométhane	MeOH	
1-13	F ₁₀₋₁	90	10	12,7
14-22	F ₁₀₋₂	90	10	71,3
23-31	F ₁₀₋₃	90	10	500,7
32-39	F ₁₀₋₄	90	10	251,9
40-47	F ₁₀₋₅	90	10	180,7
48-59	F ₁₀₋₆	90	10	160,4
60-66	F ₁₀₋₇	90	10	187,8
67-108	F ₁₀₋₈	90	10	201,4
109-117	F ₁₀₋₉	0	100	84,9

➤ *Etude de la fraction F₁₂*

La fraction F₁₂ additionnée de méthanol a montré la formation d'un précipité de couleur jaune, Après plusieurs rinçage au méthanol et séparation du surnageant, ce précipité a donné le composé LIN-10 (60 mg).

Le schéma représenté dans la figure III. 3 rassemble les différentes étapes pour l'obtention des produits de l'extrait *n*-butanol.

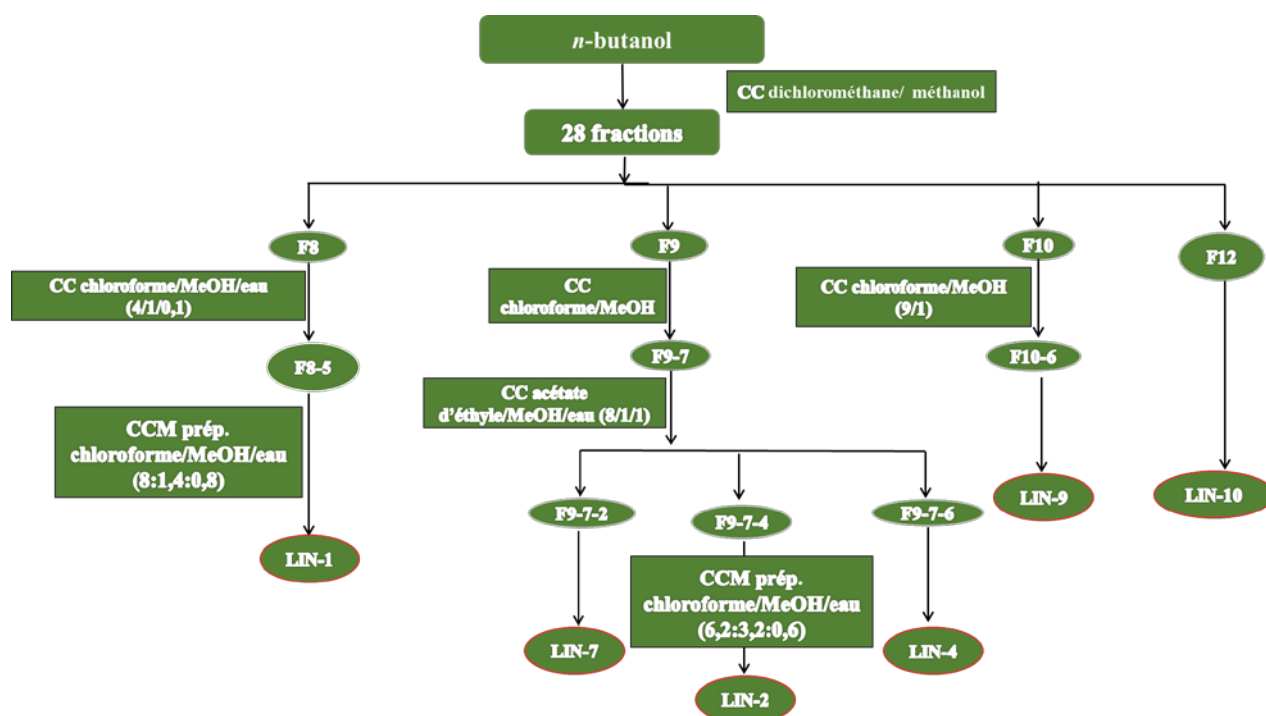


Figure III. 3 : schéma générale pour les produits obtenus de l'extrait *n*-butanol

III.5.4. Etude biologique des extraits

III.5.4.1. Activité antioxydante (*in vitro*)

III.5.4.1.1. Mise en évidence de l'activité anti-radicalaire

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Ces espèces radicalaires très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes (UV, radiations ionisantes, métaux de transition, fumées de combustion, poussières d'amiante et de silice, antiseptiques, médicaments, pesticides, solvants, la respiration cellulaire). Parmi les radicaux libres auxquels notre organisme est exposé, on retrouve les espèces réactives de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et peroxydes (RO^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défendre des antioxydants conduit vers un « stress oxydatif », principale cause initiale de plusieurs maladies telles que des cancers et des troubles neurodégénératifs comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson. L'apport exogène d'antioxydants (alimentation, médicaments,...) pourrait donc ralentir, voire prévenir, ces désordres physiologiques [6]. L'activité anti-radicalaire est évaluée en utilisant deux méthodes : la méthode du DPPH et la méthode de l'ABTS.

a) Détermination de l'activité anti-radicalaire par piégeage du DDPH

L'activité antioxydante par piégeage du DDPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH[•]) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires et plus la substance est antioxydante et plus la coloration violette initiale va disparaître [7-8].

- **Protocole**

40 µL de chacune des différentes concentrations des échantillons ont été incubées avec 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) dans des microplaques à 96 puits. Un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Après une période d'incubation de 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 517 nm [9-10]. La capacité de piéger le radical DPPH a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL) correspondant à la concentration d'inhibition de 50%.

b) Détermination de l'activité anti-radicalaire par piégeage de l'ABTS

Dans cette méthode, l'activité antioxydante des échantillons est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}. L'obtention de ce radical cationique résulte du contact de l'ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec le persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue. L'addition d'un antioxydant à une solution d'ABTS^{•+} entraîne la réduction de ce radical en ABTS⁺ et conduisant ainsi à une décoloration et une diminution de l'absorbance à 734 nm [11].

- **Protocole**

À partir de l'ABTS (7 mM) et de persulfate de potassium (2,45 mM), l'ABTS^{•+} a été produit. Les deux produits en solution aqueuse ont été mélangés et conservés à l'obscurité à la température ambiante pendant 12 à 16 heures. L'absorbance de la solution ainsi obtenue a été ajustée avec de l'eau pour obtenir une absorbance de $0,708 \pm 0,025$ à 734 nm. Ensuite, 160 µL

de solution ABTS^{•+} ont été ajoutés à 40 µL de l'échantillon. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. La capacité de piéger le radical ABTS^{•+} a été calculée à l'aide de l'équation suivante [11].

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL) correspondant à la concentration d'inhibition de 50%.

III.5.4.1.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivie de l'absorbance à 450 nm d'un complexe entre néocuproïne et le cuivre (I), ce dernier est formé par la réduction du cuivre (II) en présence de la néocuproïne [12].

En effet, en présence d'un électron libéré par un agent antioxydant, le complexe cuivre- néocuproïne (Cu⁺²-Nc) est réduit et cette réaction est quantifié par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm [13-14].

- **Protocole**

40 µL d'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 50 µL d'une solution de chlorure de cuivre (II) (10 mM), 50 µL de solution alcoolique de néocuproïne (7,5 mM) et 60 µL d'acétate d'ammonium (1 M, PH = 7,0). Après une heure, l'absorbance a été mesurée à 450 nm et les résultats ont été exprimés en A_{0,50} (µg/mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 absorbance [13].

III.5.4.1.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est basé principalement sur la capacité des anti-oxydants à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) suite à une donation d'électrons. En solution, cette forme réduite prend une couleur vert -bleue, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur [15,16].

- **Protocole**

40 µL d'une solution du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 50 µL de ferricyanure de potassium (1%) (K₃Fe(CN)₆) ont été ajoutés à 10 µL d'échantillon à différentes

concentrations. Après une incubation de 20 minutes à 50°C, 50 µL d'acide trichloroacétique (TCA) (10%), 40 µL d'eau distillée et 10 µL de chlorure ferrique (0,1%) (FeCl₃) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm et les résultats ont été exprimés en A_{0,50} (µg/mL) [17].

III.5.4.1.4. Chélation des ions métalliques

Les métaux de transition, tels que les ions ferreux ou cuivrique, peuvent être responsables de la production du radical OH[•] par la réduction de H₂O₂. Ces réactions peuvent se produire dans les cellules et constituent une source possible de stress oxydatif [12,18]. Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de ces métaux de transition [19,20]. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante.

- **Protocole**

40 µL d'échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 40 µL de méthanol et 40 µL de chlorure ferreux FeCl₂ (0,2 mM). Après addition de 80 µL de ferène (0,5 mM), la réaction a été initiée. Le mélange a été laissé à la température ambiante [21]. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 593 nm et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante.

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL).

III.5.4.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase (*in vitro*)

Il existe deux types de cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Bien que toutes les deux soient présentes dans le cerveau, l'acétylcholinestérase prédominante au niveau central est la principale responsable du métabolisme de l'acétylcholine dans le cerveau, alors que la butyrylcholinestérase a principalement une action périphérique et peut aussi être à l'origine d'effets périphériques indésirables [22].

L'acétylcholine (ACh) est le principal neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué notamment dans les fonctions cognitives. Bien que l'activité cholinergique normale soit définie par la séquence de libération, de liaison et de désactivation enzymatique

de l'ACh par l'AChE, L'activité cholinergique anormale est en revanche caractérisée par un déficit ou une diminution des transmissions cholinergiques synapses attribuée à une production réduite d'ACh ou un excès de désactivation / hydrolyse par l'AChE [23]. Les recherches pharmacologiques réalisées sur le traitement de la Maladie d'Alzheimer (MA) ont trouvé une relation entre le déficit des neurotransmissions cholinergiques et les différents symptômes de cette maladie [22]. Les anticholinestérasiques diminuent l'activité de l'acétylcholinestérase. Leur action favorise donc l'élévation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau.

- **Protocole**

AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de l'activité du cholinestérase. Brièvement, 150 μL de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), 10 μL d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et 20 μL d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés, après 15 minutes d'incubation à 25°C, 10 μL de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20 μL l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM) [24]. Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de la réaction de DTNB avec thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm. La galantamine a été utilisée comme composé de référence. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par l'équation suivante

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en valeur IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) correspondant à la concentration d'inhibition de 50%.

III.5.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose [25,26]. Le principe de cette méthode se base sur l'application de patchs imprégnés d'échantillons à testés sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antibactérienne se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques.

L'activité antibactérienne des trois extraits de *L. scariosa* a été examinée contre sept différentes souches bactériennes, à savoir *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Gram+), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram+), *Morganella morganii* (HS) (Gram-), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-), *Proteus vulgaris* (HS) (Gram-), *Citrobacter freundii* (HS) (Gram-). Les souches de référence (ATCC, American Type Culture Collection) ont été obtenues de l'Institut de Pasteur (Alger) alors que les autres (HS, souches hospitalières) ont été obtenues du laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Benbadis de Constantine, en Algérie.

- **Protocole**

Des disques (patchs) de 5 mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1. 100 mg d'extrait ont été dissouts dans 1 mL de DMSO, et à partir de cette solution mère des séries de dilutions ont été préparées pour chaque extrait. Le milieu de cultures, destiné au développement bactérien, est la gélose Mueller Hinton.

Les bactéries ont étéensemencées par étalement sur les boites de Pétri contenant la gélose à l'aide d'un étaloir stérile à trois reprises, en tournant la boite à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale, puis incubées pendant 24 heures à 37°C. Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 10 µL d'échantillon et déposés sur la surface des géloses. Les préparations sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle, le diamètre de la zone d'inhibition.

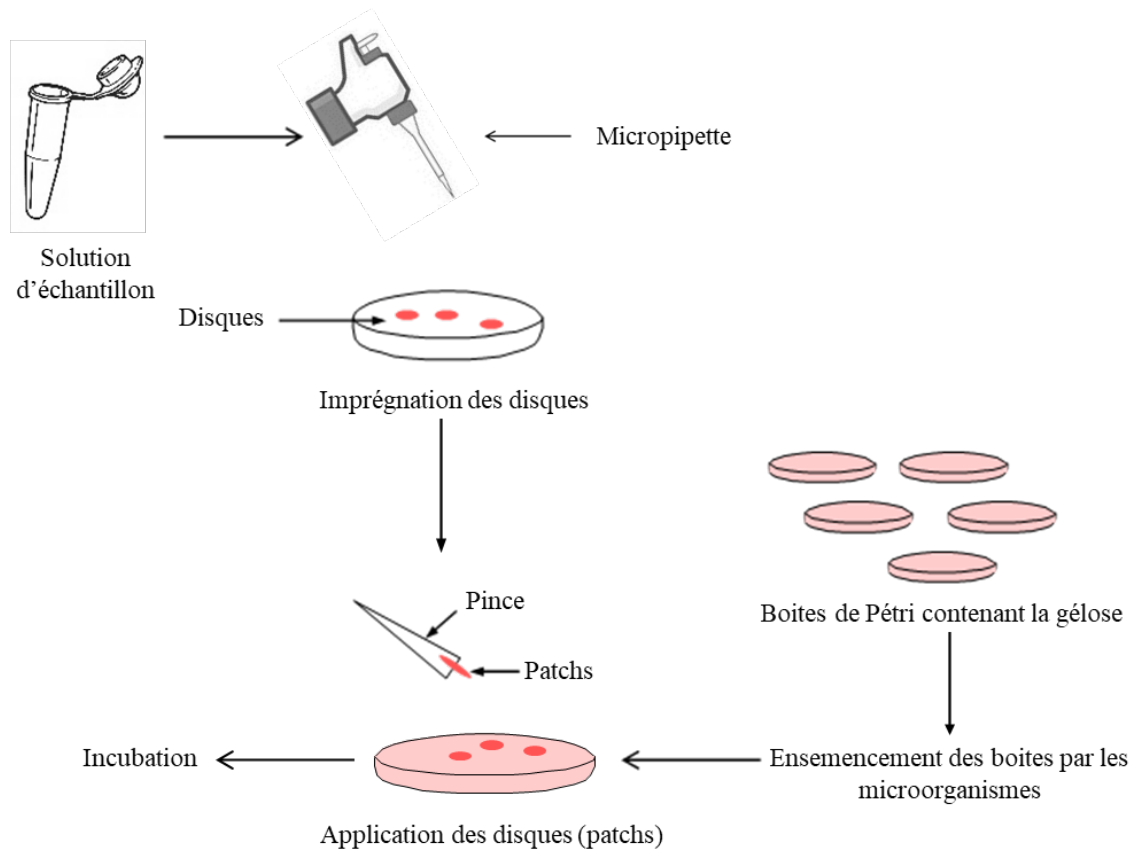


Figure III.4 : Protocole de l'activité antibactérienne des extraits

III.5.4.4. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisé par une hyperglycémie associée à l'incapacité de l'organisme à produire et/ou utiliser correctement l'insuline (hormone responsable de la maintenance de la concentration sanguine du glucose à des valeurs normales). Le diabète peut être classé en trois types :

Le diabète de type 1 caractérisé par une production insuffisante d'insuline due à une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, le diabète de type 2 caractérisé par une diminution de l'action ou de la sécrétion de l'insuline et le diabète gestationnel qui survient pendant la période de la grossesse [27]. Notre étude liée à l'inhibition enzymatique de l' α -glucosidase vise principalement le diabète de type 2.

L' α -glucosidase est une enzyme présente à la bordure en brosse des cellules intestinales. Cette enzyme catalyse le clivage des oligosaccharides et disaccharides en glucose afin d'être absorbés dans l'intestin et libérés dans la circulation sanguine [28].

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont cliniquement utilisés comme agents antihyperglycémiant. Leur administration va se traduire par un allongement du temps de digestion des glucides alimentaires et en conséquence par une limitation des élévations glycémiques postprandiales [29].

- **Protocole**

L'inhibition de l' α -glucosidase est effectuée en utilisant p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) comme substrat, qui est hydrolysé par α -glucosidase pour libérer le p-nitrophényl (un agent coloré qui peut être surveillé à 405 nm). Un volume de 50 μ L de l'échantillon à différentes concentrations est ajouté à 100 μ L de solution de α -glucosidase (0,1U/mL) (1 mg d'enzyme alpha-glucosidase dans 10 mL de tampon phosphate 100 mM, pH 6,9), suivi par l'addition de 50 μ L de pNPG (5 mM) [30]. Après incubation à 37 °C pendant 30 minutes, L'absorbance est mesurée à 405 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

Référence bibliographique

- [1] Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F. and Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res.* **2015**. 29:1589-1613.
- [2] Quezel P. and Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Vol II*. Edition C.N.R.S. Paris. **1963**. P 838.
- [3] Singleton VL. and Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vit.* **1965**. 16:144-58.
- [4] Müller L., Gnoyke S., Popken AM. and Böhm VV. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology.* **2010**. 43:992-999.
- [5] Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M. and Ulubelen A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry.* **2007**. 103:816-822.
- [6] Bensouici C. Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum* (Crassulaceae). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences exactes de l'Université de Constantine, **2015**.
- [7] Bougandoura N. and Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie.* **2013**. 9:14-19.
- [8] Reddy GR., Morais AB. and Gandhi NN. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Free Radical Scavenging Assay and Bacterial Toxicity of Protein Capped Silver Nanoparticles for Antioxidant and Antibacterial Applications. *Asian Journal of Chemistry.* **2013**. 25:9249-9254.
- [9] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* **1958**. 181:1199-1200.
- [10] Bouratoua A., Khalfallah A., Bensouici C., Kabouche Z., Alabdul Magid A., Harakat D., Voutquenne-Nazabadioko L. and Kabouche A. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Nat Prod Res.* **2018**. 32:1873-188.
- [11] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* **1999**. 26:1231-1237.
- [12] Tel G., Apaydın M., Duru ME. and Öztürk M. Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal Methods.* **2012**. 5:495-504.
- [13] Apak R., Güçlü K., Özyürek M. and Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem.* **2004**. 52:7970-7981.
- [14] Muhammad A., Tel-çayan G., Öztürk M., Duru ME., Nadeem S., Anis I., Ng SW. and Shah MR. Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure-activity relationships. *Pharmaceutical biology.* **2016**. 54:1649-1655.

- [15] Blázovics A., Lugasi A., Szentmihályi K. and Kéry A. Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis*. **2003**. 47:99-102.
- [16] Ribeiro SMR., Barbosa LCA., Queiroz JH., Knödler M. and Schieber A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*. **2008**. 110: 620-626.
- [17] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. **1986**. 44:307-315.
- [18] Tel G., Ozturk M., Duru ME. and Turkoglu A. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharm Biol*. **2015**. 53:824-830.
- [19] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. **2000**. 63:1035-1042.
- [20] Heim KE., Tagliaferro AR. and Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutrit Biochem*. **2002**. 13:572-584.
- [21] Decker EA. and Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agr Food Chem*. **1990**. 38:674-677.
- [22] Somboro AA., Diallo D., Sidibe L., Traore N., Fofana B., Bouare S., Chalard P., Chalchat JC., Figueredo G. and Troin Y. Activités anticholinestérasiques des alcaloïdes totaux extraits des feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de tronc de *Guiera senegalensis*, une plante médicinale Malienne. *Int J Biol Chem Sci*. **2013**. 7:1723-1728.
- [23] Owokotomo IA., Ekundayo O., Abayomi TG. and Chukwuka AV. In-vitro anticholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicology Reports*. **2015**. 2:850-857.
- [24] Ellman GL., Courtney KD., Andres V. and Featherston RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. **1961**. 7:88-95.
- [25] Liao CH., Lai CC., Hsu MS., Chu FY., Wu MY., Huang YT. and Hsueh PR. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int J Antimicrob Agents*. **2010**. 35:457-60.
- [26] Osato M. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. **2009**. 17:39-44.
- [27] Chelladurai GRM. and Chinnachamy C. Alpha amylase and Alpha glucosidase inhibitory effects of aqueous stem extract of *Salacia oblonga* and its GC-MS analysis. *Braz J Pharm Sci*. **2018**. 54:1-10.
- [28] Aydoğdu İ., Zihnioğlu F., Karayildirim T., Gülcemal D., Alankuş-Çalışkan Ö. and Bedir E. α -Glucosidase Inhibitory Constituents of *Linaria kurdica* subsp. *eriocalyx*. *Natural Product Communications*. **2010**. 5:841-844.
- [29] Brogard JM., Willemin BB., Blickli JF., Lamalle AM. and Stahl A. Inhibiteurs des alpha-glucosidases une nouvelle approche thérapeutique du diabète et des hypoglycémies fonctionnelles. *Rev Med Interne*. **1989**. 10:365-74.

[30] Lordan S., Smyth TJ., Soler-Vila A., Stanton C. and Ross RP. The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*. **2013**. 141:2170-2176.

CHAPITRE IV

Résultats et discussion

IV.1.Introduction

L'investigation phytochimique des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *Linaria scariosa*, a permis d'isoler plusieurs produits, leurs identification a été réalisée par la combinaison des analyses spectroscopiques (RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC et HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse et la spectrophotométrie UV-Vis. On a commencé notre étude par un screening phytochimique des trois extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) en utilisant une technique de couplage de masse GC/MS dans le but d'avoir une idée sur la composition chimique et le type des métabolites secondaires accumulés dans cette plante, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes a été également réalisé dont le but de les quantifier dans les trois extraits. Les trois extraits sont ensuite soumis à des activités biologiques : antioxydante, anti-cholinestérase et antibactérienne (*in vitro*).

IV.2. Le profile CG/SM des trois extraits de *L. scariosa*

Le criblage phytochimique en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été réalisé en comparant les temps de rétention et les différents fragments de masse de chaque pic du chromatogramme obtenu avec ceux des standards authentiques lorsqu'ils sont disponibles, une confirmation finale a été achevée en combinant leurs données de spectrométrie de masse avec celles présentes dans la bibliothèque commerciale NIST (vers 2.0 g ; 2011) [1].

Les résultats des RMatch rassemblés dans les **Tableaux IV.1, IV.2 et IV.3** indiquent que les trois extraits contenaient des pourcentages élevés de dérivés structurellement liés à l'aucubine (dichlorométhane : 6,80%, acétate d'éthyle : 27,50%, *n*-butanol : 30,92%). Ces résultats étaient en bon accord avec la chimiotaxonomie du genre *Linaria*, dans laquelle les iridoïdes et leurs dérivés glycosidiques sont des marqueurs chimiotaxonomiques, en particulier l'antirrhinoside et les composés apparentés [2]. L'analyse a également montré que les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle contenaient des dérivés de l'acide cinnamique (2,13% et 12,05%, respectivement). Les acides gras (acide hexadécanoïque : 19,97% et acide α -linoléique : 10,59%) contribuent de manière significative à la composition chimique de l'extrait dichlorométhane, ainsi que les dérivés de stérols (stigmastérol : 2,21%, β -sitostérol : 12,46% et (3 β , 9 β)-9,19-cyclolanost-24-en-3-ol : 3,34%).

Tableau IV.1 : Composition chimique de l'extrait dichlorométhane de *L. scariosa*

TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R.Match	TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R.Match
18,737	Acide malique	0,30	884	41,453	Acide cinnamique	2,13	863
20,078	Acide oct-3-énoïque	0,38	856	41,593	Acide arachidique	1,27	886
24,312	1,8-cis-undecadién-5-yne	0,22	909	44,315	2,3-dihydroxypropyl hexadécanoate	2,41	872
27,005	D-(-)-tagatofuranose	1,43	778	44,546	Acide-3-hydroxydec-2-enediénoïque	0,87	849
27,217	D-(-)-fructopyranose	1,58	820	44,955	Acide-1-hydroxycyclohexane-1-carboxylique	0,96	788
28,106	Méthyl α -D-glucopyranoside	2,15	809	45,338	Acide docosanoïque	1,11	804
28,456	Acide tétradécanoïque	1,78	832	46,669	1,3-Dihydroxy-2-propanyl-9-octadécenoate	0,75	805
29,205	β -D-(+)-mannopyranose	1,30	889	47,341	1-Monooleoylglycérol	0,96	806
29,684	β -D-galactopyranose	0,39	842	47,781	2,3-dihydroxypropyl octadécanoate	0,58	814
29,989	D-mannitol	3,19	888	48,085	D-(+)-turanoose	3,80	734
31,232	2-Deoxygalactopyranose	0,27	810	48,831	Acide tetracosanoïque	0,25	840
31,489	β -D-(+)-xylopyranose	0,80	890	49,243	Aucubine	6,80	784
32,075	Acide palmitique	1,43	864	54,819	D-Erythro-2-deoxyPentopyranose	0,41	758
33,191	Acide hexadécanoïque	19,97	842	55,239	25-Hydroxy-24-methylcholesterol	0,31	801
36,014	Acide octadéca-9Z,12Z,15Z-triénoïque	1,00	872	55,333	Campestérol	1,99	864
36,835	Acide octadéca-9Z,12Z-diénoïque	6,33	930	55,623	Stigmastérol	2,21	867
36,98	Acide α-linoléniq	10,59	906	56,302	β-Sitostérol	12,46	801
38,252	Décane-1,9-diol	0,32	706	56,993	($3\beta,9\beta$)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol	3,34	826
40,87	Acide-4-hydroxybutanoïque	1,09	801	59,008	Acide-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	0,43	735

Tableau IV.2 : Composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle de *L. scariosa*

TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R. Match	TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R. Match
8,455	Acide 2-hydroxypropanoïque	0,43	861	31,238	2-Deoxy-galactopyranose	1,50	813
10,199	butan-1,3-diol	0,48	736	31,49	Glucopyranose	2,86	872
10,467	Acide-2-méthyl-3-hydroxyPropanoïque	0,49	838	32,286	Acide- α -oxo-Benzeneacétique	0,70	790
12,947	Glycérol	1,05	797	32,815	Acide benzeneacétique	0,36	799
14,12	Acide butanedioïque	2,28	917	33,99	Ethan-1,2-diol	0,43	757
19,353	Acide-2-hydroxybenzoïque	3,44	750	35,184	Acide-3,4-dihydroxycinnamique	0,47	853
19,922	1-Deoxypentitol	0,73	848	40,451	Ethyl-D-glucopyranoside	3,17	867
22,634	Acide-3,4-dihydroxybenzoïque	2,00	866	41,453	Acide cinnamique	12,05	850
23,512	Acide-3-méthyl-2-hydroxypentanoïque	1,45	807	41,944	méthyl α -D-Mannopyranoside	0,57	803
24,557	Acide octanedioïque	0,60	817	42,263	β -DL-Arabinopyranose	0,63	753
26,242	Acide-3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque	2,62	856	44,079	Acide-3 α -méthoxy-4-hydroxybenzeneacétique	2,60	926
27,119	Acide azelaïque	2,57	845	45,134	Acide-2-hydroxysebacique	1,16	781
27,213	D-(-)-Tagatofuranose	2,36	811	45,573	Acide-2-méthyl-2-hydroxypropanoïque	1,53	823
28,201	2-deoxyD-Erythro-Pentopyranose	0,23	769	47,744	2-méthylpropanetriol	0,63	852
28,452	Acide tétradécanoïque	1,13	888	48,057	D-(+)-Turanoose	0,80	718
29,206	D-Glucopyranose	2,49	894	49,264	Aucubine	27,50	791
29,995	D-Mannitol	5,87	881	57,957	D-Xylose	3,41	807
30,155	Ribitol	4,02	831	59,623	D-Xylopyranose	3,21	833

Tableau IV.3 : Composition chimique de l'extrait *n*-butanol de *L. scariosa*

TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R.Match	TR	Nom du pic	Pourcentage (%)	R.Match
13,006	Glycérol	0,76	919	39,842	β -D-(+)-Xylopyranose	0,84	837
19,933	1-DésoxyPentitol	2,28	831	40,453	D-éthylglucopyranoside	1,86	840
26,219	D-(-)-Lyxofuranose	0,35	803	42,669	1,5-Anhydro-D-sorbitol	0,62	760
26,348	D-(-)-Tagatofuranose	6,58	810	42,904	L- 6-DéoxyMannose	0,41	828
28,1	1,5-Anhydro-D-sorbitol	1,87	813	43,381	2-Déoxy-galactopyranose	0,97	787
29,687	D-Xylose	0,43	825	43,711	2-Mono-isobutyryne	0,47	836
29,992	D-Mannitol	8,48	889	44,328	Acide hexadécanoïque	5,10	851
30,163	Ribitol	18,74	820	44,813	D-(+)-Turanoose	6,73	856
31,24	D-(-)- Erythrofuranoose	0,42	805	46,664	D-2-déoxyErythro-Pentopyranose	1,83	738
31,49	β -D-Glucopyranose	7,90	916	49,456	Aucubine	30,92	839

IV.3. La détermination des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux

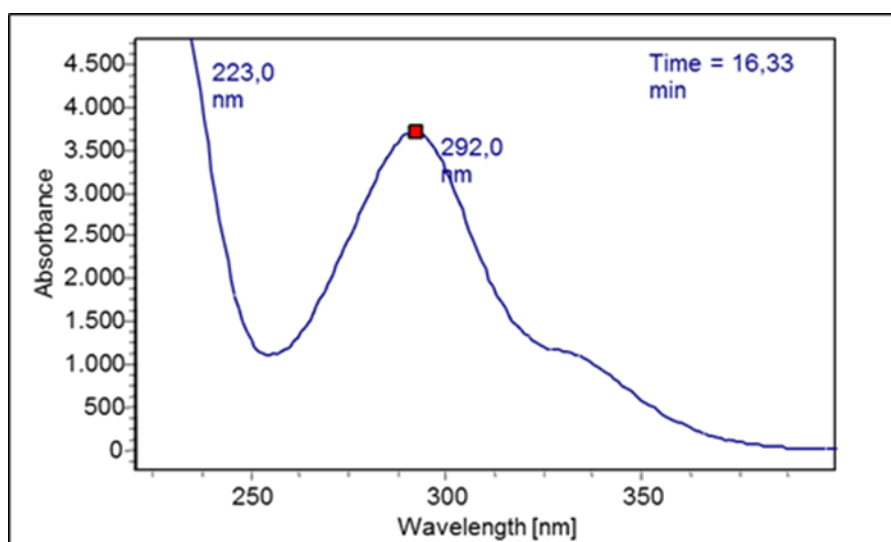
Les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux des trois extraits : dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Linaria scariosa* ont été déterminées et exprimées en équivalent d'acide gallique (EAG) et en équivalent de quercétine (EQ), respectivement. L'extrait acétate d'éthyle présentait la teneur en phénol la plus élevée ($143,6 \pm 0,002 \mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$) suivie de l'extrait *n*-butanol ($99,14 \pm 0,03 \mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$) et en dernier l'extrait dichlorométhane ($81,64 \pm 0,01 \mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$). L'extrait le plus riche en flavonoïdes était également l'extrait acétate d'éthyle ($30,19 \pm 0,006 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$) par rapport à l'extrait *n*-butanol ($26,39 \pm 0,01 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$), tandis que l'extrait dichlorométhane ($14,98 \pm 0,01 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$) était le plus pauvre.

IV.4. Elucidation structurale des composés isolés de *L. scariosa*

IV.4.1. Elucidation structurale du composé 1 (LIA-6)

Ce produit a été isolé sous forme de cristaux de couleur blanche et donnant une fluorescence orangée sous la lumière de Wood.

Le spectre UV du composé LIA-6 enregistré dans le méthanol montre des bandes d'absorptions à $\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ nm}$ et $330 \text{ (épaulement) nm}$, où on remarque que la bande I à une intensité plus faible que celle de la bande II, indiquant ainsi une structure de type flavanone ou isoflavonoïde.



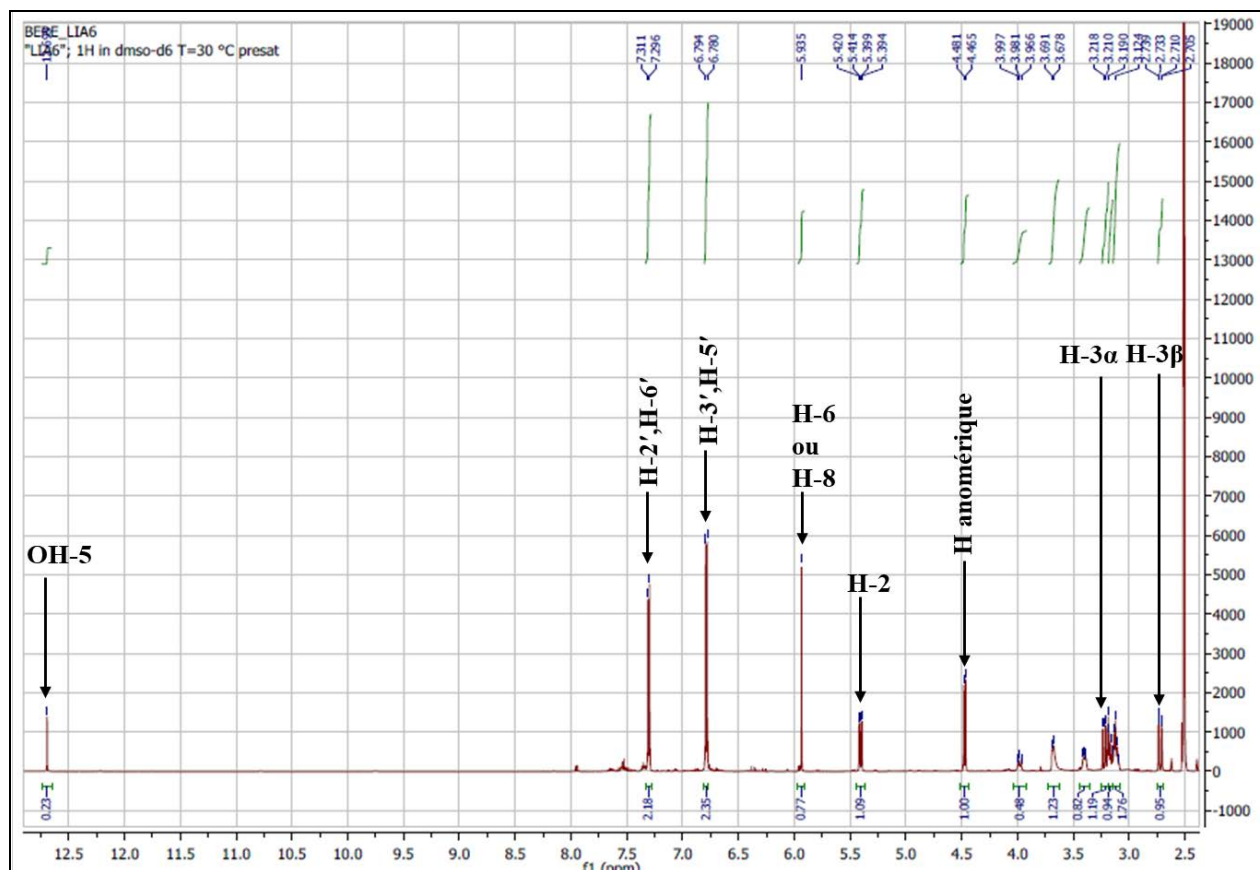
Spectre IV.4.1.1 : Spectre UV dans le méthanol du composé LIA-6

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.1.2**) de ce composé confirme qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavanone caractérisé par :

- Un doublet de doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 5,41$ ppm ($J = 12,3 ; 3,0$ Hz) attribuable au proton H-2.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 3,21$ ppm ($J = 17,1 ; 12,3$ Hz) attribuable au proton H-3 α .
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 2,72$ ppm ($J = 17,1 ; 3,0$ Hz), attribuable au proton H-3 β .

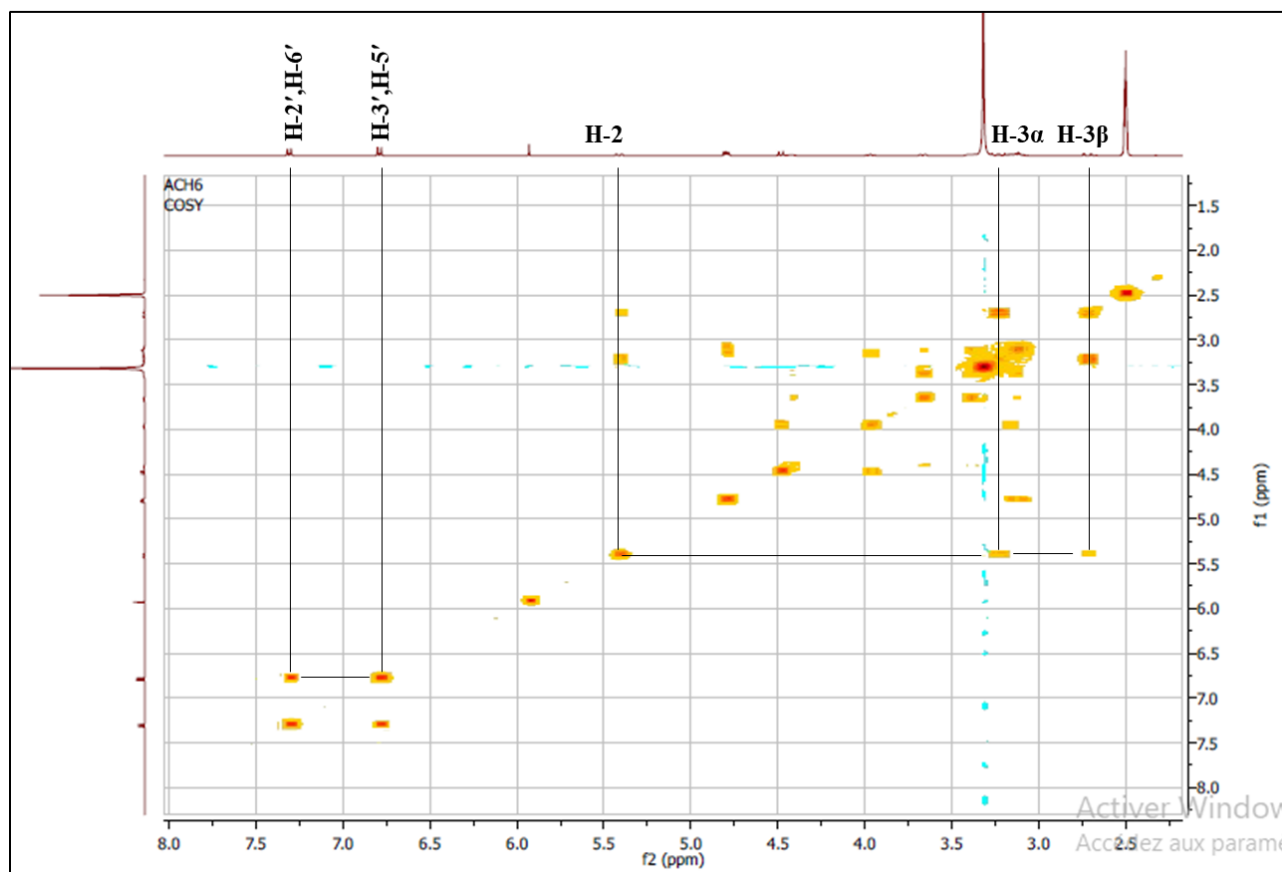
En plus de ces signaux, le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.1.2**) montre :

- Un singulet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 12,69$ ppm attribuable au proton de la fonction OH en position 5.
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 7,30$ ppm ($J = 9,0$ Hz) attribuable à H-2' et H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 6,79$ ppm ($J = 9,0$ Hz) attribuable à H-3' et H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 5,94$ ppm attribuable soit à H-8 ou H-6.



Spectre IV.4.1.2 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6

Le couplage entre les protons H-2, H-3 α et H-3 β est confirmé en analysant le spectre COSY (**Spectre IV.4.1.3**) qui montre que le H-2 corrèle à la fois avec les protons repérés à $\delta_{\text{H}} = 3,21$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 2,72$ ppm, traduisant ainsi l'attribution précédemment réalisée. L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (**Spectre IV.3.1.3**) montre également une tache de corrélation entre les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' confirmant le couplage ortho des protons du cycle B (une substitution para).



Spectre IV.4.1.3 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.1.2**) montre clairement que cette flavanone est attachée à un groupement glycosylé dont le proton anomérique est repéré à $\delta_{\text{H}} = 4,47 \text{ ppm}$ ($J = 9,6 \text{ Hz}$).

L'attribution des atomes de carbone de cette flavanone est réalisée en se basant sur les corrélations des spectres HMBC et HSQC.

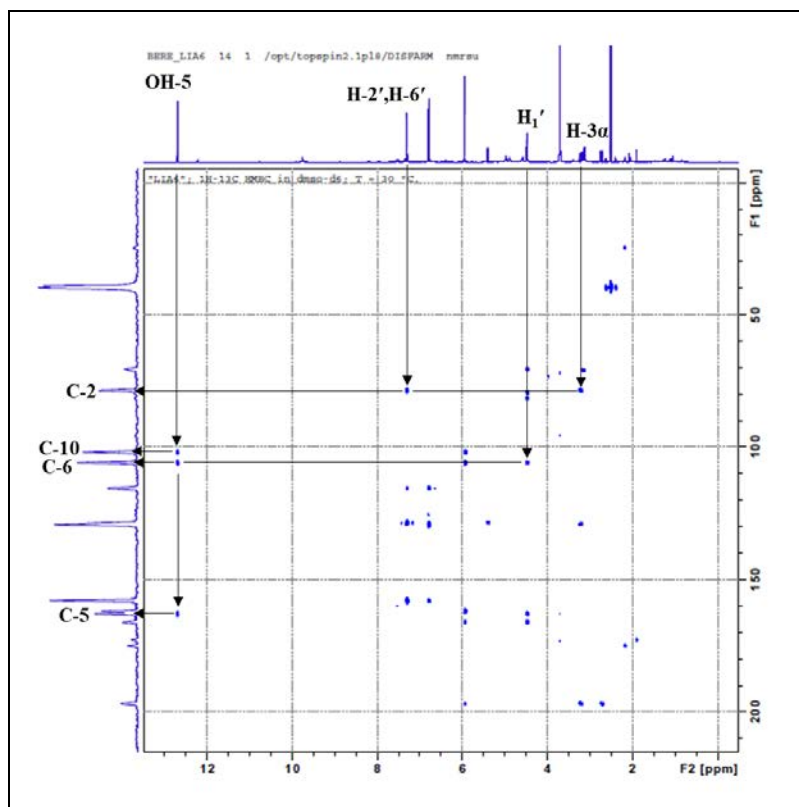
Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4**), le H du groupement OH de la position 5 corrèle avec trois carbones repérés à $\delta_{\text{C}} = 101,9 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 106,1 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 163,1 \text{ ppm}$ attribués à C-10, C-6 et C-5, respectivement.

Sur le même spectre, le carbone à $\delta_{\text{C}} = 78,7 \text{ ppm}$ montre trois taches de corrélations avec les protons H-2', H-6' et H-3, vu son déplacement chimique et sa corrélation avec le H-2 sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.1.5**) ce carbone est attribué à la position 2 oxygénée, le carbone situé en position 3 serait plus blindé et son carbone est repéré à $\delta_{\text{C}} = 42,3 \text{ ppm}$ grâce à sa corrélation avec les deux protons H-3 α et H-3 β sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.1.5**).

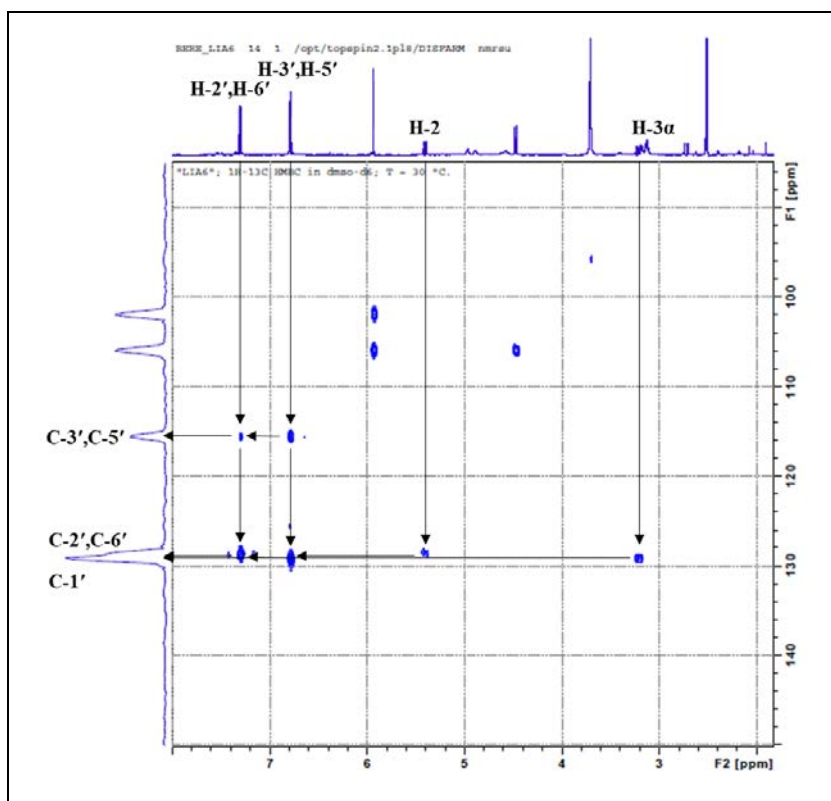
Toujours sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.1.5**), les protons H-3', H-5' corrélient avec le signal repéré à $\delta_C = 115,7$ attribuables à C-3' et C-5', de même pour les protons H-2', H-6' avec le signal repéré $\delta_C = 128,8$ attribuables à C-6' et C-2'. Ces attributions sont confirmées par le spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4a**), qui montre des corrélations entre les protons H-2', H-6', H-3', H-5' avec les deux carbones repérés à $\delta_C = 115,7$ ppm attribués aux C-3' et C-5'. Sur le même spectre, les deux carbones C-6' et C-2' repérés à $\delta_C = 128,8$ ppm montrent les mêmes corrélations avec les mêmes protons plus une corrélation avec le proton H-2, mais avec un déplacement chimique plus élevé à cause de l'effet donneur d'un radical OR situé en position 4'. Toujours sur le même spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4a**), les corrélations des protons H-2', H-6', H-3', H-5' et H-3 α avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 129,3$ ppm permettent son attribution à C-1'. Le spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4b**) montre des corrélations entre les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 158,0$ ppm permettent son attribution à C-4'.

La partie osidique est localisée sur le squelette flavonique en position 6 à cause de la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4**) entre le carbone de cette position et le proton anomérique. Le proton repéré à $\delta_H = 5,93$ ppm et donc attribué au H-8. Le carbone C-8 est repéré à $\delta_C = 95,2$ ppm à cause de sa corrélation avec le H-8 sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.1.5**).

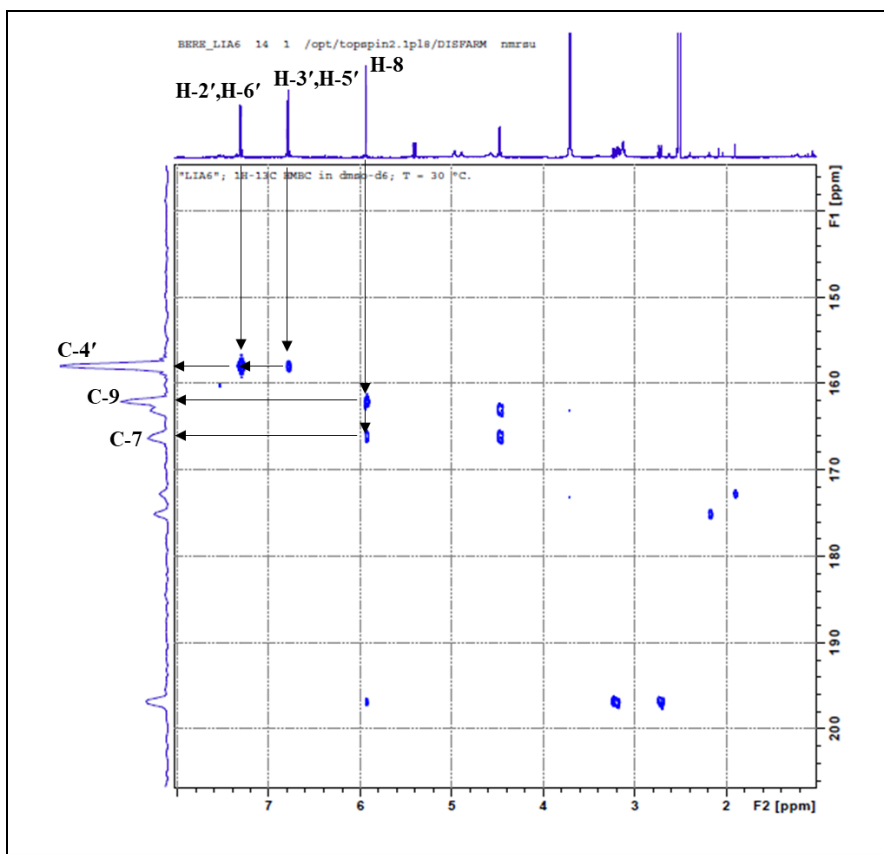
Le C-7 et le C-9 sont repérés à $\delta_C = 166,3$ ppm et à $\delta_C = 162,1$ ppm respectivement, à cause des corrélations observées sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.1.4b**) avec le proton H-8.



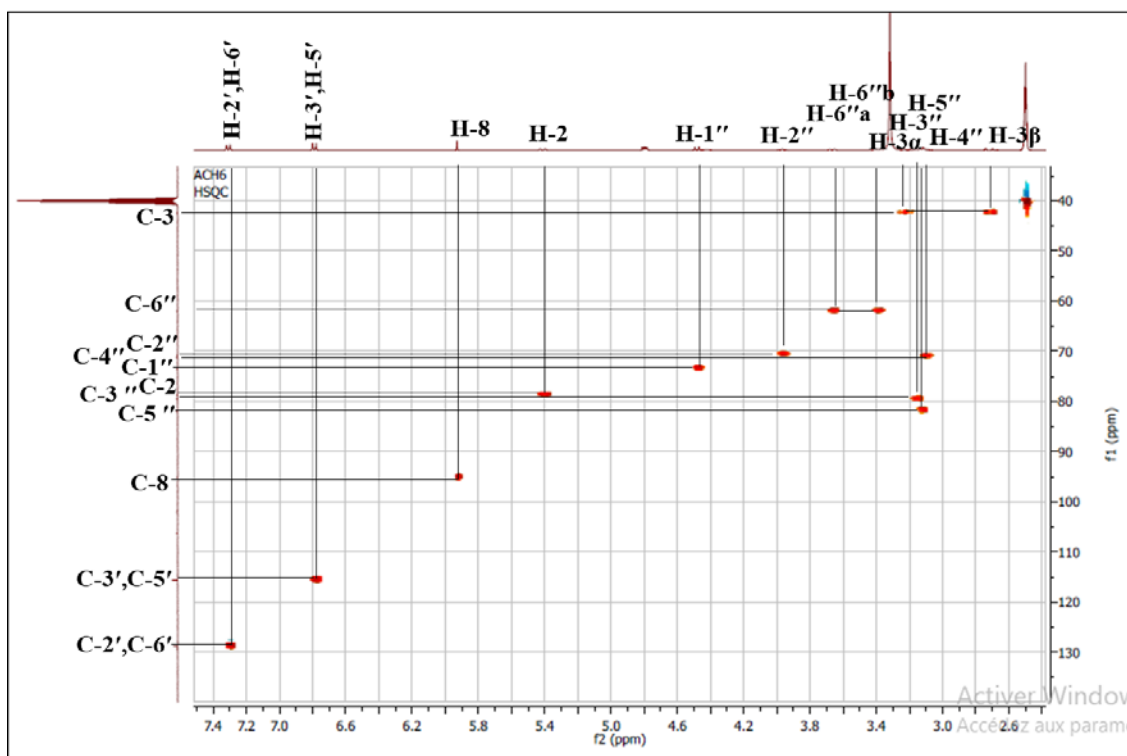
Spectre IV.4.1.4 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{ppm}) du composé LIA-6



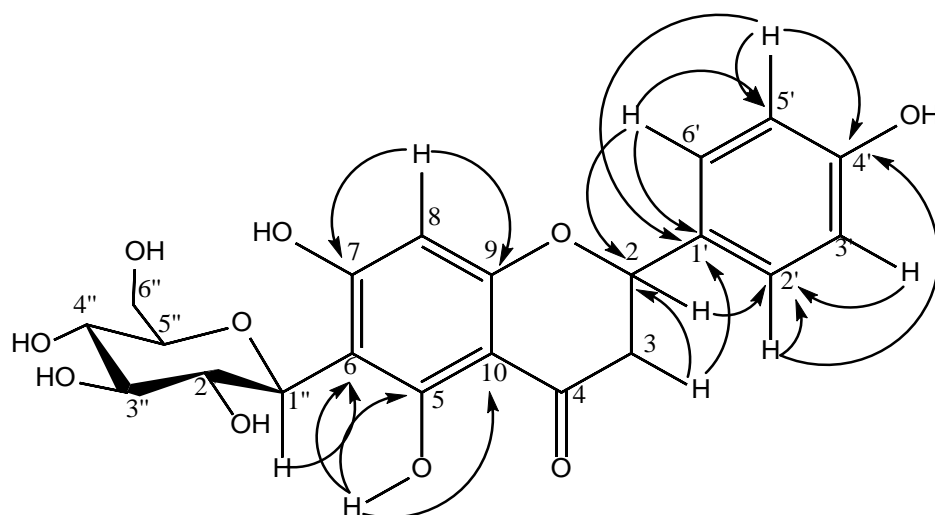
Spectre IV.4.1.4a : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{ppm}) du composé LIA-6, étalement



Spectre IV.4.1.4b : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6, étalement



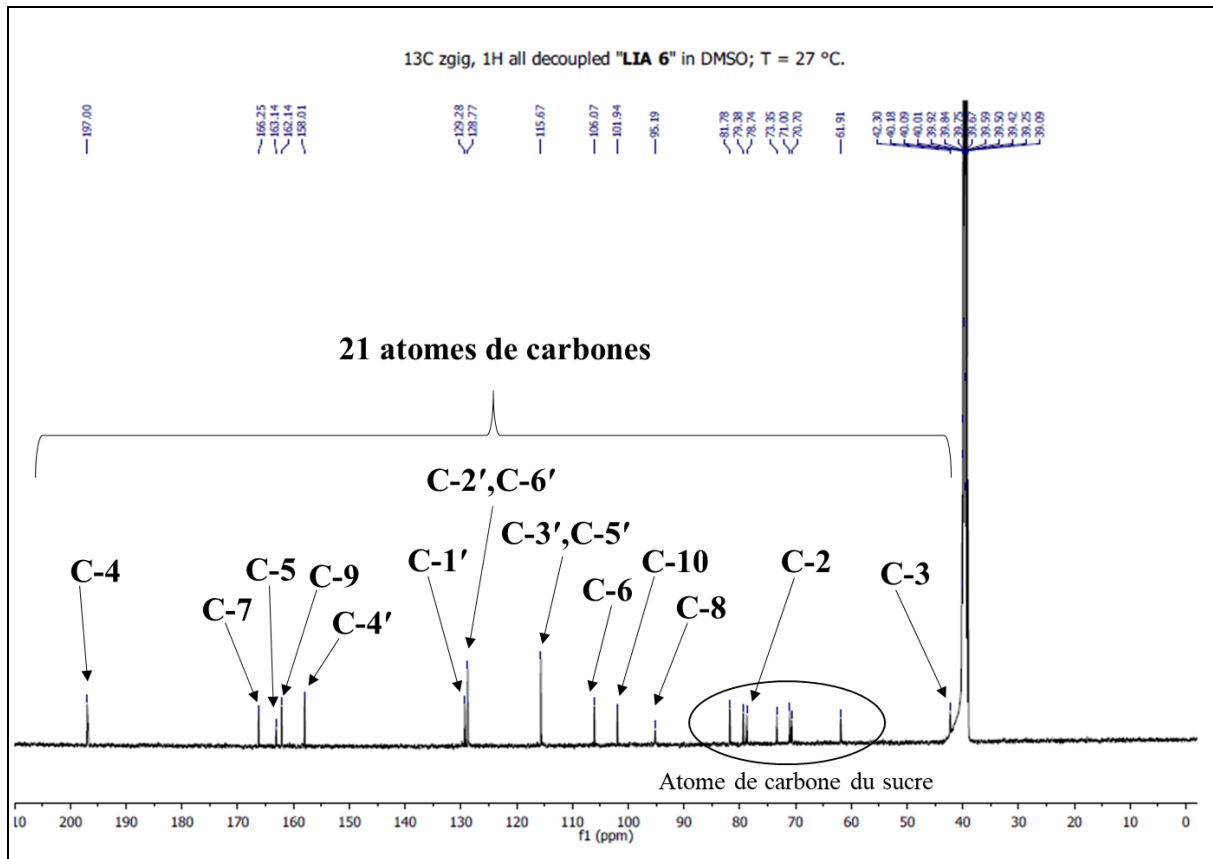
Spectre IV.4.1.5 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6



Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.1.6**) révèle la présence de 21 atomes de carbone, si nous abstrayons les 15 atomes de carbone attribués, il nous reste 6 atomes de carbone correspondent ainsi à l'entité osidique, les deux radicaux situés en position 7 et 4' ne peuvent être que des groupements OH. L'attribution des atomes de carbone de l'entité glycosylé est réalisée grâce à une étude simultanée des spectres HSQC (**Spectre IV.4.1.5**) et COSY (**Spectre IV.4.1.3a**), et les atomes de carbone C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' sont localisés à $\delta_{\text{C}} = 73,4$; $70,7$; $79,4$; $71,0$; $81,8$ et $61,9$ ppm, respectivement.

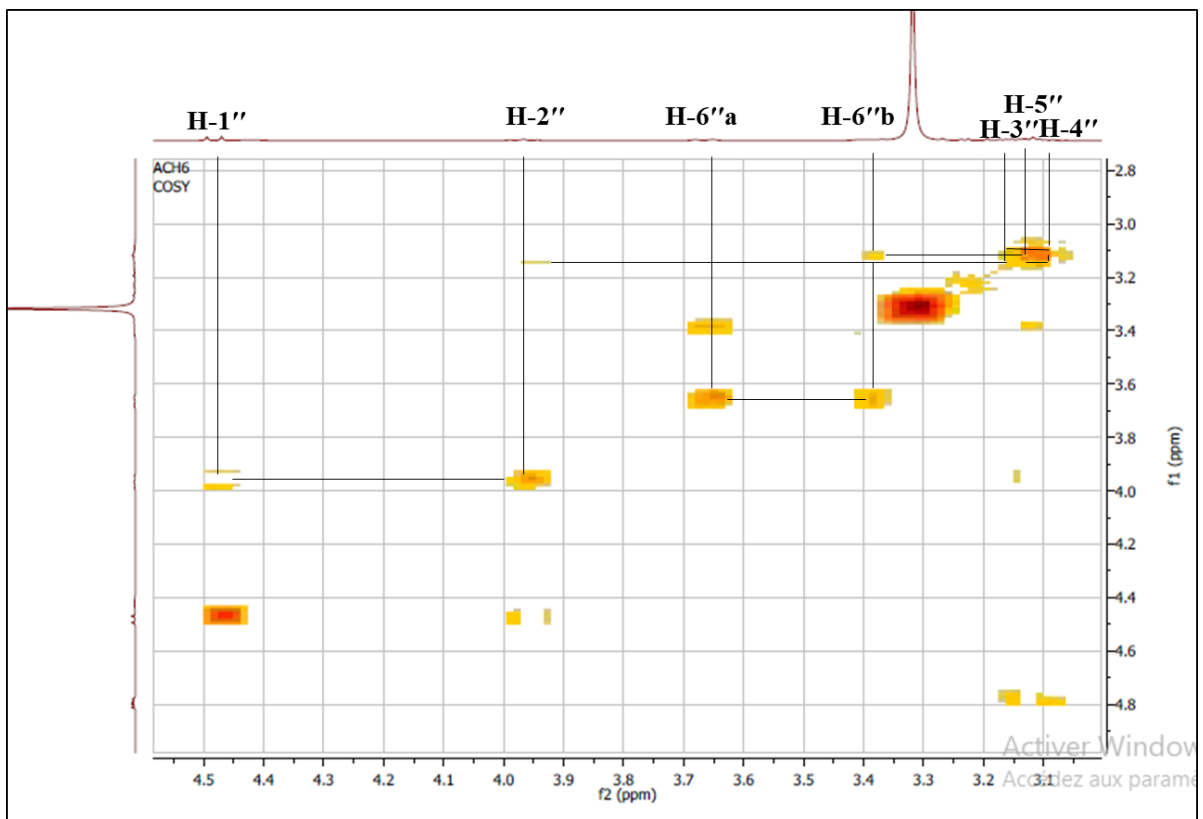
La comparaison des déplacements chimiques des carbones de ce groupement osidique avec ceux de la littérature nous a orientés vers une entité glucopyranosyle [3].

Les valeurs de déplacements chimiques du proton anomérique et son carbone ($\delta_{\text{H}} = 4,47$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 73,4$ ppm) ainsi que la valeur de la constante de couplage ($J = 9,6$ Hz) orientent bien vers une jonction C- β -glucosidique de cette partie osidique.



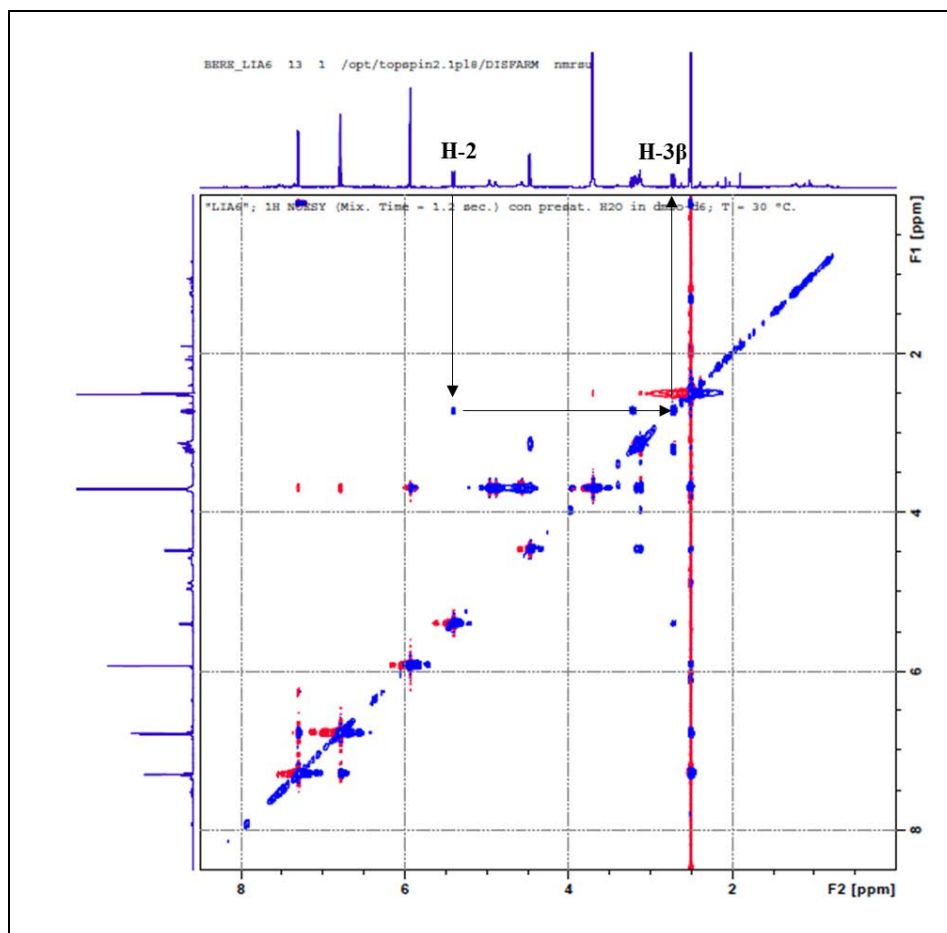
Spectre IV.4.1.6 : Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-

6



Spectre IV.4.1.3a : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6, étalement

La stéréochimie de la position C-2 est déterminée (2S) grâce à la biogenèse des flavanones qui impose une orientation α au cycle B [4], cela est confirmé grâce à l'étude du spectre NOESY (**Spectre IV.4.1.7**) qui montre une tache de corrélation entre le proton de cette position et le H-3 β indiquant une même orientation pour ces deux protons.

**Spectre IV.4.1.7** : Spectre NOESY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-6

Ce composé est donc la (2S)-6-C- β - glucopyranosyl naringenine (**Figure IV.1**). Il est connu sous le nom d'hemipholine [5]. Les résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C sont rassemblés dans le tableau (**Tableau IV.4**).

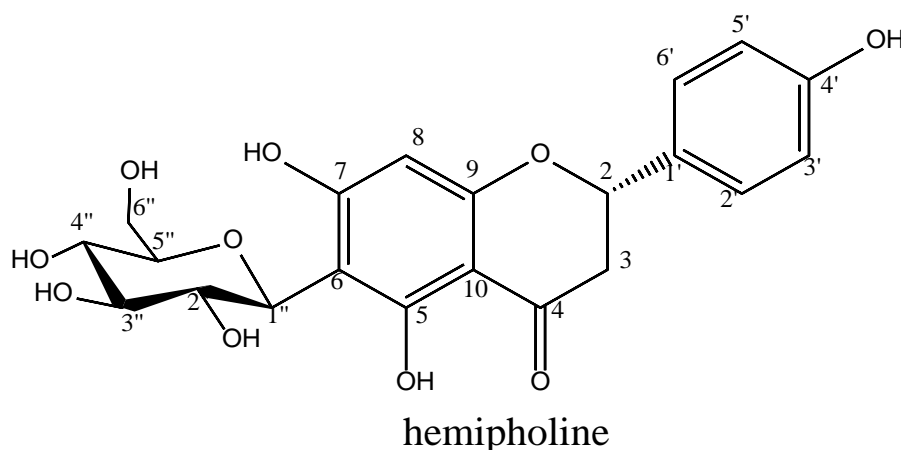


Figure IV.1 : Structure du composé LIA-6

Tableau IV.4 : Les données RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé LIA-6

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
2	78,7	5,41 <i>dd</i>	12,3 ; 3,0	3'	115,7	6,79 <i>d</i>	9,0
3	42,3	3,21 <i>dd</i> 2,72 <i>dd</i>	17,1 ; 12,3 17,1 ; 3,0	4'	158,0	-	-
4	197,0	-	-	5'	115,7	6,79 <i>d</i>	9,0
5	163,1	-	-	6'	128,8	7,29 <i>d</i>	9,0
6	106,1	-	-	1''	73,4	4,47 <i>m</i>	-
7	166,3	-	-	2''	70,7	3,98 <i>t</i>	9,0
8	95,2	5,94 <i>s</i>	-	3''	79,4	3,17 <i>m</i>	-
9	162,1	-	-	4''	71,0	3,12 <i>m</i>	-
10	101,9	-	-	5''	81,8	3,14 <i>m</i>	-
1'	129,3	-	-	6''	61,9	3,68 <i>m</i> 3,40 <i>dd</i>	- 10,8 ; 5,4
2'	128,8	7,31 <i>d</i>	9,0				

IV.4.2. Elucidation structurale du composé 2 (LIA-17)

Le composé LIA-17 a été obtenu sous forme d'une cire de couleur marron claire. La comparaison du temps de rétention et les fragments de masse du composé LIA-17, obtenus à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, avec ceux disponible dans la bibliothèque commerciale NIST (vers 2.0 g; 2011) [1], nous a permis de déduire que le composé LIA-17 a une structure très similaire à un iridoïde connu sous le nom aucubine (Figure IV.2).

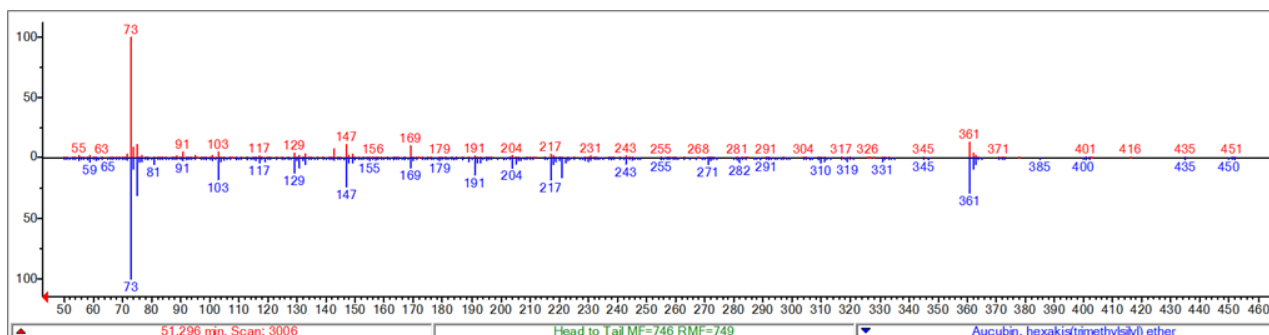
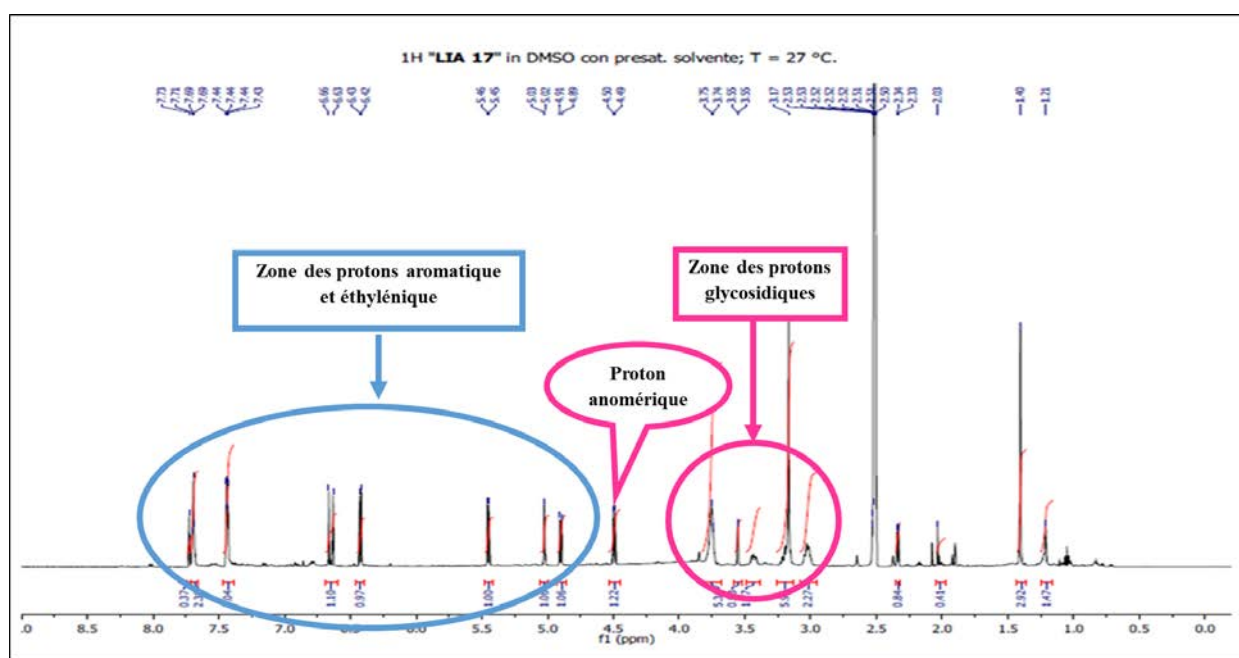


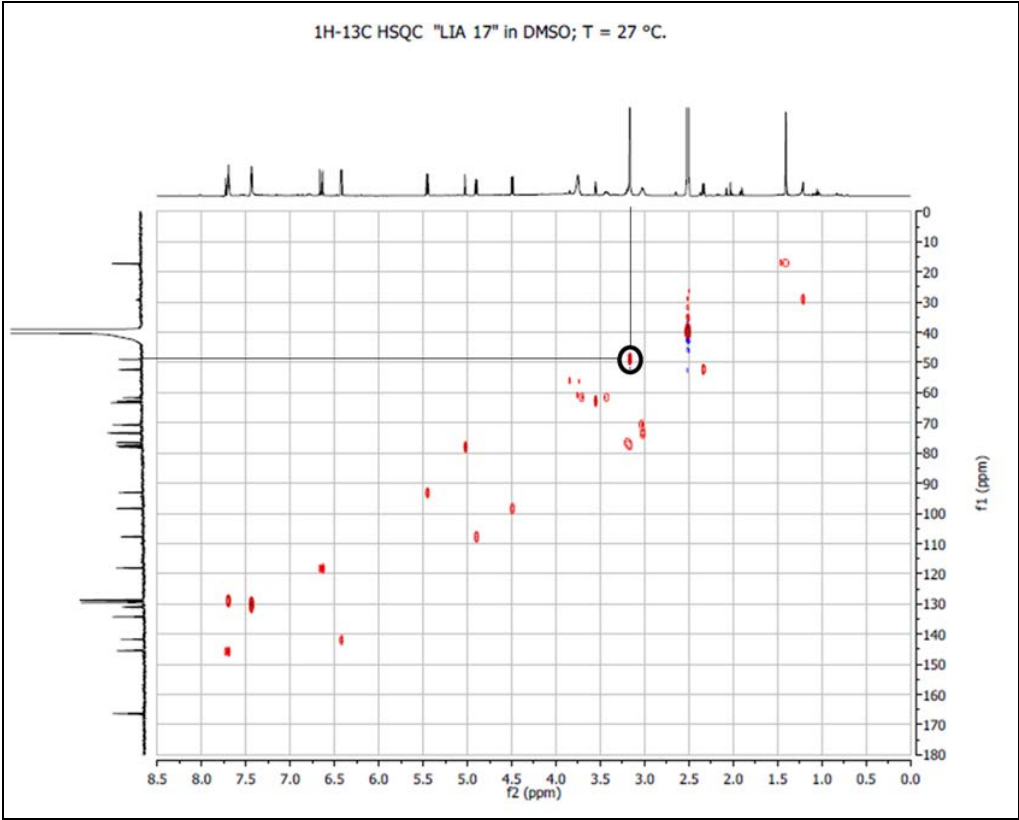
Figure IV.2 : Comparaison du spectre de masse du composé LIA17 avec celui de l'aucubine

Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.2.1**) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ montre un ensemble de signaux dans la zone des protons aromatiques et éthyléniques et un ensemble de signaux rappelant un groupement glycosylé dont le signal d'un proton anomérique.

