

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI-CONSTANTINE 1
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° D'ordre :.....

Série :

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences

En Chimie Organique

Option

Chimie structurale : synthèse organique et substances naturelles

**Investigation phytochimique et pharmacologique de
deux espèces du genre *Linaria*
(Scrophulariaceae)**

Par : CHÉRIET Thamere

Sous la direction du Pr. SEGHIRI Ramdane

Devant le jury :

M^{me} F. BENAYACHE	Pr. Université Frères Mentouri-Constantine	Présidente
Mr R. SEGHIRI	Pr. Université Frères Mentouri-Constantine	Directeur de thèse
M^{me} I. MANCINI	Pr. Université de Trento-Italie	Examinatrice
Mr S. BENAYACHE	Pr. Université Frères Mentouri-Constantine	Examineur
Mr A. ZELLAGUI	Pr. Université Larbi Ben Mhidi, Oum El-Bouaghi	Examineur
Mr H. DENDOUGUI	Pr. Université de Kasdi Merbah, Ouargla	Examineur

Dédicace

A ma chère mère qui m'a offert ses chaleureuses affections, vocations et sacrifices.

A mon tendre père qui m'a soutenu dans ma vie et durant mes études.

A mes amis : Fouzi, Billel, Chemsou et Mehdi sans oublier les amis de Trento

Amine, Mouataz, toufik, federrico, denise et andria.

A toute ma promotion : Abbes, Halima, Hanane, Mohamed, Naïma, Nassima, Sabrina et Wassila.

A toute ma famille.

Remerciements

Cette thèse de Doctorat en chimie organique est le résultat d'un travail de collaboration entre deux laboratoires de de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 Algérie et l'université de Trento Italie. La 1ère partie de cette recherche est réalisée au sein de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes université des Frères Mentouri Constantine 1, sous la direction du professeur **SEGHIRI Ramdane**, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans les meilleures conditions. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et ses encouragements et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer la 2ème partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de chimie bio-organique de la faculté de physique de Trento Italie sous la direction de madame le professeur **MANCINI Ines**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements vont également à Madame le professeur **BENAYACHE Fadila** de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'elle a faite en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le professeur **BENAYACHE Samir**, directeur de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (*VARENBIOMOL*) pour son accueil, son aide et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr. **CHALARD Pierre** de l'université de Clermont-Ferrand France, pour le profil GC-MS et la réalisation des spectres RMN. **LEÓN Francisco**, **BROUARD Ignacio** de l'Université de La Laguna Espagne, pour la réalisation des spectres RMN. **DEFANT Andrea** pour les calculs *Docking* de l'inhibition des enzymes, **STERNI Adriano**, de l'université de Trento, pour l'enregistrement des spectres de masse.

J'exprime également mes remerciements à l'équipe de biologie avec qui j'ai eu l'honneur de travailler, Pr. **AMEDDAH Souad** et **HANFAR Mourad** de Laboratoire de Biologie et Environnement pour l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. Dr. **BOUDJELAL Amal** pour l'activité antidiabétique et Dr. **SARRI Djamel** pour l'identification des deux espèces étudiés de l'université de M'sila. DR. **YOUCEF-ALI Mounia** et Pr. **KACEM CHAUCHE Noureddine** de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (*LaMyBAM*) pour l'activité antimicrobienne.

J'ai eu la chance et le plaisir que Mr **DENDOUGUI Hocine** et Mr **ZELLAGUI Amar** acceptent d'être des membres de jury pour cette thèse de doctorat en science.

Je suis aussi très reconnaissant à 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, ceci avec une pensée toute particulière envers Pr. **MEKKIOU**

Ratiba, Pr. BOUMAZA Ouahiba, et Monsieur HAZMOUNE Hichem pour la gentillesse, l'aide et la disponibilité.

Je remercie tous mes collègues Abbas, Halima, Hanene, Mohamed, Naïma, Nassima, Wassila et tous mes amis Fawzi, Billel, Chemsou et Mehdi et l'équipe du Spéléo club du vieux Rocher qui m'ont donné leur soutien et ont contribué avec leurs encouragements de près, ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail. A mes parents, qui me sont chers, très chers pour moi. Merci beaucoup mama à votre vocation.

Merci



beaucoup

SOMMAIRE

Table des figures	1
Table des tableaux	6
Abréviations et acronymes	8
Introduction générale.....	11
Références bibliographiques	15

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Rappel Bibliographique

1. Description de la famille Scrophulariaceae	17
2. Description du genre <i>Linaria</i>	18
3. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Linaria</i>	18
3.1. Utilisation en médecine traditionnel	18
3.2. Activités biologiques	19
4. Les investigations phytochimique sur le genre <i>Linaria</i>	20
4.1. Les terpénoïdes	20
4.1.1. Les iridoïdes	20
4.1.2. Les monoterpénoïdes	25
4.1.3. Les diterpénoïdes.....	26
4.1.4. Les triterpénoïdes	28
4.2. Les polyphénols	30
4.2.1. Les acides phénoliques	30
4.2.2. Les composés phénoliques glycosylés.....	31
4.2.3. Les flavonoïdes	33
4.3. Les alcaloïdes.....	38
4.4. Des autres composés	39
Références bibliographiques	40

Chapitre II : Les métabolites secondaires

Introduction.....	48
Généralité sur les métabolites secondaires	48
Les terpénoïdes	49
1.1. Introduction.....	49
1.2. Biosynthèse des terpénoïdes	50
1.3. Classification des terpénoïdes	51
1.3.1. Monoterpènes (C-10).....	52
1.3.2. Sesquiterpènes (C-15).....	53
1.3.3. Diterpènes (C-20).....	53
1.3.4. Sesterpènes (C-25).....	54
1.3.5. Triterpènes (C-30)	55
1.3.6. Tetraterpènes (C-40)	55
1.3.7. Iridoïdes	56
1.3.7.1. Définition	56
1.3.7.2. Classification des iridoïdes.....	57
a. Les iridoïdes simples.....	57
b. Les iridoïdes glycosylés.....	58
c. Séco-iridoïdes	58
d. Bisiridoïdes.....	59
e. Iridoïdes lactones	59
1.3.7.3. Propriétés biologiques des iridoïdes.....	59
1.4. Propriétés biologiques des terpénoïdes.....	60
2. Les flavonoïdes	60
2.1. Introduction.....	60
2.2. Structures et classification	61
2.2.1. Flavones et flavonols.....	62
2.2.2. Isoflavonoïdes	63
2.2.3 Flavanonones et dihydroflavonols	64
2.2.4. Chalcones et auronones.....	65
2.3. Origine biosynthétiques de flavonoïdes.....	65
2.4. Substitution du squelette flavonoïque.....	72
2.4.1. La O-substitution	73
2.4.1.1. L'hydroxylation	73
2.4.1.2. La méthylation	73
2.4.1.3. La O-glycosylation.....	74
2.4.2. La C-substitution.....	75
2.4.2.1. La C-méthylation	75

2.4.2.2. La C-glycosylation	75
2.5. Les fonctions des flavonoïdes dans les plantes	76
2.5.1. Le rôle de protection contre le stress environnemental	76
2.5.2. Les rôles comme composés de défense	77
2.5.2.1. Interaction plantes-microorganismes	77
2.5.2.2. Interaction plantes-plantes	78
2.5.2.3. Interaction plantes-pathogènes	79
2.5.2.4. Interaction plantes-insectes et animaux	79
2.5.3. Rôles dans la fertilité des plantes	79
2.6. Les activités biologiques des flavonoïdes	80
2.6.1. Activité antimicrobienne	80
2.6.1.1. Activité antibactérienne	81
2.6.1.2. Activité antifongique.....	83
2.6.1.3. Activité antivirale	84
2.6.2. Activité antioxydante.....	85
2.6.3. Activité anti-inflammatoire.....	86
2.6.4. Activité antiparasitaire.....	87
2.6.4.1. <i>Plasmodium sp.</i>	87
2.6.4.2. <i>Leishmania sp.</i>	88
2.6.4.3. <i>Trypanosoma sp.</i>	89
2.6.5. Activité antiproliférative et anticarcinogénique	89
2.6.5.1. Inhibition métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes	90
2.6.5.2. Agent suppresseurs de la carcinogénèse.....	92
2.6.5.3. Action sur la résistance des cellules tumorales	92
2.6.5.4. Action sur la vascularisation des tumeurs.....	93
2.6.6. Activité estrogénique et anti-estrogénique	94
2.6.6.1. Les récepteurs aux estrogènes	94
2.6.6.2. Principales sources des phytoestrogènes	94
2.6.6.3. Activités des phytoestrogènes	94
2.6.7. Activité sur le système cardio-vasculaire.....	97
2.6.8. D'autres activités biologiques des flavonoïdes	97
2.7. Étude chimique des flavonoïdes	97
2.7.1. Récolte de la plante.....	98
2.7.2. Extraction des flavonoïdes	98
2.7.3. Méthodes de séparation et de purification	99
2.7.3.1. Généralité sur la chromatographie	99
2.7.3.2. Principe générale de la chromatographie	99

2.7.3.3. Les différentes techniques chromatographiques	100
a. La chromatographie sur colonne (CC)	100
b. La chromatographie préparative sur papier (CP)	100
c. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	100
d. La chromatographie sur couche mince préparative	101
2.7.4. Identification structurale des flavonoïdes.....	101
2.7.4.1. Facteurs de retardement (R_f).....	101
2.7.4.2. La fluorescence sous lumière de Wood.....	102
2.7.4.3. La spectrophotométrie UV-visible	102
a. Le spectre UV-visible des flavonoïdes dans le MeOH.....	103
b. Addition des réactifs (la série spectrale UV)	104
2.7.4.4. L'hydrolyse acide des hétérosides	107
2.7.4.5. La spectrométrie de masse	107
a. historique	107
b. principes générale	108
2.7.4.6. La résonance magnétique nucléaire (RMN)	108
a. RMN ^1H	108
b. RMN ^{13}C	109
c. RMN bidimensionnelle	109
Références bibliographiques	111

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Étude Phytochimique et biologique

1. Critères de choix des deux espèces	132
2. Place dans la systématique botanique	132
3. Description botanique des espèces étudiées.....	132
3.1. <i>Linaria tingitana</i> Boiss. & Reut.	132
3.2. <i>Linaria reflexa</i> Desf.....	133
4. Matériels et méthodes chromatographiques utilisés pour l'étude phytochimique	134
5. Étude phytochimique de <i>Linaria tingitana</i>	136
5.1. L'extraction	136
5.2. Étude phytochimique de l'extrait chloroforme de <i>L. tingitana</i>	138
5.2.1. Fractionnement de l'extrait chloroforme.....	138

5.2.2. Séparation des composés de l'extrait chloroforme	139
a. Étude de la fraction LT C7	139
b. Étude de la fraction LT C9.....	140
c. Étude de la fraction LT C19	140
d. Étude de la fraction LT C22	140
5.3. Étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle de <i>L. tingitana</i>	140
a. Étude de la fraction LT Ac10.....	140
5.4. Étude phytochimique de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. tingitana</i>	140
5.4.1. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol	141
5.4.2. Séparation des composés de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	141
a. Étude de la fraction LT B9	142
b. Profile LC-MS.....	142
5.5. Le profile GC-MS de l'extrait éther de pétrole	142
6. Étude phytochimique de <i>Linaria reflexa</i> Desf.	142
6.1. L'extraction hydroalcoolique	143
6.1.1. Étude phytochimique de l'extrait chloroforme	145
6.1.2. Séparation des composés de l'extrait chloroforme	146
a. Étude de la fraction LR C1	146
b. Étude de la fraction LR C4	146
c. Étude de la fraction LR C8.....	146
6.1.3. Séparation des composés de l'extrait AcOEt	146
6.2. Étude comparative du profile LC-MS de <i>L. reflexa</i>	146
6.2.1. L'extraction hydroalcoolique	146
6.2.2. L'extraction ultrasonique.....	147
6.2.3. Étude phytochimique de l'extrait MeOH de <i>L. reflexa</i>	147
a. Étude de la fraction LR Me7.....	147
b. Étude de la fraction LR Me10	147
7. Activités biologiques.....	148
7.1. Activité antioxydante.....	148
7.1.1. <i>In vitro</i>	148
7.1.1.1. L'effet scavenger du radical DPPH.....	148
7.1.1.2. L'activité du pouvoir réducteur.....	148
7.1.1.3. Teste de blanchissement β -carotène.....	149
7.1.2. <i>In vivo</i> (l'activité antioxydante et hépatoprotectrice)	149
7.2. Activité anti-inflammatoire (<i>in vitro</i>).....	149
7.3. Activité antidiabétique.....	150
7.3.1. Matériel végétale et préparation des extraits	150

7.3.2. Les animaux.....	150
7.3.3. Incubation du diabète	151
7.3.4. Protocole expérimentale	151
7.3.5. Suivi des animaux avant sacrifice	152
7.3.6. Dosage biochimique sanguin après sacrifice.....	152
7.3.7. Analyse statistique des résultats	152
7.4. Activité antimicrobienne	153
7.4.1. Activité antibactérienne	153
7.4.1.1. Souches bactériennes.....	153
7.4.1.2. Milieux de culture.....	153
7.4.1.3. Méthode de diffusion en milieu gélose	154
7.4.1.4. Les calculs de <i>Docking</i> pour l'enzyme 3HO2.....	154
7.4.2. Activité antifongique.....	155
7.4.2.1. Souches fongique	155
7.4.2.2. Milieux de culture.....	155
7.4.2.3. Méthode de diffusion en milieu gélose	155
Références bibliographiques	157

Chapitre IV : Résultats et Discussions

Introduction.....	160
1. Identification des produits isolés de <i>L. tingitana</i>	160
1.1. Élucidation structural du composé LT C7	160
1.2. Élucidation structural du composé LT C9	174
1.3. Élucidation structural du composé LT C19-9.....	176
1.4. Élucidation structurale du composé LT C22	180
1.5. Élucidation structural du composé LT Ac10-1.....	189
1.6. Élucidation structural du composé LT B9-4-6-1.....	195
1.7. Élucidation structural du composé LT B9-6-1B-6-4.....	204
1.8. Le profile GC-MS de l'extrait éther de pétrole	212
1.9. Le profile LC-MS de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	213
2. Identification des produits isolés de <i>L. reflexa</i>	215
2.1. Élucidation structurale du composé LR M-1.....	215
2.2. Élucidation structurale du composé LR C1-1-1	227
2.3. Élucidation structurale du composé LR C4-3-1	231
2.4. Élucidation structurale du composé LR C8-4-2	237

2.5. Éluclation structurale du composé LR Ac-1.....	241
2.6. Éluclation structurale du composé LR Ac-2.....	251
2.7. Éluclation structurale du composé LR B-1	255
2.8. Éluclation structurale du composé LR Me10-9-3.....	262
2.9. Détermination par LC-MS et activités biologiques de deux extraits	264
2.9.1. Rendement des deux extraits étudiés	264
2.9.2. Identification de la composition chimique	264
2.9.3. Résultats des activités biologiques.....	270
2.9.3.1. L'activité antidiabétique (<i>in vivo</i>)	270
2.9.3.2. L'activité antioxydante (<i>in vitro</i>).....	274
3. Étude biologique des deux espèces <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i>	277
3.1. L'activité antioxydante (<i>in vitro</i>).....	277
3.1.1. L'effet scavenger du radical DPPH.....	277
3.1.2. Le blanchissement du β -carotène	278
3.2. L'activité antioxydante (<i>in vivo</i>) l'effet hépatoprotecteur des extraits <i>n</i> -butanols de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i>	279
3.3. L'activité anti-inflammatoire (<i>in vitro</i>).....	280
3.4. L'activité antimicrobienne (<i>in vitro</i>)	281
3.5. Docking de flavones de <i>L. reflexa</i>	283
Références bibliographiques	284
Conclusion générale	287
Résumé	289

Les articles publiés

1. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Natural Product Research*. **2015**. 29(17):1589-1613.
2. Chemical constituents of *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Der Pharmacia Lettre*. **2014**. 6(1):54-57.
3. Chemical constituents and antimicrobial activities of Petroleum ether and *n*-butanol extracts from *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. *J. Mater. Environ. Sci*. **2015**. 6(5):1411-1416.
4. SECONDARY METABOLITES FROM *Linaria tingitana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2015. (6).

Table des figures

Figure I.1 : iridoïdes isolés du genre <i>Linaria</i>	22
Figure I.2 : autres iridoïdes isolés du genre <i>Linaria</i>	23
Figure I.3 : acyclique monoterpènes isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	25
Figure I.4 : la structure de linaridial et linarienone	26
Figure I.5 : néo-clérodane diterpénoïdes isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	27
Figure I.6 : labdanes des espèces du genre <i>Linaria</i>	27
Figure I.7 : EI et EIM	28
Figure I.8 : stéroïdes des espèces du genre <i>Linaria</i>	29
Figure I.9 : oléanes du genre <i>Linaria</i>	29
Figure I.10 : l'acide betulique	30
Figure I.11 : les acides phénoliques isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	31
Figure I.12 : les composés phénoliques glycosylés isolés des espèces du genre <i>Linaria</i> ..	32
Figure I.13 : les dérivés de la pectolarine	34
Figure I.14 : les flavones glycosylés isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	34
Figure I.15 : la quercétine-7-O-rutinoside	35
Figure I.16 : les flavones aglycones des espèces du genre <i>Linaria</i>	35
Figure I.17 : les flavonols aglycones des espèces du genre <i>Linaria</i>	36
Figure I.18 : auronés et flavanone des espèces du genre <i>Linaria</i>	36
Figure I.19 : autres flavones de l'activité biologique.....	37
Figure I.20 : les alcaloïdes des espèces du genre <i>Linaria</i>	39
Figure I.21 : autres composés isolés des espèces du genre <i>Linaria</i>	39
Figure II.1 : processus biochimique de la formation d'entités isoprénoïdes actives (intermédiaire acide mévalonique-MVA-).....	50
Figure II.2 : processus biochimique de la formation d'entités isoprénoïdes actives (Intermédiaire: déoxyxylulose diphosphate-DXP-)	51
Figure II.3 : la classification des terpènes.....	52
Figure II.4 : quelques monoterpènes avec activité antimicrobienne et anticancéreuse	53
Figure II.5 : structures de quelques sesquiterpènes lactones	53
Figure II.6 : quelques exemples des diterpènes	54
Figure II.7 : quelques sesterpénoïdes.....	54
Figure II.8 : quelques triterpènes	55
Figure II.9 : quelques tetraterpènes.....	56
Figure II.10 : quelques iridoïdes	56
Figure II.11 : la biosynthèse de quelques produits à partir des iridoïdes.....	57
Figure II.12 : iridoïdes simples	58
Figure II.13 : quelques iridoïdes glycosylés	58
Figure II.14 : quelques séco-iridoïdes.....	58
Figure II.15 : bisiridoïdes.....	59
Figure II.16 : iridoïdes lactones	59

Table des figures

Figure II.17 : squelette de base des flavonoïdes	61
Figure II.18 : quelques chalcones et aurones	62
Figure II.19 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C	62
Figure II.20 : flavone et flavonol	63
Figure II.21 : structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes	64
Figure II.22 : quelques isoflavonoïdes.....	64
Figure II.23 : flavanone et dihydroflavonol.....	65
Figure II.24 : chalcone et aurone	65
Figure II.25 : voies biosynthétique conduisant aux chalcones.....	67
Figure II.26 : voie de biosynthétique de construction du squelette benzopyrane	68
Figure II.27 : formation de la genistéine et de l'apigénine	69
Figure II.28 : réduction de la cétone en position 4.....	69
Figure II.29 : hydroxylation de la position 3	70
Figure II.30 : voie biosynthétique conduisant à la majorité des flavonoïdes.....	71
Figure II.31 : hydroxylation de quelques flavonoïdes	73
Figure II.32 : méthylation de quelques flavonoïdes.....	74
Figure II.33 : glycosylation de quelques flavonoïdes	74
Figure II.34 : nerylifordizine C.....	75
Figure II.35 : un flavonoïde avec C-méthylation.....	75
Figure II.36 : quelques flavonoïdes avec C-glycosylation.....	75
Figure II.37 : mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse (modifié d'après Kale et al. (2008).....	91
Figure II.38 : structure de l'ASA404	93
Figure II.39 : les deux bandes d'adsorption dans les flavonoïdes	103
Figure II.40 : formation des différents types de complexes après addition d'AlCl ₃ et en présence de HCl.....	105
Figure III.1 : les parties aériennes de <i>Linaria tingitana</i> Boiss. & Reut.....	133
Figure III.2 : les parties aériennes de <i>Linaria reflexa</i> Desf.	133
Figure III.3 : extraction des parties aériennes de <i>L. tingitana</i> Boiss. & Reut.....	137
Figure III.4 : macération hydroalcoolique des parties aériennes de <i>L. reflexa</i> Desf.	144
Figure III.5 : l'extraction par ultrason	147
Figure IV.1.1 : spectre RMN ¹ H de LT C-7 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	161
Figure IV.1.2 : spectre RMN ¹ H étalé de LT C-7 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	161
Figure IV.1.3 : spectre RMN HSQC de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	162
Figure IV.1.4 : spectre RMN ¹³ C et DEPT de LT C-7 (125 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	163
Figure IV.1.5 : spectre RMN ¹³ C et DEPT étalé de LT C-7 (125 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)...	164
Figure IV.1.6 : spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	165
Figure IV.1.7 : spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	167
Figure IV.1.8 : spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	167

Table des figures

Figure IV.1.9 : spectre COSY de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	168
Figure IV.1.10 : spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	169
Figure IV.1.11 : spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	170
Figure IV.1.12 : spectre COSY étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	171
Figure IV.1.13 : spectre NOESY de LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	171
Figure IV.1.14 : RMN HMBC étalé du LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	172
Figure IV.1.15 : RMN HMBC étalé du LT C-7 (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	173
Figure IV.2.1 : RMN ¹ H du LT C-9 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	175
Figure IV.2.2 : RMN ¹ H étalé du LT C-9 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	176
Figure IV.3.1 : RMN ¹ H du LT C19-9 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	177
Figure IV.3.2 : RMN ¹ H étalé du LT C19-9 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	178
Figure IV.3.3 : série spectrale UV du LT C19-9.....	179
Figure IV.4.1 : spectre de masse ESIMS +/- du LT C22	181
Figure IV.4.2 : RMN ¹ H du LT C-22 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅ , δ ppm).....	182
Figure IV.4.3 : RMN ¹³ C du LT C-22 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅ , δ ppm).....	184
Figure IV.4.4 : RMN COSY du LT C-22 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅ , δ ppm)	185
Figure IV.4.5 : RMN HSQC du LT C-22 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅ , δ ppm)	186
Figure IV.4.6 : RMN HMBC du LT C-22 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅ , δ ppm)	188
Figure IV.4.7 : spectre de masse ESI/MSMS (-) du LT C22.....	189
Figure IV.5.1 : RMN ¹ H du LT Ac10-1 (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	191
Figure IV.5.2 : RMN ¹ H étalé du LT Ac10-1 (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	192
Figure IV.5.3 : RMN ¹ H étalé du LT Ac10-1 (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	192
Figure IV.5.4 : la série spectrale UV du composé LT Ac10-1.....	194
Figure IV.6.1 : spectre de masse ESI/MS (+/-) du LT B9-4-6-1	195
Figure IV.6.2 : spectre RMN ¹ H du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	196
Figure IV.6.3 : spectre HSQC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	198
Figure IV.6.4 : spectre HSQC étalé du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	198
Figure IV.6.5 : spectre HMBC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	200
Figure IV.6.6 : spectre de masse ESI/MSMS (-) du LT B9-4-6-1.....	201
Figure IV.6.7 : spectre de masse ESI/MSMS (+) du LT B9-4-6-1	202
Figure IV.6.8 : spectre HSQC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	203
Figure IV.7.1 : spectre de masse ESI/MS + du LT B9-6-1B-6-4	204
Figure IV.7.2 : spectre de masse ESI/MS - du LT B9-6-1B-6-4	204
Figure IV.7.3 : spectre RMN ¹ H du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	206
Figure IV.7.4 : spectre COSY du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	207
Figure IV.7.5 : spectre RMN ¹³ C du LT B9-6-1B-6-4 (100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)....	208
Figure IV.7.6 : spectre HSQC du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	208
Figure IV.7.7 : spectre RMN HMBC du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	210
Figure IV.7.8 : spectre de masse ESI/MSMS + du LT B9-6-1B-6-4.....	211
Figure IV.8 : profile GC-MS de l'extrait éther de pétrole	212

Table des figures

Figure IV.9.1 : profile LC-MS (1) en mode positif de l'extrait <i>n</i> -BuOH	213
Figure IV.9.2 : profile LC-MS (2) en mode positif de l'extrait <i>n</i> -BuOH	214
Figure IV.9.3 : masse ESI/MS (+) du composé A (antirrhinoside)	214
Figure IV.10.1 : RMN ¹ H du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	216
Figure IV.10.2 : RMN ¹ H étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	216
Figure IV.10.3 : RMN ¹ H étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	217
Figure IV.10.4 : spectre HSQC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	218
Figure IV.10.5 : spectre HSQC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	219
Figure IV.10.6 : RMN ¹³ C DEPT 90 et 135 du LR M-1 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)...	220
Figure IV.10.7 : spectre HMBC étalement du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	221
Figure IV.10.8 : spectre HMBC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	223
Figure IV.10.9 : spectre COSY du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	224
Figure IV.10.10 : spectre COSY étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	224
Figure IV.10.11 : RMN HSQC étalement du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	225
Figure IV.10.12 : spectre HMBC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	226
Figure IV.10.13 : spectre de masse HR-EI du LR M-1	227
Figure IV.11.1 : spectre RMN ¹ H du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	228
Figure IV.11.2 : spectre RMN HSQC du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	229
Figure IV.11.3 : spectre RMN HMBC du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	230
Figure IV.12.1 : spectre de masse ESI/MS (+/-) du LR C4-3-1	231
Figure IV.12.2 : spectre RMN ¹ H du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	233
Figure IV.12.3 : spectre HSQC du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	234
Figure IV.12.4 : spectre HMBC du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm).....	235
Figure IV.12.5 : spectre de masse ESI/MSMS (-) du LR C4-3-1	236
Figure IV.13.1 : spectre RMN ¹ H du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	237
Figure IV.13.2 : spectre HSQC du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	238
Figure IV.13.3 : spectre HMBC du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	240
Figure IV.14.1 : RMN ¹ H du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	242
Figure IV.14.2 : RMN ¹ H étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	242
Figure IV.14.3 : RMN ¹ H étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	243
Figure IV.14.4 : spectre HSQC du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	244
Figure IV.14.5 : RMN ¹³ C du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	245
Figure IV.14.6 : spectre HMBC du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	246
Figure IV.14.7 : spectre NOESY du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	247
Figure IV.14.8 : spectre HMBC étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	248
Figure IV.14.9 : spectre HMBC étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	249
Figure IV.14.10 : spectre de masse HR-EI du LR Ac-1	250
Figure IV.15.1 : RMN ¹ H du LR Ac-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm).....	251
Figure IV.15.2 : RMN ¹ H du LR Ac-2 (400 MHz, acétone- <i>d</i> ₆ , δ ppm).....	252
Figure IV.15.3 : spectre RMN HSQC du LR Ac-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	253

Table des figures

Figure IV.15.4 : spectre HMBC du LR Ac-2 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	254
Figure IV.15.5 : spectre de masse ESI/MS (-) du LR Ac-2	255
Figure IV.16.1 : spectre DEPT 90 et DEPT 135 du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	256
Figure IV.16.2 : spectre de masse HR-EI du LR B-1	256
Figure IV.16.3 : spectre HMBC étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	257
Figure IV.16.4 : RMN ¹ H du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	258
Figure IV.16.5 : RMN ¹ H étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	259
Figure IV.16.6 : RMN ¹ H étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	259
Figure IV.16.7 : spectre COSY du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	260
Figure IV.16.8 : spectre HMBC du LR B-1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	262
Figure IV.17 : RMN ¹ H du LR Me10-9-3 (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm)	263
Figure IV.18.1 : PDA-HPLC chromatogrammes à partir de l'analyse LC-MS d'EUS (A) et EHA (B) des parties aérienne de <i>L. reflexa</i> Desf.	264
Figure IV.18.2 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 1	265
Figure IV.18.3 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 2	266
Figure IV.18.4 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 3	267
Figure IV.18.5 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 4	268
Figure IV.18.6 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 5	269
Figure IV.18.7 : spectre de masse ESI/MS (-) du pic 6	269
Figure IV.19.1 : l'activité antioxydante des extraits EUS, EHA de <i>L. reflexa</i> et de standard vis-à-vis le DPPH. Le pourcentage de l'inhibition; chaque valeur représente la moyenne ± écart-type (n=3), P<0.05	275
Figure IV.19.2 : le pouvoir réducteur des extraits EUS, EHA de <i>L. reflexa</i> et des standards (a) et le pourcentage de l'inhibition; chaque valeur représente la moyenne ± écart-type (n=3), P<0.05	275
Figure IV.19.3 : l'effet blanchissant de la β-carotène des extraits EUS, EHA de <i>L. reflexa</i> et des standards (a) et le pourcentage de l'inhibition; chaque valeur représente la moyenne ± écart-type (n=3), P<0.05	276
Figure IV.20.1 : l'activité scavenger du radical DPPH par l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i> , et la quercétine. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions	278
Figure IV.20.2 : l'effet blanchissant de la β-carotène des extraits <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i> et la quercétine, chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions	279
Figure IV.20.3 : l'activité hépatoprotectrice de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i> , Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions	279
Figure IV.21 : zone d'inhibition de PE et <i>n</i> -BuOH contre <i>Bacillus sp.</i>	282
Figure IV.22. : Les résultats de docking pour les flavones de <i>L. reflexa</i>	283