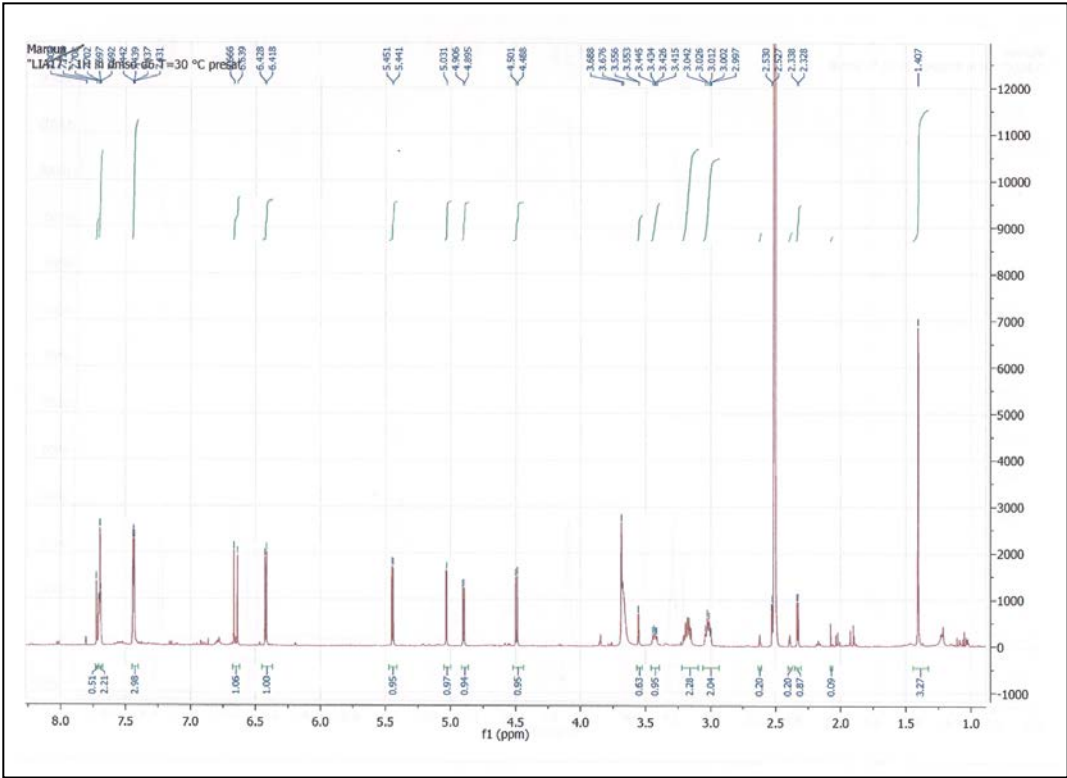


Spectre IV.4.2.1 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-17

Le spectre RMN ^{13}C révèle la présence de 25 atomes de carbone, parmi ces carbones on trouve un à $\delta_{\text{C}} = 49,1$ ppm corrélant dans le spectre HSQC (**Spectre IV.4.2.2**) avec les protons apparaissent à $\delta_{\text{H}} = 3,17$ ppm. La comparaison du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.2.1**) avec un autre spectre du même produit enregistré auparavant dans le $\text{DMSO-}d_6$ (**Spectre IV.4.2.3**) montre clairement l'absence de ce signal ce qui nous permet de l'attribuer à des traces de méthanol.



Spectre IV.4.2.2 : Spectre HSQC (600 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé LIA-17

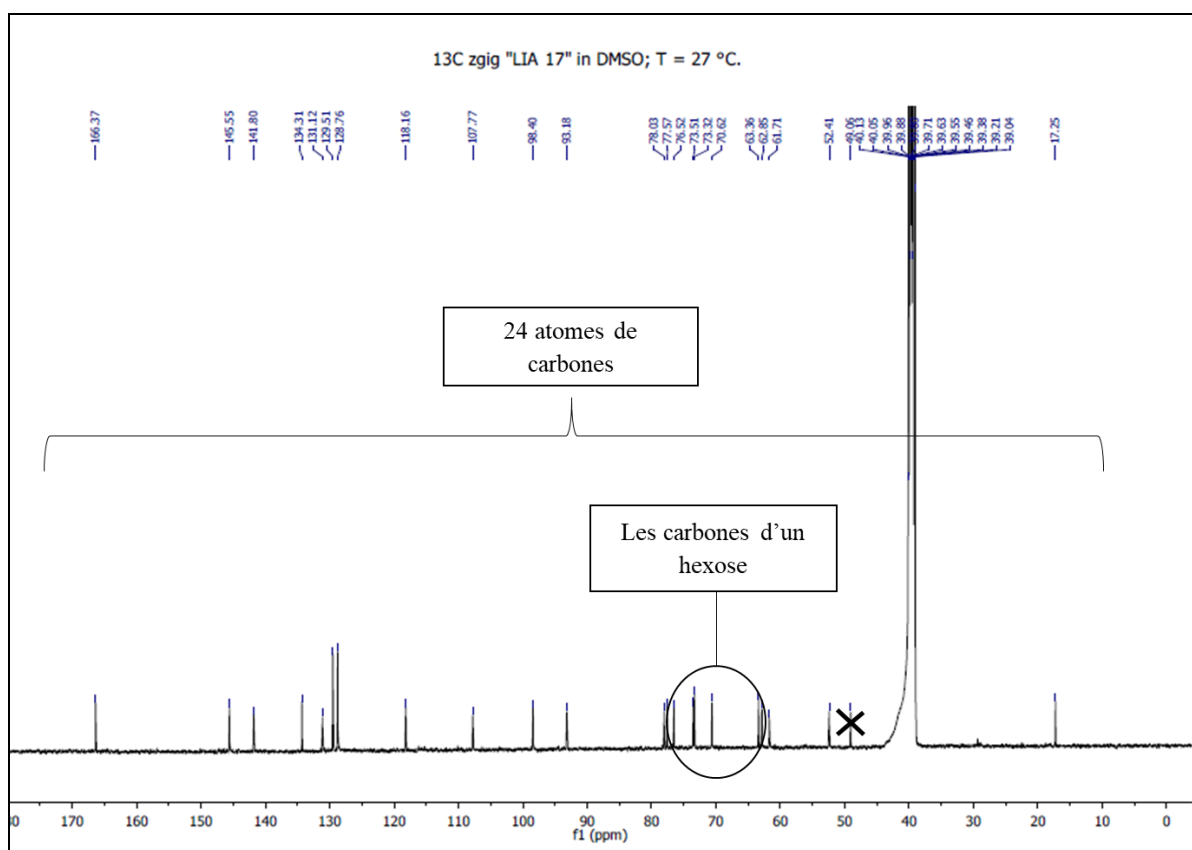


Spectre IV.4.2.3 : Spectre RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé LIA-17

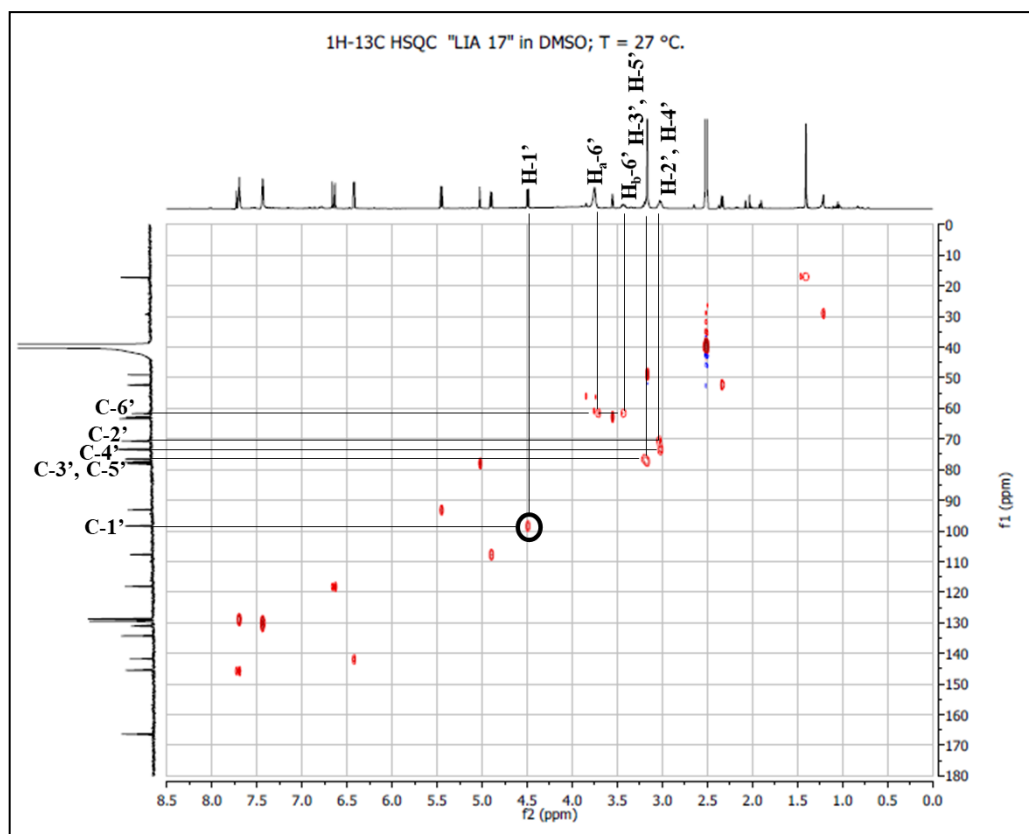
Donc, et par élimination du signal de méthanol, la structure du composé LIA-17 renferme 24 atomes de carbone (**Spectre IV.4.2.4**), à l'aide d'une analyse simultanée des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC et COSY, on peut distinguer parmi ces carbones ceux d'un hexose, attribués comme suit :

- Un CH à $\delta_{\text{C}} = 98,4$ ppm grâce à sa corrélation avec le proton anomérique ($\delta_{\text{H}} = 4,49$ ppm, *d*, $J = 7,8$ Hz) sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.2.5**), qui peut être attribuer à la position anomérique C-1' dont la valeur du déplacement chimique indique que cette entité osidique est attachée à la partie génine par une liaison *O*-hexose, et la valeur de la constante de couplage indique une configuration β de ce carbone anomérique.
- Un CH à $\delta_{\text{C}} = 70,6$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 3,00\text{-}3,04$ ppm, *m*, partiellement recouvert par le signal d'un autre proton de l'hexose), le proton de ce carbone montre sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.6**) une tache de corrélation avec le proton anomérique, il est attribué donc à la position C-2'.
- Un CH à $\delta_{\text{C}} = 76,5$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 3,15\text{-}3,21$ ppm, *m*, recouvert par le signal d'un autre proton de l'hexose), attribuable à la position C-3', grâce à la corrélation observée sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.6**) entre le proton porté par ce carbone et le proton H-2'.

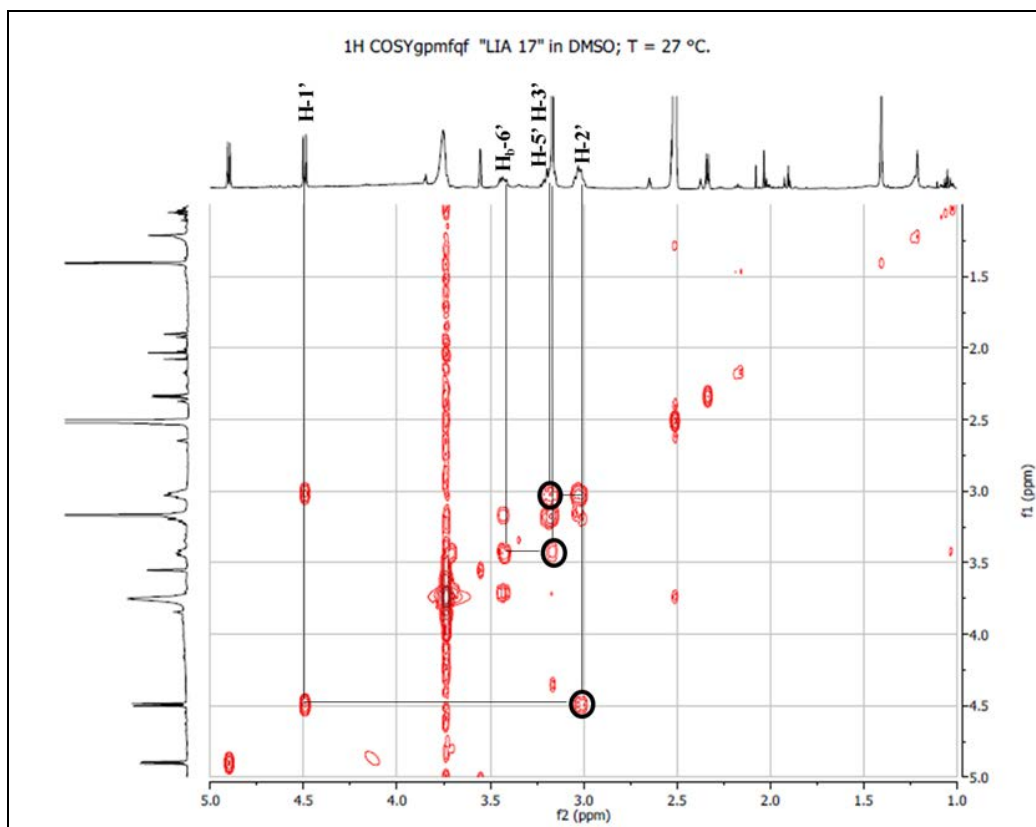
Le spectre HSQC (**Spectre IV.4.2.5**) montre que les signaux à $\delta_{\text{H}} = 3,68$ ppm (*m*, recouvert par le signal du solvant) et $\delta_{\text{H}} = 3,44$ ppm (*dd*, $J = 11,4 ; 6,6$ Hz) donnent deux taches de corrélation avec le même carbone indiquant ainsi qu'il s'agit des deux protons d'un méthylène, attribuable à H-6a' et H-6b' respectivement, le carbone de ce méthylène résonant à $\delta_{\text{C}} = 61,7$ ppm est attribué alors à la position C-6'. Sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.6**) le H6-b' donne une tache de corrélation avec le proton dont le signal est superposé au signal du H-3'. Le carbone de ce proton est repéré à $\delta_{\text{C}} = 77,6$ ppm et attribué à la position C-5'. Il ne reste que l'attribution du carbone de la position C-4' de cet hexose dont le signal de son proton est celui qui apparait partiellement recouvert par le signal de H-2', Ce carbone est repéré à $\delta_{\text{C}} = 73,3$ ppm. Donc est après l'attribution de tous les carbones du groupement osidique en question, et par comparaison avec la bibliographie [3] on déduit que le sucre attaché à la génine est un glucose.



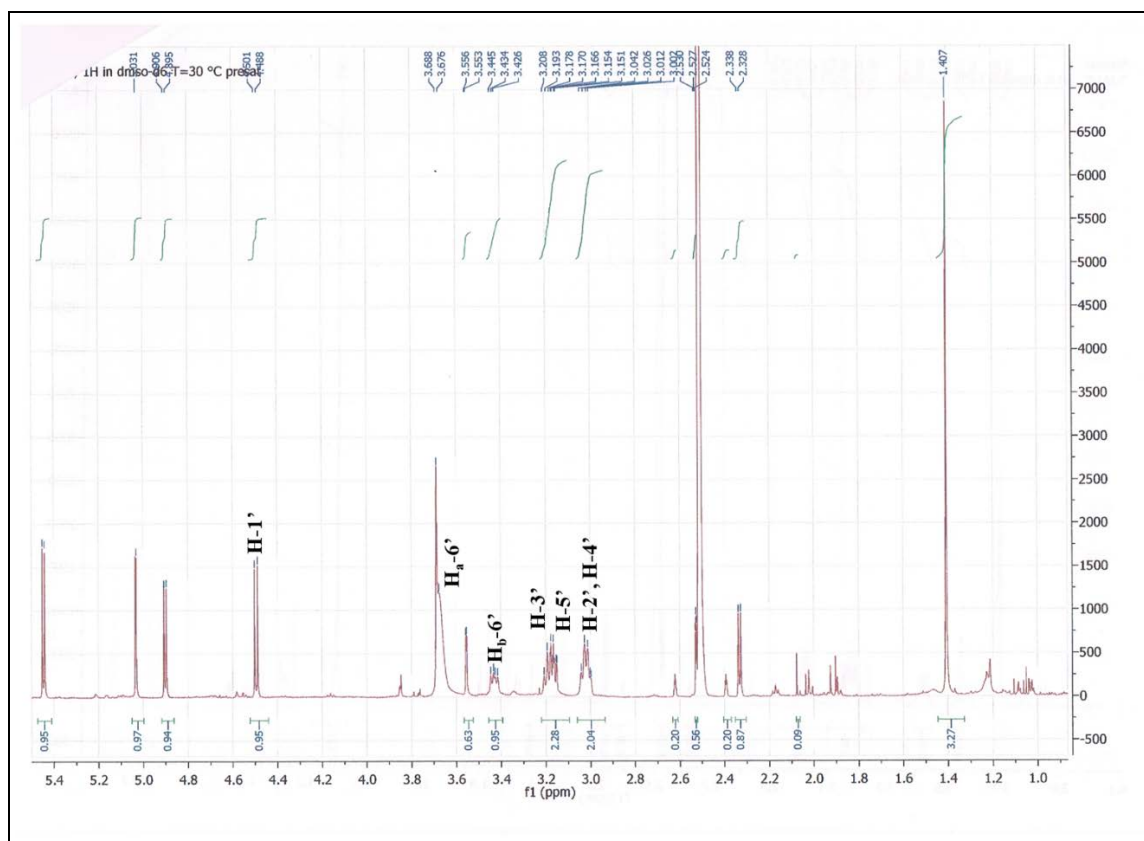
Spectre IV.4.2.4 : Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-17



Spectre IV.4.2.5 : Spectre HSQC (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-17



Spectre IV.4.2.6 : Spectre COSY (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement

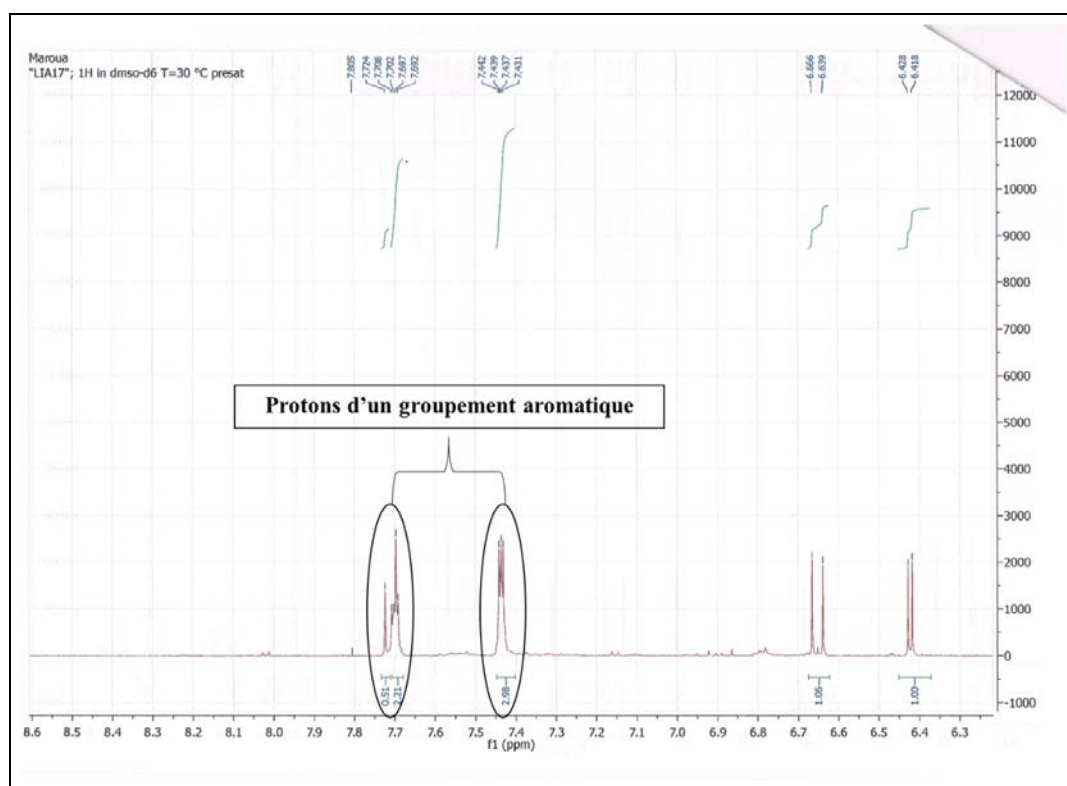


Spectre IV.4.2.7 : spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement

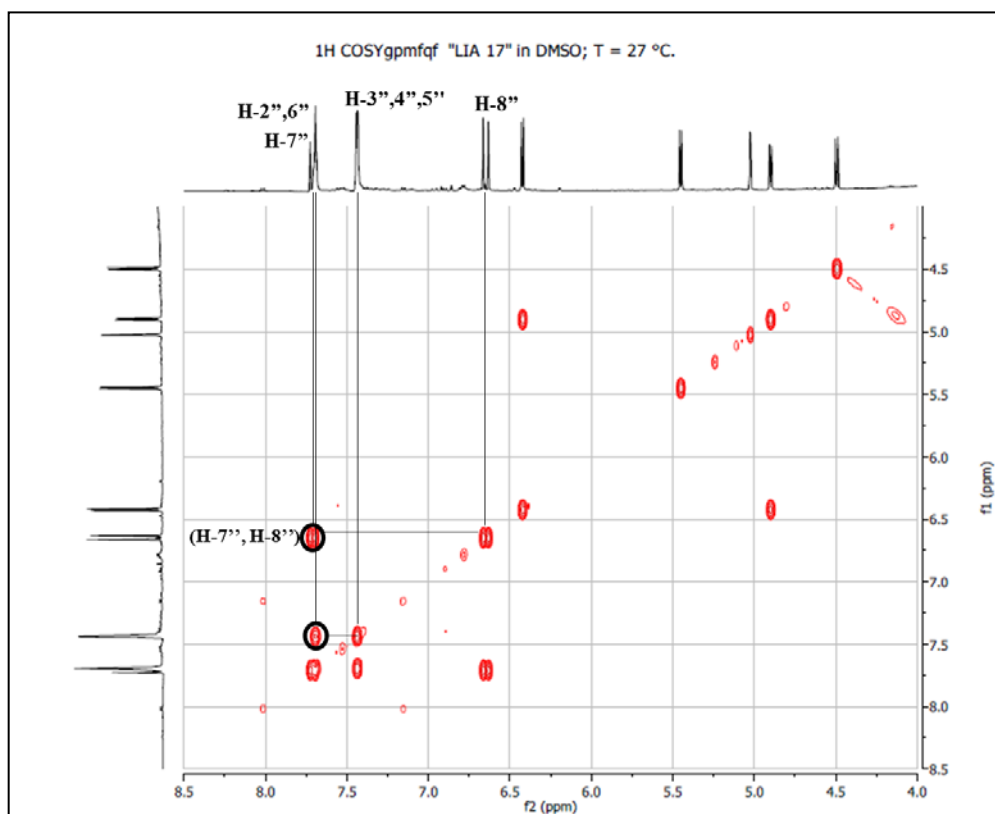
L'analyse des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C indique clairement que la génine de cette molécule est liée à un groupement aromatique. En effet, le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.2.8**) montre la présence de trois protons magnétiquement équivalents dans la zone des protons aromatiques à $\delta_{\text{H}} = 7,44$ ppm résonant sous forme d'un triplet et corrélant sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.9**) avec deux autres protons magnétiquement équivalents à $\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm dont le signal correspondant est recouvert par un autre. Cette observation permet de déduire que la génine est liée à un cycle aromatique monosubstitué. Le carbone quaternaire de ce noyau aromatique est repéré à $\delta_{\text{C}} = 134,3$ ppm d'une part grâce à sa corrélation avec les protons aromatiques sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.10**) et d'autre part, car c'est le seul carbone quaternaire (ne corrèle avec aucun proton sur le spectre HSQC) apparaît dans la zone des carbones aromatiques. Toujours sur le même spectre, ce carbone quaternaire aromatique montre une tache de corrélation avec le proton éthylénique résonant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,65$ ppm ($J = 16,2$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 118,2$ ppm). Le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.9**) montre que le deuxième proton de cette double liaison est repéré à $\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm dont son signal est recouvert par celui d'un proton aromatique, son carbone est repéré grâce au spectre HSQC (**Spectre IV.4.2.11**) à $\delta_{\text{C}} = 145,6$ ppm. Les deux protons de ce groupement éthylénique corrélient sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.10**) avec le carbone d'un carbonyle d'ester à $\delta_{\text{C}} = 166,4$ ppm, cette observation indique la présence d'un groupement ester conjugué avec une double liaison. La valeur de la constante de couplage ($J = 16,2$ Hz) entre les deux protons éthyléniques donne la faveur à une configuration *trans*.

Si nous collectons toutes ces données, nous trouvons que la partie génine est liée à un groupement *trans*-cinnamoyl par une liaison ester.

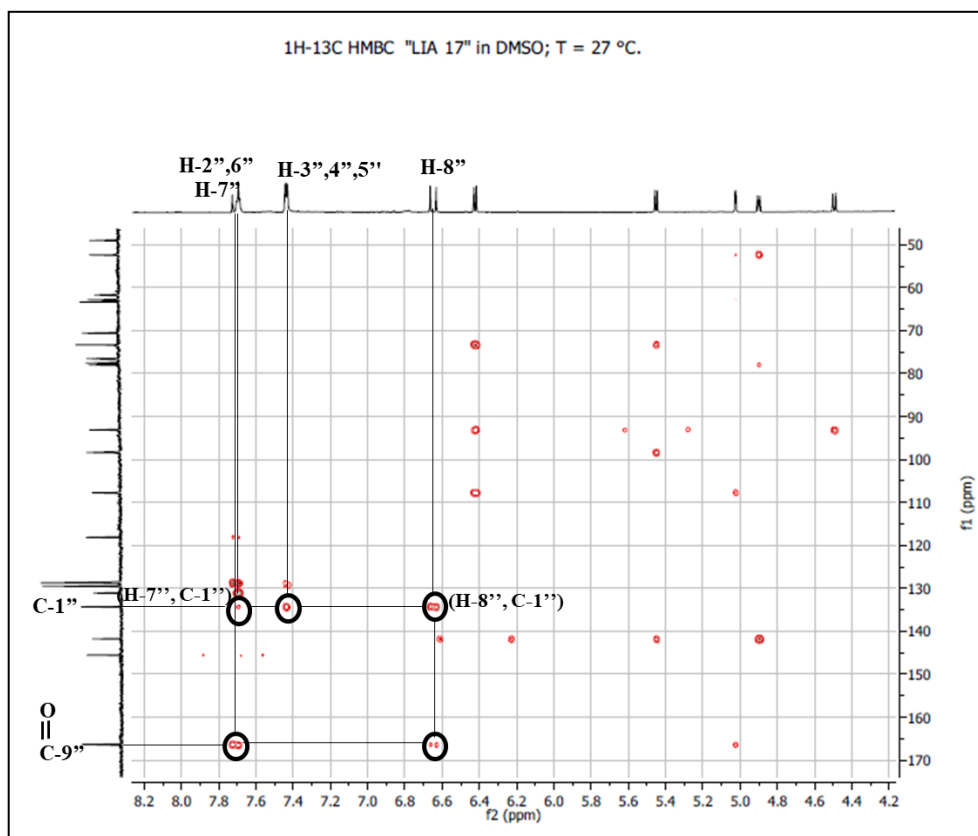
Si Nous numérotions le carbone quaternaire aromatique C-1'', L'attribution des autres carbones du cycle aromatique est réalisée à l'aide du spectre HSQC (**Spectre IV.4.2.11**) comme suit : C-2'' à $\delta_{\text{C}} = 128,8$ ppm, C-3'' à $\delta_{\text{C}} = 129,5$ ppm, C-4'' à $\delta_{\text{C}} = 131,1$ ppm, C-5'' à $\delta_{\text{C}} = 129,5$ ppm et C-6'' à $\delta_{\text{C}} = 128,8$ ppm. Les deux carbones éthyléniques repérés à $\delta_{\text{C}} = 145,6$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 118,2$ ppm prennent les positions C-7'' et C-8'', respectivement. Le carbone du carbonyle prendra donc la position C-9''.



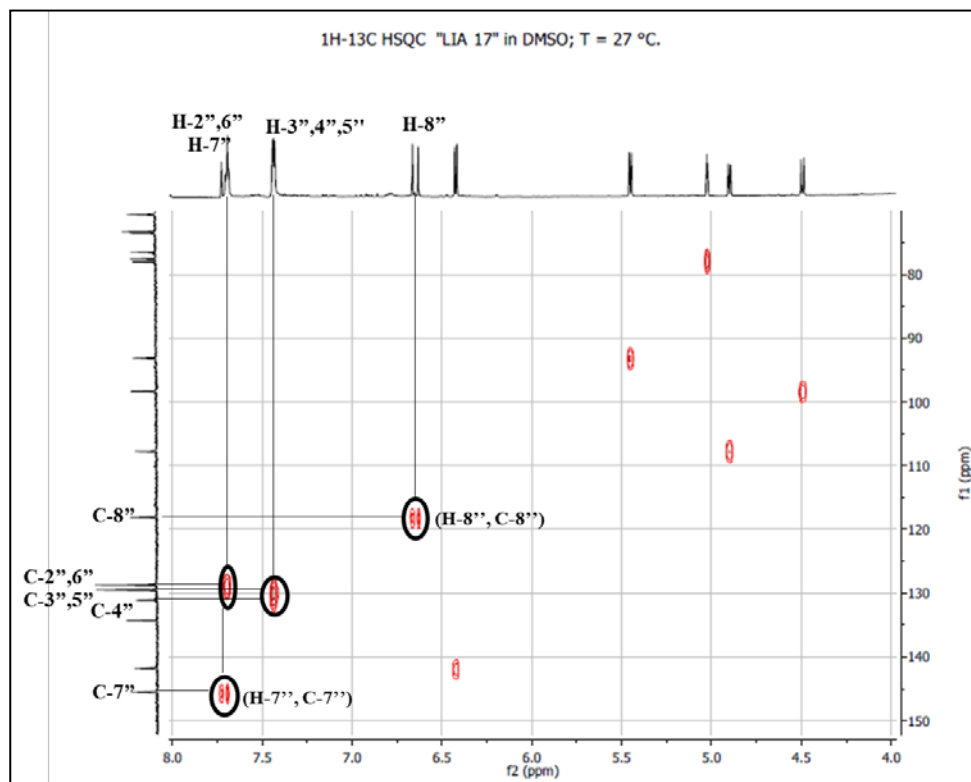
Spectre IV.4.2.8 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement



Spectre IV.4.2.9 : Spectre COSY (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement



Spectre IV.4.2.10 : Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement



Spectre IV.4.2.11 : Spectre HSQC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement

Après l'attribution des atomes de carbone du groupement glucosylé et du groupement cinnamoyl, il ne reste qu'attribuer les atomes de carbones de la partie génine. À l'aide d'une analyse simultanée des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC et COSY, cette attribution est réalisée comme suit :

- Un CH à $\delta_{\text{C}} = 93,2$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 5,45$ ppm, d , $J = 6,0$ Hz), Le déplacement chimique du carbone de ce méthine indique qu'il est attaché à deux atomes d'oxygène. Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**) le proton de ce carbone montre une tache de corrélation avec le carbone anomérique indiquant ainsi le point de glycosylation de cette molécule. Nous numérotons alors cette position C-1. Le premier oxygène est donc celui de la liaison O-glucose, le deuxième oxygène est alors placé en position 2.

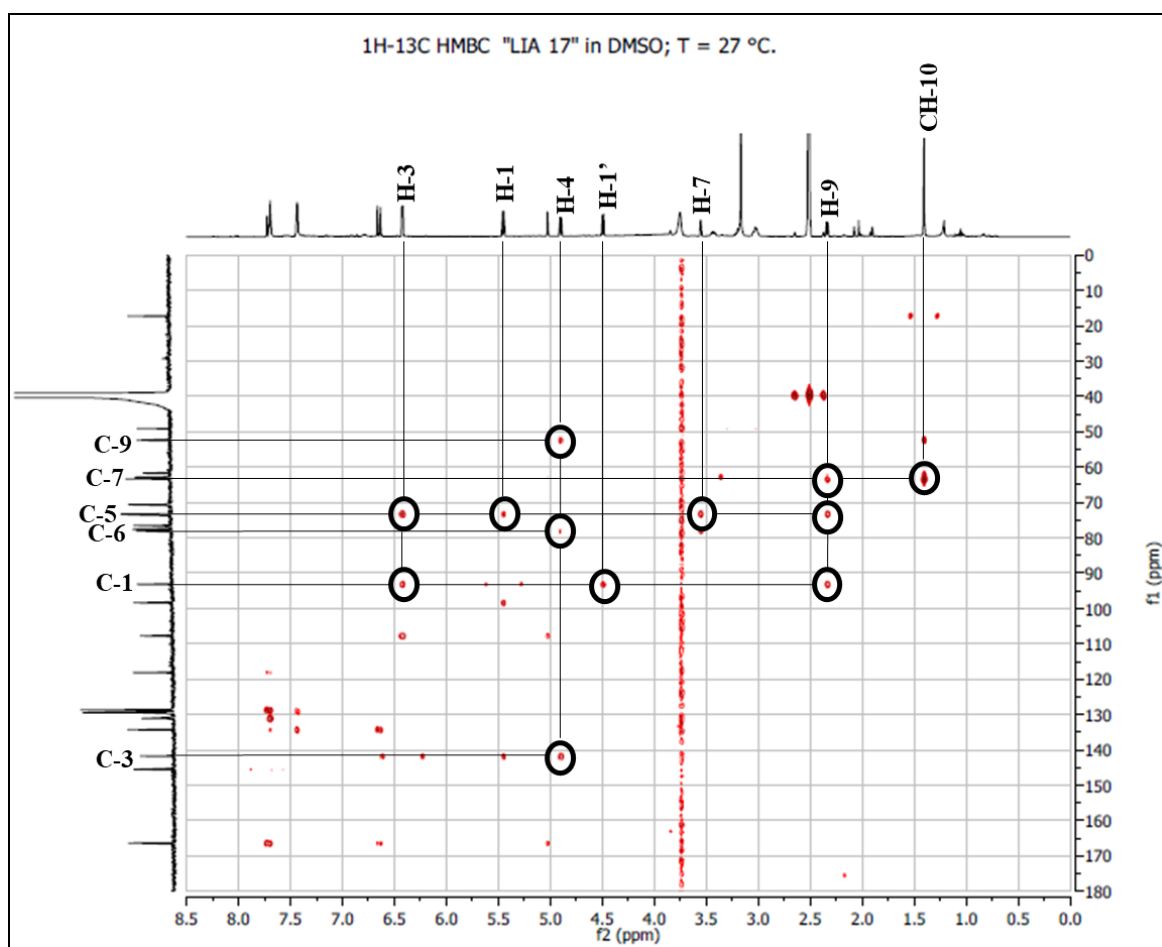
En vérifiant les corrélations du carbone numéroté 1 sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**), on remarque qu'il corrèle avec deux autres protons mise à part l'anomérique, le premier correspond à un CH éthylénique à $\delta_{\text{H}} = 6,42$ ppm (d , $J = 6,0$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 141,8$ ppm) et le

deuxième plus blindé à $\delta_{\text{H}} = 2,33$ ppm (*d*, $J = 6,0$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 52,4$ ppm). Le déplacement chimique du deuxième proton et le couplage vicinale observé sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.13**) avec le proton H-1, élimine la possibilité de son emplacement en position trois du fait que la position 2 est occupée par un atome d'oxygène. Le carbone éthylénique est alors attribué à la position trois. Toujours sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.13**), le H-3 montre une tache de corrélation avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 4,90$ ppm (*d*, $J = 6,0$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 107,8$ ppm), Ce proton est donc celui du C-4. Encore sur le même spectre, le H-4 montre uniquement une tache de corrélation avec le H-3, cette observation nous permet de déduire que la position 5 est occupée par un carbone quaternaire.

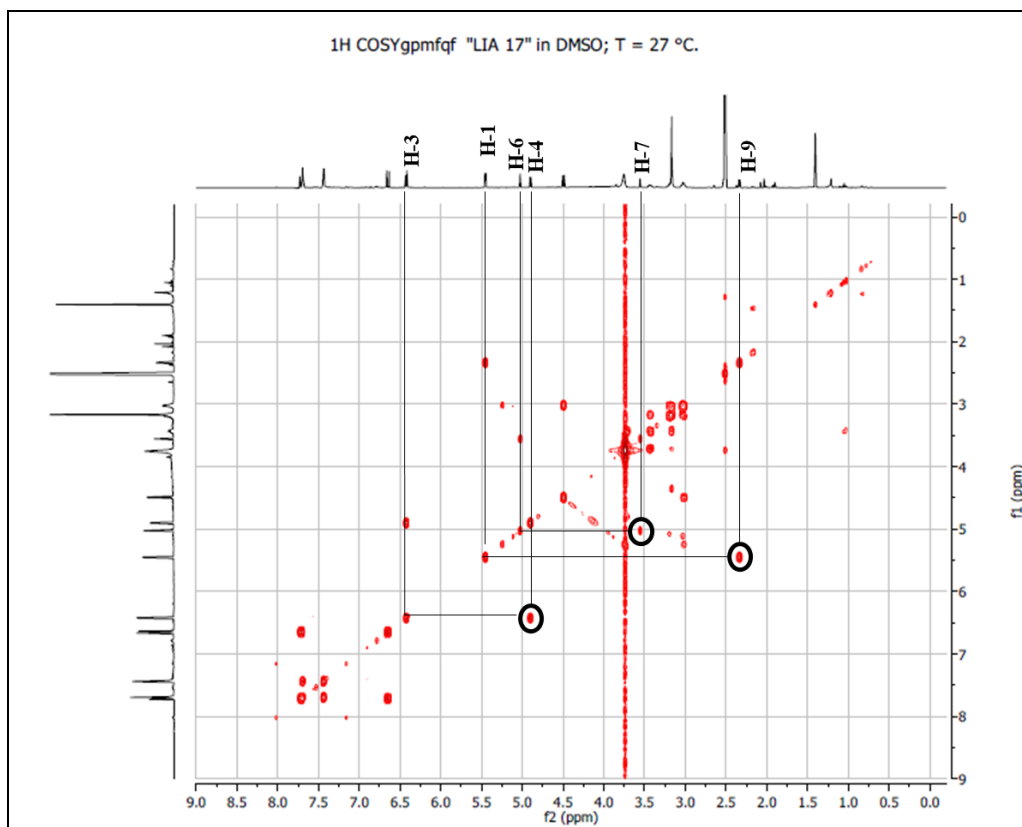
Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**), le H-4 montre trois taches de corrélations. La première avec le carbone éthylénique C-3, et deux autres corrélations avec les carbones à $\delta_{\text{C}} = 78,0$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 52,4$ ppm. Nous avons déjà montré que le proton du carbone repère à $\delta_{\text{C}} = 52,4$ ppm est en position vicinale par rapport au H-1, donc c'est le carbone repéré à $\delta_{\text{C}} = 78,0$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 5,03$ ppm, *d*, $J = 1,8$ Hz) qui va occuper la position 6, où son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné. Sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.13**), le H-6 montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 3,55$ ppm ($J = 1,8$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 62,9$ ppm) que nous pouvons numéroter H-7 et vu sa multiplicité, le carbone qui va occuper la position 8 est quaternaire.

Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**), le C-7 montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 2,33$ ppm attribuable à H-9. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le proton H-1 sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.2.13**), donc le carbone qui porte ce proton est lié avec le C-1 et le C-8, que nous numérotions C-9 ($\delta_{\text{C}} = 52,4$ ppm). Sur le même spectre HMBC, le C-7 montre une deuxième tache de corrélation avec les protons d'un groupement méthyl lié au carbone de la position 8 repéré à $\delta_{\text{H}} = 1,41$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 17,3$ ppm), attribués aux protons du carbone de la position C-10.

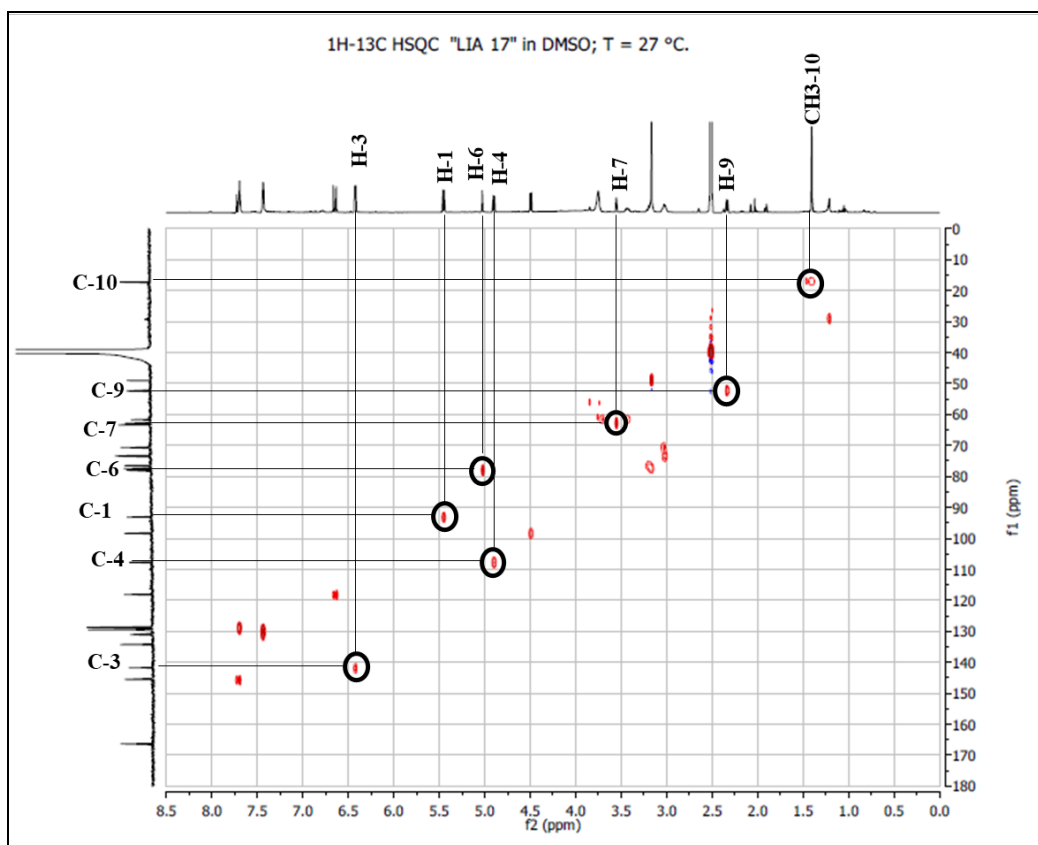
A ce stade, et si nous abstrayons tous les signaux attribués sur le spectre RMN ^{13}C , nous remarquons qu'il reste deux non attribués à $\delta_{\text{C}} = 73,5$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 63,4$ ppm. Le carbone à $\delta_{\text{C}} = 73,5$ ppm corrèle sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**) avec les protons H-3, H-1, H-7 et H-9, il est donc attribué à la position C-5. Le deuxième carbone est alors attribué à la position C-8. Le déplacement chimique des deux carbones C-8 et C-5 indique que ces deux positions sont oxygénées.



Spectre IV.4.2.12 : Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LI-A17

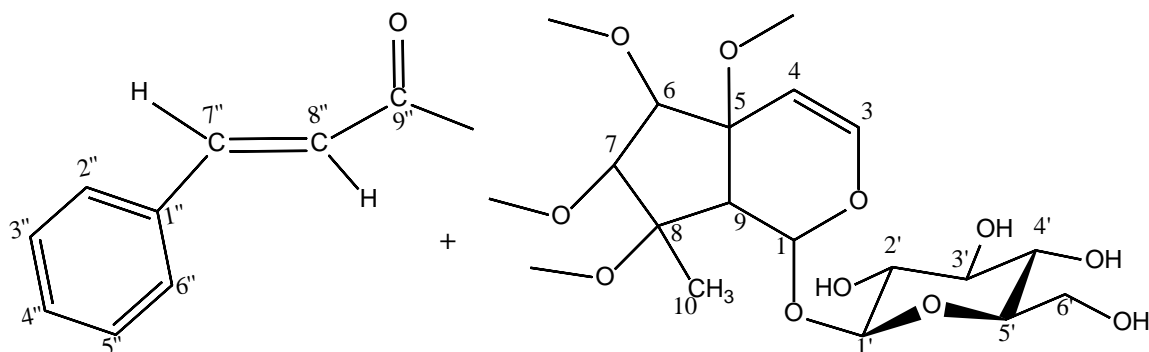


Spectre IV.4.2.13 : Spectre COSY (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17

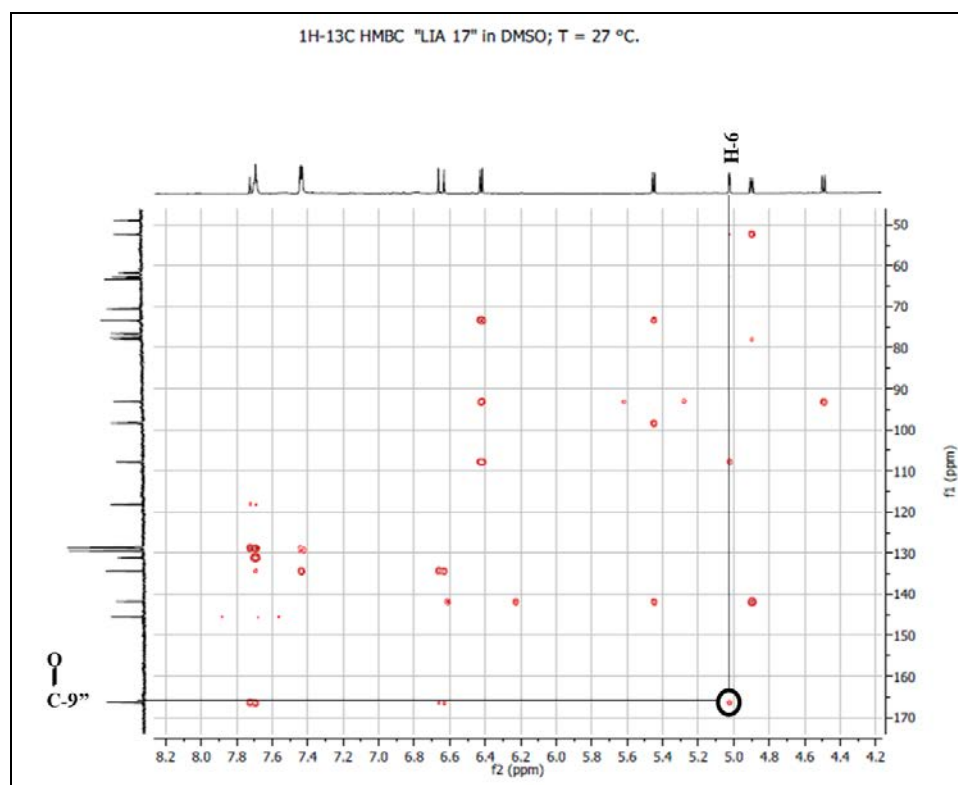


Spectre IV.4.2.14 : Spectre HSQC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17

La corrélation qui apparaît sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.12**) entre le H-9 et le C-5, nous permet de déduire que la structure développée de la génine est de type 2-oxa-bicyclo-[4,3,0]-nonane ayant la liaison C-5—C-9 commune aux deux cycles. A ce stade de notre analyse nous avons les deux entités suivantes :



Il suffit de lier le groupement cinnamoyl avec l'iridoïde en question nous aurions la structure finale, cela est réalisé grâce à une analyse du spectre HMBC (**Spectre IV.4.2.15**) qui montre une tache de corrélation entre le carbone du carbonyle du groupement cinnamoyl et le proton du C-6, ce qui permet de lier les deux parties par un pont oxygéné entre ces deux positions. Cette observation nous permet d'obtenir la structure représentée dans la **figure IV.3**.



Spectre IV.4.2.15 : Spectre HMBC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé LIA-17, étalement

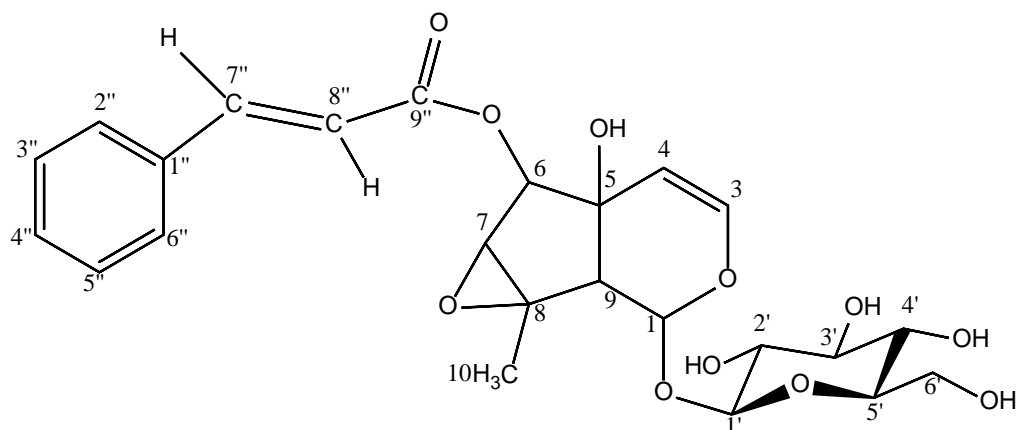


Figure IV.3 : Structure plane du composé LIA-17

Il est connu dans la littérature que les iridoïdes admettent en général un squelette *cis*-2-oxabicyclo [4.3.0] nonane [6]. Aussi les iridoïdes sont réputés par la présence d'un glucose en C-1 via une liaison β -glucosidique [6]. Parlant de notre composé, le déplacement chimique du C-1 inférieur à 100 ppm ($\delta_C = 93,2$ ppm) et le déplacement chimique du H-9 supérieur à 2 ppm ($\delta_H = 2,33$ ppm) sont en faveur d'une jonction *cis*-2-oxabicyclo [4.3.0] nonane avec une orientation β de l'hydroxyle en position 5 ($\delta_C = 96 - 100$ ppm pour le C-1 et $\delta_H = 2,0 - 2,7$ ppm pour le H-9) [7-8]. Il en sera donc de même pour l'orientation du H-9.

L'orientation des autres centres chiraux de la partie génine est définie grâce à l'étude du spectre NOESY (**Spectre IV.4.2.16**) qui montre une tache de corrélation entre le proton H-1 qui est en orientation α et le H-6 indiquant une même orientation pour ces deux protons. La petite valeur de constante de couplage entre le H-6 et le H-7 ($J = 1,8$ Hz) est en faveur d'une même orientation pour ces deux protons ce qui mène à une orientation H-6 α [9]. Cela est confirmé par le spectre NOESY qui montre une corrélation entre le H-6 et H-7, ce spectre montre également une corrélation entre le H-7 et les protons du CH₃-10 indiquant une orientation α pour les deux.

La combinaison de l'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la **Figure IV.4**. Cette molécule est nouvelle et nous la reportons pour la première fois dans la littérature sous le nom de 6-*O*-*trans*-cinnamoylantirinoside. Cette structure représente une grande similitude avec le 6-*O*-*trans*-*p*-coumaroylantirinoside ce qui permet une confirmation finale de la structure et des attributions réalisées [10].

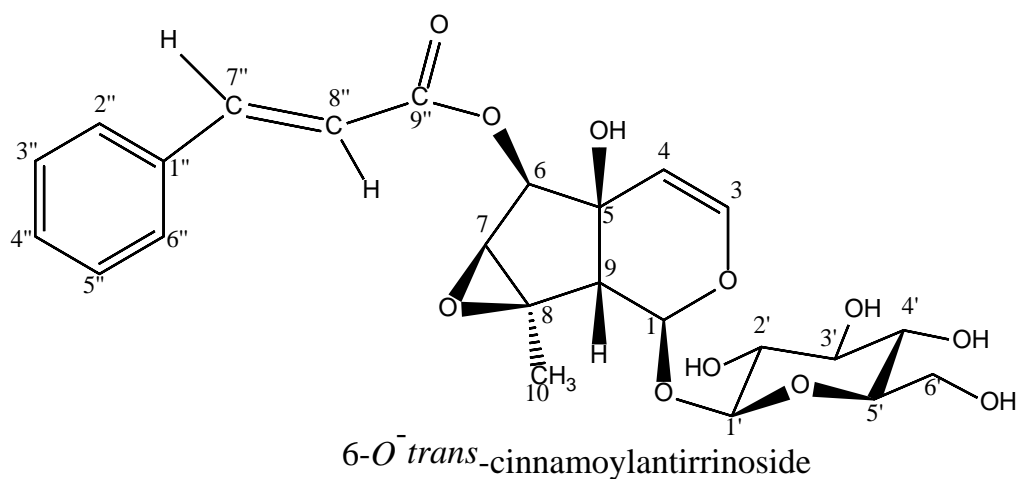
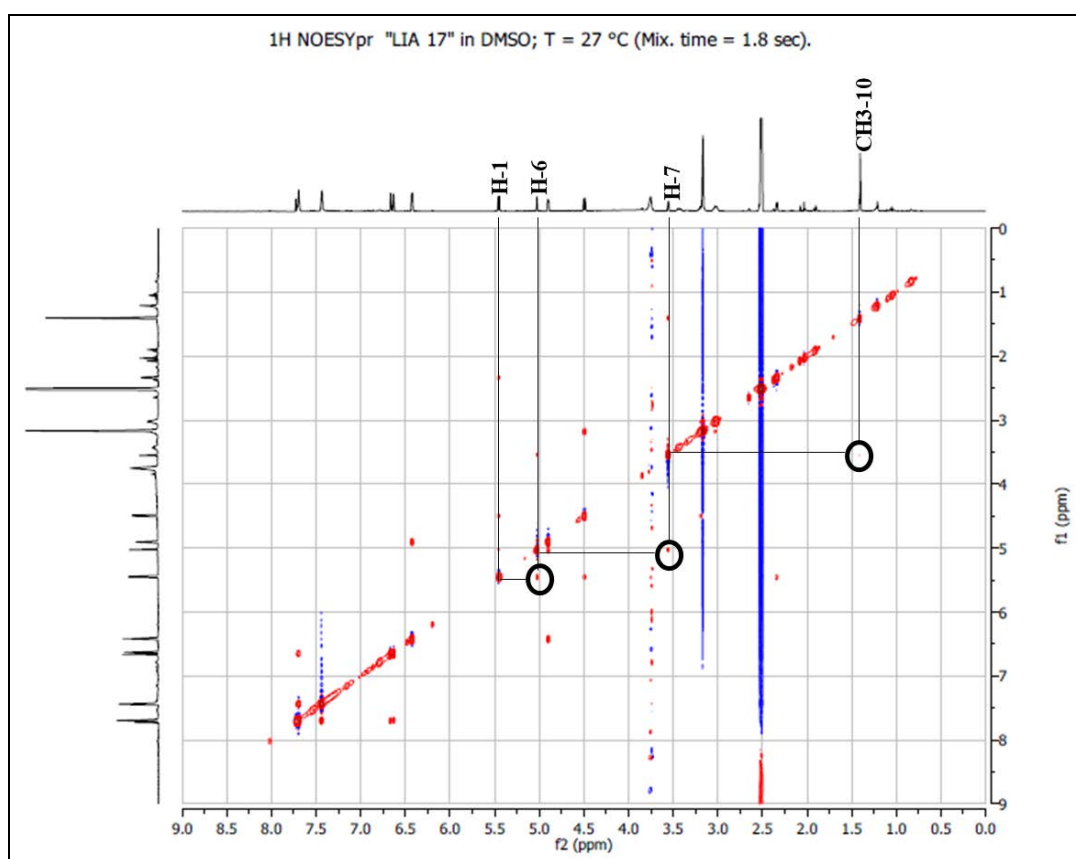


Figure IV.4 : structure du composé LIA-17

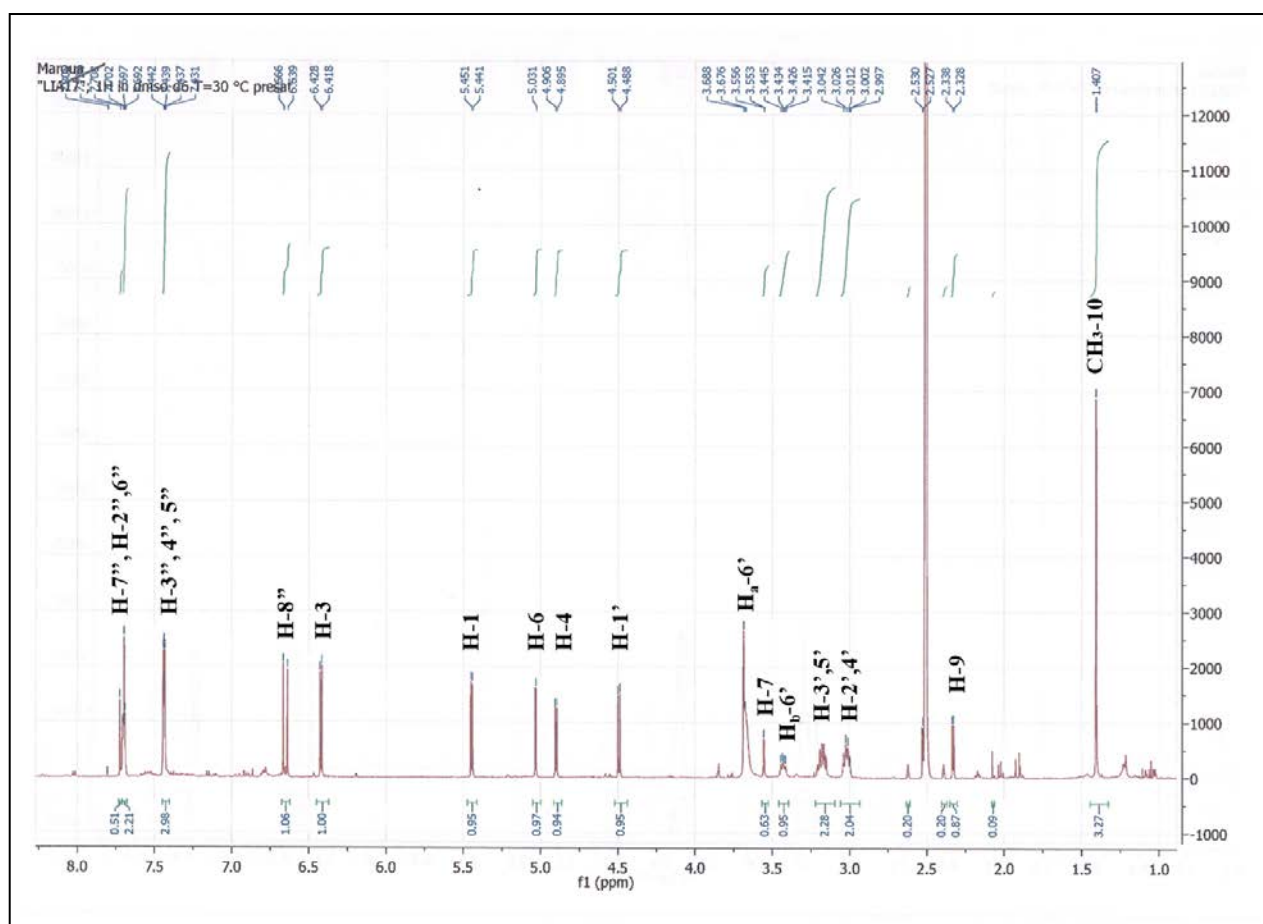


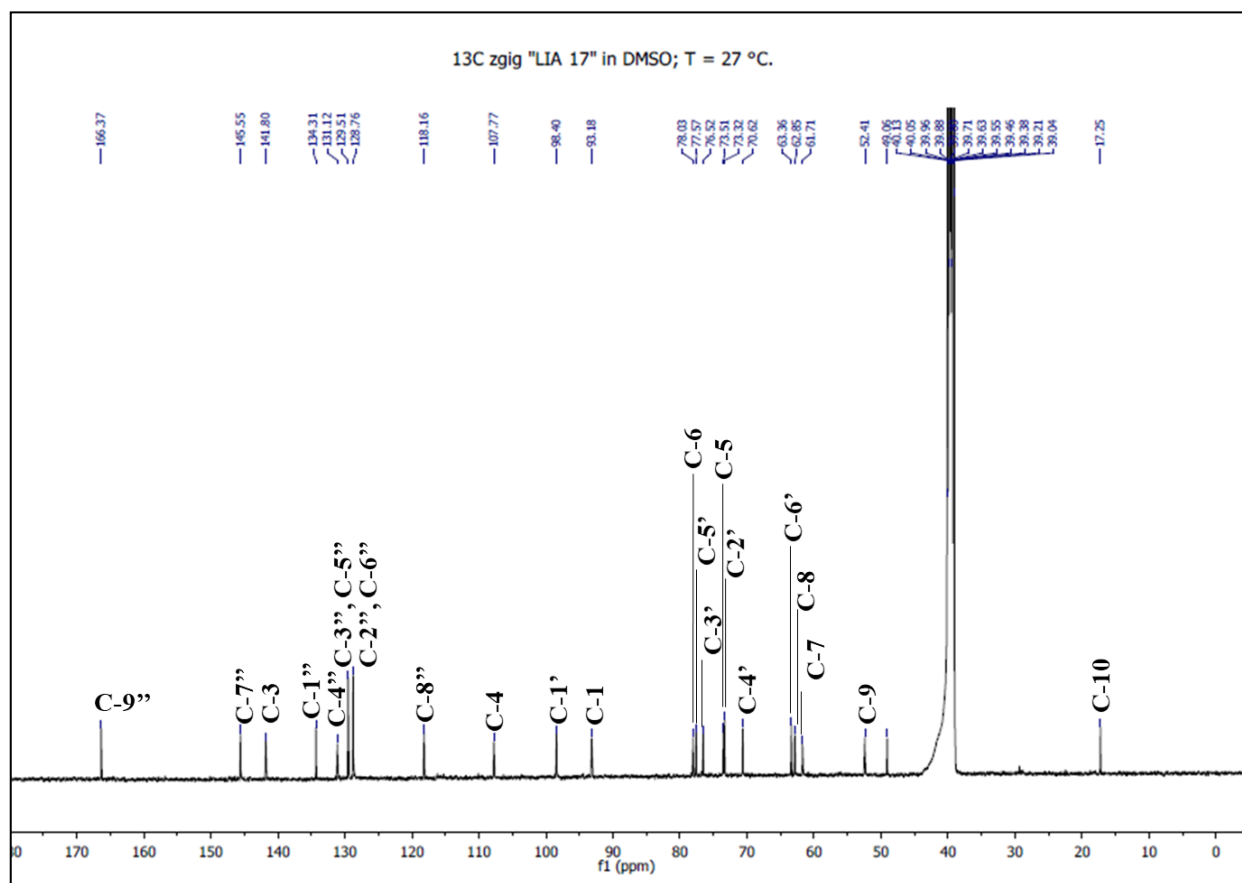
Spectre IV.4.2.16 : Spectre NOESY (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{ppm}) du composé LIA-17

Les données spectroscopiques RMN ¹H et RMN ¹³C sont rassemblées dans le **Tableau IV.5.**

Tableau IV.5 : Les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LIN-17

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
1	93,2	5,45 <i>d</i>	6,0	4'	70,6	3,00-3,04 <i>m</i>	-
2	-	-	-	5'	77,6	3,15-3,21 <i>m</i>	-
3	141,8	6,42 <i>d</i>	6,0	6'	61,7	3,68 <i>m</i> 3,44 <i>dd</i>	- 11,4 ; 6,6
4	107,8	4,90 <i>d</i>	6,0	1''	134,3	-	-
5	73,5	-	-	2''	128,8	7,70 <i>m</i>	-
6	78,0	5,03 <i>d</i>	1,8	3''	129,5	7,44 <i>t</i>	3,6
7	62,9	3,55 <i>d</i>	1,8	4''	131,1	7,44 <i>t</i>	3,6
8	63,4	-	-	5''	129,5	7,44 <i>t</i>	3,6
9	52,4	2,33 <i>d</i>	6,0	6''	128,8	7,70 <i>m</i>	-
10	17,3	1,41 <i>s</i>	-	7''	145,6	7,70 <i>m</i>	-
1'	98,4	4,49 <i>d</i>	7,8	8''	118,2	6,65 <i>d</i>	16,2
2'	73,3	3,00-3,04 <i>m</i>	-	9''	166,4	-	-
3'	76,5	3,15-3,21 <i>m</i>	-				

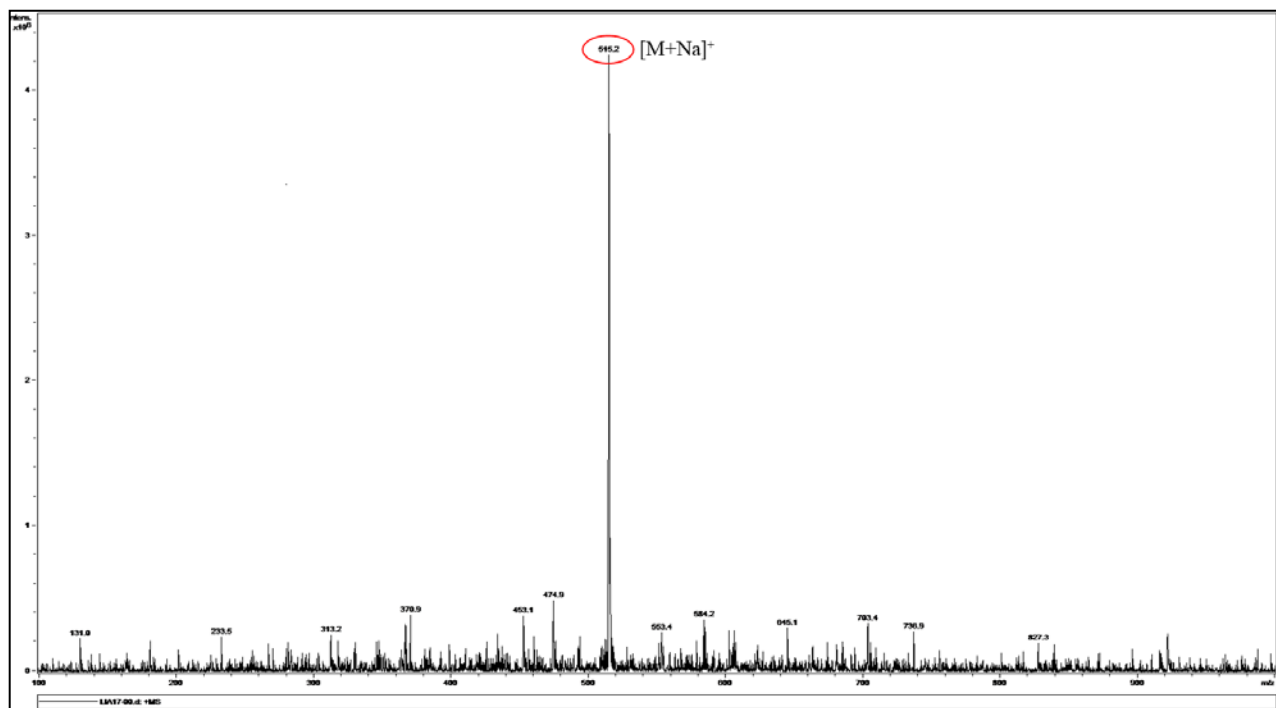
Spectre IV.4.2.17 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-17



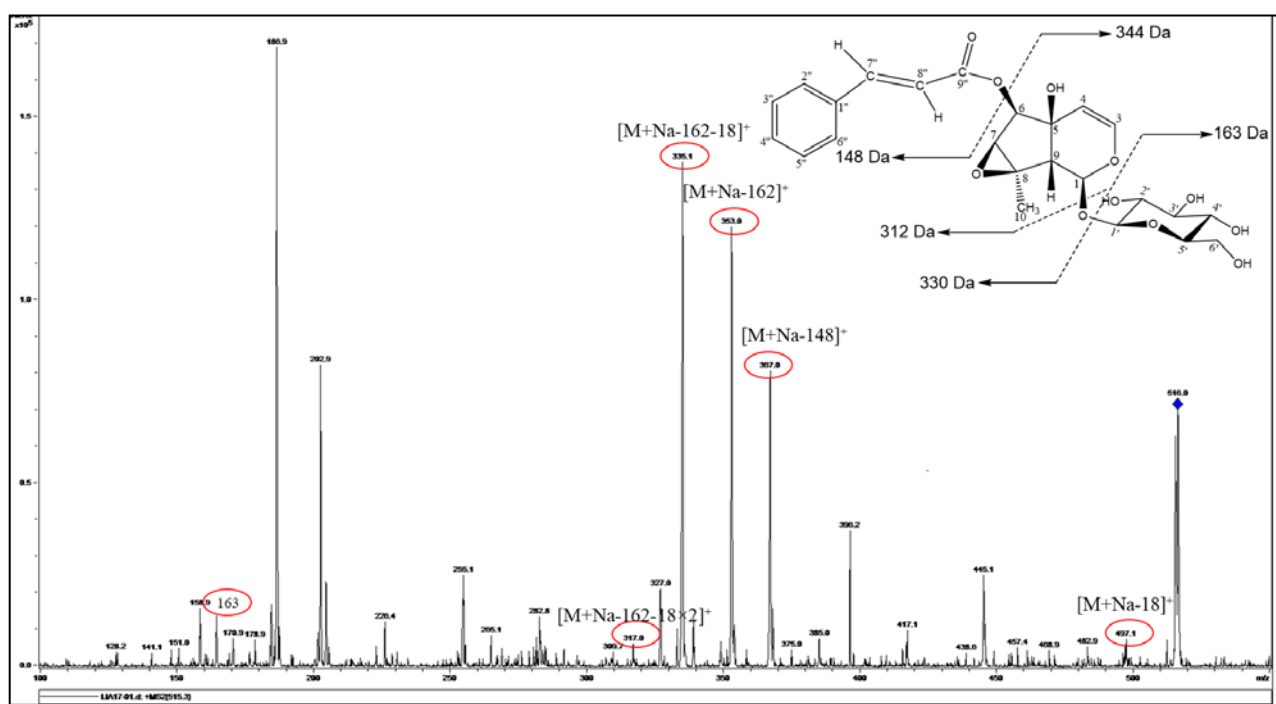
Spectre IV.4.2.18 : Spectre RMN¹³C (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{ppm}) du composé LIA-17

L'étude du spectre de mass enregistré en mode SM/IES (+) (**Spectre IV.4.2.19**) montre un pic à $m/z = 515,2$ correspond à $[M+Na]^+$ pour une masse moléculaire de 492, ce résultat confirme bien la formule brute précédemment suggérée (C₂₄H₂₈O₁₁) et confirme également la présence d'un époxyde lié entre les position 7 et 8 et n'en pas deux groupements hydroxyles.

L'étude du spectre SM²/IES (+) (**Spectre IV.4.2.20**) indique la présence des fragments relatifs à la structure de notre composé. La majorité des pics sont interprétés comme des possibilités de fragmentation pour confirmer la structure de notre composé comme suit : 497,1 $[M+Na-18]^+$, 367,0 $[M+Na-148]^+$, 353,0 $[M+Na-162]^+$, 335,1 $[M+Na-162-18]^+$, 317,0 $[M+Na-162-2 \times 18]^+$, 163,0 Glc.



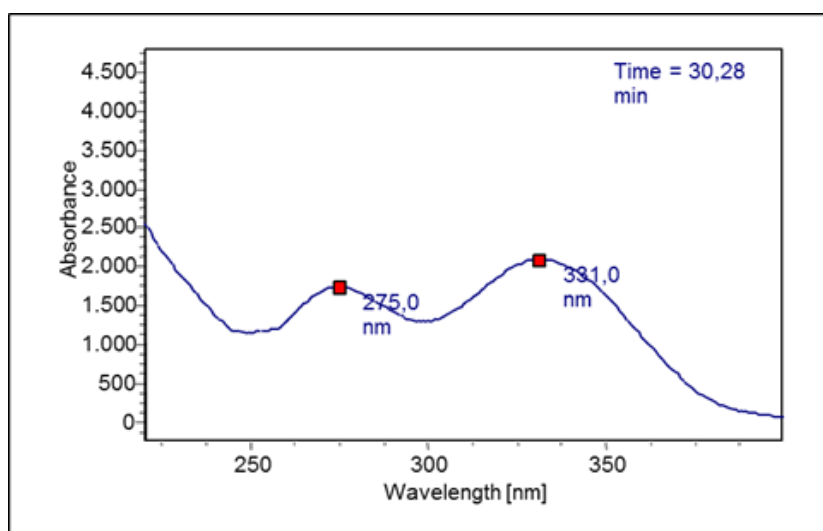
Spectre IV.4.2.19 : Spectre de masse SM/IES (+) du composé LIA-17



Spectre IV.4.2.20 : Spectre de masse SM²/IES (+) du composé LIA-17

IV.4.3. Elucidation structurale du composé 3 (LIA-22)

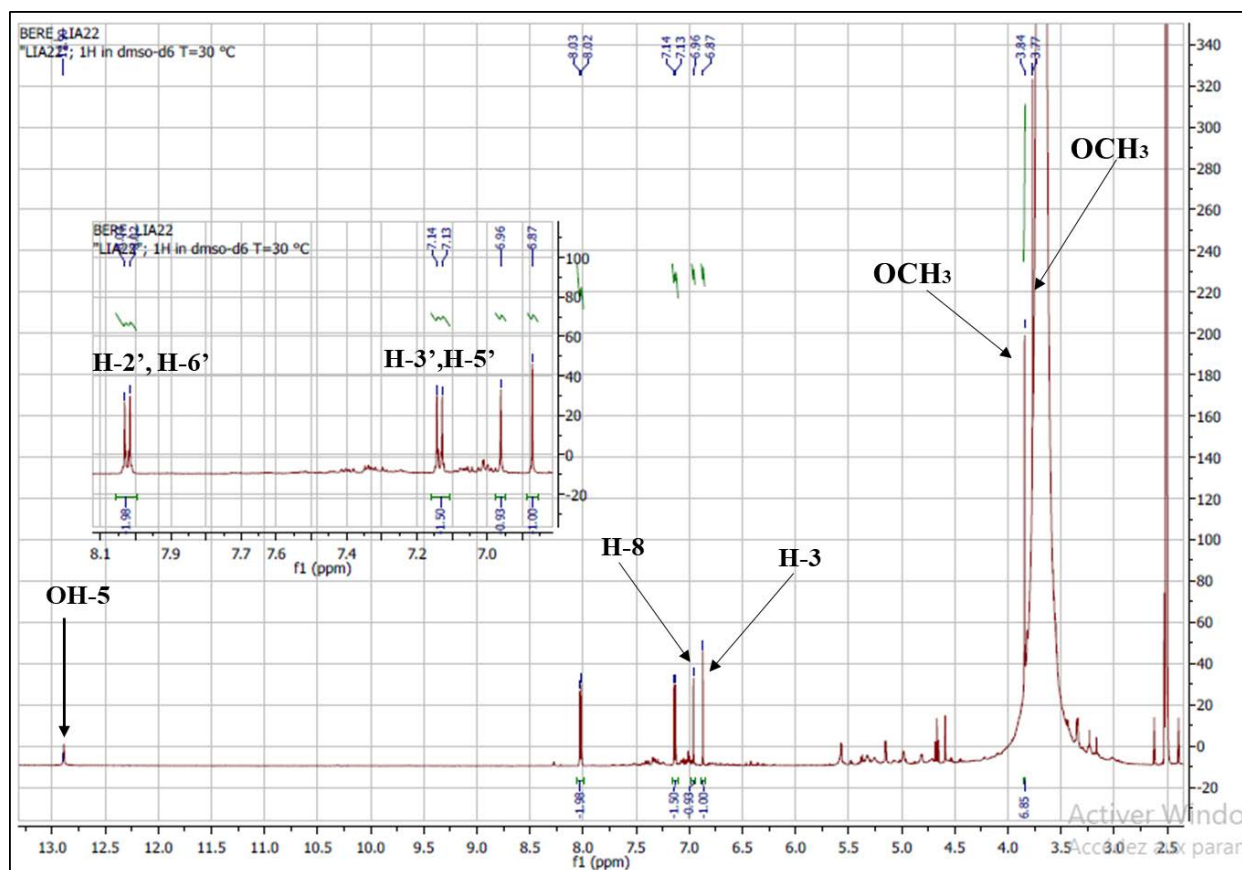
Le spectre UV enregistré dans le méthanol de ce composé montre deux bandes d'absorptions à $\lambda_{\max} = 275$ et 331 nm caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone.



Spectre IV.4.3.1 : Spectre UV dans le méthanol du composé LIA-22

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.3.2**) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ a montré la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavone que l'on peut identifier par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12,89$ ppm attribuable au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- Une para substitution du noyau B (OR-4') déduite par la présence de deux signaux sous forme de doublet dans la zone des protons aromatiques, le premier à $\delta_{\text{H}} = 8,02$ ppm (2H, *d*, $J = 9$ Hz), attribuable aux protons H-2' et H-6', et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration (2H) à $\delta_{\text{H}} = 7,14$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,96$ et $6,87$ ppm attribuables aux protons H-8 ou H-6 et H-3, respectivement.
- deux singulets à $\delta_{\text{H}} = 3,84$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3,77$ ppm d'intégration 3H chacun, indiquent la présence de deux groupements méthoxyles.



Spectre IV.4.3.2 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ_{ppm}) du composé LIA-22

Le spectre SM/IE (**Spectre IV.4.3.3**) montre le pic moléculaire à $m/z=314$ et deux autres fragments à $m/z = 167$ et à $m/z= 133$, caractéristiques d'une flavone avec un groupement méthoxyle et deux groupements hydroxyles attachés au cycle A ($m/z 167$) et un groupement méthoxyle attaché au cycle B ($m/z 133$) [11]. Les informations obtenues des spectres UV, RMN ^1H et SM suggèrent que la structure du composé LIA-22 est : 5,7-dihydroxy-6,4'-diméthoxyflavone ou 5,7-dihydroxy-8,4'-diméthoxyflavone. la comparaison des fragmentations de masse du LIA-22 avec ceux des composés de la bibliothèque commerciale NIST (vers. 2.0 g; 2011) indique qu'il s'agit de la première proposition, une flavone connu sous le nom de la pectolarigénine, en montrant une parfaite ressemblance entre les deux spectres de masse. Une dernière confirmation a été réalisée en interprétant quelques fragments MS comme suit : SM/IE m/z : 314 $[\text{M}]^+$, 299 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 271 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$, 183 $[\text{A}_1+\text{H}]^+$, 167 $[\text{A}_1-\text{CH}_3]^+$, 133 $[\text{B}_1+\text{H}]^+$, et par comparaison avec la littérature [11].

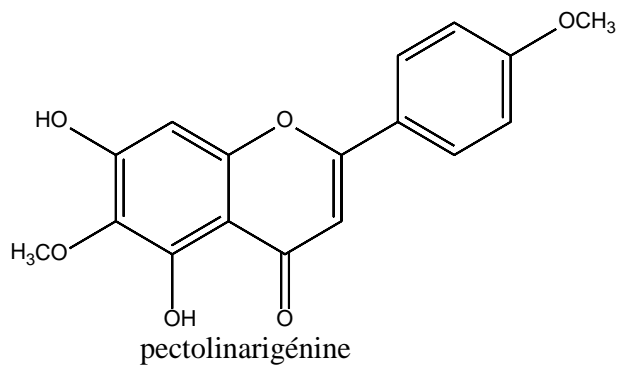


Figure IV.5 : structure du composé LIA-22

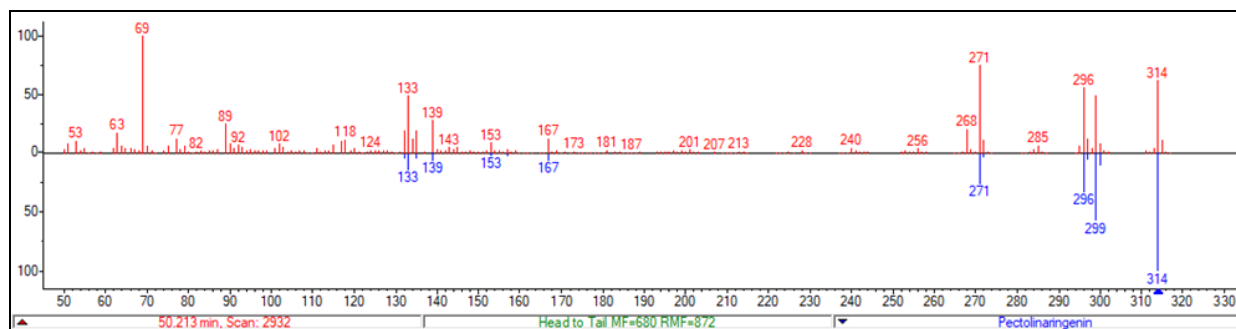
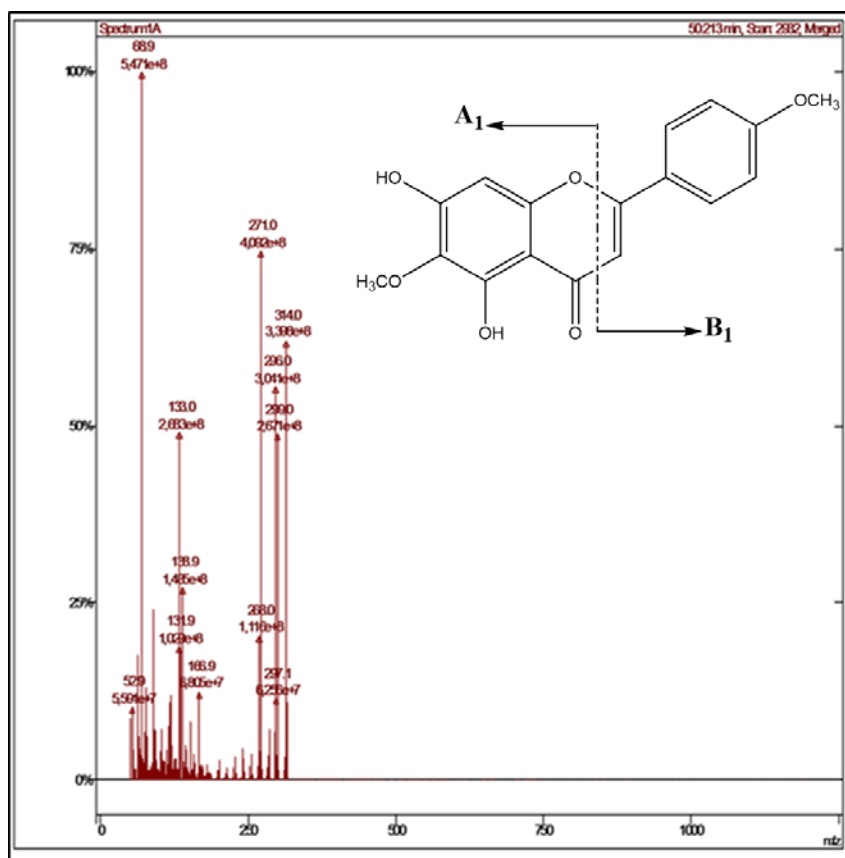


Figure IV.6 : Comparaison des spectres de masse du composé LIA-22 et de la pectolinarigénine présente dans la bibliothèque commercial NIST.



Spectre IV.4.3.3 : Spectre EI-MS du composé LIA-22

IV.4.4. Elucidation structurale du composé 4 (LIN-1)

Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux de couleur marron claire invisible sous UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). L'examen simultané des spectres RMN ^1H , COSY et HSQC enregistrés dans le CD_3OD montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type iridoïde, on observe sur le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.4.1**) :

- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 5,36$ ppm ($J = 3,2$ Hz) caractéristique du proton H-1 d'un iridoïde.
- Un signal sous forme d'un doublet de doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,05$ ppm ($J = 6,4 ; 2,0$ Hz) caractéristique du proton oléfinique H-3 d'un iridoïde.
- Un signal sous forme d'un doublet de doublet dédoublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,61$ ppm ($J = 6,4 ; 2,6 ; 0,8$ Hz) caractéristique d'un proton oléfinique, attribué à H-4 en se basant sur sa corrélation avec le H-3 sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.4.2**).

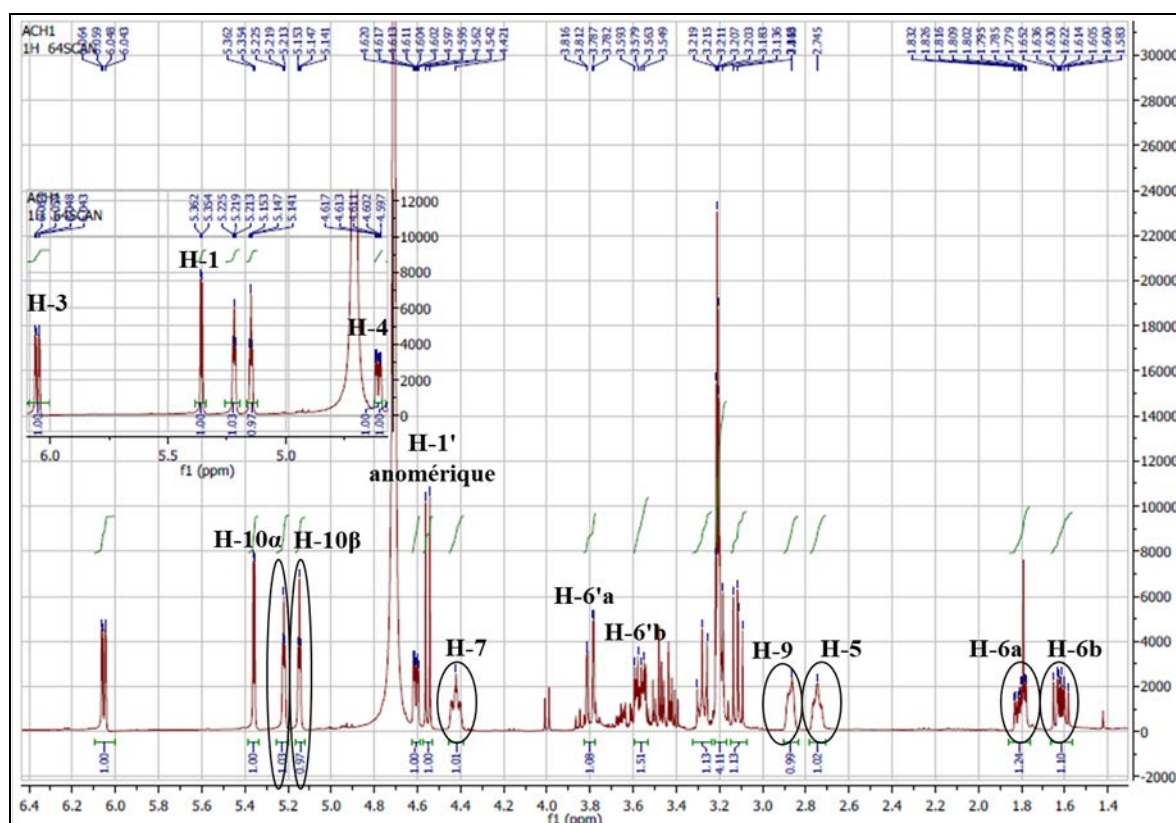
La multiplicité du signal du H-3 ainsi que la valeur de la constante de couplage ($J = 2$ Hz) indiquent la présence d'un H en position 5, et que ce couplage est en fait un couplage longue distance (couplage allylique). Ce couplage est d'ailleurs repéré sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.4.2**) entre le H-3 et le signal à $\delta_{\text{H}} = 2,75$ ppm d'intégration 1H (*m*) attribuable à H-5. Toujours sur le même spectre COSY, le H-5 montre trois autres taches de corrélations :

- La première corrélation avec le H-4, ce qui confirme son attribution.
- La deuxième corrélation avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 2,86$ ppm (*m*) attribuable à H-9 à cause de sa corrélation avec le H-1. Le H-9 montre sur le même spectre COSY une tache de corrélation avec le H-4, cette corrélation indique un couplage W entre les deux protons et explique ainsi la multiplicité du H-4.
- Une dernière corrélation avec les deux signaux sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}} = 1,81$ et $1,62$ ppm d'intégration 1H chacun, qui ne peut être expliqué que par la présence d'un groupement méthylène en position 6, attribuable donc à H-6a et H-6b. le spectre HSQC (**Spectre IV.4.4.3**) confirme cette attribution en montrant une tache de corrélation pour chacun des deux protons avec le carbone blindé à $\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm attribuable à C-6.

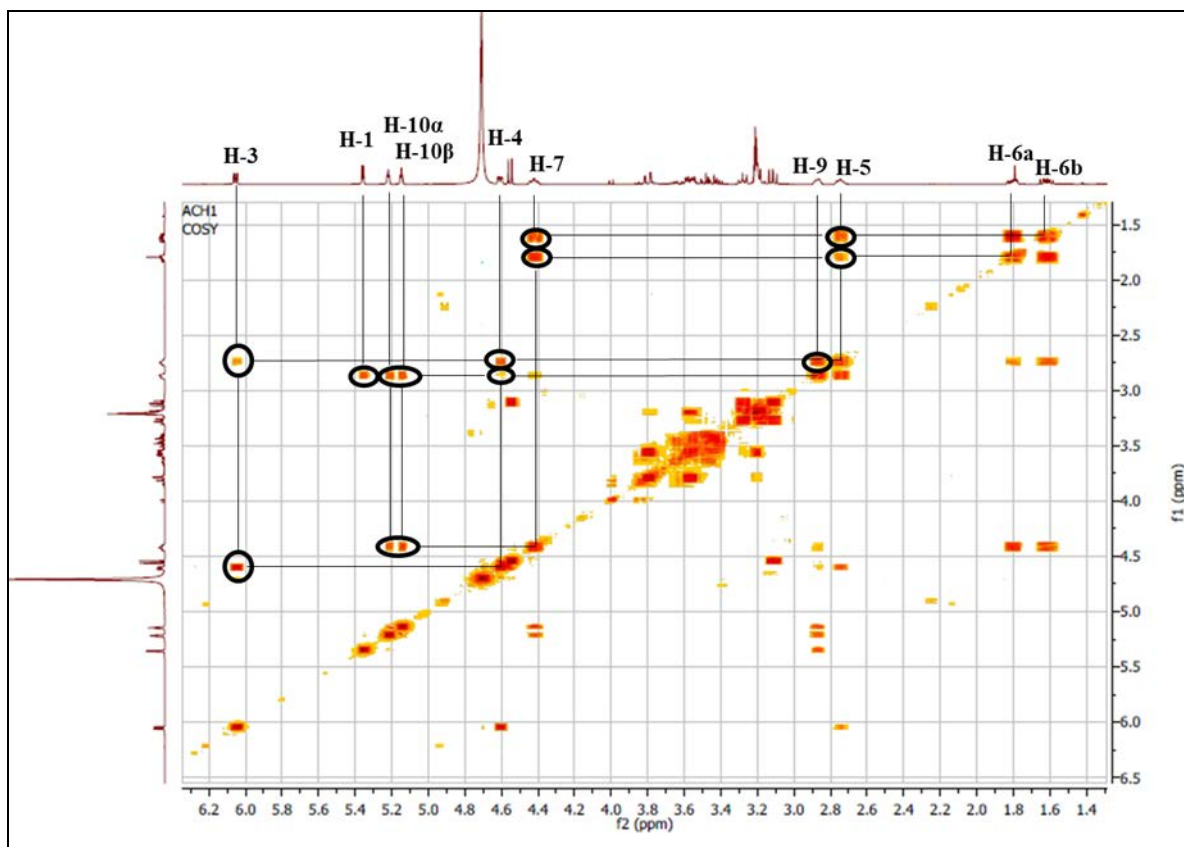
Le H-6 montre sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.4.2**) une corrélation avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 4,42$ ppm sous forme d'un multiplet attribuable à H-7, son carbone est localisé grâce au

spectre HSQC (**Spectre IV.4.4.3**) à $\delta_C = 72,9$ ppm, son déplacement chimique indique que cette position est oxygénée.

Les deux signaux sous forme de multiplet d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 5,22$ et $5,15$ ppm montrent sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.4.2**) deux taches de corrélation avec les protons H-9 et H-7, et vu leurs déplacements chimiques élevés, la possibilité de trouver un méthylène en position 8 est écartée, cependant ils ne peuvent être expliqués que par la présence d'un CH₂ éthylénique numéroté C-10 (le spectre HSQC (**Spectre IV.4.4.3**) confirme la présence de ce carbone éthylénique à $\delta_C = 109,7$ ppm et d'un carbone quaternaire en position C-8. Les deux multiplet sont donc attribués à H-10 α et H-10 β respectivement, et leurs multiplicités est dû à un couplage éthylénique à longue distance avec les protons H-7 et H-9.



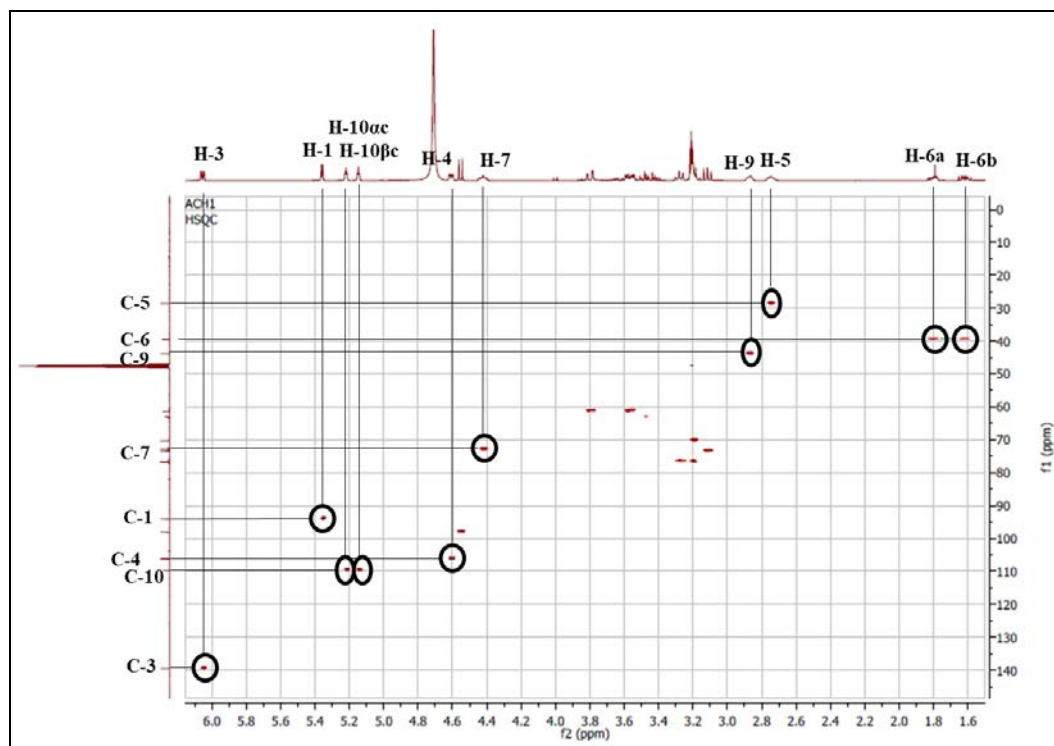
Spectre IV.4.4.1 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1



Spectre IV.4.4.2 : Spectre COSY (400 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé LIN-1

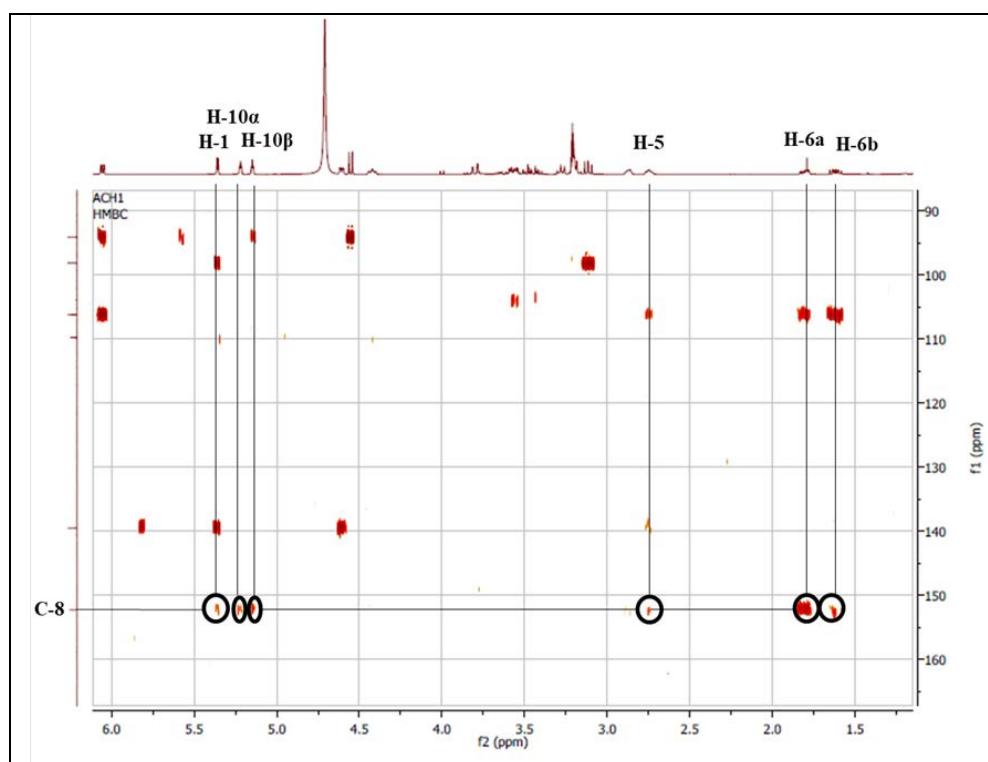
L'attribution des autres atomes de carbones est réalisée par le spectre HSQC (**Spectre IV.4.4.3**) qui montre en effet :

- Une tache de corrélation entre le H-1 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 94,1$ ppm attribuable à C-1.
- Une tache de corrélation entre le H-3 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 139,6$ ppm attribuable à C-3.
- Une tache de corrélation entre le H-4 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 106,1$ ppm attribuable à C-4.
- Une tache de corrélation entre le H-5 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 28,8$ ppm attribuable à C-5.
- Une tache de corrélation entre le H-9 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 44,00$ ppm attribuable à C-9.



Spectre IV.4.4.3 : Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1

Le carbone quaternaire C-8 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 152,3$ ppm à cause de sa corrélation avec les protons H-6a, H-6b, H-10 α , H-10 β , H-5 et H-1 sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.4.4**).



Spectre IV.4.4.4 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1, étalement

A ce stade de notre analyse, nous proposons la structure partielle représentée dans la **Figure IV.7**

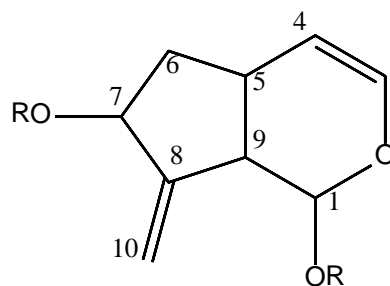
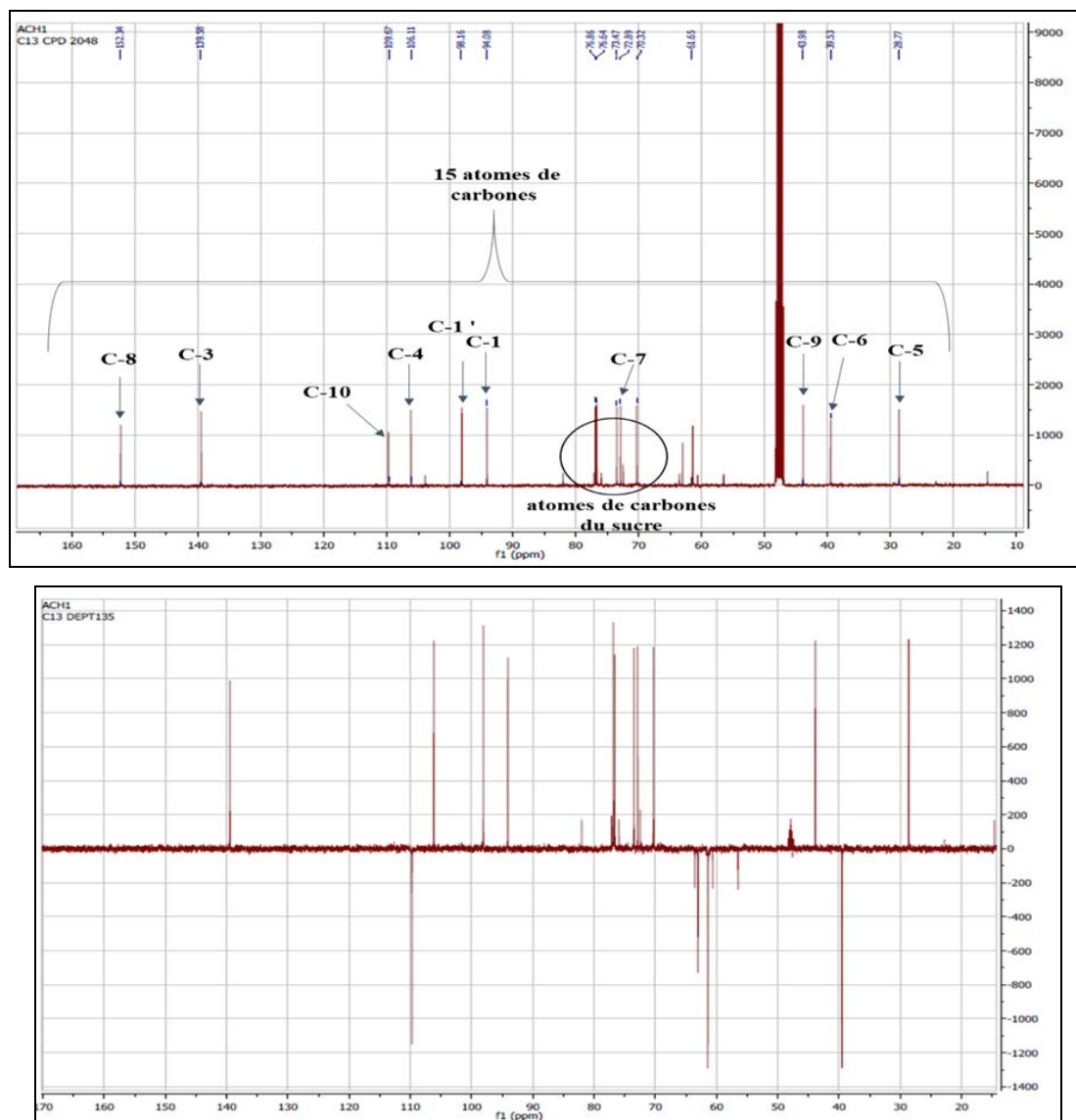


Figure IV.7 : Structure partielle du composé LIN-1

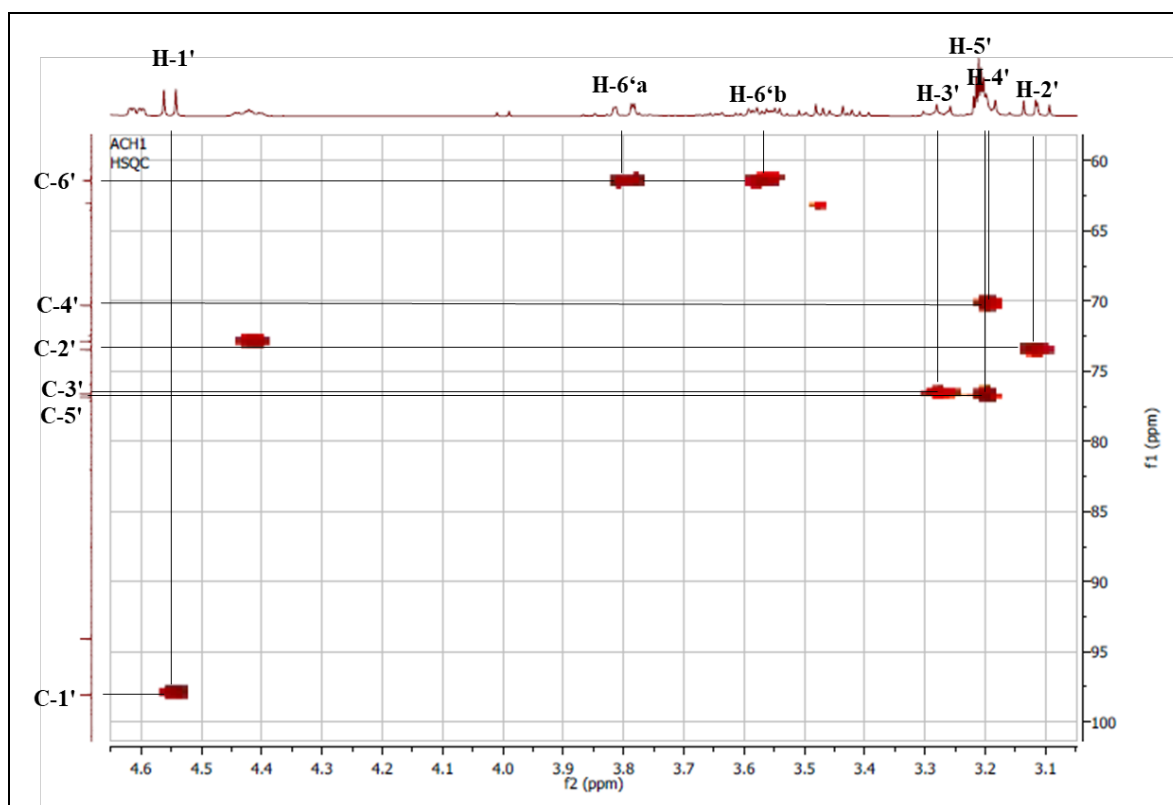
Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.4.5**) montre la présence de 15 atomes de carbones, en faisant abstraction des 9 atomes de carbones attribués précédemment, il reste 6 atomes de carbone correspondant ainsi à l'entité osidique.



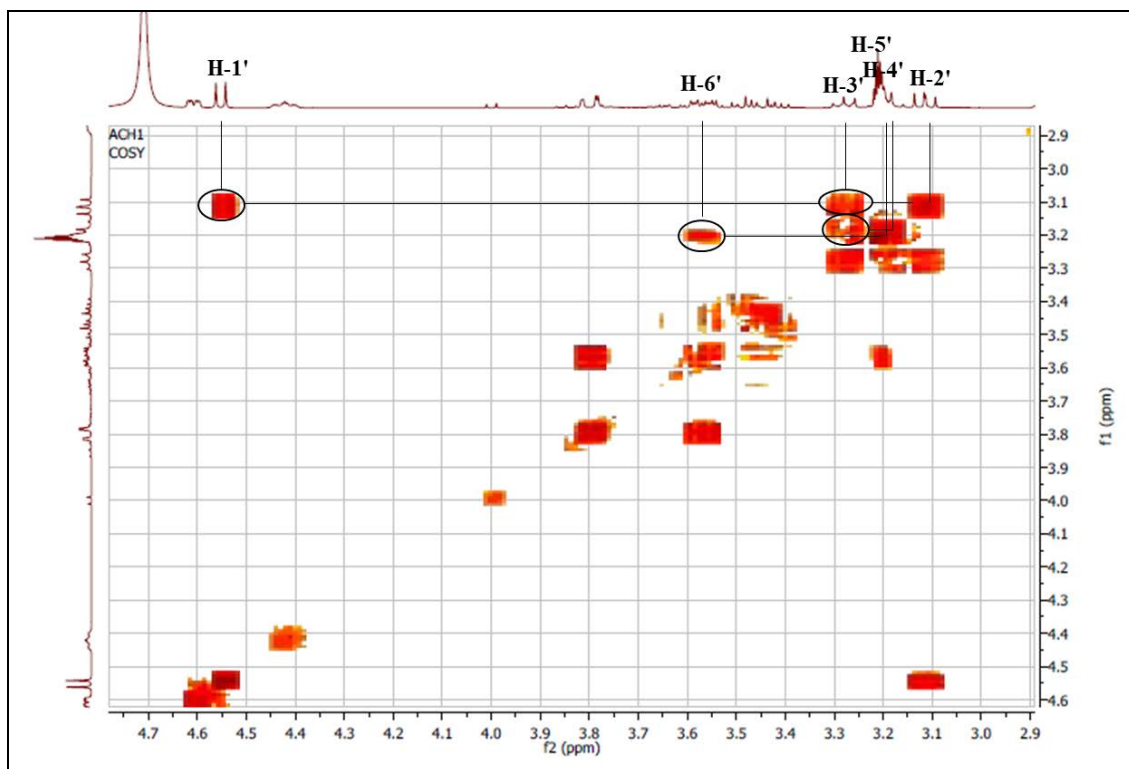
Spectre IV.4.4.5 : Spectre RMN ^{13}C et DEPT 135 (400 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé LIN-1

La présence de cette entité glycosidique est confirmée par une analyse simultanée des spectres RMN ^1H et HSQC. En effet, et en plus des signaux de la génine, le spectre RMN ^1H montre la présence d'un ensemble de signaux dans la zone des protons d'un groupement glycosylé, dont le signal du proton anomérique est à $\delta_{\text{H}} = 4,55$ ppm (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz). Selon le spectre HSQC (**Spectre IV.4.4.6**), le carbone anomérique est localisé à $\delta_{\text{C}} = 98,2$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques du proton et son carbone ainsi que la valeur de la constante de couplage orientent vers une jonction *O*- β -glycosidique, si le carbone anomérique est attribué à la position C-1', les autres atomes de carbone de cette entité sont attribués grâce à une étude simultanée des spectres COSY (**Spectre IV.4.4.7**) et HSQC (**Spectre IV.4.4.6**) et prennent les positions C-2', C-3', C-4', C-5' et C-6' localisés à $\delta_{\text{C}} = 73,5$; 76,9 ; 70,3 ; 76,6 et 61,7 ppm, respectivement. La comparaison de ces données avec la littérature indique que le sucre attaché à la génine est le glucose [3].

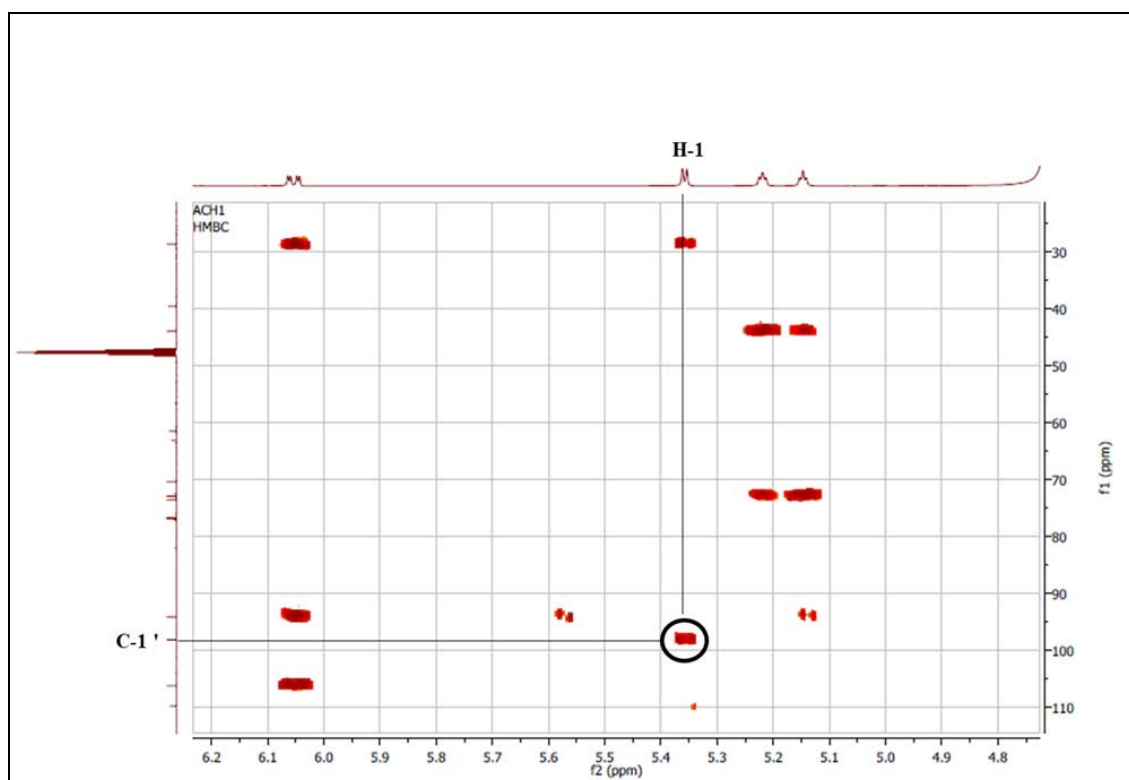
Le spectre HMBC (**Spectre IV.4.4.8**) montre une tache de corrélation entre le carbone anomérique et le H-1 indiquant ainsi le point de glucosylation en C-1.



Spectre IV.4.4.6 : Spectre HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé LIN-1, étalement



Spectre IV.4.4.7 : Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1, étalement



Spectre IV.4.4.8 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1, étalement

L'ensemble de cette analyse mène à la structure plane représenté dans la **Figure IV.8**

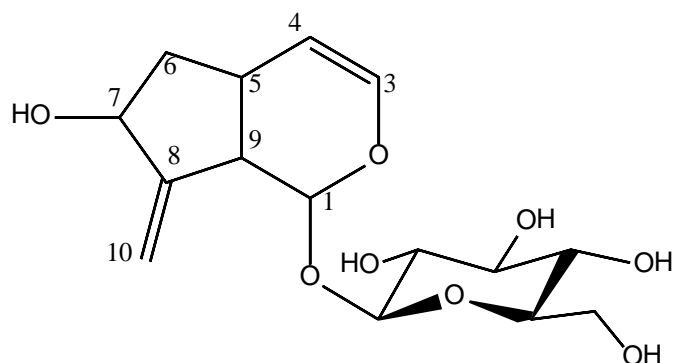
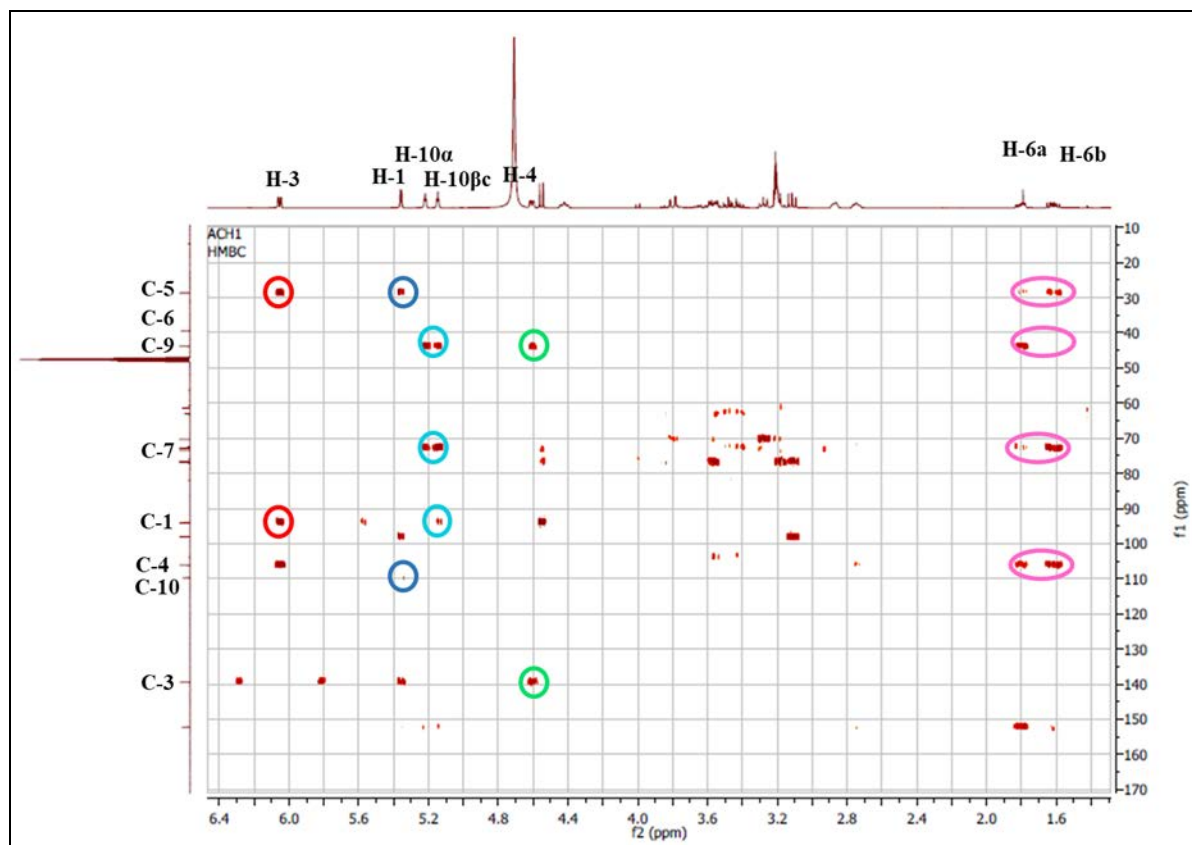


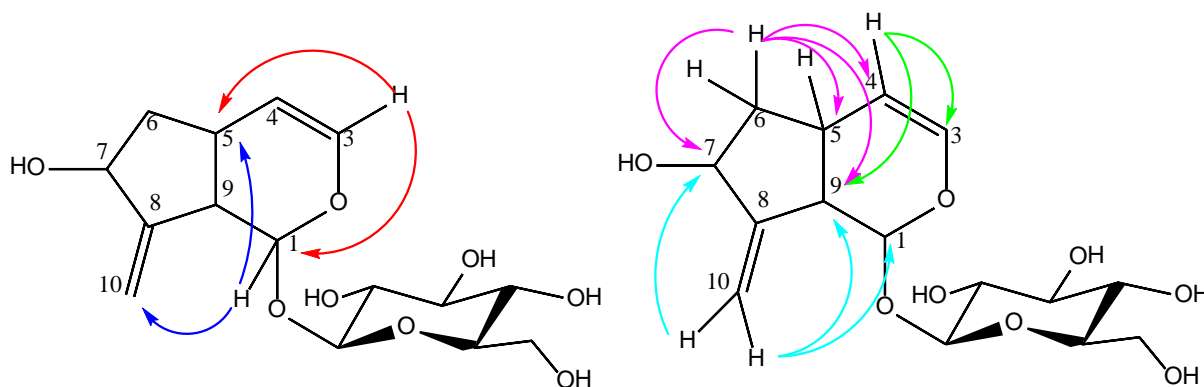
Figure IV.8 : Structure plane du composé LIN-1

Une confirmation de la structure proposée a été réalisée par une analyse des corrélations sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.4.9**), à titre d'exemple :

- Le proton H-3 montre des tâches de corrélations, avec le C-5 à $\delta_C = 28,8$ ppm et le C-1 à $\delta_C = 94,1$ ppm.
- Le proton H-1 montre des tâches de corrélations, avec le C-5 à $\delta_C = 28,8$ ppm et le C-10 à $\delta_C = 109,7$ ppm.
- Les deux protons H-10 α et H-10 β montrent des tâches de corrélations avec les carbones à $\delta_C = 44,0$; 72,9 et 94,1 ppm, attribuables à C-9, C-7 et C-1 respectivement, Confirmant ainsi leurs attributions.
- Le H-4 montre des tâches de corrélation avec le C-9 à $\delta_C = 44,0$ ppm et le C-3 à $\delta_C = 139,6$ ppm.
- Le H-6a et le H-6b montrent quatre tâches de corrélations autre que celle avec le C-8, avec les carbones C-5, C-9, C-7 et C-4, confirmant ainsi leurs attributions.



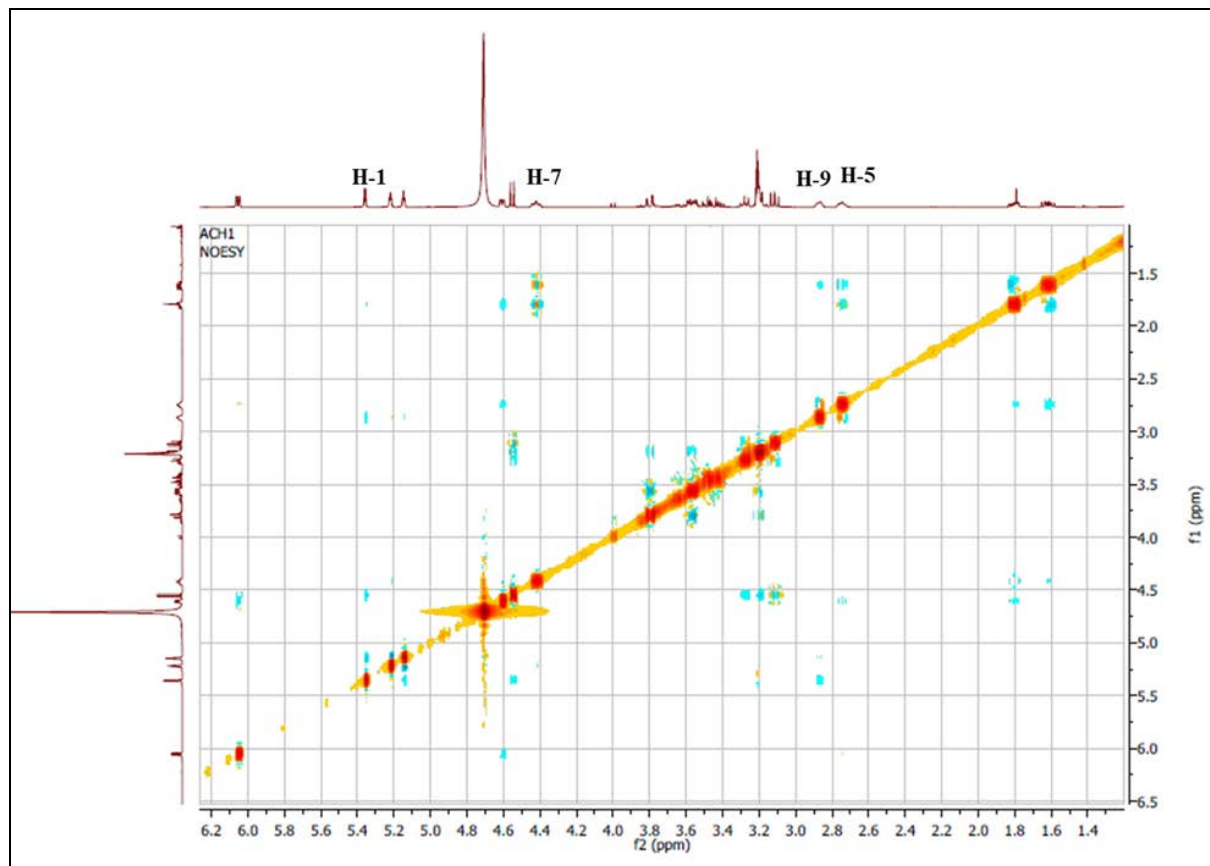
Spectre IV.4.4.9 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-1



En ce qui concerne la stéréochimie du composé, le déplacement chimique du carbone C-1 inférieure à 100 ppm et le déplacement chimique du proton H-9 supérieur à 2 ppm ainsi que la constante de couplage allylique H-3/H-5 qui ne dépasse pas le 2 Hz sont en faveur d'une jonction *cis*-2-oxabicyclo [4.3.0] nonane [7-8].

En plus, l'examen du spectre NOESY (**Spectre IV.4.4.10**) ne montre aucune tache de corrélation entre H-1 et H-5. Cependant, et partant d'une orientation α pour H-1, donc les orientations de H-5 et H-9 sont déduites β . Sur le même spectre, le H-7 ne montre aucune

corrélation avec les protons H-9 et H-5, ce qui implique une orientation β du groupement hydroxyle en position 7.



Spectre IV.4.4.10 : Spectre NOESY (400 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé LIN-1

Une dernière confirmation est réalisée en comparant les données des spectres RMN avec celles reportées dans la littérature, qui montre une grande similarité entre le composé et l'antirrhide [12-13].

La structure finale du composé LIN-1 est représentée dans **Figure IV.9**

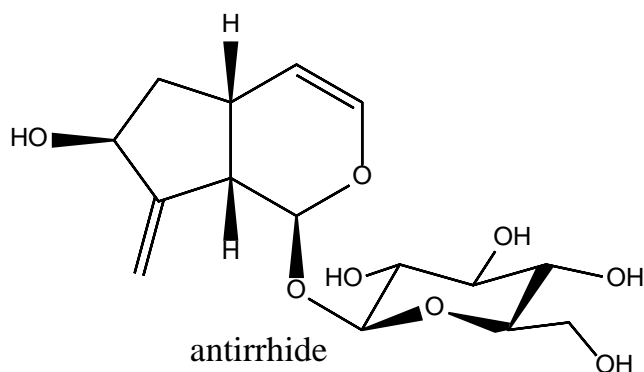


Figure IV.9 : structure du composé LIN-1

Les données spectroscopiques RMN ^1H et RMN ^{13}C sont rassemblées dans le **Tableau IV.6**

Tableau IV.6 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LIN-1

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
1	94,1	5,36 <i>d</i>	3,2	9	44,0	2,86 <i>m</i>	-
2	-	-	-	10	109,7	5,22 <i>m</i> 5,15 <i>m</i>	- -
3	139,6	6,05 <i>dd</i>	6,4 ; 2,0	1'	98,2	4,55 <i>d</i>	8,0
4	106,1	4,61 <i>ddd</i>	6,4 ; 2,6 ; 0,8	2'	73,5	3,11 <i>dd</i>	9,0 ; 7,6
5	28,8	2,75 <i>m</i>	-	3'	76,6	3,28 <i>t</i>	9,0
6	39,5	1,81 <i>m</i> 1,62 <i>m</i>	- -	4'	70,3	3,18-3,22 <i>m</i>	-
7	72,9	4,42 <i>m</i>	-	5'	76,9	3,18-3,22 <i>m</i>	-
8	152,3	-	-	6'	61,7	3,80 <i>m</i> 3,57 <i>m</i>	- -

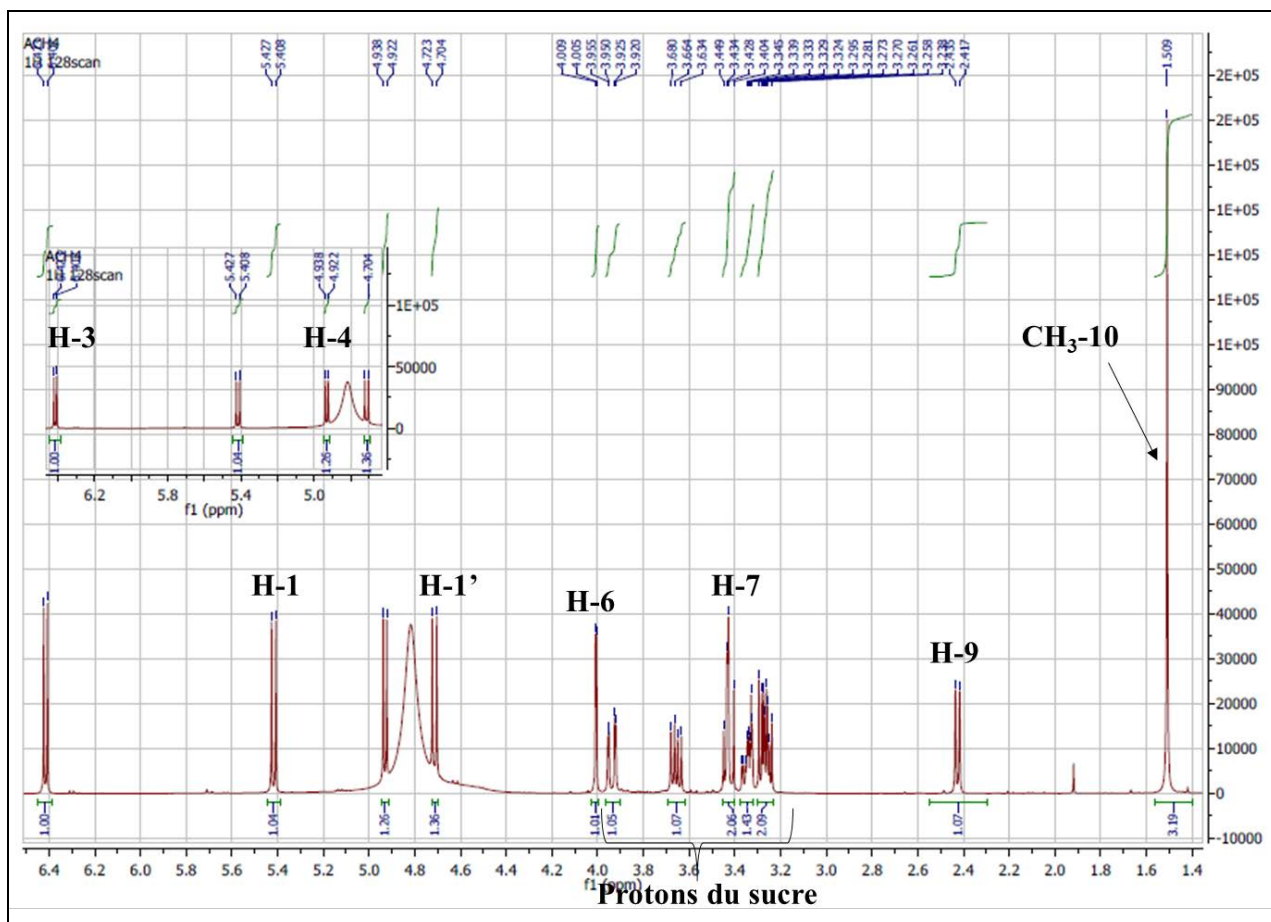
IV.4.5. Elucidation structurale du composé 5 (LIN-4)

Ce composé a été isolé sous forme d'une cire de couleur marron, invisible sous la lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). L'examen simultané des spectres RMN ^1H (**Spectre IV.4.5.1**), COSY (**Spectre IV.4.5.2**) enregistrés dans CD_3OD indique la présence des signaux rappelant un squelette de type iridoïde, caractérisé par :

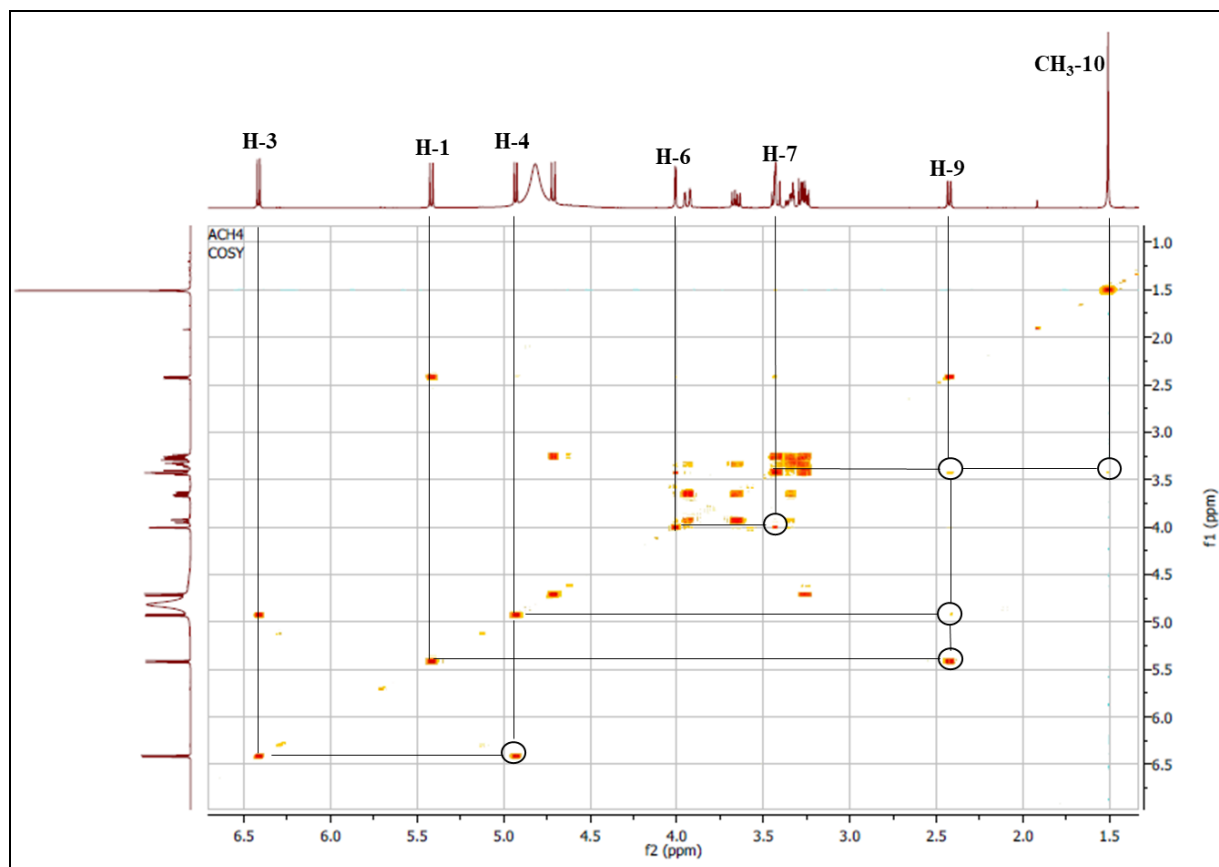
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,42$ ppm ($J = 6,4$ Hz) et un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 4,93$ ppm ($J = 6,4$ Hz) caractéristiques des deux protons d'un iridoïde comportant une double liaison entre les positions 3 et 4 conjuguée à une fonction éther, attribuables à H-3 et H-4, respectivement. Ce couplage est confirmé par le spectre COSY qui montre une tache de corrélation entre ces deux protons.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,02$ ppm ($J = 1,6$ Hz) caractéristique du proton H-6. Sur le spectre COSY, le H-6 montre une tache de corrélation avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm dont le signal est partiellement recouvert par d'autres signaux, ce qui permet son attribution à H-7.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 5,42$ ppm ($J = 7,6$ Hz) caractéristique du proton H-1.
- Un doublet large d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 2,43$ ppm ($J = 7,6$ Hz) attribuable au proton H-9 à cause de sa corrélation avec le H-1 sur le spectre COSY. Sur le même spectre le H-9 corrèle avec le H-7 (constante de couplage très petite), indiquant un couplage

W entre les deux noyaux du système bicyclique et expliquant ainsi la multiplicité du signal de H-9. Ce type de couplage est également observé entre le H-9 et le H-4 et entre le H-7 et le méthyl localisé à $\delta_H = 1,51$ ppm.

- Un singlet large d'intégration 3H, à $\delta_H = 1,51$ ppm, attribuables aux protons du groupement méthyl de la position 10, CH₃-10.



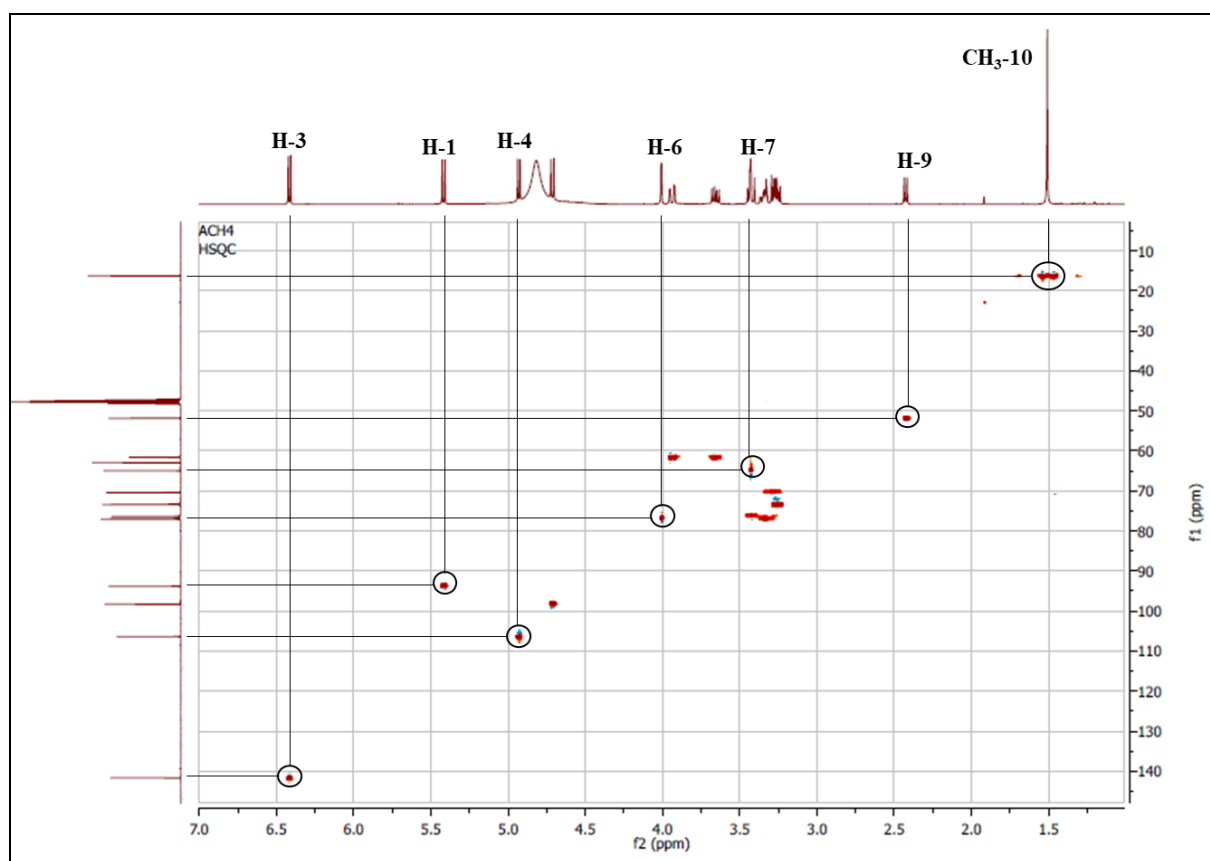
Spectre IV.4.5.1 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4



Spectre IV.4.5.2 : Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (**Spectre IV.4.5.3**) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbones correspondants, ainsi :

- Le H-3 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 141,7$ ppm au carbone C-3.
- Le H-1 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 93,8$ ppm au carbone C-1.
- Le H-4 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 106,4$ ppm au carbone C-4.
- Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ppm au carbone C-6.
- Le H-7 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 65,0$ ppm au carbone C-7.
- Le H-9 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 51,8$ ppm au carbone C-9.
- Les protons du groupement méthyl CH₃-10 permettent l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 16,3$ ppm au carbone C-10.



Spectre IV.4.5.3 : Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4

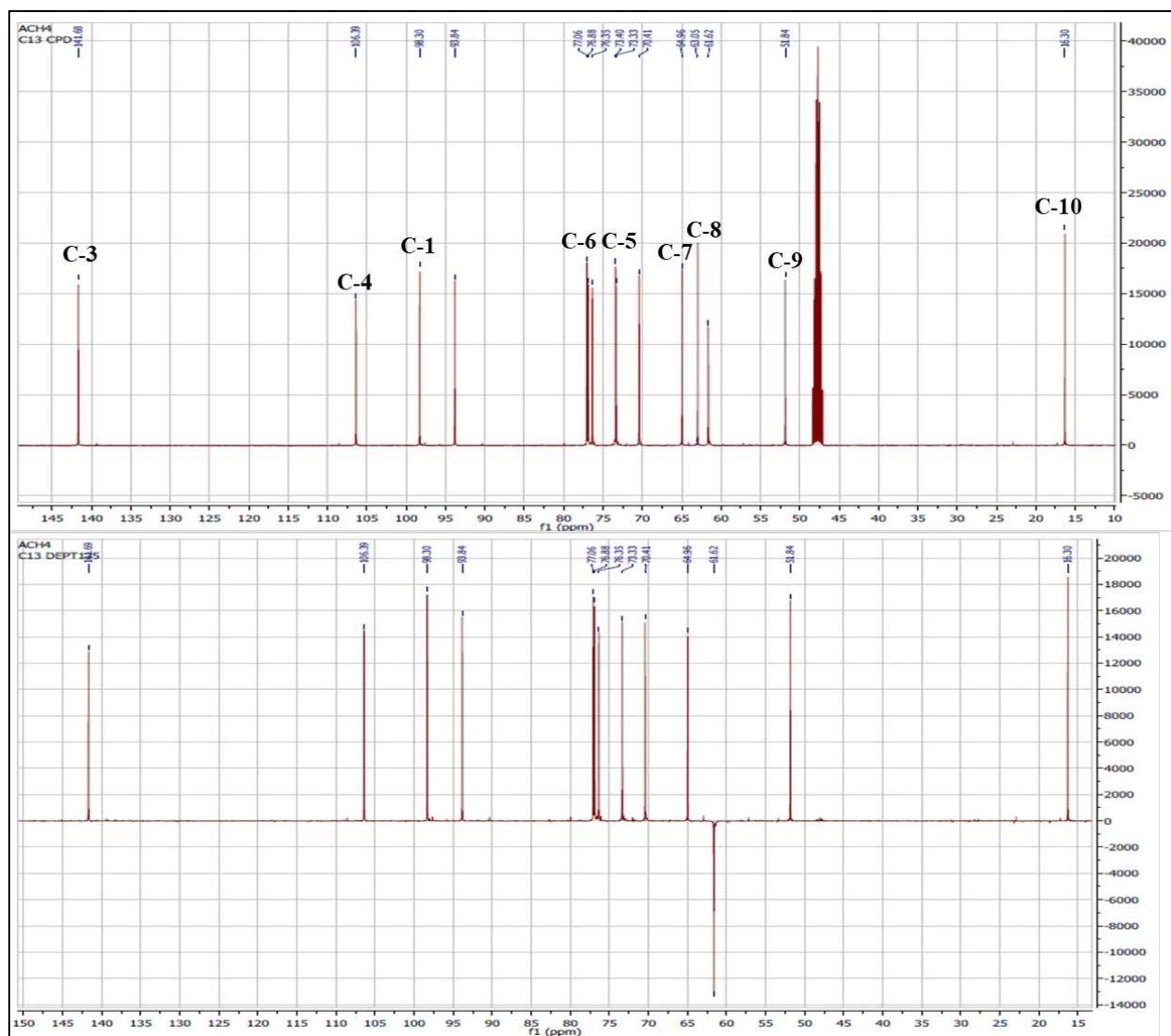
Une étude simultanée des deux spectres RMN¹³C et DEPT 135° (**Spectre IV.4.5.4**) indique la présence de deux carbones quaternaires oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 73,4$ et $63,1$ ppm :

Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.5.5**), le proton H-3 corrèle avec le premier carbone quaternaire oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 73,4$ ppm ce qui permet son attribution au carbone C-5, cette attribution est confirmée par les corrélations observées entre ce carbone et les protons H-1 et H-9. Ce spectre HMBC permet également l'attribution du deuxième carbone quaternaire localisé à $\delta_{\text{C}} = 63,1$ ppm à C-8 grâce à ces corrélations avec les protons H-1 et H-9 ainsi qu'avec les protons du groupement méthyl ce qui permet la localisation de ce dernier sur cette position.