Table des tableaux

Tableau I.1 : Classification de la famille Scrophulariaceae d'après Valdés (1987)	17
Tableau I.2 : iridoïdes isolés du genre <i>Linaria</i>	23
Tableau I.3 : Polyphénols isolés à partir du genre <i>Linaria</i>	32
Tableau I.4 : flavonoïdes isolés du genre <i>Linaria</i>	37
Tableau II.1 : Différentes classes des flavonoïdes.....	61
Tableau II.2 : Liste des enzymes (indiquées figure II.25 à II.30) conduisant aux différentes classes de flavonoïdes.....	72
Tableau II.3 : Relation R_f -Structure flavonique	102
Tableau II.4 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques	102
Tableau II.5 : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes	104
Tableau II.6 : les principaux déplacements des bandes I et II dans le cas de flavone	106
Tableau III.1 : classification botanique des espèces étudiées.....	132
Tableau III.2 : Rendement des extraits.....	138
Tableau III.3 : Résultats de la séparation par CC de l'extrait CHCl_3 de <i>L. tingitana</i>	139
Tableau III.4 : Résultats de la séparation par CC de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>L. tingitana</i>	141
Tableau III.5 : les rendements des extraits	145
Tableau III.6 : Résultats de la séparation par FC de l'extrait chloroforme de <i>L. reflexa</i>	145
Tableau III.7 : Composition du régime croquette (ONAB Bejaia)	150
Tableau IV.1 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du β -amyrine	174
Tableau IV.2 : Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; acétone- d_6) du LT C19-9.....	177
Tableau IV.3 : les données spectroscopique d' l'UV du LT C19-9.....	179
Tableau IV.4 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du daucostérol	189
Tableau IV.5 : Les résultats de l'RMN ^1H (400 MHz; MeOH- d_4) du LT Ac10-1	190
Tableau IV.6 : les données spectroscopique de l'UV du LT Ac10-1	194
Tableau IV.7 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LT B9-4-6-1	200
Tableau IV.8 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LT B9-6-1B-6-4	209
Tableau IV.9 : composition chimique de l'extrait éther de pétrole de <i>L. tingitana</i>	213
Tableau IV.10 : Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) du LR M-1	217
Tableau IV.11 : Les résultats de l'RMN ^1H et ^{13}C du LR M-1 (400 MHz; DMSO- d_6).....	226
Tableau IV.12 : les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du pinosésinol.....	236
Tableau IV.13 : Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; MeOH- d_4) du LR C8-4-2	238
Tableau IV.14 : Les résultats de l'RMN ^1H et ^{13}C du LR C8-4-2 (400 MHz; MeOH- d_4).....	240
Tableau IV.15 : Les résultats de l'RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) du LR Ac-1.....	243
Tableau IV.16 : Les résultats de l'RMN ^1H et ^{13}C du LR Ac-1 (400 MHz; DMSO- d_6).....	249
Tableau IV.17 : Les résultats de l'RMN ^1H et ^{13}C du LR Ac-2 (400 MHz; MeOH- d_4)	254
Tableau IV.18 : Les résultats de l'RMN ^1H et ^{13}C du LR B-1 (400 MHz; DMSO- d_6).....	262
Tableau IV.19 : résultats de deux méthodes d'extraction.....	264
Tableau IV.20 : LC-MS détermination du EUS et EHA	265
Tableau IV.21 : évaluation antidiabétique <i>In vivo</i> : Variation du niveau du glucose dans le sang, après administration orale d'EUS et l'EHA de <i>L. reflexa</i> pendant 15 jours	271
Tableau IV.22 : Effet de l'extrait aqueux et méthanolique de <i>L. reflexa</i> sur les poids corporels..	272
Tableau IV.23 : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats	273
Tableau IV.24 : L'activité anti-inflammatoire des extraits (%) <i>n</i> -butanol de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i> , et diclofenac. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions.....	281
Table IV.25 : L'activité antimicrobienne des extraits PE & <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i>	282
Table IV.26 : L'activité antimicrobienne des extraits de <i>L. tingitana</i> et <i>L. reflexa</i>	282

Abréviations et acronymes

Les abréviations et notation utilisées dans ce document sont explicitées ci-dessous:

142BR	fi broblastes de la peau humaine
A375	le mélanome malin humain
A-549	carcinome pulmonaire humain
ABCG2	ATP-binding cassette sous-famille G type 2
AChE	acétylcholinestérase
AcOEt	acétate d'éthyle
ACHN	rénal adénocarcinome
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AlCl ₃	chlorure d'aluminium
ARN	acide ribonucléique
BuOH	butanol
C32	amélanotique mélanome
Caco-2	colorectal adénocarcinome
CC	chromatographie sur colonne
CCM	chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	chloroforme
CHS	chalcone synthase
COR-L23	la grande cellule de carcinome du poumon
CO ₂	dioxyde de carbone
¹³ C	carbone 13
CP	chromatographie sur papier
CYP	cytochrome P450
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublet
DMAPP	diméthylallyl pyrophosphate
DPPH	diphenylpicrylhydrazyl
ER	récepteurs aux estrogènes
F	fraction
FAB	ionisation par bombardement d'atomes accélérés (Fast Atom Bombardment)
FPP	farnésyl pyrophosphate (diphosphate)
glu	glucose
GC	chromatographie phase gazeuse
GC-MS	chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GGPP	géranylgeranyl pyrophosphate (ou di phosphate)
GPP	géranyl pyrophosphate (ou di phosphate)
GST	glutathion S-transférase
¹ H	proton
H ₂ O	eau
H ₃ BO ₃	acide borique
HCl	acide chlorhydrique
HepG-2	carcinome hépatocellulaire
HL-60	lignée de cellules leucémique

Abréviations et acronymes

HPLC	chromatographie liquide à haute performance /pression
HPTLC	chromatographie sur couche mince de haute performance
HT-29	carcinome colorectal humain
IC ₅₀	concentration inhibitrice à 50%
IL	interleukine
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IPP	Isopentényl pyrophosphate (diphosphate)
<i>J</i>	constantes de couplage
LC	chromatographie en phase liquide
LC-MS	une HPLC couplée avec la masse
LDL	low density lipoprotein
LOXs	lipoxygénases
LPP	linanyl pyrophosphate (di phosphate)
LTB ₄	Leucotriène B4 (un leucotriène impliqué dans l'inflammation)
M	masse
MDR	multi-drug resistance
Me	methyl
Mel-28	malignes de mélanome humain
MeOH	méthanol
MRC5	la cellule normale du poumon fœtal humain
MRP	multidrug resistance protein
NADH	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOAc	acétate de sodium
NaOH	hydroxyle de sodium
NFKB	nuclear factor KB
<i>nodD</i>	gènes bactériens
OH	hydroxyle
OMe	méthoxyle
P-388	leucémie murine
PAL	phénylalanine ammonia lyase
P-gp	glycoprotéine P
PLA ₂	enzyme
PLCgI	phosphatidylinositol phospholipase C, isoforme γ
PP	pyrophosphate
R _f	facteur de retardement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	reactive oxygen species
RP-HPLC	HPLC avec une colonne phase inverse
<i>s</i>	singulet
SAMR	staphylococcus aureus résistant à la méticilline
SM	spectroscopie de masse
SN ₁	
THS	traitements hormonaux substitutifs

Abréviations et acronymes

TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase
UV	ultraviolet
UV-B	ultraviolet (315-280 nm)
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C	température en degrés Celsius
cm	centimètre
g	gramme
h	heure
Hz	hertz
Kg	kilogramme
MHz	méga Hertz
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
nm	nanomètre
ppm	partie par million
μ g	microgramme



Introduction générale

Les origines de la vie, remontent à environ 3.5 à 3.8 milliards d'années et demeurent incertaines. Des scientifiques ont trouvés des micro-organismes fossiles dans les roches d'Isua au Groenland datant de 3.8 milliards d'années, qui pourrait être des artefacts [1].

D'autres traces paléontologiques de vie ont été retrouvées [2]:

- microfossiles de Warrawoona (Australie) datés de 3.5 milliards d'années
- microfossiles d'Onverwacht et Fig Tree (Afrique du Sud) datés de 3.4 – 3.5 milliards d'années
- microfossiles de Bulawayo (Zimbabwe) datés de 2.8 milliards d'années
- microfossiles de Gunflint (Ontario) datés de 2 milliards d'années
- microfossiles de Bitter Springs (Australie) datés de 850 millions d'années

Les précurseurs des végétaux semblent être des Cyanobactéries, ils sont classés traditionnellement parmi les algues, sous le nom de cyanophytes ou algues bleu-vert.



Elles apparaissent déjà dans des fossiles du Précambrien, datant d'environ 3.8 milliards d'années. Elles auraient joué un grand rôle dans la production de l'oxygène de l'atmosphère et seraient responsables de la Grande Oxydation il y a environ 2.4 milliards d'années [2]. Cette action est due à la photosynthèse réalisée dans le cytoplasme des végétaux. La photosynthèse est le processus bioénergétique qui permet aux plantes, aux algues et certaines bactéries, dites photoautotrophes, de synthétiser la matière organique en utilisant la lumière du soleil [3]. Des glucides, par exemple des oses tels que le glucose, sont synthétisés à partir du dioxyde de carbone et de l'eau avec libération d'oxygène comme sous-produit de l'oxydation de l'eau. Cette opération maintient le taux d'oxygène constant dans l'atmosphère terrestre et fournit toute la matière organique ainsi que l'essentiel de l'énergie utilisées par la vie sur terre [4].

Les végétaux ont évolué en atteignant des niveaux croissants de complexité, depuis les premières algues¹, en passant par les bryophytes², les lycopodes³ et les fougères⁴, jusqu'aux complexes gymnospermes⁵ et angiospermes⁶ actuels.

Toutes ces plantes utilisent la photosynthèse qui ne consiste pas simplement à produire des sucres et de l'oxygène mais aussi à déclencher une succession de réactions chimiques et enzymatiques complexes afin de produire d'autres molécules qu'on appelle métabolites secondaires. Ces derniers sont en général des composés de faible poids moléculaire, ayant souvent une structure complexe et interviennent dans des fonctions diverses comme : les défenses immunitaires, la lutte contre les herbivores, l'attraction des pollinisateurs, la communication entre plantes, le maintien d'associations symbiotiques avec la flore du sol, la fertilisation, etc. La diversité structurelle et fonctionnelle de ces métabolites dans le royaume végétal est grande; on estime que des centaines de milliers d'enzymes sont mis en jeu pour leur production, avec 15 à 25 % du génome codant pour ces enzymes, chaque espèce possède son lot unique de métabolites secondaires [5]. Nombre de ces derniers ont une importance médicale considérable pour les humains.

Quelle est la fonction d'une telle quantité de métabolites, dont la production occupe une partie significative du métabolome? On a fait l'hypothèse que la majorité sert à des défenses immunitaires, et que leur diversité est la conséquence de la guerre permanente entre les plantes et leurs parasites; il y a des indices de ce que cela doit être vrai dans beaucoup de cas, mais le coût reproductif pour maintenir cet impressionnant inventaire semble élevé. Divers modèles explorant cet aspect de la question ont été suggérés, mais le consensus sur l'importance de ce coût n'est pas atteint [6]; on ne sait pas estimer l'avantage qu'aurait une plante ayant plus de métabolites secondaires que ses voisines. La production de métabolites secondaires semble être apparue très tôt durant l'évolution; même les bactéries possèdent la capacité de les fabriquer. Mais leur rôle est devenu plus important à partir des champignons,

¹ Les algues sont des êtres vivants capables de photosynthèse dont le cycle de vie se déroule généralement en milieu aquatique.

² Parmi les plantes actuelles, les bryophytes sont celles qui ont conservé le plus de caractères des premières plantes ayant colonisé la terre ferme.

³ Les Lycopodes sont des plantes vivaces toujours vertes, à racines dichotomiques (division en forme de "Y").

⁴ Les Filicophytes, communément appelées fougères, sont des cryptogames vasculaires. Elles comportent environ 13000 espèces (le plus grand embranchement végétal après les angiospermes).

⁵ Les Gymnospermes sont des plantes faisant partie d'un sous-embranchement paraphylétique des Spermaphytes (plantes à graines) qui inclut les plantes dont l'ovule est à nu (non enclos dans un ovaire à la différence des Angiospermes) et est porté par des pièces foliaires groupées sur un rameau fertile (cône).

⁶ La division des Magnoliophyta (ou Angiospermes) regroupe les plantes à fleurs, et donc les végétaux qui portent des fruits.

et surtout chez les plantes, où ils semblent être diversifiés en utilisant différents mécanismes, comme la duplication de gènes et l'évolution de nouveaux gènes; de plus, des études ont montré que la diversité de certains de ces métabolites a subi une sélection positive. Bien qu'on ne puisse nier le rôle de ces grands changements génétiques, on connaît plusieurs exemples où de nouveaux métabolites ont été formés par de petites variations des réactions les produisant. Par exemple, on a suggéré que les hétérosides cyanogénétiques avaient évolué à plusieurs reprises dans des lignées assez éloignées. On connaît de nombreux exemples analogues d'évolution convergente; ainsi, on sait désormais que les enzymes synthétisant le limonène (un terpène) sont plus semblables entre les angiospermes et les gymnospermes qu'avec ceux synthétisant d'autres terpènes chez les mêmes plantes, ce qui suggère une évolution indépendante des chemins de la biosynthèse du limonène dans ces deux lignées [7]. Comme ça, les plantes développent des métabolites secondaires, une série après l'autre avec des modifications seulement pour ses besoins.

Après la création de l'atmosphère et spécialement la couche d'ozone, et l'arrivée de l'homme sur terre, cette nouvelle espèce trouve tous ces besoins dans le règne végétal qui produit tout ce qui est important pour survivre comme l'oxygène, la nutrition, les vêtements et surtout les médicaments. L'homme a acquis dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et au développement de son bien-être, avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tout type de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle ». L'étude de ces connaissances ancestrales par les sciences modernes révèle progressivement quelques secrets de la nature qui permettent à l'homme de poursuivre son évolution. C'est dans ce cadre que des disciplines hétérogènes telles que la botanique, la phytochimie, la biologie, l'anthropologie et bien d'autres sont mises en œuvre afin de décrire et d'interpréter les « pharmacopées traditionnelles ».

Depuis toujours, les humains ont utilisés leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels sont d'origine naturelle [8] : obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification d'un produit naturel, composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique.

De par sa situation géographique, l'Algérie chevauche entre deux empires floraux: l'Holarctis⁷ et le Paleotropis⁸. Cette position lui confère une flore très diversifiée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques. Sur les 3139 espèces (5402 taxons en comptant les sous espèces, les variétés et les formes) décrites par Quezel et Santa (1962) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Zeraia (1983) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques. Molinier (Zeraia, 1983) signale 700 espèces endémiques dans la flore algérienne; nous avons dénombré 653 sur la base de la flore de Quezel et Santa (1962-63). Le taux d'endémisme en Algérie est de 12.6 %. Parmi les espèces endémiques, nous pouvons distinguer 165 endémiques Nord-africaines, 270 endémiques algériennes, alors que l'UICN (Union Internationale de la Conservation de la Nature) et l'ANN ne signalent que 168 endémiques spécifiques à l'Algérie [9].

Cette thèse est consacrée à l'étude phytochimique et pharmacologique de deux espèces endémiques Algériennes du genre *Linaria* : *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. et *Linaria reflexa* Desf.

Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique et biologique de ces deux espèces du genre *Linaria* et mettre en évidence des traceurs spécifiques pour chacune et une possibilité d'utilisation de leurs extraits ultérieurement dans l'industrie.

Dans le premier chapitre, nous aborderons les différentes recherches bibliographiques et botaniques, l'utilisation de ce genre en médecine traditionnelle ainsi que le criblage biologique et phytochimiques qui ont orienté le choix de notre étude pour ces espèces.

Le second chapitre renferme les connaissances bibliographiques disponibles pour quelques classes de métabolites secondaires notamment les iridoïdes et les flavonoïdes qui sont des chimiotaxonomiques marquées pour le genre *Linaria*, avec une idée générale sur les méthodes chromatographiques et spectroscopiques utilisés dans l'étude de ces classes.

Le troisième chapitre sera consacré à nos études phytochimiques et biologiques de *L. tingitana* Boiss. & Reut. et *L. reflexa* Desf. Pour chaque plante, nous détaillerons les étapes de

⁷ Holarctis est le plus grand Royaume floristique du monde. Il contient la plupart de l'hémisphère Nord. Holarctis est situé en Europe, une grande partie de l'Asie et l'Amérique du Nord, également de la marge nord de l'Afrique.

⁸ Paleotropis couvre grande partie de l'Afrique (à l'exception de ses extrémités nord et au sud du continent), l'Inde, l'Asie du Sud et l'Indonésie - Paleotropis comprend toutes les régions tropicales de l'Ancien Monde. Cette zone est très riche dans le côté botanique; nous pouvons trouver ici 40 familles endémiques. Environ 50% de toutes les espèces tropicales est situé juste dans cette région floristique.

cette investigation, à commencer par la macération, le fractionnement, la séparation jusqu'à la purification des composés isolés. On termine ce chapitre par un petit résumé rassemblant les activités biologiques et les protocoles utilisés pour l'évaluation.

Le dernier chapitre, décrira l'identification des produits isolés, ainsi que les résultats des activités biologiques étudiées. Enfin, nous utiliserons tous ces résultats pour définir quels traceurs employé pour ces deux plantes.

Références bibliographiques

- [1] Gargaud M.
Les traces de la vie. Press universitaires de Bordeaux. Bordeaux, **2003**, pp 327.
- [2] Yves S.
Elles ont façonné la Terre, Hors-série Microbes. *Science et Vie*. **2012**. 261:21.
- [3] Gest H.
History of the word photosynthesis and evolution of its definition. *Photosynthesis Research*. **2002**. 73:7–10.
- [4] Bryant D.A, Frigaard N.U.
Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*. **2006**. 14:488–496.
- [5] Pichersky E, Gang D.
Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci*. **2000**. 5:439–445.
- [6] Nina Theis, Manuel Lerdau.
The evolution function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci*. **2003**. 164:S93–S102.
- [7] Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R.
Plant terpenoid synthesis: molecular and phylogenetic analysis. *PNAS*. **1998**. 95:4126–4133.
- [8] Newmann D, Cragg G.M.
Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod*. **2007**. 70:461–477.
- [9] Chouaki S, Bessedik F, Chebouti A, Maamri F, Oumata S, Kheldoun S, Hamana M.F, Douzene M, Bellah F, Kheldoun A.
Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. juin **2006**.



Chapitre

Rappel bibliographique

1. Description de la famille Scrophulariaceae

La famille Scrophulariaceae comporte environ 269 genres et 5100 espèces [1]. Les Scrophulariaceae sont des plantes ordinairement herbacées, parfois arbustives ou arborescentes, pouvant être plus ou moins parasites (*Lathraea*), aquatiques ou grimpantes. Elles sont dépourvues de phloème interne. Les feuilles sont toujours simples, entières, parfois pennatiséquées, alternes ou opposées, sans stipules. Les fleurs sont hermaphrodites, souvent zygomorphes, pentamères ou tétramères. Elles sont solitaires, regroupées en épis, en grappes ou en panicules. Les sépales, à préfloraison valvaire ou imbriquée, sont connues entre eux au moins à leur base. La corolle est à pétales soudés et à préfloraison valvaire ou imbriquée. Les étamines sont ordinairement au nombre de quatre avec un staminode (parfois cinq ou deux étamines seulement). Elles sont insérées sur le tube de la corolle. L'ovaire est supère, normalement biloculaire, composé de deux carpelles soudés entre eux. Il est surmonté d'un style terminal à un ou deux stigmates. Il y a souvent un disque nectarifère autour du pistil. Les ovules sont nombreux, unitéguminés, anatropes à hémitropes, sur des placentas axiles. Le fruit est une capsule déhiscente septicide, parfois loculicide ou porricide, rarement une baie ou un schizocarpe. Les semences sont ailées ou anguleuses avec un embryon droit ou légèrement courbe dans un albumen oléagineux [1]. Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [2]. Le tableau suivant présente quelques exemples sur les sous-familles, les tribus et des genres de cette grande famille.

Tableau I.1: Classification de la famille Scrophulariaceae d'après Valdés (1987) [3].

Sous-familles	tribus	genres
Verbascoideae	Verbasceae	<i>Verbascum</i>
Scrophularioideae	Scrophularieae	<i>Scrophularia</i>
	Anthirrhineae	<i>Anarrhium</i>
		<i>Antirrhinum</i>
		<i>Chaenorrhinum</i>
		<i>Cymbalaria</i>
		<i>Kickxia</i>
		<i>Linaria</i>
		<i>Misopates</i>
		<i>Gratiola</i>
		<i>Sibthorpia</i>
Rhinanthoideae	Digitaleae	<i>Digitalis</i>
	Veroniceae	<i>Veronica</i>
	Rhinantheae	<i>Bartisia</i>
		<i>Ballardia</i>
		<i>Odentites</i>
		<i>Parentucellia</i>
		<i>Pedicularis</i>

2. Description du genre *Linaria*

Le genre *Linaria* comprend approximativement 200 espèces de plante distribuées dans les zones climatiques modérées de l'Europe, nord d'Afrique et l'Asie. Plantes herbacées à feuilles simples et étroites (souvent linéaires), sessiles, les inférieures opposées ou verticillées, les supérieures généralement alternes. Fleurs zygomorphes¹ groupées en racèmes simples ou capituliformes, ou en racèmes de racèmes. Calice à cinq lobes inégaux, souvent courts. Corolle bilabée à tube renflé, à limbe en gueule, prolongée à la base par un éperon. La lèvre supérieure est formée de deux lobes légèrement réfléchis, la lèvre inférieure de trois lobes. Cette lèvre présente un palais saillant fermant la gorge, bilobé, maculé de couleurs vives, généralement velu, quatre étamines. Le fruit est une capsule polysperme à deux loges. Le centre de distribution de ce genre est dans la cuvette méditerranéenne [4], par exemple on trouve 20 espèces en Turquie [4, 5], 20 en Italie [6], 24 en Espagne [7] et 39 espèces en Algérie [8]. Dans la médecine populaire, les espèces *Linaria* sont utilisées comme laxative, spasmolytique, cholagogue et anti-inflammatoire, pour traitement d'hémorroïdes des catarrhes de la vessie [9], toniques, antiscorbutiques, antidiabétiques, diurétiques et les désordres vasculaires [10].

3. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Linaria*

3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Ce genre est bien connu dans la famille Scrophulariaceae, il inclut plusieurs espèces réputées pour leurs vertus thérapeutiques comme exemples :

Linaria vulgaris répandue en Bulgarie [11], est utilisé dans la médecine populaire comme laxative, dans le traitement d'inflammation de la vessie, les éruptions cutanées ainsi que dans le traitement des hémorroïdes, etc. [12]. La même espèce, poussant dans le Nord-Est de la Chine, est utilisée par la population locale dans le traitement de la toux, de l'asthme et comme expectorant [13].

Linaria Japonica (nom japonais: Unran) est une plante vivace, qui grandit dans les régions de rivage, est utilisé dans la médecine traditionnelle pour ces propriétés diurétique, purgative [14] et laxative [15].

Linaria cymbalaria [16] possède des propriétés diurétiques, toniques et antiscorbutiques [17].

¹ La zygomorphie est la caractéristique d'une fleur qui présente une symétrie bilatérale.

Les deux sous-espèces *L. saxatilis* var. *saxatilis* et *L. saxatilis* var. *glutinosa* ont été étudiées à cause de la variété des activités biologiques et usages thérapeutiques des espèces du même genre [15, 17, 18]. Des produits naturels sont isolés à partir de ces deux sous-espèces et ont donné une activité cytotoxique intéressante [19].

Linaria reflexa Desf., 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 [20]. L'activité antiproliférative très importante par action des flavones isolées notamment la Pectolinarigenine, la linariine et la pectolinarine [21] en particulier contre la cellule COR-L23 [21, 22].

Il en ressort que la plupart des espèces du genre *Linaria* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs diverses propriétés biologiques: toniques, antiscorbutiques, laxatives, antidiabétiques et diurétiques, ainsi que pour le traitement de blessures, d'hémorroïdes et des désordres vasculaire [10], spasmolytique, anti-inflammatoire, cholagogue et anti-rhume [23].

3.2. Activités biologiques

Les produits naturels constituent une excellente source de structures chimiques possédant une large variété d'activités biologiques et en particulier la propriété anticancéreuse [24]. Cela oriente vers de nouveaux champs d'enquête sur le potentiel des composés anti-tumorale, qui sont déjà largement utilisés dans la chimiothérapie du cancer. Les modèles de la sélection cytotoxique fournissent d'importantes données préliminaires pour sélectionner des plantes possédant des composés ayant un potentiel anticancéreux [21]. Dans ce thème, une étude sur plusieurs flavones isolées de *L. reflexa* a montré une action antiproliférative contre les lignes cellulaires suivantes : le carcinome à grande cellule du poumon COR-L23, carcinome hépatocellulaire HepG-2, rénal adénocarcinome ACHN, amélanotique mélanome C32 et colorectal adénocarcinome Caco-2. Le travail rapporte que la pectolinarigenine et quelques flavonoïdes glycosylés comme la pectolinarine ont montré une activité cytotoxique forte sur la ligne cellulaire COR-L23 avec une valeur d'IC₅₀ de 5.03 et 4.07 µM, respectivement [21].

Pendant plusieurs années, l'espèce *L. saxatilis* a été étudiée pour sa composition chimique et ses activités biologiques intéressantes. Il s'avère que *L. saxatilis* var. *saxatilis*, plante native du nord et du centre de la péninsule ibérique, a fait l'objet d'une investigation phytochimique qui a conduit à l'isolement de diterpénoïdes à squelette néo-clérodane. Ces derniers ont montré une bonne activité cytotoxique contre une série de cellules cancéreuses *in*

vitro [19]. Une autre étude effectuée sur l'espèce *L. saxatilis* var. *glutinosa* a révélé que quelques néo-clérodanes diterpénoïdes ont un effet inhibiteur sur les enzymes impliqués dans les processus inflammatoires [25].

Otsuka a étudié pendant des années l'espèce *L. japonica* [14]. Ses résultats sont bien connus comme références pour les autres recherches sur les espèces de ce genre, sans oublié aussi la richesse des résultats de Kitagawa [15].

Les espèces du genre *Linaria* contiennent des composés glycosylés venimeux, ce qui montre leur légère toxicité pour le bétail [26].

Des études biologiques sur les extraits des espèces *L. grandiflora*, *L. genistifolia* subsp. *confertiflora* et *L. aucheri*, ont montré des effets analgésiques et anti-inflammatoires sans toxicité [27].

L'investigation des effets génotoxiques et mutagéniques sur les extraits aqueux des parties aériennes de *L. genistifolia* (L.) Mill. subsp. *genistifolia*, a donnée des résultats importants [28].

Les extraits obtenus de *L. corifolia* ont montré un effet antibactérien spécialement contre des bactéries de Gram+, mais aucune activité importante contre des bactéries de Gram-. Ils ont un effet anti-levure spécialement contre *Kluyveromyces fragilis* [29].

4. Les investigations phytochimique sur le genre *Linaria*

Les études réalisées sur le genre montrent la diversité des métabolites secondaires tels que les iridoïdes, les diterpénoïdes, les flavonoïdes et les alcaloïdes [30-36]. Ces produits sont connus pour leurs activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire [37].

4.1. Les terpénoïdes

4.1.1. Les iridoïdes

Les iridoïdes sont présents chez les végétaux supérieurs notamment chez les angiospermes dicotylédones particulièrement chez les gamopétales appartenant aux ordres *gentianales*, *lamiales* et *scrophulariales*.

Antirrhinoside (1) et ces dérivés sont les marqueurs chimiques pour les genres de la tribu Scrophularioideae-Antirrhineae de la famille Scrophulariaceae, y compris *Linaria*, *Antirrhinum*, *Asarina*, *Kickxia*, *Cymbalaria* et *Maurandia* [38-40]. Les iridoïdes les plus fréquents sont les dérivés de 6-acyl antirrhinoside et de 5-deoxyantirrhinoside.

Antirrhinoside (1) est bien connu dans le genre *Linaria*, isolé pour la première fois à partir de *L. vulgaris* [41], les deux nouveaux dérivés 6-*O-trans-p*-coumaroylantirrhinoside

(2) et 6-*O*-*cis*-*p*-coumaroylantirrhinoside (3) avec procumbide (4) sont isolés de la même espèce [42-43], le dernier composé a été décrit pour la première fois dans la famille Scrophulariaceae. Le 5-*O*-glucosylantirrhinoside (5) a été identifié dans six espèces du genre *Linaria* avec le nouveau composé 5-*O*-allosylantirrhinoside (6) [35]. Deux nouveaux dérivés de (1) [6-seneciolyantirrhinoside (7) et 6-angeloylantirrhinoside (8)] ont été isolés à partir de *L. clementei* [43]. Une structure simple avec l'absence de 5-OH par rapport au composé (1) [5-deoxyantirrhinoside (9)], a été isolée seulement de *L. arcusangeli* et *L. flava* [44-45]. Un nouveau iridoïde similaire au composé (1), genistifoline (6-*O*-acétylantirrhinoside, 10) a été identifié dans *L. genistifolia* [46]. Seulement trois dérivés d'antirrhinoside (1) avec un groupement acétyle sur le C-6' du glucose ont été isolés, il s'agit du 6'-*O*-acétylantirrhinoside (11) à partir de *L. flava* subsp. *sardoa* [44], ce produit a été décrit pour la première fois dans la littérature; le 6'-*O*-seneciolyantirrhinoside (12) et le 6'-*O*-angeloylantirrhinoside (13) à partir de *L. capraria* [47]. L'investigation phytochimique de *L. dalmatica* a permis d'isoler le nouveau iridoïde 7,8-*epi*-antirrhinoside (14), ce dernier est décrit comme le premier iridoïde glycosylé avec une orientation α de l'époxyde 7,8 [48]. Deux nouveaux iridoïdes nommés l'acide 8-*epi*-loganique (15) et 7- β -hydroxy-8-*epi*-iridodial glucoside (16) ont été isolés à partir de *L. cymbalaria* [49].

En général, le squelette des iridoïdes montre l'absence de la substitution de l'atome Cl, par contre dans le genre *Linaria*, un iridoïde glycosylé chloré, la linarioside (17), rare comme produit naturel a été isolé pour la première fois à partir de *L. japonica* [50], d'autres études ont montré la présence de ce composé dans plusieurs espèces de ce genre tel que *L. dalmatica*, *L. simplex*, *L. pelisseriana*, *L. sp.*, *L. genistifolia* [46, 48], *L. arcusangeli* et *L. flava* [45], *L. vulgaris* [51] et *L. aegyptiaca* [52]. Il semble être un bon marqueur chimiotaxonomique du genre *Linaria*.

Un autre type d'iridoïde est présent dans le genre *Linaria*, il s'agit de l'aucubine (18) dans *L. vulgaris* [53] et *L. macroura* [54] et ses deux dérivés, le premier est le 10-*O*- β -glucosylaucubine (19) dans *L. vulgaris* [53, 55] et *L. purpurea* [56] et le second est la linaride (10-deoxyaucubine) (20), un nouveau iridoïde isolé à partir de *L. muralis* [57].

Une étude sur *L. purpurea*, a montré la présence d'un nouveau iridoïde avec une structure de type nepeta-lactone et une unité de sucre lié au cycle cyclopentène nommé purpureoside (21) [56]. D'autres iridoïdes ont été isolés à partir de *L. japonica* en particulier antirrhide (22), un constituant très connu dans le genre *Linaria* et ses deux dérivés le 6- β -hydroxyantirrhide (23) et la linarioloside (24), ainsi que le 5-deoxyteuhircoside (25) et le seco-linarioside (26). Ces quatre derniers sont des nouveaux iridoïdes [58]. D'autres travaux

ont permis l'identification de la genestifolioside (27), un nouveau iridoïde dans *L. genistifolia* [59], le 8-*epi*-muralioside (28), un nouveau iridoïde glycosylé polyhydroxylé dans *L. arcusangeli* [60], l'acide mussaenosidique (29) dans *L. aegyptiaca*, le 7 α -hydroxyharpagide (30) dans *L. heterophylla*, le catalpol (31) et l'isocatalpol dans *L. macroura*.

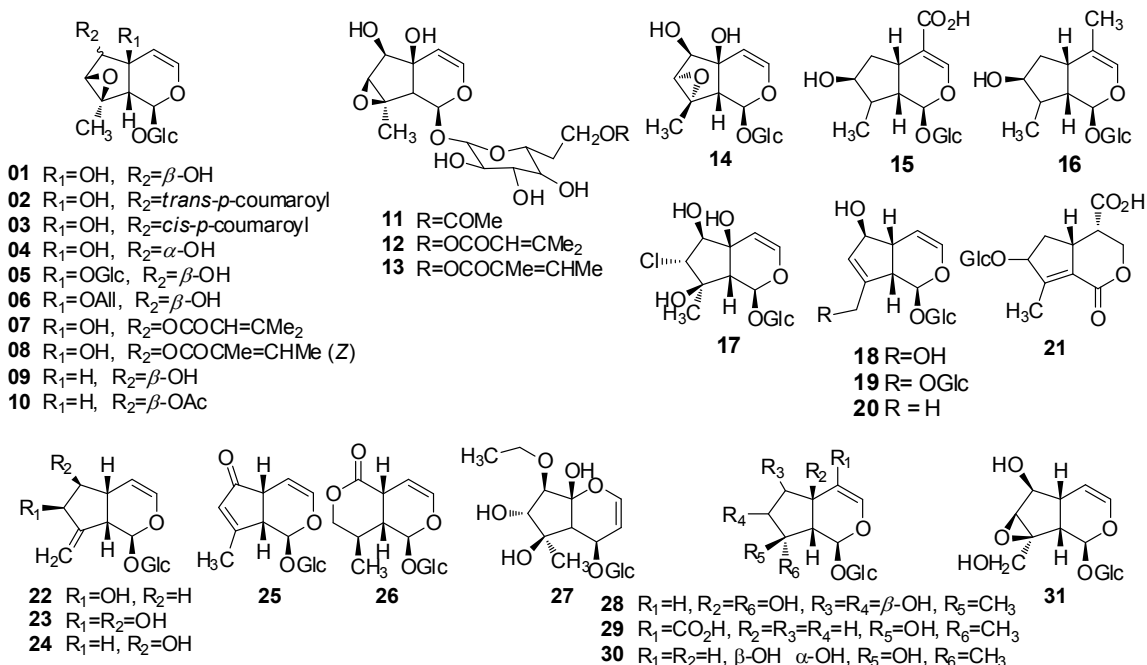


Figure I.1 : iridoïdes isolés du genre *Linaria*

Plusieurs autres nouveaux iridoïdes ont été isolés des espèces du genre *Linaria* comme le 4-carboxy-boonein (32) de *L. vulgaris* [55], un bi-iridoïde : l'arcusangeloside (33) de *L. arcusangeli* [45], l'acide 7-deoxyiridolactonique (34) et ses dérivés l'acide 7-deoxyiridolactonique diméthyles ester (35), l'iridolinaroside A, B, C et D (36-39) [61] et l'iridolinarine A, B et C (40-42) [62] de *L. japonica* ainsi que le 4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl) D-glucopyranose (43) et le 3-Acetyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (44) de *L. canadensis* [63].

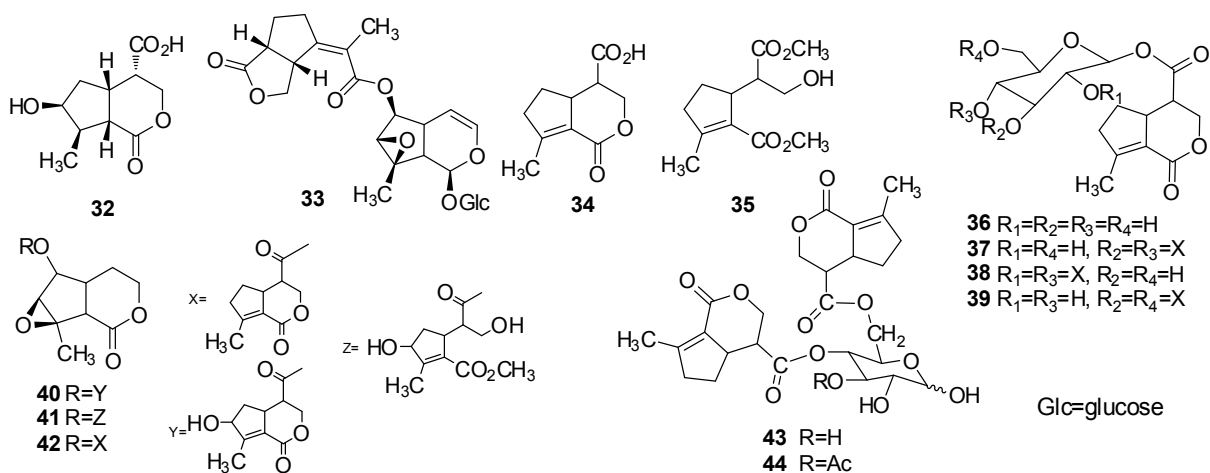


Figure I.2 : autres iridoïdes isolés du genre *Linaria*

Le tableau suivant présent tous les iridoïdes isolés à partir du genre *Linaria*.

Tableau I.2 : iridoïdes isolés du genre *Linaria*

Composé	espèce	Référence
antirrhinoside (1)	<i>L. vulgaris</i>	[35, 41, 42, 46, 48, 55, 64, 65]
	<i>L. japonica</i>	[15, 58]
	<i>L. clementi</i>	[43]
	<i>L. haelava</i>	[66]
	<i>L. genistifolia</i>	[35,48]
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. cymbalaria</i>	
	<i>L. arcusangeli</i>	[44]
	<i>L. flava</i>	[44, 45]
	<i>L. purpurea</i>	[56]
	<i>L. capraria</i>	[47]
	<i>L. aucheri</i>	[67]
	<i>L. reflexa</i>	[21]
<i>L. multicaulis</i>	[68]	
<i>L. heterophylla</i>	[69]	
<i>L. aegyptiaca</i>	[52]	
<i>L. kurdica</i>	[70]	
6- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroylantirrhinoside (2)	<i>L. vulgaris</i>	[35, 42]
6- <i>O</i> - <i>cis</i> - <i>p</i> -coumaroylantirrhinoside (3)		
procumbide (4)	<i>L. vulgaris</i>	[42]
5- <i>O</i> -glucosylantirrhinoside (5)	<i>L. haelava</i>	[66]
	<i>L. vulgaris</i>	[35, 48]
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
<i>L. pelisseriana</i>		
<i>L. sp.</i>		

	<i>L. flava</i>	[44, 45, 60]
	<i>L. arcusangeli</i>	
	<i>L. purpurea</i>	
5- <i>O</i> -allosylantirrhinoside (6)	<i>L. vulgaris</i>	[35, 48]
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. Sp.</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. kurdica</i>	[70]
6-seneciolyantirrhinoside (7)	<i>L. clementi</i>	[43]
6-angeloylantirrhinoside (8)	<i>L. heterophylla</i>	[69]
	<i>L. multicaulis</i>	[68]
5-deoxyantirrhinoside (9)	<i>L. arcusangeli</i>	[44, 45]
	<i>L. flava</i>	
genistifoline (10)	<i>L. genistifolia</i>	[46,48]
6'- <i>O</i> -acetylantirrhinoside (11)	<i>L. flava</i>	[44]
6'- <i>O</i> -seneciolyantirrhinoside (12)	<i>L. capraria</i>	[47]
6'- <i>O</i> -angeloylantirrhinoside (13)		
7,8- <i>epi</i> -antirrhinoside (14)	<i>L. dalmatica</i>	[48]
l'acide 8- <i>epi</i> -loganique (15)	<i>L. cymbalaria</i>	[49]
7- β -hydroxy-8- <i>epi</i> -iridodial glucoside (16)	<i>L. cymbalaria</i>	[49]
	<i>L. japonica</i>	[58]
linarioside (17)	<i>L. japonica</i>	[50]
	<i>L. dalmatica</i>	[46, 48]
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. vulgaris</i>	[51]
	<i>L. arcusangeli</i>	[45]
	<i>L. flava</i>	
	<i>L. aegyptiaca</i>	[52]
aucubine (18)	<i>L. vulgaris</i>	[53]
	<i>L. macroura</i>	[54]
10- <i>O</i> - β -glucosylaucubine (19)	<i>L. vulgaris</i>	[53, 55]
	<i>L. purpurea</i>	[56]
linaride (20)	<i>L. muralis</i>	[57]
	<i>L. japonica</i>	[58]
	<i>L. flava</i>	[44, 45]
	<i>L. arcusangeli</i>	
purpureoside (21)	<i>L. purpurea</i>	[56]
antirrhide (22)	<i>L. japonica</i>	[15, 58]
	<i>L. clementi</i>	[43]
	<i>L. simplex</i>	[23]
	<i>L. flava</i>	[44]
	<i>L. arcusangeli</i>	[44, 45]
	<i>L. purpurea</i>	[56]
	<i>L. reflexa</i>	[21]
	<i>L. vulgaris</i>	[55]
	<i>L. multicaulis</i>	[68]

	<i>L. kurdica</i>	[70]
6- β -hydroxyantirrhine (23)	<i>L. genistifolia</i>	[23]
	<i>L. japonica</i>	[58]
	<i>L. purpurea</i>	[56]
	<i>L. vulgaris</i>	[55]
linarioloside (24)	<i>L. japonica</i>	[58]
5-deoxyteuhircoside (25)	<i>L. japonica</i>	[58]
seco-linarioside (26)		
genestifolioside (27)	<i>L. genistifolia</i>	[59]
8- <i>epi</i> -muralioside (28)	<i>L. arcusangeli</i>	[60]
L'acide mussaenosidique (29)	<i>L. aegyptiaca</i>	[52]
7 α -hydroxyharpagide (30)	<i>L. heterophylla</i>	[69]
catalpol (31)	<i>L. macroura</i>	[54]
4-carboxy-boonein (32)	<i>L. vulgaris</i>	[55]
arcusangeloside (33)	<i>L. arcusangeli</i>	[44, 45]
	<i>L. flava</i>	
l'acid 7-deoxyiridolactonique (34)	<i>L. japonica</i>	[61]
l'acid 7-deoxyiridolactonique diméthyle ester (35)		
iridolinaroside A (36)		
iridolinaroside B (37)		
iridolinaroside C (38)		
iridolinaroside D (39)		
iridolinarine A (40)	<i>L. japonica</i>	[62]
iridolinarine B (41)		
iridolinarine C (42)		
4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (43)	<i>L. canadensis</i>	[63]
3-acétyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (44)		

4.1.2. Les monoterpénoïdes

Les monoterpènes acyclique ne sont pas très répons dans le genre *Linaria*, seulement trois ont été isolés: l'acide 6,7-dihydrofoliamenthic 1-*O*- β -D-glycopyranosyl ester-8-*O*- β -D-glycopyranoside (45), le 10-hydroxygeraniol diglucosylés (46) à partir de *L. japonica* [71] et le 8-*O*-glucosyl-méthoxy-6,7-dihydrofoliamenthoy (47) à partir de *L. capraria* [47].

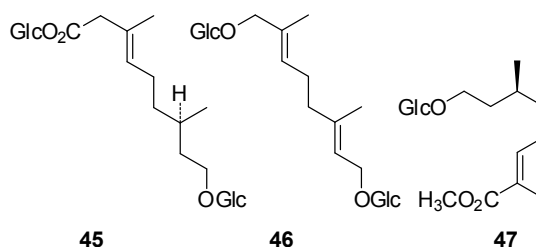


Figure I.3 : acyclique monoterpènes isolés des espèces du genre *Linaria*

4.1.3. Les diterpénoïdes

Le squelette néo-clérodane diterpénoïde est présent seulement dans deux espèces du genre *Linaria* surtout *L. saxatilis*. Seulement deux nouveaux néo-clérodane diterpénoïdes ont été isolés à partir de *L. japonica*, le premier est un diterpène dialdéhyde (linaridial, **48**) [72] et le second est la linarienone (**49**) [73].

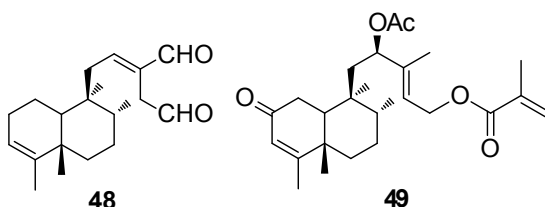


Figure I.4 : la structure de linaridial et linarienone

San Feliciano et ses collaborateurs [32, 74] ont pu isolés seize néo-clérodane diterpénoïdes avec deux autres dérivés acétylés des parties aériennes de *L. saxatilis* (L.) Chaz, il s'agit de 15, 16-acetoxy-15, 16-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12Z-diene (**50**), 15, 16-acetoxy-15, 16-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12E-diene (**51**), isolinaridial (**52**) [75], isolinaridiol (**53**), diacétate isolinaridiol (**54**), Bis-clerodane (**55**), isolinaritriol (**56**), triacétate isolinaritriol (**57**), 15, 16-diacétate d'isolinaritriol (**58**), 12, 15-diacétate d'isolinaritriol (**59**), 12, 16-diacétate d'isolinaritriol (**60**), 16-oxo-ent-cleroda-4(18), 12-dien-15, 11-lactone (**61**) 15-acetoxy-11, 15-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12-dien-16-al (**62**), 15, 16-epoxy-16-méthoxy-ent-cleroda-4(18), 12Z, 14-triene (**63**), ent-cleroda-4(18), 12-dien-15-al (**64**), 15, 16-epoxy-15, 16-diméthoxy-ent-cleroda-4(18), 12Z-diene (**65**), 15-acetoxy-15, 16-epoxy-15-méthoxy-ent-cleroda-4(18), 12Z-diene (**66**) et 15-acetoxy-15, 16-epoxy-16-méthoxy-ent-cleroda-4(18), 12E-dien-14-ol (**67**). Dans le but d'identifié d'autres néo-clérodane diterpénoïdes, l'investigation faite par San Feliciano *et al.* sur *L. saxatilis* var. *glutinosa* a montré la richesse des racines avec la présence de six nouveaux composés : 14, 15, 16-triacetoxy-15, 16-epoxy-ent-cleroda-3, 12Z-diene (**68**), 15, 16-diacetoxy-12, 13-15, 16-diepoxy-ent-clerod-3-ene (**69**), 15, 16-diacetoxy-ent-cleroda-3, 12E-diene (**70**), 15, 16-diacetoxy-ent-cleroda-3, 12Z-diene (**71**), ent-cleroda-3, 12E-dien-15, 16-dial (**72**), ent-cleroda-3, 12Z-dien-15, 16-dial (**73**) [16] et les parties aériennes avec la détermination d'un nouveau diterpénoïde, le 14, 15, 16-triacetoxy-15, 16-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12E-diene (**74**) ainsi que le *E*-isolinaridial (**75**) et le 15-acetoxy-11, 15-epoxy-ent-cleroda-4(18), 12-dien-16-al (**76**) [76]. Une autre étude faite sur *L. saxatilis* var. *glutinosa*, a permis d'isoler cinq nouveaux diterpénoïdes, trois des parties aériennes : 15 ξ , 16 ξ -diacetoxy-15, 16-epoxy-néo-cleroda-4(18), 11E-dien-13 ξ -ol (**77**), 15 α , 16 β -diacetoxy-15, 16-epoxy-néo-

cleroda-4(18), 12Z-dien-14β-ol (**78**) et (12R)18-nor-12, 15, 16-Triacetoxy-néo-cleroda-4(18), 13E-dien (**79**) [77] et deux des racines : 15, 16-diacetoxy-15, 16-epoxy-néo-cleroda-3, 12Z-diène (**80**) et 15, 16-diacetoxy-12, 13-15, 16-diepoxy-14-hydroxy-néo-clerod-3-ène (**81**) [78].

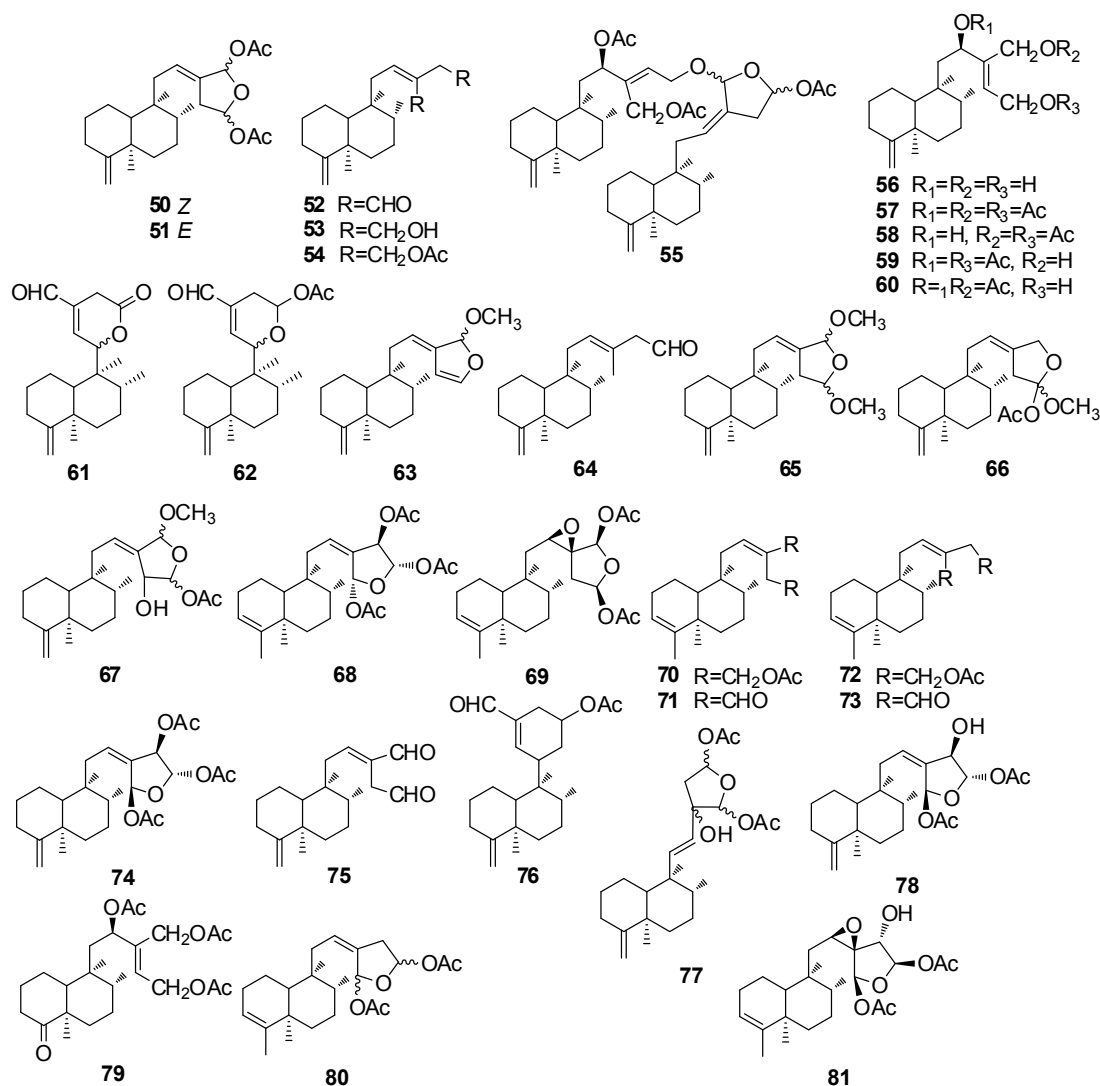


Figure I.5 : néo-clérodane diterpénoïdes isolés des espèces du genre *Linaria*

En 1993, une recherche rapporte le premier isolement des labdanes du genre *Linaria* avec l'identification de labda-8,13E-dien-15-yl acétate (**82**), labda-7,13E-dien-15-yl acétate (**83**), labda-8(17),13E-dien-15-ol acétate (**84**) et labda-13E-en-8,15-diol 15-monoacétate (**85**) [79].

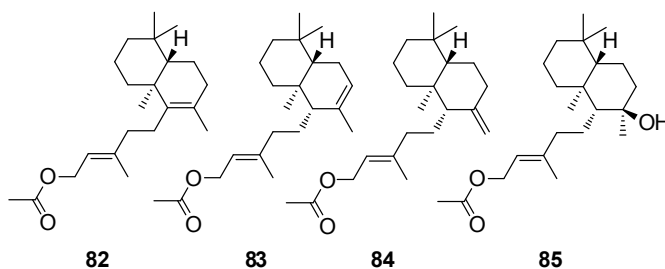


Figure I.6 : labdanes des espèces du genre *Linaria*

L'étude de l'activité biologique antitumorale du composé (**86**) isolés de *L. saxatilis* var. *glutinosa* et ses dérivés semi-synthétiques, exposées dans l'inhibition de la croissance *in vitro* contre les cellules leucémie murine P-388, carcinome pulmonaire humain A-549, carcinome colorectal humain HT-29 et malignes de mélanome humain Mel-28, a donné des résultats satisfaisants avec un IC₅₀ inférieur à 1 µM [19].

Une recherche concerne l'effet inhibiteur de deux néo-clérodane diterpénoïdes, *E*-isolinaridial (*EI*) (**75**) et son dérivé méthylcétone (*EIM*) (**87**) isolés de *L. saxatilis* var. *glutinosa*, sur la PLA₂ et d'autres activités enzymatiques impliquées dans le processus inflammatoire a rapporté que ces deux composés inhibent la sPLA₂ synovial humain d'une manière dépendante par rapport la concentration avec des valeurs d'IC₅₀ de 0.20 et 0.49 µM, respectivement, comparable à scalaradial. En outre, ces composés ont diminués l'activité acellulaire 5-lipoxygénase et A23187-induite la biosynthèse de neutrophile LTB₄. Une autre fonction des neutrophiles humains, tel que la dégranulation de récepteur-médiée, a été également réduite d'une manière significative. En revanche, aucun des composés affectés la production de super-oxyde dans les leucocytes, la cyclo-oxygénase-1 ou la cyclo-oxygénase-2 et inductibles les activités de synthèse nitrique oxyde dans des analyses acellulaires [25].

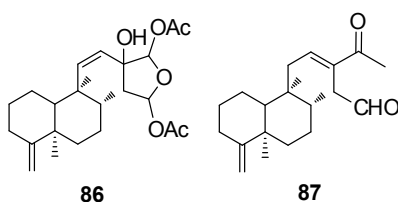


Figure I.7 : *EI* et *EIM*

4.1.4. Les triterpénoïdes

Les triterpénoïdes ne sont pas bien commun dans le genre *Linaria*, la majorité ont été isolés à partir de *L. vulgaris*. La plupart d'entre eux sont des stéroïdes avec la présence de certaines structures correspondant aux squelettes oléane et lupane.

Les Stéroïdes

Plusieurs stéroïdes ont été rapportés dans le genre *Linaria* tel que le β -sitosterol (**88**) [80], son dérivé 3-*O*- β -D-glucopyranoside (daucosterol) (**89**) [21] et le stigmasterol (**90**) [81]. L'investigation phytochimique sur *L. vulgaris* a montré la présence des stéroïdes suivants: 6 β -hydroxystigmast-4-en-3-one (**91**), 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one (**92**), daucosterol palmitate (**93**), 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-diene-3 β -ol (**94**), ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol (**95**) ainsi que les composés (**88**, **89**) [82], le cycloart-25-ene-3 β -, 24 ϵ -diol (**96**) et le cycloart-23-

ene-3 β , 25-diol (**97**) [83]. Une autre étude faite par GC-MS a permis de détecter le stigmastadienone (**98**) [80]. En utilisant la même méthode, les composés 9, 19-cyclolanost-24-en-3-ol (**99**), fucosterol (**100**), campesterol (**101**) et stigmasta-5, 24-dien-3-ol (**102**) ont été détectés dans l'extrait *n*-hexane de *L. multicaulis* subsp. *multicaulis* [68]. D'autres stéroïdes ont été isolés à partir de *L. aucheri* et sont ergost-7-en-3 β -ol (**103**), stigmasta-5, 22-*E*-dien-3 β -ol (**104**) et stigmast-5-en, 24*S*-3 β -ol (**105**) [67].

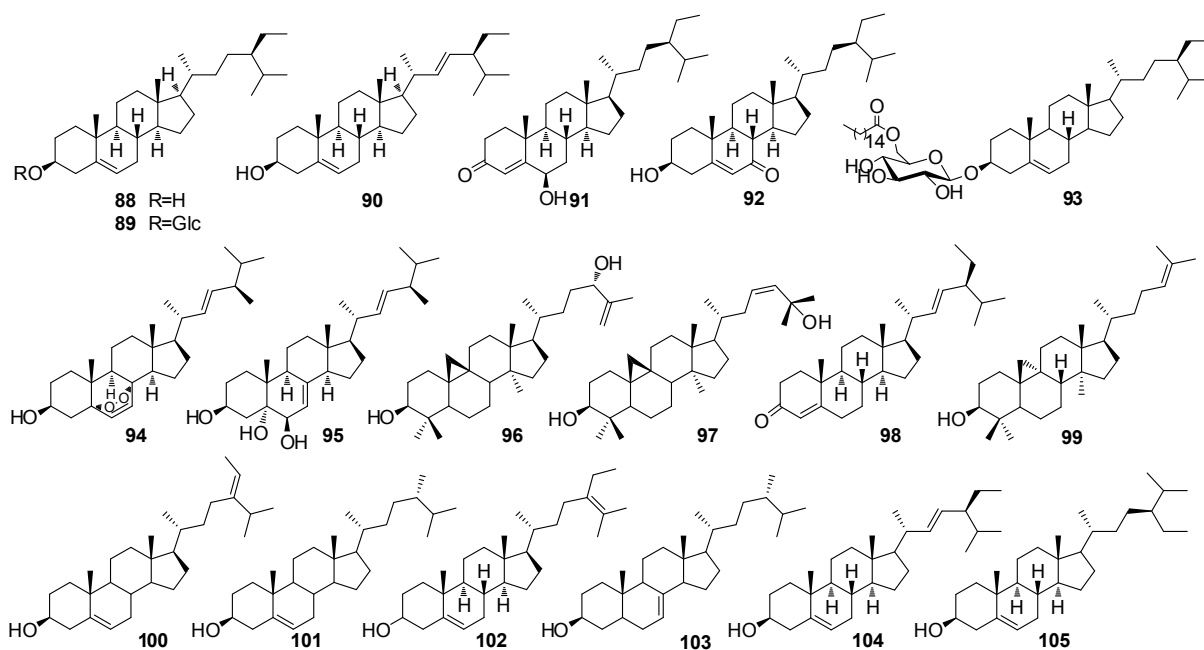


Figure I.8 : stéroïdes des espèces du genre *Linaria*

Oléanes

Quelques triterpénoïdes de type oléane ont été isolés tel que l'isomultiflorenol (**106**), l'isomultiflorenone (**107**), l'acide ursolique (**108**), l'acide maslinique (**109**) [83], l' α -amyrine (**110**), soyasapogénol B (**111**) à partir de *L. vulgaris* [80]. La β -amyrine (**112**), a été isolée à partir de *L. aucheri* [67].

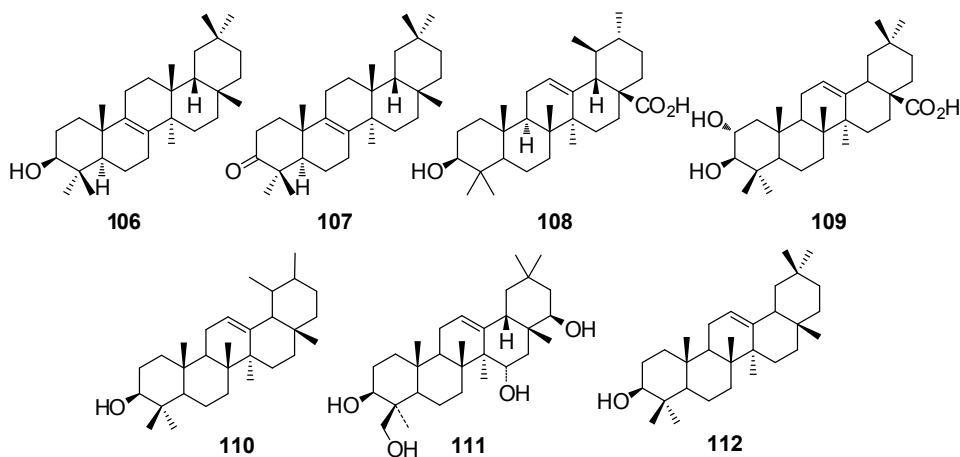


Figure I.9 : oléanes du genre *Linaria*

Lupanes

Seulement l'acide betulique (113) a été isolé et identifié comme le seul lupane triterpénoïde à partir de *L. vulgaris* [80].

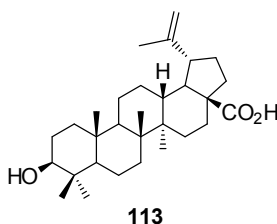


Figure I.10 : l'acide betulique

4.2. Les polyphénols

Les composés phénoliques sont caractérisés par au moins un cycle aromatique substitué par un ou plusieurs groupements hydroxyles. Des milliers de structures phénoliques ont été identifiés. Cette classe est largement distribuée dans le règne végétal [84]. Elle contient de nombreux squelettes comme les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines et les xanthones. Le genre *Linaria* comporte différentes classes : les acides phénoliques, les phényléthanoïdes et en particulier les flavonoïdes.

4.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont communs dans le genre *Linaria* en particulier *L. vulgaris* avec l'identification par RP-HPLC de l'acide protocatéchique (114), l'acide gallique (115), l'acide *p*-hydroxybenzoïque (116), l'acide vanillique (117) et l'acide salicylique (118) [85]. L'acide gluco-syringique (119) [51, 86], *p*-méthoxybenzoïque (120) [51], l'acide caféique (121), l'acide *p*-coumarique (122), l'acide férulique (123), l'acide homoprotocatechuique (124) et l'acide *O*-hydroxyphénylacétique (125) [85]. Un acide phénolique connu sous le nom l'acide chlorogénique (126) a été isolé à partir de *L. macroua* [54].

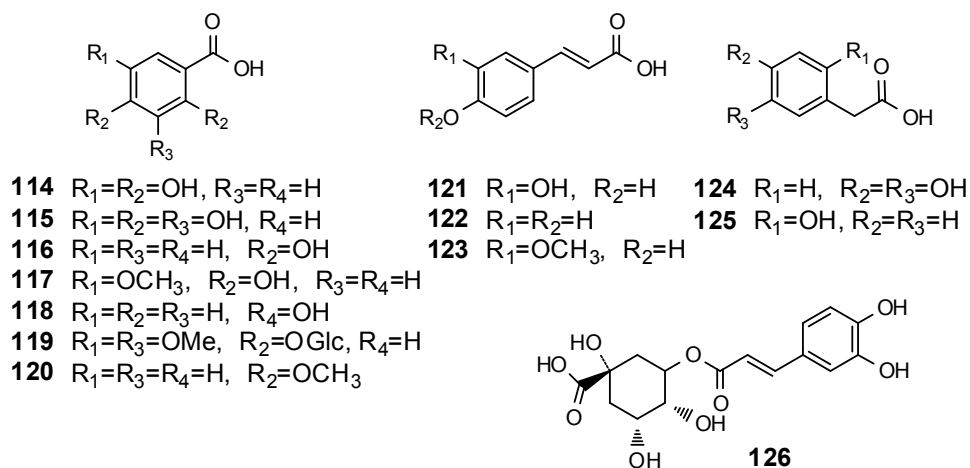


Figure I.11 : Les acides phénoliques isolés des espèces du genre *Linaria*

4.2.2. Les composés phénoliques glycosylés

Ils sont connus dans certaines espèces du genre telles que *L. japonica* avec salidroside (**127**), syringine (**128**) et β -D-glucopyranose-1-féruulate (**129**) [58], *L. vulgaris* avec l'alcool benzylique β -D-(2'-O- β -xylopyranosyle)-glucopyranoside (**130**), l'alcool benzylique O- β -D-glucopyranoside (**131**), l'alcool benzylique O- β -D-primveroside (**132**), 3, 5-diméthyl-4-hydroxy-benzaldéhyde (**133**), 2, 4-di-tert butyle phénol (**134**) et liriodendrine (**135**) [51]. Plusieurs phényléthanoïdes ont été identifiés dans *L. japonica* comme la martynoside (**136**), glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) martynoside (**137**) avec trois nouveaux dérivés l'uranoside A, B et C (**138-140**) [14]. Un phényle propanoïde glycosylé : acetoside (verbascoside) (**141**) semblable à martynoside (**136**) a été décrit dans *L. haelava* [66].