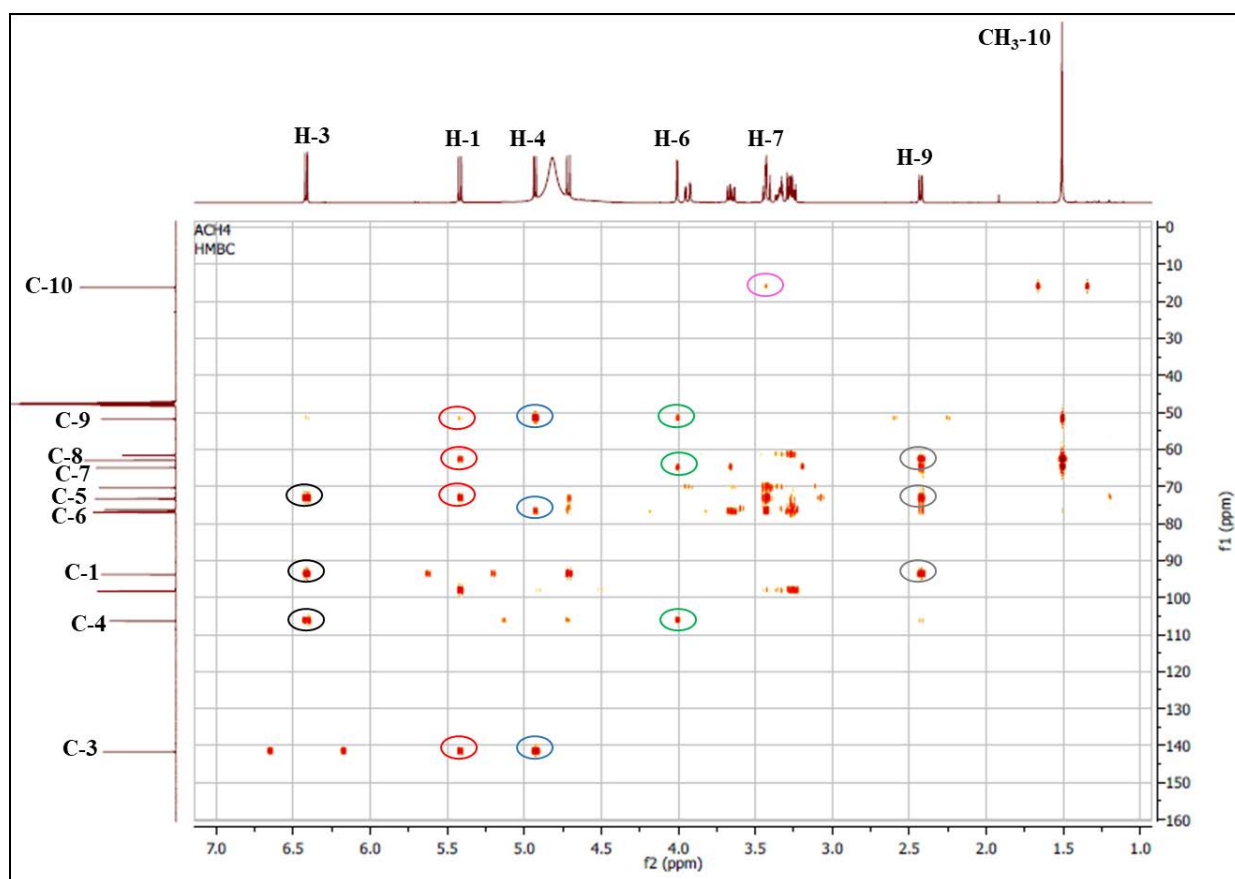
Le même spectre a permis de tirer les indications suivantes confirmant ainsi les attributions réalisées :

- Le H-3 montre deux taches de corrélations autre que celle avec le C-5, avec les deux carbones à $\delta_{\text{C}} = 106,4$ et $93,8$ ppm, ce qui confirme leurs attributions à C-4 et C-1 et respectivement.

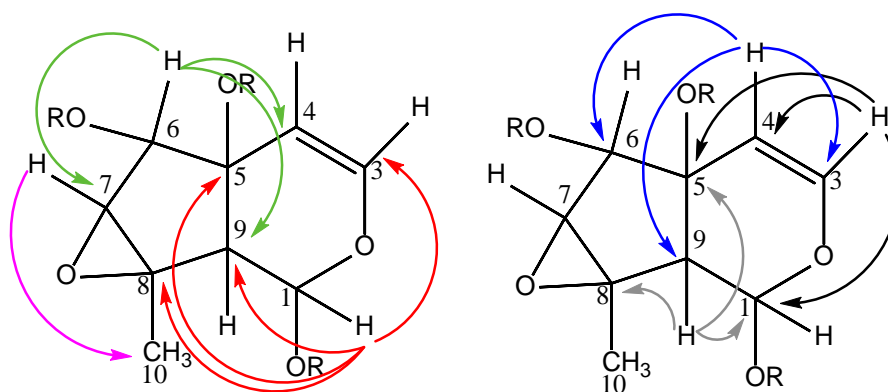
- Le H-1 montre des taches de corrélations autres que celles avec C-3 et C-8, avec le C-9 et le carbone localisé à $\delta_C = 73,4$ ppm confirmant ainsi son attribution à C-5.
- Le H-4 montre des taches de corrélations avec le C-3 et le C-9, et montre également une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 77,0$ ppm confirmant ainsi son attribution à C-6.
- Le H-6 montre des corrélations avec le C-4 et le C-9, et montre également une corrélation avec le carbone oxygéné à $\delta_C = 65,0$ ppm confirmant son attribution à C-7.
- Le H-7 montre une tache de corrélation avec le carbone C-10 du méthyle ce qui confirme son attribution et écarte la possibilité d'attribuer son signal à H-6.
- Le H-9 montre trois taches de corrélations avec les carbones C-8, C-5 et C-1.



Spectre IV.4.5.4 : Spectre RMN ^{13}C et DEPT 135 (100 MHz, CD_3OD , δ_{ppm}) du composé LIN-4

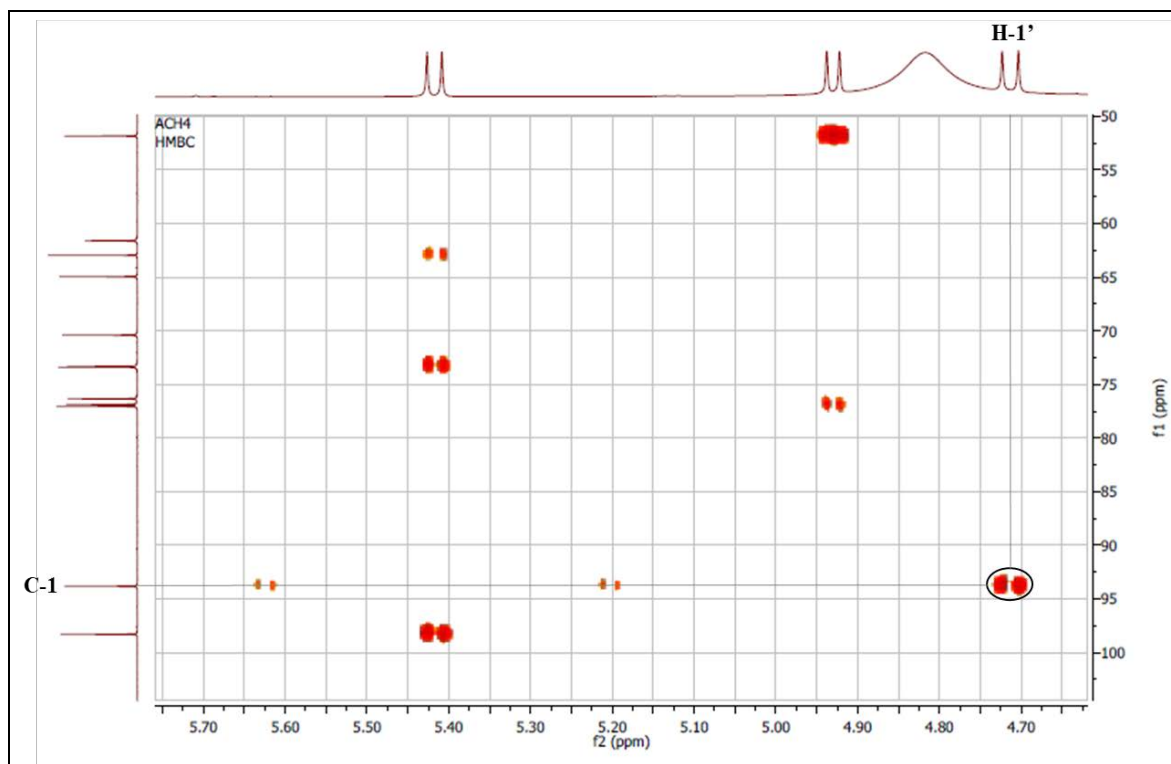


Spectre IV.4.5.5 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4



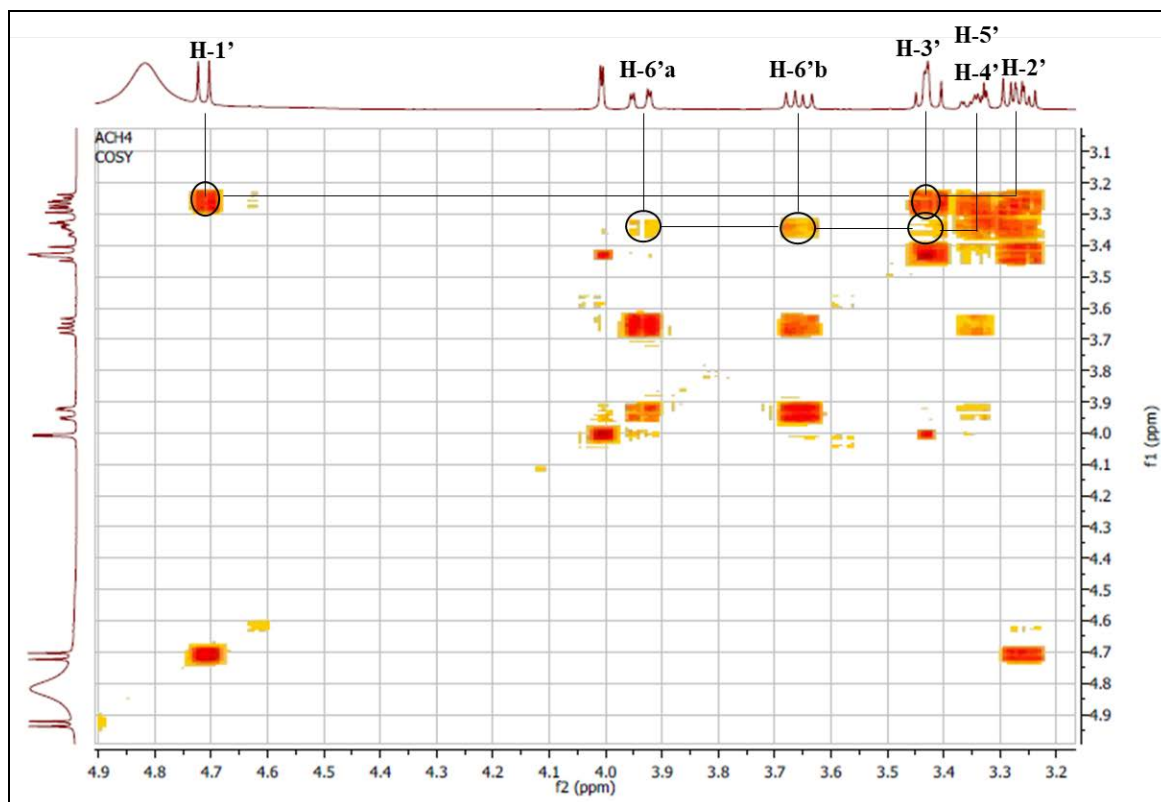
En faisant abstraction des signaux attribués de la génine du nombre totale des atomes de carbones apparus sur le spectre RMN ¹³C (**Spectre IV.4.5.4**) (15 atomes de carbone), les 6 signaux restants ne peuvent appartenir qu'à l'entité osidique. En effet, le spectre RMN ¹H (**Spectre IV.4.5.1**) indique la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,71$ ppm ($J = 7,6$ Hz) caractéristique du proton anomérique H-1' du sucre ($\delta_{\text{C}} = 98,3$ ppm). Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone ainsi que la valeur de la constante de couplage orientent bien vers une jonction *O*- β -glycosidique de cette partie osidique. Ce

proton anomérique montre sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.5.6**), une tache de corrélation avec le C-1 de la génine permettant ainsi la substitution du squelette iridoïde par l'entité osidique en cette position.

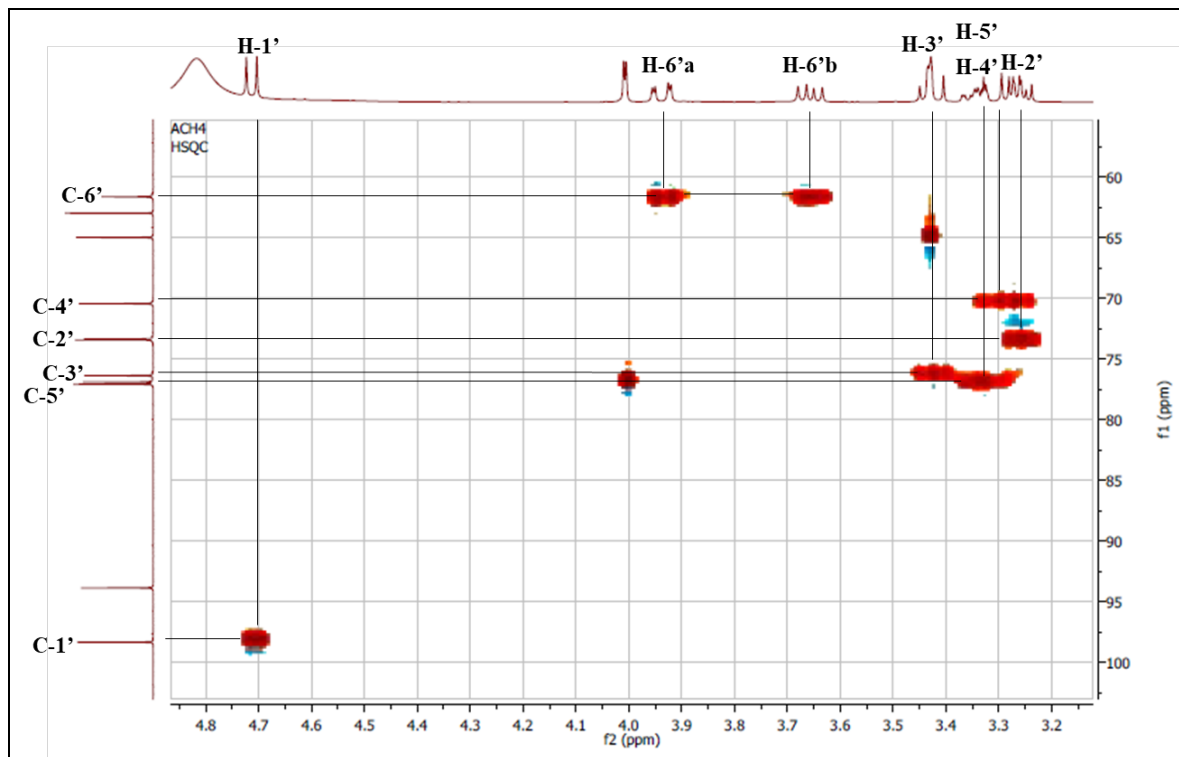


Spectre IV.4.5.6 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4, étalement

Partant du signal du proton anomérique (H-1') et de celui de son carbone (C-1'), la combinaison des résultats des analyses des spectres COSY (**Spectre IV.4.5.7**) et HSQC (**Spectre IV.4.5.8**) permet l'attribution des carbones de l'entité osidique C-2', C-3', C-4', C-5' et C-6' aux signaux à δ_C = 73,3 ; 76,4 ; 70,4 ; 77,1 et 61,6 ppm, respectivement. La comparaison de ces déplacements chimiques avec ceux de la littérature a permis de déduire que le sucre attaché à la génine est le glucose [3].



Spectre IV.4.5.7 : Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4, étalement



Spectre IV.4.5.8 : Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4, étalement

A ce stade de notre analyse, la structure plane du composé LIN-4 est représentée dans la **Figure IV.10**.

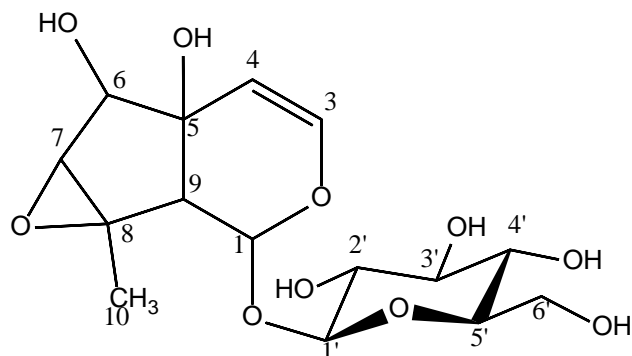
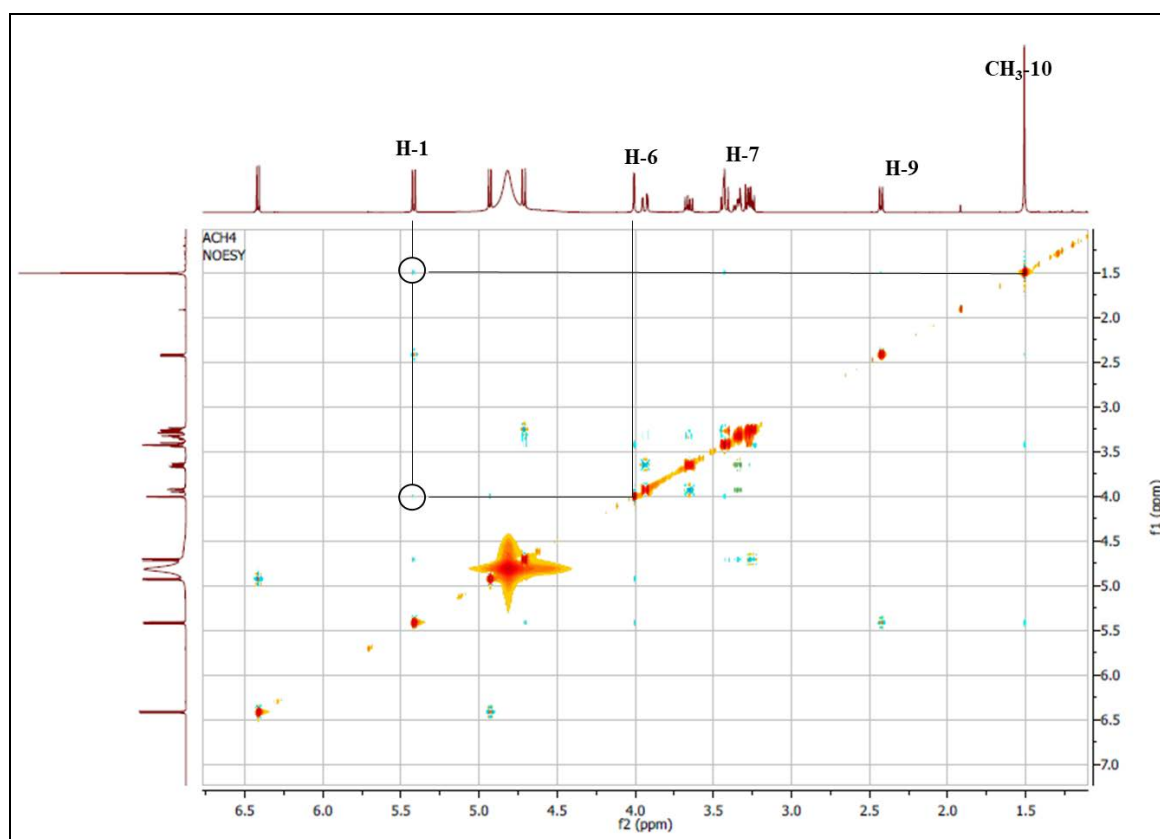


Figure IV.10 : Structure plane du composé LIN-4

Concernant la stéréochimie des centres chiraux du composé LIN-4, le déplacement chimique du C-1 inférieure à 100 ppm et le déplacement chimique du H-9 supérieur à 2 ppm sont en faveur d'une jonction *cis*-2-oxabicyclo [4.3.0] nonane avec une orientation β de l'hydroxyle en position 5 [7-8]. Le H-9 admet donc la même orientation de H-5.

Sur le spectre NOESY (**Spectre IV.4.5.9**), le H-1 montre une tache de corrélation avec le H-7 et le CH₃-10, le H-7 de son côté ne montre aucune corrélation avec le H-9 sur le même spectre, donc, et partant d'une orientation α pour le H-1, le H-7 et le CH₃-10 admettent une orientation α .

Comme a été déjà mentionné, la constante de couplage entre le H-6 et le H-7 est petite ($J = 1,6$ Hz) [9], cette observation est en faveur d'une même orientation pour ces deux protons ce qui mène à une orientation α pour le H-6.



Spectre IV.4.5.9 : Spectre NOESY (400 MHz, CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-4

Les données spectroscopiques RMN ¹H et RMN ¹³C sont rassemblées dans le **Tableau IV.7**

Tableau IV.7 : les données spectroscopique RMN ¹H et RMN ¹³C du composé LIN-4

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
1	93,8	5,42 <i>d</i>	7,6	9	51,8	2,43 <i>dl</i>	7,6
2	-	-	-	10	16,3	1,51 <i>sl</i>	-
3	141,7	6,42 <i>d</i>	6,4	1'	98,5	4,71 <i>d</i>	7,6
4	106,5	4,93 <i>dl</i>	6,4	2'	73,3	3,27 <i>m</i>	-
5	73,4	-	-	3'	76,4	3,43 <i>m</i>	-
6	77,0	4,01 <i>d</i>	1,6	4'	70,4	3,32-3,37 <i>m</i>	-
7	65,0	3,43 <i>m</i>	-	5'	77,1	3,32-3,37 <i>m</i>	-
8	63,1	-	-	6'	61,6	3,94 <i>dd</i> 3,66 <i>dd</i>	12,0 ; 2,0 12,0 ; 6,4

L'ensemble de nos données sont en parfait accord avec ceux de l'antirrhinose (Figure IV.11) qui est un iridoïde bien distribué dans les espèces du genre *Linaria* [12-13].

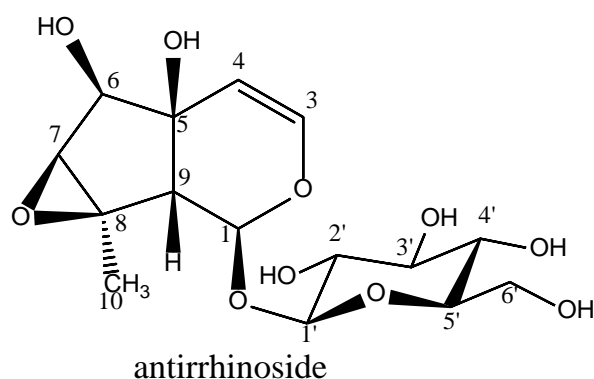
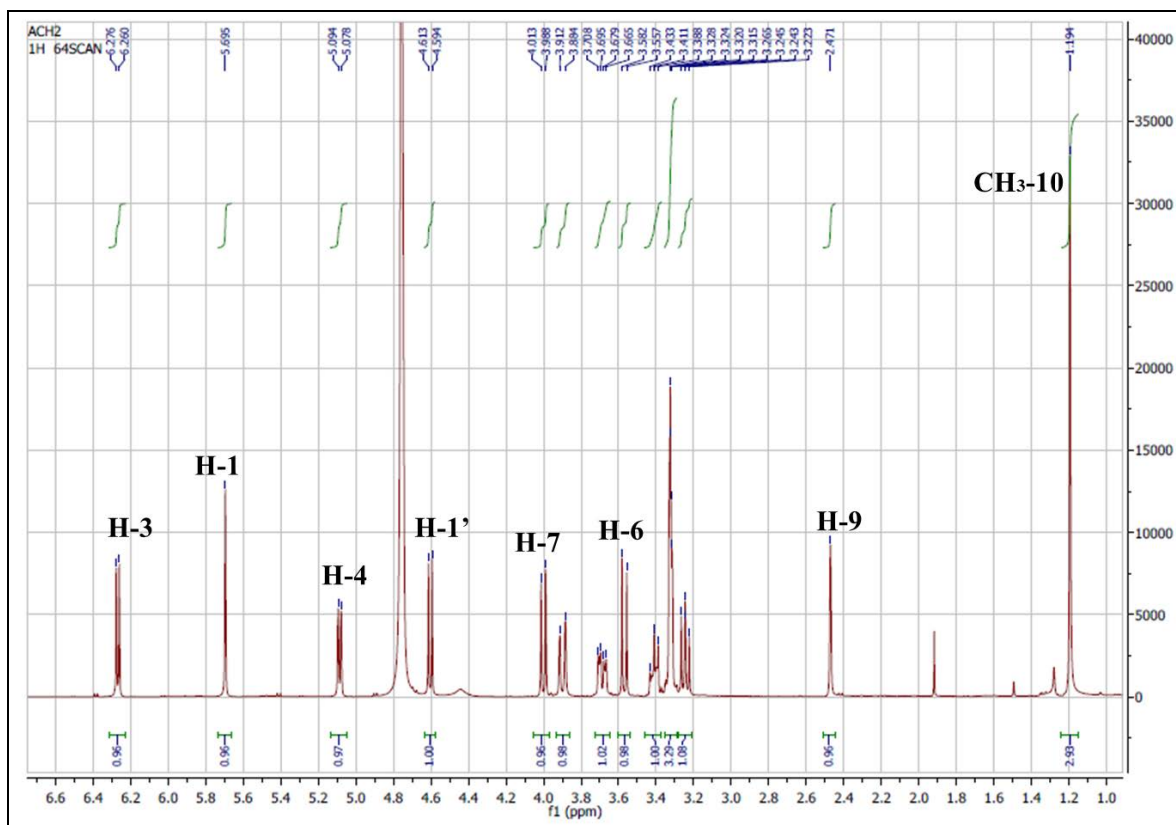


Figure IV.11 : Structure du composé LIN-4

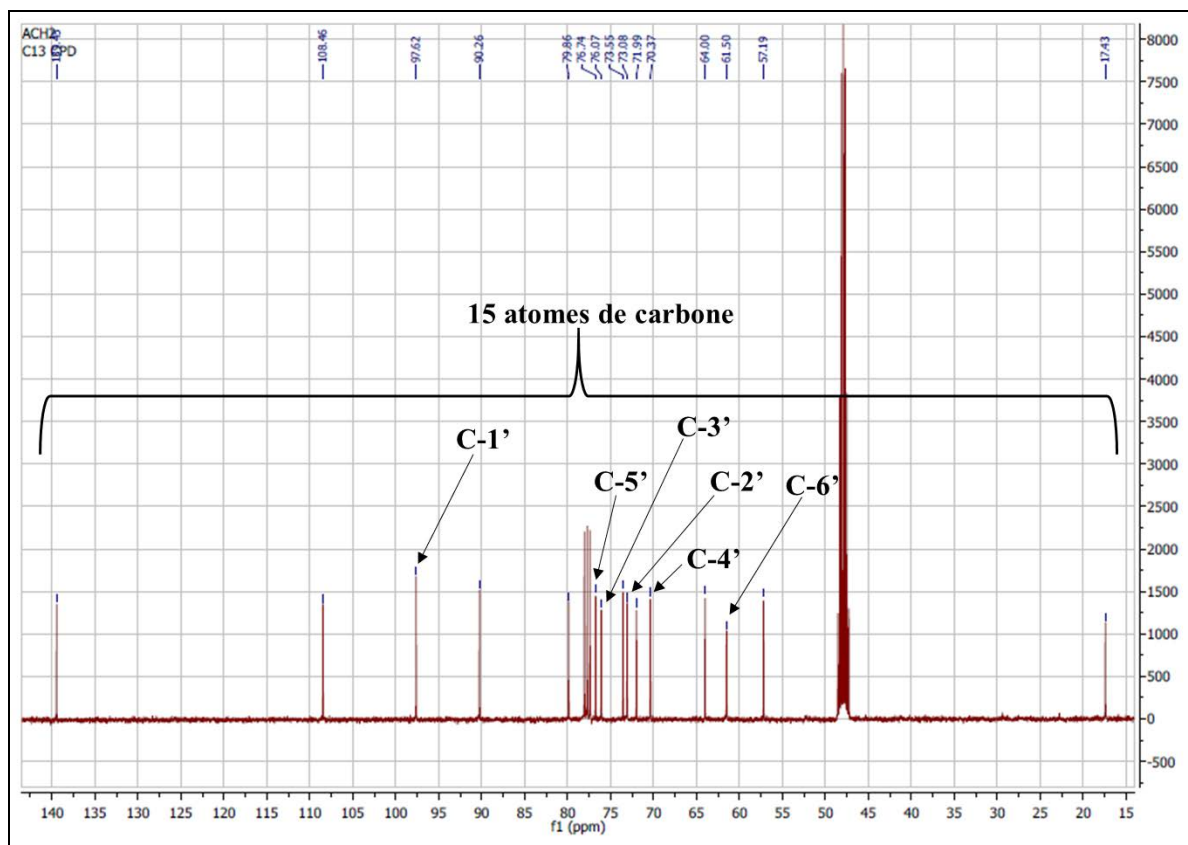
IV.4.6. Elucidation structurale du composé 6 (LIN-2)

Le composé LIN-2 a été obtenu sous forme d'une cire incolore, invisible sous la lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm).

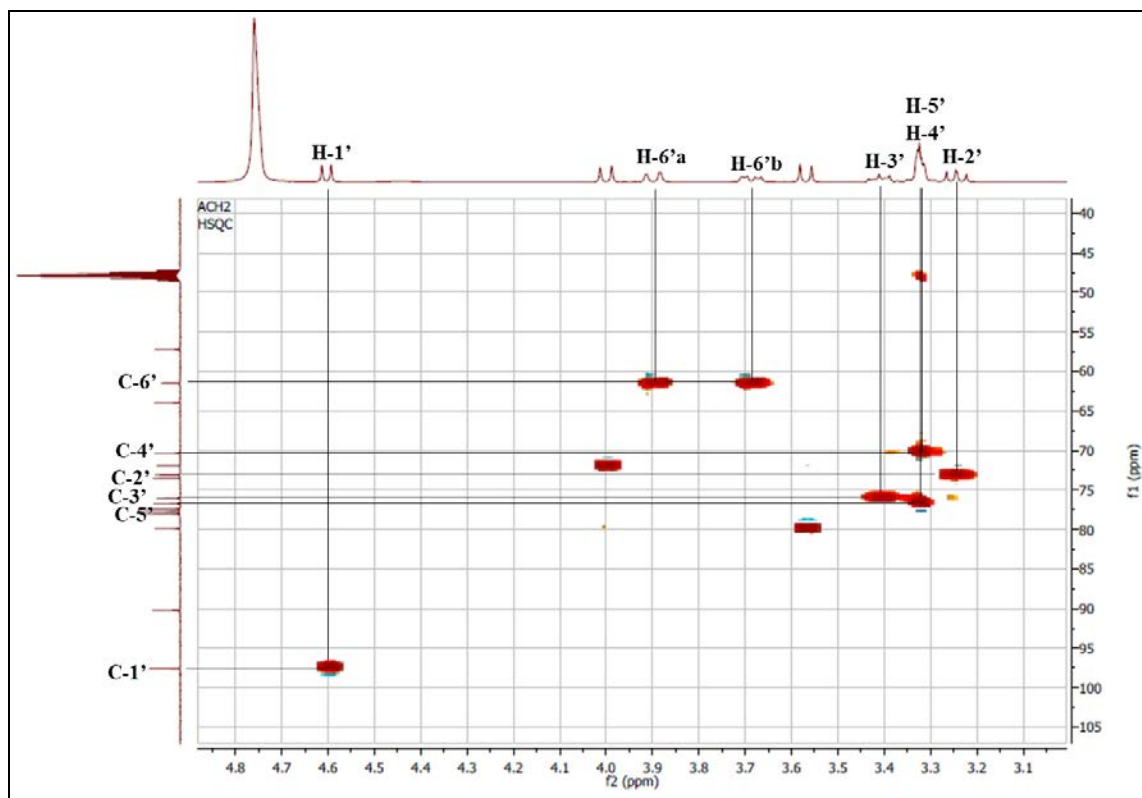
Les spectres RMN ^1H (**Spectre IV.4.6.1**) et RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.6.2**) enregistrés dans le CD_3OD (avec quelques gouttes de CDCl_3) présentent de fortes similitudes avec ceux du composé LIN-4. On observe en effet, la présence des 15 atomes de carbones, dont ceux de l'entité glucopyranosyle. La présence de cette entité osidique est confirmée par le spectre RMN ^1H qui indique la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,60$ ppm ($J = 7,6$ Hz) caractéristique du proton anomérique H-1' du sucre. Le carbone anomérique est localisé grâce au spectre HSQC (**Spectre IV.4.6.3**) à $\delta_{\text{C}} = 97,6$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques du proton et du carbone anomérique et la valeur de la constante de couplage du H-1' permettent de déduire la jonction *O*- β -glucosidique de cette partie osidique. La confirmation de ce groupement glucopyranosyle est réalisée par la comparaison des déplacements chimiques des carbones C-2', C-3', C-4', C-5' et C-6', localisé grâce à une étude simultanée des spectre COSY (**Spectre IV.4.6.4**) et HSQC (**Spectre IV.4.6.3**) à $\delta_{\text{C}} = 73,1$; $76,1$; $70,4$; $76,7$ et $61,5$ ppm respectivement, avec ceux de la littérature [3].



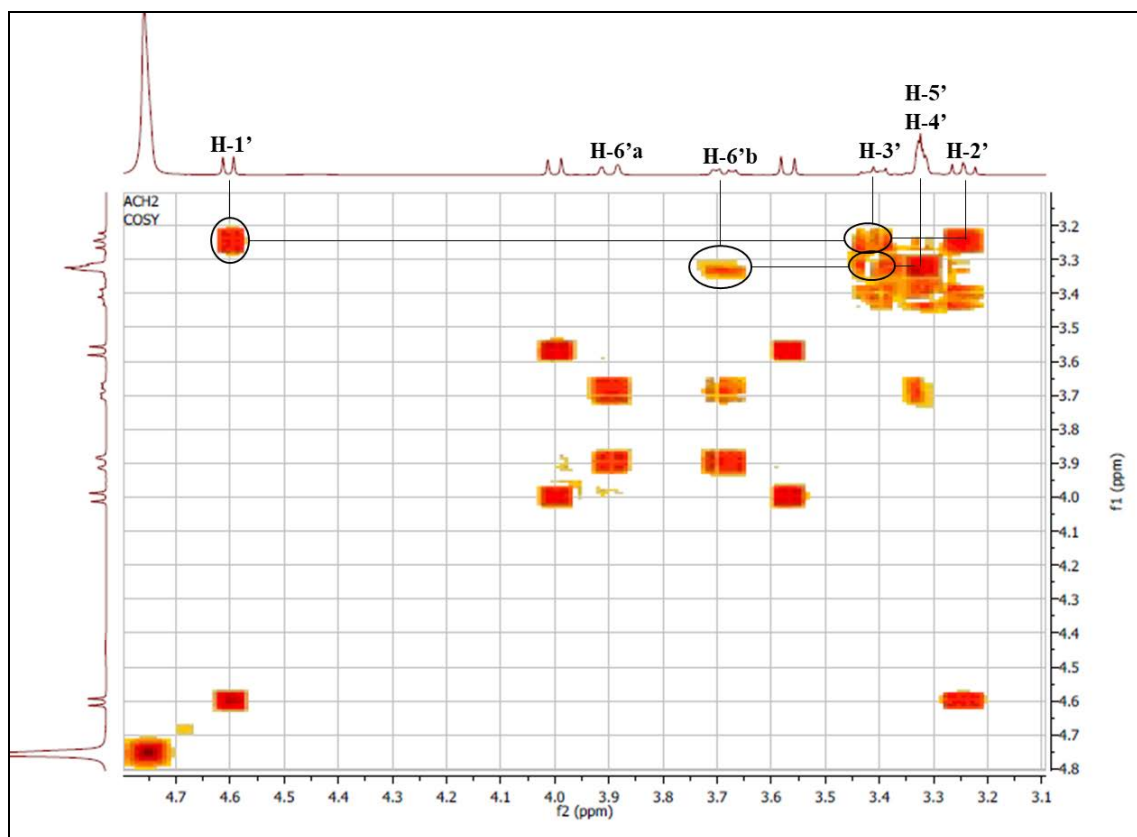
Spectre IV.4.6.1 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃+ CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-2



Spectre IV.4.6.2 : Spectre RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃+ CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-2



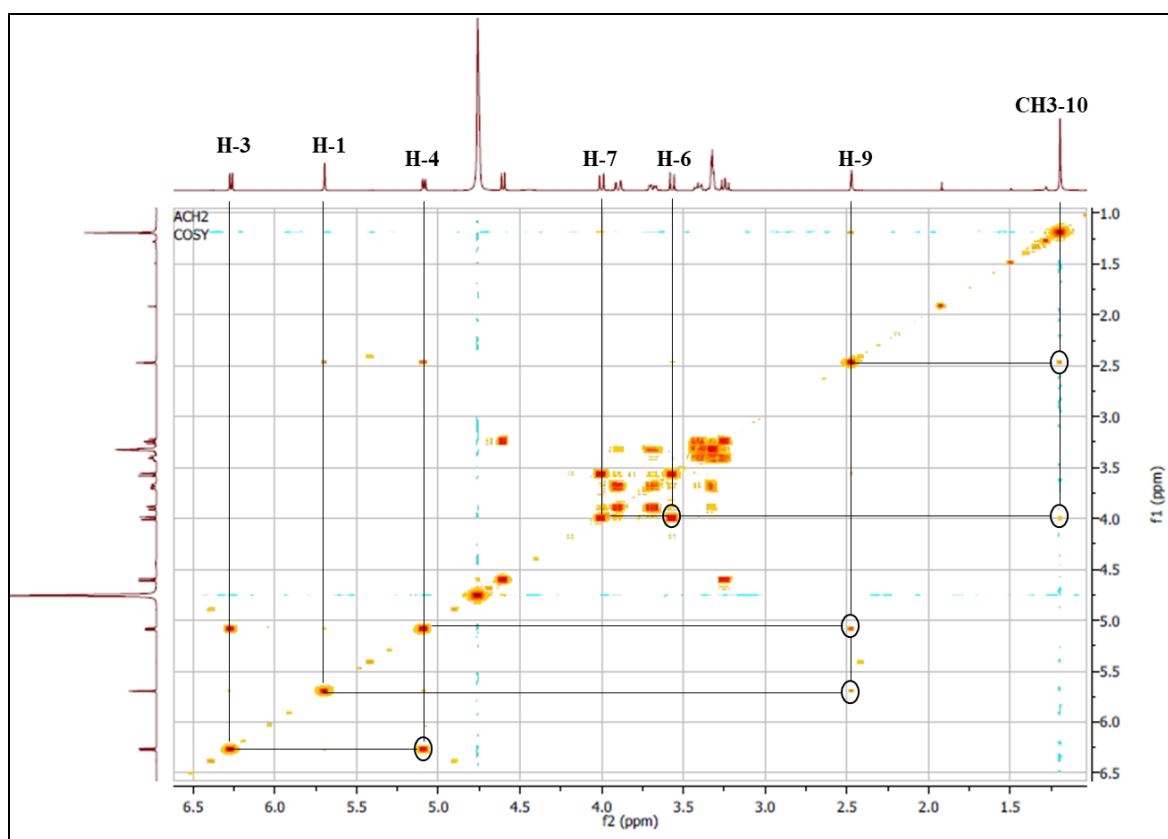
Spectre IV.4.6.3 : Spectre HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ_{ppm}) du composé LIN-2, étalement



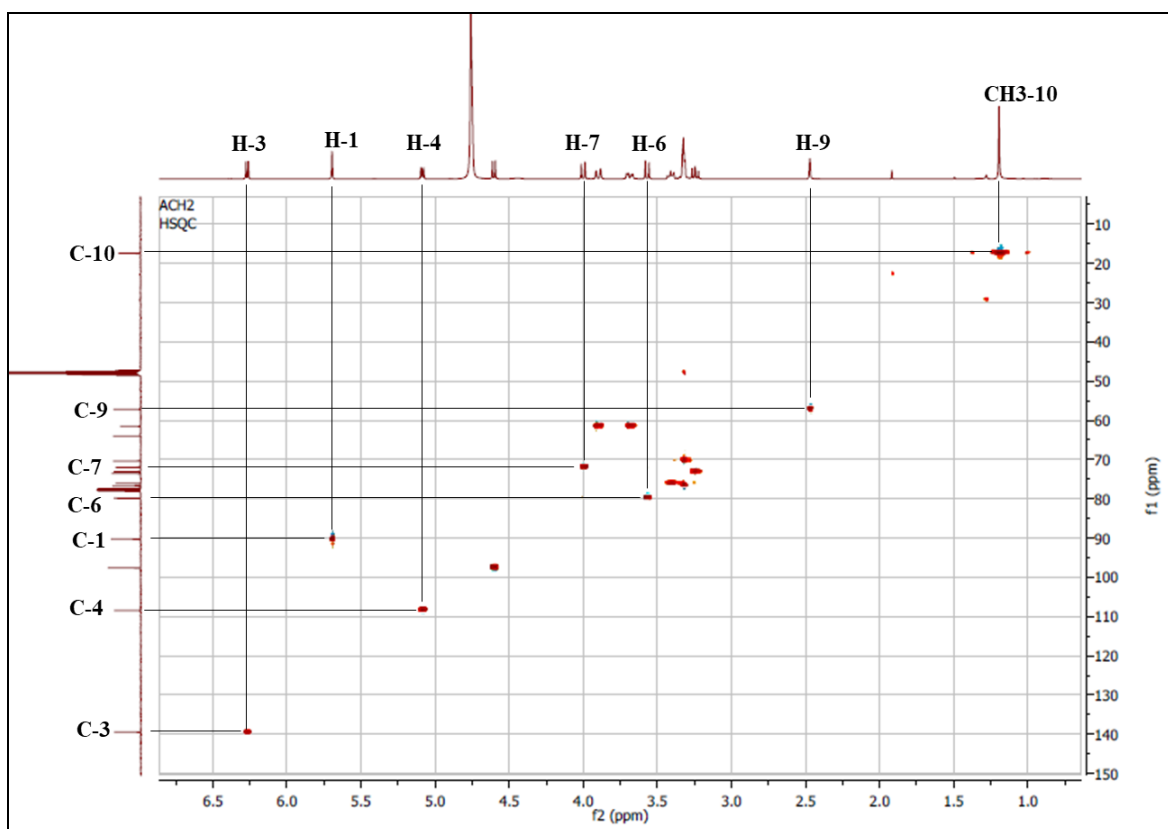
Spectre IV.4.6.4 : Spectre COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ_{ppm}) du composé LIN-2, étalement

La combinaison des résultats des analyses des spectres RMN ^1H (**Spectre IV.4.6.1**), RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.6.2**), COSY (**Spectre IV.4.6.5**) et HSQC (**Spectre IV.4.6.6**) permet l'attribution des atomes de carbones du squelette iridoïde, on observe en effet :

- Un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,27$ ppm ($J = 6,4$ Hz) caractéristique du proton oléfinique oxygéné H-3 ($\delta_{\text{C}} = 139,5$ ppm).
- Un signal sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 5,09$ ppm ($J = 6,4$ Hz) attribuable au proton H-4 ($\delta_{\text{C}} = 108,5$ ppm), cette attribution est confirmée par le spectre COSY qui montre une corrélation entre ce proton et le H-3.
- Un signal sous forme d'un singulet large à $\delta_{\text{H}} = 5,70$ ppm caractéristique du proton H-1 ($\delta_{\text{C}} = 90,3$ ppm).
- Un signal sous forme d'un singulet large à $\delta_{\text{H}} = 2,47$ ppm, attribuable au proton H-9 ($\delta_{\text{C}} = 57,2$ ppm) grâce à sa corrélation avec le proton H-1 sur le spectre COSY, sur le même spectre le H-9 montre d'autres taches de corrélations avec les protons H-4 et les protons du méthyl localisé à $\delta_{\text{H}} = 1,19$ ppm, dû à un couplage W entre les deux noyaux du système bicyclique.
- Un singulet large d'intégration 3H, à $\delta_{\text{H}} = 1,19$ ppm, attribuables aux protons du groupement méthyl CH₃-10 ($\delta_{\text{C}} = 17,4$ ppm).
- Un signal sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 4,00$ ppm ($J = 10,0$ Hz) attribuable au proton H-7 ($\delta_{\text{C}} = 72,0$ ppm), sur le spectre COSY ce proton montre deux taches de corrélations, la première avec le proton localisé à $\delta_{\text{H}} = 3,57$ ppm ($J = 10,0$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 79,9$ ppm) attribuable au proton H-6, et une seconde tache de corrélation avec les protons du méthyl CH₃-10 interprétée par le couplage W entre les deux noyaux du système bicyclique.



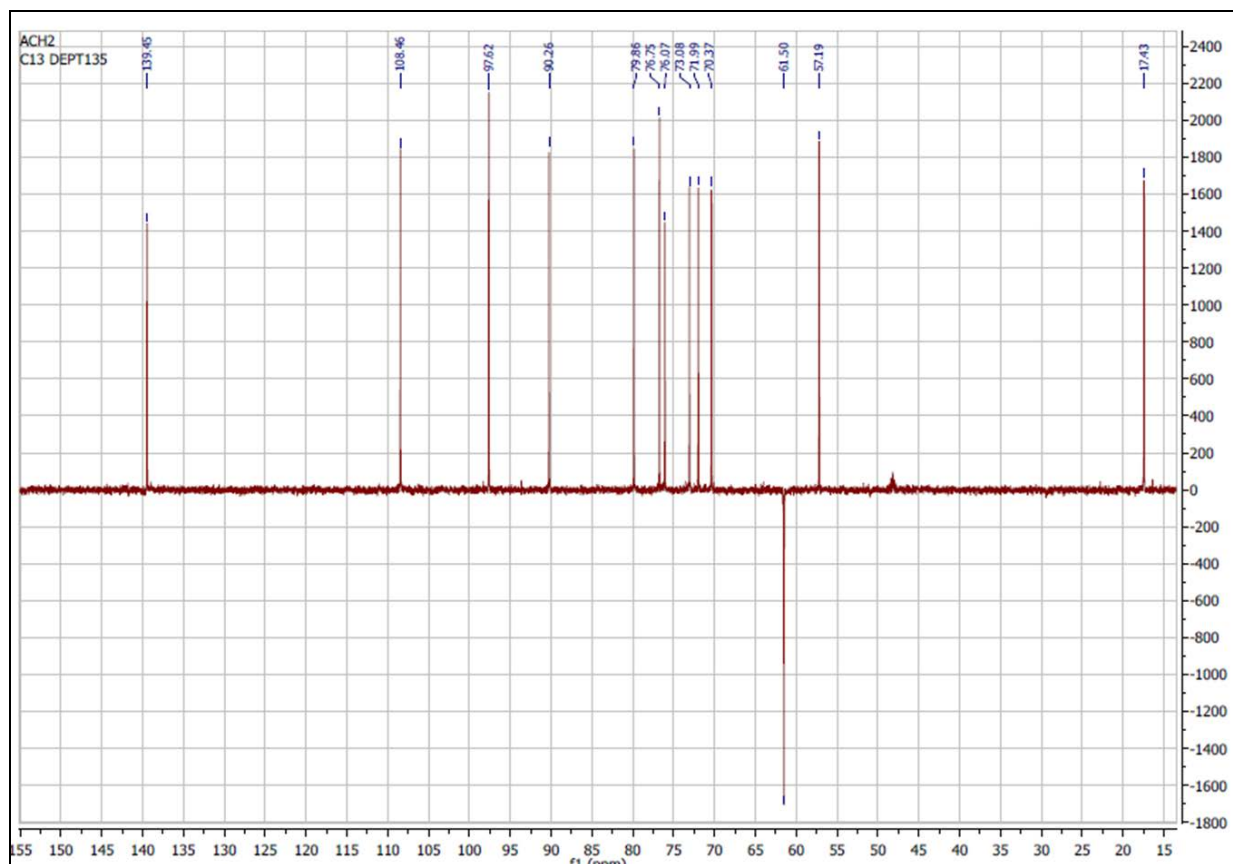
Spectre IV.4.6.5 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃+ CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-2



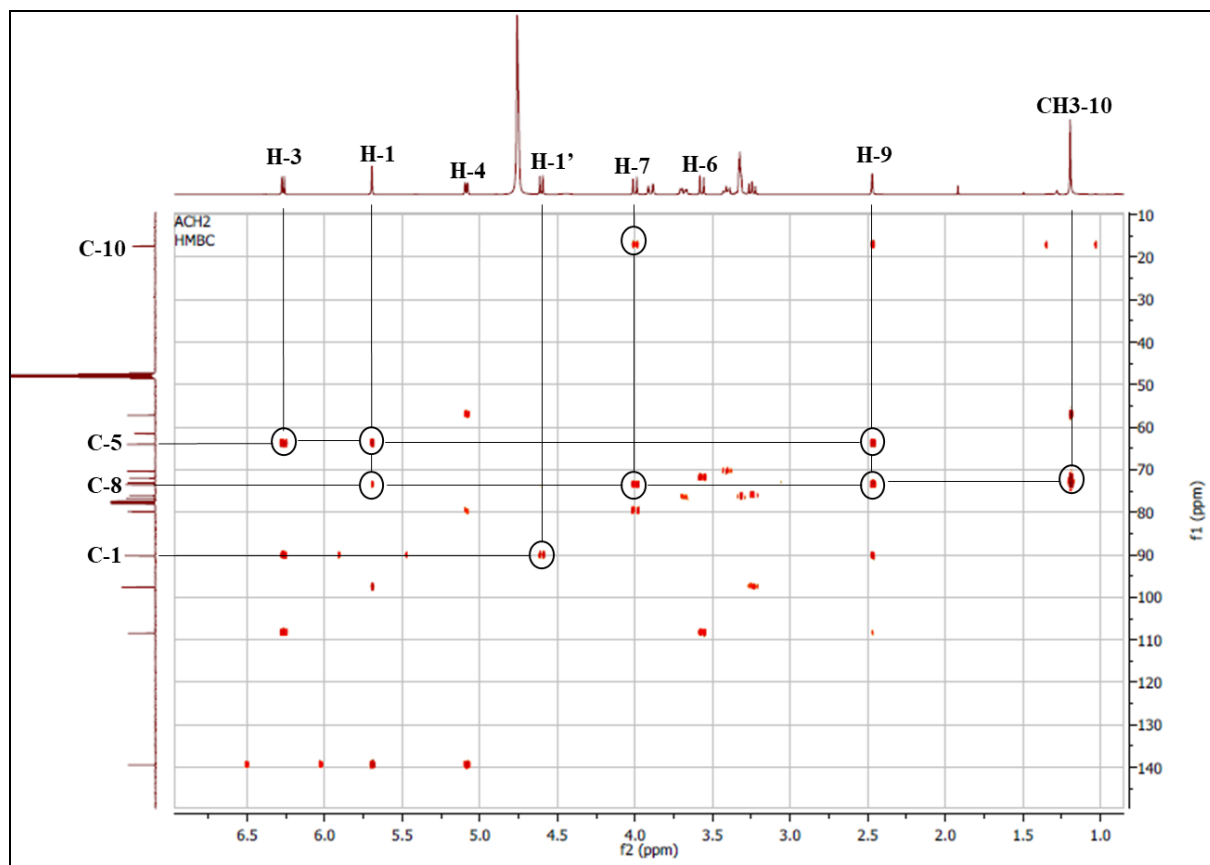
Spectre IV.4.6.6 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃+ CD₃OD, δ_{ppm}) du composé LIN-2

Comme il a été déjà indiqué, Le spectre RMN ^{13}C montre la présence de 15 atomes de carbones. En faisant abstraction des 13 atomes de carbones attribués, il reste deux atomes de carbones oxygénés localisés à $\delta_{\text{C}} = 73,6$ et $64,0$ ppm dont la comparaison des deux spectres RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.6.2**) et le DEPT 135° (**Spectre IV.4.6.7**) indique qu'il s'agit de deux carbones quaternaires qui ne peuvent être attribués qu'aux carbones C-8 et C-5 respectivement, cette attribution est confirmée par le spectre HMBC (**Spectre IV.4.6.8**) comme suit :

- Le C-8 localisé à $\delta_{\text{C}} = 73,6$ ppm montre des taches de corrélations avec les protons H-1, H-7, H-9 et les protons du CH_3 -10 ce qui confirme son attribution.
- Le C-5 localisé à $\delta_{\text{C}} = 64,0$ ppm montre des taches de corrélations avec les protons H-3, H-1 et H-9 ce qui confirme son attribution.



Spectre IV.4.6.7 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ_{ppm}) du composé
LIN-2



Spectre IV.4.6.8 : Spectre HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ_{ppm}) du composé LIN-2

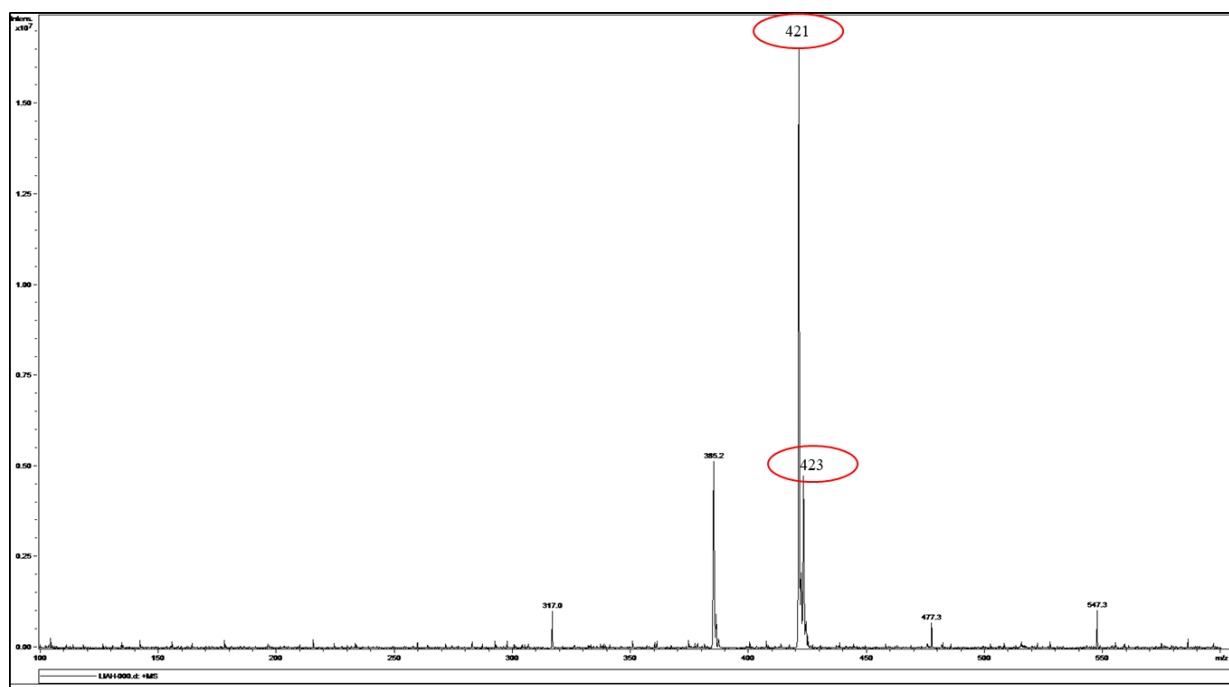
La confirmation de la localisation du groupement glucosylé en position C-1 est réalisée grâce au spectre HMBC (**Spectre IV.4.6.8**) qui montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1' et le C-1.

La comparaison entre les attributions des signaux des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C ainsi que les valeurs des constantes de couplage des deux composés LIN-2 et LIN-4 ont permis de tirer quelques différences, on remarque en effet :

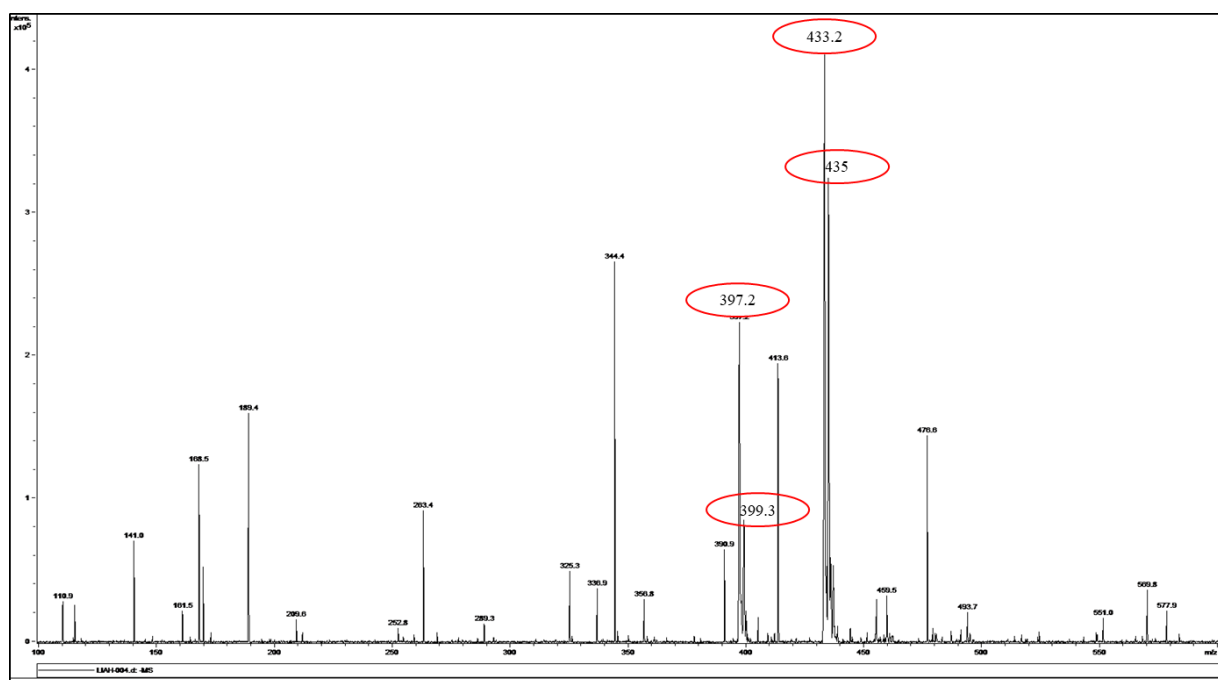
- Un changement du déplacement chimique des deux protons H-6 et H-7 dans le spectre RMN ^1H du composé LIN-2, où le H-7 est devenu plus déblindé par rapport au H-6. L'attribution du H-7 est confirmée par le spectre HMBC (**Spectre IV.4.6.8**) qui montre une corrélation entre ce proton localisé à $\delta_{\text{H}} = 4,00$ ppm et le C-10.
- La valeur de la constante de couplage entre le H-6 et le H-7 est plus grande dans le composé LIN-2 ($J = 10$ Hz) par rapport à celle du composé LIN-4 ($J = 1,6$ Hz).
- La valeur de la constante de couplage entre le H-9 et le H-1 est plus petite dans le composé LIN-2 par rapport à celle du composé LIN-4 ($J = 6,4$ Hz).

- Un changement du déplacement chimique des deux carbones C-5 et C-8 dans le spectre RMN ^{13}C du composé LIN-2, où le C-8 est devenu plus déblindé par rapport au C-5, cela est confirmé par le spectre HMBC (**Spectre IV.4.6.8**), où le H-3 montre une corrélation avec le C-5 à $\delta_{\text{C}} = 64,0$ ppm et n'en pas avec le carbone $\delta_{\text{C}} = 73,6$ attribué à C-8.

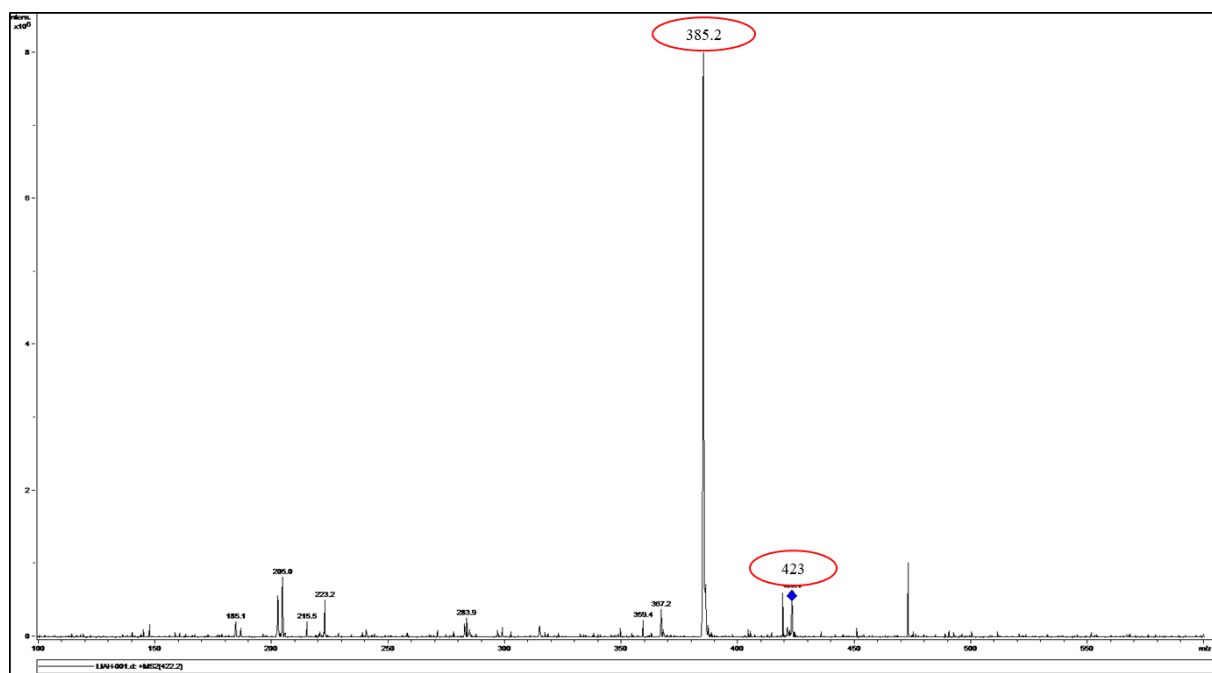
Une recherche bibliographique a permis de déduire que ces critères ne peuvent être vérifiés que lorsque la position 7 est substituée par un halogène (le Chlore ou le Brome) [14]. Une série de spectre SM/IES a confirmé qu'il s'agit d'un atome de chlore et qui a donné des fragmentations qui correspondent à un composé en accord avec une formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClO}_{10}$. SM/IES (+): m/z 421 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+\text{Na}]^+$, 423 $[\text{M}(^{37}\text{Cl})+\text{Na}]^+$ (dans un rapport 3 : 1), SM/IES (-) m/z 397,2 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})-\text{H}]^-$, 399,3 $[\text{M}(^{37}\text{Cl})-\text{H}]^-$, 433,2 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+^{35}\text{Cl}]^-$, 435 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+^{37}\text{Cl}]^-$, SM^2/IES (+) (423): 385,2 $[\text{M}-(^{37}\text{Cl})]^+$, SM^3/IES (+) (385.2): 367,1 $[\text{M}-(^{37}\text{Cl})-\text{H}_2\text{O}]^+$, 205,1 $[\text{M}-(^{37}\text{Cl})-\text{Glc}]^+$.



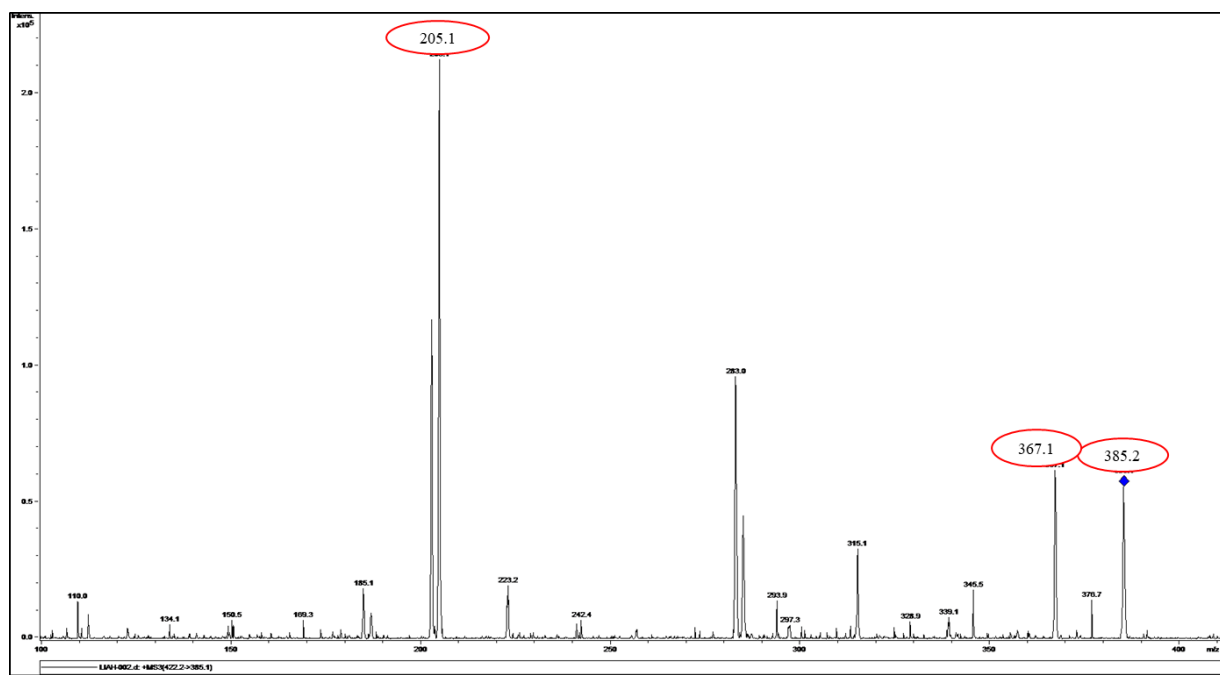
Spectre IV.4.6.9 : Spectre de masse SM/IES (+) du composé LIA-2



Spectre IV.4.6.10 : Spectre de masse SM/IES (-) du composé LIA-2



Spectre IV.4.6.11 : Spectre de masse SM²/IES (+) du composé LIA-2



Spectre IV.4.6.12 : Spectre de masse SM³/IES (+) du composé LIA-2

A ce stade de notre analyse nous proposons la structure plane représentée dans la **Figure IV.12**

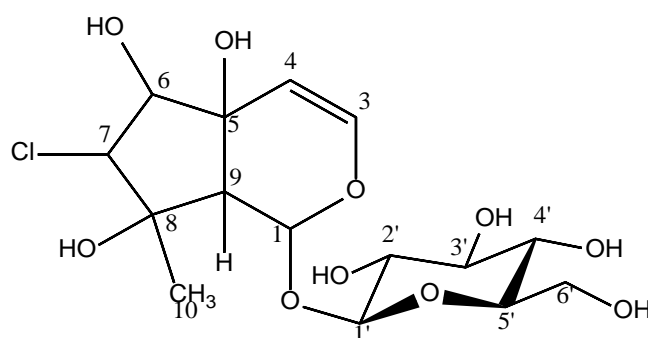
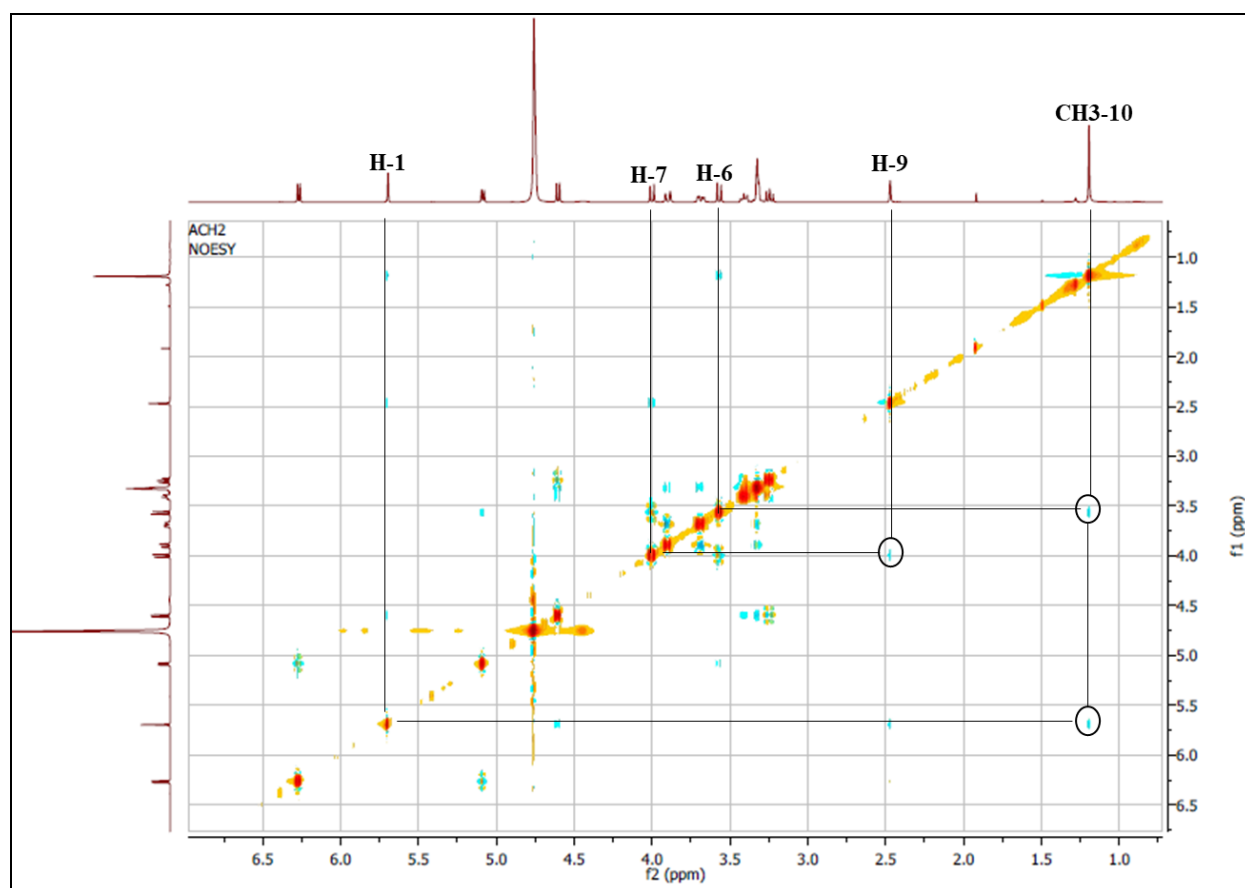


Figure IV.12 : Structure plane du composé LIN-2

Concernant la stéréochimie des centres chiraux, la grande constante de couplage ($J = 10$ Hz) entre H-6 et H-7 indique que ces deux protons admettent des orientations différentes [9]. Sur le spectre NOESY (**Spectre IV.4.6.13**) le H-6 montre une tache de corrélation avec les protons de CH₃-10, ce dernier montre sur le même spectre une corrélation avec le H-1, donc, et partant d'une orientation α pour le H-1, le H-6 et le CH₃-10 admettent des orientations α . Par contre le H-7 admet une orientation β , cette orientation est confirmée par le même spectre NOESY qui montre une tache de corrélation entre le H-7 et le H-9 (β).