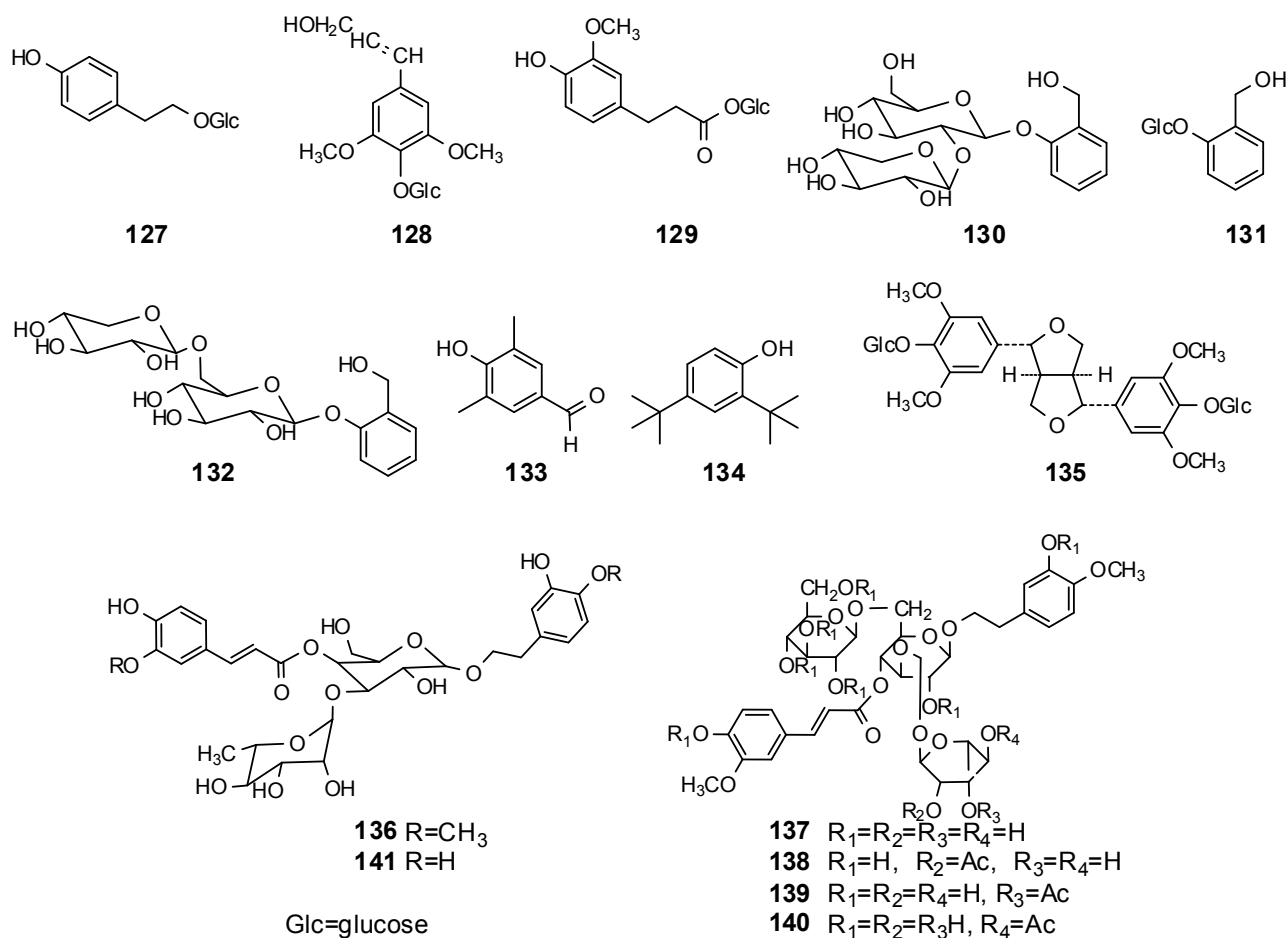


Figure I.12 : Les composés phénoliques glycosylés isolés des espèces du genre *Linaria*

Tableau I.3 : Polyphénols isolés à partir du genre *Linaria*

Composé	Espèce	Référence
l'acide protocatechique (114)	<i>L. vulgaris</i>	[85]
l'acide gallique (115)		
l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque (116)		
l'acide vanillique (117)		
l'acide salicylique (118)		
l'acide gluco-syringique (119)	<i>L. vulgaris</i>	[51,86]
l'acide <i>p</i> -methoxybenzoïque (120)	<i>L. vulgaris</i>	[51]
l'acide caféique (121)	<i>L. macroua</i>	[54]
	<i>L. vulgaris</i>	[85, 87]
l'acide <i>p</i> -coumarique (122)	<i>L. vulgaris</i>	[85, 87]
l'acide ferulique (123)	<i>L. vulgaris</i>	[85]
l'acide homoprotocatechique (124)		
l'acide <i>O</i> -hydroxyphenylacétique (125)		
l'acide chlorogénique (126)	<i>L. macroua</i>	[54]
salidoside (127)	<i>L. japonica</i>	[58]
syringine (128)		
β -D-glucopyranose-1-ferulate (129)		
benzyl alcohol β -D-(2'-O- β -xylopyranosyl)-glucopyranoside (130)	<i>L. vulgaris</i>	[51]
benzyl alcohol <i>O</i> - β -D-glucopyranoside		

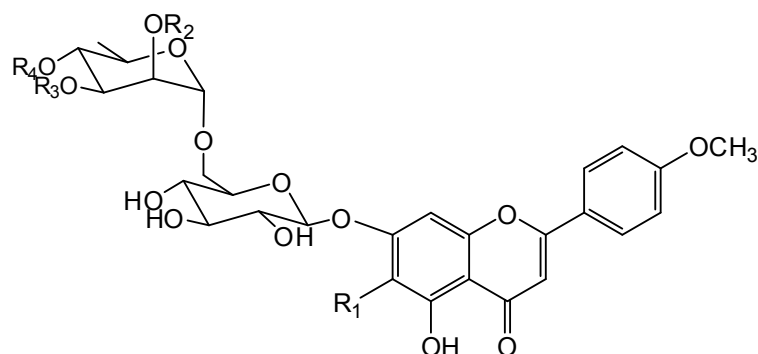
(131)		
benzyl alcohol <i>O</i> - β -D-primveroside (132)		
3, 5-dimethyl-4-hydroxy benzaldehyde		
(133)		
2, 4-ditert butyl phenol (134)		
liriodendrine (135)		[51, 86]
martynoside (136)	<i>L. japonica</i>	[14]
glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) martynoside (137)		
uranoside A (138)		
uranoside B (139)		
uranoside C (140)		
acetoside (141)	<i>L. haelava</i>	[66]

4.2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très répandus dans le genre *Linaria*, notamment les flavones, les flavonols et leurs glycosylés.

Les flavones et flavonoles glycosylés

Les flavones *O*-glycosylés sont commun dans les espèces du genre *Linaria*, en particulier les flavones 7-*O*-rutinoside, elles sont spécifiques pour le genre et représentés par le composé scutellaréine-6,4'-diméthoxy-7-*O*- β -D-rutinoside connu sous le nom pectolinarine (142) décrit pour la première fois à partir de *L. vulgaris* [88] avec un nouveau dérivé de ce dernier (142) mais avec l'absence du groupement méthoxyle en position 6, c'est la linarine (143). Un dérivé acétylé de (142) nommé la linariine (4'''-*O*-acétylpectolinarine) (144), ce dernier a été isolé pour la première fois de *L. japonica* et *L. vulgaris* [89], deux nouveaux dérivés de (144) ont été décrits dans *L. japonica*, il s'agit de l'isolianriine A (2'''-*O*-acétylpectolinarine) (145) et l'isolianriine B (3'''-*O*-acétylpectolinarine) (146) [90]. Le composé diosmétine 4'-méthoxy-7-*O*- β -D-rutinoside (diosmine) (147) a été identifié dans deux espèces du genre *Linaria* [54, 66]. Notant que les flavones glycosylés (142), (143) et (144) sont les plus connus dans ce genre, le composé genkwanine-4'-*O*-rutinoside (148) est la seule flavone 4'-*O*-rutinoside décrit uniquement dans *L. canadensis* [63].



- 142** $R_1=OCH_3, R_2=R_3=R_4=H$
143 $R_1=R_2=R_3=R_4=H$
144 $R_1=OCH_3, R_2=R_3=H, R_4=Ac$
145 $R_1=OCH_3, R_3=R_4=H, R_2=Ac$
146 $R_1=OCH_3, R_2=R_4=H, R_3=Ac$

Figure I.13 : Les dérivés de la pectolinarine

Les flavones 7-*O*-glycosylés sont représentés dans le genre *Linaria* par l'apigénine-7-*O*- β -D-glucoside (**149**) et les dérivés de la lutéoline (**150**), il s'agit de la lutéoline 7-*O*-glucoside (**151**) isolée à partir de *L. macroura* [54], la lutéoline 7-*O*-glucuronide (**152**), ces deux derniers produits ont été isolées à partir de *L. canadensis* [63] et la lutéoline 4'-méthoxy-7-*O*- β -D-glucoside (diosmétine-7-*O*- β -D-glucoside) (**153**) a été isolée à partir de *L. macroura* [54]. Un dérivé de l'acacétine (**154**); l'acacétine 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**155**) décrits dans *L. kurdica* [91] et un autre dérivé de la pectolinarigénine (**156**), la linaroside (scutellaréine-6,4'-diméthoxy-7-*O*- β -D-glucopyranoside) (**157**) a été identifiée comme nouveau flavone glycosylé de *L. sessilis* [92].

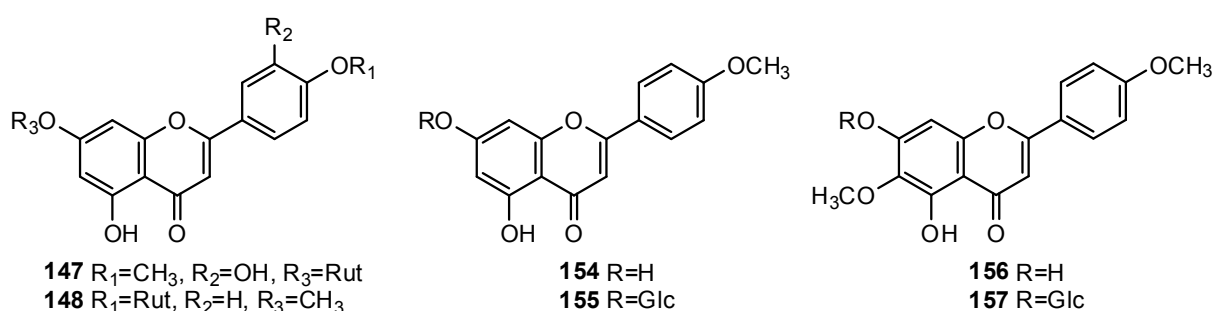


Figure I.14 : Les flavones glycosylés isolés des espèces du genre *Linaria*

Seule la quercétine-7-*O*-rutinoside (**158**) des flavonoles glycosylés a été isolée à partir de *L. canadensis* [63].

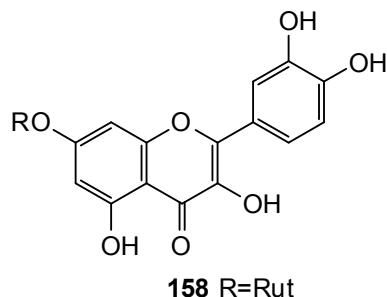


Figure I.15 : la quercétine-7-*O*-rutinoside

Les flavones et flavonols aglycones

La majorité des flavones ont été isolées des espèces du genre *Linaria* sont des dérivés de la scutellaréine éther méthylique ainsi que la pectolarigenine (**156**) et l'hispiduline (**159**) [93], la scutellaréine-4'-méthyl éther (5, 6, 7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone) (**160**), une nouvelle flavone de *L. aeruginea* [94] et la ladaneine (**161**) de *L. aegyptiaca* décrite pour la première fois dans la famille Scrophulariaceae [52]. L'apigénine (**162**) et son 4'-méthyl éther (acacétine, **154**) sont communs dans le genre *Linaria*, tandis que son dérivé le 7-méthyl éther (genkwanine, **163**) a été trouvé que dans *L. canadensis* [63]. La lutéoline (**150**) et son dérivé 4'-méthyle éther (diosmétine) (**164**) sont communs à *L. macroura* [54], *L. vulgaris* [93] et *L. canadensis* [63]. Seulement une flavone avec deux groupements méthoxyyles nommée 4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-biméthoxyflavone (chryisine) (**165**) a été décrite [51].

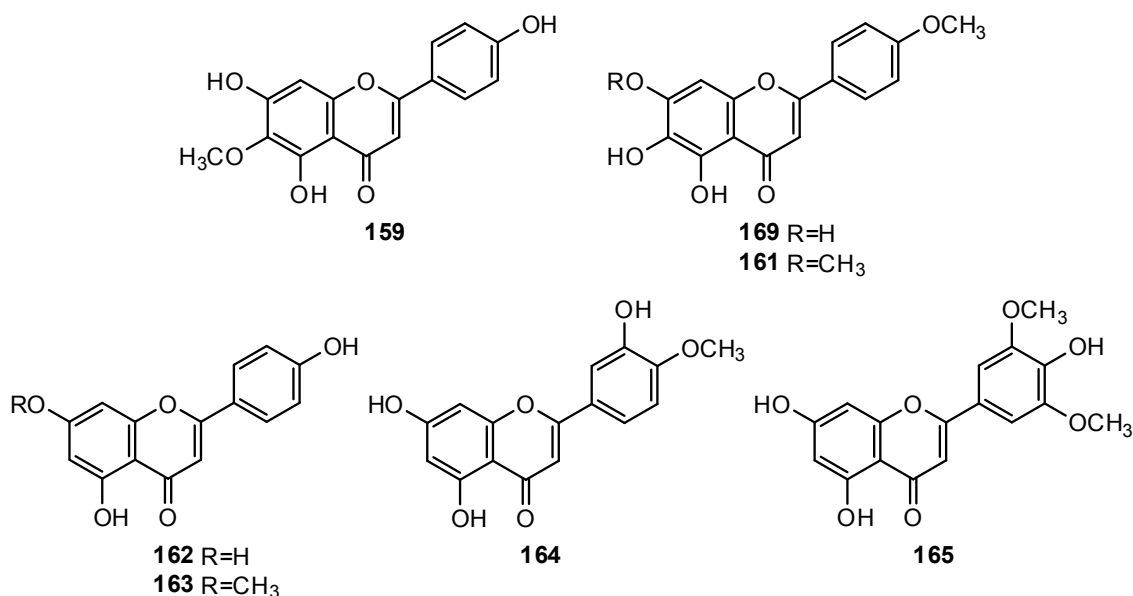


Figure I.16 : les flavones aglycones des espèces du genre *Linaria*

Les quatre flavonols qui ont été décrits à ce jour dans le genre *Linaria* comprennent un nouveau dérivé du kaempférol le 3, 5-di-*O*-méthyle kaempférol (**166**) et le composé 3, 7-di-*O*-méthyle kaempférol (**167**) rapporté dans *L. dalmatica* [81]. La quercétine (**168**) est présente

dans *L. vulgaris* [95] et *L. macroura* [54]. La myricétine (3', 4', 5', 5', 7-pentahydroxy flavonol) (169) a été identifiée dans *L. macroura* [54].

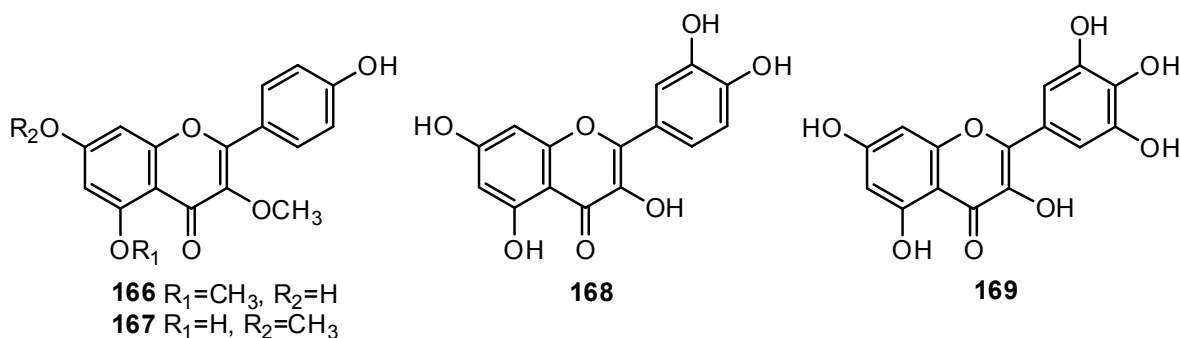


Figure I.17 : les flavonols aglycones des espèces du genre *Linaria*

Les aurones et flavanones

La classe des aurones est présente dans le genre *Linaria* par l'identification de deux composés l'aureusine (anreusidine 6-glucoside) (170) et bracteatine 6-glucoside (171) dans *L. maroccana* [96]. Une seule flavanone nommée l'hespéridine (172) a été identifiée par HPLC dans *L. vulgaris* subsp. *sinensis* (Bebeaux) Hong [97].

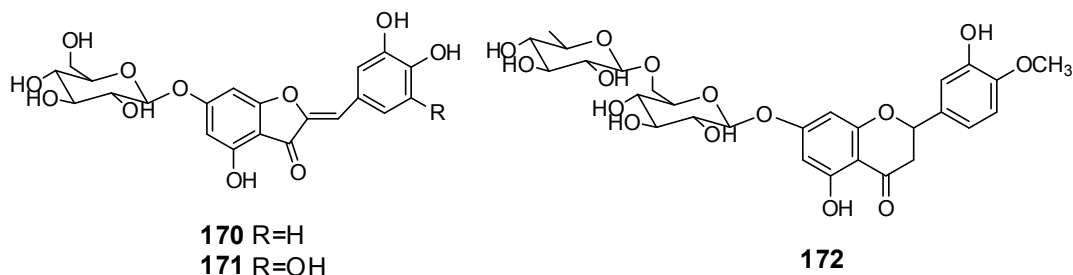


Figure I.18 : aurones et flavanone des espèces du genre *Linaria*

L'activité antiproliférative du pectolarine (142), liniarine (144), isoliniarine A (145) et isoliniarine B (146) isolées à partir de *L. reflexa*, ainsi que pectolarigenine (156), le composé (157) (l'hydrolyse acide totale du composé 142 a donné la génine 156 et la rutinose, l'hydrolyse acide partielle avec le départ du groupement rhamnosyle a mené au composé 157) et la peracétylpectolarine (173) (173 obtenue par l'acétylation de 142) a été évaluée *in vitro* par le dosage SRB contre les cellules: la grande cellule de carcinome du poumon COR-L23, carcinome hépatocellulaire HepG-2, adénocarcinome rénal ACHN, mélanome amélanotique C32, adénocarcinome colorectal Caco-2 et la cellule normale du poumon fœtal humain MRC5. La pectolarine (142) présente une activité cytotoxique forte sur les lignes cellulaires COR-L23, Caco-2 et C32 avec une valeur d'IC₅₀ de 5.03, 6.18, et 7.17 μ M, respectivement. Des activités similaires ont été enregistrées pour les composés (144), (145) et (146). La

pectolarigenine (**156**) présente la plus forte activité cytotoxique sur les lignes cellulaires COR-L23 et C32 avec une valeur d'IC₅₀ de 4.07 et 7.02 µM, respectivement [21]. Ces bons résultats ont encouragé l'équipe à poursuivre la recherche et d'obtenir une excellente activité cytotoxique sur les dérivés synthétique de pectolarigenine (**156**), un de ces dérivés (**174**) présente une bonne activité contre les cellules COR-L23, ACHN, C32, A549 et A375 avec une valeur d'IC₅₀ de 7.2 , 10.8, 8.9 , 7.4 et 7.7 µM, respectivement. Aucun des composés testés (**142**, **156**, et **174** avec cinq dérivés synthétiques) n'a affecté la prolifération des fibroblastes cutanés 142BR suggérant une activité sélective contre les cellules tumorales [22]. Une autre recherche biologique menée sur *L. reflexa* est l'activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) de flavones isolées (**144-146**) et les extraits de la plante en utilisant la méthode d'Ellman. Une relation dose-réponse a été observée pour l'ensemble des extraits et les composés isolés ont présenté une activité avec des valeurs d'IC₅₀ allant de 0.27 à 0.30 µM [98].

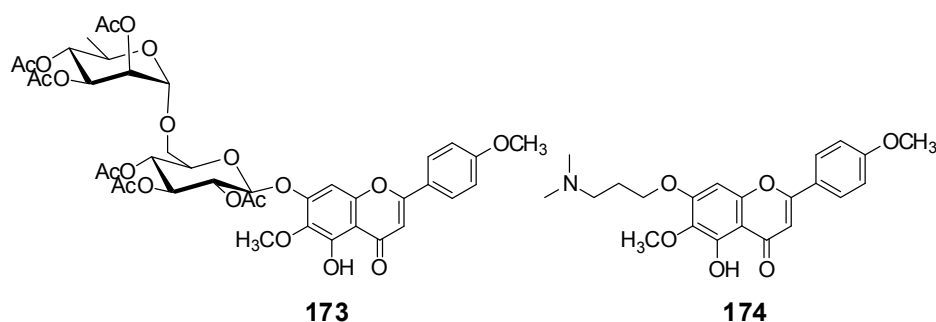


Figure I.19 : autres flavones de l'activité biologique

Tableau I.4 : flavonoïdes isolés du genre *Linaria*

Composé	Espèce	Référence
pectolarine (142)	<i>L. vulgaris</i>	[31, 48, 88, 93]
	<i>L. vulgariformis</i>	[31]
	<i>L. popovii</i>	
	<i>L. japonica</i>	[93, 99]
	<i>L. kurdica</i>	[66, 91, 31]
	<i>L. haelava</i>	[48]
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. Sp.</i>	
linarine (143)	<i>L. vulgaris</i>	[88, 91, 100, 101]
	<i>L. japonica</i>	[90]
	<i>L. haelava</i>	[48]
	<i>L. kurdica</i>	[70]
linariine (144)	<i>L. vulgaris</i>	[89]
	<i>L. japonica</i>	[90]
	<i>L. aucheri</i>	[67]

	<i>L. reflexa</i>	[21]
	<i>L. kurdica</i>	[70]
isolinariine A (145)	<i>L. japonica</i>	[90]
	<i>L. reflexa</i>	[21]
isolinariine B (146)		
diosmine (147)	<i>L. macroura</i>	[54]
	<i>L. haelava</i>	[48]
genkwanine-4'- <i>O</i> -rutinoside (148)	<i>L. canadensis</i>	[63]
apigénine-7- <i>O</i> - β -D-glucoside (149)	<i>L. macroura</i>	[54]
lutéoline (150)	<i>L. macroura</i>	[54]
	<i>L. vulgaris</i>	[93]
	<i>L. canadensis</i>	[63]
Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside (151)	<i>L. macroura</i>	[54]
	<i>L. canadensis</i>	[63]
lutéoline-7- <i>O</i> -glucuronide (152)	<i>L. canadensis</i>	[63]
diosmétine-7- <i>O</i> - β -D-glucoside (153)	<i>L. macroura</i>	[54]
acacétine (154)	<i>L. aeruginea</i>	[94]
	<i>L. kurdica</i>	[91]
	<i>L. macroura</i>	[95]
	<i>L. vulgaris</i>	[93]
acacétine-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (155)	<i>L. kurdica</i>	[91]
pectolarigenine (156)	<i>L. vulgaris</i>	[93]
linaroside (157)	<i>L. kurdica</i>	[91]
	<i>L. sessilis</i>	[92]
quercétine-7- <i>O</i> -rutinoside (158)	<i>L. canadensis</i>	[63]
hispiduline (159)	<i>L. vulgaris</i>	[93]
scutellareine-4'-méthyle éther (160)	<i>L. aeruginea</i>	[94]
ladaneine (161)	<i>L. aegyptiaca</i>	[52]
apigénine (162)	<i>L. macroura</i>	[54]
	<i>L. canadensis</i>	[63]
genkwanine (163)	<i>L. canadensis</i>	[63]
diosmétine (164)	<i>L. macroura</i>	[54]
	<i>L. vulgaris</i>	[93]
	<i>L. canadensis</i>	[63]
chryisine (165)	<i>L. vulgaris</i>	[51]
3,5-di- <i>O</i> -méthyle kaempférol (166)	<i>L. dalmatica</i>	[81]
3,7-di- <i>O</i> -méthyle kaempférol (167)		
quercétine (168)	<i>L. vulgaris</i>	[95]
	<i>L. macroura</i>	[54]
myricétine (169)	<i>L. macroura</i>	[54]

4.3. Les alcaloïdes

Ils ne sont pas très communs pour les espèces de ce genre, mais la quinazoline tricyclique est le squelette le plus distribué par la présence de la vasicine (peganine) (175) isolé à partir de quelques espèces notamment *L. popovii* [102] et *L. vulgaris* [103]. Trois autres alcaloïdes semblables à (175) ont été identifiés : la vasicinone (176) dans *L. macroura*

et *L. kurdica* [103], la 7-hydroxyvasicine (177) et un nouveau alcaloïde appelé l'acide linarinique (1, 2, 3, 9-tetrahydropyrrolo (2, 1- β) quinazolin-1-carboxylique) (178) ont été isolés à partir de *L. vulgaris* [86].

Harkiss (1972) a prouvé la présence de la choline (179) dans *L. vulgaris* [105]. Un nouvel alcaloïde a été identifié comme étant la 7-méthyle-4-hydroxyméthyle-1, 3-dioxo-1, 2, 3, 4-tétrahydrocyclopenta[2, 3-c]pyridine (linavuline) (180) dans *L. vulgaris* [106]. Ces résultats indiquent que *L. vulgaris* est la source la plus commune des alcaloïdes dans le genre *Linaria*.

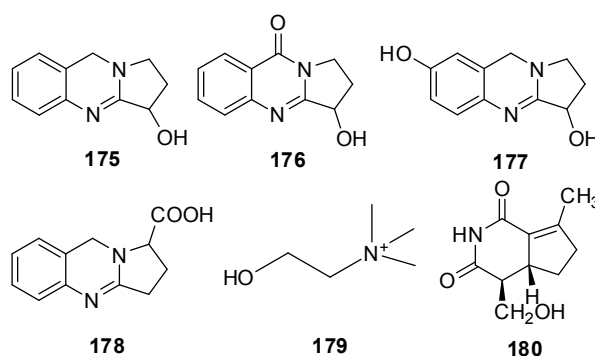


Figure I.20 : les alcaloïdes des espèces du genre *Linaria*

4.4. Autres composés

D'autres classes de composés naturels ont été identifiés comme les nouveaux inols isolés à partir de *L. japonica* nommés linarionside A, B et C (181-183) [71], l'identification par HPLC/UV des acides organiques avec l'acide shikimique (184), l'acide ascorbique (185), l'acide oxalique (186), l'acide aconitique (187), de l'acide citrique (188), l'acide cétoglutarique (189), l'acide malique (190), l'acide fumarique (191) et l'acide succinique (192) [107] ainsi que la séparation des sucres comme le mannitol (193) et le galactitol (194) [51] à partir de *L. vulgaris*.

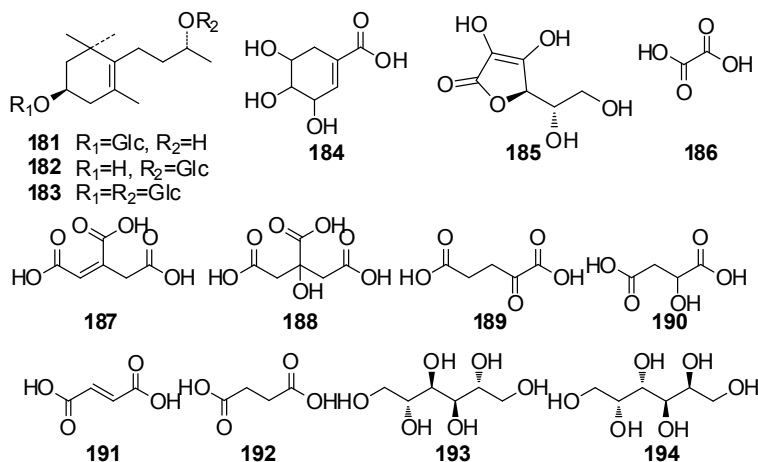


Figure I.21 : autres composés isolés des espèces du genre *Linaria*

Références bibliographiques

- [1] Scrophulariaceae : la famille de la Digitale
<http://www.botanique.org/1/classification-549/description-diffrents-taxons/descriptions-familles/scrophulariaceae-famille-digitale/>
- [2] Ismael ES, Castro SV, Appezato-da-Glória B.
 Anatomical confirmation of root parasitism in Brazilian *Agalinis Raf.* species (Scrophulariaceae). *Brazilian archives of biology and technology*. **2001**. 44:303–311.
- [3] Valdés B, Talavera S, Fernandez-Galiano E.
 Flora vascular de *Andalucia Occidental* (Scrophulariaceae). *Barcelona: Ketres*. **1987**. 2:486–547.
- [4] Davis PH.
 Flora of Turkey and the East Aegean Island. *University press, Edinburgh*. **1978**. 6:825.
- [5] Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E.
 Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, VI. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, İzmir. **2000**. No 116.
- [6] Pignatti S.
 Flora D'Italia; Edagricole, *Ed. Bologna*. Italy. **1982**. 542–543.
- [7] Rocio J, Julio P, Inmaculada F.
 Morphological and Anatomical Studies of *Linaria* Species from South-west Spain: Seeds. *Annals of Botany*. **1999**. 84:11–19.
- [8] Quezel, P., Santa, S.
 Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS. Paris*. **1963**. Vol 2.
- [9] Baytop T.
 Therapy with Medicinal Plants (Past and Present), 2nd ed. Nobel Tip Kitabevleri Ltd., Istanbul, p. 373, **1999**.
- [10] Dilek EM, Koray S, Del Olmo E, San Feliciano A.
 Chemical Constituents of *Linaria aucheri*. *Turk. J. Chem*. **2004**. 28:133–139.
- [11] Stojanov Pd, Stefanov B, Kitanov B.
 In *Flora Bulgaricu, Part II. Naukai Iskustvo*, Sofia. **1967**, 959.
- [12] Stojanov N.
 In *Our Medicinal Plants, Part II. Naukai Iskustvo*, Sofia. **1973**, 99.
- [13] Jiangsu College of New Medicine, "A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines". *People's Hygiene Publisher*. Beijing. **1977**.
- [14] Otsuka H.
 Phenylethanoids from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1993**. 32:979–981.
- [15] Kitagawa I, Tani T, Akita K, Yosioka I.
 Constituents of *Linaria japonica*. I. Structure of linarioside, a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides. *Chem. Pharm. Bull*. **1973**. 21:1978–1987.
- [16] San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML.
 Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Phytochemistry*. **1993**. 33:631–633.
- [17] Dobrescu D, Cristea A, Susanu M.
 Experimental pharmacodynamic study of *Linaria vulgaris* used in folk medicine for the treatment of eczemas. *Farmacia Bucharest*. **1985**. 33:215–220.
- [18] Pahlow M.
 In "El gran libro de la splantasmédicinales"; **4 Ed. Everest S.A.** Madrid. **1979**, 273.

- [19] Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, de la Puente LM, Garcia-Grávalos MD, San Feliciano A. Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**. 7:1649–1654.
- [20] Boukef MK.
Médecine traditionnelle et pharmacopée. *ISBN*. **1986**.
- [21] Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F.
Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15:4757–4760.
- [22] Bonesi M, Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Menichini F, Tillequin F, Menichini F.
In vitro biological evaluation of novel 7-*O*-dialkylaminoalkyl cytotoxic pectolarigenin derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**. 18:5431–5434.
- [23] Handjieva NV, Ilieva EI, Spassov SL, Popov SS.
Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* **1993**, 49:9261–9266.
- [24] Cragg GM, Newman DJ.
Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2000**. 9:2783–2797.
- [25] Benrezzouk R, Terencio MC, Ferrandiz ML, San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML, Alcaraz, MJ.
Inhibition of human sPLA₂ and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. *Life Sciences (Pharmacology Letters)*. **1999**. 64:PL205–PL211.
- [26] Moroshita DW.
Dalmatian toadflax, yellow toadflax, black henbane, and tansymustard: importance, distribution, and control. **1991**. 399–408. In: James, L.F., Evans, J.O., Ralphs, M.H., Child, R.D. (eds), *Noxious range weeds*. Westview Press, Boulder, San Francisco and Oxford.
- [27] Akkol EK, Ercil D.
Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharm. Biol.* **2009**. 47:188–194.
- [28] Liman R, Gökçe UG, Akyıl D, Eren Y, Konuk M.
Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*. *Braz. J. Pharmacogn.* **2011**. 22:541–548.
- [29] Gonuz A, Dujger B, 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.
- [30] John S. Groeger D.
Alkaloids in *Linaria* species. *Pharmazie.* **1968**. 23:35–36.
- [31] Kuptsova LP, Bankovskii AI.
New flavonoid from some species of *Linaria*. *Khim. Prir. Soedin.* **1970**. 6:128–129.
- [32] San Feliciano A, Barrero AF, Miguel del Corral, JM, Gordaliza M, Medarde M.
Clerodane diterpenes from *Linaria saxatilis*. II. *Annals of Chemistry, Series C: Org Chem & Biochem.* **1985**. 81:244–247.
- [33] El-Naggar LJ, Beal JL.
Iridoids. A review. *J. Nat. Prod.* **1980**. 43:649–707.
- [34] Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L, Bianco A, Passacantilli P.
Iridoids in the Flora of Italy; Part 11¹. Kickxioside, A New Iridoid Glucoside from *Kickxia spuria*. *Planta Med.* **1987**. 53:295–297.
- [35] Ilieva E, Handjieva N, Spassov S, Popov S.
5-*O*-allosylantirrhinoside from *Linaria* species. *Phytochemistry.* **1993**. 32:1068–1070.
- [36] Soren D, Soren RJ, Bentjuhl JN.

- ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. *Phytochemistry*. **1981**. 20:2717–2732.
- [37] Bahar A, Al-Rehaily AJ, Al-Howiriny TA, El-Sayed KA, Shamim AM. Scopolioside-D2 and harpagoside-B: Two new iridoid glycosides from *Scrophularia deserti* and their antidiabetic and anti-inflammatory activity. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**. 26:462–467.
- [38] Kooiman P. The occurrence of iridoid glycosides in the Scrophulariaceae. *Acta Bot. Neerl.* **1970**. 19:329.
- [39] Nicoletti M, Serafini M, Garbarino JA, Gambaro V. A chemosystematic study of Scrophulariaceae: Iridoid glycosides. *Giorn Bot. Ital.* **1988**. 122:13–24.
- [40] Serafini M, Foddai S, Ballero M, Guiso M, Bianco A. The occurrence of iridoid glycosides in *Cymbalaria* spp. in Italy. *Nat. Prod. Res.* **2004**. 18:325–327.
- [41] Sticher O. Isolation of antirrhinoside from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry*. **1971**. 10:1974–1975.
- [42] Ilieva E, Khandzheva N, Popov S. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry*. **1992**. 31:1040–1041.
- [43] Marco JL. Iridoid glucosides of *Linaria clementei*. *Phytochemistry*. **1985**. 24:1609–1610.
- [44] Bianco A, Guiso M, Mazzel RA, Piccioni F, Nicoletti M, Serafini M, 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.
- [45] Bianco A, Guiso M, Martino M, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L, Mossa L, Poli F. Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. *Phytochemistry*. **1996**. 42:89–91.
- [46] Ilieva E, Handjieva N, Popov S. Genistifolin and other iridoid glucosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*. **1992**. 47:791–793.
- [47] Bianco A, Guiso M, Ballero M, Foddai S, Nicoletti M, Piccin A, Serafini M, Tomassini L. Iridoids in the Flora of Italy: Glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat. Prod. Res.* **2004**. 18:241–246.
- [48] Ilieva E, Handjieva N, Bankova V, Popov S, Evstatieva L. Iridoid and flavonoid glycosides from *Linaria* species. *Bulgarian Chem. Commun.* **1992**. 25:400–406.
- [49] Bianco A, Passacantilli P, Polidori G. 8-Epiloganic acid and 7- β -hydroxy-8-epiiridodial glucoside. Two new iridoid glucosides from *Linaria cymbalaria*. *Planta Medica*. **1982**. 46:38–41.
- [50] Kitagawa I, Tani T, Akita K, Yosioka I. Linarioside, a new chlorine containing iridoid glucoside, from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* **1972**. 5:419–422.
- [51] Hua H, Li X, Xing SE, Pei YH. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin. Pharm. J.* **2005**. 40:653–656.
- [52] Ferhat M, Harkat H, Lavaud C, Haba H, Long C, Benkhaled M. Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum. subsp. *fruticosa*. *Biochem. Sys. & Ecol.* **2010**. 38:833–835.
- [53] Esposito P, Scarpati ML. Iridoids. IX. 10-O- β -glucosylaucubin from *Linaria vulgaris*. *Gazzetta Chimica Italiana*. **1970**. 100:836–845.
- [54] Degot AV, Fursa NS, Zaitsev VG, Chaika EA, Popova TP, Litvinenko VI, Kornievskii YI

- Study of *Linaria macrourea*. *Chem. Nat. Comp.* **1983**. 3:388–389.
- [55] Guiso M, Tassone G, Nicoletti M, Serafini M, Bianco A.
Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat. Prod. Res.* **2007**. 21:1212–1216.
- [56] Bianco A, Guiso M, Procaccio C, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L.
Iridoids in the flora of Italy. 8. A new methyl-cyclopentanoid monoterpene from *Linaria purpurea*. *Gazzetta Chimica Italiana.* **1997**. 127:407–409.
- [57] Bianco A, Guiso M, Iavarone C, Passacantilli P, Trogolo C
Iridoids. XXIV. Linaride (10-deoxyaucubin), a new iridoid from *Linaria muralis*. *Gazzetta Chimica Italiana.* **1977**. 107:83–85.
- [58] Otsuka H.
Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* **1993**. 33:617–622.
- [59] Ahmad VU, Kousar F, Zubair M, Khan A, Ali MS, Choudhary MI, Sener B.
A new iridoid glycoside from *Linaria genistifolia*. *Fitoterapia.* **2006**. 77:12–14.
- [60] Bianco A, Guiso M, Martino M, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L.
8-*epi*-Muralioside, an Iridoid Glucoside from *Linaria arcusangeli*. *J. Nat. Prod.* **1997**. 60:366–367.
- [61] Otsuka H.
Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* **1995**. 39:1111–1114.
- [62] Otsuka H.
Iridolinarins A, B, and C: iridoid esters of an iridoid glucoside from *Linaria japonica*. *J. Nat. Prod.* **1994**. 57:357–362.
- [63] Kouichi M, Takashi T, Isao K, Toshihiro F, Yuki Y, Kanji I.
New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J. Nat. Med.* **2011**. 65:172–175.
- [64] Beninger CW, Cloutier RR, Grodzinski B.
A Comparison of Antirrhinoside Distribution in the Organs of two Related Plantaginaceae Species with Different Reproductive Strategies. *J. Chem. Ecol.* **2009**. 35:1363–1372.
- [65] Jamieson MA, Bowers MD.
Iridoid Glycoside Variation in the Invasive Plant Dalmatian Toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae), and Sequestration by the Biological Control Agent, *Calophasia lunula*. *J. Chem. Ecol.* **2010**. 36:70–79.
- [66] Lahloub MF.
Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J. Pharmac. Sci.* **1992**. 8:78–95.
- [67] Ercil D, Sakar MK, Del Olmo E, San Feliciano A.
Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turk. J. Chem.* **2004**. 28:133–139.
- [68] Tundis R, Deguin B, Dodaro D, Statti GA, Tillequi F, Menichini F.
Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.) Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). *Bioch. Sys. & eco.* **2008**. 36:142–145.
- [69] Tekaya-Karoui A, Hammami S, Ben Jannet H, Hamza MA, Abreu P, 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.
- [70] Aydogdu I, Zihnioglu F, Karayildirim T, Gulcemal D, Alankus-Caliskan O, Bedir E.
 α -glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *ericalyx*. *Nat. Prod. Commun.* **2010**. 5:841–844.
- [71] Otsuka H.

- Linarionosides A-C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1994**. 37:461–465.
- [72] Kitagawa I, Yoshihara M, Tani T, Yosioka I.
Linaridial, a new cis-clerodane-type diterpene dialdehyde, from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* **1975**. 1:23–26.
- [73] Kitagawa I, Yoshihara M, Kamigauchi T.
Linarienone, a new cis-clerodane-type diterpene from the subterranean part of *Linaria japonica* Miq. *Tetrahedron Lett.* **1977**. 14:1221–1224.
- [74] San Feliciano A, Barrero AF, Miguel del Corral JM, Gordaliza M, Medarde M.
Further neo-clerodane diterpenes from *Linaria saxatilis* (L.) Chaz. *Tetrahedron*. **1985**. 41:671–680.
- [75] De Pascual TJ, San Feliciano A, Barrero AF, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, Medarde M.
Isolaridial, new clerodane diterpenoid from *Linaria saxatilis*. *Annals of Chemistry, Series C: Org Chem & Biochem*. **1982**. 78:425–426.
- [76] San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML, Garcia-Granda S, Salvado MA.
Neo-clerodane diterpenoids from aerial parts of *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Tetrahedron*. **1993**. 49:9067–9078.
- [77] Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, De La Puente ML, San Feliciano A.
Neo-clerodane diterpenoids from *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Phytochemistry*. **1994**. 36:1453–1456.
- [78] Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, Mahique MM, Castro MA, San Feliciano A.
Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* VAR. *saxatilis*. *Phytochemistry*. **1995**. 40:1307–1309.
- [79] San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, De la Puente ML.
Labdanes from *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Fitoterapia*. **1993**. 64:184.
- [80] Rzadkowska-Bodalska H, Kowalczyk-Ohem B, Lamer-Zarawska E.
Chemical and biological investigation of lipophilic fraction of *Linaria vulgaris* Mill. (Scrophulariaceae). *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Biological Sciences*. **1996**. 43:179–184.
- [81] Kapoor R, Rishi AK, Atal CK.
A rarely methylated new flavonol aglycone from *Linaria dalmatica*. *Fitoterapia*. **1985**. 56:296–297.
- [82] Hua H, Li X, Zhang H.
Steroids from *Linaria vulgaris* Mill. *J. Shenyang Pharm. Univ.* **2000**. 17:40–42, 48.
- [83] Hua H, Hou B, Li W, Li X, Zhang Y.
Triterpenes from butter-and-eggs (*Linaria vulgaris*). *Chin. Trad. Herb. Drugs*. **2000**. 31:409–412.
- [84] Strack D.
In *Plant Biochemistry*, ed. Dey PM, Harborne JB, Academic Press, London, **1997**. 387–416.
- [85] Sokolowska-Wozniak A, Szewczyk K, Nowak R.
Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L.) Mill. *Herba Polonica*. **2003**. 49:161–165.
- [86] Hua H, Cheng M, Li X, Pei Y.
A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**. 50:1393–1394.
- [87] Kelemen L, Scedo C.
Data about the polyphenol content of *Linaria vulgaris* Mill species. Note I. *Farmacia* (Bucharest, Romania). **2003**. 51:86–89.
- [88] Klobb T.

- Two New Glucosides: *Linarine* and *Pectolinarine*. *Compt rend.* **1907**. 145:331–334.
- [89] Morita N, Shimizu M, Arisawa M, Kobayashi K.
Medicinal resources. 37. Components of leaves of *Linaria japonica* and *L. vulgaris* (Scrophulariaceae). *Pharmacy magazine.* **1974**. 94:913–916.
- [90] Otsuka H.
Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J. Nat. Prod.* **1992**. 55:1252–1255.
- [91] Smirnova LP, Boryaev KI, Ban'kovskii AI.
Acacetin and its glycosides in plants of the genus *Linaria*. *Chem. Nat. Comp.* **1974**. 10:96–97.
- [92] Smirnova LP, Zapesochnaya GG, Ban'kovskii AI, Boryaev KI.
Linaroside, a new flavonoe glycoside from some species of *Linaria*. *Chem. Nat. Comp.* **1974**. 10:249–250.
- [93] Hua H, Sun J, Li X.
Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). *Chin. Trad. Herb. Drugs.* **1999**. 30:332–334.
- [94] Harborne JB, Valdes B.
Identification of scutellarein 4'-methyl ether in *Linaria aeruginea*. *Phytochemistry.* **1971**. 10:2850–2851.
- [95] Pethes E, Marczal G, Kery A, Petho M.
Flavonoids as biologically active agents and their occurrence in the Scrophulariaceae family. *Acta Pharmaceutica Hungarica.* **1974**. 44:83–90.
- [96] Harborne JB.
Comparative biochemistry of flavonoids. I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry.* **1966**. 5:111–115.
- [97] Guan HF, Liu XQ, Lan Z, Wang RR, 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.
- [98] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Statti GA, Deguin B, Tillequin F, Menichini F, Houghton PJ.
Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat. Prod. Commun.* **2007**. 2:759–763.
- [99] Mun GS, Song HY, Kim IG.
Analysis of flavonoid-components of *Linaria Japonica* Miq. *Anal. Scie. & techno.* **1979**. 3:28–32.
- [100] Wagner H, Aurnhammer G, Hoerhammer L, Farkas L.
Acacetin glycosides. II. Identity comparison of acaciin from *Robinia pseudoacacia* and linarin from *Linaria vulgaris*. *Chemische Berichte.* **1969**. 102:1445–1446.
- [101] Takahashi K, Tanabe Y, Kishihara S.
Constituents of medicinal plants. XII. Constituents of the flowers of *Linaria japonica*. *Pharmacy magazine.* **1973**. 93:707–710.
- [102] Yunusov SY, Ismailov ZF.
Alkaloids of *Linaria popovii*. *Reports of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR.* **1956**. 1:25–27.
- [103] Men'shikov GP, Ban'kovski AI, Frolova VI.
Alkaloids of *Linaria vulgaris* Mill. *J. General. Chem.* **1959**. 29:3846–3848.
- [104] Plekhanova NV, Sheveleva GP.
Alkaloids of *Linaria transiliensis* and *Linaria vulgariformis*. Issled. Flory Kirgizii na Alkaloidonosnost, *Akad Nauk Kirg SSR, Inst Organ Khim.* **1965**. 54–56.
- [105] Harkiss KJ.

Scrophulariaceae. VI. Quantitative determination of choline in *Antirrhinum majus*, *A. Orontium*, and *Linaria vulgaris*. *Planta Med.* **1972**. 21:353–357.

[106] Hua H, Piao F, Wang S, Li X, Qiao B, Li P.

Study on a new alkaloid of *Linaria vulgaris*. *J. Shenyang Pharm. Univ.* **1997**. 14:219–220.

[107] Vrchovska V, Spilkova J, Valentao P, Sousa C, Andrade PB, Seabra RM.

Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. *Nat. Prod. Res.* **2008**. 22:735–746.



Chapitre

Les

métabolites secondaires

Introduction

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, jusqu'à il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent des réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une espèce à l'autre [1].

Généralités sur les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement. D'une part, les pigments et les arômes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpénoïdes...) sont souvent très impliqués dans des relations à bénéfices réciproques établies au cours de l'évolution entre plantes et animaux (pollinisation, dissémination des semences...). D'autre part, la plupart des métabolites secondaires des végétaux sont des phytoalexines, c'est à dire des molécules biologiquement actives, impliquées dans la défense des végétaux. Les propriétés de ces molécules sont très souvent mises à profit dans le cadre des médecines traditionnelles, à travers l'emploi des plantes médicinales, mais également dans la médecine allopathique moderne à travers l'usage de molécules purifiées ou issues d'hémisynthèses chimiques. Dans certains cas, la synthèse chimique est plus coûteuse que la production des molécules directement par les plantes. La culture au champ de plantes médicinales est cependant parfois délicate et les efforts se sont multipliés depuis maintenant près de 20 ans pour produire des molécules à partir de cultures *in vitro* de tissus végétaux [2-3]. On peut classer les métabolites secondaires sous trois classes : les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Ce chapitre, concerne les terpénoïdes et les flavonoïdes (composés phénoliques).

1. Les terpénoïdes

1.1. Introduction

Le terme terpène est inventé par **Kekulé**, vient à l'origine de l'huile de «térébenthine» (terpentin) qui a été utilisé pour tous les composés huileux volatils insolubles dans l'eau [4]. Dans le domaine des terpénoïdes, quatre chimistes ont gagnés le prix d'Nobel [5], **H. O. Wieland** «pour ses recherches sur la constitution des acides biliaires et substances apparentées», **A. O. R. Windaus** «pour les services rendus par ses recherches sur les stéroïdes et leurs relations avec les vitamines», **L. Ruzicka** «Pour son travail sur les polyméthylènes et les terpènes les plus élevés» et **A. F. J. Butenandt** «Pour son travail sur les hormones sexuelles».

Les terpénoïdes sont présents chez tous les organismes vivants et remplissent des rôles physiologiques très divers. Un certain nombre d'entre eux sont des métabolites essentiels. Les stéroïdes jouent le rôle de stabilisateurs de membranes biologiques chez les eucaryotes et sont les précurseurs des hormones stéroïdes, les caroténoïdes sont impliqués dans l'appareil photosynthétique de tous les organismes phototrophes, les polyprénols à longue chaîne servent de transporteurs des glucides pour la biosynthèse des polysaccharides ou de précurseurs pour les chaînes prénylées des quinones impliquées dans les systèmes de transport d'électrons. Pour la plupart d'entre eux, le rôle physiologique est moins évident et reste à déterminer, en particulier chez les végétaux : mono- et sesquiterpènes des huiles essentielles ou triterpénoïdes. Les végétaux sont de grands producteurs de terpénoïdes d'une étonnante diversité. Les terpénoïdes végétaux accaparent ainsi la part la plus significative des encyclopédies dévolues à ces substances.

Les terpénoïdes constituent un ensemble connu et très vaste des métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des molécules polyéniques qu'on trouve également dans le règne végétal et animal. En 1887, **O. Wallach** croyait que le terpène devait être construit à partir d'unité isoprénique [6]. Cette hypothèse a été renouvelée en 1953 par **Ruzicka** [7]. Une règle général qui postule que chaque groupe de terpènes est issu de la condensation « tête à queue » d'un nombre variable d'unités isopréniques.

Le chimiste **Ruzicka** proposa une nomenclature pour les terpènes en fonction du nombre d'atomes de carbones qui les constituent: les hémiterpènes en C-5, les monoterpènes en C-10, les sesquiterpènes en C-15, les diterpènes en C-20, les sesterpènes en C-25, les triterpènes en C-30, les tétraterpènes en C-40 et les polyterpènes [8].

Ils sont d'origine végétale et constituent la source odoriférante des plantes. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15 et 20 atomes de carbone.

Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possédant de propriétés antiseptiques [9], d'où divers emplois dont l'embaumement qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles essentielles qui en sont tirées. Ces terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage de 2 entités à 5 carbones (au minimum) et dont la structure est celle de l'isoprène (2-méthylbuta-1, 3-diène). Plus de 30 000 structures de terpénoïdes ont été identifiées à ce jour.

1.2. Biosynthèse des terpènes

Deux voies de biosynthèse conduisent aux terpénoïdes : la voie dite classique à partir du mévalonate (fig. II.1) et celle découverte récemment qui suggère un passage via la déoxyxylulose phosphate (fig. II.2).

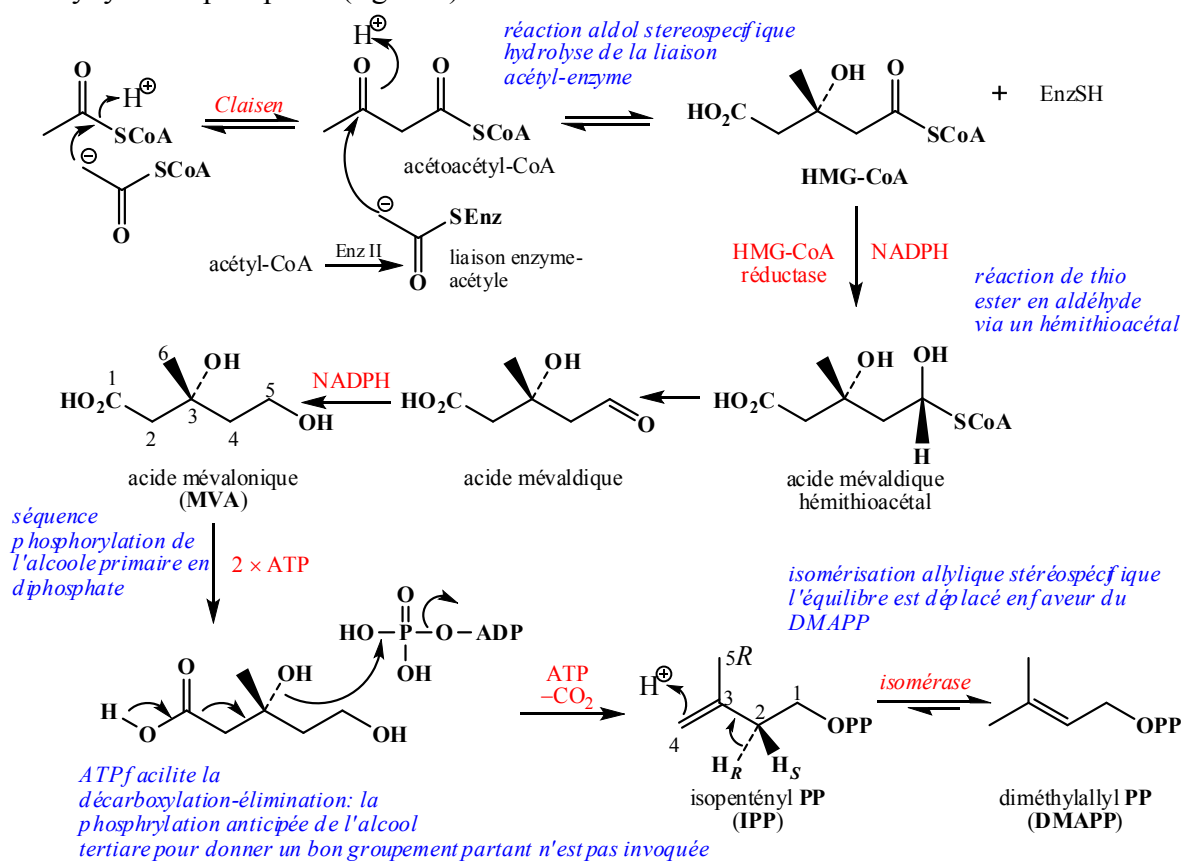


Figure II.1: processus biochimique de la formation d'entités isoprénoïdes actives (intermédiaire: acide mévalonique -MVA-)

Une enzyme isomérase stéréospécifique, transforme l'IPP en DMAPP par élimination du proton pro-*R* du carbone C-2 et l'incorporation d'un proton en C-4 par addition de H₂O. Cette conversion produit un électrophile très réactif, donc un bon agent d'alkylation. Le DMAPP possède un bon groupement partant (diphosphate), il peut donner via un mécanisme de type S_N1, un carbocation allylique stabilisé par la délocalisation de la charge. L'IPP, qui possède une double liaison terminale, réagira envers le DMAPP (électrophile) comme un

nucléophile. Cette différence de réactivité entre ces deux entités isoprènes constitue la base de la biosynthèse des terpénoïdes et permet de rationaliser les différents mécanismes de la formation des carbocations intermédiaires [10-12].

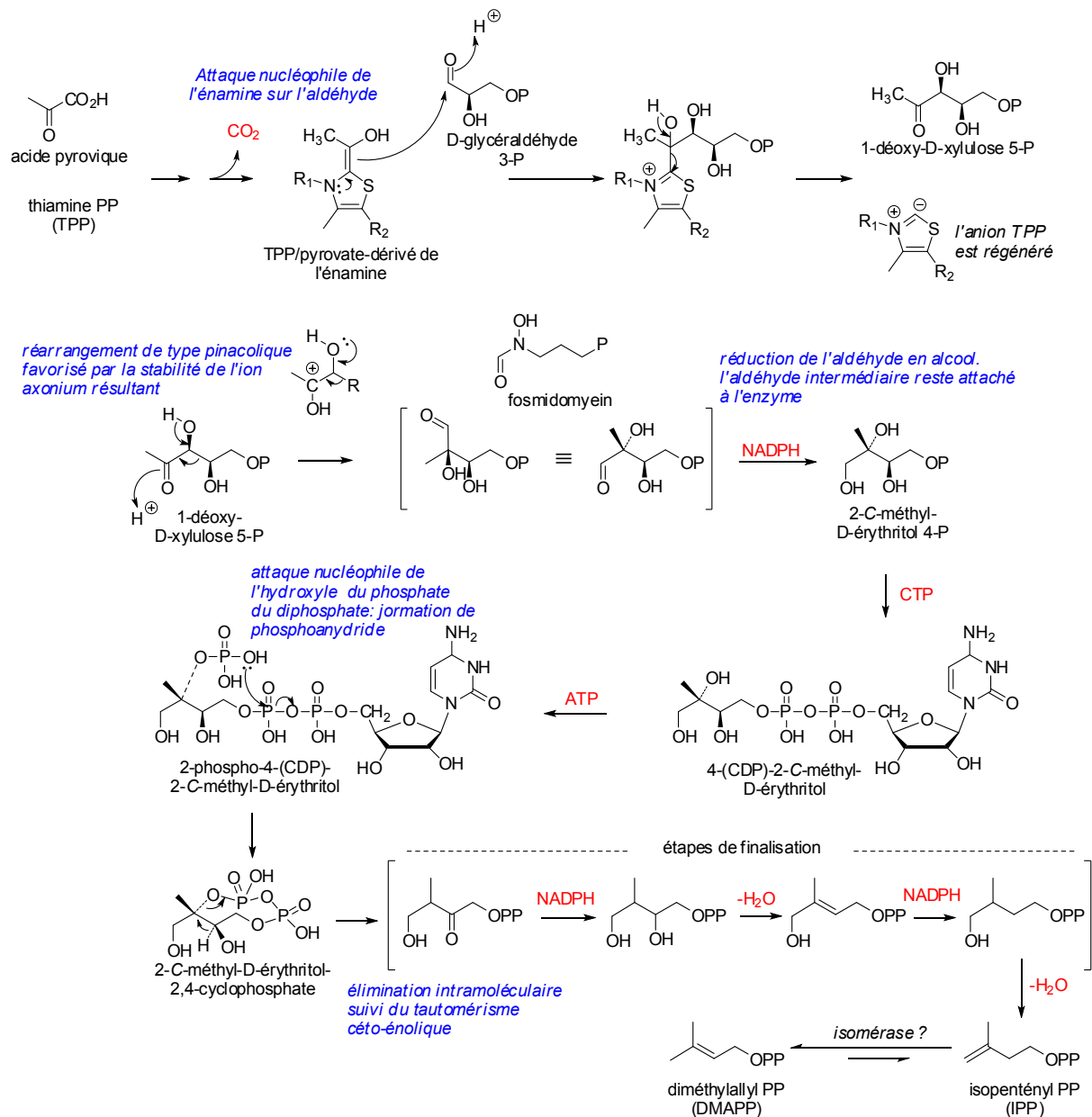


Figure II.2: processus biochimique de la formation d'entités isoprénoïdes actives (Intermédiaire: déoxyxylulose diphosphate-DXP-)

1.3. Classification des Terpénoïdes

Selon le nombre d'entités C-5 isoprènes (C_5H_8)_n, incorporé dans leurs structures, les terpènes sont classés en diverses catégories (fig. II.3).