Spectre IV.4.6.13 : Spectre NOESY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ_{ppm}) du composé LIN-2

Les données spectroscopiques RMN¹H et RMN¹³C sont rassemblées dans le **Tableau IV.8**

Tableau IV.8 : les données spectroscopique RMN ¹H et RMN ¹³C du composé LIN-2

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
1	90,3	5,70 <i>sl</i>	-	9	57,2	2,47 <i>sl</i>	-
2	-	-	-	10	17,4	1,19 <i>sl</i>	-
3	139,5	6,27 <i>d</i>	6,4	1'	97,6	4,60 <i>d</i>	7,6
4	108,5	5,09 <i>dl</i>	6,4	2'	73,1	3,24 <i>dd</i>	8,8 ; 8,0
5	64,0	-	-	3'	76,1	3,41 <i>t</i>	8,8
6	79,9	3,57 <i>d</i>	10,0	4'	70,4	3,30-3,35 <i>m</i>	-
7	72,00	4,00 <i>dl</i>	10,0	5'	76,7	3,30-3,35 <i>m</i>	-
8	73,6	-	-	6'	61,5	3,90 <i>dl</i>	11,2
						3,69	11,2 ; 5,6

L'ensemble de nos données sont en parfait accord avec ceux de la linarioside (**Figure IV.13**) qui est un iridoïde bien distribué dans le genre *Linaria* [13-14].

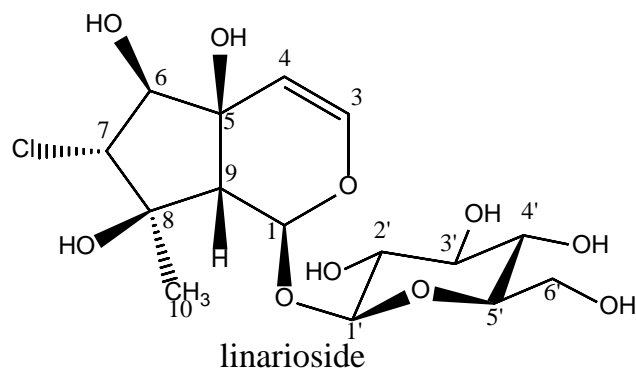


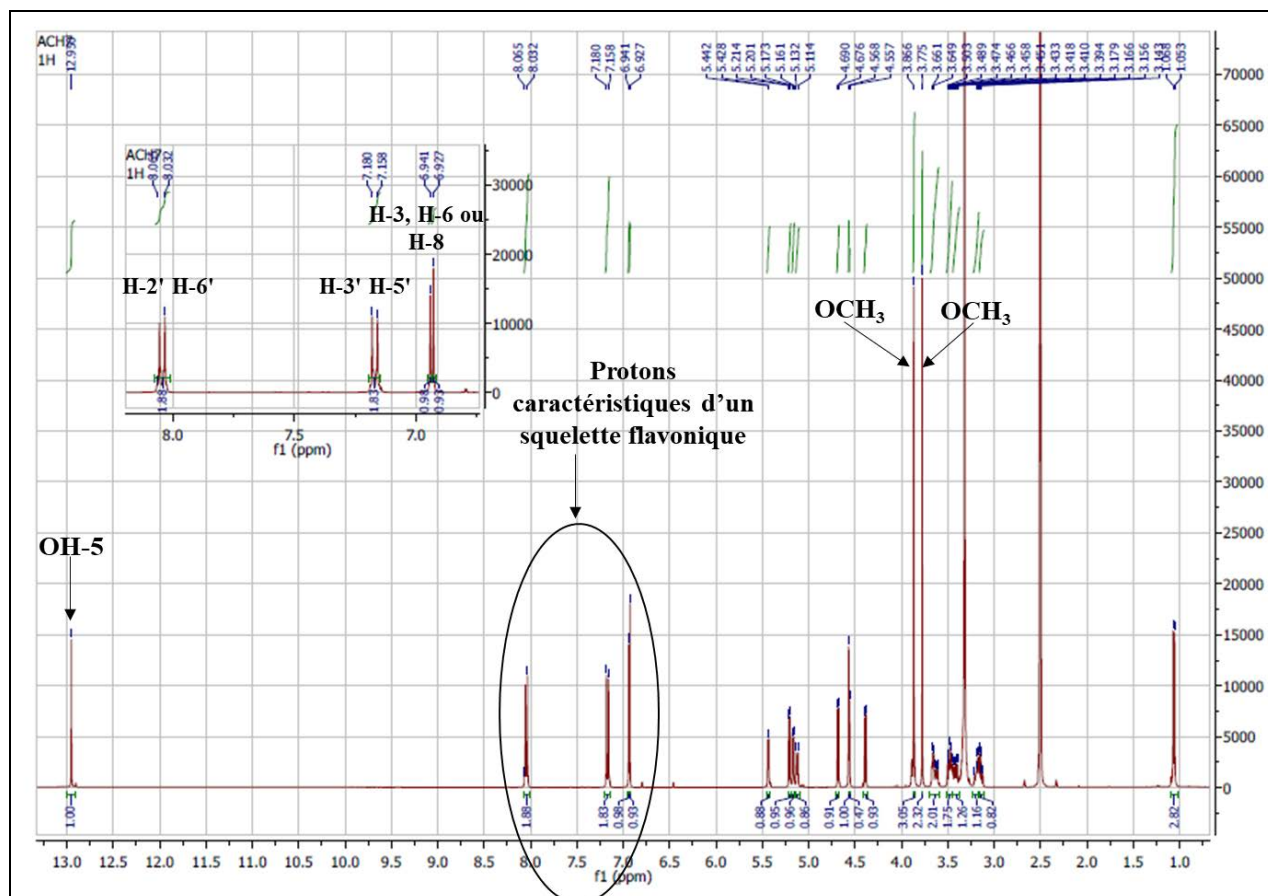
Figure IV.13 : Structure du composé LIN-2

IV.4.7. Elucidation structurale du composé 7 (LIN-7)

Le composé LIN-7 a été obtenu sous forme d'une poudre de couleur jaune claire. Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$), il montre une fluorescence noire-violette orientant vers un squelette flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR.

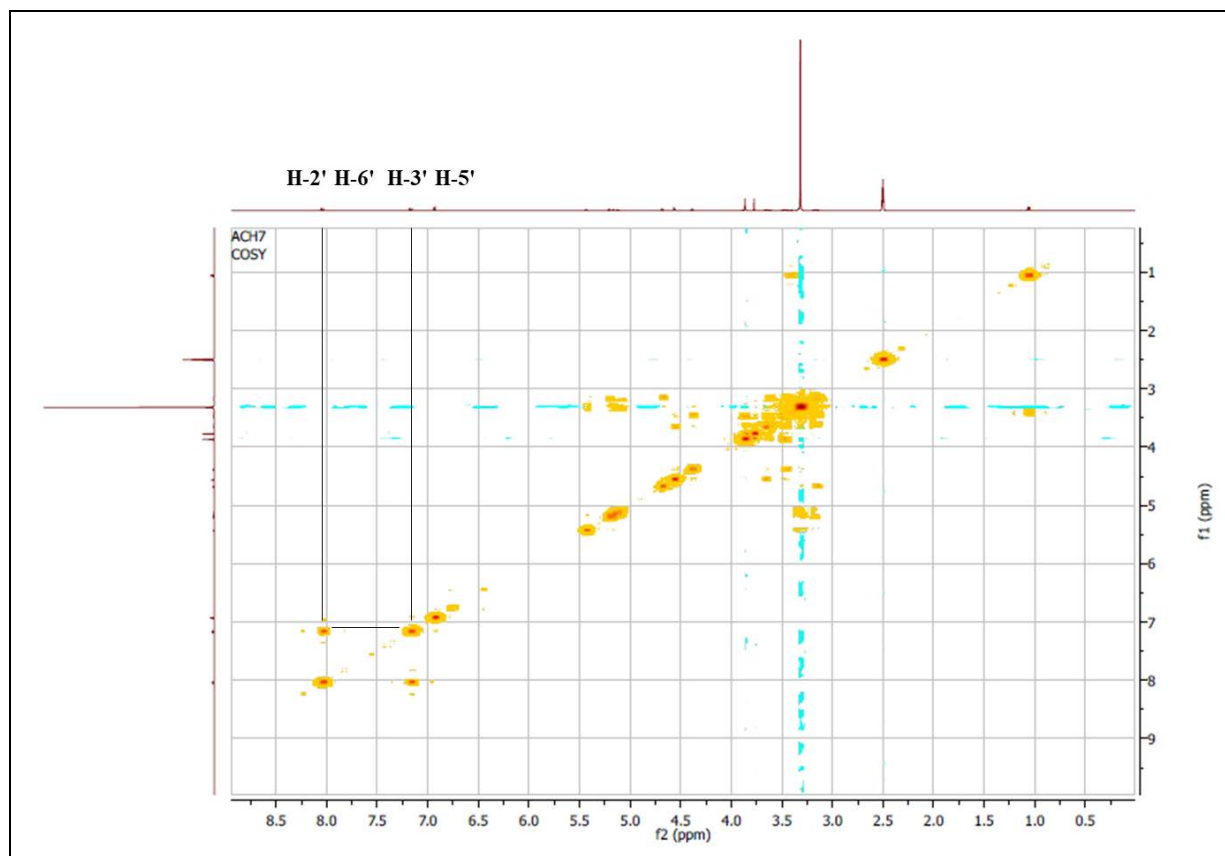
L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.7.1**) enregistré dans le DMSO- d_6 , montre qu'il s'agit bien d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol 3-OR caractérisé par :

- Un singulet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 12,95 \text{ ppm}$, caractéristique du proton d'un groupement OH en position 5 (OH-5).
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 8,04 \text{ ppm}$ ($J = 8,8 \text{ Hz}$), attribuable aux protons H-2', H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 7,17 \text{ ppm}$ ($J = 8,8 \text{ Hz}$), attribuable aux protons H-3', H-5'.
- Deux signaux sous forme de singulet d'intégration 1H chacun, à $\delta_{\text{H}} = 6,94$ et $6,93 \text{ ppm}$, attribuables aux protons H-3, H-6 ou H-8.
- deux singulets d'intégration 3H chacun, à $\delta_{\text{H}} = 3,87$ et $3,78 \text{ ppm}$, indiquant la présence de deux groupements méthoxyles.



Spectre IV.4.7.1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7

La para substitution du noyau B est confirmée par le spectre COSY (**Spectre IV.4.7.2**), qui montre une tache de corrélation entre les protons H-2', H-6' et H-3', H-5'.

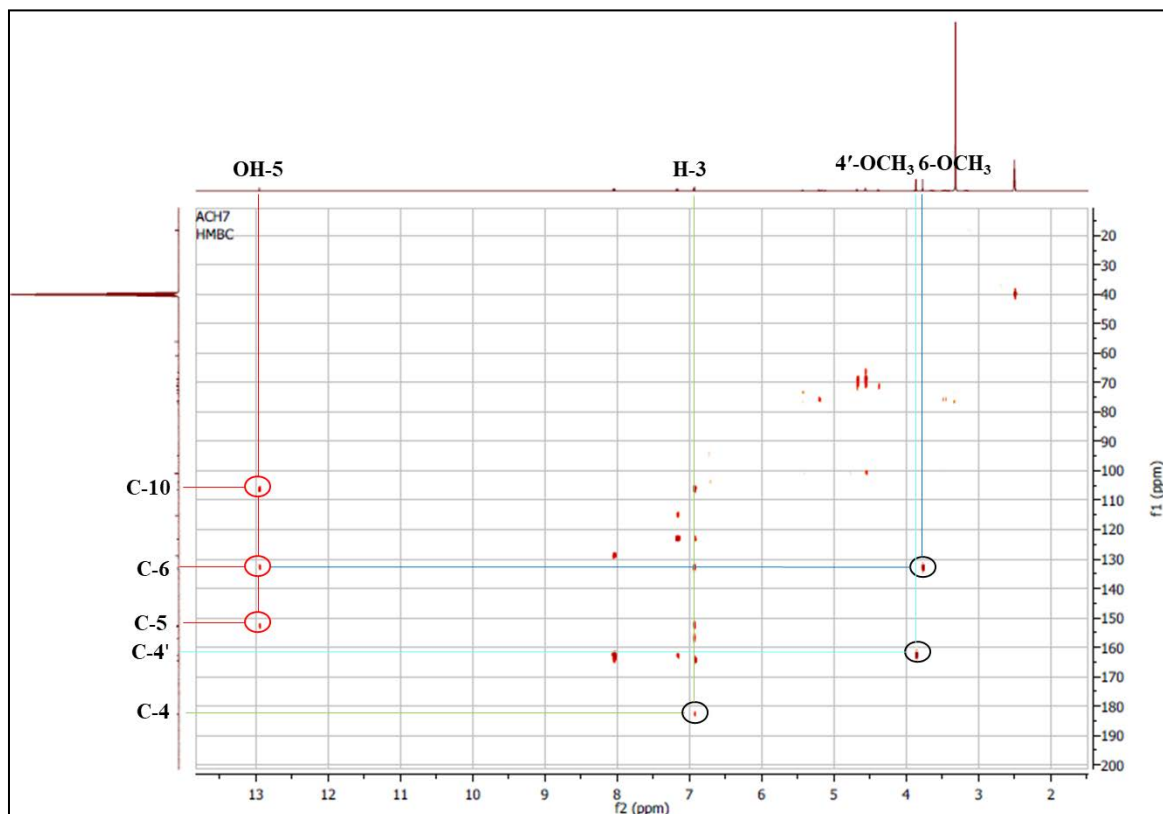


Spectre IV.4.7.2 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7

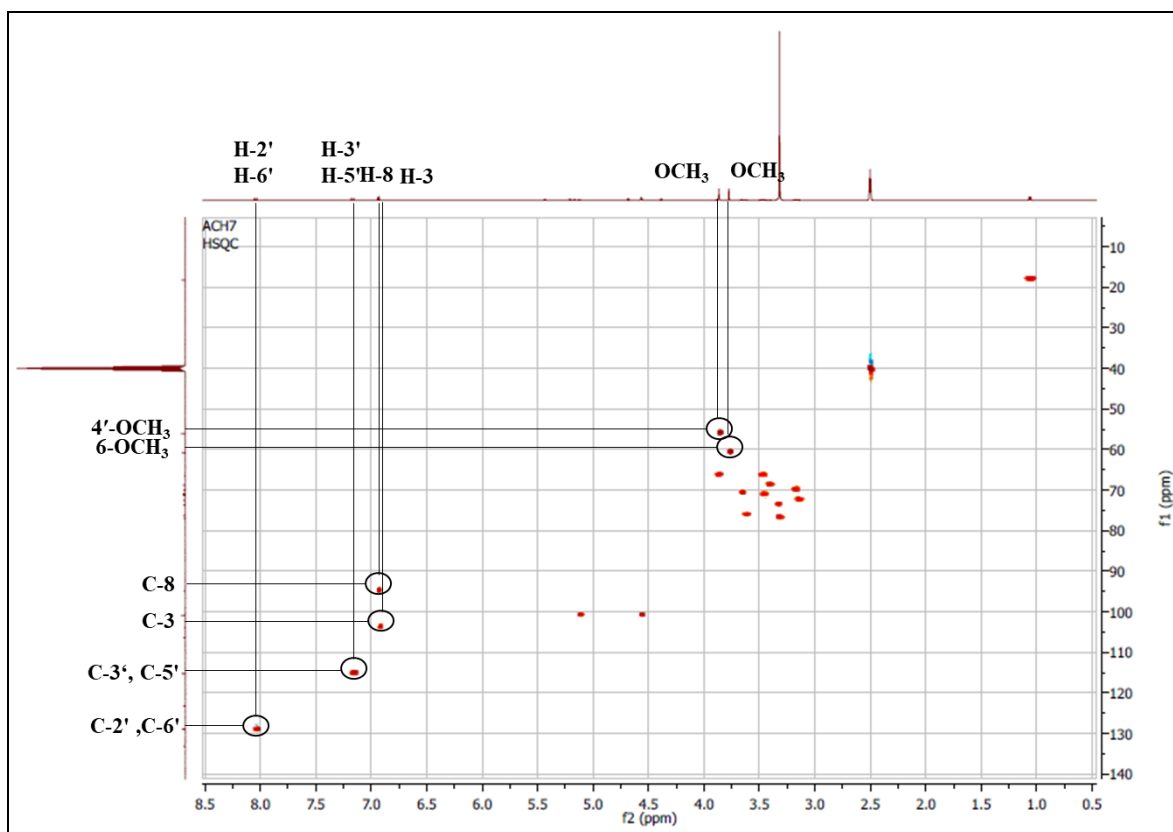
Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.3**), le proton du groupement hydroxyle OH-5 montre trois taches de corrélations :

- la première avec le carbone à $\delta_C = 153,0$ ppm attribuable à C-5.
- Une autre tâche de corrélation avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 106,4$ ppm attribuable à C-10.
- Une dernière tache de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 133,2$ ppm qui ne peut être que le C-6.

Sur le même spectre HMBC, le C-6 montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,78$ ppm ($\delta_C = 60,8$ ppm), ce qui permet la localisation de ce méthoxyle en C-6. Par ailleurs et toujours sur le même spectre HMBC, le proton repéré à $\delta_H = 6,93$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone du carbonyle détecté à $\delta_C = 183,1$ ppm (caractéristique du carbonyle situé en position 4 de la flavone) ce qui permet son attribution à H-3. Donc le proton corrélant sous forme d'un singulet à $\delta_H = 6,94$ ppm ne peut être que le H-8. Grâce au spectre HSQC (**Spectre IV.4.7.4**) les carbones C-3 et C-8 sont repérés à $\delta_C = 103,9$ et $94,9$ ppm, respectivement.



Spectre IV.4.7.3 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7

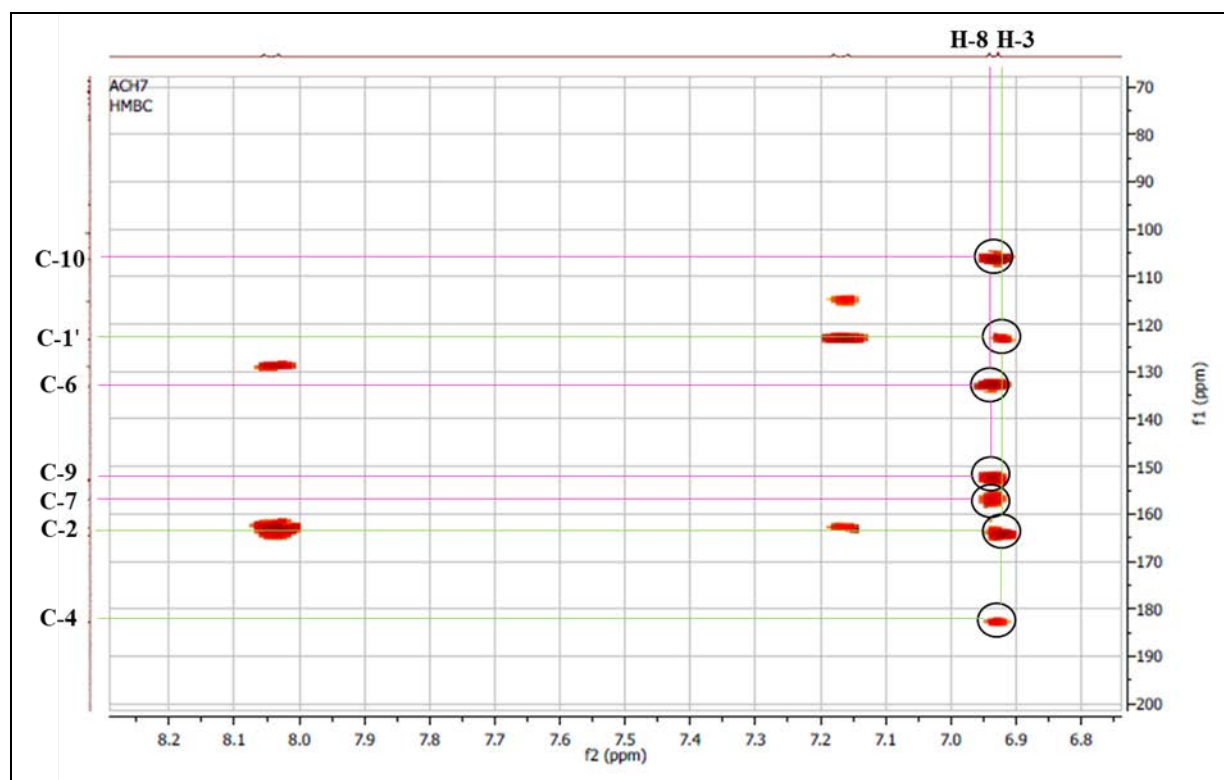


Spectre IV.4.7.4 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7

L'attribution du C-8 permet la localisation de C-9 à $\delta_C = 152,7$ ppm vu la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.5**) entre ce carbone et le H-8. Sur le même spectre, le même proton montre trois autres taches de corrélations :

- La première avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 157,0$ ppm attribuable à C-7.
- Deux autres taches de corrélations avec les carbones corrélant à $\delta_C = 133,2$ et 106,4 ppm confirmant ainsi leurs attributions à C-6 et C-10, respectivement.

Toujours sur le même spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.5**), la corrélation entre le H-3 et le carbone à $\delta_C = 164,6$ ppm permet son attribution à C-2.

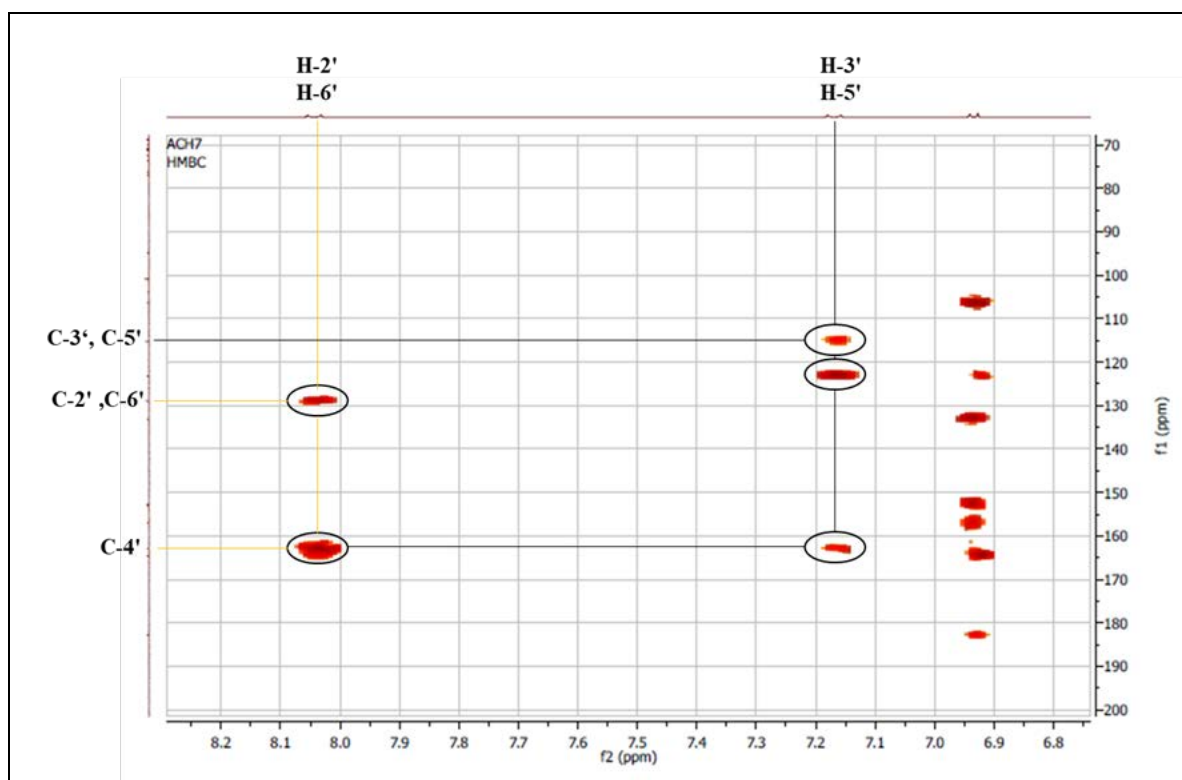


Spectre IV.4.7.5 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7, étalement

Le spectre relatif à l'expérience HSQC (**Spectre IV.4.7.4**) permet la localisation des carbones C-2', C-6' et C-3', C-5' à $\delta_C = 128,9$ et 115,3 ppm, respectivement. Les corrélations des protons H-2', H-6' et H-3', H-5' sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.6**) permettent de localiser les autres carbones du noyau B. En effet :

- Les protons H-2', H-6' montrent deux taches de corrélations :

- ✓ La première tache de corrélation avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 162,9$ ppm. Lui-même montre sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.3**), une corrélation avec le deuxième groupement méthoxyle ($\delta_H = 3,87$ ppm, $\delta_C = 56,1$ ppm), donc et à cause de la parasubstitution du noyau B, ce carbone ne peut être que le C-4' substitué par ce méthoxyle.
- ✓ Une deuxième tache de corrélation avec les carbones C-2', C6' à $\delta_C = 128,9$ ppm.
- Les protons H-3', H-5' montrent trois taches de corrélations :
 - ✓ Une première tache de corrélation avec les carbones C-3', C5' à $\delta_C = 115,3$ ppm.
 - ✓ Une deuxième tache de corrélation avec le carbone C-4' à $\delta_C = 162,9$ ppm.
 - ✓ Une troisième tache de corrélation avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 123,2$ ppm, qui ne peut être que le C-1', cette attribution est confirmée par la corrélation avec le H-3 sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.5**).



Spectre IV.4.7.6 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé LIN-7, étalement

La **Figure IV.14** représente la structure proposée pour le composé LIN-7 à ce stade de notre analyse, et montre également les différentes corrélations du spectre HMBC.

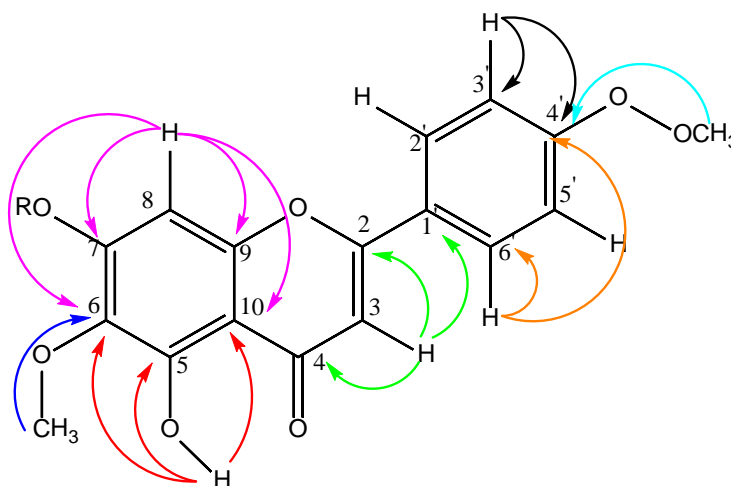
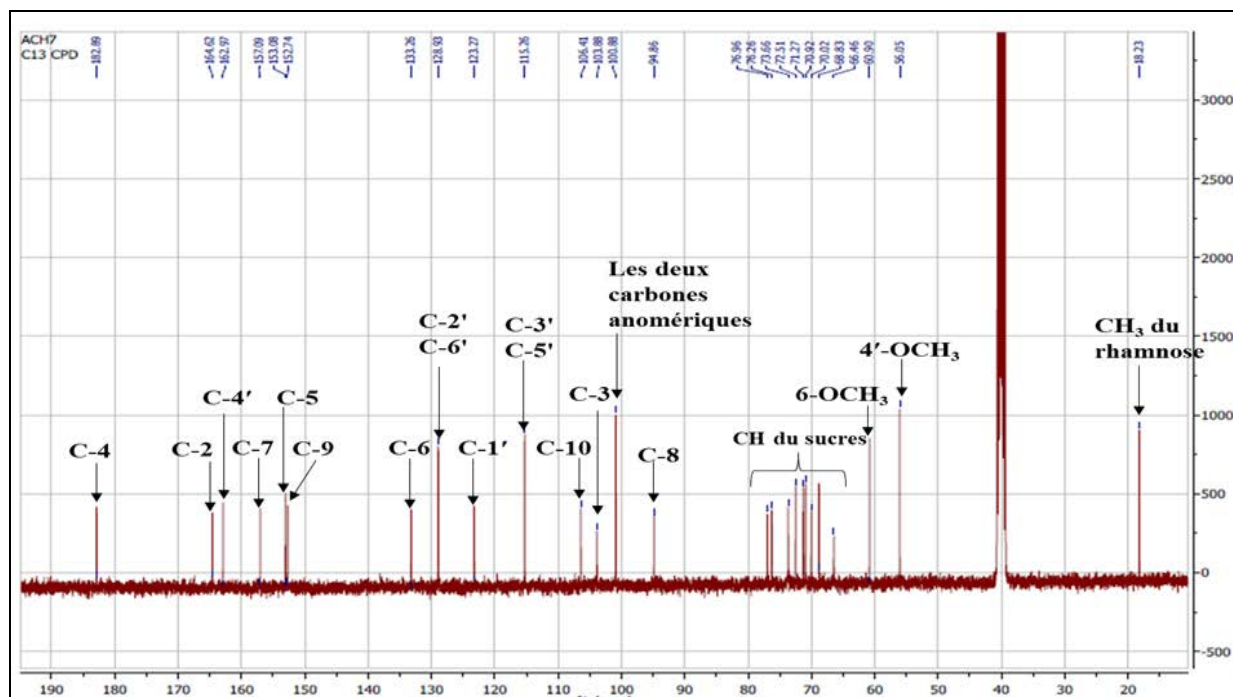


Figure IV.14 : Structure partielle du composé LIN-7

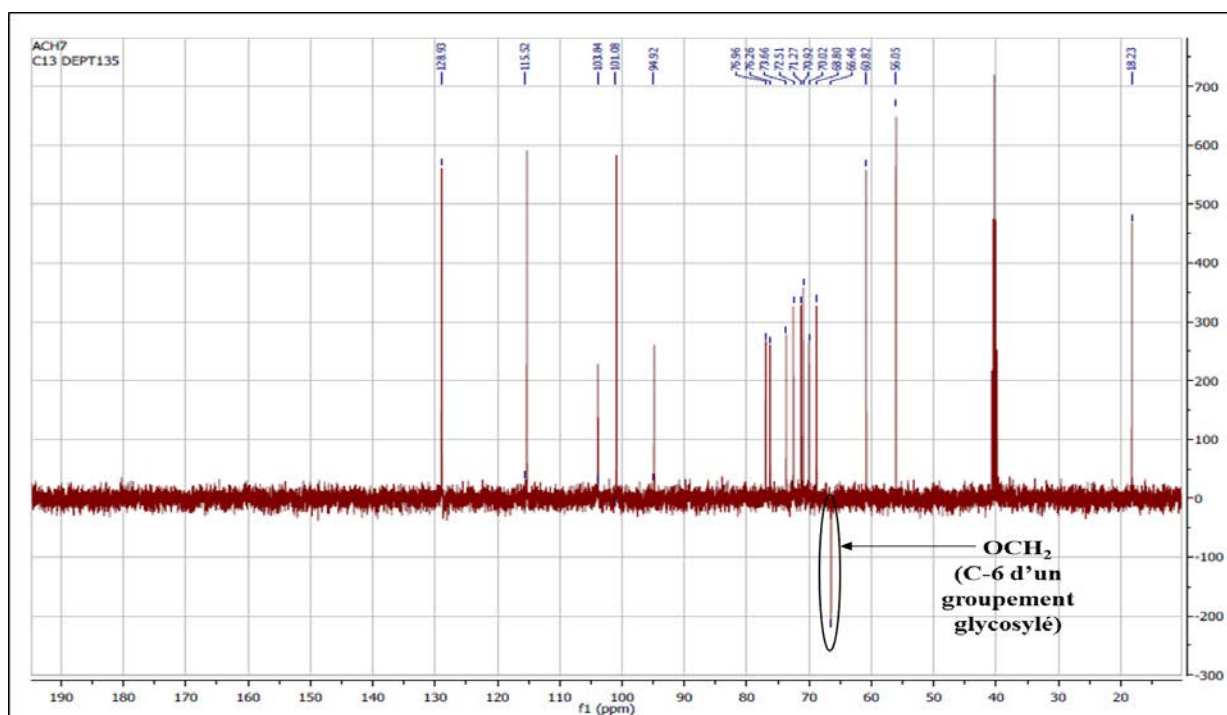
Les résultats des signaux RMN ^1H et RMN ^{13}C attribués à ce stade de notre analyse sont rassemblés dans le **Tableau IV.9**.

Tableau IV.9 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C

δ_{H} (ppm)	J (Hz)	Intégration	δ_{C} (ppm)	Attribution des carbne
-	-	1H	164,6	C-2
6,93 <i>s</i>	-	1H	103,9	C-3
-	-	-	183,1	C-4
-	-	-	153,0	C-5
-	-	-	133,2	C-6
-	-	-	157,0	C-7
6,94 <i>s</i>	-	1H	94,9	C-8
-	-	-	152,7	C-9
-	-	-	106,4	C-10
-	-	-	123,2	C-1'
8,04 <i>s</i>	8,8	2H	128,9	C-2', C6'
7,17 <i>s</i>	8,8	2H	115,3	C-3', C-5'
-	-	-	162,9	C-4'
3,78 <i>s</i>	-	3H	60,8	6-OCH ₃
3,87 <i>s</i>	-	3H	56,1	4'-OCH ₃



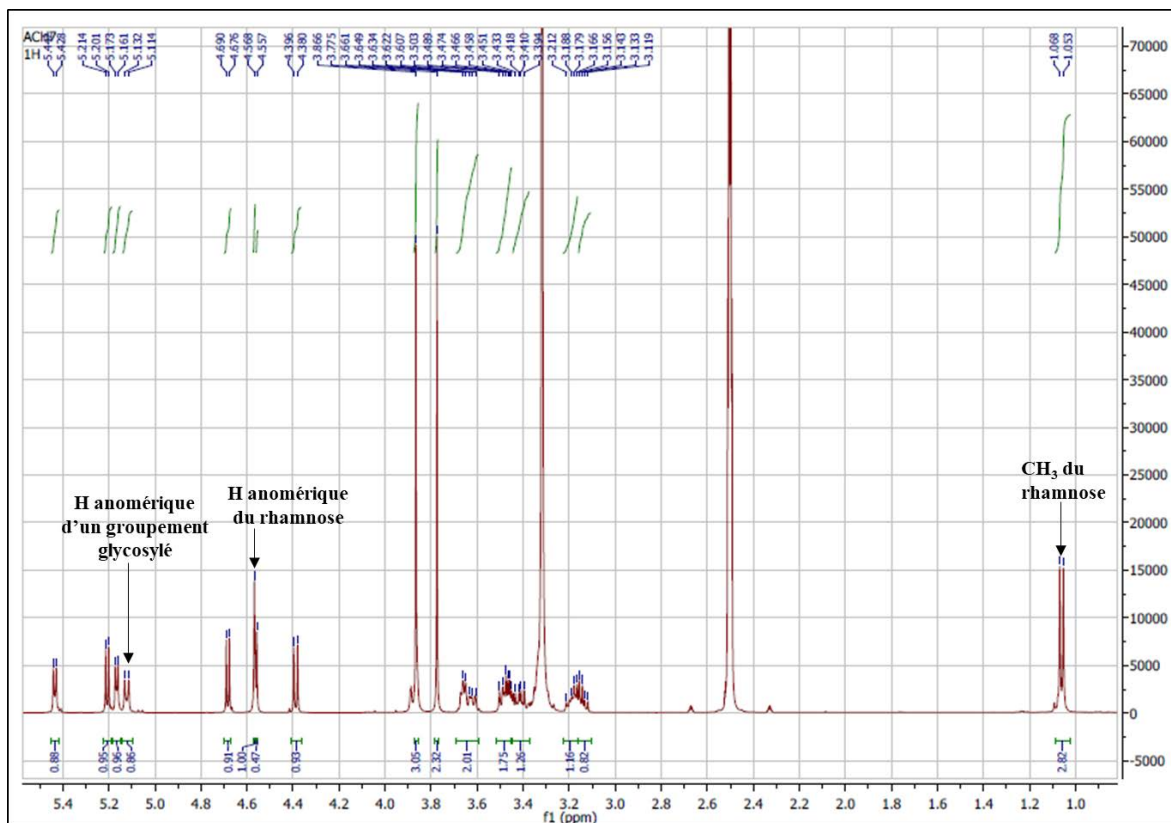
Spectre IV.4.7.7 : Spectre RMN¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-7



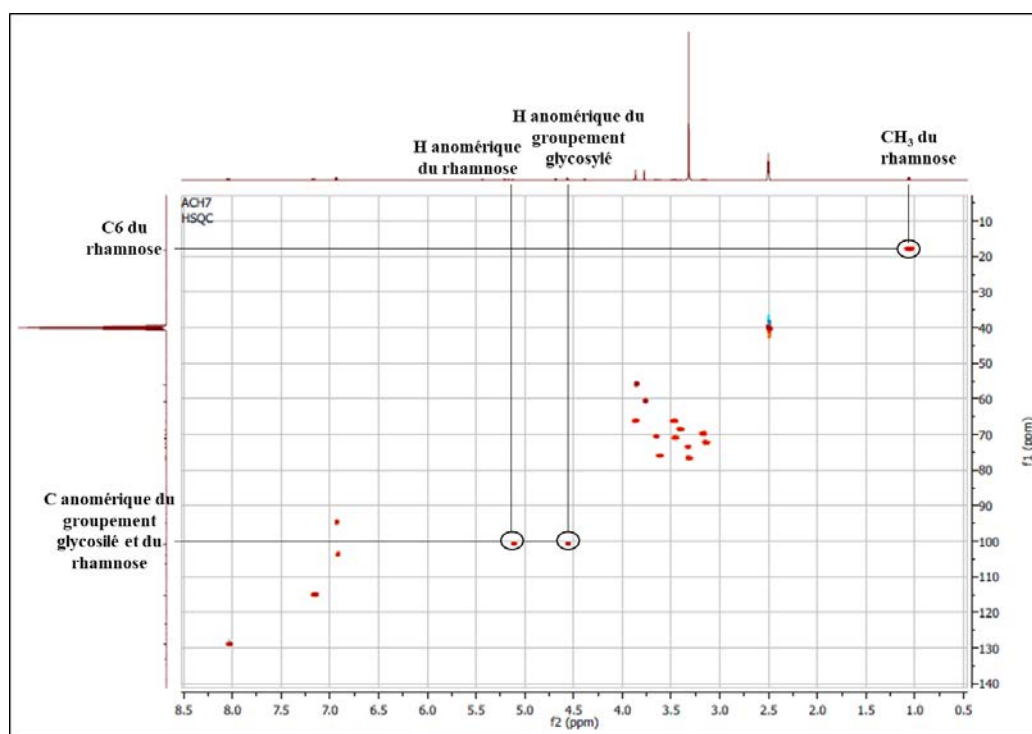
Spectre IV.4.7.8 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-7

La présence d'une entité biglycosylés est mise en évidence par la présence de deux signaux d'intégration 1H chacun (Spectre IV.4.7.9). Le premier sous forme d'un doublet ($J = 7,2$ Hz) à $\delta_H = 5,12$ ppm ($\delta_C = 100,9$ ppm), dont la valeur de la constante de couplage est en

faveur d'une configuration β , et la valeur du déplacement chimique indique une jonction *O*-glycosylé. Le second sous forme d'un singulet large à $\delta_{\text{H}} = 4,57$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 100,9$ ppm) attribuable au proton anomérique d'un groupement rhamnosyl avec une configuration α , le méthyl caractéristique de ce rhamnose est localisé à $\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 18,2$ ppm).

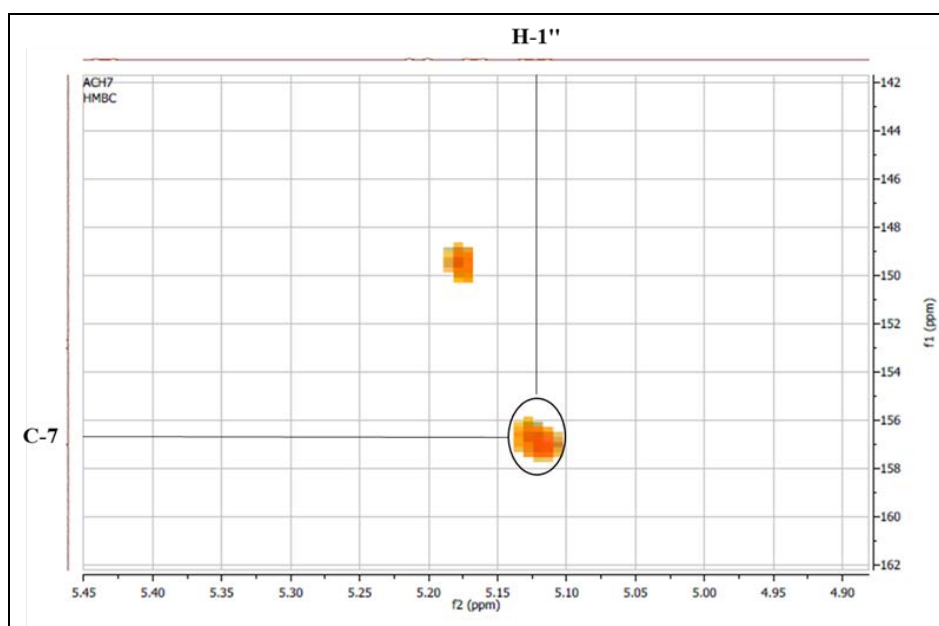


Spectre IV.4.7.9 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ_{ppm}) du composé LIN-7, étalement



Spectre IV.4.7.10 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7

Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.11**), le C-7 montre une tache de corrélation avec le proton anomérique du premier groupement glycosylé, ce qui permet la localisation de ce sucre sur le C-7 et son proton anomérique prendra donc la position 1'', le deuxième proton anomérique du rhamnose prendra alors la position 1'''.



Spectre IV.4.7.11 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7, étalement

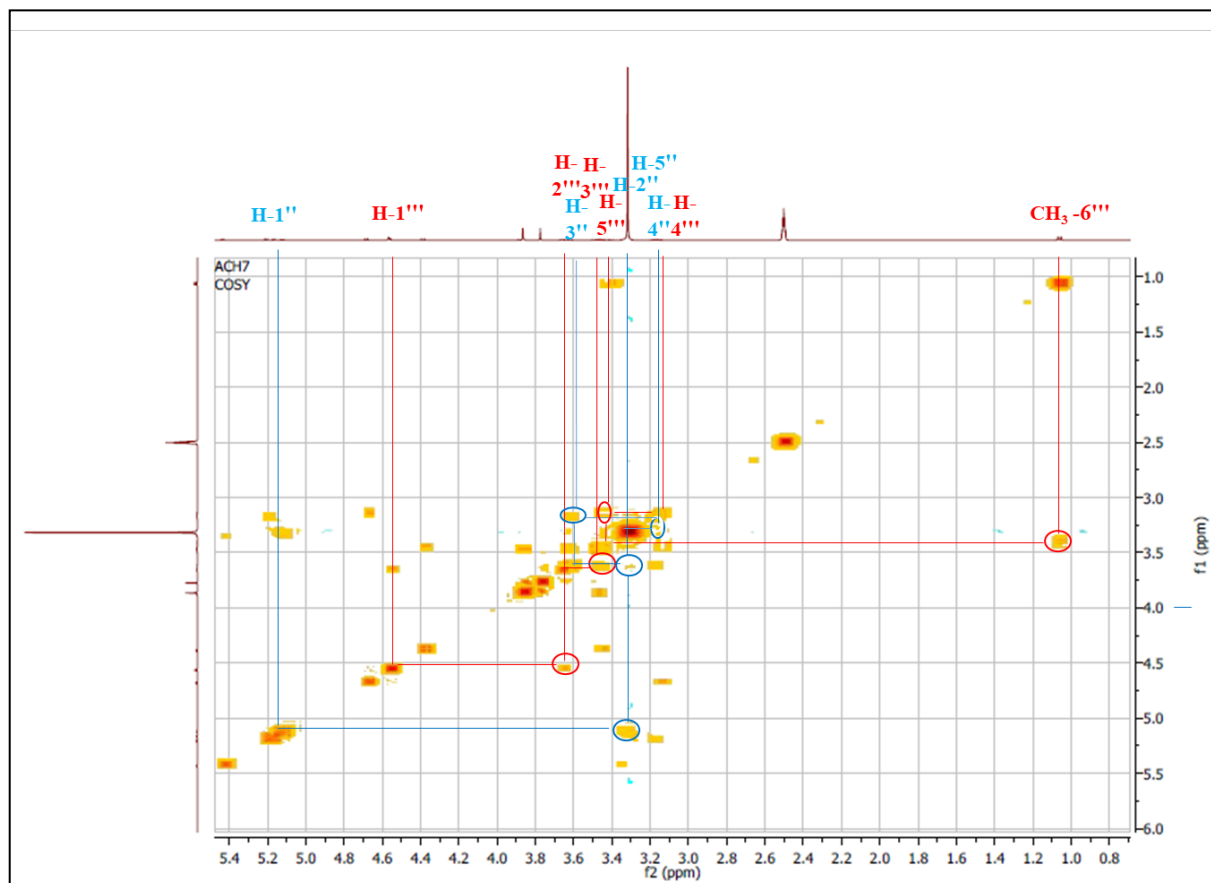
Les autres protons des deux sucres sont attribués grâce à une étude de spectre COSY (Spectre IV.4.7.12).

Les protons du rhamnose sont attribués comme suit :

- Une corrélation entre le signal des protons du méthyle $\text{CH}_3\text{-6}'''$ du rhamnosyle et un signal sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}} = 3,40$ ppm attribuable à $\text{H-5}'''$.
- Le $\text{H-5}'''$ montre une tâche de corrélation avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 3,14$ ppm attribuable à $\text{H-4}'''$ (*m*).
- Le $\text{H-3}'''$ (*m*) est plus facilement localisé à $\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm à cause de sa corrélation avec $\text{H-2}'''$ (*m*), lui-même localisé à $\delta_{\text{H}} = 3,65$ ppm à cause de sa corrélation avec le proton anomérique à $\delta_{\text{H}} = 4,57$ ppm.

Les protons de l'autre groupement glycosylé sont attribués comme suit :

- Une corrélation entre le $\text{H-1}''$ ($\delta_{\text{H}} = 5,12$) et un signal à $\delta_{\text{H}} = 3,32$ ppm attribuable à $\text{H-2}''$. ce dernier corrèle avec un signal à $\delta_{\text{H}} = 3,61$ ppm attribuable à $\text{H-3}''$.
- Le $\text{H-3}''$ montre une corrélation avec le signal à $\delta_{\text{H}} = 3,17$ ppm attribuable à $\text{H-4}''$.
- Le $\text{H-4}''$ montre une tâche de corrélation avec le signal à $\delta_{\text{H}} = 3,32$ ppm attribuable à $\text{H-5}''$.
- Le $\text{H-6}''\text{a}$ et le $\text{H-6}''\text{b}$ sont plus facilement localisés à $\delta_{\text{H}} = 3,86$ et $3,46$ ppm respectivement, à cause de leurs corrélations sur le spectre HSQC (spectre 3-3) avec le même carbone $\text{C-6}''$ ($\delta_{\text{C}} = 66,5$ ppm).



Spectre IV.4.7.12 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7, étalement

L'attribution des atomes de carbones de chaque sucre est réalisée grâce à l'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (**Spectre IV.4.7.13**).

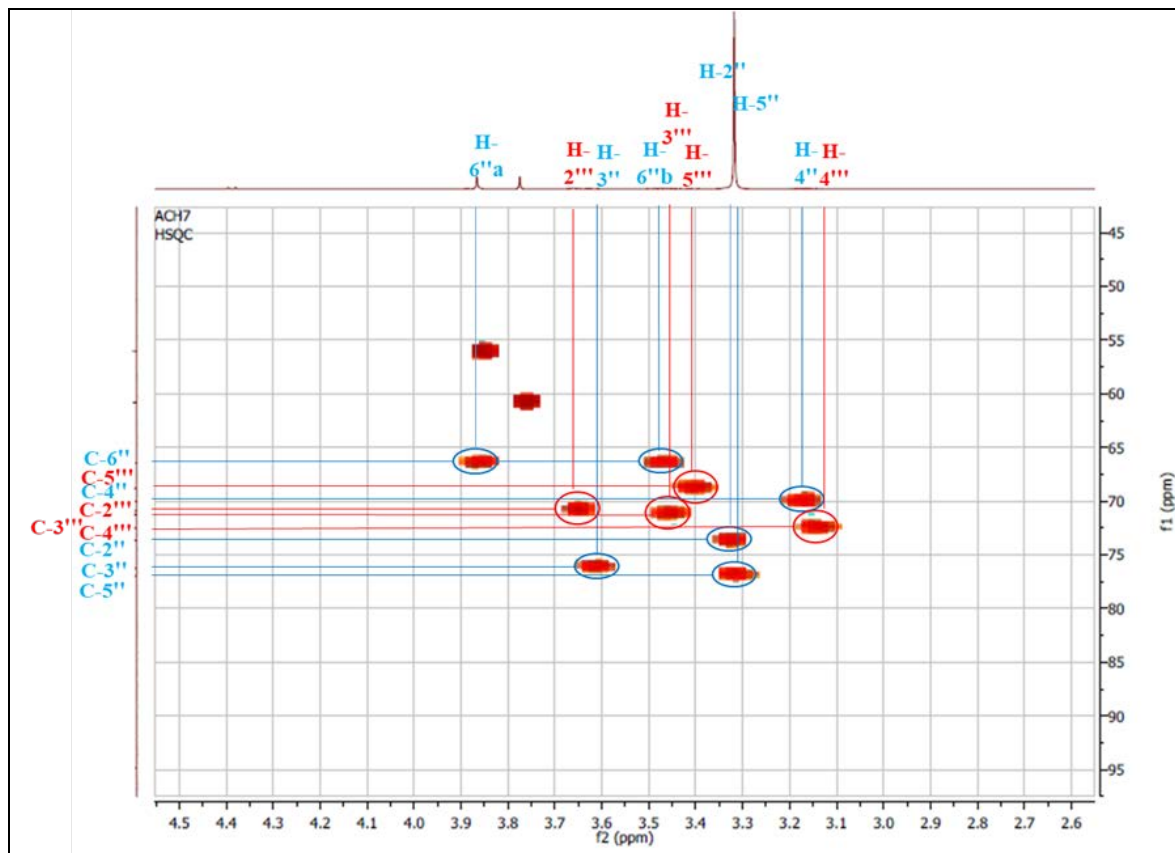
Les carbones du rhamnosyle sont attribués comme suit :

- Le proton H-2''' permet la localisation du C-2''' à $\delta_C = 70,9$ ppm.
- Le proton H-3''' permet la localisation du C-3''' à $\delta_C = 71,3$ ppm.
- Le proton H-4''' permet la localisation du C-4''' à $\delta_C = 72,5$ ppm.
- Le proton H-5''' permet la localisation du C-5''' à $\delta_C = 68,8$ ppm.

Les carbones de l'autre groupement glycosylé sont attribués comme suit :

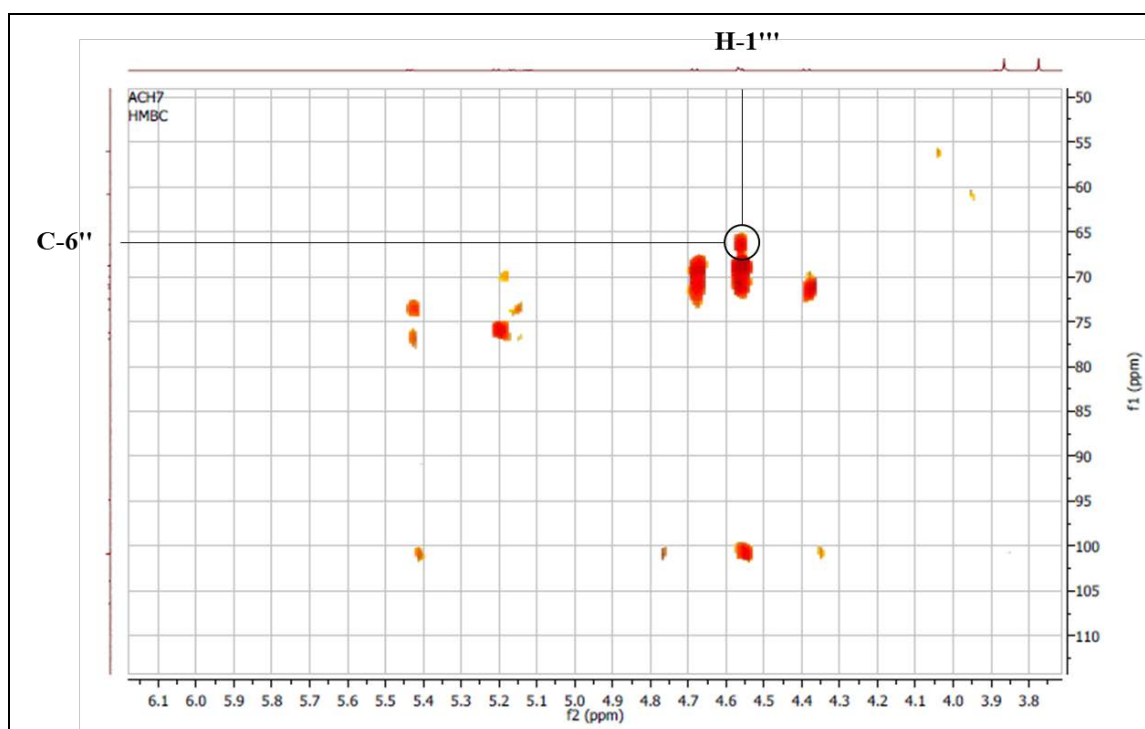
- Le proton H-2'' permet la localisation du C-2'' à $\delta_C = 73,1$ ppm.
- Le proton H-3'' permet la localisation du C-3'' à $\delta_C = 75,7$ ppm.
- Le proton H-4'' permet la localisation du C-4'' à $\delta_C = 69,5$ ppm.
- Le proton H-5'' permet la localisation du C-5'' à $\delta_C = 76,4$ ppm.

Une étude comparative des données RMN ^{13}C de ce groupement glycosylé avec ceux de la littérature [3], indique que notre sucre est un glucose.



Spectre IV.4.7.13 : Spectre HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δppm) du composé LIN-7, étalement

Le rhamnose est localisé en position C-6'' du glucose, à cause de la tache de corrélation sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.7.14**) entre son proton anomérique et le carbone C-6'' du glucose.



Spectre IV.4.7.14 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-7, étalement

Les données relatives aux spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de ce composé sont rassemblées dans le **Tableau IV.10**.

Tableau IV.10 : Les données relatives aux spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé LIN-7

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
2	164,6	-	-	1'''	100,9	5,12 <i>d</i>	7,2
3	103,9	6,93 <i>s</i>	-	2'''	73,7	3,32 <i>m</i>	-
4	183,1	-	-	3'''	76,3	3,61 <i>m</i>	-
5	153,0	-	-	4'''	70,0	3,17 <i>m</i>	-
6	133,2	-	-	5'''	77,0	3,32 <i>m</i>	-
7	157,0	-	-	6'''	66,5	3,46 <i>m</i>	-
						3,86 <i>m</i>	-
8	94,9	6,94 <i>s</i>	-	1'''	100,9	4,57 <i>sl</i>	-
9	152,7	-	-	2'''	70,9	3,65 <i>m</i>	-
10	106,4	-	-	3'''	71,3	3,43 <i>m</i>	-
1'	123,2	-	-	4'''	72,5	3,14 <i>m</i>	-
2'	128,9	8,04 <i>d</i>	8,8	5'''	68,8	3,40 <i>m</i>	-
3'	115,3	7,17 <i>d</i>	8,8	6'''	18,2	1,06 <i>d</i>	6,0
4'	162,9	-	-	4'-OMe	56,1	3,87 <i>s</i>	-
5'	115,3	7,17 <i>d</i>	8,8	6'-OMe	60,8	3,78 <i>s</i>	-
6'	128,9	8,04 <i>d</i>	8,8				

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la **Figure IV.15**, c'est la 4',6-diméthoxy-5-hydroxy-7-*O*- β -rutinoside flavone. Elle est également connue sous le nom de Pectolarine [15]. Cette molécule est bien connue pour le genre *Linaria*.

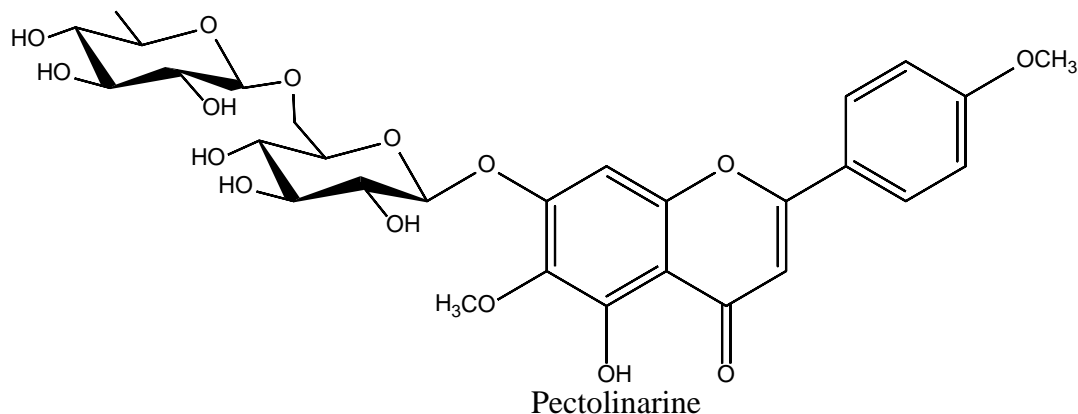


Figure IV.15 : Structure du composé LIN-7

IV.4.8. Elucidation structurale du composé 8 (LIN-9)

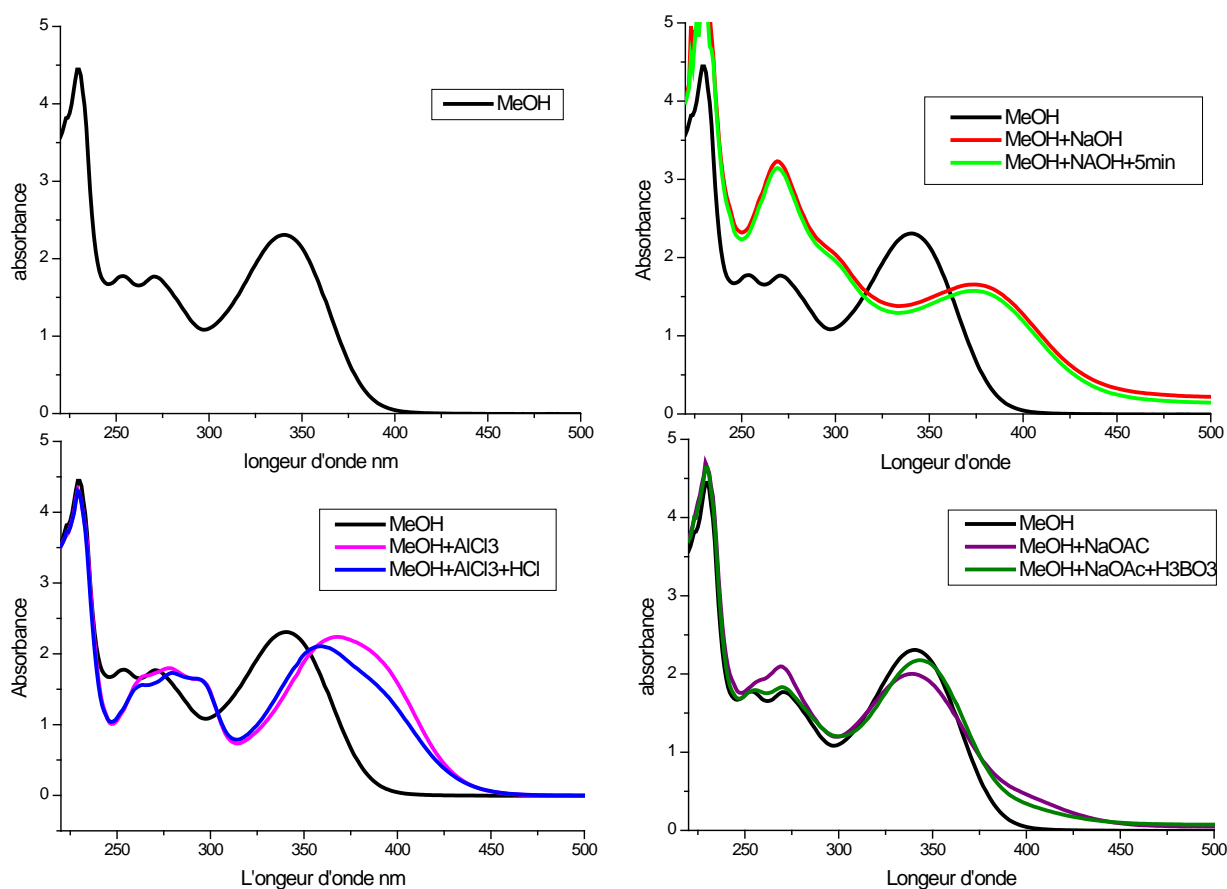
Le composé LIN-9 a été obtenu sous forme d'une poudre de couleur jaune. La fluorescence noire violette sous la lumière de Wood ($\lambda = 365$ nm) indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol 3-OR.

L'examen de la série spectrale UV du composé LIN-9 permet de tirer les indications suivantes :

- le spectre UV enregistré dans le méthanol indique la présence de deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique, la bande I à $\lambda = 340$ nm et la bande II à $\lambda = 270$ nm orientant ainsi vers un squelette de type flavone ou flavonol 3-OR.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 35$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, avec une diminution de l'intensité, permet de déduire la présence d'un OR ($R \neq H$) en C-4', en revanche, aucune nouvelle bande n'apparaissent ce qui écarte la présence d'un OH libre en position 7.
- L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I (-20 à 40 nm) par comparaison des deux spectres enregistrés dans $AlCl_3$ et $AlCl_3+HCl$ indique l'absence d'un système ortho di OH sur le cycle B. alors que la comparaison du spectre enregistré dans $AlCl_3+HCl$ avec celui enregistré dans le méthanol montre un

déplacement bathochrome de la bande I de 19 nm indiquant ainsi la présence d'un OH en position 5 et d'une oxygénation en position 6.

- L'absence d'un déplacement bathochrome de la bande II après l'ajout du NaOAc, en comparant avec le spectre enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un OR ($R \neq H$) en position 7. L'addition de H_3BO_3 à NaOAc ne provoque aucun déplacement de la bande I, ce qui indique l'absence d'un système ortho di-OH sur le cycle A et confirme l'absence d'un système ortho di OH sur le cycle B.



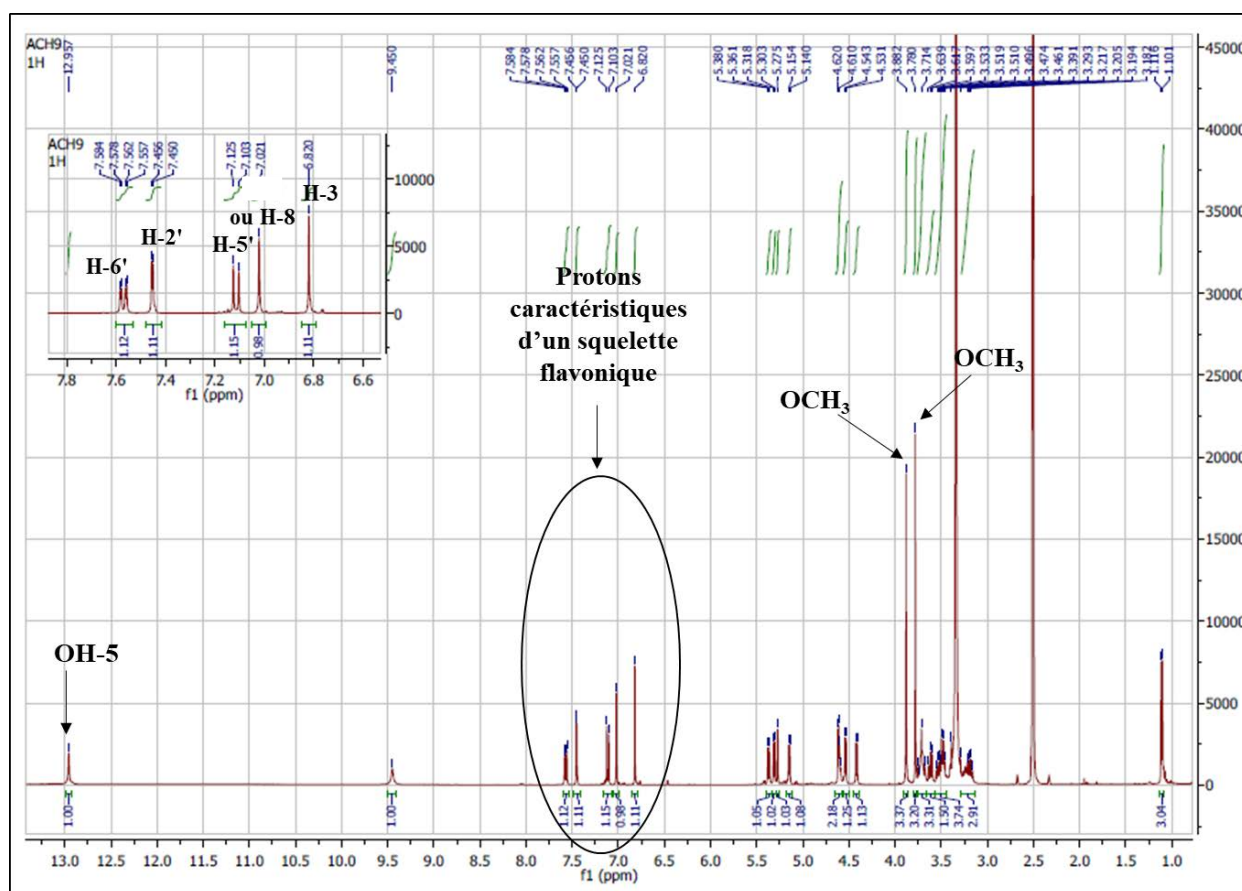
Spectre IV.4.8.1 : La série spectrale UV du composé LIN-9

Tableau IV.11 : Les données spectroscopique d' l'UV du LIN-9

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	340	270
NaOH	375	270
$AlCl_3$	367	275
$AlCl_3+HCl$	358	276
NaOAc	340	269
$NaOAc+H_3BO_3$	342	270

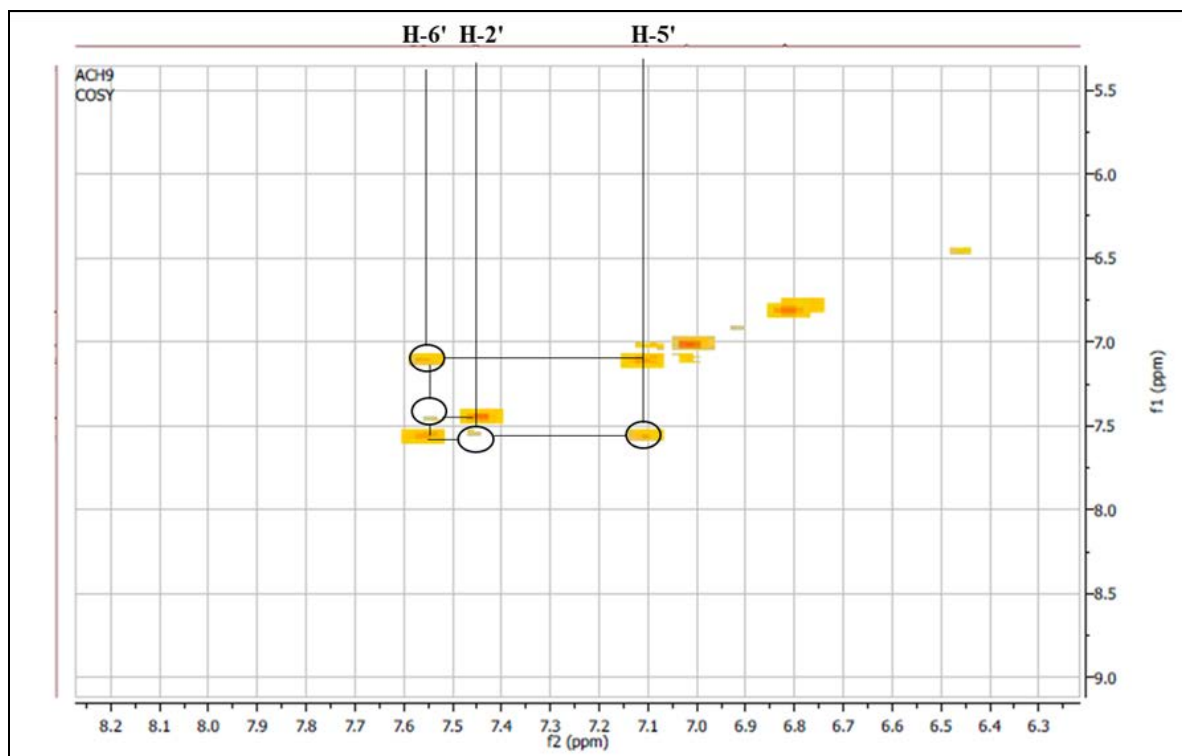
L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre IV.4.8.2**) enregistré dans le DMSO-*d*₆, montre bien qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12,96$ ppm attribuable au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- Un doublet de doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,57$ ppm ($J = 8,8 ; 2,4$ Hz), attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,45$ ppm ($J = 2,4$ Hz), attribuable au proton H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,11$ ppm ($J = 8,8$ Hz), attribuable au proton H-5'.
- deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7,02$ et $6,82$ ppm attribuables à H-3 et H-8 (car la position C-6 est oxygénée).
- deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 3,88$ et $3,78$ ppm, indiquant la présence de deux groupements méthoxyles.



Spectre IV.4.8.2 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé LIN-9

L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (**Spectre IV.4.8.3**) confirme les couplages et les attributions des protons H-5', H-6' et H-2'.