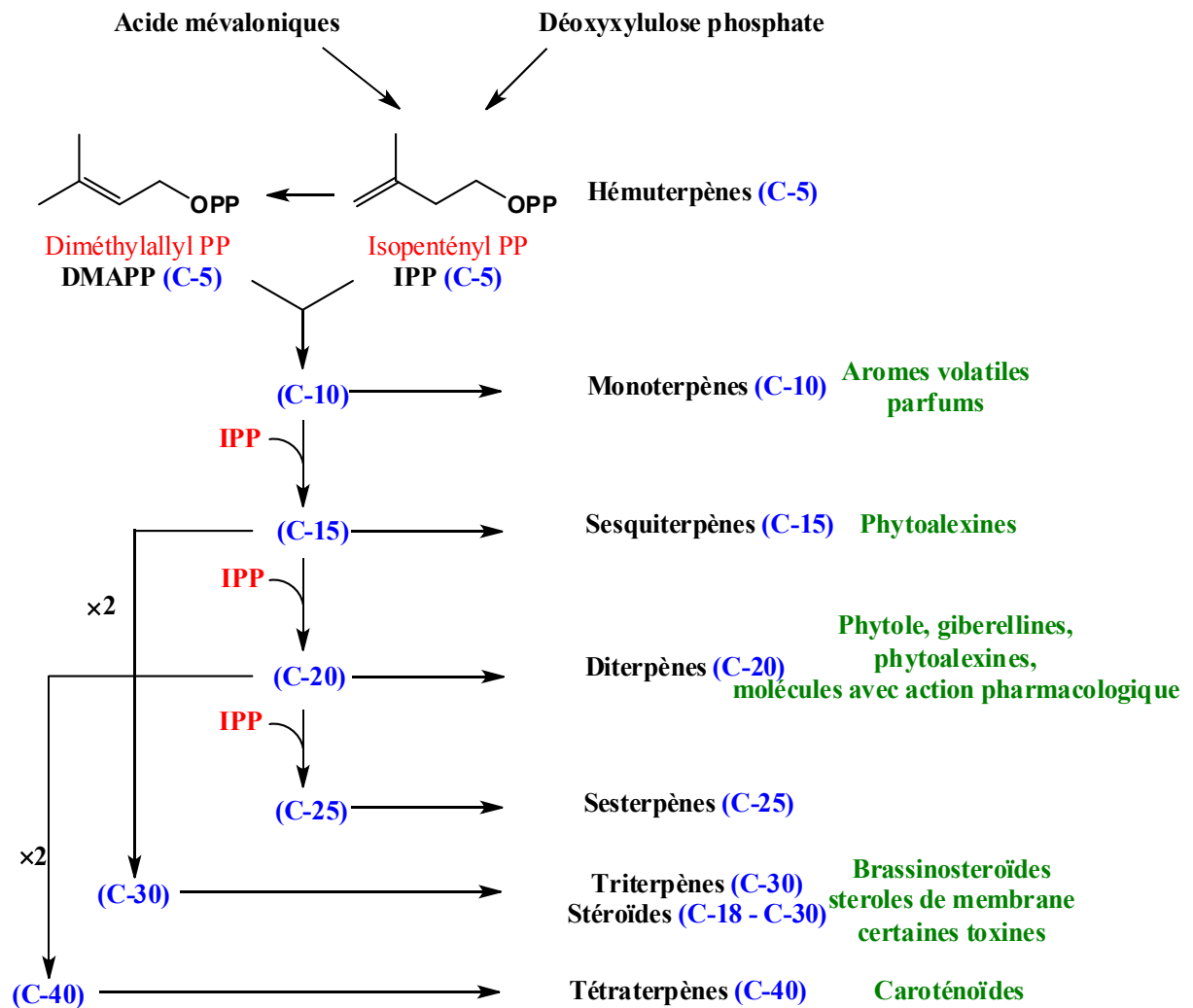


Figure II.3: la classification des terpènes

1.3.1. Monoterpènes (C-10)

Le processus biochimique invoqué lors de la formation du géranyl diphosphate (GPP) est une condensation du DMAPP et de l'IPP *via* la prényl transférase. Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles qui sont présentes en quantité chez environ 2000 espèces de 60 familles végétales [13]. Cette classe des composés a connu une large extension conduisant ainsi à des systèmes mono/bicyclique. Les monoterpènes ont des propriétés biologiques importantes telles que anticancéreuse [14-16], AChE inhibiteur [17], antidiabétique [18] et l'antimicrobienne [19-21]. Quelques exemples sont illustrés dans ce qui suit :

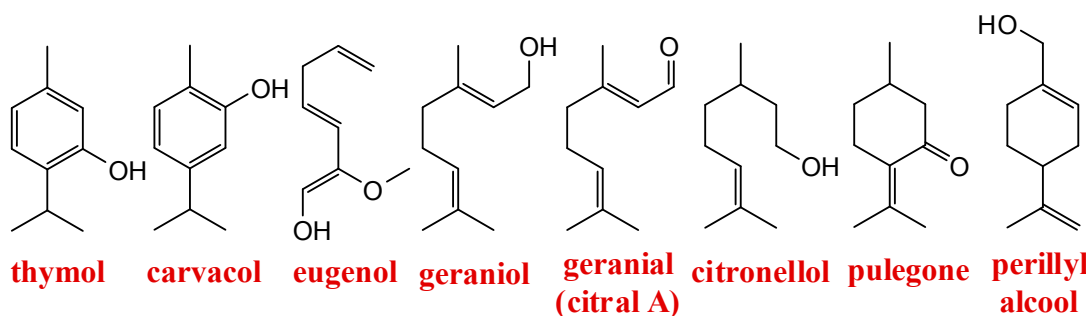


Figure II.4: quelques monoterpènes avec activité antimicrobienne et anticancéreuse

1.3.2. Sesquiterpènes (C-15)

L'addition d'une unité IPP au géranyl diphosphate conduit via la prényl transférase, au farnésyl diphosphate (FPP), précurseur fondamental des sesquiterpènes. Par rapport à la sous famille des monoterpènes, les sesquiterpènes offrent un plus grand nombre de possibilités de cyclisation, ce qui augmente la diversité structurale d'une façon considérable. Ces composés n'ont pas seulement un intérêt de produit chimique et position-points du chimiotaxonomique, mais aussi parce que beaucoup d'entre eux possèdent une activité thérapeutique telles que l'anti-inflammatoire [22], l'anticancéreuse [23-24], l'antitumorale [25-26], l'anti-HIV [27], l'antimicrobienne, l'antihelminthique et l'antifongique [25], l'antidiabétique [28] et les propriétés anti-infectieux [29-31]. Les sesquiterpènes lactones représentent plus de 5000 structures différentes [32]. On les retrouve dans les champignons et autre familles d'angiospermes (ex. Apiaceae) et dans les plantes (ex. Asteraceae, fleurs et feuilles) [33-35].

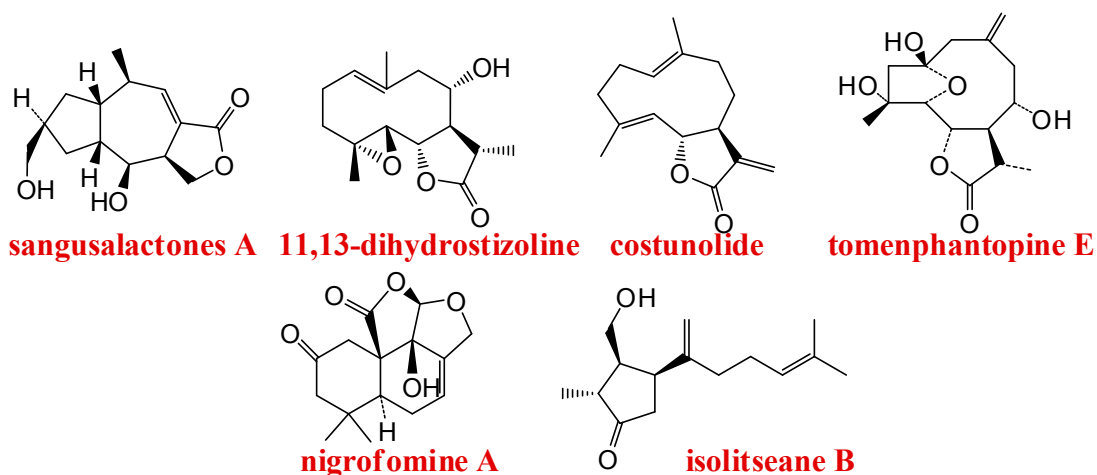


Figure II.5: Structures de quelques sesquiterpènes lactones

1.3.3. Diterpènes (C-20)

Les diterpènes sont surtout répandus chez les végétaux, mais sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins. Ils sont formés par l'union des quatre

unités d'isoprènes et sont classés selon leur biogenèse pour former le géranyl géranyl diphosphate (GGPP) [36]. Les diterpènes possèdent diverses potentialités thérapeutiques: propriétés anti-cancéreuse [37-38], antitumorale [39-40], anti-HIV [41], anti-hypertensives, abortives, et anti-inflammatoires. Il y a lieu de signaler également l'intérêt des quinones diterpéniques dans le traitement de plusieurs affections myocardiques et la toxicité des amides diterpéniques à l'égard des insectes [9].

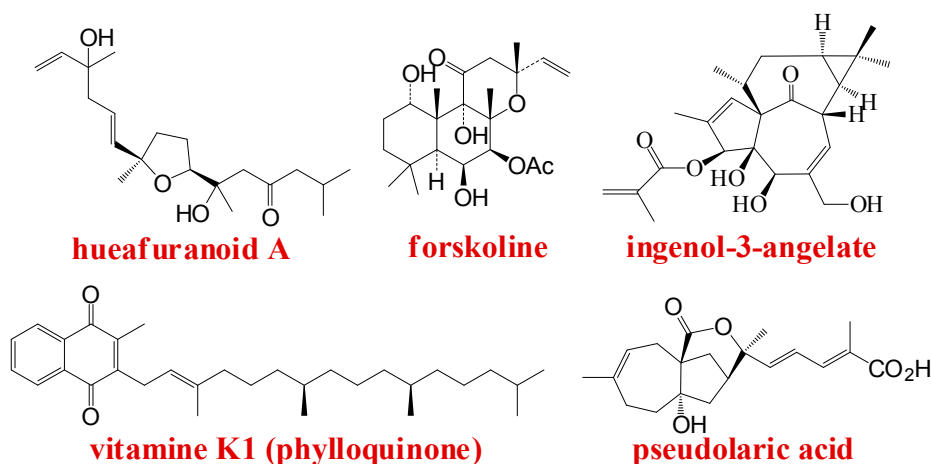


Figure II.6: quelques exemples des Diterpènes

1.3.4. Sesterpènes (C-25)

Ils sont un groupe relativement restreints de terpénoïdes, leurs sources sont généralisés, et ils ont été isolés à partir de champignons terrestres, lichens, plantes supérieures, d'insectes et de divers organismes marins, en particulier les éponges. Ils présentent diverses propriétés biologiques telles que l'anti-inflammatoire [42], cytotoxique [43], l'anti-cancéreuse [44], l'antimicrobienne [45], l'antituberculeux [46] et l'anti-biofilm [47].

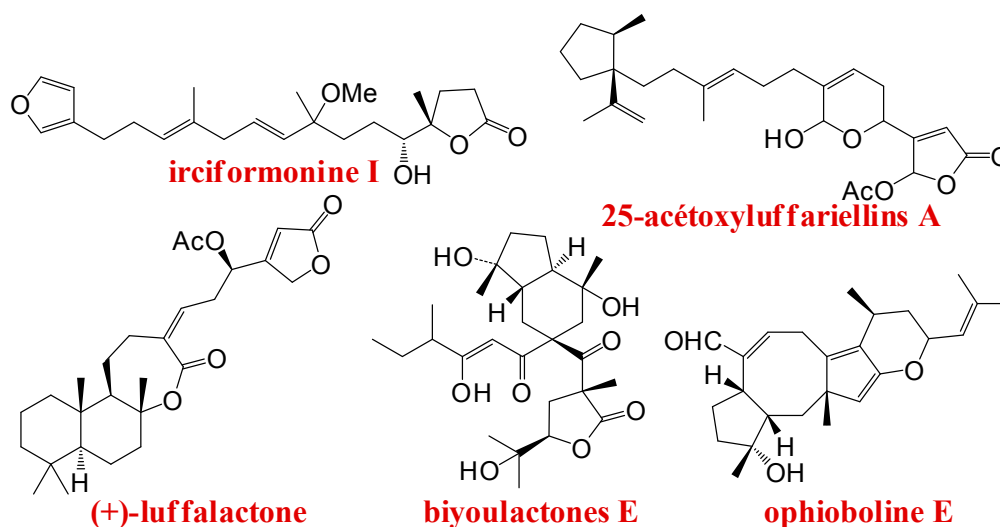


Figure II.7: quelques sesterpénoïdes

1.3.5. Triterpènes (C-30)

Sont distribués dans le règne végétal et animal, leur formation en C-30 provient du simple triterpène: le squalène (fig. II.8) issu du couplage réductif de deux unités de (FPP). Ce type de composés possède des propriétés pharmacologiques telles que: anti-inflammatoire [48], antibactérienne [49], antifongique [50], antiviral [51], antitumorale [52], antidiabétique [53], anti-ulcerogénique [54], anti-cariogénique [55], hépatoprotective [56], neuroprotective [57], anti-parasitique [58], analgésique [59] et antioxydante [60].

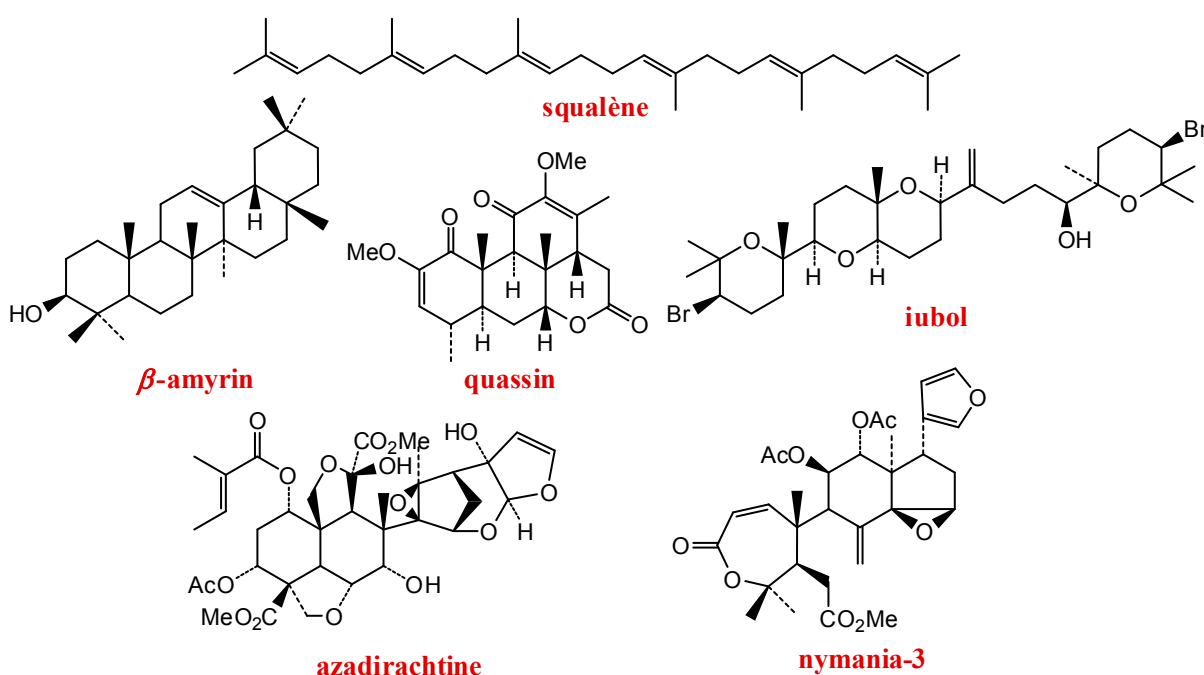


Figure II.8: Quelques triterpènes

1.3.6. Tétraterpènes (C-40)

Ils sont représentés par un seul groupe, les caroténoïdes, dont plusieurs centaines de variantes structurales sont connues. Ces composés jouent un rôle dans la photosynthèse mais on les retrouve également dans des tissus non photosynthétiques de plantes, de champignons et dans les bactéries. La formation du squelette tétraterpène invoque un couplage queue-queue de deux molécules de GGPP dans la séquence essentielle qui est similaire à celle invoquée dans la formation des triterpènes et du squalène. La couleur orange des carottes (*Daucus carota*; Umbelliferae/Apiaceae) est causée essentiellement par le β-Carotène.

En 1920, **Richard Willstätter** a été invité pour présenter une conférence dans la cérémonie de Nobel, à Oslo [61]. Un travail sur la séparation et l'élucidation structural de chlorophylle A, B et l'anthocyanines, il a mentionné aussi encore une autre substance: la xanthophylle jaune, un troisième type de composés; un carotène. Il a connu déjà ça formule,

$C_{40}H_{56}O_2$ et nommé un carotène oxydé (lutein). Cependant, l'histoire de l'isolation de caroténoïde est très ancienne, en 1826, le chimiste **Wackenroder** a isolé une teinture naturelle (c'est le β , β -carotène) à partir des carottes sous-forme des cristaux rouge [62].

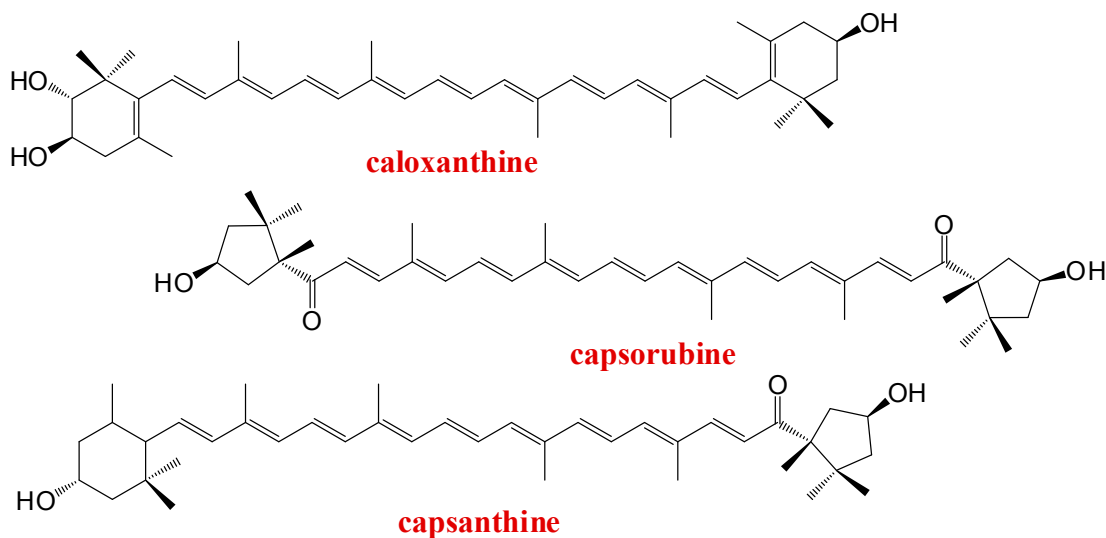


Figure II.9: quelques tetraterpènes

1.3.7. Iridoïdes

1.3.7.1. Définition

Les iridoïdes sont un groupe de composés naturels appartenant à la grande classe des terpénoïdes [63]. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentane (C) pyranique à jonction *cis*, partiellement hydrogéné [64]. Ils sont définis par une structure commune, en l'occurrence le noyau iridane de nature cyclopentapyranique (*cis*-2-oxabicyclo [4, 3, O]-nonane). Les iridoïdes tirent leur nom de celui de fourmis du genre *Iridomirmex*, à partir des quelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense qui leur sont propres. On citera notamment l'iridodial et l'iridomyrmécine [9].

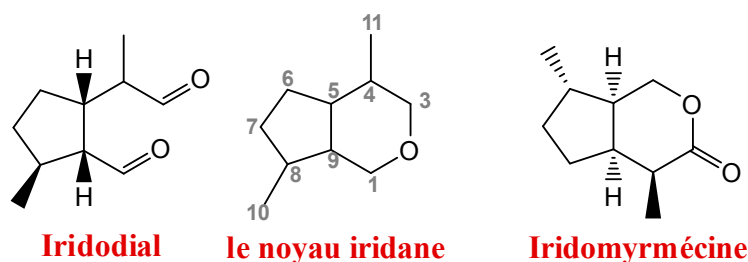


Figure II.10 : quelques iridoïdes

Ce sont des monoterpènes d'origine presque exclusivement végétale, ces composés sont préférentiellement synthétisés par les Eudicots et particulièrement par les Asterids clade. Dipsacales (Adoxaceae, Caprifoliaceae, Dipsacaceae et Valerianaceae), Gentianales (Rubiaceae, Gentianaceae, Apocynaceae et Loganiaceae) et Lamiales (Lamiaceae, Oleaceae,

Pedaliaceae, Plantaginaceae, Bignoniaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, etc.) [65]. Leur intérêt vient surtout du fait que ce sont des intermédiaires clés pour la biosynthèse de produits naturels extrêmement importants. Ainsi le plus connu d'entre eux, la loganine et son dérivé la sécologanine, sont les précurseurs de plusieurs composés [66]. Parmi ceux-ci, on cite l'akuammicine, l'ajmalicine, la tabersonine, la catharanthine et la strychnine¹.

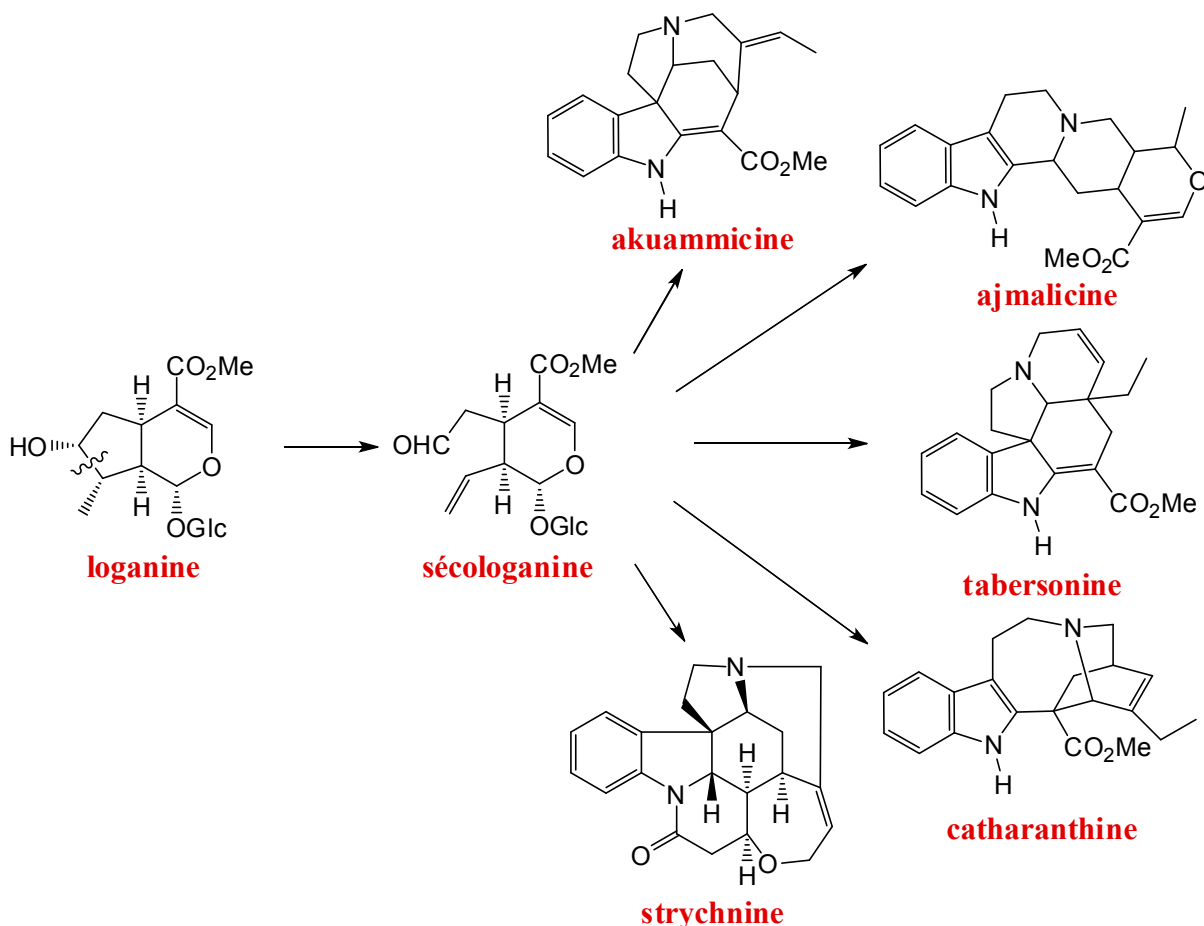


Figure II.11 : la biosynthèse de quelques produits à partir des iridoïdes

1.3.7.2. Classification des iridoïdes

Les iridoïdes sont les composés les plus importants de la famille des monoterpènes à squelette cyclopentanoïde et peuvent être divisés en cinq groupes [67] :

a) Les iridoïdes simples :

Les iridoïdes simples ou non hétérosidiques peuvent également être alcaloïdiques (indicaine [68]) ou polycycliques (dunnisine [69]).

¹ Strychnine est un poison très vigoureux et dangereux même en petite quantité [5].

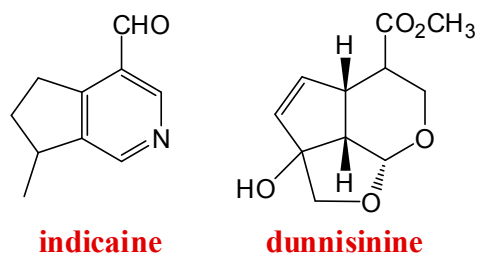


Figure II.12: iridoïdes simples

b) Les iridoïdes glycosylés

La majorité des iridoïdes sont glycosylés. Les sucres sont portés par les carbones C-1 (linaride [70]), C-6 (scrospiocide B) [71] et C-11 (suspensolide A) [72] de la génine.

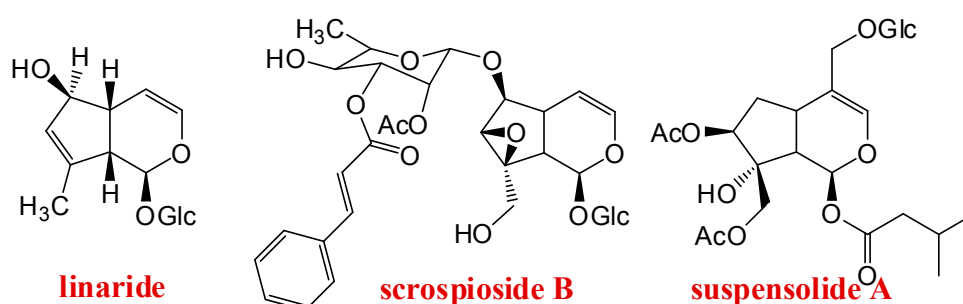


Figure II.13: quelques iridoïdes glycosylés

c) Séco-iridoïdes

Ils sont issus de la rupture de la liaison C₇-C₈ du noyau cyclopentanique. Les séco-iridoïdes non hétérosidiques sont rares. L'appellation séco-iridoïde regroupe un vaste ensemble de molécules divisées en trois classes, selon la nature de leur génine :

- Celles ayant un vinyle en C-9 (gentiopicroside) [73].
- Celles ayant un groupe éthylidène (raibocarpaoside) [74].
- Celles qui sont amidifiées par une amine aromatique (fontaphilline) [75].

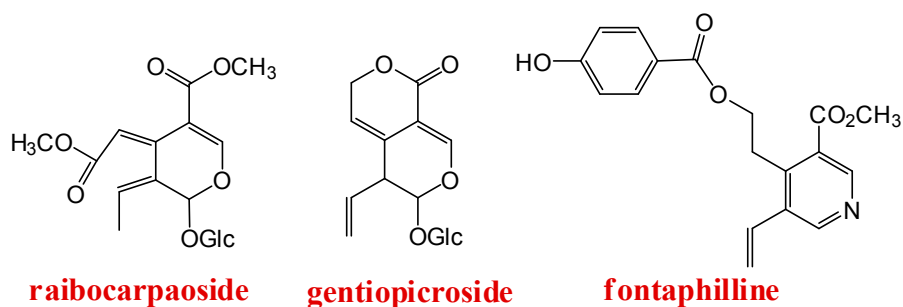


Figure II.14: quelques séco-iridoïdes

d) Bisiridoïdes

Ce sont des molécules issues de la condensation de deux iridoïdes. Des composés de cette classe ont été rencontrés lors de l'étude des espèces *Lonicera* (centauroside) [76]. Différents bisiridoïdes sont également présents chez la famille Plantaginaceae (globuloside B) [70].

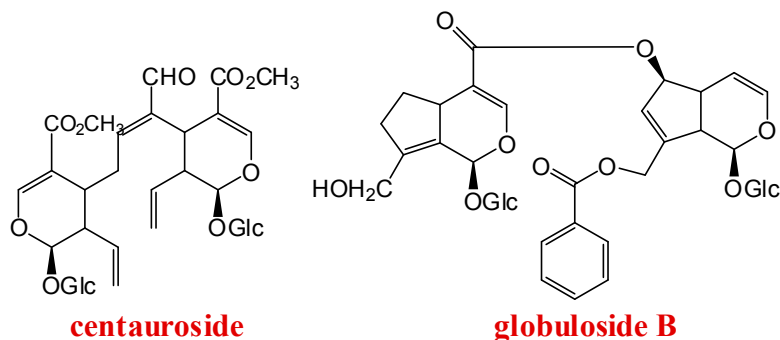


Figure II.15: bisiridoïdes

e) Iridoïdes lactones

Pour cette classe de substances, on distingue les iridoïdes lactonique de types I et II [77], selon l'orientation régiochimique de la lactone par rapport au noyau cyclopentanique.

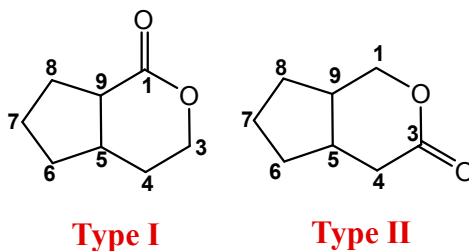


Figure II.16: Iridoïdes lactones

1.3.7.3. Propriétés biologiques des iridoïdes

Les iridoïdes représentent un groupe important et toujours croissant de cyclopenta [c] pyrane monoterpénoïdes trouvés dans un certain nombre de plantes médicinales populaires utilisés comme amers, sédatifs, hypotenseurs, antipyrétiques, antitussifs, des remèdes pour les blessures et les maladies de la peau. Ce résultat a encouragé l'étude des activités biologiques de ces composés. Des recherches approfondies ont révélé que les iridoïdes présentent un large éventail de bioactivité: neuroprotecteur [78-87], anti-tumorale [88-97], anti-inflammatoire [98-103], antioxydante [104-106], hépatoprotective [107], antimicrobien [108-114], antiviral [115-116], anti-leishmania et molluscicides [117-118], cardiovasculaire [119-123], hypoglycémie [124-125], cicatrisante [126], cholérétique [127-129], anti-allergiques [130] et anxyolitique [131].

1.4. Propriétés biologiques des terpénoïdes

Des investigations concernant les activités biologiques des terpénoïdes ont prouvé l'existence des plusieurs activités biologiques notamment l'activité anticancéreuse (chez les mono, sesqui, di, triterpènes et stéroïdes) [24, 132-135], l'anti-inflammatoire (chez la majorité de classes terpéniques) [136-138], l'anti-tumorale (chez les mono, sesqui, di, et triterpènes) [14, 39, 51, 139-140], l'antioxydante (chez les mono, sesqui, triterpènes) [60, 141-142] ...etc.

2. Les flavonoïdes

2.1. Introduction

En 1930, le physiologiste hongrois **Albert Szent-Györgyi** a isolé pour la première fois les flavonoïdes, il a aussi séparé l'acide ascorbique (vitamine C) et a eu le Prix Nobel en Physiologie en 1937. Ainsi que la classification initial des bioflavonoïdes comme vitamine P qui a été refusée [5].

Le terme flavonoïde est dérivé du mot grec « flavus » qui veut dire jaune [143] désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine du visible, mais présentent tous une bande d'absorption dans l'ultraviolet proche du visible. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes [9]. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux bien qu'ils sont présent dans toutes les organes des plantes : feuilles, fleurs, graines, racines...etc. Structuellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont : les flavones, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavone, les isoflavonones, les chalcones, les auronnes, les anthocyanes et les tanins [144]. A de rares exceptions près², seules les plantes ont la capacité de biosynthétiser des flavonoïdes.

Les flavonoïdes ont une diversité structurale très importante. Ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirale, anti inflammatoire et anticancéreuse. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^{*}) et superoxydes (O₂⁻). Vers l'an 2004, plus de 9000 flavonoïdes ont été identifiés [146].

² Quelques flavonoïdes ont été isolés d'un corail marin et d'un petit nombre de champignons [145]

2.2. Structure et classification

Le squelette de base des flavonoïdes est constitué de 15 atomes de carbone, répartis sur deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ soit un système C₆-C₃-C₆ [147], comme le montre la figure II.17 [148].

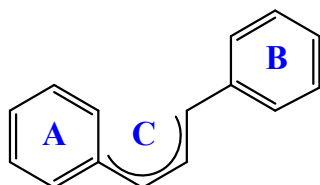


Figure II.17: Squelette de base des flavonoïdes

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C₃ (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [149]. Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 (fig. II.17).