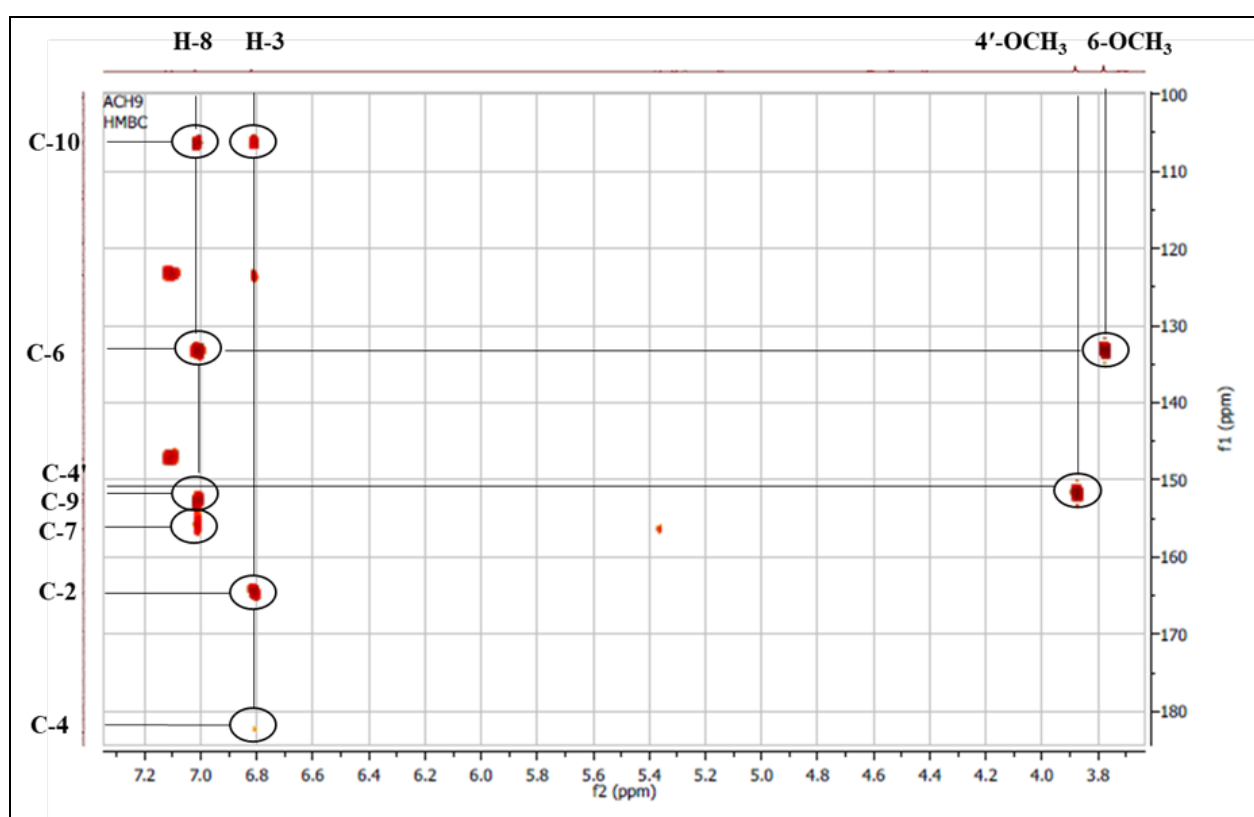
Spectre IV.4.8.3 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9, étalement

Le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.4**) montre une tache de corrélation entre le proton à $\delta_H = 6,82$ ppm et le carbone à $\delta_C = 182,8$ ppm caractéristique au carbone du groupement carbonyle C-4 de la flavone, ce qui permet l'attribution de ce proton à H-3. Donc le proton repéré à $\delta_H = 7,02$ ppm ne peut être que le H-8. Grâce au spectre HSQC (**Spectre IV.4.8.5**), le C-3 et le C-8 sont localisés à $\delta_C = 103,9$ ppm et à $\delta_C = 94,8$ ppm, respectivement.

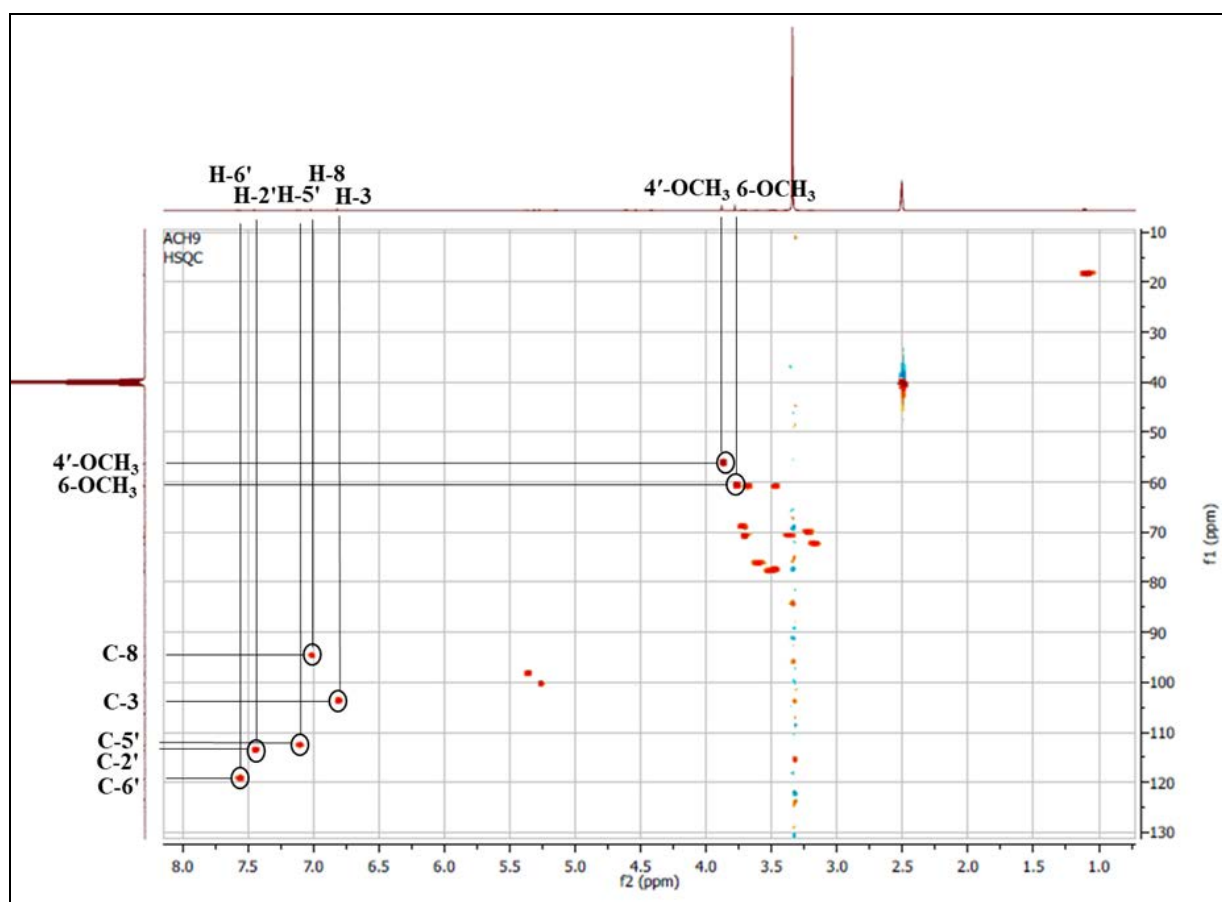
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (**Spectre IV.4.8.4**), le H-3 montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 164,6$ ppm ce qui permet son attribution à C-2.

Toujours sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.4**), le H-8 montre deux taches de corrélation avec deux carbones quaternaires oxygénés à $\delta_C = 156,3$ et $152,6$ ppm attribuables à C-7 et C-9, respectivement. Sur le même spectre, le H-8 montre deux autres taches de corrélations :

- Une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 106,3$ ppm attribuable à C-10, ceci est confirmé par le fait qu'on observe sur le même spectre HMBC (Spectre IV.4.8.4), que ce carbone montre une tache de corrélation avec le H-3.
- Une autre tache de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 133,3$ ppm qui ne peut être que le C-6. Par ailleurs et toujours sur le même spectre HMBC (Spectre IV.4.8.4), le C-6 montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,78$ ppm ($\delta_C = 60,7$ ppm), ce qui permet la localisation de ce méthoxyle en C-6, est l'oxygénation située en position 6 déduite de l'analyse UV est donc dû à une méthylation à cette position.



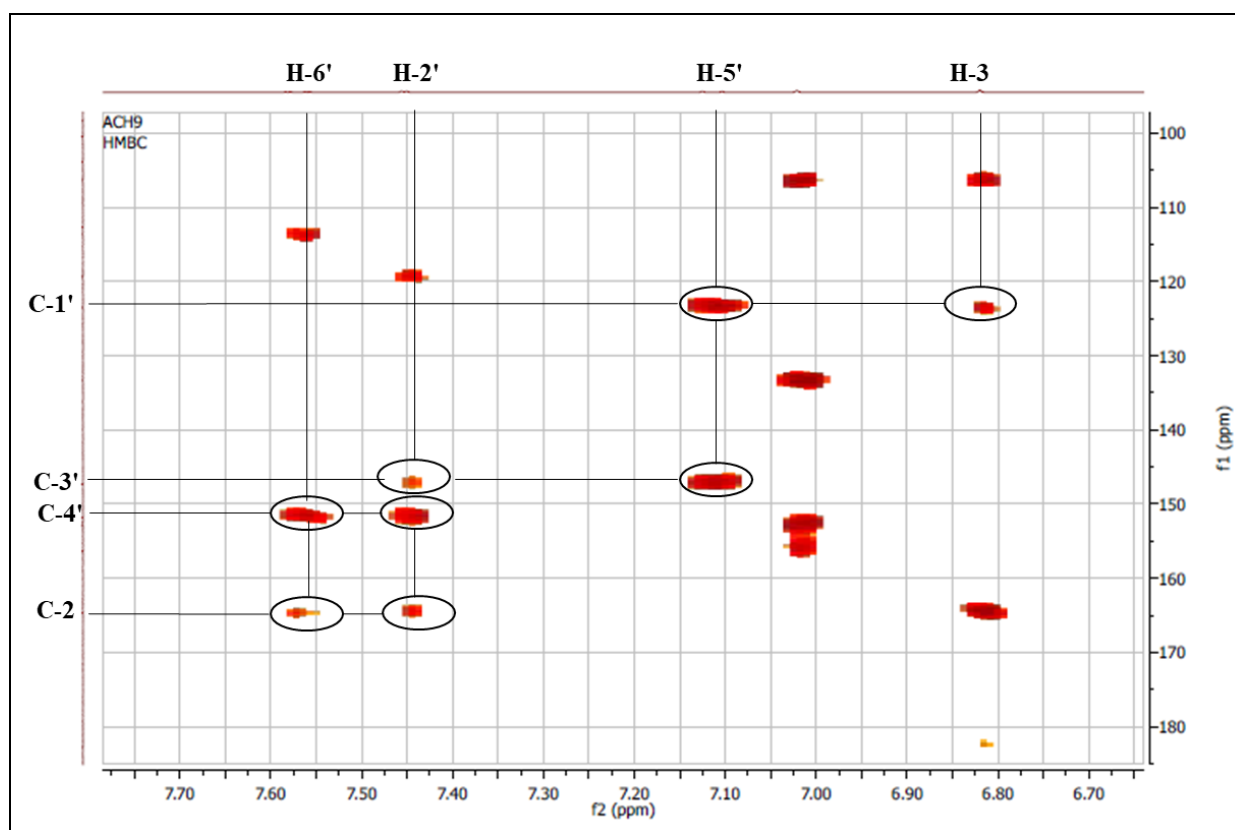
Spectre IV.4.8.4 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé LIN-9, étalé



Spectre IV.4.8.5 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9

L'examen du spectre relatif à l'expérience HSQC (**Spectre IV.4.8.5**) permet la localisation des carbones C-5', C-2' et C-6' à $\delta_C = 112,6$; $113,6$ et $119,3$ ppm, respectivement. L'attribution des autres carbones du cycle B est réalisée à cause des corrélations des protons H-5', H-2' et H-6' sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.6**) comme suit :

- la corrélation entre H-5' et le carbone à $\delta_C = 123,5$ ppm permet son attribution au carbone C-1', cette attribution est confirmée sur le même spectre qui montre une corrélation entre ce carbone est le H-3. la corrélation entre le H-5' et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 147,3$ ppm permet l'attribution de ce carbone à C-3'.
- les corrélations entre H-6' et H-2' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 151,8$ ppm permettent son attribution à C-4', ce dernier montre sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.4**) une tache de corrélation avec les protons du deuxième groupement méthoxyle ($\delta_H = 3,88$ ppm, $\delta_C = 56,3$ ppm) ce qui permet sa localisation sur cette position (C-4'). Ces deux protons (H-6' et H-2') montrent également des corrélations avec le C-2 à $\delta_C = 164,6$ ppm confirmant ainsi son attribution.

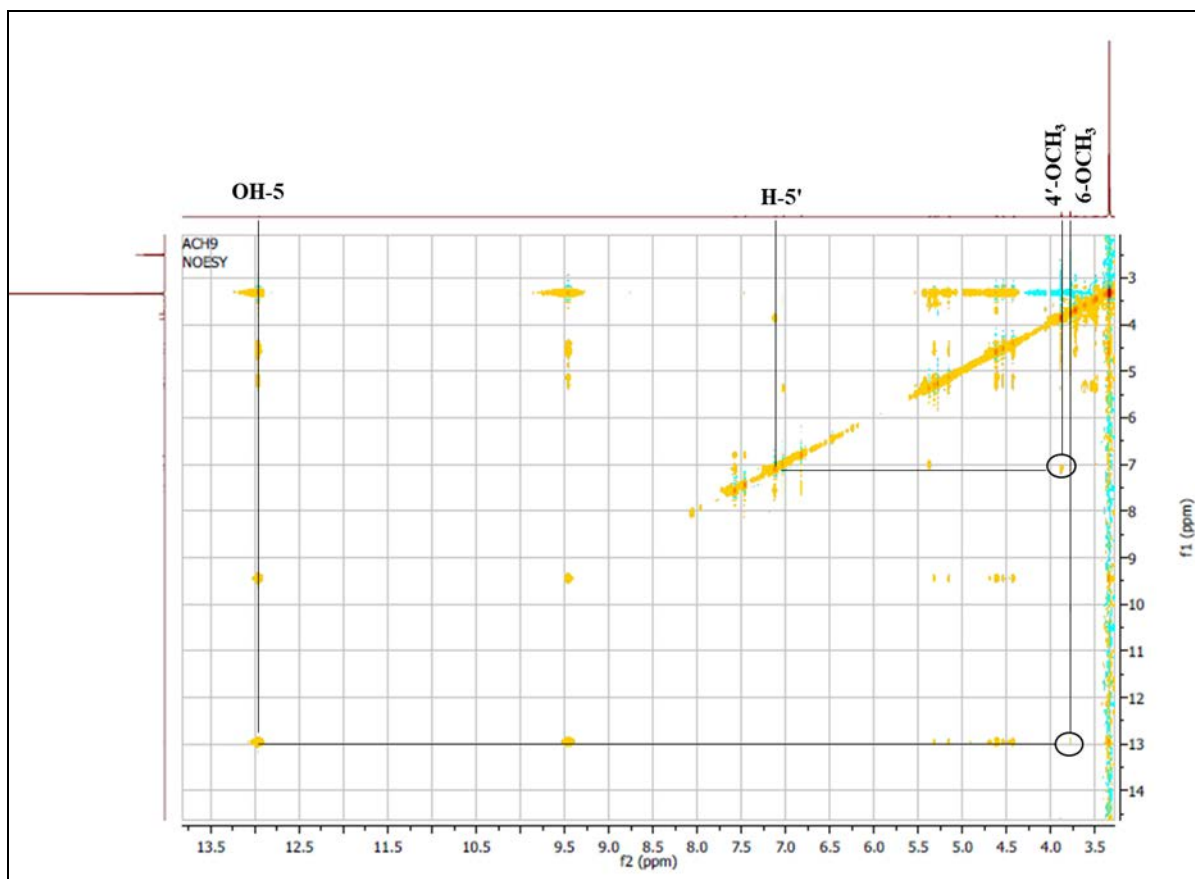


Spectre IV.4.8.6 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9, étalement

Le carbone C-5 est localisé à $\delta_C = 153,0$ ppm, car c'est le seul carbone quaternaire non attribué dans la zone des carbones oxygénés de la flavone.

La localisation des deux méthoxyles est confirmée par le spectre NOESY (**Spectre IV.4.8.7**) qui montre :

- une tache de corrélation entre le méthoxyle à $\delta_H = 3,88$ ppm et le proton H-5' confirme sa localisation sur le C-4'.
- une tache de corrélation entre le méthoxyle à $\delta_H = 3,78$ ppm et le proton du groupement hydroxyle situé en position 5 confirme sa localisation sur le C-6, cette observation confirme bien que le signal à $\delta_H = 7,02$ ppm correspond à H-8 et n'en pas à H-6.



Spectre IV.4.8.7 : Spectre NOESY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9

A ce stade de notre analyse, la structure proposée pour le composé LIN-9 est représentée dans la **Figure IV.16**.

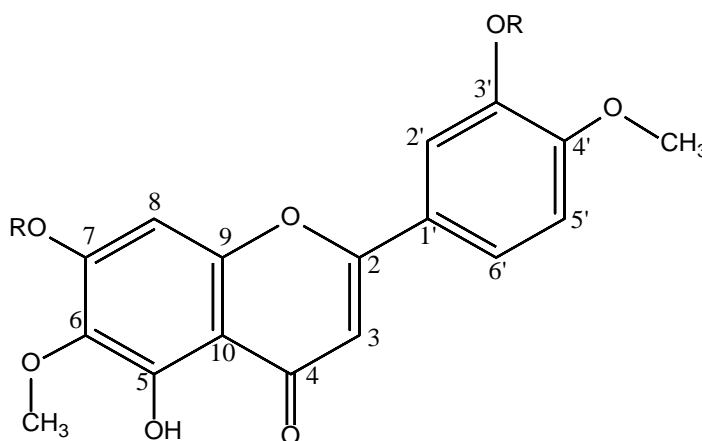
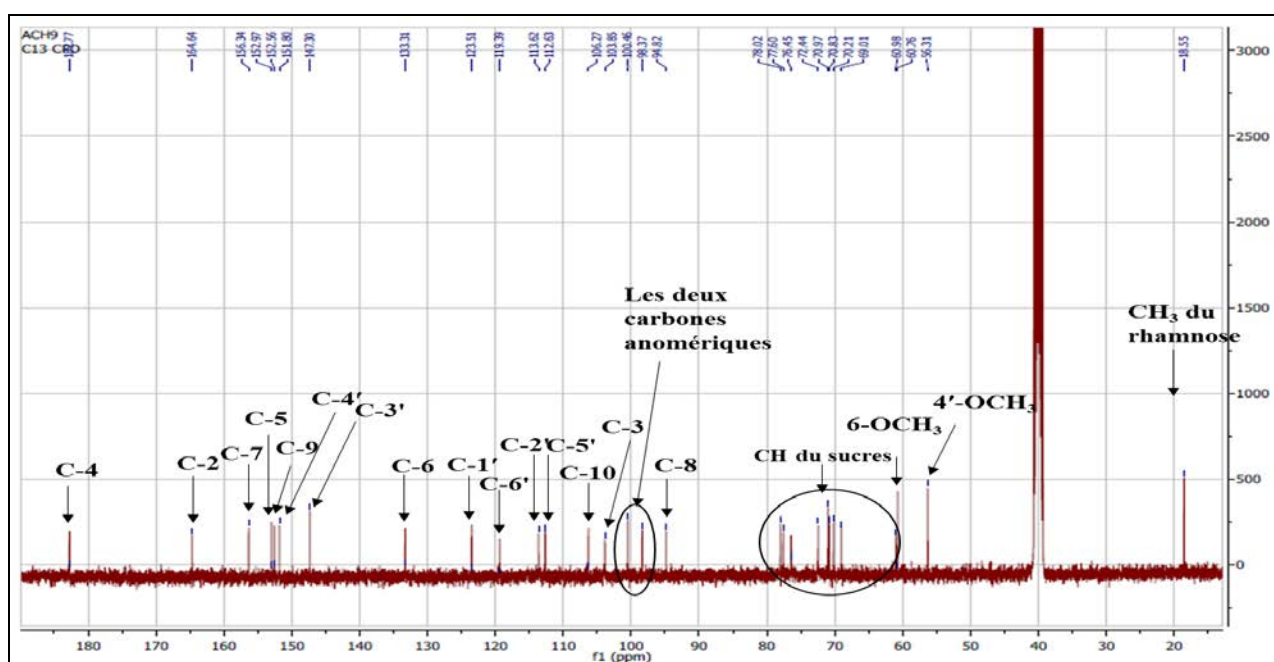


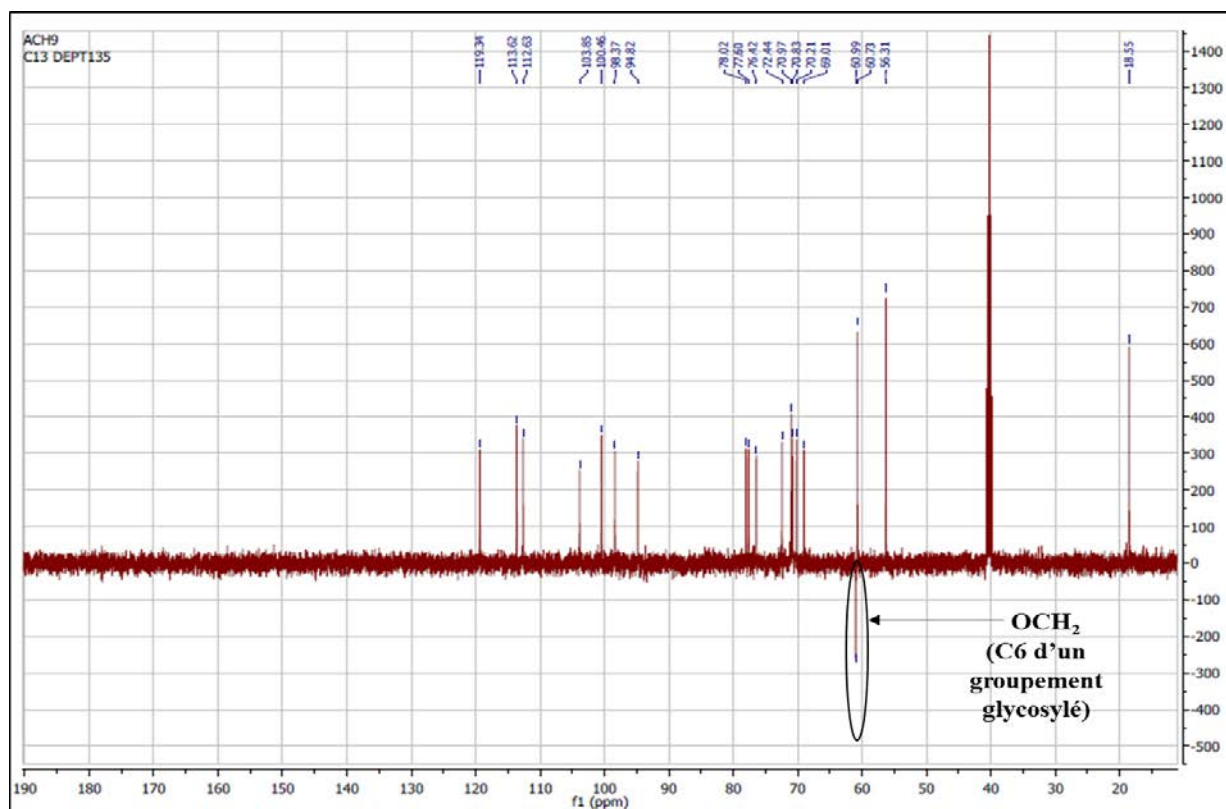
Figure IV.16 : Structure partielle du composé LIN-9

Les résultats des signaux RMN ^1H et RMN ^{13}C attribués à ce stade de notre analyse sont rassemblés dans le **Tableau IV.12**.

Tableau IV.12 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C

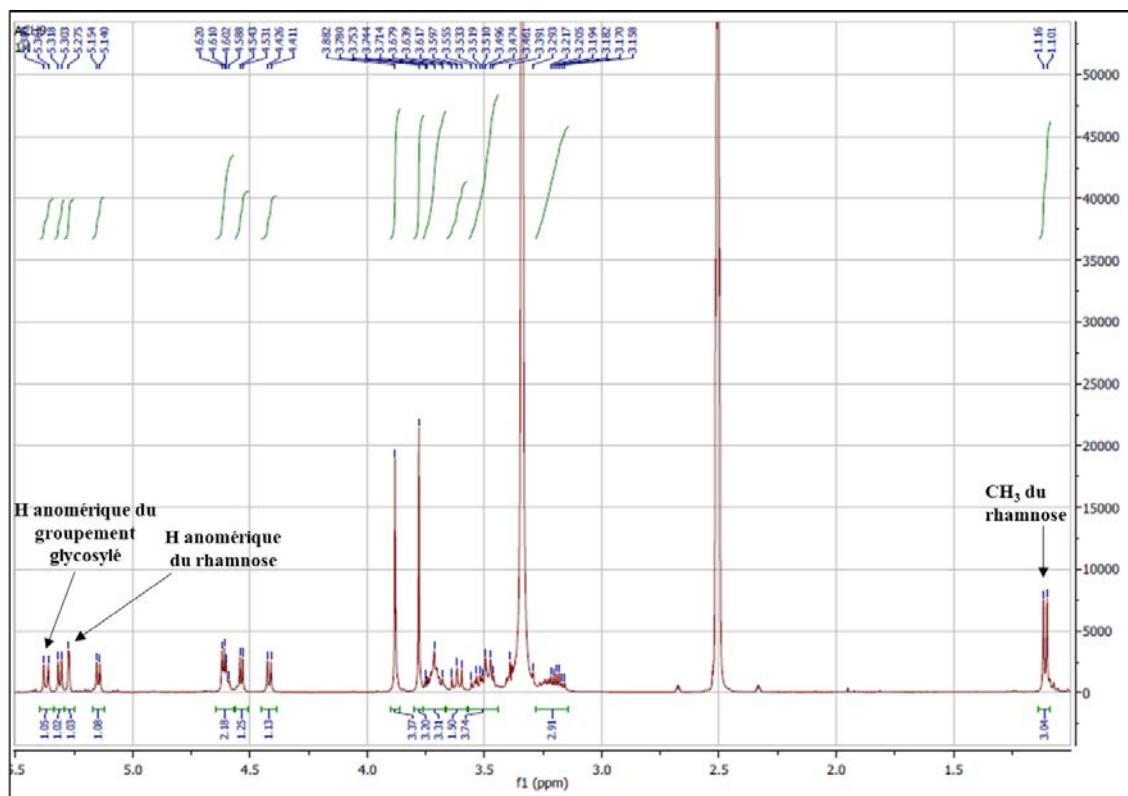
δ_{H} (ppm)	J (Hz)	Intégration	δ_{C} (ppm)	Attribution des carbones
-	-	-	164,6	C-2
6,82 <i>s</i>	-	1H	103,9	C-3
-	-	-	182,8	C-4
-	-	-	153,0	C-5
-	-	-	133,3	C-6
-	-	-	156,3	C-7
7,02 <i>s</i>	-	1H	94,8	C-8
-	-	-	152,6	C-9
-	-	-	106,3	C-10
-	-	-	123,5	C-1'
7,45 <i>d</i>	2,4	1H	113,6	C-2'
-	-	1H	147,3	C-3'
-	-	-	151,8	C-4'
7,11 <i>d</i>	8,8	1H	112,6	C-5'
7,57 <i>dd</i>	8,8 ; 2,4	1H	119,3	C-6'
3,78 <i>s</i>	-	3H	60,7	6-OCH ₃
3,88 <i>s</i>	-	3H	56,3	4'-OCH ₃

Spectre IV.4.8.8 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9

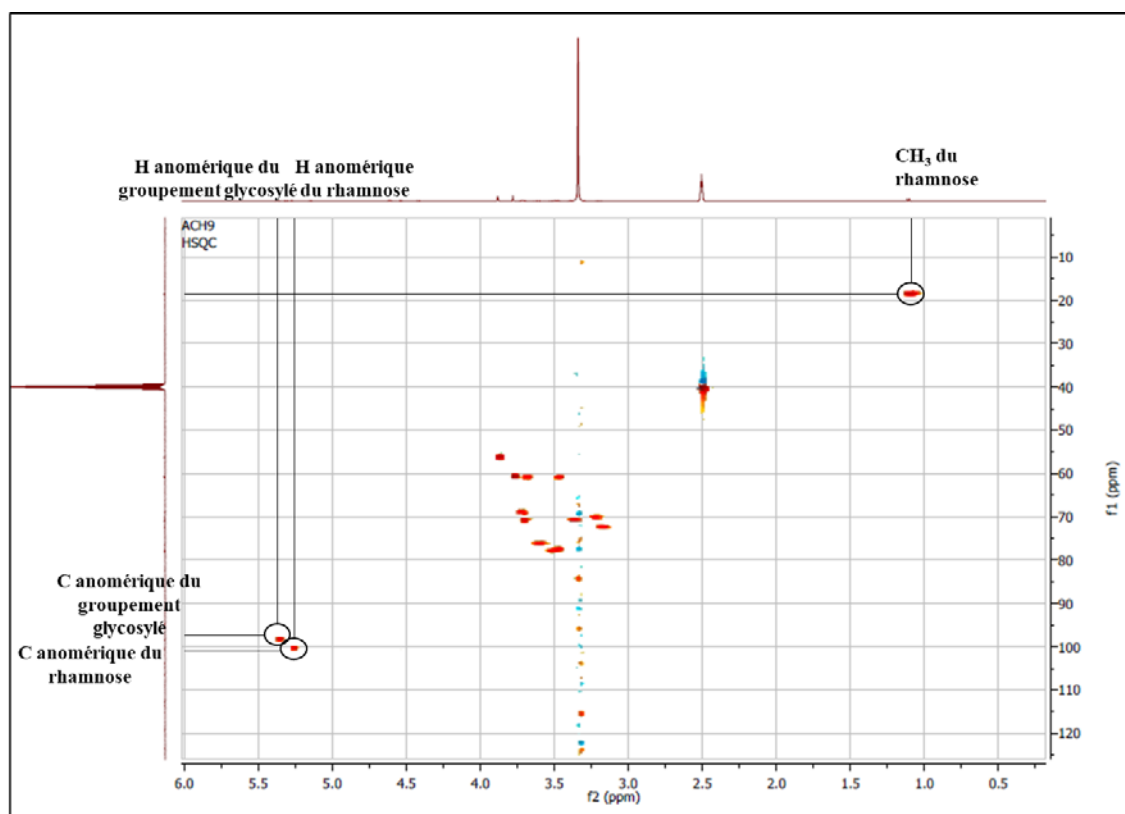


Spectre IV.4.8.9 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-9

Le spectre RMN ¹H (**Spectre IV.4.8.10**) indique la présence de deux protons anomériques, le premier sous forme d'un doublet ($J = 7,6$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta_H = 5,37$ ppm ($\delta_C = 98,4$ ppm), dont la valeur de la constante de couplage est en faveur d'une configuration β , et la valeur du déplacement chimique indique une jonction *O*-glycosylé. Et le second sous forme d'un singulet large à $\delta_H = 5,28$ ppm ($\delta_C = 100,5$ ppm) attribuable au proton anomérique d'un groupement rhamnosyl avec une configuration α , le méthyl caractéristique de ce rhamnose est localisé à $\delta_H = 1,10$ ppm (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, $\delta_C = 18,6$ ppm).

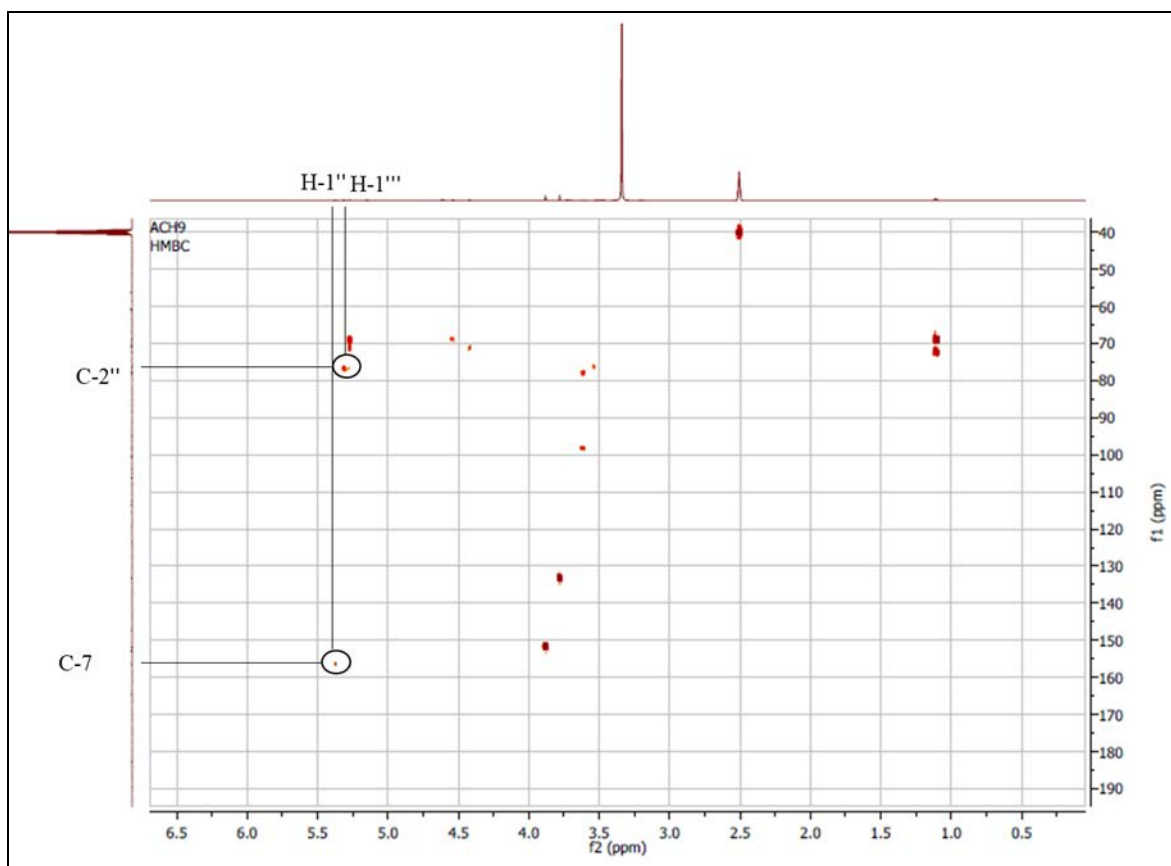


Spectre IV.4.8.10 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-9, étalement



Spectre IV.4.8.11 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-9

Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.12**), le C-7 montre une tache de corrélation avec le proton anomérique du premier groupement glycosylé, ce qui permet la localisation de ce sucre sur le C-7, et son carbone anomérique prendra donc la position C-1'', la position du carbone anomérique du rhamnose sera alors C-1'''.



Spectre IV.4.8.12 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9, étalement

Les autres carbones des deux entités glycosidiques sont attribués grâce à une étude simultanée des spectres COSY (**Spectre IV.4.8.13**) et HSQC (**Spectre IV.4.8.14**).

Pour le premier sucre :

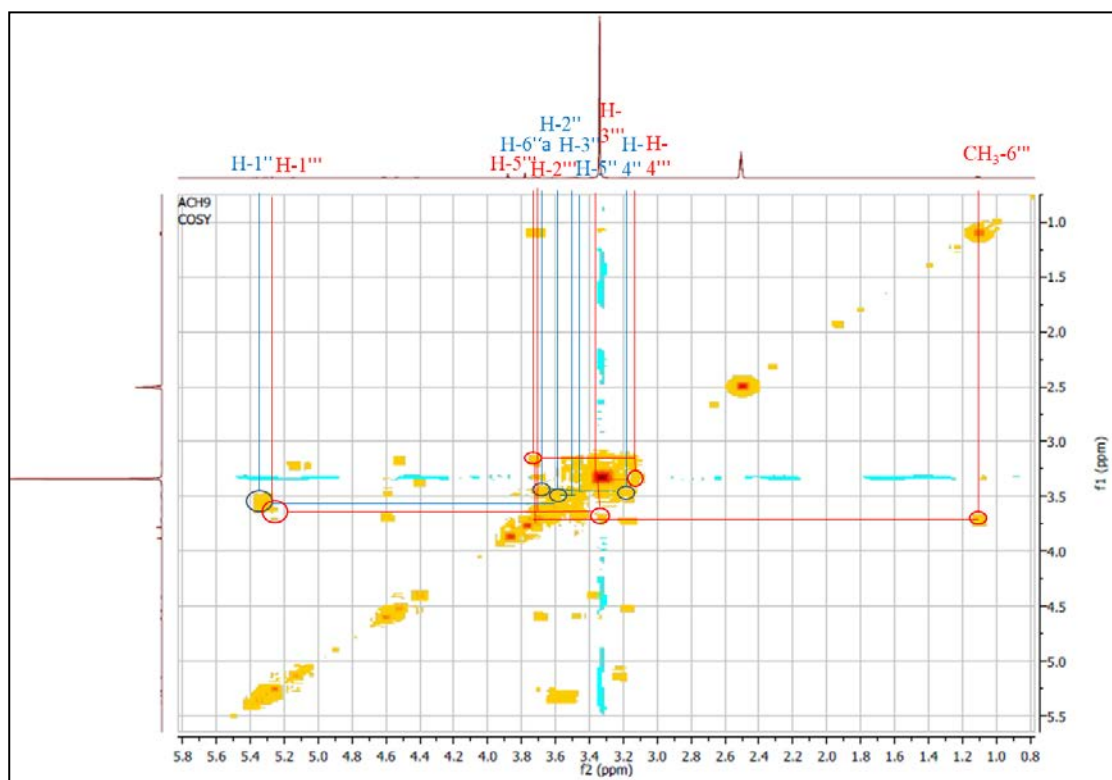
- le C-2'' est localisé à $\delta_C = 76,5$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le H-1'' sur le spectre COSY.
- le C-3'' est localisé à $\delta_C = 78,0$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le H-2'' sur le spectre COSY.

- Le C-4'' est plus facilement localisé à $\delta_C = 70,2$ ppm grâce à la corrélation entre son proton et le H-5'', le carbone de ce dernier est localisé à $\delta_C = 77,6$ ppm grâce à la corrélation entre son proton et le H-6''a.
- Le DEPT 135° (**Spectre IV.4.8.9**) montre clairement que le signal à $\delta_C = 61,0$ ppm correspond à un O-CH₂ attribué à C-6''.

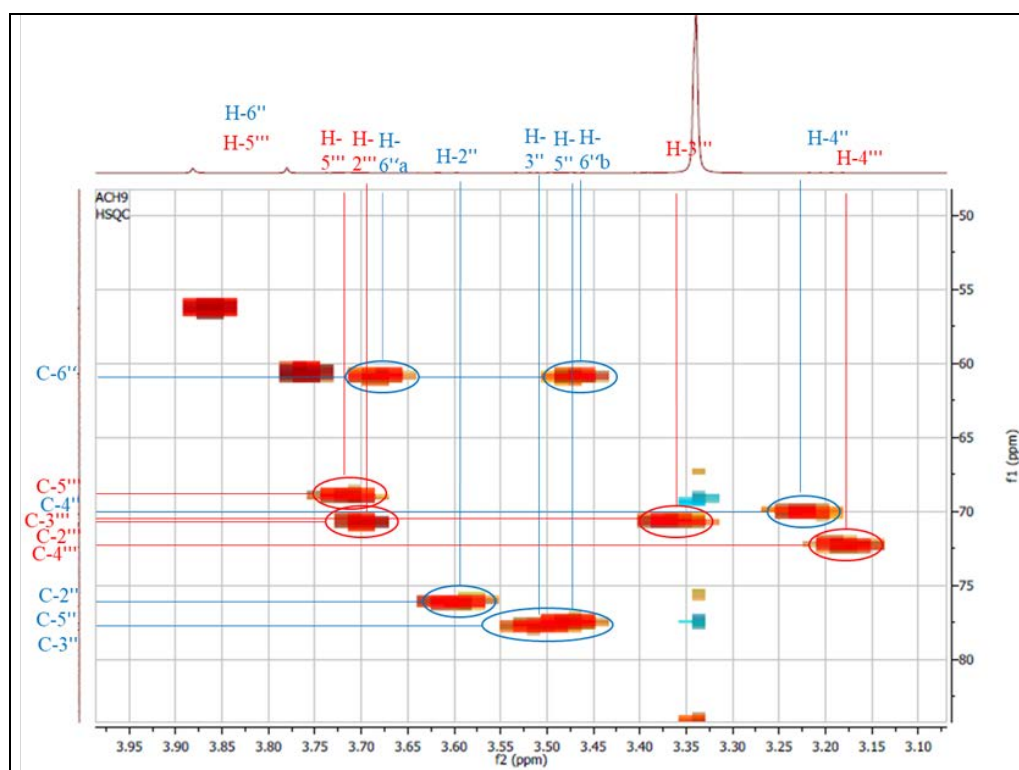
La comparaison des déplacements chimiques des carbones attribués avec ceux de la littérature [3], indique que ce groupement glycosylé est le glucose.

Les carbones du groupement rhamnosyle sont attribués comme suit :

- Le C-5''' est localisé à $\delta_C = 69,0$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le CH₃-6''' sur le spectre COSY.
- Le C-4''' est localisé à $\delta_C = 72,4$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le H-5''' sur le spectre COSY.
- Le C-3''' est localisé à $\delta_C = 70,8$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le H-4''' sur le spectre COSY.
- Le C-2''' est localisé à $\delta_C = 71,0$ ppm, grâce à la corrélation entre son proton et le H-3''' sur le spectre COSY.



Spectre IV.4.8.13 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9, étalement



Spectre IV.4.8.14 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-9, étalement

Le déplacement chimique bas du C-6'' a permis d'écarter la possibilité de localiser le rhamnose dans cette position, cela est confirmé par le spectre HMBC (**Spectre IV.4.8.12**) qui montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1''' du rhamnose et le carbone à $\delta_C = 76,5$ ppm correspond à C-2'' indiquant ainsi la localisation du rhamnose dans cette position.

L'ensemble de nos données mène à la structure représentée dans la **Figure IV.17**

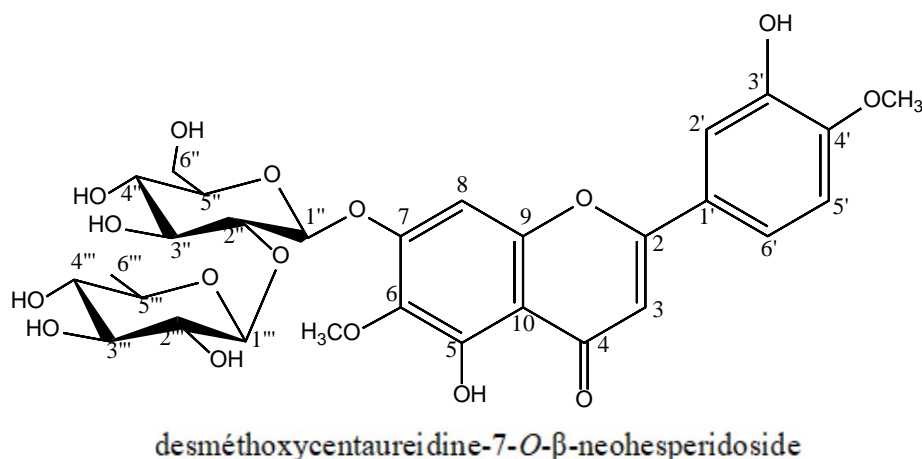


Figure IV.17 : Structure du composé LIN-9

Les données relatives au spectre RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportée dans le **Tableau IV.13**.

Tableau IV.13 : Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé LIN-9

position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)	position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)
2	164,6	-	-	1''	98,4	5,37 <i>d</i>	7,6
3	103,9	6,82 <i>s</i>	-	2''	76,5	3,61 <i>m</i>	-
4	182,8	-	-	3''	78,0	3,52 <i>m</i>	-
5	153,0	-	-	4''	70,2	3,19 <i>m</i>	-
6	133,3	-	-	5''	77,6	3,47 <i>m</i>	-
7	156,3	-	-	6''	61,0	3,47 <i>m</i>	-
						3,69 <i>m</i>	-
8	94,8	7,02 <i>s</i>	-	1'''	100,5	5,28 <i>sl</i>	-
9	152,6	-	-	2'''	71,0	3,70 <i>m</i>	-
10	106,3	-	-	3'''	70,8	3,36 <i>m</i>	-
1'	123,5	-	-	4'''	72,4	3,17 <i>m</i>	-
2'	113,6	7,45 <i>d</i>	2,4	5'''	69,0	3,73 <i>m</i>	-
3'	147,3	-	-	6'''	18,6	1,10 <i>d</i>	6,0
4'	151,8	-	-	4'-OMe	56,3	3,88 <i>s</i>	-
5'	112,6	7,11 <i>d</i>	8,8	6'-OMe	60,7	3,78 <i>s</i>	-
6'	119,3	7,57 <i>dd</i>	8,8 ; 2,4				

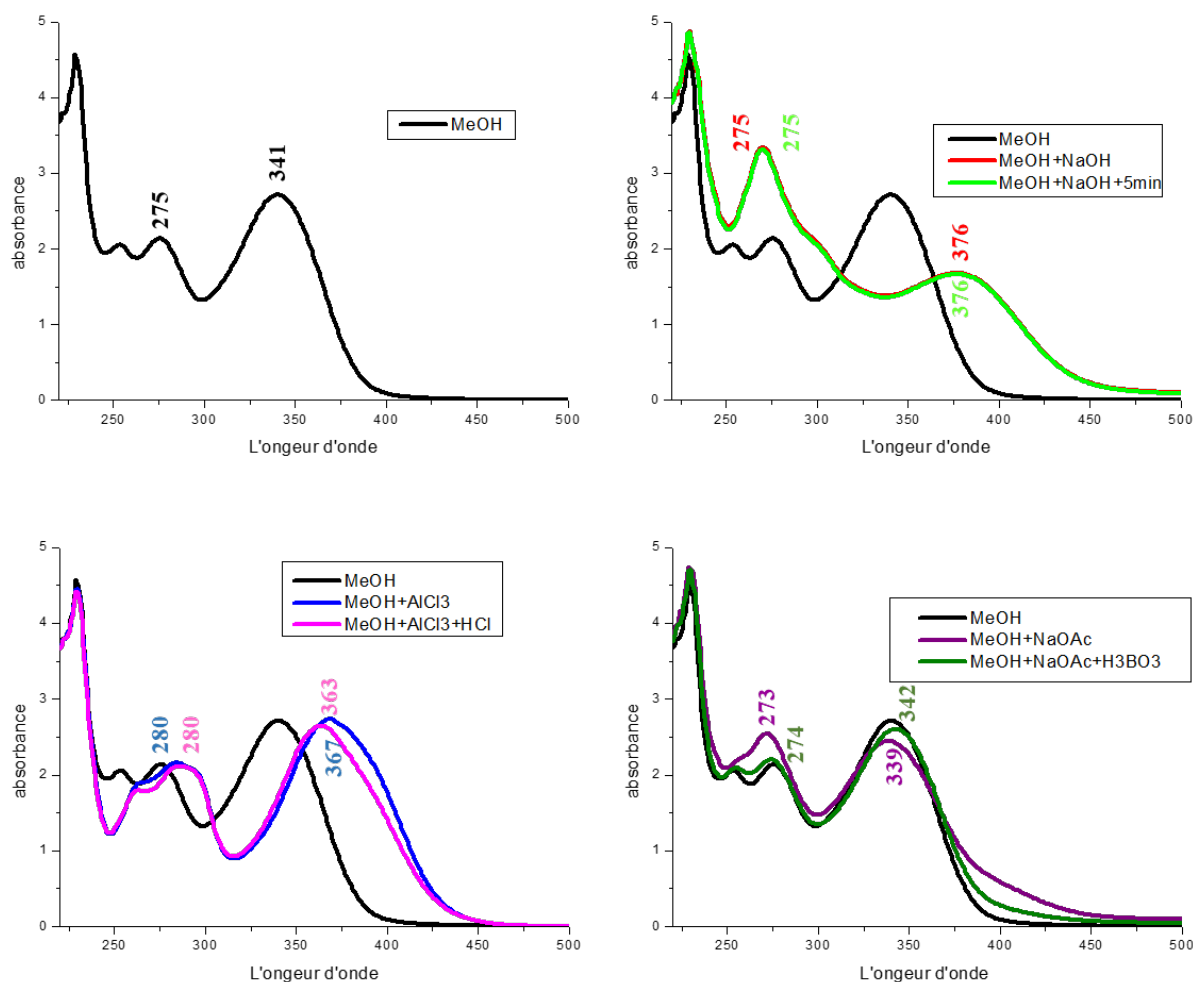
Cette molécule est nouvelle nous la reportons pour la première fois dans la littérature sous le nom desméthoxycentaureidine-7-*O*- β -neohesperidoside, (4',6-diméthoxy-3',5-dihydroxy-7-*O*- β -neohesperidoside flavone).

IV.4.9. Elucidation structurale du composé 9 (LIN-10)

Le composé LIN-10 a été obtenu sous forme d'une poudre de couleur jaune. Il a une fluorescence noire violette sous la lumière de Wood indiquant ainsi qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

L'examen de la série spectrale UV du composé LIN-10 permet de tirer les indications suivantes :

- le spectre UV enregistré dans le méthanol indique la présence de deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique, la bande I à $\lambda = 341$ nm et la bande II à $\lambda = 270$ nm orientant ainsi vers un squelette de type flavone.
- L'addition du réactif NaOH conduit à un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +36$ nm) de la bande I avec une diminution de l'intensité par rapport au spectre enregistré dans le méthanol ce qui prouve la présence d'un OR (R \neq H) en C-4'. l'absence d'un OH libre en position 7 est déduite à cause de l'absence d'une nouvelle bande. Cela est confirmé par l'enregistrement du spectre après ajout du NaOAc qui indique l'absence d'un déplacement bathochrome de la bande II comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indiquant ainsi la présence d'un OR (R \neq H) en position 7.
- L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I par comparaison des deux spectres enregistrés dans AlCl_3 et $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ indique l'absence d'un système ortho di OH sur le cycle B. cela est confirmé par l'absence d'un déplacement bathochrome de la bande I du spectre enregistré dans le milieu ($\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaOAc}$) par rapport à celui enregistré dans le méthanol, cette dernière indique aussi l'absence d'un système ortho di-OH sur le cycle A.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +22$ nm) du spectre enregistré dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport à celui enregistré dans le méthanol montre la présence d'un OH en position 5 avec une oxygénation en position 6.

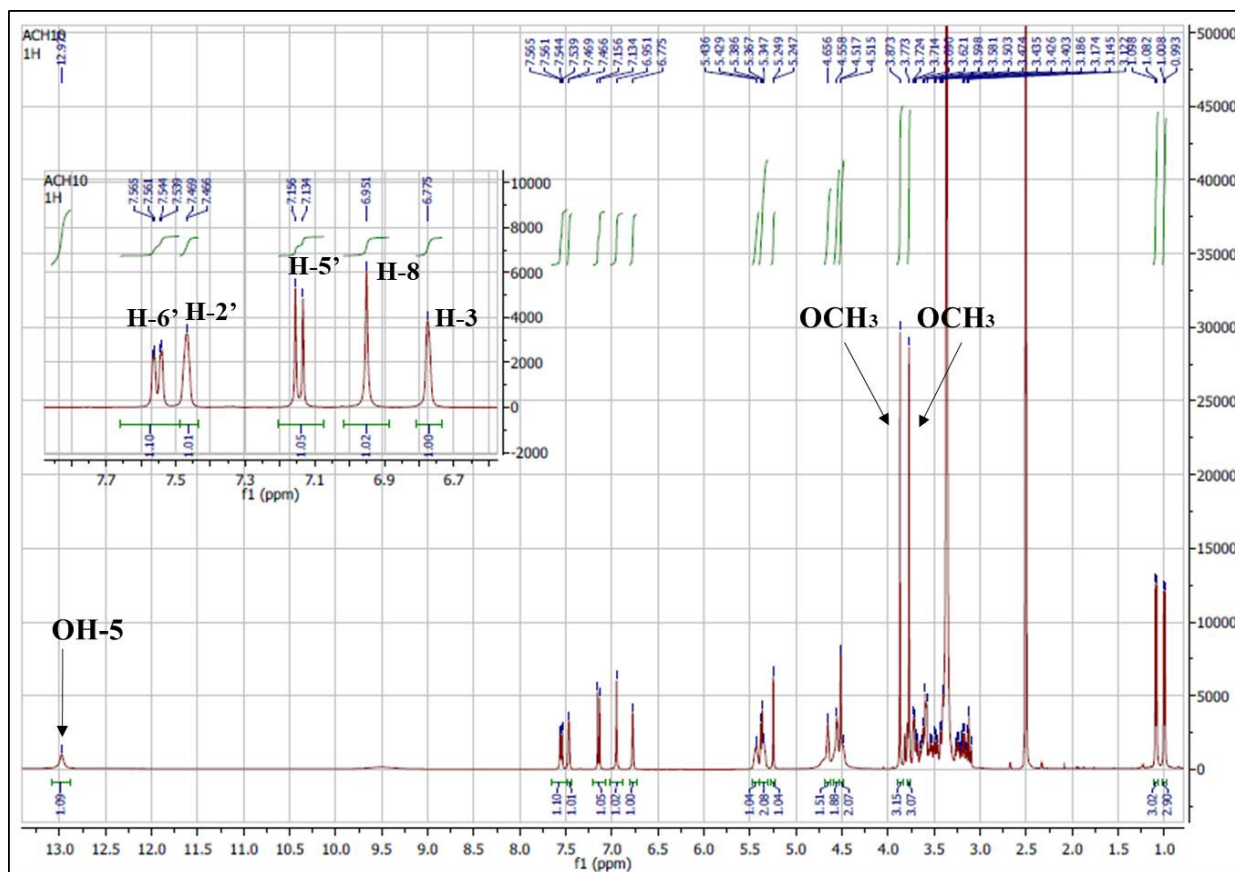


Spectre IV.4.9.1 : La série spectrale UV du composé LIN-10

L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre IV.4.9.2**) enregistré dans le DMSO-*d*₆, indique bien que ce composé a une structure très similaire à celle du composé LIN-9, il montre en effet :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12,96$ ppm attribuable au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- Un doublet de doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm ($J = 8,8 ; 1,2$ Hz), attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,47$ ppm ($J = 1,2$ Hz), attribuable au proton H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,15$ ppm ($J = 8,8$ Hz), attribuable au proton H-5'.

- deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 6,95$ et $6,78$ ppm attribuables à H-3 et H-8 (car la position C-6 est oxygénée).
- deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 3,87$ et $3,77$ ppm, indiquant la présence de deux groupements méthoxyles.

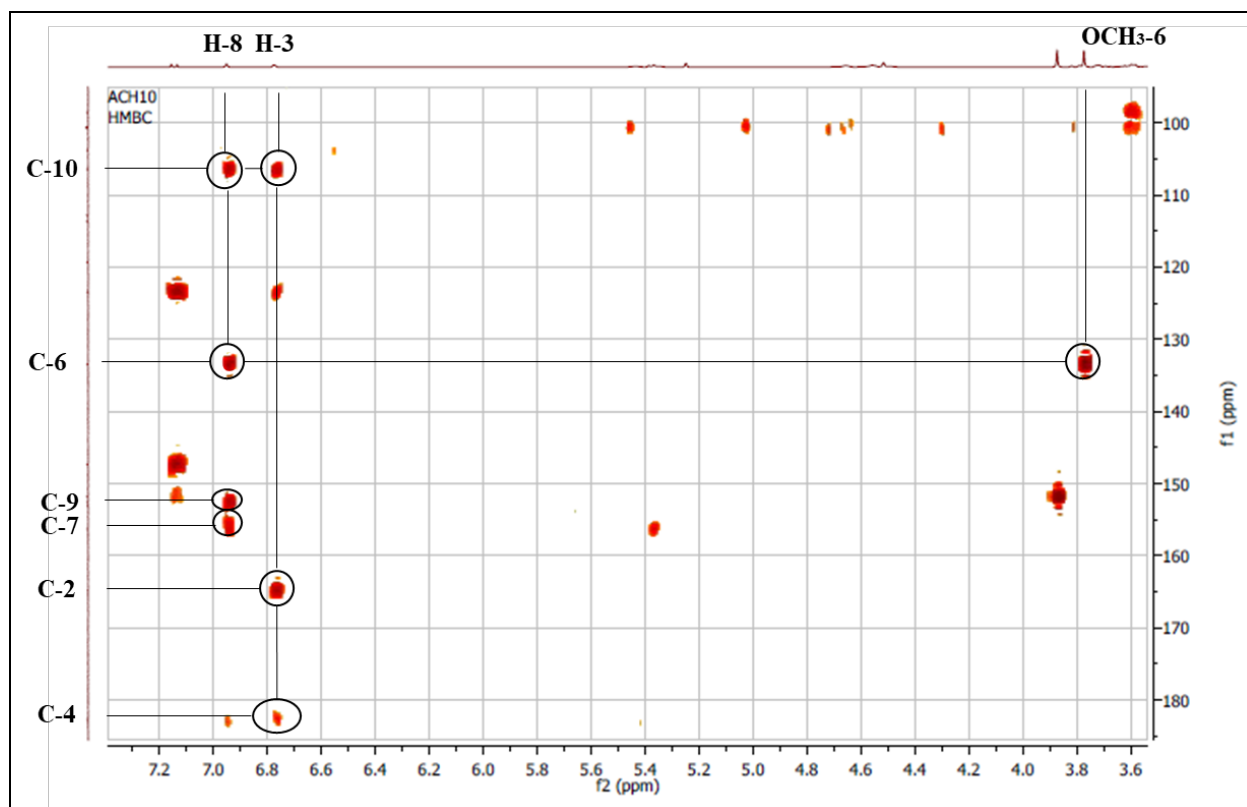


Spectre IV.4.9.2 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10

Le proton localisé à $\delta_H = 6,78$ ppm montre sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.3**), une tache de corrélation avec le carbone du carbonyle C-4 repéré à $\delta_C = 182,7$ ppm, ce qui permet son attribution à H-3, donc l'autre singulet repéré à $\delta_H = 6,95$ ppm et celui de H-8. Le H-3 montre également des corrélations avec les carbones à $\delta_C = 164,8$ et $106,4$ ppm attribuable à C-2 et C-10, respectivement.

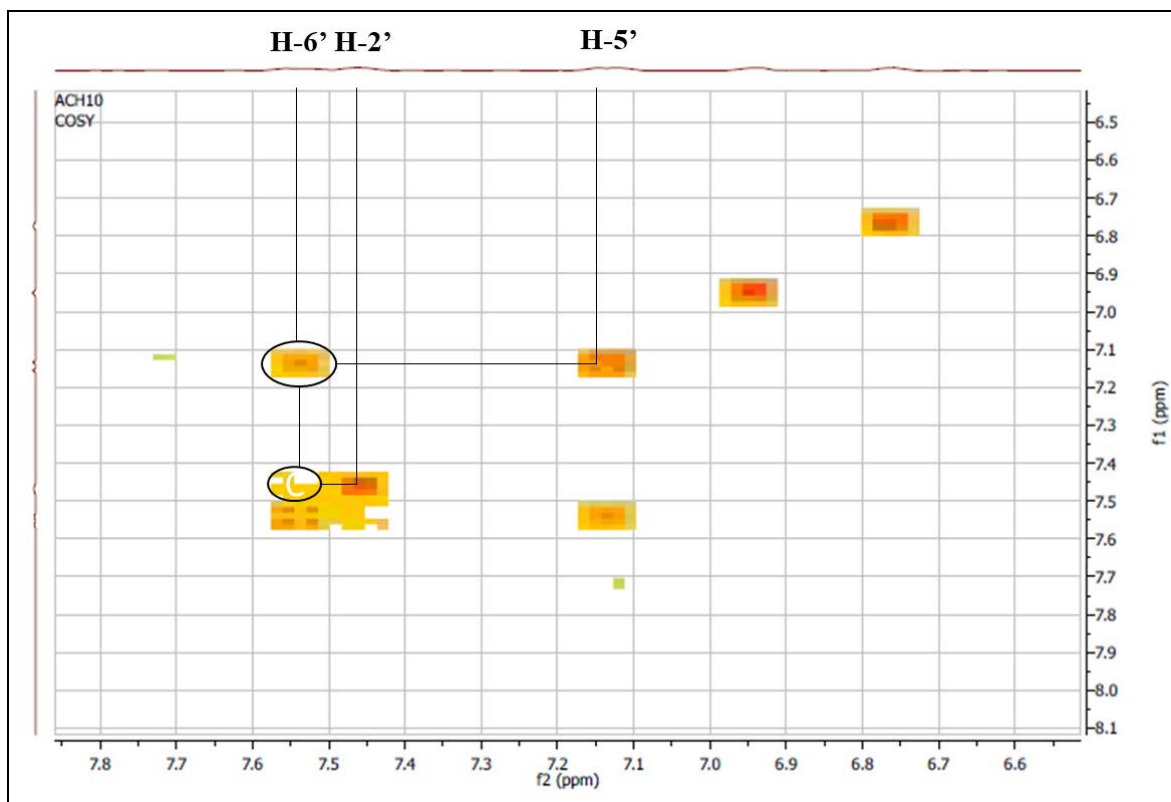
La corrélation de H-8 sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.3**) avec le C-10 à $\delta_C = 106,4$ ppm confirme l'attribution de ce dernier. Sur le même spectre, le H-8 montre des corrélations avec deux carbones quaternaires oxygénés, la première avec le carbone à $\delta_C = 152,5$ ppm attribuable à C-9, et la seconde avec un carbone plus déblindé à $\delta_C = 156,3$ ppm qui ne peut être que le C-7. Toujours sur le spectre HMBC, le H-8 montre une tache de

corrélation avec un carbone à $\delta_C = 133,5$ ppm, ce dernier montre une tache de corrélation sur le même spectre avec un méthoxyle ($\delta_H = 3,77$ ppm, $\delta_C = 60,8$ ppm) donc ce carbone ne peut être que le C-6 et l'oxygénation déduite de l'analyse spectrophotométrique est donc une méthylation de cette position.



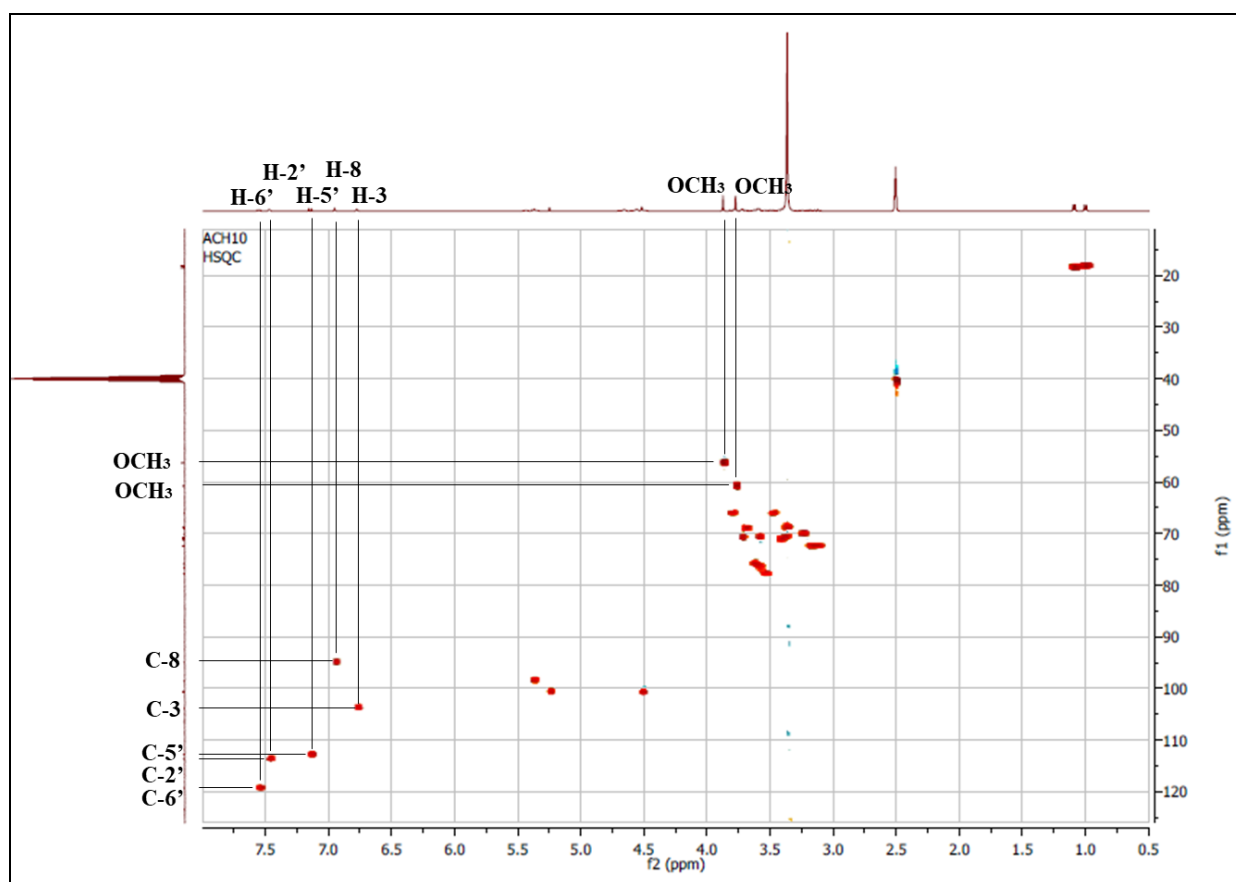
Spectre IV.4.9.3 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement

L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (**Spectre IV.4.9.4**) confirme les couplages et les attributions des protons H-5', H-6' et H-2'.



Spectre IV.4.9.4 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement

La localisation des carbones C-8, C-3, C-5', C-2' et C-6' est réalisée grâce au spectre HSQC (Spectre IV.4.9.5) à $\delta_C = 94,9$; 103,8 ; 112,8 ; 113,7 et 119,3 ppm, respectivement.

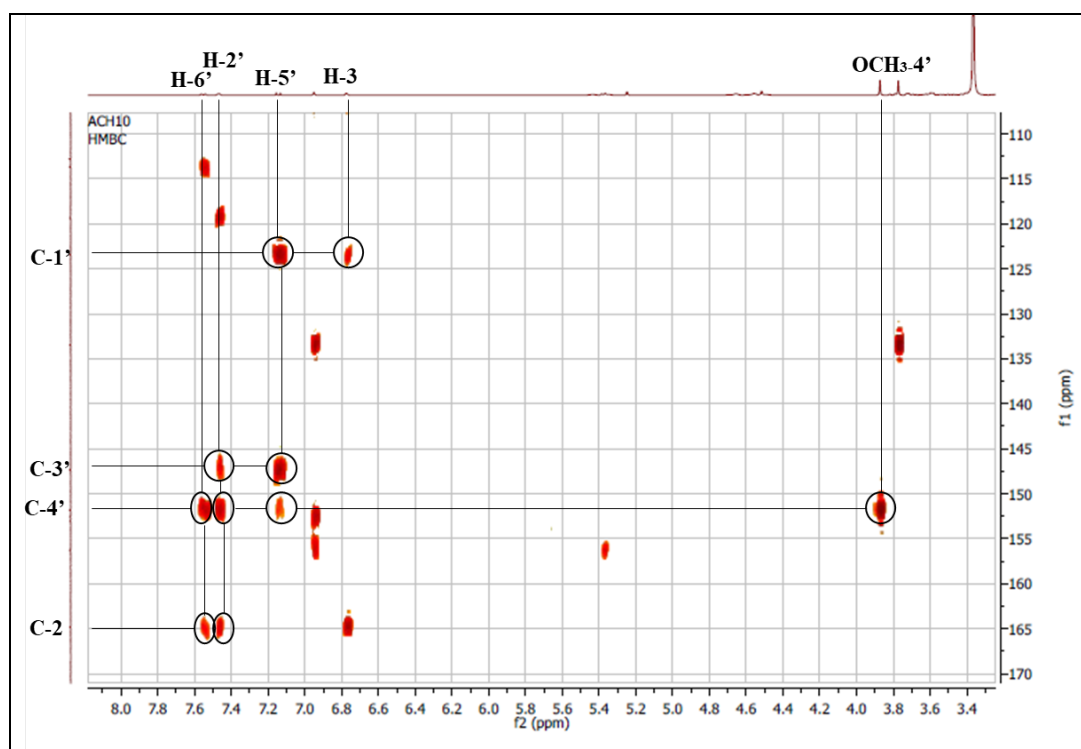


Spectre IV.4.9.5 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10

Les corrélations des protons H-5', H-2' et H-6' sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.6**) ont permis la localisation des autres carbones quaternaires du cycle B comme suit :

- le C-4' est localisé à $\delta_C = 151,8$ ppm, grâce à ses corrélations avec les protons H-5', H-2' et H-6'. Ce carbone montre une tache de corrélation avec le deuxième groupement méthoxylé ($\delta_H = 3,87$ ppm, $\delta_C = 56,3$ ppm) ce qui permet la localisation de ce dernier sur cette position.
- Le C-3' est localisé à $\delta_C = 147,4$ ppm, grâce à ses corrélations avec les deux protons H-5' et H-2'.
- Le C-1' est localisé à $\delta_C = 123,4$ ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-5', cette attribution est confirmée avec la corrélation entre ce carbone est le H-3.
- Les corrélations des protons H-2' et H-6' avec le C-2 confirment l'attribution de ce dernier.

Le carbone C-5 est localisé à $\delta_C = 153,0$ ppm, car c'est le seul carbone quaternaire non attribué dans la zone des carbones oxygénés de cette flavone.

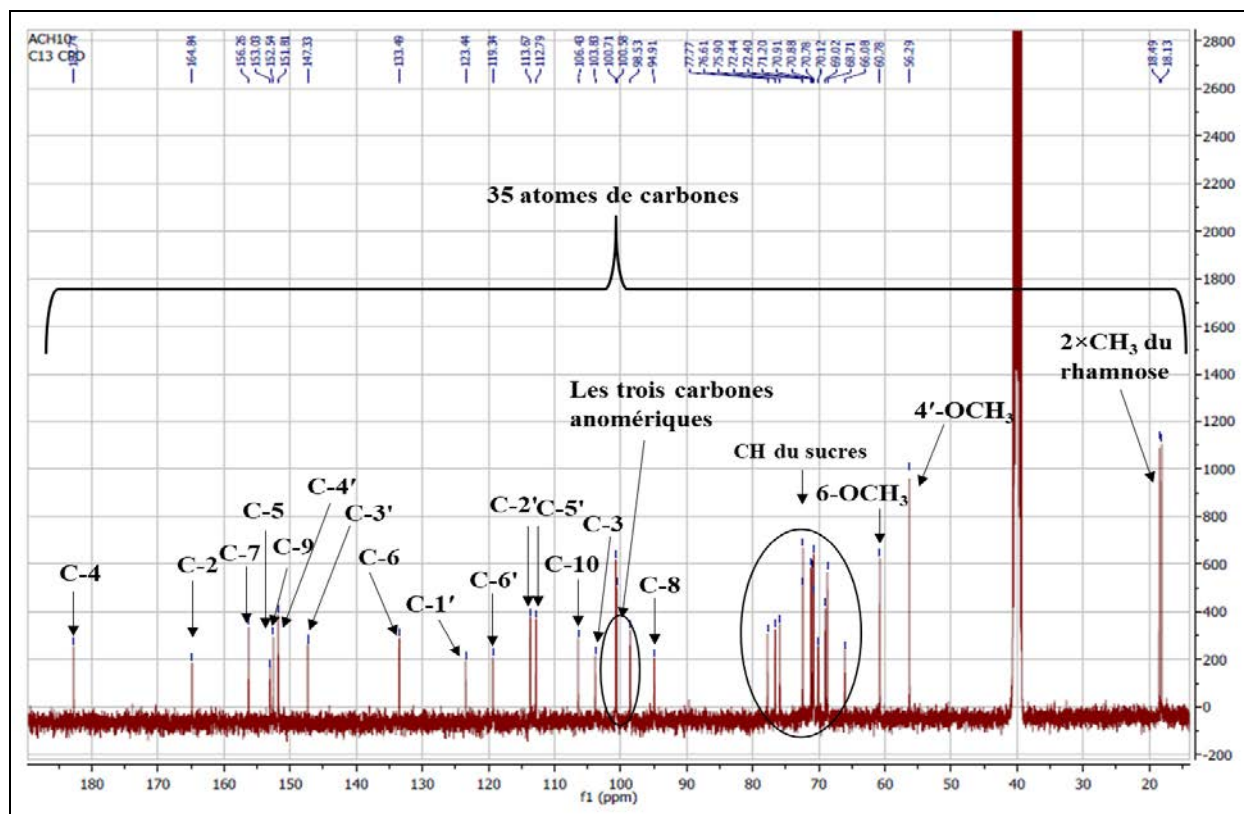


Spectre IV.4.9.6 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement

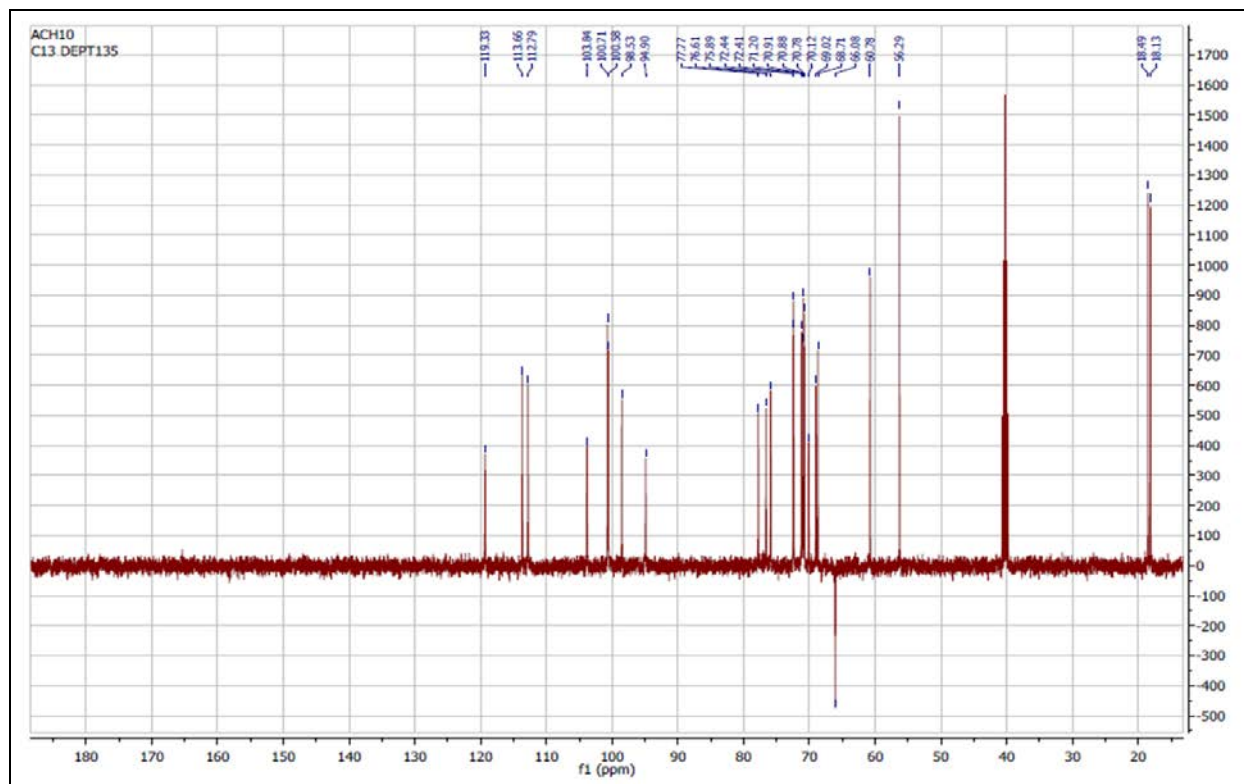
Le **Tableau IV.14** rassemble les résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C attribués à ce stade de notre analyse.

Tableau IV.14 : Tableau récapitulatif des résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C

δ_{H} (ppm)	J (Hz)	Intégration	δ_{C} (ppm)	Attribution des carbones
-	-	1H	164,8	C-2
6,78 <i>s</i>	-	1H	103,8	C-3
-	-	-	182,7	C-4
-	-	-	153,0	C-5
-	-	-	133,5	C-6
-	-	-	156,3	C-7
6,95 <i>s</i>	-	1H	94,9	C-8
-	-	-	152,5	C-9
-	-	-	106,4	C-10
-	-	-	123,4	C-1'
7,47 <i>d</i>	1,2	-	113,7	C-2'
-	-	1H	147,4	C-3'
-	-	-	151,8	C-4'
7,15 <i>d</i>	8,8	1H	112,8	C-5'
7,55 <i>dd</i>	8,8 ; 1,2	1H	119,3	C-6'
3,77 <i>s</i>	-	3H	60,8	6-OCH ₃
3,87 <i>s</i>	-	3H	56,3	4'-OCH ₃



Spectre IV.4.9.7 : Spectre RMN¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-10

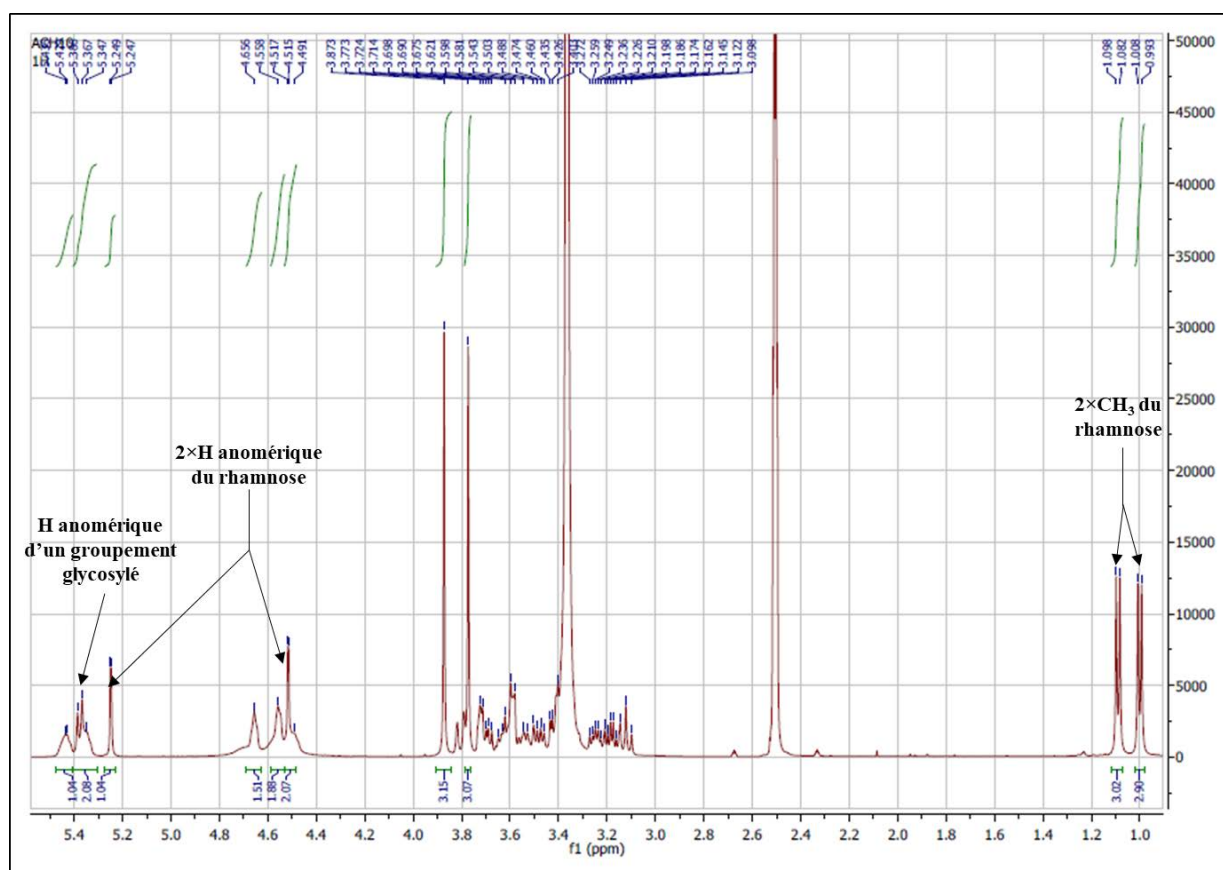


Spectre IV.4.9.8 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-10

La comparaison des déplacements chimiques des carbones du composé LIN-10 avec ceux du composé LIN-9 indique qu'ils possèdent la même structure de l'entité aglycone (**Figure IV.16**).

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.9.7**) indique la présence de 35 atomes de carbone, en faisant abstraction des 17 atomes de carbone de la partie aglycone, il apparaît clairement que cette flavone est triglycosylé, et les 18 atomes de carbone restants appartenant par conséquent à la partie osidique, cette hypothèse est confirmée par l'analyse du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.9.9**), on trouve en effet :

- La présence de deux signaux d'intégration 1H chacun, sous forme de singulet large à $\delta_{\text{H}} = 4,52$ et $5,25$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 100,7$ et $100,6$ ppm) attribuables aux protons anomériques de deux groupements rhamnosyls de configuration α . Les deux méthyles situés en position 6 qui caractérisent ces deux groupements rhamnosyls sont localisés à $\delta_{\text{H}} = 1,00$ et $1,09$ ppm sous forme de deux doublets avec une constante de couplage de 6 Hz.
- Un signal d'intégration 1H, sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5,38$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 98,5$ ppm, $J = 7,6$ Hz), dont la valeur de la constante de couplage est en faveur d'une configuration β , et la valeur du déplacement chimique du carbone anomérique indique une jonction *O*-sucre. Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.10**), le C-7 montre une tache de corrélation avec ce proton anomérique, ce qui permet la localisation de ce sucre en C-7 et ce proton prendra donc la position 1'', les deux protons anomériques des deux rhamnosyls localisés à $\delta_{\text{H}} = 4,52$ et $5,25$ ppm prendront les positions 1''' et 1''', respectivement.



Spectre IV.4.9.9 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement

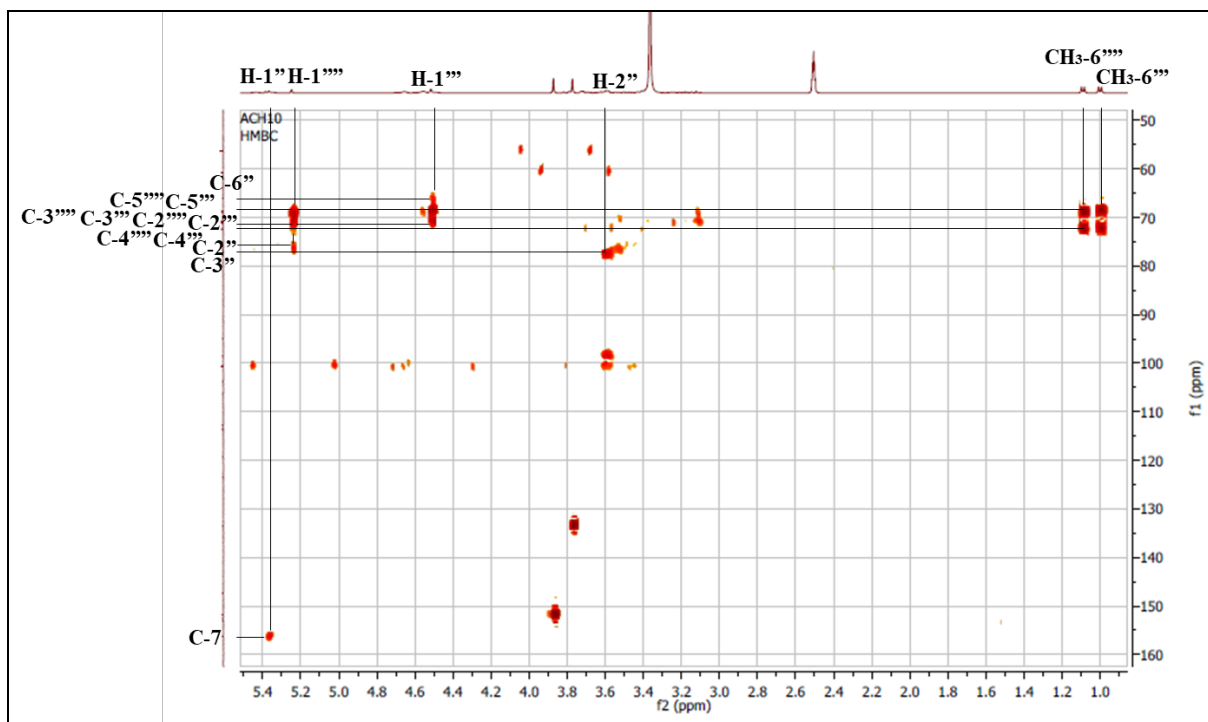
Grace aux corrélations des trois protons anomériques sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.9.11**), les carbones C-1', C-1'' et C-1''' sont localisés à $\delta_{\text{C}} = 98,5$; $100,7$ et $100,6$ ppm, respectivement.

L'attribution des différents carbones des trois sucres est réalisée par une analyse simultanée des spectres RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.9.7**), HMBC (**Spectre IV.4.9.10**) et HSQC (**Spectre IV.3.9.11**), ainsi que par la combinaison des résultats RMN ^{13}C des deux flavonoïdes biglycosylés LIA-7 et LIA-9. Sur le spectre HMBC, le méthyl du rhamnose localisé à $\delta_{\text{H}} = 1,00$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 18,1$ ppm) montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 68,7$ ppm, lui-même montre sur le même spectre une tache de corrélation avec le proton anomérique H-1''' ($\delta_{\text{H}} = 4,52$ ppm) ce qui permet son attribution à C-5''', le signal du méthyl est donc attribué à C-6''. Les protons du méthyl montrent une deuxième tache de corrélation avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 72,4$ ppm attribuable à C-4''', de la même façon le C-5''', C-6'' et C-4'' sont localisés à $\delta_{\text{C}} = 69,1$; $18,5$ et $72,4$ ppm, respectivement.

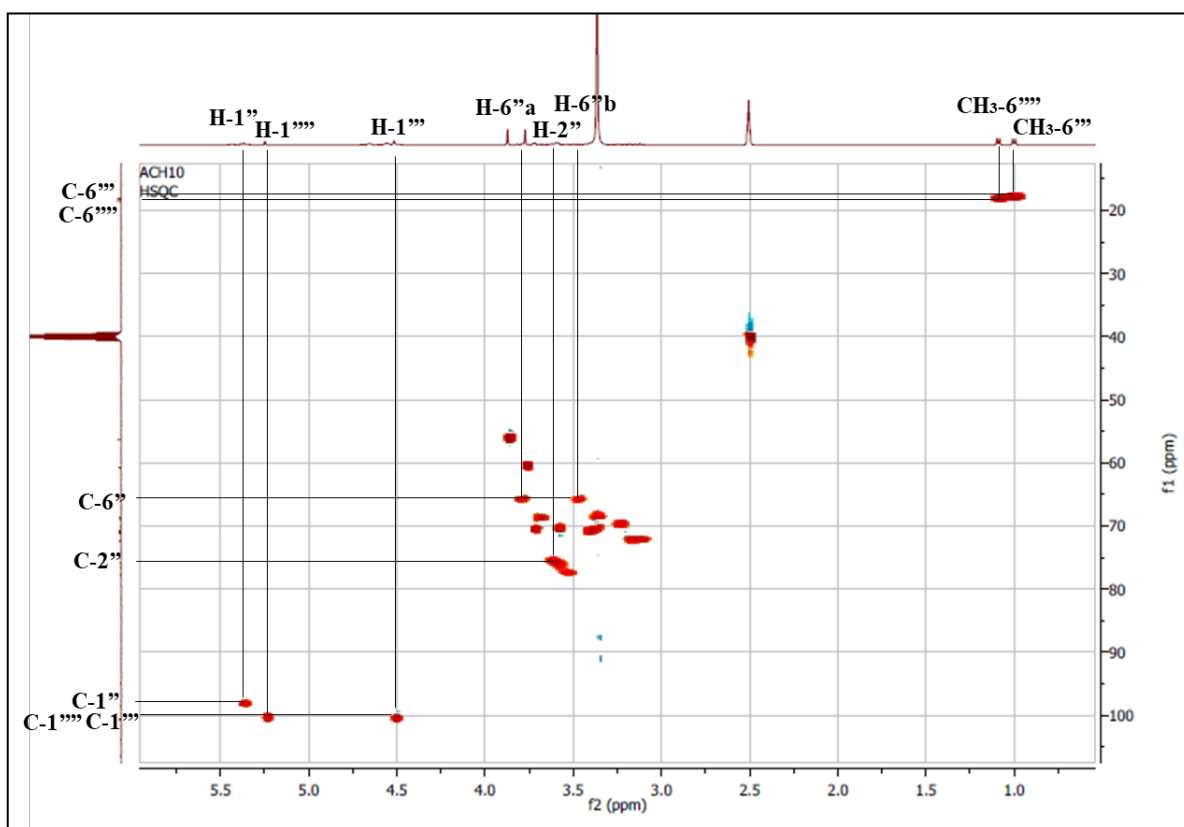
Toujours sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.10**), les deux protons anomériques des deux rhamnoses montrent des taches de corrélations avec les carbones localisés à $\delta_C = 70,8$; $70,9$; $70,9$ et $71,2$ ppm attribuables à C-3''', C-2''', C-2'''' et C-3''', respectivement.

Sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.9.12**), le H-1'' montre une tache de corrélation avec le proton à $\delta_H = 3,59$ ppm attribuable à H-2'', le C-2'' est donc localisé grâce au spectre HSQC (**Spectre IV.4.9.11**) à $\delta_C = 75,9$ ppm. Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.10**), le H-2'' montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 77,8$ ppm attribuable à C-3''. Le C-6'' est localisé à $\delta_C = 66,1$ ppm grâce aux corrélations des deux protons H-6a et H-6b sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.9.11**), cette attribution est confirmée par le spectre DEPT 135° (**Spectre IV.4.9.8**) qui indique que ce signal correspond à un CH₂. Les deux signaux à $\delta_C = 76,6$ et $70,1$ ppm ne peuvent être attribués qu'à C-5'' et C-4'', respectivement. La comparaison des déplacements chimiques de ces carbones avec ceux de la littérature [3] a permis de déduire que ce groupement glycosidique ne peut être que le glucose.

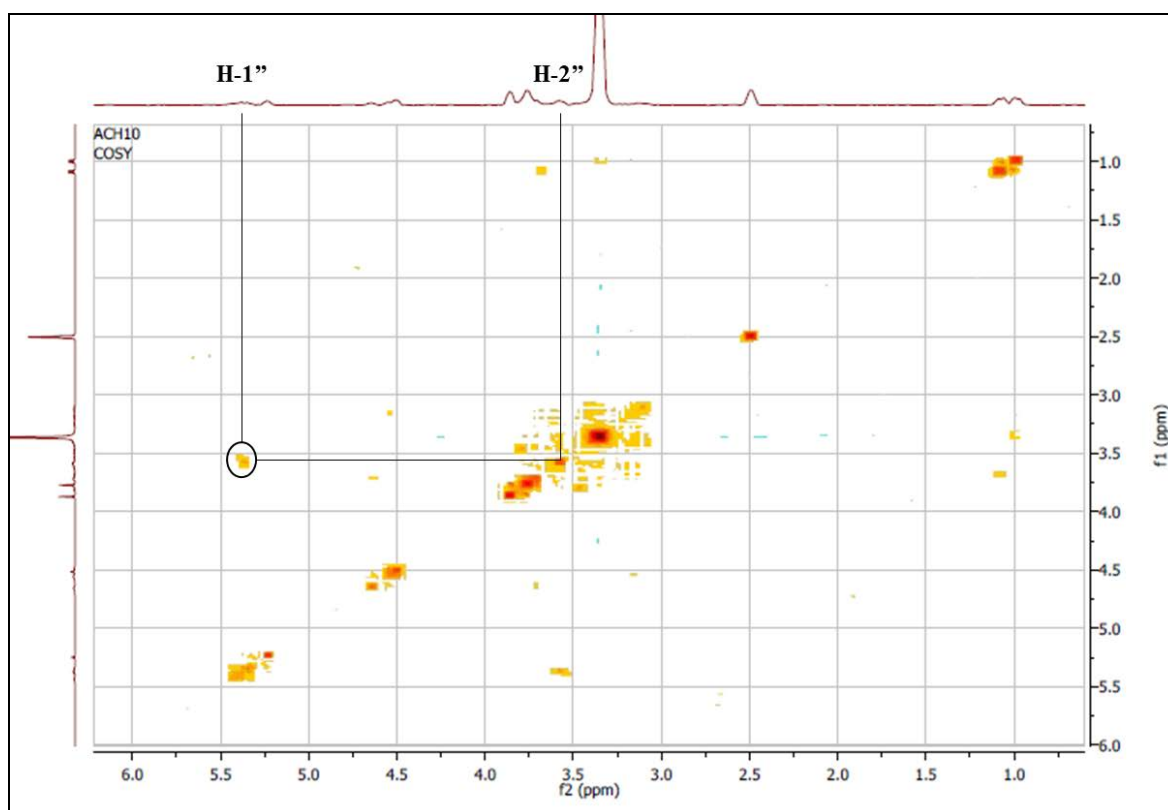
Sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.9.10**), le H-1'''' montre une tache de corrélation avec le C-6'' du glucose permettant ainsi la localisation du premier rhamnose sur cette position. Sur le même spectre, le H-1'''' montre une tache de corrélation avec le C-2'' ce qui permet la localisation du second rhamnose sur cette position.



Spectre IV.4.9.10 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement



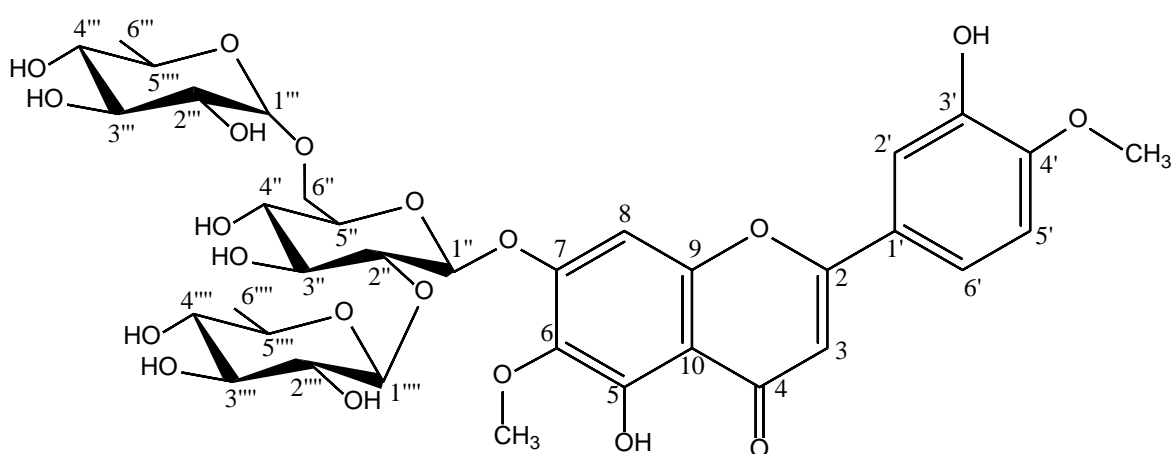
Spectre IV.4.9.11 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalement



Spectre IV.4.9.12 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-10, étalément

Les données relatives aux spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de ce composé sont reportées dans le **Tableau IV.15**.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée dans la **Figure IV.18**.



desméthoxycentaurei dine-7- O - α -rhamnopyranosyl(1''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside

Figure IV.18 : Structure du composé LIN-10

Tableau IV.15 : Les données relatives aux spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé LIN-10

position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)
2	164,8	-	-	4''	70,12	3,82-3,10 <i>m</i>	-
3	103,8	6,78 <i>s</i>	-	5''	76,61	3,82-3,10 <i>m</i>	-
4	182,7	-	-	6''	66,08	3,82-3,10 <i>m</i>	-
5	153,0	-	-	1'''	100,71	4,52 <i>sl</i>	-
6	133,5	-	-	2'''	70,88	3,82-3,10 <i>m</i>	-
7	156,3	-	-	3'''	71,20	3,82-3,10 <i>m</i>	-
8	94,9	6,95 <i>s</i>	-	4'''	72,44	3,82-3,10 <i>m</i>	-
9	152,5	-	-	5'''	68,71	3,82-3,10 <i>m</i>	-
10	106,4	-	-	6'''	18,13	1,00 <i>d</i>	6,0
1'	123,4	-	-	1''''	100,58	5,25 <i>sl</i>	-
2'	113,7	7,47 <i>d</i>	1,2	2''''	70,91	3,82-3,10 <i>m</i>	-
3'	147,4	-	-	3''''	70,78	3,82-3,10 <i>m</i>	-
4'	151,8	-	-	4''''	72,40	3,82-3,10 <i>m</i>	-
5'	112,8	7,15 <i>d</i>	8,8	5''''	69,06	3,82-3,10 <i>m</i>	-
6'	119,3	7,55 <i>dd</i>	8,8 ; 1,2	6''''	18,49	1,09 <i>d</i>	6,0
1''	98,5	5,38 <i>d</i>	7,6	4'-OMe	56,29	3,87 <i>s</i>	-
2''	75,9	3,59 <i>m</i>	-	6-OMe	60,78	3,77 <i>s</i>	-
3''	77,8	3,82-3,10 <i>m</i>	-				

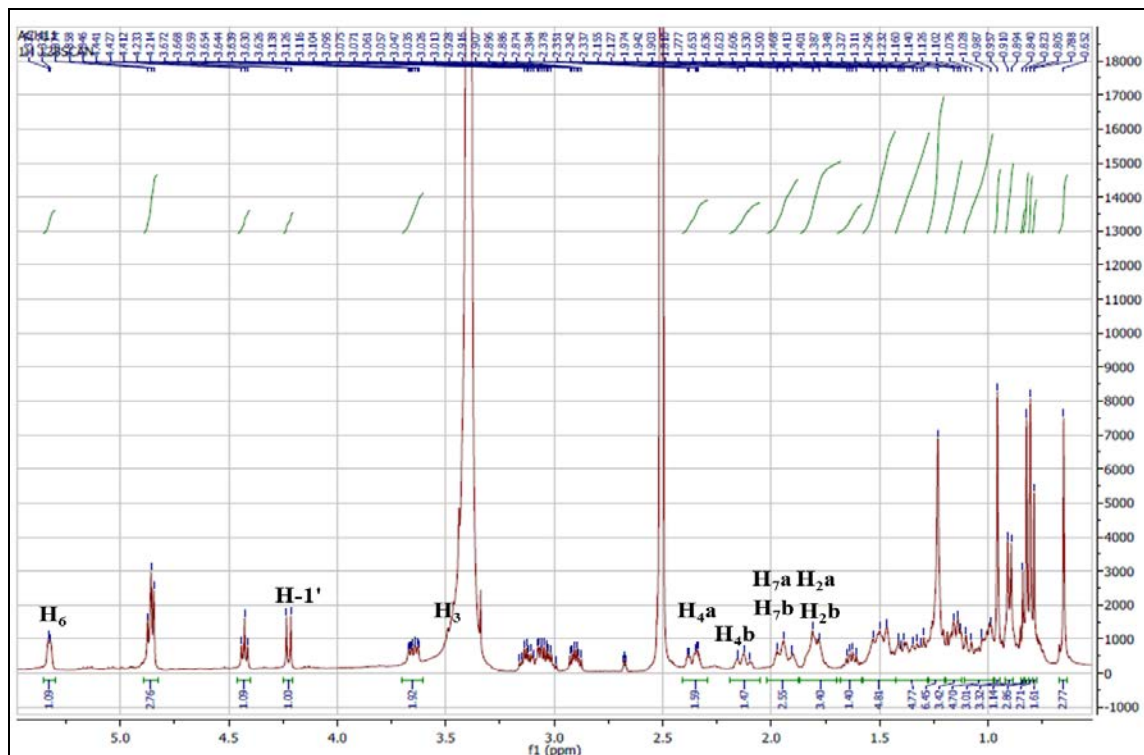
Cette molécule est nouvelle, nous la reportons pour la première fois dans la littérature sous le nom desméthoxycentaureidine-7-*O*- α -rhamnopyranosyl (1'''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside, (4',6-diméthoxy-3',5-dihydroxy-7-*O*- α -rhamnopyranosyl(1'''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside flavone).

IV.4.10. Elucidation structurale du composé 10 (LIN-11)

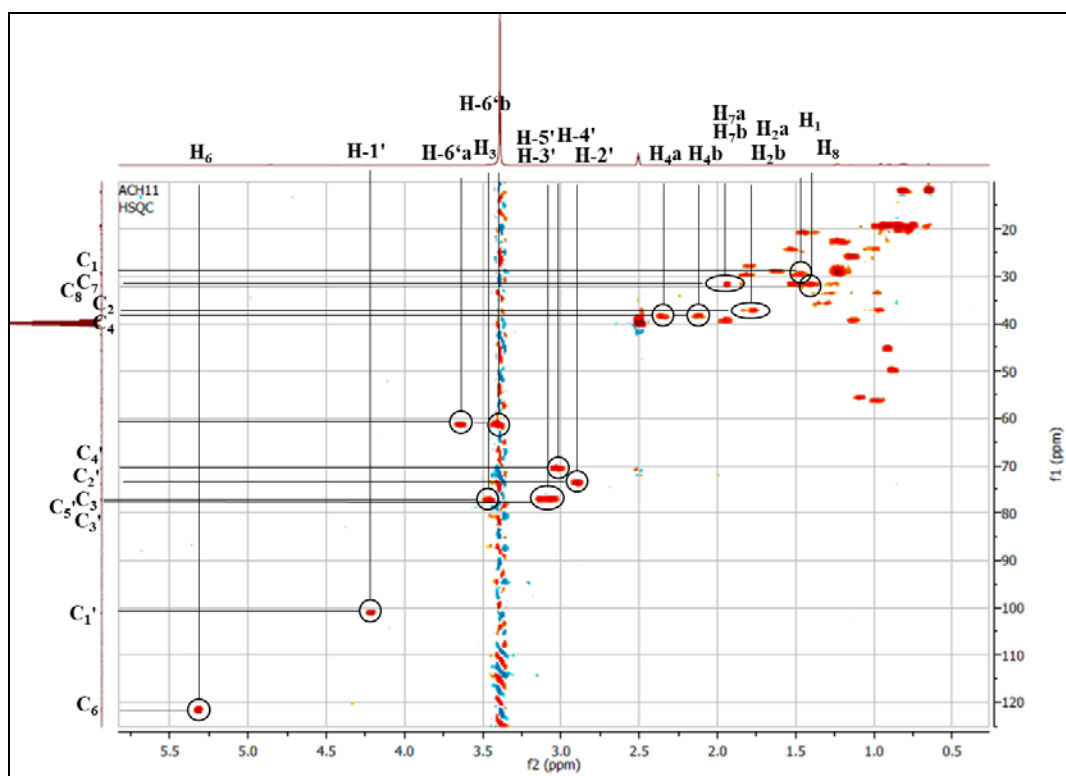
Ce produit a été isolé directement de l'extrait brut sous forme d'un précipité blanc insoluble dans le méthanol, invisible sous la lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm).

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.4.10.1**) révèle la présence d'un ensemble de pics très dense dans l'intervalle 0,60 ppm à 1,25 ppm, supposant la présence d'un nombre élevé de groupements méthyles, méthylènes et méthynes. Sur le même spectre, on remarque la présence de deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 5,33$ ppm ($J = 4,8$ Hz) et le second sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 3,48$ ppm caractéristiques respectivement, du proton oléfinique H-6 et du proton H-3 attaché à un carbone oxygéné d'un β -sitostérol. Cette observation est confirmée par l'examen simultané des spectres HSQC (**Spectre IV.4.10.2**), RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.10.3**) et DEPT 135° (**Spectre IV.4.10.4**) qui indique la présence d'un CH éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 121,7$ ppm et d'un CH

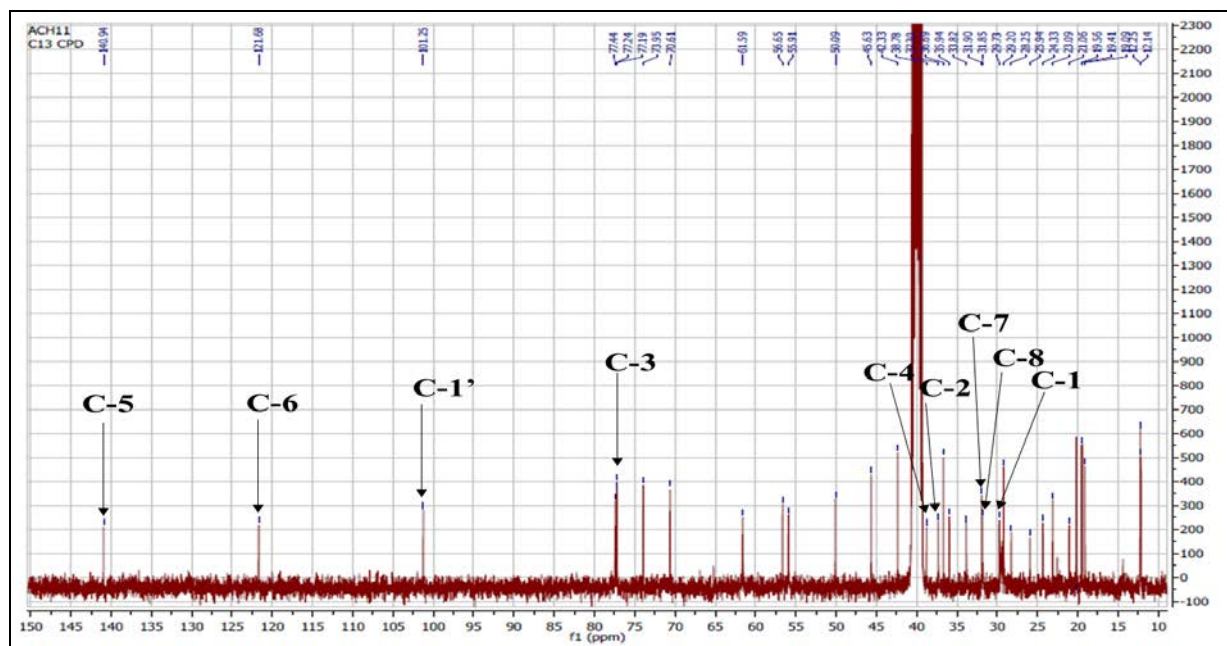
oxygéné à $\delta_C = 77,2$ ppm correspondant respectivement, aux carbones C-6 et C-3. Le carbone éthylénique quaternaire localisé à $\delta_C = 140,9$ ppm est attribué au carbone C-5.



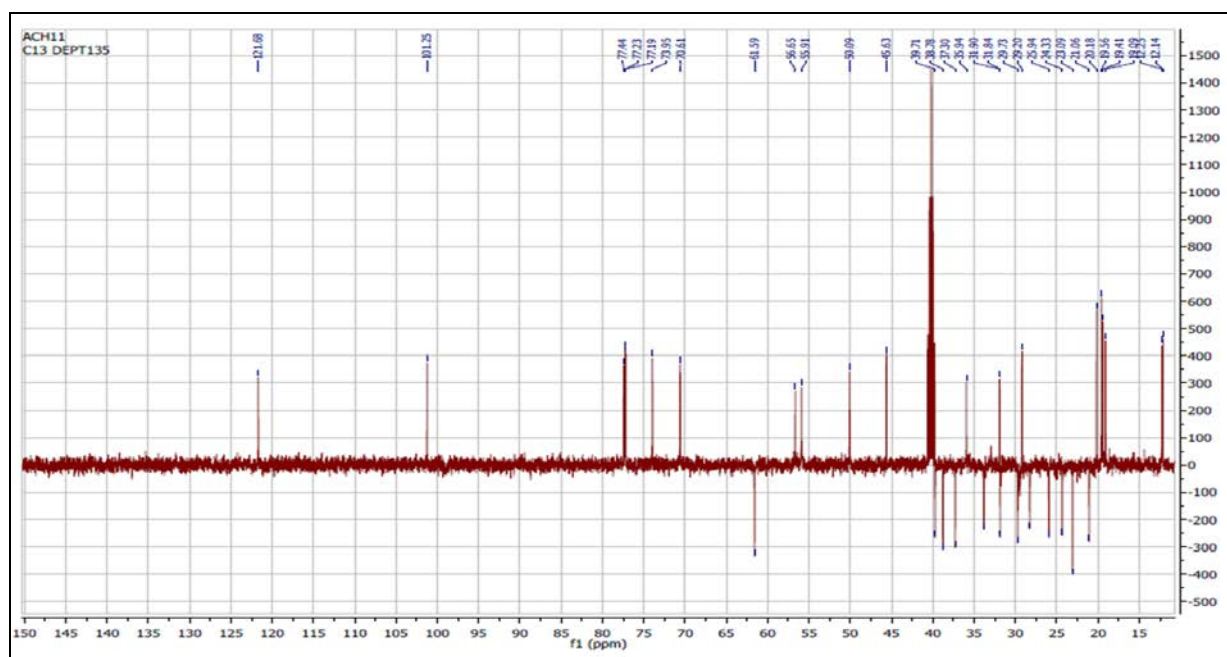
Spectre IV.4.10.1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δppm) du composé LIN-11



Spectre IV.4.10.2 : Spectre HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δppm) du composé LIN-11



Spectre IV.4.10.3 : Spectre RMN¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-11

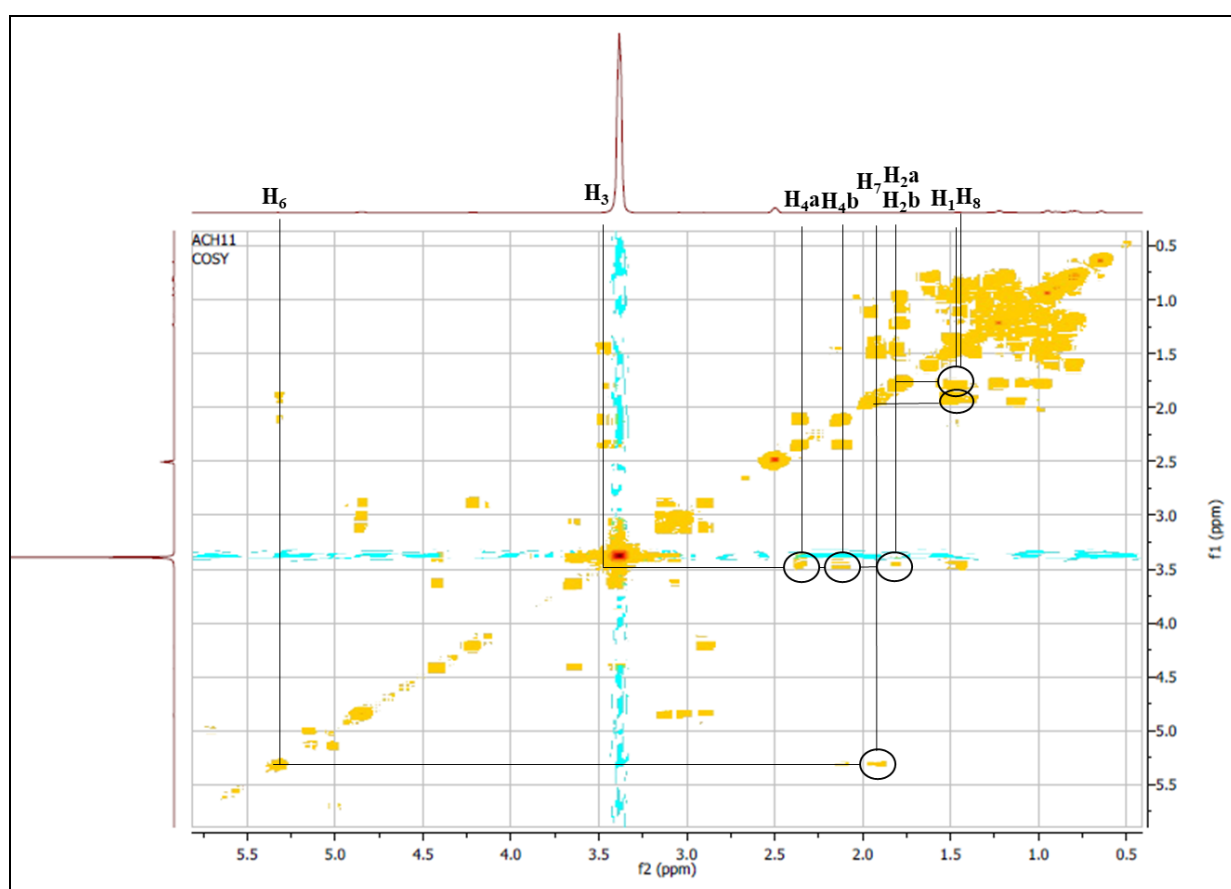


Spectre IV.4.10.4 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, DMSO-*d*₆, δppm) du composé LIN-11

Sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.10.5**), le H-3 montre des taches de corrélation avec les deux protons d'un groupement méthylène à $\delta_{\text{H}} = 2,36$ ppm (*m*) et à $\delta_{\text{H}} = 2,13$ ppm (*m*), attribuables aux protons H-4a et H-4b respectivement, sur le même spectre ces deux protons ne montrent aucune autre corrélation ce qui confirme leurs attributions. Le spectre HSQC (**Spectre IV.4.10.2**) confirme bien que ces deux protons sont portés par le même atome de carbone ($\delta_{\text{C}} = 38,8$ ppm). Sur le spectre COSY, le H-3 montre une autre tache de

corrélation avec les deux protons sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}} = 1,79$ ppm, le spectre HSQC montre que ces deux protons sont portés par le carbone localisé à $\delta_{\text{C}} = 37,3$ ppm attribuable donc à C-2. Toujours par combinaison des deux spectres COSY et HSQC, le C-1 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 29,7$ ppm, le DEPT 135° indique qu'il s'agit bien d'un méthylène.

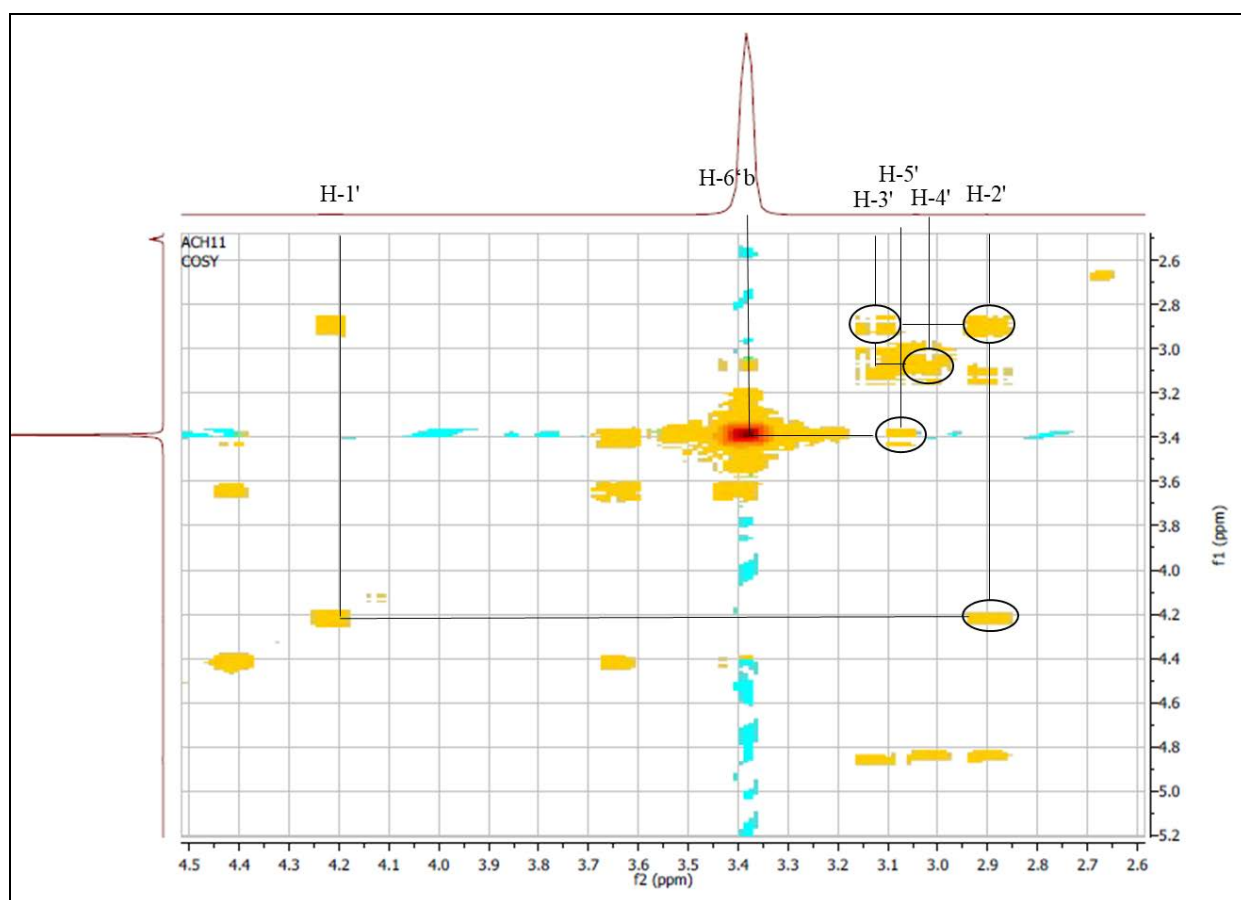
Sur le spectre COSY (**Spectre IV.4.10.5**), le proton H-6 corrèle avec les deux protons dont le signal est à $\delta_{\text{H}} = 1,94$ ppm, par combinaison des deux spectres HSQC (**Spectre IV.4.10.2**) et le DEPT 135° (**Spectre IV.4.10.4**), le carbone de ce méthylène est localisé à $\delta_{\text{C}} = 31,9$ ppm, donc ces deux protons sont attribués à H-7a et H-7b. Par combinaison des deux spectres COSY et HSQC, le C-8 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 31,9$ ppm.



Spectre IV.4.10.5 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-11

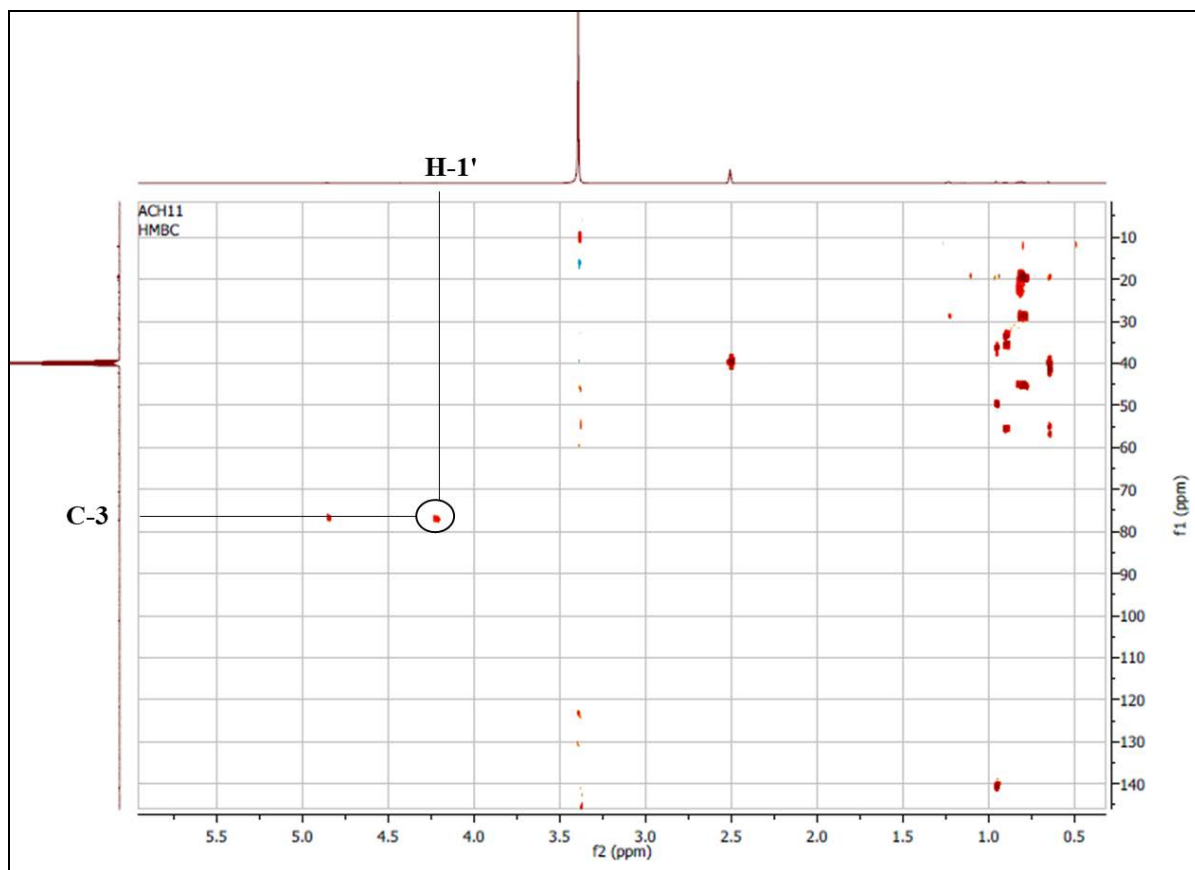
Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C montrent la présence d'une partie osidique reconnaissable en premier lieu, sur le spectre proton (**Spectre IV.4.10.1**) à un signal sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,22$ ppm ($J = 7,6$ Hz), caractéristique du proton anomérique H-1' d'un sucre de configuration β .

Sur le spectre HSQC (**Spectre IV.4.10.2**), le carbone anomérique correspondant est alors relevé à $\delta_C = 101,3$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone et celle du proton anomérique indiquent que cette partie osidique est reliée à l'aglycone par une liaison oxygène. Les carbones C-2', C-3', C-4', C-5', C-6' correspondants aux autres atomes de carbones de cette entité glycosidique sont localisés à l'aide d'une étude simultanée des spectres COSY (**Spectre IV.4.10.6**), HSQC (**Spectre IV.4.10.2**) et RMN ^{13}C (**Spectre IV.4.10.3**) à $\delta_C = 74,0$; 77,4 ; 70,6 ; 77,3 et 61,6 ppm respectivement, dont la comparaison de ces déplacements chimiques avec ceux de la littérature [3] indique que cette entité glycosidique est le glucose.



Spectre IV.4.10.6 : Spectre COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-11, étalement

Cette partie osidique est localisée sur la position 3 du β -sitosterol en se basant sur la tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone C-3 sur le spectre HMBC (**Spectre IV.4.10.7**).



Spctre IV.4.10.7 : Spctre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé LIN-11

L'ensemble des données nous indique que le composé LIA-11 est le le β -sitosterol-3-*O*- β -glucopyranoside (daucostérol) [16] (**Figure IV.19**).

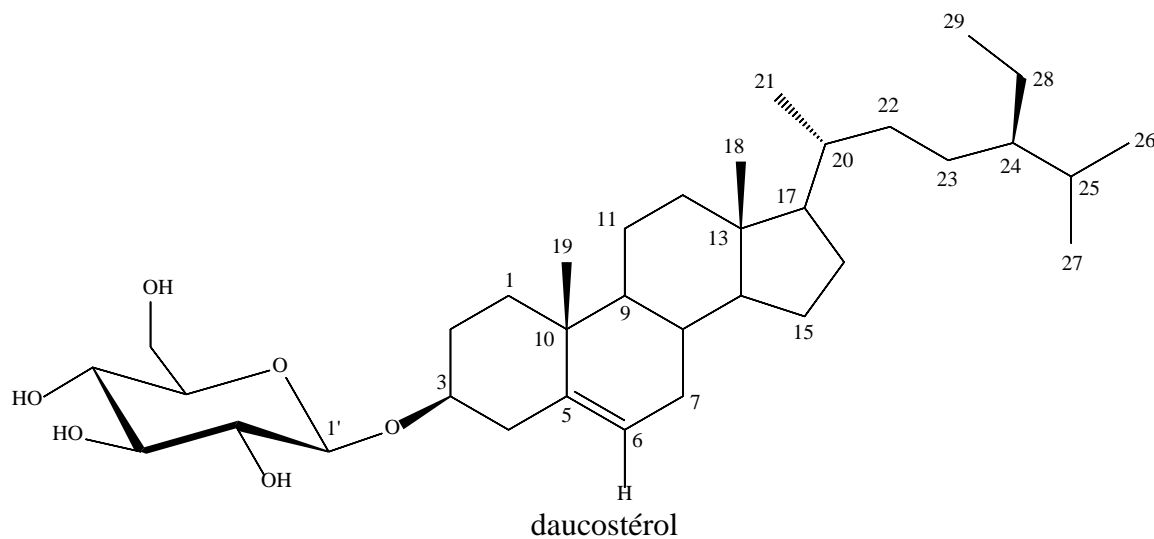


Figure IV.19 : Structure du composé LIN-11

La comparaison des déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C avec ceux de la littérature a permis d'attribuer les autres atomes de carbones comme le montre le **Tableau IV.16**.

Tableau IV.16 : Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé LIN-11

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1	29,7	1,63	19	19,6	0,65-1,45
2	37,3	1,79	20	35,9	0,65-1,45
3	77,2	3,48	21	20,2	0,65-1,45
4	38,8	2,36 ; 2,13	22	33,9	0,65-1,45
5	140,9	-	23	28,3	0,65-1,45
6	121,7	5,33	24	45,6	0,65-1,45
7	31,9	1,94	25	29,2	0,65-1,45
8	31,9	1,50	26	19,2	0,65-1,45
9	50,1	0,65-1,45	27	19,4	0,65-1,45
10	36,7	-	28	24,3	0,65-1,45
11	21,1	0,65-1,45	29	12,3	0,65-1,45
12	39,7	0,65-1,45	1'	101,3	4,22
13	42,3	-	2'	74,0	2,87-3,67
14	56,7	0,65-1,45	3'	77,4	2,87-3,67
15	23,1	0,65-1,45	4'	70,6	2,87-3,67
16	26,0	0,65-1,45	5'	77,2	2,87-3,67
17	55,9	0,65-1,45	6'	61,6	2,87-3,67
18	12,1	0,65-1,45			

IV.5. Résultats des activités biologiques

IV.5.1. Activités biologiques des extraits de *L. scarisa*

IV.5.1.1. Activité antioxydante (*in vitro*)

Cinq méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits dichlorométhane (LIC), acétate d'éthyle (LIA) et *n*-butanol (LIN) de *Linaria scariosa* : DPPH, ABTS, métal chélate, CUPRAC et le pouvoir réducteur.

Les résultats de l'activité antioxydante sont représentés par les pourcentages d'inhibitions pour chaque concentration de chaque extrait (**Tableau IV.17**, **Tableau IV.18** et **Tableau IV.19**), ainsi que par les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (CI_{50}) pour les tests du DPPH, ABTS et métal chélate, et par les valeurs qui indiquent 0,50 d'absorbance ($A_{0,50}$) pour les tests CUPRAC et pouvoir réducteur (**Tableau IV.20**).

L'extrait LIA a présenté une meilleure activité inhibitrice du DPPH et du radical ABTS^{•+} ($CI_{50} = 71,64 \pm 1,13$ et $22,28 \pm 0,54$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement), en comparaison avec l'extrait LIC ($CI_{50} = 187,88 \pm 1,47$ et $23,01 \pm 0,33$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement) et l'extrait LIN ($CI_{50} = 292,82 \pm 1,05$ et $56,89 \pm 0,99$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement). Cette activité est due à la présence de molécules polaires à savoir les flavonoïdes et les polyphénols qui constituent les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. L'activité antioxydante varie en fonction du taux de ces composés dans chaque extrait et même par la différence dans leurs structures qui résulte de la variation des substituants et de la position et du nombre des hydroxyles [17]. Cela explique bien les résultats obtenus dont les quels l'extrait LIA qui a montré l'activité antiradicalaire la plus intéressante a également montré la teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes. Les résultats obtenus de la GC/MS ont montré que l'extrait LIA est le plus riche en acide cinnamique et ses dérivés (12,05%) ce qui explique son activité antiradicalaire la plus élevée. toujours avec les résultats de la GC/MS, qui ont montré que les dérivés d'acide cinnamique contribuent pour 2,13% de la composition chimique totale de l'extrait LIC tandis que l'extrait LIN est dépourvu de ces dérivés, et ce qui est en bon accord avec les résultats de l'activité antiradicalaire obtenus [18]. Une autre remarque à attirer notre attention dans le stade de la séparation et la purification des métabolites secondaires des extraits et qui peut également expliquée ces résultats, c'est que les profils chromatographiques sur couche mince ont montré une grande richesse de l'extrait LIA en flavonoïdes aglycones, en revanche une grande richesse en flavonoïdes glycosilés et surtout en iridoïdes de l'extrait LIN a été remarquée.

Le test CUPRAC est basé sur la capacité antioxydante par réduction du cuivre, les résultats obtenus ont permis de déduire que l'extrait LIA est le meilleur réducteur ($A_{0,50} = 21,58 \pm 0,77$), suivi de l'extrait LIC ($A_{0,50} = 31,04 \pm 0,52$ $\mu\text{g/mL}$) et en dernier l'extrait LIN ($A_{0,50} = 62,76 \pm 1,85$ $\mu\text{g/mL}$).

La capacité de réduction peut servir comme indicateur signifiant de l'activité antioxydante potentielle. Le test correspond a montré que c'est toujours l'extrait LIA qui a manifesté l'activité antioxydante la plus puissante ($A_{0,50} = 68,31 \pm 1,83$ $\mu\text{g/mL}$) en comparant avec l'extrait LIC ($A_{0,50} = 136,83 \pm 1,94$ $\mu\text{g/mL}$). L'extrait LIN est le plus faible dont la valeur de l' $A_{0,50}$ est supérieure à 200 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau IV. 17 : inhibition du DDPH et ABTS par les extraits de *L. scariosa*

Extraits et standards	DDPH					ABTS								
	800	400	200	100	50	25	12,5	800	400	200	100	50	25	12,5
LIC	78,66±0,55	69,93±0,44	51,71±0,55	35,92±1,06	20,17±0,49	10,58±1,88	3,82±1,06	93,10±0,00	92,16±0,72	91,64±0,36	88,87±0,47	74,19±0,55	53,71±0,59	30,41±1,39
LIA	85,92±0,30	85,01±0,30	84,10±0,45	64,02±1,69	41,42±1,97	23,55±0,61	12,25±3,03	92,01±0,16	91,69±0,54	89,76±1,31	81,61±3,62	70,38±2,41	54,08±0,41	33,39±5,85
LJN	83,45±1,03	65,79±0,40	37,18±1,29	20,07±1,59	12,75±1,14	5,79±1,27	1,60±1,54	92,27±0,77	89,66±0,27	81,09±0,71	64,32±0,80	49,06±0,57	38,14±0,36	38,14±0,39
BHA	90,14±0,00	89,36±0,19	87,13±0,17	84,18±0,10	81,73±0,10	79,89±0,26	76,55±0,48	95,86±0,10	95,83±0,15	95,59±0,47	95,32±0,25	94,95±0,90	94,68±0,42	92,83±1,42
BHT	95,02±0,23	95,38±0,41	94,97±0,08	94,00±0,31	88,73±0,89	72,63±2,06	49,09±0,76	96,68±0,39	90,95±0,51	90,85±1,74	88,76±3,07	88,12±1,28	78,23±1,34	69,21±0,40

Tableau IV. 18 : inhibition du CUPRAC et le pouvoir réducteur par les extraits de *L. scariosa*

Extraits et standards	CUPRAC					POUVOIR REDUCTEUR								
	800	400	200	100	50	25	12,5	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125
LIC	2,50±0,09	1,79±0,03	1,28±0,03	0,86±0,04	0,64±0,03	0,47±0,02	0,35±0,02	0,68±0,02	0,40±0,00	0,29±0,00	0,17±0,01	0,13±0,01	0,09±0,01	0,08±0,02
LIA	3,39±0,09	3,39±0,03	1,85±0,06	1,19±0,05	0,82±0,02	0,54±0,02	0,40±0,02	0,74±0,02	0,70±0,03	0,36±0,05	0,22±0,01	0,17±0,01	0,10±0,01	0,09±0,01
LJN	1,98±0,05	1,28±0,04	0,88±0,04	0,63±0,02	0,46±0,03	0,40±0,01	0,33±0,02	0,32±0,00	0,22±0,03	0,15±0,03	0,13±0,02	0,10±0,02	0,10±0,01	0,09±0,00
BHA	3,92±0,13	3,77±0,19	3,35±0,20	3,58±0,42	3,14±0,46	1,95±0,31	1,12±0,05	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a
BHT	3,38±0,13	2,86±0,07	2,56±0,05	2,50±0,01	2,42±0,02	2,22±0,05	1,41±0,03	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a
Acide ascorbique	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	1,44±0,21	1,37±0,20	1,18±0,34	0,93±0,30	0,84±0,12	0,46±0,03	0,35±0,05
α -tocopherol	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	NT ^a	1,81±0,09	1,37±0,08	0,73±0,03	0,35±0,03	0,21±0,03	0,16±0,00	0,11±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type
^a non testé

Les ions ferreux sont considérés comme l'un des plus efficaces pro-oxydants parce que l'état ferreux du fer accélère la peroxydation lipidique en décomposant l'hydrogène et les lipides peroxydes en radicaux libres réactifs. Ces réactions peuvent se produire dans les cellules et entraînent la génération de radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), sources possibles de stress oxydatif. Le **Tableau IV.19** montre les effets chélateurs des trois extraits de *L. scariosa* sur des ions ferreux. L'activité de chélation du métal augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. L'extrait LIC a montré l'activité chélatante des métaux la plus élevée ($\text{CI}_{50} = 154,71 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$) en comparant avec les deux autres extraits qui ont montré une valeur de CI_{50} supérieure à 800 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau IV.19 : Activité des extraits de *L. scariosa* sur les ions chélates

Extraits et standards	métal chélate						
	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg
LIC	30,81 \pm 1,55	31,69 \pm 3,19	32,51 \pm 0,09	43,76 \pm 1,49	56,24 \pm 0,97	64,03 \pm 2,41	77,86 \pm 2,79
LIA	28,53 \pm 0,98	29,53 \pm 0,78	29,41 \pm 1,07	26,04 \pm 3,62	29,99 \pm 3,35	33,39 \pm 1,25	45,64 \pm 1,11
LIN	25,86 \pm 4,14	27,80 \pm 4,42	29,55 \pm 1,08	30,84 \pm 1,68	33,01 \pm 0,85	29,53 \pm 1,58	41,12 \pm 1,45
EDTA	73,00 \pm 1,59	73,60 \pm 1,20	73,80 \pm 1,51	95,78 \pm 0,10	95,80 \pm 0,06	95,84 \pm 0,22	95,87 \pm 0,06

Le **Tableau IV.20** indique les valeurs des CI_{50} et $\text{A}_{0,50}$ des cinq tests réalisés par rapport aux valeurs des CI_{50} des standards. L'activité antioxydante est moins prononcée comparativement aux standards qui ont montré une activité plus forte que les extraits testés en montrant des valeurs des CI_{50} et $\text{A}_{0,50}$ plus grande. Mais les résultats obtenus restent significatifs surtout que les extraits ont montré une grande richesse dans les études réalisées.

Tableau IV.20 : valeurs des CI_{50} et $\text{A}_{0,50}$ pour chaque extrait et standard

Extraits et standards	DPPH (CI_{50})	ABTS (CI_{50})	CUPRAC ($\text{A}_{0,50}$)	Pouvoir réducteur ($\text{A}_{0,50}$)	Métal chélate (CI_{50})
LIC	187,88 \pm 1,47	23,01 \pm 0,33	31,04 \pm 0,52	136,83 \pm 1,94	154,71 \pm 109
LIA	71,64 \pm 1,13	22,28 \pm 0,54	21,58 \pm 0,77	68,31 \pm 1,83	>200
LIN	292,82 \pm 1,05	56,89 \pm 0,99	62,76 \pm 1,85	>200	>200
BHA	6,14 \pm 0,41	1,81 \pm 0,10	5,35 \pm 0,71	NT	NT
BHT	12,99 \pm 0,41	1,29 \pm 0,30	8,97 \pm 3,94	NT	NT
EDTA	NT	NT	NT	NT	8,80 \pm 0,47
Acide ascorbique	NT	NT	NT	6,77 \pm 1,15	NT
α - tocophérol	NT	NT	NT	34,93 \pm 2,38	NT

IV.5.1.2. Activité anti-cholinestérase (*in vitro*)

L'extrait LIC ($CI_{50} = 96,02 \pm 0,69 \mu\text{g} / \text{mL}$) a présenté une activité modérée contre la BChE par rapport à la galantamine ($CI_{50} = 34,75 \pm 1,99 \mu\text{g} / \text{mL}$). Cependant, les deux extraits LIA et LIN étaient inactifs pour les différentes concentrations (**Tableau IV.21**). L'effet modéré du LIC peut être lié à sa composition chimique déterminée par analyse GC-MS, indiquant la présence d'acides gras en particulier les acides α -linoléique (10,59%) et palmitique (19,97%), Ainsi que la présence de stérols, y compris le β -sitostérol (12,46%), qui possèdent une forte inhibition de la BChE [19,20].

L'extrait LIN ($CI_{50} = 75,47 \pm 3,50 \mu\text{g} / \text{mL}$) a montré une faible activité contre l'AChE par rapport à la galantamine ($CI_{50} = 6,27 \pm 1,15 \mu\text{g} / \text{mL}$). Cependant, les deux extraits LIA et LIN ont montré une très faible activité dont les valeurs des CI_{50} sont supérieures à $200 \mu\text{g} / \text{mL}$ (**Tableau IV.22**). Il est à noter que des études similaires sur les extraits de *L. reflexa* ont montré que l'extrait acétate d'éthyle a donné l'activité la plus remarquable ce qui a été expliqué par la présence de la linarine, isolinariine A et B dans sa composition chimique, qui sont des flavones avec un radical rutinosyl comme partie commune, et qui est connue pour interagir avec l'enzyme AChE [21]. Cela pourrait expliquer les résultats de l'extrait LIN, qui contient la pectolinarine, et qui a montré une activité supérieure à celle de LIC et LIA.

Tableau IV.21 : Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de *L. scariosa*

Extraits et standard	% inhibition BChE							CI_{50}
	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
LIC	PA	7,83 \pm 0,74	22,65 \pm 6,67	38,22 \pm 0,25	40,20 \pm 8,90	53,42 \pm 2,10	68,86 \pm 0,74	96,02 \pm 0,69
LIA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA
LIN	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA
Galenthamine	3,26 \pm 0,62	6,93 \pm 0,62	24,03 \pm 2,94	45,13 \pm 2,60	63,87 \pm 2,85	73,57 \pm 0,77	78,95 \pm 0,58	34,75 \pm 1,99

Tableau IV.22 : Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de *L. scariosa*

Extraits et standard	% inhibition AChE							CI_{50}
	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
LIC	PA	PA	PA	PA	5,49 \pm 2,09	19,85 \pm 4,97	38,82 \pm 5,99	>200
LIA	PA	PA	PA	PA	PA	15,34 \pm 1,44	19,73 \pm 3,41	>200
LIN	15,15 \pm 5,21	26,53 \pm 7,28	33,42 \pm 2,63	41,90 \pm 0,00	42,89 \pm 2,41	54,63 \pm 1,90	60,73 \pm 2,51	75,47 \pm 3,50
Galenthamine	35,93 \pm 2,28	43,77 \pm 0,00	68,50 \pm 0,31	80,69 \pm 0,41	85,78 \pm 1,63	91,80 \pm 0,20	94,77 \pm 0,34	6,27 \pm 1,15

IV.5.1.3. Activité antibactérienne (*in vitro*)

Le potentiel antibactérien des extraits a été évalué en termes de zone d'inhibition de la croissance bactérienne. Les résultats de l'activité antibactérienne sont présentés dans le **Tableau IV.23**.

Le **Tableau IV.23** montre en effet l'activité antibactérienne des trois extraits à la concentration de 1000 µg/mL, contre six bactéries : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Gram+), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram+), *Morganella morganii* (HS) (Gram-), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-), *Proteus vulgaris* (HS) (Gram-), *Citrobacter freundii* (HS) (Gram-).

L'extrait LIA a inhibé faiblement la croissance de quatre souches bactériennes avec des diamètres de zone d'inhibition de 7-10 millimètres, (*Morganella morganii* (9mm), *Staphylococcus aureus* (10mm), *Bacillus subtilis* (9mm), *Proteus vulgaris* (HS) (7mm)). L'extrait LIC a inhibé la croissance de *Bacillus subtilis* avec un diamètre de 10 mm. Alors que Les résultats montrent que l'extrait LIN n'a pas une activité antibactérienne contre les bactéries testées.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour la plupart des espèces de *Linaria* qui n'ont pas montré un pouvoir antibactérien puissant [2].

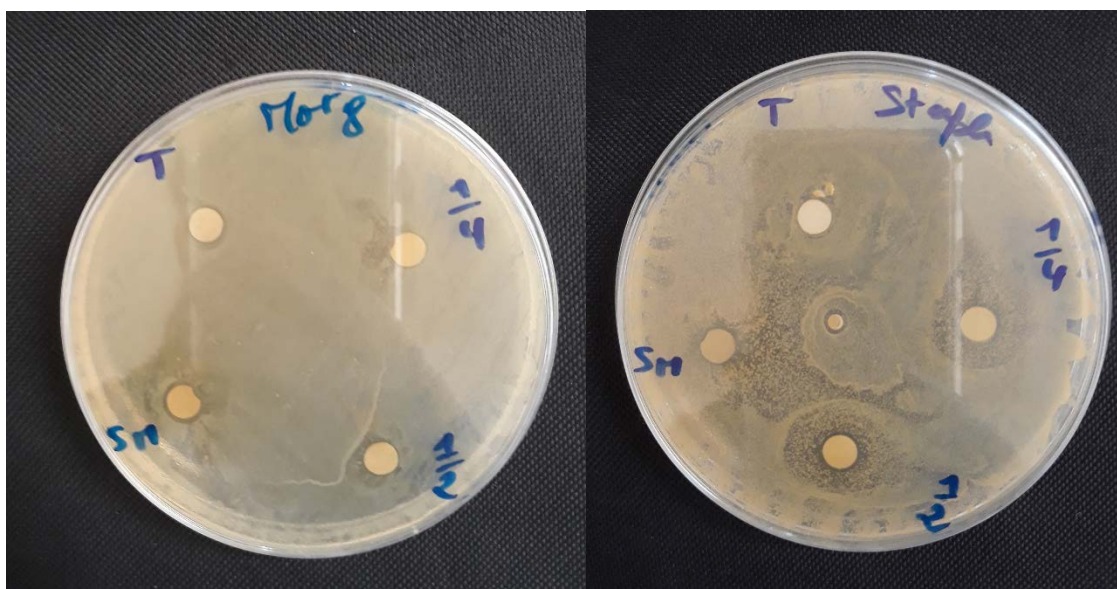


Figure IV.20 : zone d'inhibition de LIA contre *Morganella morganii* et *Staphylococcus aureus*.

Tableau IV.23 : L'activité antimicrobienne des extraits de *L. scariosa*

Microorganismes	Diameter de la zone d'inhibition (mm)		
	Extraits		
	LIC	LIA	LIN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	10	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10	9	-
<i>Morganella morganii</i> (HS)	-	9	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (HS)	-	7	-
<i>Citrobacter freundii</i> (HS)	-	-	-

IV.5.2. Activités biologiques des nouveaux composés

IV.5.2.1. Activité antioxydante (*in vitro*) du composé LIA-17

L'activité antioxydante du composé LIA-17 a été mise en évidence en utilisant trois méthodes (DPPH, CUPRAC et ABTS). Dans les trois tests le composé LIA-17 a montré une très faible activité antioxydante en donnant des valeurs de CI_{50} et d' $A_{0,50}$ élevées (**Tableau IV.24**). Les résultats des standards sont mentionnés dans les tableaux **IV.17**, **IV.18** et **IV.20**

Tableau IV.24 : inhibition du DPPH, CUPRAC et ABTS du composé LIA-17

Test	Composé LIA-17							
	11,718 μ g	23,437 μ g	46,875 μ g	93,75 μ g	187,5 μ g	375 μ g	750 μ g	CI_{50}
DPPH	PA	4,20 \pm 1,12	11,22 \pm 3,49	16,38 \pm 0,98	27,27 \pm 0,63	55,93 \pm 2,94	60,94 \pm 1,54	331,73 \pm 5,57
		11,718 μ g	23,437 μ g	46,875 μ g	93,75 μ g	187,5 μ g	375 μ g	750 μ g
CUPRAC		0,12 \pm 0,00	0,14 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,22 \pm 0,00	0,35 \pm 0,00	0,59 \pm 0,01	0,96 \pm 0,06
ABTS		10,75 \pm 1,18	19,56 \pm 1,54	22,65 \pm 5,09	45,62 \pm 0,64	66,49 \pm 2,18	88,78 \pm 1,54	92,61 \pm 1,36
								$A_{0,50}$
								308,46 \pm 2,66
								126,36 \pm 0,11

IV.5.2.2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (*in vitro*) des composés LIA-17, LIN-9 et LIN-10

Le composé LIA-17 a montré une activité inhibitrice de l' α -glucosidase remarquable avec une $CI_{50} = 40,86\pm 3,31$ μ g/mL en comparant avec l'acarbose choisis comme standard ($CI_{50} = 275,43\pm 1,59$ μ g/mL), mais son activité reste modéré en comparant avec la quercétine qui a montré une bonne activité inhibitrice de l' α -glucosidase en donnant une valeur de $CI_{50} = 4,26\pm 0,24$ μ g/mL. Une recherche bibliographique a montré que l'antirrhinoside et l'antirrhide, deux iridoïdes qui ont une structure similaire au composé LIA-17, ont une bonne

activité inhibitrice de l' α -glucosidase [22], et ce qui en accord avec les résultats trouvés. Les deux nouveaux flavonoïdes LIN-9 et LIN-10 ont montré un pouvoir inhibiteur de l' α -glucosidase très faible.