Tableau II.1: Différentes classes des flavonoïdes

Flavonoïdes	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Réf
Flavones											
Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[150]
Diosmétine	H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	H	H	[151]
Flavonols											
Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	[152]
Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[153]
Isoflavones											
genistéine	-	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[154]
daïdzéine	-	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[155]
Flavanones											
liquiritigenin	H ₂	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[156]
Naringénine	H ₂	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[157]
Anthocyanidines											
Cyanidine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	[158]
apigénidine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	[159]

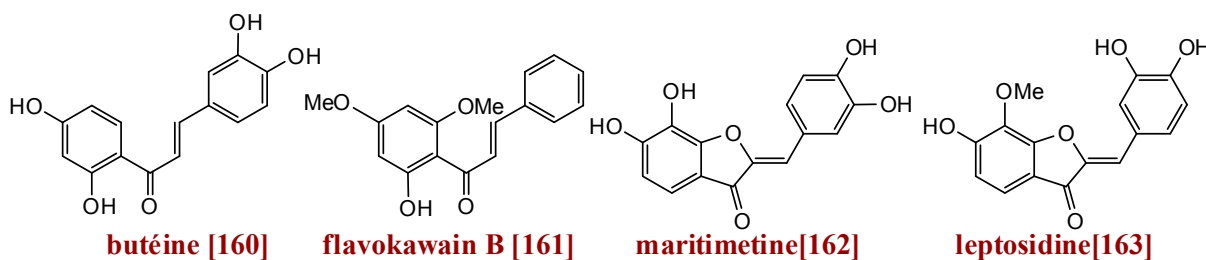


Figure II.18 : quelques chalcones et auronnes

La figure II.19 montre les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes.

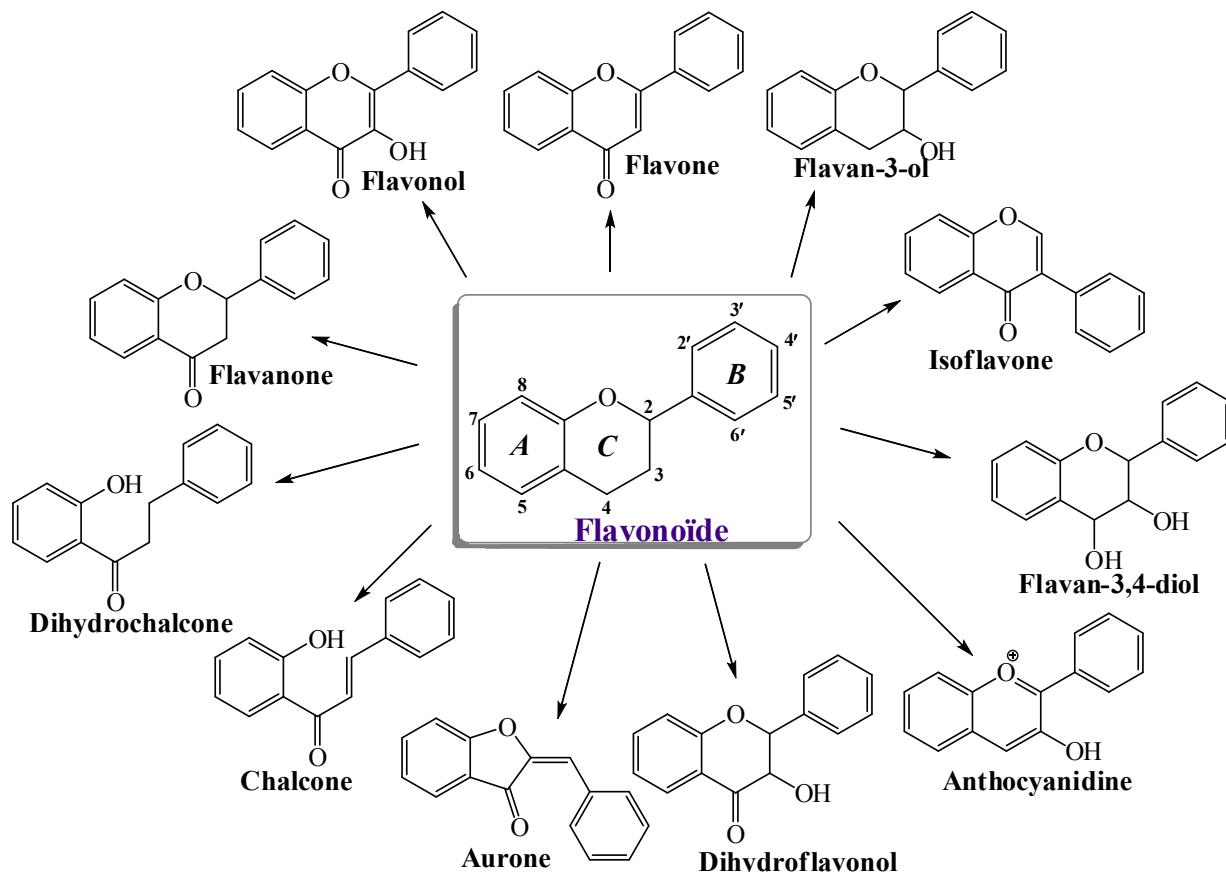


Figure II.19 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

2.2.1. Flavones et flavonols

Le terme flavone a été utilisé pour la première fois en 1895 par **VonKostanecki** et **Tamber** qui ont des pionniers dans le travail structural de cette classe particulière des flavonoïdes [164], les flavonols sont considérés comme l'étendue la plus ancienne [165].

Ils représentent 80% des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Le noyau B est dans 80% des cas substitué en C-4' ou di substitué en C-3' et C-4' ou encore trisubstitué en C-3', C-4' et C-5'. Les positions C-2'

et C-6' ne sont qu'exceptionnellement substitués [9]. Ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) ou des groupements méthoxyles (OMe). En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3.

La flavone la plus connue est l'apigénine [150] tandis que la quercétine [163] le flavonol le plus connu.

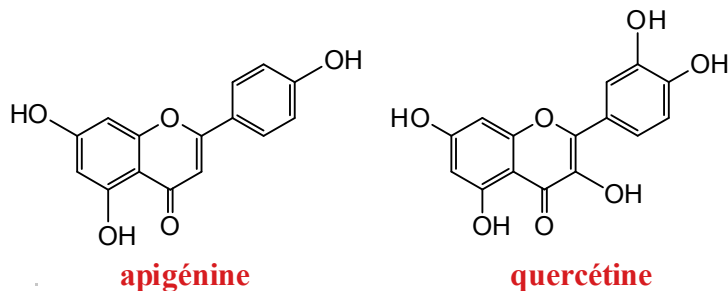


Figure II.20 : flavone et flavonol

2.2.2. Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes sont différents des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position C-3 (en C-2 pour les autres flavonoïdes). Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (fig. II.21), classés notamment en fonction du degré d'oxydation, l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires, les plus communs étant les isoflavones, alors que les isoflavanols et les coumaranochromones sont peut rencontrés [145]. Ils sont très actifs biologiquement [166-167]. Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présentes dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, quelque fois dans les feuilles et les fleurs. Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont très réponsus chez la famille des Légumineuses, car 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille [145]. Il apparait que 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés à partir de 59 autres familles [168].

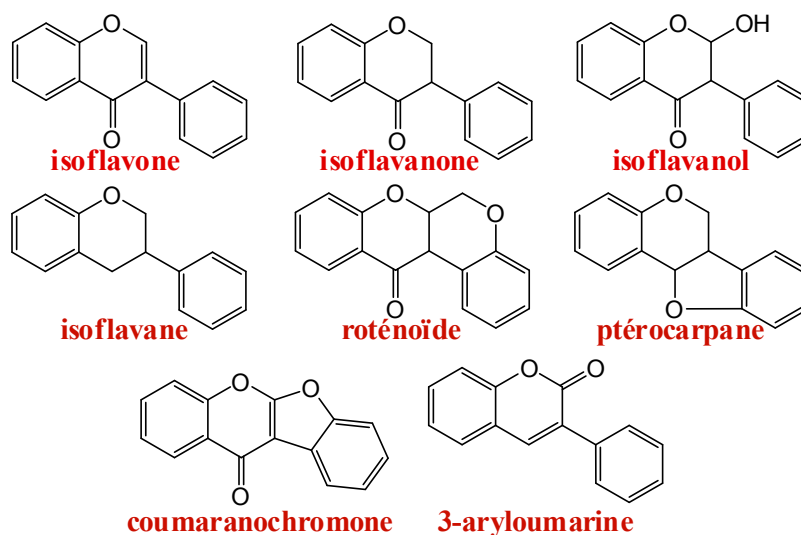


Figure II.21 : Structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes

Quelques Structures des isoflavonoïdes isolés pendant les dernières années: isoflavones (Irisflorentine [169]), isoflavanones (Platyisoflavanone A [170]), isoflavanes (licorisoflavane A [171]), isoflavanols (Pumilanol [172]) et Ptérocarpanes (médicarpine [173]).

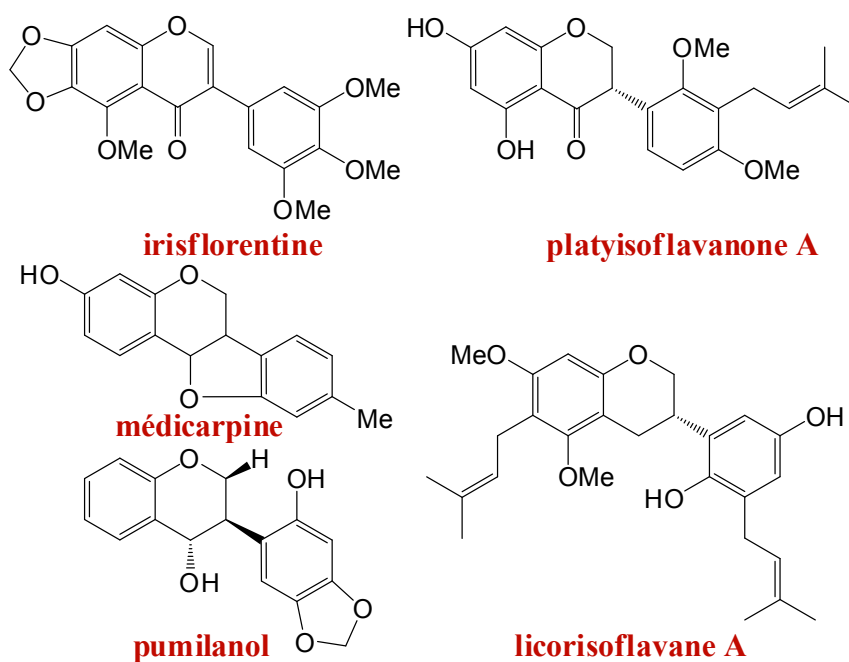


Figure II.22 : quelques isoflavonoïdes

2.2.3. Flavanones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence d'un centre chiral en position 2. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Elles sont synthétisées à partir des chalcones,

par une chalcone isomérase sous forme de 2*S*-flavanones, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin. Il semblerait que seuls les stéréo-isomères 2*S* sont biologiquement actifs [174]. Les dihydroflavonols (3, 5, 7-trihydroxyflavonol [175]) se distinguent des flavanones (lawsonaringénine [176]) par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe des flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols.

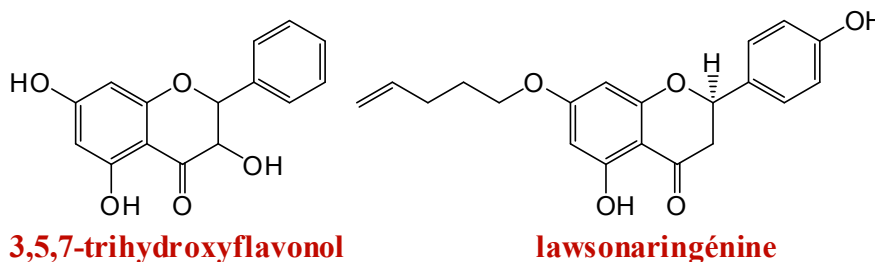


Figure II.23 : flavanone et dihydroflavonol

2.2.4. Chalcones et aures

Les chalcones (2', 4'-dihydroxychalcone [177]) sont différents des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. D'une part l'ouverture du noyau pyranique central d'autre part elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α , β -insaturée (fig. II.19). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont les plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aures (Aureusidine [178]) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone (fig. II.19).

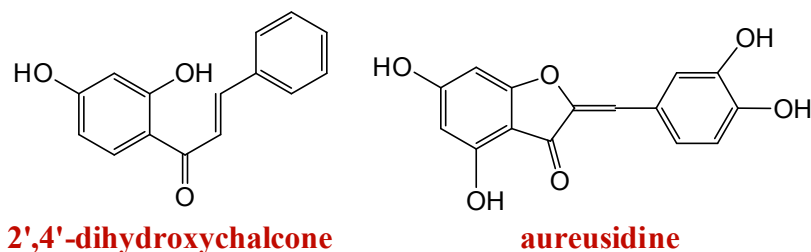


Figure II.24 : chalcone et aures

2.3. Origine Biosynthétiques de flavonoïdes

L'origine des flavonoïdes est inscrite en filigrane dans leur structure. Elle apparaît bien dans celle des chalcones : condensation d'un tri-acétate (cycle A) et d'un acide cinnamique (cycle B), la cyclisation engendrant le cycle pyranique central. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de précurseurs radio marqués et par des études au niveau

enzymatique, aussi bien sur des cultures de tissus que sur la plante entière (les pétales en particulier).

Les deux précurseurs (fig. II.23) proviennent d'hydrates de carbone. Le malonyl-CoA est formé à partir d'acétyl-CoA et de CO₂ par catalyse à l'acétyl-CoA carboxylase. Le 4-coumaroyl-CoA et les esters d'acides hydroxycinnamiques correspondants sont fournis à partir de la voie phénylpropanoïde. Cette voie de biosynthèse de la phénylalanine est issue de celle du shikimate/arogénate. La réaction clé est la désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonialyase (PAL). Cette enzyme joint la voie métabolique primaire à la voie phénylpropanoïde. Le produit de la réaction, le trans-cinnamate, est hydroxylé en 4-coumarate par la cinnamate-4-hydroxylase associée à la fonction mono-oxygénase du cytochrome P-450. L'activation du 4-coumarate par la formation d'ester CoA est catalysée par la 4-coumarate-CoA ligase. Le 4-coumaroyl-CoA peut être hydroxylé en position 3, en caffeoyl-CoA qui sert de substrat pour la formation de chalcones ainsi que pour la synthèse de la 4-coumaroyl-CoA dans certaines plantes.

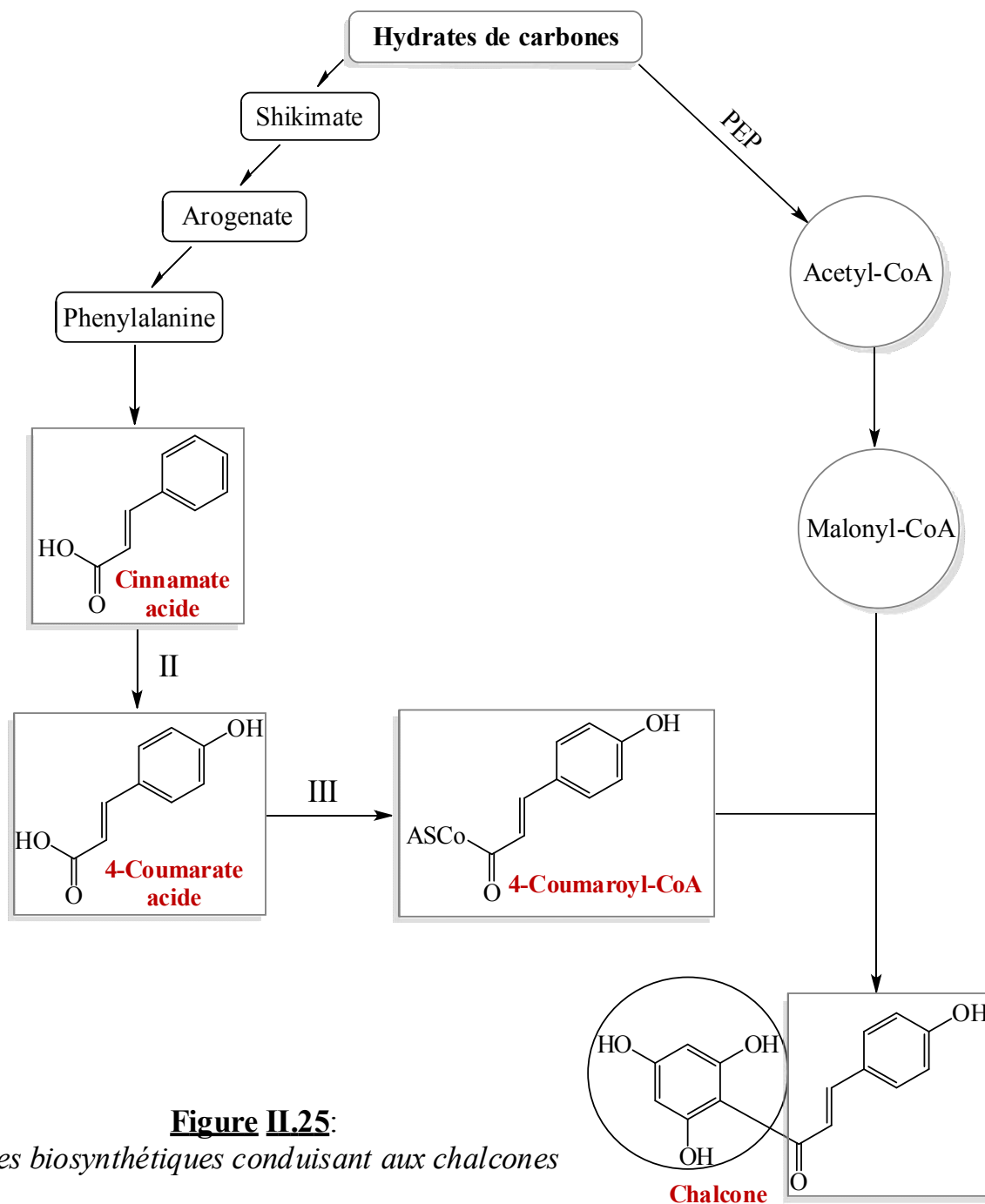


Figure II.25:
Voies biosynthétiques conduisant aux chalcones

L'enzyme-clé pour la formation du squelette flavonoïde est la synthèse de chalcone (CHS), qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C₁₅; 2', 4', 6', 4-tétrahydrochalcone (fig. II.26) [179].

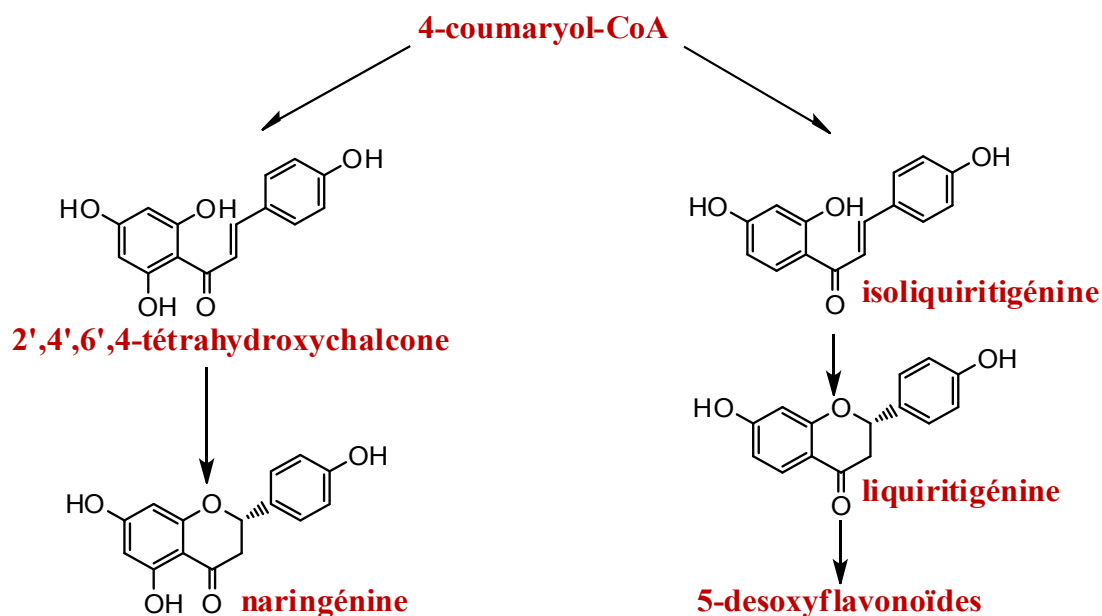


Figure II.26: Voie de biosynthétique de construction du squelette benzopyrane.

La 6'-désoxychalcone [180] et l'isoquiritigénine [181] sont respectivement obtenues à partir de la malonyl-CoA et du 4-coumaroyl-CoA par la synthèse de chalcone mais avec participation d'une réductase NADPH-dépendante. Ces deux types de chalcones sont les précurseurs directs des aurones et des autres diphenylpropanoïdes. Les enzymes impliquées dans ces réactions sont encore inconnues. Mais, en particulier, les 6'-hydroxy- et 6'-désoxychalcones sont les intermédiaires précurseurs de tous les flavonoïdes. La cyclisation stéréospécifique des chalcones, catalysée par la chalcone isomérase, conduit aux 2*S*-flavanones (par exemple la naringénine [157] et la liquiritigénine [182]) avec le squelette spécifique des flavonoïdes (fig. II.26). Deux types de chalcone isomérases sont connus, l'une catalyse la cyclisation de la 6'-hydroxychalcone en 5-hydroxyflavanone et l'autre isomérisé les 6-hydroxy et 6'désoxychalcone en 5-hydroxy- et 5-désoxyflavanone, respectivement.

Les flavanones sont les précurseurs directs de la majeure partie des flavones, des isoflavones et de la formation de deux intermédiaires de flavonoïdes : les flavan-4-ols et les dihydroflavanols. Les flavones (comme l'apigénine [150]) sont synthétisées à partir des flavanones par introduction d'une double liaison entre les carbones C-2 et C-3 (fig. II.27).

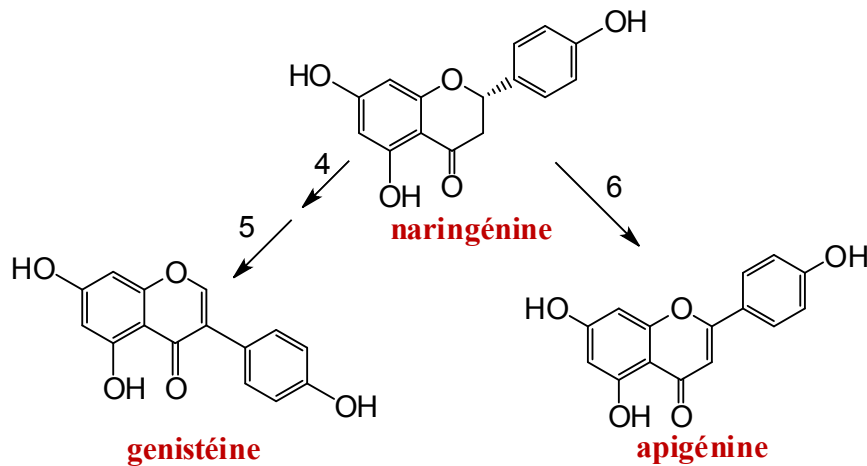


Figure II.27: Formation de la genistéine et de l'apigénine

Deux types d'enzymes catalysent cette réaction, la flavone synthèse I : une 2-dioxygénase oxoglutarate-dépendante et la flavone synthèse II: une fonction associée mono-oxygénase du cytochrome P-450 couplée à une protéine déshydratase. L'enzyme accepte comme substrat aussi bien les 5-hydroxy que les 5-désoxyflavanones. Pour les isoflavones, la réaction implique un réarrangement oxydant de flavanone et un déplacement du groupe aryle de la position 2 à la position 3.

La réaction du groupe carbonyle des flavanones permet d'obtenir les flavan-4-ols (comme l'apiférol [183]). La réaction est catalysée par la flavanone-4-réductase et donne le précurseur immédiat pour la formation des 3-désoxyanthocyanines (fig. II.28).

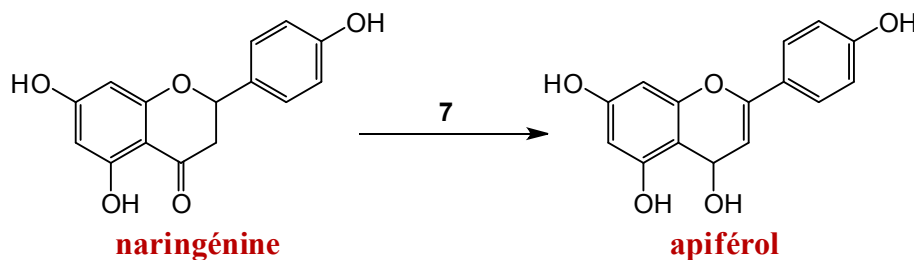


Figure II.28: Réduction de la cétone en position 4.

Finalement, les flavanones peuvent être hydroxylées dans la position 3 pour conduire aux dihydroflavanonols (comme le dihydrokaempférol [184]), qui sont les intermédiaires biosynthétiques dans la formation des anthocyanidines. Cette réaction est catalysée par la flavanone 3-hydroxylase, 2-oxoglutarate dioxygénase dépendante.

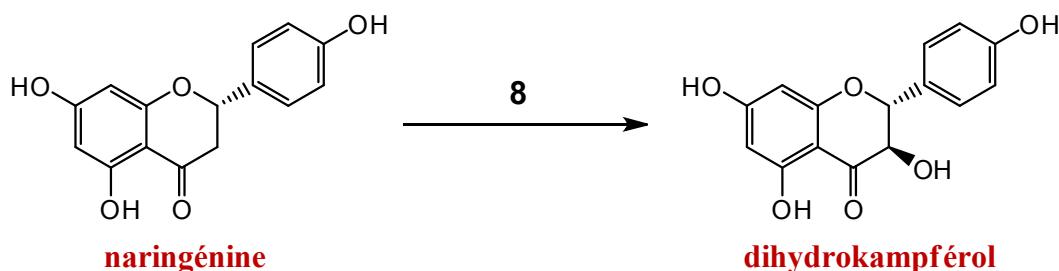


Figure II.29: Hydroxylation de la position 3.

Les dihydroflavanonols sont les précurseurs directs pour une grande partie des flavonols et pour la formation des flavan-3, 4-diols (les leuco-anthocyanidines [185]). Les flavonols (comme le kaempférol [153]) sont formés à partir des dihydroflavanonols (fig. II.29) par introduction d'une double liaison entre les carbones C-2 et C-3. La réaction est catalysée par la synthase du flavonol, une autre 2-dioxygénase oxoglutarate-dépendante.

La réduction des dihydroflavanonols en position 4 catalysée par les dihydroflavanonol-4-réductases, conduit aux flavan-2,3-*trans*-3,4-*cis*-diols (leuco-pélargonidine [186]), qui sont des intermédiaires dans la formation des catéchines, des proanthocyanidines et des anthocyanidines. Les catéchines (l'afzeléchine [187]) sont synthétisées à partir des leuco-anthocyanidines via une réduction de la position 4. Cette réaction est catalysée par la flavan-3, 4-*cis*-diol réductase. Les pro-anthocyanidines (pro-pélargonidine [188]) proviennent vraisemblablement de la condensation de leuco-anthocyanidines et de catéchines. Les enzymes catalysant cette réaction sont encore inconnues.

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et l'enzymologie de la production des pro-anthocyanidines dans les plantes proviennent d'une étude détaillée réalisée par **Stafford [189]**. Il a également décrit les relations entre la lignine et les pro-anthocyanidines, mais n'a pas pu montrer de rôle structural pour les pro-anthocyanidines contrairement à la lignine. **Stafford** suggère que la lignine et les pro-anthocyanidines ont des rôles de défense similaires.

Le schéma de la biosynthèse [190] des pro-anthocyanidines est résumé dans la figure II.30 et la liste des enzymes qu'elle implique est représentée dans le tableau II.2 Les étapes réactionnelles conduisant aux précurseurs des flavonoïdes et à leurs différentes classes impliquent des intermédiaires 4'-hydroxylés (sur le cycle B), les flavonoïdes obtenus sont ensuite hydroxylés (ou fonctionnalisés) sur les noyaux A et B pour conduire aux autres classes des flavonoïdes.

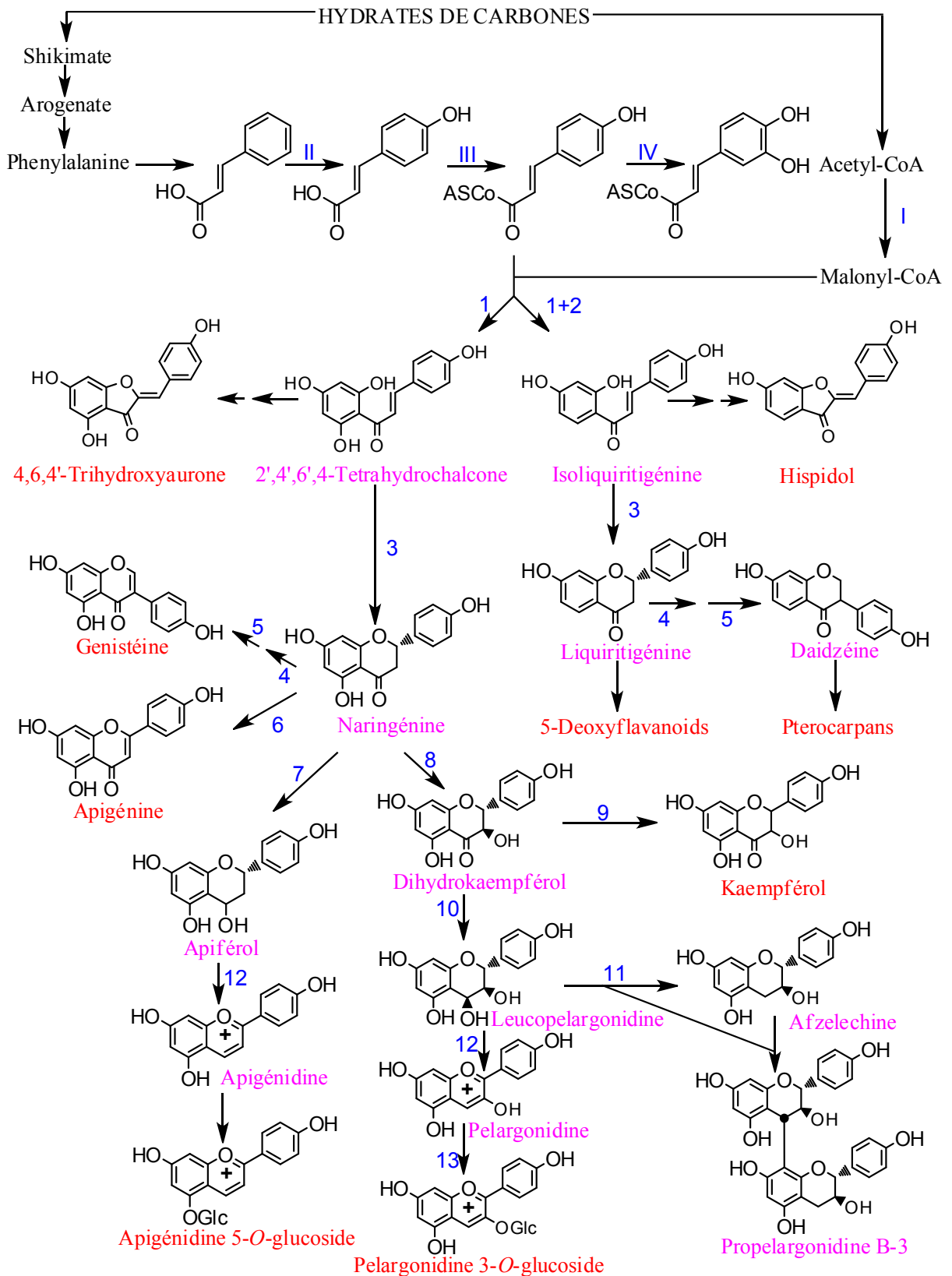


Figure II.30: Voie biosynthétique conduisant à la majorité des flavonoïdes. Les enzymes représentées par des numéros sont rassemblées dans le tableau II.2.