Tableau IV.25 : inhibition de l' α -glucosidase des composés LIA-17, LIN-9 et LIN-10

% d'inhibition								
Produits	15,625 μ g	31,25 μ g	62,5 μ g	125 μ g	250 μ g	500 μ g	1000 μ g	CI ₅₀ (μ g/mL)
LIN-9	25,26 \pm 3,11	28,50 \pm 3,35	29,01 \pm 3,82	36,07 \pm 0,24	37,75 \pm 1,27	44,34 \pm 1,93	52,59 \pm 0,19	834,91 \pm 7,03
LIN-10	NA	24,36 \pm 3,96	25,12 \pm 4,43	25,23 \pm 0,66	35,36 \pm 2,64	52,13 \pm 0,00	58,58 \pm 2,12	466,01 \pm 5,36
LIA-17	23,437 μ g	46,875 μ g	93,75 μ g	187,5 μ g	375 μ g	750 μ g	1500 μ g	CI ₅₀ μ g/mL
	44,78 \pm 0,18	51,96 \pm 1,44	57,96 \pm 3,76	62,57 \pm 0,09	69,79 \pm 0,56	71,66 \pm 5,29	72,94 \pm 2,94	40,86 \pm 3,31
Acarbose	78,125 μ g	156,25 μ g	312,5 μ g	625 μ g	1250 μ g	2500 μ g	5000 μ g	CI ₅₀ μ g/mL
	27,43 \pm 2,18	38,91 \pm 3,20	54,86 \pm 1,79	67,29 \pm 2,63	80,19 \pm 1,66	85,54 \pm 0,45	91,05 \pm 0,72	275,43 \pm 1,59
Quercétine	1,953 μ g	3,906 μ g	7,812 μ g	15,625 μ g	31,25 μ g	62,5 μ g	125 μ g	CI ₅₀ μ g/mL
	36,99 \pm 1,37	49,11 \pm 0,54	54,34 \pm 0,41	61,01 \pm 0,48	72,58 \pm 0,19	86,91 \pm 0,09	95,98 \pm 0,59	4,26 \pm 0,24

Il est juste a noté que les composés LIA-17, LIN-9 et LIN-10 ont été également testés pour leur activité anticholinestérase mais les résultats étaient négatifs.

Référence bibliographique

- [1] <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srd/NIST1a11Ver2-0Man.pdf>
- [2] Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F. and Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res.* **2015.** 29:1589-1613.
- [3] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry.* **1992.** 31:3307-3330.
- [4] Fowler ZL. and Koffas MAG. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009.** 83:799-808.
- [5] Abdel-Kader MS. Two New Nor-phenylpropanoid Glucosides and Hemipholin from the Flowers of *Ononis vaginalis*. *J Braz Chem Soc.* **1997.** 8:637-639.
- [6] Joubouhi C., Mabou FD., Tebou PLF., Ngnokam D. and Harakat D. Voutquenne-Nazabadioko L. Five new iridoïd dimers from the fruits of *Canthium subcordatum* DC (syn. *Psydrax subcordata* DC). *Phytochemistry Letters.* **2015.** 13:348-354.
- [7] Krull RE., Stermitz FR., Franzyk H. and Jensen SR. iridoid glycoside biosynthesis in *pentemon secudiflorus*. Another H-5, H-9 *trans* iridoid glycoside. *Phytochemistry.* **1998.** 49:1605-1608.
- [8] Zhang Y., Chen Y., Fan C., Ye W. and Luo J. Two new iridoid glucosides from *Hedyotis diffusa*. *Fitoterapia.* **2010.** 81:515-517.
- [9] Bianco A., Guiso M., Pellegrini G., Nicoletti M. and Serafini M. Muralioside, an iridoid from *Cymbalaria muralis*. *Phytochemistry.* **1997.** 44:1515-1517.
- [10] Ilieva EI., Handjieva NV. and Popov SS. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry.* **1992.** 31:1040-104.
- [11] Segueni N., Zellagui A., Moussaoui F., Lahouel M. and Rhouati S. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry.* **2016.** 9:425-428.
- [12] Handjieva NV., Ilieva EI., Spassov SL. and Popov SS. Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* **1993.** 49:9261-9266.
- [13] Otsuka H. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* **1993.** 33:617-622.
- [14] Franzyk H., Jensen SR., Thale Z. and Olsen CE. Halohydrins and Polyols Derived from Antirrhinoside: Structural Revisions of Muralioside and Epimuralioside. *Nat Prod Res.* **1999.** 62:275-278.
- [15] Lim H., Son KH., Chang HW., Bae K., Kang SS. and Kim HP. Anti-inflammatory Activity of Pectolarigenin and Pectolarin Isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biol Pharm Bull.* **2008.** 31:2063-2067.
- [16] Rai NP., Adhikari BB., Paudel A., Masuda K., Mckelvey RD. and Manandhar MD. Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococcacoriacea* of Nepalese origin. *J Nepal Chem Soc.* **2006.** 21:486-547.
- [17] Aissaoui H., Menad A., Mezhoud S., Ameddah S., Mekkiou R., Benayache S and Benayache F. phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Lifago dielsii schweinj.* & *Muschl* (Asteraceae). *International journal of phytomedicine.* **2014.** 6:280-285.

- [18] Takahashi T. and Miyazawa M. Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues. *Pharmazie*. **2010**. 65:913-918.
- [19] Ozturk M., Tel G., Aydogmus Ozturk F. and Duru ME. The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Rec Nat Prod*. **2014**. 8:189-194.
- [20] Ayaz M., Junaid M., Ullah F., Subhan F., Sadiq A., Ali G., Ovais M., Shahid M., Ahmad A. and Wadood A. Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Front Pharmacol*. **2017**. 8:697.
- [21] Loizzo MR., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti GA., Deguin B., Tillequin F., Menichini F. and Houghton PJ. Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat Prod Commun*. **2007**. 2:759-763.
- [22] Aydogdu I., Zihnioglu F., Karayildirim T., Gulcema D., Alankus-Caliskan O. and Bedir E. α -glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *Eriocalyx*. *Nat Prod Commun*. **2010**. 5:841-844.

Conclusion générale

Dans le présent travail, nous avons procédé à l'étude phytochimique et biologique des parties aériennes d'une espèce du genre *Linaria* : *Linaria scariosa* Desf., espèce algérienne saharienne, endémique pour l'Algérie et la Tunisie, appartenant à la famille Scrophulariaceae et qui n'a jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques.

Sur le plan chimiotaxonomique, et en se basant sur les résultats de la GC/MS, la composition chimique des extraits est en bon accord avec celle des plantes de la famille Scrophulariaceae, dans laquelle les iridoïdes et leurs dérivés glycosidiques sont des marqueurs chimiotaxonomiques.

L'investigation phytochimique réalisée sur *L. scariosa* a permis d'isoler par diverses méthodes chromatographiques, 10 composés naturels. L'identification de ces composés a été réalisée par combinaison de différentes méthodes spectrales à savoir : la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT) et 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY). Il s'agit de quatre iridoïdes dont un nouveau, cinq flavonoïdes dont deux nouveaux et un stérol :

- **LIA-17** : 6-*O-trans*-cinnamoylantirrhinoside
- **LIN-4** : antirrhinoside
- **LIN-1** : antirrhidine
- **LIN-2** : linarioside
- **LIN-9** : desméthoxycentaureidine-7-*O*- β -neohesperidoside
- **LIN-10** : desméthoxycentaureidine-7-*O*- α -rhamnopyranosyl(1'''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside
- **LIA-22** : pectolinarigénine
- **LIA-6** : hemipholine
- **LIN-7** : Pectolinarine
- **LIN-11** : daucostérol

Ces produits sont isolés pour la première fois de l'espèce *Linaria scariosa*, et le produit hemipholin est isolé pour la première fois du genre *Linaria*.

Les activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et anticholinestérase) étudiées sur les extraits montrent que l'espèce a un pouvoir antioxydant significatif dans les

concentrations utilisées expliqué par les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux, elle a également une efficacité pour l'activité anticholinestérase.

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase réalisée sur les trois nouveaux produits indique que le nouveau iridoïdes (6-*O-trans*-cinnamoylantirinoside) a un effet inhibiteur de l' α -glucosidase remarquable, ce qui est en accord avec les résultats des recherches préalablement réalisées sur l'antirinoside.

Référence bibliographique

- Abdel-Kader MS.** Two New Nor-phenylpropanoid Glucosides and Hemipholin from the Flowers of *Ononis vaginalis*. *J Braz Chem Soc.* **1997.** 8:637-639.
- Agrawal PK.** NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry.* **1992.** 31:3307-3330.
- Ahmad VU., Kousar F., Zubair M., Khan A., Ali MS., Choudhary MI. and Sener B.** A new iridoid glycoside from *Linaria genistifolia*. *Fitoterapia.* **2006.** 77:12-14.
- Ahmed E., Arshad M., Khan MZ., Amjad MS., Sadaf HM., Riaz I., Sabir S. and Nabila Ahmad A.** Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* **2017.** 6: 205-214.
- Aissaoui H., Menad A., Mezhoud S., Ameddah S., Mekkiou R., Benayache S and Benayache F.** phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Lifago dielsii schweinj. & Muschl* (Asteraceae). *International journal of phytomedicine.* **2014.** 6:280-285.
- Alvarez A., Real R., Perez M., Mendoza G., Prieto JG. and Merino G.** Modulation of the activity of ABC Transporters (P-Glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharmac Sci.* **2010.** 99:598-617.
- Andres A., Donovan SM. and Kuhlenschmidt MS.** Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **2009.** 20:563-569.
- Andres S., Hansen U., Niemann B., Palavinskas R. and Lampen A.** Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover. *Food Funct.* **2015.** 6:2017-2025.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M. and Karademir SE.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem.* **2004.** 52:7970-7981.
- Ayaz M., Junaid M., Ullah F., Subhan F., Sadiq A., Ali G., Ovais M., Shahid M., Ahmad A. and Wadood A.** Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Front Pharmacol.* **2017.** 8:697.
- Aydođdu İ., Zihniođlu F., Karayildirim T., Gülcemal D., Alankuř-Çalıřkan Ö. and Bedir E.** α -Glucosidase Inhibitory Constituents of *Linaria kurdica* subsp. *ericalyx*. *Natural Product Communications.* **2010.** 5:841-844.
- Bachheti RK., Pandey DP., Joshi A. and Rana V.** Chemical Analysis of Aerial Parts of *Justicia gendarussa*. *International Journal of Chem Tech Research.* **2011.** 3:244-247.

- Bakhtiari M., Panahi Y., Ameli J. and Darvishi B.** Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother.* **2017.** 93:218-229.
- Balasundram N., Kalyana Sundram K. and Samman S.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* **2006.** 99:191-203.
- Benrezzouk R., Terencio MC., Ferrandiz ML., San Feliciano A., Gordaliza M., Miguel del Corral JM., de la Puente ML. and Alcaraz MJ.** Inhibition of human sPLA₂ and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. *Life Sciences (Pharmacology Letters).* **1999.** 64:205-211.
- Bensouici C.** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum* (Crassulaceae). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences exactes de l'Université de Constantine, **2015.**
- Bessam FZ. and Mehdadi Z.** Evaluation of the Antibacterial and Antifongigal Activity of different extracts of Flavonoïques *Silybum Marianum* L. *Advances in Environmental Biology.* **2014.** 8:1-9.
- Bianco A., Guiso M., Ballero M., Foddai S., Nicoletti M., Piccin A., Serafini M. and Tomassini L.** Iridoids in the Flora of Italy: Glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat Prod Res.* **2004.** 18:241-246.
- Bianco A., Guiso M., Martino M., Nicoletti M., Serafini M., Tomassini L., Mossa L. and Poli F.** Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. *Phytochemistry.* **1996.** 42:89-91.
- Bianco A., Guiso M., Mazzel RA., Piccioni F., Nicoletti M., Serafini M. and Ballero M.** Iridoids in the flora of Italy 14. 6'-O-acetylantirrhinoside, a new iridoid glucoside from *Linaria flava* subsp. *sardoa*. *Fitoterapia.* **1996.** 67:364-366.
- Bianco A., Guiso M., Pellegrini G., Nicoletti M. and Serafini M.** Muralioside, an iridoid from *Cymbalaria muralis*. *Phytochemistry.* **1997.** 44:1515-1517.
- Bianco A., Guiso M., Procaccio C., Nicoletti M., Serafini M. and Tomassini L.** Iridoids in the flora of Italy. 8. A new methyl-cyclopentanoid monoterpene from *Linaria purpurea*. *Gazzetta Chimica Italiana.* **1997.** 127:407-409.
- Bishayee A., Ahmed S., Brankov N. and Perloff M.** Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci.* **2011.** 16:980-996.
- Black CA., Parker M., Siebert TE., Capone DL. and Francis IL.** Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* **2015.** 21:582-600.

- Blázovics A., Lugasi A., Szentmihályi K. and Kéry A.** Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis*. **2003**. 47:99-102.
- Blois MS.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **1958**. 181:1199-1200.
- Bohlmann J. and Keeling CI.** Terpenoid biomaterials. *Plant J*. **2008**. 54:656-669.
- Boje K., Lechtenberg M. and Nahrstedt A.** New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. *Planta Medica*. **2003**. **69:820-825**.
- Boros CA. and Stermitz FR.** Iridoids. An Updated Review, Part I. *Journal of Natural Products*. **1990**. 53:1061.
- Bougandoura N. and Bendimerad N.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. **2013**. 9:14-19.
- Boukef MK.** Médecine traditionnelle et pharmacopée. *ISBN*. **1986**.
- Bouratoua A., Khalfallah A., Bensouici C., Kabouche Z., Alabdul Magid A., Harakat D., Voutquenne-Nazabadioko L. and Kabouche A.** Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Nat Prod Res*. **2018**. 32:1873-188.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **2001**. 161:839-851.
- Briggs LH., Cain BF., Le Quesne PW. and Shoolery JN.** The structure of asperuloside. *Tet Lett*. **1963**. 4:69-74.
- Brodowska KM.** Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*. **2017**. 7:108-123.
- Brogard JM., Willemin BB., Blickli JF., Lamalle AM. and Stahl A.** Inhibiteurs des alpha-glucosidases une nouvelle approche thérapeutique du diabète et des hypoglycémies fonctionnelles. *Rev Med Interne*. **1989**. 10:365-74.
- Bruneton J.** Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales), **3ème Ed**, Paris. **1998**.
- Bruneton J.** Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes Médicinales), **4ème Ed**. *Tech & Doc*, Paris. **2009**. 707-729.
- Calis I., Kirmizibekmez H. and Sticher O.** Iridoid glycosides from *Globularia trichosantha*. *J Nat Prod*. **2001**. 64:60-64.

- Calis I., Yuruker A., Ruegger H., Wright AD. and Sticher O.** Lantanoside, a monocyclic C10 iridoid glucoside from *viburnum lantana*. *Phytochemistry*. **1995**. 38:163-165.
- Carbonezi CA., Martins D., Young MCM., Lopes MN., Furlan M., Filho ER. and Bolzani VdS.** Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. **1999**. 51:781-785.
- Cavill G. and Ford D.** The Chemistry of Ants. III. Structure and Reactions of Iridodial. *Aust J Chem*. **1960**. 13:295.
- Cavill G., Ford D. and Locksley H.** The chemistry of ants. I. Terpenoid constituents of some Australian Iridomyrmex species. *Aust J Chem*. **1956**. 9:288.
- Chelladurai GRM. and Chinnachamy C.** Alpha amylase and Alpha glucosidase inhibitory effects of aqueous stem extract of *Salacia oblonga* and its GC-MS analysis. *Braz J Pharm Sci*. **2018**. 54:1-10.
- Chen HQ., Jin ZY., Wang XJ., Xu XM., Deng L. and Zhao JW.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci Lett*. **2008**. 448:175-179.
- Chena B., Liu Y., Liuc HW., Wanga NL., Yang BF. and Yao XS.** Iridoid and Aromatic Glycosides from *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. And Their Inhibition of $[Ca^{+2}]_i$ Increase Induced by KCl. *chemistry and biodiversity*. **2008**. 5:1723-1735.
- Cheng MJ., Tsai IL. and Chen IS.** Chemical Constituents from *Strychnos Cathayensis*. *J Chin Chem Soc*. **2001**. 48:235-239.
- Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F. and Benayache S.** Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res*. **2015**. 29:1589-1613.
- Cheyrier V.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. **2005**. 81:223-229.
- Chiang LC., Ng LT., Chiang W., Chang MY. and Lin CC.** Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med*. **2003**. 69: 600-604.
- Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I. and Król W.** Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules*. **2015**. 20:1610-1625.
- Collu G., Garcia AA., van der Heijden R. and Gerpoorte R.** Activity of the cytochrome P450 enzyme geranyol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures. *Plant Sc*. **2002**. 162:165-172.

- Collu G., Unver N., Peltenburg-Looman AMG., van der Heijden R., Verpoorte R. and Memelink J.** Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* **2001.** 508:215-220.
- Contin A., van der Heijden R., Lefeber AW. and Verpoorte R.** The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* **1998.** 434:413-416.
- Cuender M., Hostettmann K., Potterat O. and Dyatmiko W.** Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta.* **1997.** 80:1144-1152.
- Cuendet M., Potterat O. and Hostettmann K.** Iridoid glucosides, phenylpropanoid derivatives and flavonoids from *Bartsia alpine*. *Pharmaceutical Biology.* **1999.** 37:318-320.
- Cushnie TP. and Lamb AJ.** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* **2005.** 26:343-356.
- D'Abrosca B., Florentino A., Monaco P. and Pacifico S.** Radical-scavenging activities of new hydroxylated ursane triterpenes from cv. Annurca apples. *Chem Biodiv.* **2005.** 2:953-958.
- Dai JQ., Liu ZL. and Yang L.** Non-glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica*. *Phytochemistry.* **2002.** 59:537-542.
- Danelli MGM., Soares DC., Abreu HS., Pecanha LMT. and Saraiva EM.** Leishmanicidal effect of LLD-3, a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry.* **2009.** 70:608-614.
- Da Silva VC., Giannini MJSM., Carbone V., Piacente S., Pizza C., Bolzani VdS. and Lopes MN.** New Antifungal Terpenoid Glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). *Helv Chim Acta.* **2008.** 91:1355-1362.
- Davis PH.** Flora of Turkey and the East Aegean Island. *Edinburgh University Press.* Edinburgh. **1978.** 6:825.
- Decker EA. and Welch B.** Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agr Food Chem.* **1990.** 38:674-677.
- Degot AV., Fursa NS., Zaitsev VG., Chaika EA., Popova TP., Litvinenko VI. And Kornievskii YI.** Study of *Linaria macroura*. *Chem Nat Comp.* **1983.** 3:388-389.
- Devappa RK., Makkar HPS. and Becker K.** *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc.* **2011.** 88:301-22.

- Dewick PM.** The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural product reports*. **2002**. 19:181-222.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo AA. and Capasso F.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci*. **1999**. 65:337-353.
- Dinda B. and Debnath S.** Monoterpenes: Iridoids. In Ramawat K, Mérillon J (Eds). *Natural Products*. Berlin Heidelberg: Springer, **2013**. 3009-3067.
- Dinda B., Debnath S. and Harigaya Y.** Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2007**. 55:159-222.
- Dinda B., Debnath S. and Harigaya Y.** Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2007**. 55:689-728.
- Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D. and Rohdich F.** Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*. **2004**. 61:1401-1426.
- Ellman GL., Courtney KD., Andres V. and Featherston RM.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. **1961**. 7:88-95.
- Ercil D., Sakar MK., Del Olmo E. and San Feliciano A.** Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turk J Chem*. **2004**. 28:133-139.
- Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis IP., Tsimidou M. and Boskou D.** Identification and Quantification of Caffeic and Rosmarinic Acid in Complex Plant Extracts by the Use of Variable-Temperature Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem*. **2001**. 49:2-8.
- Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E. and Quetin-Leclercq J.** Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. **2001**. 12:707-15.
- Falcone Ferreyra ML., Rius SP. and Casati P.** Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. **2012**. 3:1-15. **1975**.
- Ferhat M., Harkat H., Lavaud C., Haba H., Long C. and Benkhaled M.** Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum.subsp. *fruticosa*. *Biochem Sys & Ecol*. **2010**. 38:833-835.
- Fleeger JL. and Flipse IJ.** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J Dairy Sci*. **1964**. 47: 535-8.
- Fowler ZL. and Koffas MAG.** Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2009**. 83:799-808.

- Franzyk H., Jensen SR., Thale Z. and Olsen CE.** Halohydrins and Polyols Derived from Antirrhinoside: Structural Revisions of Muralioside and Epimuralioside. *Nat Prod Res.* **1999.** 62:275-278.
- Fu L., Zhang S., Li N., Wang J., Zhao M., Sakai J., Hasegawa T., Mitsui T., Kataoka T., Oka S., Kiuchi M., Hirose K. and Ando M.** Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J Nat Prod.* **2005.** 68:198-206.
- Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U. and Caristi C.** Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules.* **2007.** 12:1641-1673.
- Geleijnse JM. and Hollman PC.** Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms. *Am J Clin Nutr.* **2008.** 88:12-13.
- Ghasemzadeh A. and Ghasemzadeh N.** Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research.* **2011.** 5:6697-6703.
- Ghisalberti EL.** Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine.* **1998.** 5:147-163.
- Gonuz A., Dujger B. and Kargioglu M.** The Morphological, Anatomical properties and Antimicrobial Activity of Endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pak J Biol Sci.* **2005.** 8:220-336.
- Gordaliza M., Miguel Del Corral JM., de la Puente LM., Garcia-Grávalos MD. and San Feliciano A.** Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg Med Chem Lett.* **1997.** 7:1649-1654.
- Goto T., Takahashi N., Hirai S. and Kawada T.** Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism. *PPAR Res.* **2010.** 10:1-9.
- Graikou K., Aligiannis N., Chinou IB. and Harvala C.** Cantleyoside-dimethyl-acetal and Other Iridoid Glucosides from *Pterocephalus perennis* - Antimicrobial Activities. *Z Naturforsch.* **2002.** 57:95-99.
- Grayer RJ. and Harborne JB.** A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry.* **1994.** 37:19-42.
- Guan HF., Liu XQ., Lan Z., Wang RR. and Hua H.** Content determination of pectolinarin and hesperidin in *Linaria vulgaris* subsp. *sinensis* (Bebeaux) Hong by HPLC. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao.* **2009.** 26:119-122.
- Guimarães AG., Quintans JSS. and Quintans-Júnior LJ.** Monoterpenes with analgesic Activity-A systematic review. *Phytother Res.* **2012.** 27:1-15.

- Guiso M., Tassone G., Nicoletti M., Serafini M. and Bianco A.** Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat Prod Res.* **2007.** 21:1212-1216.
- Halbwirth H.** The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *Int J Mol Sci.* **2010.** 11:595-621.
- Hamerski L., Furlan M., Silva DHS., Cavaleiro AJ., Eberlin MN., Tomazela DM. and Bolzani VDS.** Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* **2003.** 63:397-400.
- Handjieva NV., Ilieva EI., Spassov SL. and Popov SS.** Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* **1993.** 49:9261-9266.
- Harborne JB.** Comparative biochemistry of flavonoids. I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry.* **1966.** 5:111-115.
- Harborne JB., Mabry TJ. and Mabry H.** The Flavonoids. *Academic Press, New York.* **1975.**
- Harborne JB. and Valdes B.** Identification of scutellarein 4'-methyl ether in *Linaria aeruginea*. *Phytochemistry.* **1971.** 10:2850-2851.
- Hayat M., Abbas M., Munir F., Hayat MQ., Keyani R. and Amir R.** Potential of plant flavonoids in pharmaceuticals and nutraceuticals. *J Biomol Biochem.* **2017.** 1:12-17.
- Heim KE., Tagliaferro AR. and Bobilya DJ.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutrit Biochem.* **2002.** 13:572-584.
- Heinig U. and Jennewein S.** Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African Journal of Biotechnology.* **2009.** 8:1370-1385.
- Hossen F., Ahasan R., Haque MR., Begum B. and Hasan CM.** Crispene A, B, C and D, Four New Clerodane Type Furanoid Diterpenes from *Tinospora crispa* (L.). *Pharmacogn Mag.* **2016.** 12:37-41.
- Hua H., Hou B., Li W., Li X. and Zhang Y.** Triterpenes from butter-and-eggs (*Linaria vulgaris*). *Chin Trad Herb Drugs.* **2000.** 31:409-412.
- Hua H., Li X., Xing SE. and Pei YH.** Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin Pharm J.* **2005.** 40:653-656.
- Hua H., Li X. and Zhang H.** Steroids from *Linaria vulgaris* Mill. *J Shenyang Pharm Univ.* **2000.** 17:40-42.
- Hua H., Sun J. and Li X.** Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). *Chin Trad Herb Drugs.* **1999.** 30:332-334.
- Huang S., Zhang CP., Li GQ., Sun YY., Wang K. and Hu FL.** Identification of Catechol as a New Marker for Detecting Propolis Adulteration. *Molecules.* **2014.** 19:10208-10217.

- Huang WJ., Niu HS., Lin MH., Cheng JT. and Hsu FL.** Antihyperglycemic Effect of Catalpol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nat Prod.* **2010.** 73:1170-1172.
<https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srd/NIST1a11Ver2-0Man.pdf>.
- Ilieva E., Handjieva N., Bankova V., Popov S. and Evstatieva L.** Iridoid and flavonoid glycosides from *Linaria* species. *Bulgarian Chem Commun.* **1992.** 25:400-406.
- Ilieva E., Handjieva N., Spassov S. and Popov S.** 5-O-allosylantirrhinoside from *Linaria* species. *Phytochemistry.* **1993.** 32:1068-1070.
- Ilieva E., Handjieva N. and Popov S.** Genistifolin and other iridoid glucosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. *Zeitschrift fuer Naturforschung.* **1992.** 47:791-793.
- Ilieva EI., Handjieva NV. and Popov SS.** Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris.* *Phytochemistry.* **1992.** 31:1040-1044.
- Ilieva E., Khandzheva N. and Popov S.** Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris.* *Phytochemistry.* **1992.** 31:1040-1041.
- Inouye H., Ueda S. and Uesato S.** Intermediacy of iridodial in the biosynthesis of some iridoid glucosides. *Phytochemistry.* **1977.** 16:1669-1675.
- Itoh A., Oya N., Kawaguchi E., Nishio S., Tanaka Y., Kawachi E., Akita T., Nishi T. and Tanahashi T.** Secoiridoid Glucosides from *Strychnos spinosa.* *J Nat Prod.* **2005.** 68:1434-1436.
- Iwashina T.** The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res.* **2000.** 113:287-299.
- Izzo AA.** PAF and the digestive tract. A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **1996.** 48:1103-1111.
- Jaishree V., Badami S. and Krishnamurthy PT.** Antioxidant and hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Enicostemma axillare* (Lam). Raynal against CCL4-induced liver injury in rats. *Indian J Exp Biol.* **2010.** 48:896-904.
- Jensen SR., Franzyk H. and Wallander E.** Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry.* **2002.** 60:213-231.
- Jensen SR. and Schripsema J.** Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, L & Albert V. Eds *Cambridge University Press.* **2002.** 573-584.
- Jian B., Zhang H., Han C. and Liu J.** Anti-Cancer Activities of Diterpenoids Derived from *Euphorbia fischeriana* Steud. *Molecules.* **2018.** 23:387.
- Jiangsu College of New Medicine,** "A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines". *People's Hygiene Publisher.* Beijing. 1977.

- Jin JL., Lee S., Lee YY., Heo JE., Kim JM. and Yun-Choi HS.** Two new non-glycosidic iridoids from the leaves of *Campsis grandiflora*. *Planta Med.* **2005.** 71:578-580.
- John SA. and Annadurai A.** GC-MS screening of active secondary metabolites present in the *Cleome gynandra*. *International Journal of Phytopharmacy.* **2015.** 5:47-52.
- Joubouhi C., Mabou FD., Tebou PLF., Ngnokam D. and Harakat D. Voutquenne-Nazabadioko L.** Five new iridoïd dimers from the fruits of *Canthium subcordatum* DC (syn. *Psydrax subcordata* DC). *Phytochemistry Letters.* **2015.** 13:348-354.
- Kale A., Gawande S. and Kotwal S.** Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research.* **2008.** 22:567-577.
- Kanchanapoom T., Kasai R. and Yamasaki K.** Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia*. *Phytochemistry.* **2002.** 60:769-771.
- Kaneko T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. and Duc NM.** Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry.* **1997.** 45:907-910.
- Kanko C., Oussou RK., Akcah J., Boti JB., Seri-Kouassi BP. and Casanova J.** Structure des composés majoritaires et activité insecticide des huiles essentielles extraites de sept plantes aromatiques de Côte D'ivoire. *International Journal of Engineering and Applied Sciences.* **2017.** 4:27-34.
- Kapoor R., Rishi AK. and Atal CK.** A rarely methylated new flavonol aglycone from *Linaria dalmatica*. *Fitoterapia.* **1985.** 56:296-297.
- Kataev VE., Khaybullin RN., Sharipova RR. and Strobykina IY.** Ent-Kaurane Diterpenoids and Glycosides: Isolation, Properties, and Chemical Transformations. *Review Journal of Chemistry.* **2011.** 1:93-160.
- Katerere DR., Gray AI., Nash RJ. and Waigh RD.** Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry.* **2003.** 63:81-88.
- Kelemen L. and Scedo C.** Data about the polyphenol content of *Linaria vulgaris* Mill species. *Farmacia (Bucharest, Romania).* **2003.** 51:86-89.
- Khan MTH., Ather A., Thompson KD. and Gambari R.** Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research.* **2005.** 67:107-119.
- Kim SR., Lee KY., Koo KA., Sung SH., Lee NG. and Kim JW.** Four new neuroprotective iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* roots. *J Nat Prod.* **2002.** 65:1696-1699.
- Kitagawa I., Yoshihara M., Tani T. and Yosioka I.** Linaridial, a new cis-clerodane-type diterpene dialdehyde from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* **1975.** 1:23-26.
- Kochs G. and Grisebach H.** Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur J Biochem.* **1986.** 155:311-318.

- Kouichi M., Takashi T., Isao K., Toshihiro F., Yuki Y. and Kanji I.** New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J Nat Med.* **2011.** 65:172-175.
- Krohn K., Gehle D., Dey SK., Nahar N., Mosihuzzaman M., Sultana N., Sohrab MH., Stephens PJ., Pan JJ. and Sasse F.** Prismatomerin, a new iridoid from *Prismatomeris tetrandra*. Structure elucidation, determination of absolute configuration, and cytotoxicity. *J Nat Prod.* **2007.** 70:1339-1343.
- Krull RE., Stermitz FR., Franzyk H. and Jensen SR.** iridoid glycoside biosynthesis in *pentemon secudiflorus*. Another H-5, H-9 *trans* iridoid glycoside. *Phytochemistry.* **1998.** 49:1605-1608.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. and Abdelly C.** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry.* **2007.** 45:244-249.
- Kuete V.** Phenylpropanoids and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa.* **2013.** 251-260.
- Kumar S. and Pandey AK.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal.* **2013.** 2013:1-16.
- Kumarasamy Y., Nahar L., Cox PJ., Jaspars M. and Sarker SD.** Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine.* **2003.** 10:344-347.
- Kuo RY., Qian K., Morris-Natschke SL. and Lee KH.** Plant derived triterpenes and analogues as antitumor and anti HIV agents. *Nat Prod Rep.* **2009.** 26:1321-1344.
- Kuptsova LP. and Bankovskii AI.** New flavonoid from some species of *Linaria*. *Khim Prir Soedin.* **1970.** 6:128-129.
- Kuster RM., Arnold N. and Wessjohann L.** Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem Syst Ecol.* **2009.** 37:63-65.
- Lahloub MF.** Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.)Dil. *Mansoura J Pharmac Sci.* **1992.** 8:78-95.
- Lean ME., Noroozi M., Kelly I., Burns J., Talwar D., Sattar N. and Crozier A.** Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* **1999.** 48:176-181.
- Lee MK. and Kim YC.** Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J Nat Prod.* **2001.** 64:328-331.
- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry.* **2010.** 125:288-306.

- Liao CH., Lai CC., Hsu MS., Chu FY., Wu MY., Huang YT. and Hsueh PR.** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int J Antimicrob Agents*. **2010**. 35:457-60. 7:88-95.
- Lim H., Son KH., Chang HW., Bae K., Kang SS. and Kim HP.** Anti-inflammatory Activity of Pectolarigenin and Pectolarin Isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biol Pharm Bull*. **2008**. 31:2063-2067.
- Loizzo MR., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti GA., Deguin B., Tillequin F., Menichini F. and Houghton PJ.** Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat Prod Commun*. **2007**. 2:759-763.
- Lordan S., Smyth TJ., Soler-Vila A., Stanton C. and Ross RP.** The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*. **2013**. 141:2170-2176.
- Luan F., Tang LL., Chen XX. and Liu HT.** Simultaneous Determination of Daidzein, Genistein and Formononetin in Coffee by Capillary Zone Electrophoresis. *Separations*. **2017**. 4:1-8.
- Ma J., Whittaker P., Keller AC., Mazzola EP., Pawar RS., White KD., Callahan JH., Kennelly EJ., Krynitsky AJ. and Rader JI.** Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia*. *Planta Med*. **2010**. 76:1758-1761.
- Mabry TJ., Markham KR. and Thomas MB.** The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag*, New York, Heidelberg. Berlin. **1970**. 254.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. **2004**. 79:727-747.
- Manguro LOA., Ogur JA., Okora DM., Wagai SO. and Lemmen P.** Further flavonol and iridoid glycosides from *Ajuga remota* aerial parts. *J Asian Nat Prod Res*. **2007**. 9:617-629.
- Mann J., Davidson R., Hobbs J., Banthorpe D. and Harborne JB.** *Natural products: their chemistry and biological significance*. Longman Scientific & Technical: **1994**.
- Marco JL.** Iridoid glucosides of *Linaria clementei*. *Phytochemistry*. **1985**. 24:1609-1610.
- Marion Meyer JJ., Van der Kooy F. and Joubert A.** Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC. *South African Journal of Botany*. **2007**. 73:654-656.
- Markham KR.** Flavones, Flavonols and their Glycosides. *Methods in plant biochemistry*. **1989**. 1:197-235.

- Markham KR.** Technique of flavonoides identification, *Academic press*, London. **1982**.
- Martin VJ., Pitera DJ., Withers ST., Newman JD. and Keasling JD.** Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol.* **2003**. 21:796-802.
- Mehul KB., Dholwani Kishor KD. and Ajay KS.** Isolation and structure elucidation of Scopoletin from *Ipomoea reniformis* (Convolvulaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* **2011**. 01:138-144.
- McGarvey DJ. and Croteau R.** Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* **1995**. 7:1015-1026.
- Mirzaee F., Hosseini A., Jouybari HB., Davoodi A. and Azadbakht M.** Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. *J Tradit Complement Med.* **2017**. 7:400-408.
- Mistrzak P., Celejewska-Marciniak H., Szypuła WJ., Olszowska O. and Kiss AK.** Identification and quantitative determination of pinoresinol in *Taxus media* Rehder needles, cell suspension and shoot cultures. *Acta Soc Bot Pol.* **2014**. 84:125-132.
- Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R.** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine.* **2010**. 49:963-975.
- Morikawa K., Nonaka M., Mochizuki H., Handa K., Hanada H. and Hirota K.** Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J Agric Food Chem.* **2008**. 56:11030-11037.
- Morikawa T., Pan Y., Ninomiya K., Imura K., Yuan D., Yoshikawa M., Hayakawa T. and Muraoka O.** Iridoid and Acyclic Monoterpene Glycosides, Kankanosides L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem Pharm Bull.* **2010**. 58:1403-1407.
- Morota T., Sasaki H., Nishimura H., Sugama K., Chin M. and Mitsuhashi H.** Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry.* **1989**. 28:2149-2153.
- Morreel K., Goeminne G., Storme V., Sterck L., Ralph J., Coppieters W., Breyne P., Steenackers M., Georges M., Messens E. and Boerjan W.** Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *The Plant Journal.* **2006**. 47:224-237.
- Muhammad A., Tel-çayan G., Öztürk M., Duru ME., Nadeem S., Anis I., Ng SW. and Shah MR.** Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure–activity relationships. *Pharmaceutical biology.* **2016**. 54:1649-1655.
- Muller AA. and Weigend M.** iridoids from *Loasa acerifolia*. *Phytochemistry.* **1998**. 49:131-135.

- Müller L., Gnoyke S., Popken AM. and Böhm VV.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. **2010**. 43:992-999.
- Murali R. and Saravanan R.** Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Preven Nutri*. **2012**. 2:269-275.
- Nagarajan A. and Brindha P.** Diterpenes-A Review on Therapeutic uses with special emphasis on Antidiabetic Activity. *Journal of Pharmacy Research*. **2012**. 5:4530-4540.
- Nair MSR., Memorris TC. and Anchel M.** Cassiixanthone, a hydroxyxanthone dicarboxylic acid from *cassia* species. *Phytochemistry*. **1970**. 9:1153-1155.
- Nakayama T., Sato T., Fukui Y., Yonekura-Sakakibara K., Hayashi H., Tanaka Y., Kusumi T. and Nishino T.** Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett*. **2001**. 499:107-111.
- Ngameni B., Fotso GW., Kamga J., Ambassa P., Abdou T., Fankam AG., Voukeng IK., Ngadjui BT., Abegaz BM. and Kuete V.** 9 – Flavonoids and related compounds from the medicinal plants of Africa. In: Kuete V., editor. *Medicinal Plant Research in Africa*. Elsevier; Oxford. **2013**. 301-350.
- O'Connor SE. and Maresh JJ.** Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep*. **2006**. 23:532-547.
- Oinonen PP., Jokela JK., Hatakka AI. and Vuorela PM.** Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia*. **2006**. 77:429-434.
- Olmstead RG., Depamphilis CW., Wolfe AD., Young ND., Elisons WJ. and Reeves PA.** Disintegration of the scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. **2001**. 88:348-361.
- Osato M.** Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. **2009**. 17:39-44.
- Otsuka H.** Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1993**. 33:617-622.
- Otsuka H.** Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1995**. 39:1111-1114.
- Otsuka H.** Iridolinarins A, B, and C: iridoid esters of an iridoid glucoside from *Linaria japonica*. *J Nat Prod*. **1994**. 57:357-362.
- Otsuka H.** Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J Nat Prod*. **1992**. 55:1252-1255.

- Otsuka H.** Linarionosides A-C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1994**. 37:461-465.
- Owokotomo IA., Ekundayo O., Abayomi TG. and Chukwuka AV.** In-vitro anti-cholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicology Reports*. **2015**. 2:850-857.
- Oyaizu M.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. **1986**. 44:307-315.
- Ozenda P.** Flore du Sahara Septentrional et Central. *CNRS*. **1958**. 386.
- Öztürk A., Güney KB., Bani B., Güney K., Karavelioğullari FA., Pinar NM. and Çeter T.** Pollen morphology of some *Verbascum* (Scrophulariaceae) taxa in Turkey. *Phytotaxa*. **2018**. 333:209-218.
- Ozturk M., Tel G., Aydogmus Ozturk F. and Duru ME.** The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Rec Nat Prod*. **2014**. 8:189-194.
- Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytekan M. and Fiedurek J.** Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp*. **2007**. 55:315-327.
- Panche AN., Diwan AD. and Chandra SR.** Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. **2016**. 5:1-15.
- Park HH., Lee S., Son HY., Park SB., Kim MS., Choi EJ., Singh TS., Ha JH., Lee MG., Kim JE., Hyun MC., Kwon TK., Kim YH. and Kim SH.** Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res*. **2008**. 31:1303-1311.
- Pethes E., Marczal G., Kery A. and Petho M.** Flavonoids as biologically active agents and their occurrence in the Scrophulariaceae family. *Acta Pharmaceutica Hungarica*. **1974**. 44:83-90.
- Phillips MA. and Croteau RB.** Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci*. **1999**. 4:184-190.
- Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. **2000**. 63:1035-1042.
- Quezel P. et Santa S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS*. Paris. **1963**. Vol 2.
- Rai NP., Adhikari BB., Paudel A., Masuda K., Mckelvey RD. and Manandhar MD.** Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococcacoriacea* of Nepalese origin. *J Nepal Chem Soc*. **2006**. 21:486-547.

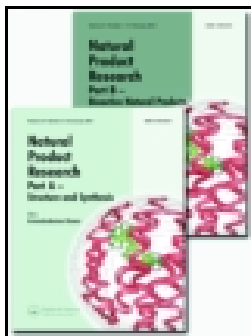
- Raja M. and Kinne RKH.** Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie*. **2015**. 115:187-193.
- Reddy GR., Morais AB. and Gandhi NN.** 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Free Radical Scavenging Assay and Bacterial Toxicity of Protein Capped Silver Nanoparticles for Antioxidant and Antibacterial Applications. *Asian Journal of Chemistry*. **2013**. 25:9249-9254.
- Refaeya MS., Hassanein AMM., Mostafa MAH., Wanas AS. and Ali AA.** Two new iridoid glycosides from *Odontonema cuspidatum* and their bioactivities. *Phytochemistry Letters*. **2017**. 22:27-32.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. **1999**. 26:1231-1237.
- Ribeiro SMR., Barbosa LCA., Queiroz JH., Knödler M. and Schieber A.** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*. **2008**. 110: 620-626.
- Rivière C., Goossens L., Guerardel Y., Maes E., Garénaux E., Pommery J., Pommery N., Désiré O., Lemoine A., Telliez A., Delelis A. and Hénichart JP.** Chemotaxonomic interest of iridoids isolated from a Malagasy species: *Perichlaena richardii*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2011**. 39:797-825.
- Sahoo N., Manchikanti P. and Dey S.** Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia*. **2010**. 81:462-71.
- Sampaio-Santos MI. and Kaplan MAC.** Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2001**. 12:144-153.
- Sangpheak W., Kicuntod J., Schuster R., Rungrotmongkol T., Wolschann P., Kungwan N., Viernstein H., Mueller M. and Pongsawasdi P.** Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated β -cyclodextrin. *Beilstein J Org Chem*. **2015**. 11:2763-2773.
- Sano S., Sugiyama K., Ito T., Katano Y. and Ishihata A.** Identification of the Strong Vasorelaxing Substance Scirpusin B, a Dimer of Piceatannol, from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds. *J Agric Food Chem*. **2011**. 59:6209-6213.
- Scalbert A., Manach C., Morand C. and Rémésy C.** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2005**. 45:287-306.
- Schripsema J., Caprini GP., van der Heijden R., Bino R., de Vos R. and Dagnino D.** Iridoids from *Pentas lanceolata*. *J Nat Prod*. **2007**. 70:1495-1498.

- Seghiri R.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine. **2007**.
- Segueni N., Zellagui A., Moussaoui F., Lahouel M. and Rhouati S.** Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*. **2016**. 9:425-428.
- Setyawan AD.** Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Nusantara Bioscience*. **2011**. 3:44-58.
- Shirley BW.** Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*. **1996**. 1:377-382.
- Singleton VL. and Rossi JAJ.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vit*. **1965**. 16:144-58.
- Smirnova LP., Boryaev KI. and Ban'kovskii AI.** Acacetin and its glycosides in plants of the genus *Linaria*. *Chem Nat Comp*. **1974**. 10:96-97.
- Sokolowska-Wozniak A., Szewczyk K. and Nowak R.** Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L.) Mill. *Herba Polonica*. **2003**. 49:161-165.
- Somboro AA., Diallo D., Sidibe L., Traore N., Fofana B., Bouare S., Chalard P., Chalchat JC., Figueredo G. and Troin Y.** Activités anticholinestérasiques des alcaloïdes totaux extraits des feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de tronc de *Guiera senegalensis*, une plante médicinale Malienne. *Int J Biol Chem Sci*. **2013**. 7:1723-1728.
- Song JL., Wang R., Shi YP. and Qi HY.** Iridoids from the flowers of *Gardenia jasminoides* Ellis and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2014**. 56:267-270.
- Staniszewska J., Szymański M. and Ignatowicz E.** Antitumor and immunomodulatory activity of *Inonotus obliquus*. *Botanical to Medical Research*. **2017**. 63: 48-58.
- Stevenson PC., Simmonds MSJ., Sampson J., Houghton PJ. and Grice P.** Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. *Phytother Res*. **2002**. 16:33-35.
- Stojanov N.** In Our Medicinal Plants, Part **II**. *Naukai Iskustvo*. Sofia. **1973**. 99.
- Stojanov Pd., Stefanov B. and Kitanov B.** In Flora Bulgaricu. Part **II**. *Naukai Iskustvo*. Sofia. **1967**, 959.
- Sun H., Fang WS., Wang WZ. and Hu C.** Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type Triterpenoids. *Botanical Studies*. **2006**. 47:339-368.

- Sun P., Song S., Zhou L., Zhang B., Qi J. and Li X.** Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*. *International journal of molecular sciences*. **2012**. 13:13748-13763.
- Takač MJM. and Topić D.** FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives. *Acta Pharm*. **2004**. 54:177-191.
- Takahashi T. and Miyazawa M.** Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues. *Pharmazie*. **2010**. 65:913-918.
- Takeda Y., Kiba Y., Masuda T., Otsuka H., Honda G., Tagawa M., Sezik E. and Yesilada E.** Nepetaracemosides A and B, Iridoid Glucosides from *Nepeta racemosa*, *Chem Pharm Bull*. **1999**. 47: 1433-1435.
- Tanahashi T., Takenaka Y. and Nagakura N.** two dimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum polyanthum*. *Phytochemistry*. **1996**. 41:1341-1345.
- Tekaya-Karoui A., Hammami S., Ben Jannet H., Hamza MA., Abreu P. and Mighri Z.** Iridoid glycosides from the aerial parts of *Linaria heterophylla* Desf growing in Tunisia. *J de la Societe Algerienne de Chimie*. **2008**. 18:149-158.
- Tel G., Apaydın M., Duru ME. and Öztürk M.** Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal Methods*. **2012**. 5:495-504.
- Tel G., Ozturk M., Duru ME. and Turkoglu A.** Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharm Biol*. **2015**. 53:824-830.
- The Manulae.** A tribe of Scrophulariaceae. *Edinburgh University Press*. Edinburgh. **1994**. 1-212.
- Tirapelli CR., Ambrosio SR., da Costa FB. and de Oliveira AM.** Diterpenes: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*. **2008**. 3:1-8.
- Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M. and Ulubelen A.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. **2007**. 103:816-822.
- Topçuan G. and Gören AC.** Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants. *Rec Nat Prod*. **2007**. 1:1-16.
- Treutter D.** Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*. **2005**. 7:581-591.

- Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G. and Oreopoulou V.** Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. **2007**. 12:593-606.
- Tundis R., Deguin B., Dodaro D., Statti GA., Tillequi F. and Menichini F.** Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.)Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). *Bioch Sys & eco*. **2008**. 36:142-145.
- Tundis R., Deguin B., Loizzo MR., Bonesi M., Statti GA., Tillequin F. and Menichini F.** Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg Med Chem Lett*. **2005**. 15:4757-4760.
- Wahab A., Tahira., Begum S., Ayub A., Mahmood I., Mahmood T., Ahmad A. and Fayyaz N.** Luteolin and kaempferol from *cassia alata*, antimicrobial and antioxidant activity of its methanolic extracts. *Fuuast J Biol*. **2014**. 4:1-5.
- Wang TY., Li Q. and Bi KS.** Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2018**. 13:12-23.
- Wang Z., Guhling O., Yao R., Li F., Yeats TH., Rose JKC. and Jetter R.** Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit Cuticular Triterpenoids. *Plant Physiol*. **2011**. 155:540-552.
- Wegener T. and Lüpke NP.** Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens* DC.). *Phytother Res*. **2003**. 17:1165-1172.
- Wong CC., Li HB., Cheng KW. and Chen F.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*. **2006**. 97:705-711.
- Xiao XH., Yuan ZQ. and Li GK.** Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*. **2013**. 104:284-289.
- Yahi N., Vela E., Benhouhou S., De Belair G. and Gharzouli R.** Identifying Important Plants Areas (Key Biodiversity Areas for Plants) in northern Algeria. *Jott communication*. **2012**. 4:2753-2765.
- Yoshikawa M., Ueda T., Matsuda H., Yamahara J. and Murakami N.** Absolute stereostructures of hydramarosides A and B, new bioactives secoiridoid glucoside complexes from the leaves of *hydrangea macrophylla* seringe var. *thunbergii* makino. *Chem Pharm Bull*. **1994**. 42:1691-1693.

- Yuan WH., Yi YH., Xue M., Zhang HW. and La MP.** Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chin J Nat Med.* **2008.** 6:105-108.
- Zhang Y., Chen Y., Fan C., Ye W. and Luo J.** Two new iridoid glucosides from *Hedyotis diffusa*. *Fitoterapia.* **2010.** 81:515-517.
- Zhou W., Fukumoto S. and Yokogoshi H.** Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. *Nutr Neurosci.* **2009.** 12:57-64.
- Zuleta LMC., Cavalheiro AJ., Silva DHS., Furlan M., Young MCM., Albuquerque S., Castro-Gamboa I. and Bolzani VDS** seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* **2003.** 64:549-553.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


Chemical composition, *in vitro* antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Linaria scariosa* Desf

Meroua Ahmed-Chaouch, Thamere Cheriet, Giangiacomo Beretta, Djamel Sarri, Chawki Bensouici, Rayene Ouelbani, Ines Mancini, Ines Sekhara & Ramdane Seghiri

To cite this article: Meroua Ahmed-Chaouch, Thamere Cheriet, Giangiacomo Beretta, Djamel Sarri, Chawki Bensouici, Rayene Ouelbani, Ines Mancini, Ines Sekhara & Ramdane Seghiri (2019): Chemical composition, *in vitro* antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Linaria scariosa* Desf, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1629913](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1629913)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1629913>

 View supplementary material 

 Published online: 19 Jun 2019.

 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Chemical composition, *in vitro* antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Linaria scariosa* Desf

Meroua Ahmed-Chaouch^a, Thamere Cheriet^{a,b}, Giangiacomo Beretta^c, Djamel Sarri^d, Chawki Bensouici^e, Rayene Ouelbani^f, Ines Mancini^g, Ines Sekhara^a and Ramdane Seghiri^a

^aUnité de recherche valorisation des ressources naturelles, molécules bioactives et analyses physicochimiques et biologiques (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie; ^bDépartement de chimie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, Algérie; ^cDepartment of Environmental Science and Policy, University of Milan, Milan, Italy; ^dDépartement de biologie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, Algérie; ^eCentre de recherche en biotechnologie, Ali Mendjli nouvelle ville UV 03, Constantine, Algeria; ^fLaboratoire de génétique biochimie et biotechnologie végétale, Département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie; ^gDipartimento di Fisica, Laboratorio di Chimica Bioorganica, Università di Trento, Povo-Trento, Italy

ABSTRACT

The study was performed on the dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EAc) and *n*-butanol (Bu) fractions (F) obtained from the 80% ethanol extract of *Linaria scariosa* Desf. aerial parts, collected in the North Eastern region of Algeria. Remarkable total phenolic and flavonoid contents were obtained, mainly for EAcF. These results were in accordance with the antioxidant activity of EAcF against DPPH, ABTS, CUPRAC and reducing power tests. DCMF and BuF exhibited significant cholinesterase activity inhibition of BChE and AChE. Moreover, EAcF displayed only moderate antibacterial activities, especially against *S. aureus*. The biological results were correlated to the chemical components, deduced by both GC-MS analysis of the fractions and the isolation of hemipholin, pectolinarigenin, antirride, antirinoside, pectolinarin and linarioside, some of which known to exhibit potent effects on the tested biological activities. The study provides the first biological and chemical investigation on *Linaria scariosa* Desf (unresolved name).

ARTICLE HISTORY


Received 11 February 2019
Accepted 6 June 2019

KEYWORDS

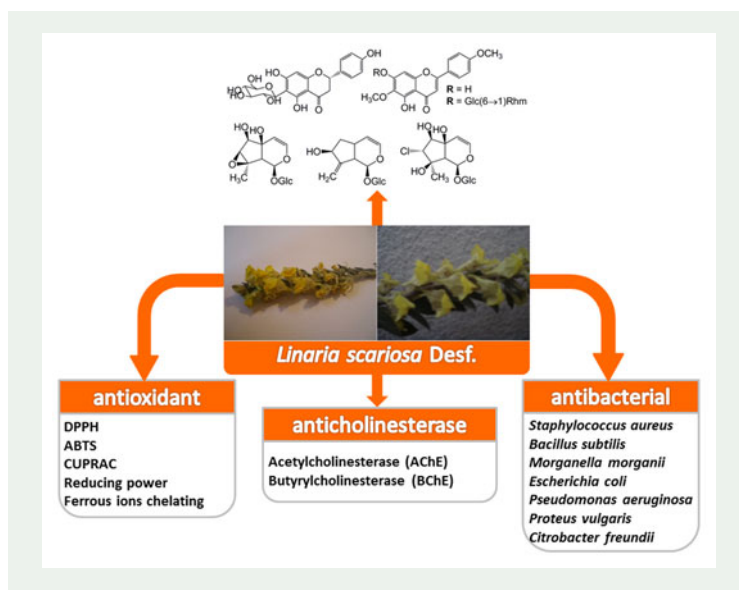
Linaria scariosa Desf;
flavonoids; iridoids;
antioxidant activity;
anticholinesterase activity;
antibacterial activity

CONTACT Thamere Cheriet  tamercheriet@umc.edu.dz

Experimental details, isolated compounds data together with Tables (S1–S6) and Figure S1 relating to this paper are available online.

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1629913>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



1. Introduction

The genus *Linaria* Mill. is common in the folkloric medicine of different nations for the use as tonic, anti-scorbutic, laxative, anti-diabetic and diuretic (Cheriet et al. 2015a). It is known for the presence of iridoids (Bianco et al. 2004; Guiso et al. 2007), and flavonoids (Cheriet et al. 2014, 2015a,b) as the major constituents with various biological activities such as anti-tumor (Tundis et al. 2005), anti-AChE (Loizzo et al. 2007), anti-inflammatory (Hanfer et al 2017), antioxidant (Hanfer et al. 2016; 2018) and antidiabetic (Cheriet et al. 2017). In the present study, we examined for the first time the *in vitro* antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of different fractions obtained from the aerial parts of *Linaria scariosa* Desf. (unresolved name) (synonyms: *Kickxia dentata* (Vahl) D.A. Sutton and *Antirrhinum dentatum* Vahl.) supported by a chemical investigation including the isolation and identification of six compounds, the phenolic and flavonoid contents as well as the GC-MS profile of each fraction with the detection of various metabolites.

2. Results and discussion

The total phenolic content (TPC) and flavonoid content (TFC) in DCM, EAc and Bu fractions were determined by Folin-Ciocalteu reagent and expressed as gallic acid (GAE) and quercetin (QE) equivalents, respectively. Ethyl acetate fraction (EAcF) showed the highest TPC ($143.6 \pm 0.002 \mu\text{g GAE/mg extract}$) and TFC ($30.19 \pm 0.006 \mu\text{g QE/mg extract}$), followed by butanol fraction (BuF) ($99.14 \pm 0.03 \mu\text{g GAE/mg extract}$ and $26.39 \pm 0.01 \mu\text{g QE/mg extract}$, respectively) and dichloromethane fraction (DCMF) ($81.64 \pm 0.01 \mu\text{g GAE/mg extract}$ and $14.98 \pm 0.01 \mu\text{g QE/mg extract}$, respectively). Based on the known ability of phenolic and other primary and secondary metabolites to act

Table 1. Antioxidant evaluation (IC₅₀ in µg/mL and A_{0.50} values^a) of the tested fractions from *L. scariosa* and of standard compounds (BHA, BHT, EDTA, ascorbic acid and α-tocopherol).

Fractions standards	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)	CUPRAC (A _{0.50})	Reducing power (A _{0.50})	Metal chelating (IC ₅₀)
DCMF	187.88 ± 1.47	23.01 ± 0.33	31.04 ± 0.52	136.83 ± 1.94	154.71 ± 1.09
EAcF	71.64 ± 1.13	22.28 ± 0.54	21.58 ± 0.77	68.31 ± 1.83	>800
BuF	292.82 ± 1.05	56.89 ± 0.99	62.76 ± 1.85	>200	>800
BHA	6.14 ± 0.41	1.81 ± 0.10	5.35 ± 0.71	–	–
BHT ^a	12.99 ± 0.41	1.29 ± 0.30	8.97 ± 3.94	–	–
EDTA	–	–	–	–	8.80 ± 0.47
Ascorbic acid	–	–	–	6.77 ± 1.15	–
α-tocopherol	–	–	–	34.93 ± 2.38	–

^aIC₅₀ and A_{0.50} values represent the means ± SEM of three parallel measurements ($p < 0.05$).

Table 2. Inhibition of electric eel acetylcholinesterase (AChE), and equine serum butyrylcholinesterase (BChE) and IC₅₀ values (µg/mL) by *L. scariosa* fractions.

fractions standard	% inhibition AChE							IC ₅₀
	200 µg	100 µg	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	3.125 µg	
DCMF	38.82 ± 5.99	38.82 ± 5.99	5.49 ± 2.09	NA	NA	NA	NA	>200
EAcF	19.73 ± 3.41	19.73 ± 3.41	NA	NA	NA	NA	NA	>200
BuF	60.73 ± 2.51	60.73 ± 2.51	42.89 ± 2.41	41.90 ± 0.00	33.42 ± 2.63	26.53 ± 7.28	15.15 ± 5.21	75.47 ± 3.50
Galantamine	94.77 ± 0.34	94.77 ± 0.34	85.78 ± 1.63	80.69 ± 0.41	68.50 ± 0.31	43.77 ± 0.00	35.93 ± 2.28	6.27 ± 1.15
	% inhibition BChE							
DCMF	68.86 ± 0.74	53.42 ± 2.10	40.20 ± 8.90	38.22 ± 0.25	22.65 ± 6.67	7.83 ± 0.74	NA	96.02 ± 0.69
EAcF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BuF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Galantamine	78.95 ± 0.58	73.57 ± 0.77	63.87 ± 2.85	45.13 ± 2.60	24.03 ± 2.94	6.93 ± 0.62	3.26 ± 0.62	34.75 ± 1.99

Values expressed are means ± S.E.M. of three parallel measurements ($p < 0.05$). NA = not active.

as antioxidants, these data correlate quite properly with the antioxidant activity of the studied fractions (Table 1). EAcF displayed the highest activity against CUPRAC and ABTS, while moderate activity was observed in its reducing power evaluation and DPPH tests (Table 1). Detailed inhibition assays of DPPH, ABTS, CUPRAC and reducing power (Table S1), and of metal chelating (Table S2) have been also provided for the *L. scariosa* fractions at different weight values.

The fractions were screened for their inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes, related to galantamine, a drug used for the treatment of Alzheimer's disease and other cognitive impairments (Table 2). The most interesting anti-AChE data were obtained for BuF. It is notable that similar studies on *L. reflexa* extracts showed instead the most remarkable activity for EAcF, containing linarin, isolinariin A and B, flavones with rutinose moiety as common part which is known to interact with AChE enzyme (Loizzo et al. 2007). This could explain why the BuF, which contains pectolinarin, exhibited a higher activity compared with EAc and DCM fractions. While EAc and Bu fractions resulted inactive against BChE at all tested concentrations, the moderate effect of DCMF can be related to its chemical composition determined by GC-MS analysis (Table S4), indicating the presence of fatty acids particularly α-linolenic (10.59%) and palmitic (19.97%) acids, known being good BChE inhibitors (Öztürk et al. 2014) and of sterols including β-sitosterol (12.46%) which possesses strong AChE inhibition (Ayaz et al. 2017).

In the evaluation on a series of pathogenic bacteria strain, BuF displayed no activity, only a moderate inhibition was observed both for EAcF against *Morganella morganii*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Proteus vulgaris*, and for against *B. subtilis* (Table S3).

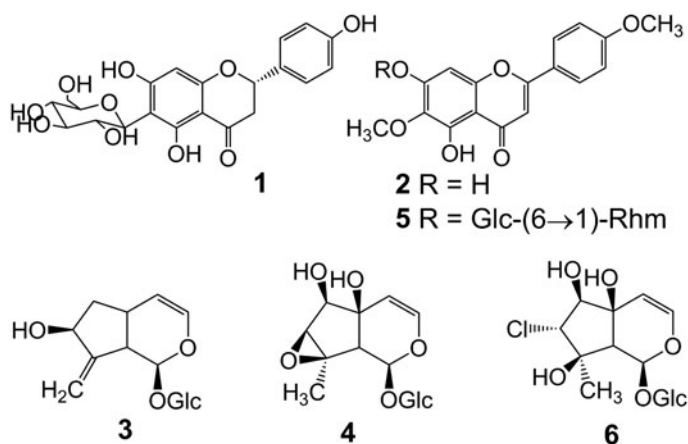


Figure 1. Chemical structures of the isolated and identified metabolites 1–6 (Cheriet et al. 2015a).

These results are in agreement with the behaviour observed for most *Linaria* species (Cheriet et al. 2015a).

Six pure metabolites were isolated and identified by NMR and MS analyses, in comparison with reported data. They were hemipholin (**1**) (Chen et al. 2015) and pectolinarigenin (**2**) (Cheriet et al. 2014) from EAcF, antirrhidine (**3**), antirrhinoside (**4**) (Hanfer et al. 2017), pectolinarin (**5**) (Cheriet et al. 2017) and linarioside (**6**) (Bianco et al. 2004) from BuF. Notably, this is the first report deals with the isolation of hemipholin from the Plantaginaceae family and the first C-glycosylated flavonoid in the genera *Linaria* Mill., *Kickxia* and *Antirrhinum*. Also a high similarity was observed in comparison with the chemical composition of some *Kickxia* like *Kickxia spuria* (Venditti et al. 2018) and *Antirrhinum* like *Antirrhinum majus* (Drøhse Høgedal and Mølgaard 2000).

The phytochemical screening by GC-MS analysis allowed to identify a wide series of molecules present in the three fractions, reported in Tables S4-S6.

3. Conclusion

In this study, we report for the first time the antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Linaria scariosa* extracts, relating them to the chemical profile established by total phenolic and flavonoid contents, by GC-MS analysis of EAc, DCM and Bu fractions, and isolation of pure metabolites. These preliminary data are promising for further studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to CRBt (Constantine-Algeria).

References

- Ayaz M, Junaid M, Ullah F, Subhan F, Sadiq A, Ali G, Ovais M, Shahid M, Ahmad A, Wadood A, et al. 2017. Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Front Pharmacol.* 8:697.

- Bianco A, Guiso M, Ballero M, Foddai S, Nicoletti M, Piccin A, Serafini M, Tomassini L. 2004. Iridoids in the flora of Italy: glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat Prod Res.* 18(3):241–246.
- Chen YJ, Xie GY, Xu GK, Dai YQ, Shi L, Qin MJ. 2015. Chemical constituents of *Pyrrhosia calvata*. *Nat Prod Commun.* 10(7):1191–1193.
- Cheriet T, Aouabdia S, Mancini I, Defant A, Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Sarri D, Leon F, Brouard I, et al. 2014. Chemical constituents of *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Der Pharm Lett.* 6:54–57.
- Cheriet T, Mancini I, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. 2015a. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res.* 29(17):1589–1613.
- Cheriet T, Baatouche S, Sarri D, Chalard P, Seghiri R, Mekkiou R, Boumaza O, Leon F, Benayache S, Benayache F. 2015b. Secondary metabolites from *Linaria tingitana*. *Chem Nat Compd.* 51(6):1202–1203.
- Cheriet T, Hanfer M, Boudjelal A, Baali N, Mancini I, Seghiri R, Ameddah S, Menad A, Benayache F, Benayache S. 2017. Glycosyl flavonoid profile, *in vivo* antidiabetic and *in vitro* antioxidant properties of *Linaria reflexa* Desf. *Nat Prod Res.* 31(17):2042–2048.
- Drøhse Høgedal B, Mølgaard P. 2000. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. *Biochem Syst Ecol.* 28(10):949–962.
- Guiso M, Tassone G, Nicoletti M, Serafini M, Bianco A. 2007. Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat Prod Res.* 21(13):1212–1216.
- Hanfer M, Cheriet T, Youcef-Ali M, Ameddah S, Menad A, Kacem Chaouche N, Seghiri R, Benayache S, Benayache F. 2016. Phytochemical screening, *in vitro* antimicrobial and antioxidant properties of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 38:135–140.
- Hanfer M, Cheriet T, Ameddah S, Mancini I, Seghiri R, Menad A, Benayache S, Benayache F. 2017. Iridoids and anti-inflammatory properties of *n*-butanol extract of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. *Nat Prod Res.* 31(17):2008–2015.
- Hanfer M, Cheriet T, Menad A, Seghiri R, Benayache S, Benayache F, Ameddah S. 2018. Modulation of liver glutathione-dependent enzymes and steatosis by *Linaria tingitana* in sodium valproate-treated rats. *J Herbs Spices Med Plants.* 24(2):173–184.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Statti GA, Deguin B, Tillequin F, Menichini F, Houghton PJ. 2007. Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat Prod Commun.* 2:759–763.
- Öztürk M, Tel G, Aydogmus Öztürk F, Duru ME. 2014. The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Rec Nat Prod.* 8:189–194.
- Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F. 2005. Potential anti-tumor agents: flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg Med Chem Lett.* 15(21):4757–4760.
- Venditti A, Frezza C, Serafini I, Ciccòla A, Sciubba F, Serafini M, Bianco A. 2018. Iridoids of chemotaxonomy relevance, a new antirrhinose ester and other constituents from *Kickxia spuria* subsp. *integrifolia* (Brot.). *Chem Biodiversity.* 15(2):e1700473.

ملخص

يظهر البحث الببليوغرافي على الجنس *Linaria* (Scrophulariaceae) انه معروف بغناه بمركبات متنوعة من الايض الثانوي خاصة الإيريديويدات والفلافونويدات المعروفة بفعاليتها البيولوجية المتنوعة.

خلال هذا البحث، ركزنا اهتمامنا على الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبتة جزائرية، *Lianaria scariosa* Desf. شجعتنا المحلية التي تمتاز بها هذه النبتة على بدء هذا العمل خاصة لأنه لم تتم دراستها مطلقا.

بدأت الدراسة بالكشف عن التركيب الكيميائي بواسطة GC/MS والذي أظهر ثراء في الإيريديويدات و هو ما يتوافق تماما مع التصنيف الكيميائي لعائلة Scrophulariaceae .

سمحت مختلف تقنيات الفصل الكروماتوغرافي المستخدمة في أبحاثنا، انطلاقا من مستخلصي الأسيتات الاثيل و البوتانول، بعزل 10 مركبات :4 إيريديويد، 5 فلافونويد و 1 ستيرول. من بين المركبات المعزولة، 1 إيريديويد يعزل لأول مرة المسمى *6-O-trans-cinnamoylantirrinolide* و 2 الفلافونويدات يعزلان لأول مرة مسميان *desmethoxycentauriedin-7-O-β-neohesperidoside* و

desmethoxycentauriedine-7-O-α-rhamnopyranosyl(1''''→2'')-β-rutinoside.

تم التعرف البنيوي للمركبات المفصولة من خلال تحليل أطياف الأشعة فوق بنفسجية-المرئية، معطيات المراجع. RMN 1D (¹H, ¹³C et DEPT), 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY), الى جانب مقارنة النتائج مع

الاختبارات على النشاطات البيولوجية: المضاد للأكسدة (في المختبر)، المضادة للكولينستيراز (في المختبر) ومضادة للبكتيريا (في المختبر)، التي أجريت على المستخلصات، بينت أن النبتة لها فعالية ملحوظة في النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للكولينستيراز.

يشير النشاط المثبط للافلا-غلوكردياز الذي تم إجراؤه على المركبات الثلاثة الجديدة إلى أن الإيريديويد الجديد له تأثير مثبط ملحوظ على للافلا-غلوكردياز.

الكلمات المفتاحية : *Lianaria scariosa* Desf.، الدراسة الفيتو كيميائية، إيريديويدات، المضاد للأكسدة، المضادة للكولينستيراز، مضادة للبكتيريا، الفا-غلوكردياز .

Résumé

Une recherche bibliographique sur le genre *Linaria* (Scrophulariaceae) montre que celui-ci est réputé pour accumuler une diversité de métabolites secondaires, en particulier les iridoïdes et les flavonoïdes, molécules connues pour leurs activités biologiques diverses.

Dans ce travail, notre intérêt a porté sur l'étude phytochimique et biologique d'une espèce algérienne, *Linaria scariosa* (Scrophulariaceae). L'endémisme de cette espèce pour l'Algérie et la Tunisie nous a encouragés à entamer ce travail, surtout que cette plante n'a jamais été étudiée.

L'étude a débuté par l'évaluation de la composition chimique par GC/MS qui a montré une richesse en iridoïdes, ce qui est tout à fait en accord avec la chimiotaxonomie de la famille Scrophulariaceae.

Les différentes méthodes chromatographiques de séparation utilisées dans notre recherche ont permis d'isoler, à partir des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol, 10 composés : quatre iridoïdes, cinq flavonoïdes et un stérol. Parmi les composés isolés, un nouveau iridoïde nommé 6-*O*-*trans*-cinnamoylantirrinoside, et deux nouveaux flavonoïdes nommés desméthoxycentaureidine-7-*O*- β -neohesperidoside et desméthoxycentauriedine-7-*O*- α -rhamnopyranosyl(1'''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside.

L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres UV-Visible, RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT) et 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les tests des activités biologiques : antioxydante (*in vitro*), anticholinestérase (*in vitro*), et antibactérienne (*in vitro*) réalisés sur les extraits, montrent que l'espèce présente une activité antioxydante et anticholinestérase remarquable.

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase réalisée sur les trois nouveaux produits indique que le nouveau iridoïde a un effet inhibiteur de l' α -glucosidase remarquable.

Mots clés : *Linaria scariosa* Desf., étude phytochimique, iridoïdes, antioxydante, anticholinestérase, antibactérienne, α -glucosidase.

Abstract

A bibliographic search on the genus *Linaria* (Scrophulariaceae) shows that this genus is reputed to accumulate a diversity of secondary metabolites, in particular iridoids and flavonoids, molecules known for their various biological activities.

In this work, our interest focused on the phytochemical and biological study of an Algerian species, *Linaria scariosa* (Scrophulariaceae). The endemism of this specie for Algeria and Tunisia has encouraged us to start this work, especially since this plant has never been studied.

The study began with the evaluation of the chemical composition by GC / MS which showed a richness in iridoids, which is in good agreement with the chemotaxonomy of the family Scrophulariaceae.

The various chromatographic separation methods used in our experiment made it possible to isolate, from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts, 10 compounds : four iridoids, five flavonoids and one sterol. Among the isolated compounds, one new iridoid named 6-*O*-trans-cinnamoylantirrinolide, and two new flavonoids named desmethoxycentauriedin-7-*O*- β -neohesperidoside and desmethoxycentauriedin-7-*O*- α -rhamnopyranosyl(1'''' \rightarrow 2'')- β -rutinoside.

The structural elucidation of the isolated compounds was carried out by analyzing the UV-Visible, NMR1D (^1H , ^{13}C and DEPT) and 2D (HSQC, HMBC, COSY and NOESY) spectra and comparing with the data of the literature.

The biological activity tests: antioxidant (*in vitro*), anticholinesterase (*in vitro*), and antibacterial (*in vitro*) performed on the extracts, show that the species exhibit remarkable antioxidant and anticholinesterase activity.

The inhibitory activity of α -glucosidase performed on the three new products indicates that the new iridoids has a remarkable inhibitory effect on α -glucosidase.

Key words: *Linaria scariosa* Desf., Phytochemical study, iridoids, antioxidant, anticholinesterase, antibacterial, α -glucosidase.