L'enzyme catalysant cette réaction avec les anthocyanidines comme substrat est l'UDP-glucose-flavonoïde-3-*O*-glucosyl-transférase. Le produit est une anthocyanine stable (comme la pélargonidine-3-*O*-glucoside) (fig.II.30).

Tableau II.2: Liste des enzymes (indiquées figure II.25 à II.30) conduisant aux différentes classes de flavonoïdes [191-192].

Numéro	Enzyme	Acronyme
Précurseurs non-Flavonoïdes		
I	Acetyl-CoA Carboxylase	ACC
II	Phenylalanine Ammonia Lyase	PAL
III	Cinnamate 4-Hydroxylase	C4H
IV	4-Coumarate: CoA Ligase	4CL
V	4-Coumaroyl-CoA 3-Hydroxylase	CC3H
Les classes des flavonoïdes		
1	CHalcone Synthèse	CHS
2	PolyKetide Réductase	PKR
3	CHalcone Isomérase	CHI
4	2-HydroxyIsoFlavone Synthèse	IFS
5	2-HydroxyIsoFlavone Déhydratase	IFD
6	FlavoNe Synthèse I et II	FNS I et II
7	Flavone 4-Réductase	FNR
8	Flavone 3-Hydroxylase	FHT
9	FlavonoL Synthèse	FLS
10	DihydroFlavonol 4-Réductase	DFR
11	Leuco Anthocyanidin 4-Réductase	LAR
12	ANthocyanidine Synthèse	ANS
13	Flavonoïde 3- <i>O</i> -Glucosyl Transférase	FGT

2.4.Substitution du squelette flavonique

Les flavonoïdes se divisent en sous-classes, les composés variés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux noyaux aromatiques A et B et l'hétérocycle C.

2.4.1. La O-substitution

2.4.1.1. L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols et d'après les réactions de biogénèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [193]. L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C (lutéoline [194]), c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4' et 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [195]. Pour le cycle C, la substitution sera sur la position C-3 qui donne la myricétine [196] comme exemple. Les positions C-2' et C-6' du cycle B sont rarement hydroxylées [197] (2', 5'-dihydroxyflavonol [194]).

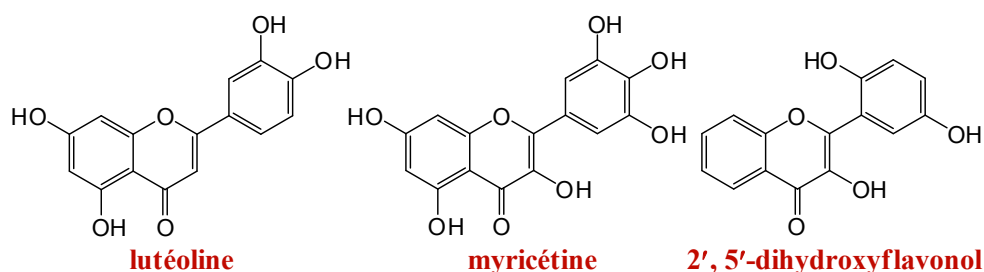


Figure II.31 : hydroxylation de quelques flavonoïdes

2.4.1.2. La méthylation

La méthylation faite partie de la biosynthèse de plusieurs flavonoïdes, elle joue un rôle important dans la couleur de ces derniers, par exemple le groupe méthyle de l'anthocyanine donne la couleur des fleurs [198]. La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (*O*-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [199-200].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7 et 8), noyau B (carbones 2', 3', 4' et 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones (5, 2'-dihydroxy-7, 3', 4', 5'-tetraméthoxyflavone [200]) et flavonols (kumatakenine [201]) [202].

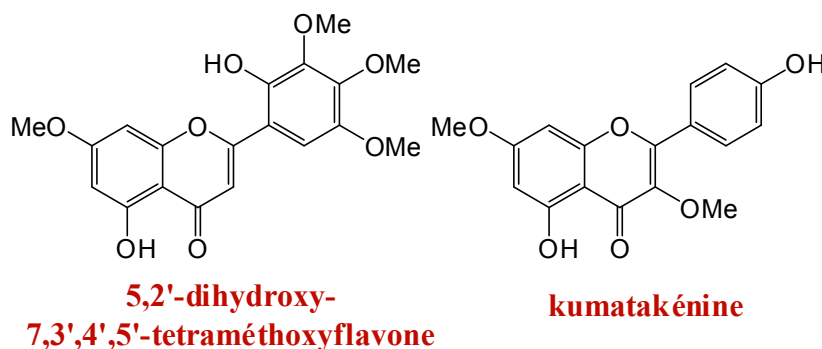


Figure II.32 : méthylation de quelques flavonoïdes

On note aussi les recherches faites par **Deluca** en 1984 qui a abouti à faire un schéma montrant les différentes étapes de la substitution du groupement méthyle sur le squelette flavonique.

Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation en position C-5 du cycle A et la position C-4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par **Khoury** [203], on peut citer à titre d'exemple l'irisflorentine [169] méthyloxylés en C-4' et C-5 (fig. II.22).

2.4.1.3. La *O*-glycosylation

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique avec un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) en présence de l'enzyme Glycosyltransférase et l'UDP-glu (Uridine diphosphate glucose) comme donneur du sucre. D'une manière générale, l'hydroxyle en position C-7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones (lutéoline 7-*O*-glucoside [204]) alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 (afzéline [205] [206]).

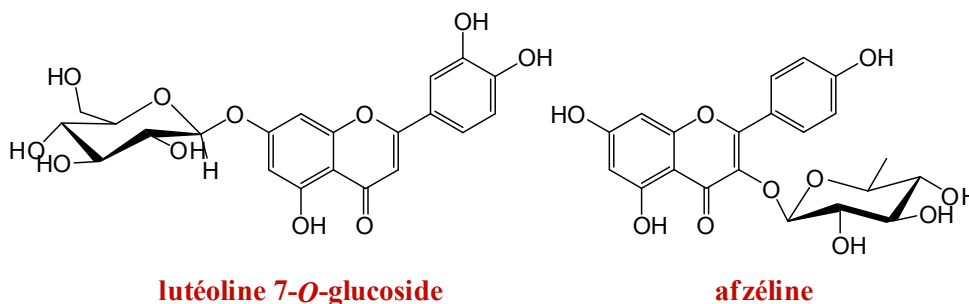


Figure II.33 : glycosylation de quelques flavonoïdes

Un deuxième sucre (ou plusieurs) peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé (nervilifordizine C [207]).

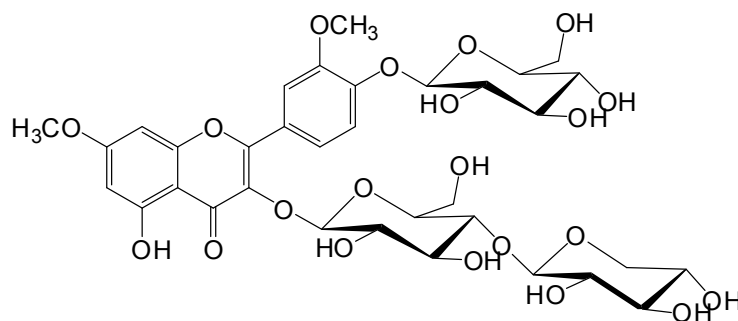
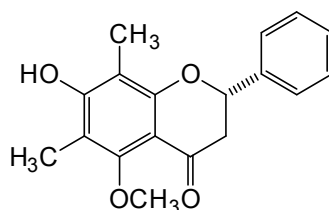


Figure II.34: nerylifordizine C

2.4.2. La C-substitution

2.4.2.1. La C-méthylation

Le méthyle est lié au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position 6 ou en position 8, ou encore en position 6 et 8 ((2*S*)-7-hydroxy-5-méthoxy-6,8-diméthylflavanone [208]). L'enzyme catalysant la C-méthylation en position 6 et / ou en position 8 est toujours inconnue [190].

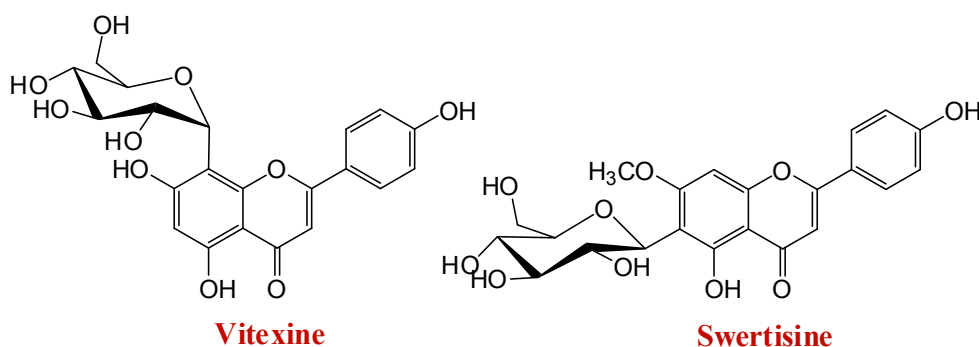


**(2*S*)-7-hydroxy-5-méthoxy-
6, 8-diméthylflavanone**

Figure II.35 : un flavonoïde avec C-méthylation

2.4.2.2. La C-glycosylation

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [9]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [209]. D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position 6 ou 8 (Swertisine et Vitexine [210]).



Vitexine

Swertisine

Figure II.36 : quelques flavonoïdes avec C-glycosylation

2.5. Les fonctions des flavonoïdes dans les plantes

2.5.1. Le rôle de protection contre le stress environnemental

Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Ils peuvent également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. 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. Les flavonoïdes sont de puissants piègeurs de radicaux libres (ROS) et préviennent ainsi la peroxydation des lipides [211].

Les flavonoïdes ont des maximums d'absorption dans la gamme des UV-B, et sont retrouvés avec des niveaux élevés dans les couches épidermiques des tissus des feuilles et dans le pollen. De plus, la synthèse des flavonoïdes est rapidement et fortement induite par l'irradiation aux UV-B, une réponse qui est médiée, au moins pour une partie, par le niveau de transcription des gènes biosynthétiques des flavonoïdes [212]. Dans certains cas, ce phénomène est accompagné d'une réduction de la biomasse, une diminution de la germination du pollen et une réduction de l'activité photosynthétique [198]. La phénylalanine ammonia lyase (PAL), ainsi que la chalcone synthèse (CHS) sont des enzymes inductibles par les UV-B. D'autres enzymes entrant dans la biosynthèse des flavonoïdes sont également inductibles par les UV, en particulier la glucose-6-phosphatase déshydrogénase, la 3-déoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthèse et la sadénosyl-homocystéine hydrolase [213]. L'accumulation de certains isoflavonoïdes, existant de manière constitutive, est ainsi stimulée par les radiations UV-B. Il semblerait que la sensibilité des plantes aux radiations UV-B se fait à différents niveaux, notamment [213] :

- ✗ photogénération des ROS et une sensibilité des plantes à ceux-ci
- ✗ dégradation irréversible de l'ADN (par formation de dimères de nucléotides)
- ✗ absorption des radiations par des récepteurs UV-B spécifiques avec des maximums d'absorption vers 280-290 nm
- ✗ absorption des radiations par d'autres récepteurs UV-B spécifiques avec des maximum d'absorption vers 300-310 nm [213]

2.5.2. Les rôles comme composés de défense

Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents d'une manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, ou sont uniquement biosynthétisés après une agression et dans ce cas on parle de phytoalexines.

Les phytoalexines « *Stricto sensu* » sont définis comme des composés synthétisés en réponse à une attaque et les phytoanticipines comme des composés présents avant toute attaque [214].

Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés dans des endroits stratégiques de la plante pour la défendre. Mais les preuves de la relation entre la localisation et les effets bénéfiques pour la plante sont difficiles à trouver. Par exemple, l'occurrence de flavanols dans le noyau de plusieurs espèces d'arbres est encore à débattre. Des études microscopiques mettent en évidence la présence de flavanols dans les anthères de *Camellia sinensis* pendant l'anaphase et la prophase, mais la fonction des flavanols à ce niveau est encore obscure [211].

2.5.2.1. Interactions plantes-microorganismes

La plupart des plantes vivent en symbiose ou d'une manière commensale avec des microorganismes. Les racines de beaucoup des légumineuses sont colonisées par des bactéries fixatrices d'azote. Beaucoup de flavonoïdes sont sécrétés par les racines des plantes et agissent comme des signaux d'induction de la transcription de gènes bactériens, nommés nodD, pour nodulation. Ceci représente une action significative des flavonoïdes dans la croissance et le maintien des plantes. Les flavonoïdes jouant le rôle des molécules de signalisation, sont variés : chalcones, flavones (lutéoline), dihydroxyflavones, flavanones (naringénine), isoflavonoïdes, flavanols, anthocyanidines [212].

Les flavonoïdes, sont des molécules de signalisation, interviennent à d'autres niveaux comme dans les interactions symbiotiques avec les champignons. La colonisation des plantes par des champignons mycorrhiziens apparaît comme un phénomène universel, permettant de transférer des minéraux, en particulier le phosphore, aux plantes et des carbohydrates aux champignons. La colonisation des racines de *Medicago truncatula* (alfalfa) par le champignon mycorrhizien *Glomus versiforme* entraîne des changements dans la composition en flavonoïdes et en isoflavonoïdes, ainsi qu'un changement de l'expression des gènes impliqués

dans la biosynthèse de ces composés (par exemple, la synthèse des isoflavonoïdes agissant comme des phytoalexines est réprimée) [213].

De nombreuses études mettent en évidence le rôle des isoflavonoïdes comme molécules de signalisation dans les interactions plantes-microorganismes. Par exemple, les pterocarpanes, maackiaine et pisatine agissent comme des phytoalexines classiques dans l'interaction entre *Pisum sativum* et le pathogène fongique *Nectria haematococca*. De plus, les enzymes détoxifiant la maackiaine et la pisatine représentent des facteurs de virulence fongique. La pisatine induit la synthèse d'une protéine qui contrôle la transcription de l'enzyme de détoxification de cette dernière. En plus d'agir comme un signal pour la détoxification des phytoalexines, la pisatine et d'autres flavonoïdes, agiraient comme des stimulants de la germination des spores de *Nectria haematococca*. Les isoflavonoïdes des graines de soja (daïdzéine et génistéine) stimulent l'attraction chémotropique dans les hyphes de l'oomycète pathogène *Phytophthora sojae*, ceci suggère qu'ils pourraient assister les extrémités des hyphes des zoospores proches des racines dans la localisation de leur hôte [215]. Ainsi, il semble que les isoflavonoïdes agissent comme de multiples signaux aussi bien pour les microorganismes bénéfiques pour la plante que certains pathogènes, leur rôle apparaît donc comme très complexe dans l'écologie des plantes.

Inversement, les flavonoïdes peuvent aussi être des attractants pour des microorganismes pathogènes, comme *Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas syringae*, et des inducteurs de leurs gènes de virulence. Des activités de stimulation de la phagocytose sont également attribuées à divers types de flavonoïdes [211].

2.5.2.2. Interactions plantes-plantes

Les activités antimicrobiennes des flavonoïdes ont été décrites comme participant dans les interactions allélopathiques³ plante-plante. Les rôles et les modes d'action ne sont pas encore totalement élucidés. Par exemple, la réduction de croissance de certaines graminées (maïs, riz...) peut être causée par la naringénine, entraînant une inhibition de la 4-coumarate CoA ligase et donc de la lignification. D'autre part, *Centaurea maculosa* sécrète au niveau de ses racines de la catéchine (flavanol) qui inhibe la croissance et la germination des graines de *Centaurea diffusa* et d'*Arabidopsis thaliana*. [212].

³ Lorsque un microorganisme ou un végétal inhibe la croissance d'autres organismes par libération de composés dans l'environnement

2.5.2.3. Interactions plantes-pathogènes

Beaucoup de flavonoïdes possèdent des propriétés antifongiques : inhibition de cellulases microbiennes, de xylanases, de pectinases, chélation de métaux nécessaires aux enzymes et formation d'une structure dure et cristalline agissant comme une barrière physique aux pathogènes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et ainsi promouvoir la formation de thylle⁴ et de cal⁵, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

Les flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la résistance fongique, après la récolte, des fruits et des légumes. De fortes concentrations en flavonoïdes dans les fruits sont, en effet, très souvent corrélées avec une faible incidence de pathogènes. Cette constatation est d'ailleurs mise à profit pour mieux conserver les fruits. Par exemple, l'irradiation UV de *Citrus aurantium* entraîne une augmentation de la concentration en flavonoïdes et réduit la contamination par *Penicillium digitatum* [211].

2.5.2.4. Interactions plantes-insectes et animaux

Le rôle des flavonoïdes dans les interactions plantes-insectes est très important. Certains insectes peuvent séquestrer des flavonoïdes synthétisés par les plantes dans leur cuticule pour s'en servir comme défense contre les prédateurs, ou dans leurs ailes pour attirer leurs congénères. Les flavonoïdes peuvent aussi avoir un effet négatif comme substances antiappétantes, comme réducteurs de la digestion et comme toxines.

De plus, les flavonoïdes possèdent des effets sur les herbivores. Il semble que des exsudats de *Cistus ladanifer* contenant de l'apigénine et du 3, 7-diméthyl kaempférol, inhibe le *réticulum sarcoplasmique* du muscle squelettique (Ca²⁺-ATPase), entraînant ainsi une relaxation du muscle squelettique de la bouche de l'herbivore [211].

2.5.3. Rôle dans la fertilité des plantes

On observe chez des mutants naturels du maïs, une déficience d'activité de la chalcone synthétisée du pollen, ainsi qu'une stérilité. De même, certaines études ont mis en évidence chez des pétunias transgéniques, dont l'activité de la chalcone synthétisée est perturbée, une baisse de la fertilité. Que ce soit pour le maïs ou les pétunias, les plantes déficientes en flavonoïdes produisent un pollen qui ne soit pas germer, ou bien éclate pendant la formation du tube pollinique. Une addition exogène de flavonols, au pollen déficient, restore la fertilité.

⁴ Excroissance cellulaires ou sécrétion gommeuse qui obstrue les vaisseaux de sèves des arbres

⁵ Tissu végétal de cicatrisation qui se forme en réaction à une blessure

Le fait de retrouver ce rôle dans des espèces aussi éloignées que le maïs et le pétunia suggère un rôle universel des flavonoïdes dans la fertilité. Néanmoins, il a été mis en évidence que les flavonoïdes n'avaient aucun rôle dans la germination chez *Arabidopsis*, *Petroselinum crispum*, *Antirrhinum majus*. Ces résultats suggèrent que ce rôle a été perdu pendant l'évolution ou, au contraire, est apparu chez certaines plantes [212].

2.6. Les activités biologiques des flavonoïdes

Comme il a été présenté précédemment, les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur pouvoir antioxydant peut aussi expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques. Les isoflavonoïdes, en tant que phytoestrogènes, possèdent de nombreuses activités biologiques.

Toutefois certaines considérations concernant le métabolisme et la biodisponibilité des flavonoïdes sont à prendre en compte. Les flavonoïdes sous leur forme glycosylée (β -glycosides) ne sont pas absorbables. Néanmoins, il existe des enzymes au niveau intestinal capables d'hydrolyser les hétérosides [216]. De plus, certains microorganismes présents dans l'intestin sont capables d'hydrolyser les β -glycosides en aglycones et ainsi leur permettre de franchir la barrière intestinale [217]. On note également l'action de transporteurs de la famille ABC (Pgp et MRP) qui vont entraîner un efflux des métabolites au niveau intestinal [216]. Des inactivations sont également possibles au niveau du métabolisme entéro-hépatique avec notamment l'intervention de cytochromes P450. Les flavonoïdes interagissent avec les cytochromes P450 à plusieurs niveaux : en induisant la biosynthèse de P450 ou en modulant leur activité enzymatique (inhibition ou stimulation). Ils sont aussi métabolisés par les P450, ce qui peut conduire soit à une augmentation de leur activité *in vivo* (métabolite plus actif) soit à une diminution (métabolisation en composés peu actifs). Les flavanones et les flavanes sont peu influencés par les P450 en raison de leurs structures non planes [217].

2.6.1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne et donc l'anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [218].

2.6.1.1. Activité antibactérienne

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel ils se trouvent : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Escherichia coli* [218], *Staphylococcus aureus* [219], *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. [220-224]. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétine chez le cochon d'inde infecté par *Shigella*, sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium*) [224].

De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + [225]. Pour ces composés, il semble que la présence de deux groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité [225].

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.*, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens [224].

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, la encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle pour cette activité [224]. Certains pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne [224]. La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2, 4, 2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH-cytochrome c réductase [224].

anti SAMR (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants)

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées, l'apigénine n'a montré qu'une faible activité contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fortement sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus*, les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule [226-228].

Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des SAMR [229]. Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve de meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' (sur le cycle B) et en 6 (sur le cycle A). De plus, une hydroxylation en position 5 augmenterait l'activité. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait avoir une relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes [229]. De plus une dihydroxylation en méta, sur les cycles A ou B, augmente l'activité [230].

Pour les flavanones, une étude indique qu'une 2', 4' ou 2', 6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5, 7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR. Une substitution en position 6 ou 8 avec une longue chaîne aliphatique (type géranyle ou lavandulyle) augmente l'activité [224].

Certains travaux, ont montré que les flavonoïdes extraits avec de l'éthanol 95% sont actifs sur certaines bactéries, alors que ceux obtenus avec de l'éthanol 60% de la même plante sont inactifs, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* [231].

action sur les bactéries impliquées dans la formation des caries dentaires

L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) apparait comme un agent intéressant pour la prévention des caries dentaires en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec l'incorporation du glucose, diminuant ainsi la synthèse d'acides organiques [229].

action sur *Helicobacter pylori*

Des roténoïdes prénylés ont montré une activité sur *H. pylori* par inhibition de l'oxydation de NADH de la chaîne respiratoire de la bactérie. La présence des carbones saturés en position 6a et 12a semble indispensable à l'activité, de plus le cycle E doit être un cycle à 6 [229,232]. Des isoflavonoïdes de la réglisse ont également une action sur *H. pylori* [229].

action sur *Escherichia coli*

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* [233]. En effet, selon les travaux de Dadi et ses

collaborateurs, la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes :

- ✗ Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité
- ✗ Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase

Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

2.6.1.2. Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, les plus importants sont les flavanones et les flavanes [234]. Une flavanone prénylée (5, 7, 4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2*S*)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylène dioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* [224].

L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno et ses collaborateurs (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosylés et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringénine, l'hespéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum* [235].

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que l'activité des ptérocarpanes soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la présence de substituants oxygénés en position 3 et 9 apparaît comme essentielle à l'activité [225].

Quelle que soit la classe de flavonoïde considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique [225,234]. De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle [225].

Batawita et ses collaborateurs (2002), dans leur études sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica* L., ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes* [236]. D'autres flavonoïdes isolés de

Tibouchina grandifolia ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures [237].

Néanmoins, les études portées sur l'activité antifongique des flavonoïdes restent encore insuffisantes du fait de la grande hétérogénéité des moisissures et des levures.

2.6.1.3. Activité antivirale

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpe (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (A/WS/33) [238-239].

Certains chercheurs [238] ont d'abord suggérés que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte; bloquant ainsi tout le processus infectieux. D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral [238]. Ceci, explique que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5, 6, 7-triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés [240]. Elle pourrait être active en inhibant la PTK (inhibition de l'entrée du virus), en inhibant la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de l'assemblage du virus), en inhibant la sécrétion du facteur TNF- α , ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (inhibition de la réplication virale) [240].

Des isoflavanones ainsi que des isoflavonoïdes prénylés ont une activité antivirale sur le VIH, des études suggèrent qu'une absence de groupement hydroxyle en position 4' et une absence de tout substituant en position 5 est nécessaire à l'activité [229].

Des flavones (baicaléine, robustaflavone, hinokiflavone) sont décrites comme inhibant la transcriptase inverse du VIH-1, d'autres (gardénine A; 3, 2'-dihydroxyflavone) inhibent la protéinase de VIH-1, l'intégrase de VIH-1 ou la transcription virale [224]. Dans une étude concernant 34 flavonoïdes naturels ou de synthèse, la chrysin apparaît comme la molécule présentant le meilleur index thérapeutique contre VIH-1 [224].

Plusieurs mécanismes d'action sont proposés, incluant une inhibition de la polymérase virale, un attachement à l'acide nucléique viral ou aux protéines de la capsid virale [224].

Kongkum et ses collaborateurs (2012), dans leurs études sur les flavonoïdes de *Gardenia carinata* ont aussi démontré que ces molécules avaient une activité anti-HIV-1 dans l'essai anti-syncytium en utilisant le virus $\Delta^{\text{Tat/rev}}$ MC99 et le système de ligne cellulaire 1A2 [241].

2.6.2. Activité antioxydante

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes est conditionnée par la présence de [230, 242-244]:

- ✧ Une double liaison en C₂-C₃ avec un groupement oxo en C-4, et une hydroxylation en C-3 sur le cycle C
- ✧ Une dihydroxylation en C-5 et C-7 du cycle A
- ✧ Une ortho-dihydroxylation du cycle B

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes [230,245]. Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule [230]. Les trois principaux sites de chélation se situent [243] :

- ✧ entre l'hydroxyle en C-5 et le carbonyle en C-4
- ✧ entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en C-4
- ✧ entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B

Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipoxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés [243].

Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, il apparaît que la double liaison C₂=C₃ soit indispensable à cette activité. La NADPH oxydase peut aussi être inhibée par des flavonoïdes. Les composés dont la liaison C₂-C₃ est saturée sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position méta d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase [243].

En ce qui concerne le cas particulier des isoflavones, il apparaît que le potentiel antioxydant dépend de plusieurs caractéristiques structurales [244]:

- ✧ une dihydroxylation en C-5 et C-7

- ✗ une ortho-dihydroxylation sur les cycles A ou B augmente l'activité
- ✗ l'importance de phénol libre, notamment la méthylation du groupe hydroxyle en C-4' ou une sulfo ou une glucurono-conjugaison avec l'hydroxyle en C-7 diminue la capacité antioxydante des isoflavonoïdes [244]

La génistéine peut inhiber l'oxydation dans des systèmes lipidiques simples (liposomes) mais aussi dans des systèmes plus complexes. Néanmoins, cette inhibition est indépendante du système oxydatif et arrive aussi bien dans des procédés dépendant des métaux que non dépendants [246]. Les isoflavonoïdes réagiraient, à l'instar de la vitamine E (tocophérol) avec des radicaux lipidiques peroxylés, formant l'hydroperoxyde correspondant et le radical polyphénol. Ensuite, ce radical réagirait avec un second radical lipidique peroxylé dans une réaction classique antioxydante, et régénérerait l'isoflavonoïde de départ [246].

Une étude de l'activité antioxydante de trois flavonoïdes hydroxyles aux mêmes positions [un flavonol (la quercétine), un flavan-3-ol (la catéchine) et un anthocyanine (la cyanidine)] a montré que l'activité de la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine. Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C₂-C₃ et une fonction 4-oxo. La cyanidine avec une structure conjuguée, a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine [247].

2.6.3. Activité anti-inflammatoire

Le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans la régulation de nombreux gènes, il joue un rôle important en particulier dans la réponse inflammatoire. En inhibant l'activation de NF-κB, certains flavonoïdes s'avèrent posséder des propriétés anti-inflammatoires [246].

Certains flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'enzyme COX-2⁶ [248]. De plus, certains sont suppresseurs de la transcription de COX-2, en activant PPAR-γ (Peroxisome proliferator-activated receptors). Parmi les flavonoïdes testés, les flavanones et les flavan-3-ols sont inactifs, suggérant que la double liaison C₂-C₃ est essentielle à l'activation de PPAR-γ. De plus, cette activation semble dépendante du nombre et de la position des hydroxyles : des hydroxylations en position C-5 et C-7 sur le cycle A, et en C-4' sur le cycle B augmentent l'activité, alors qu'un hydroxyle en C-3' diminue cette activité [249].

Les flavonoïdes possèdent une activité comme piègeurs de NO, mais d'un côté, il semble que cette activité *in vitro* n'ait pas de signification au niveau physiologique, puisqu'elle reste très faible comparée à celles que peuvent avoir certaines molécules

⁶ Enzyme qui produit les prostaglandines impliquées dans l'inflammation

"physiologiques" comme l'hémoglobine. Il apparaît plutôt que les flavonoïdes diminueraient la production de NO par inhibition des protéines induisant la synthèse d'iNOS (synthèse inductible de NO) notamment par inhibition de l'activation de NF- κ B [243].

L'analyse de l'expression des gènes et de la sécrétion de plusieurs cytokines dans des mastocytes humains (cellules HMC-1) a révélé que la fisétine, la quercétine et la rutine diminuaient l'expression et la production du TNF- α , de l'IL-1- β , de l'IL-6 et de l'IL-8. La myricétine, quant à elle, a diminué celles du TNF- α et de l'IL-6 mais pas celles de l'IL-1- β ou de l'IL-8. Enfin la fisétine, la myricétine et la rutine ont supprimé l'activation de NF-kappaB [250].

2.6.4. Activité antiparasitaire

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antiparasitaires. Les plantes contenant des roténoïdes, dont en particulier la roténone, ont longtemps été utilisées pour lutter contre les ecto et les endo-parasites. D'ailleurs des formulations vétérinaires existent. La roténone représente ainsi le principe actif (0,1 à 10%) de quelques formulations acaricides à usage externe pour les chats, les chiens, les ruminants et les porcs.

2.6.4.1. *Plasmodium* sp.

Le paludisme est certainement la parasitose la plus importante avec 300 à 600 millions de cas cliniques et près d'un million de morts par an dans le monde [251]. Les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées (en particulier les personnes atteintes du VIH) sont les plus touchés. Les agents responsables sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, les formes les plus sévères étant imputées à *P. falciparum*.

La génistéine possède une activité contre *P. falciparum* [229]. Un certain nombre d'isoflavonoïdes prénylés dont des roténoïdes inhibe la croissance de différentes souches de *P. falciparum*. Il a été observé que les roténoïdes contenant une unité prényle ou 2, 2-diméthylpyrano sont plus actifs que les roténoïdes non prénylés, de plus, la présence du carbonyle en position 5 semble indispensable à cette activité [229]. L'artémétine et la casticine (flavanols polyméthoxylés) agissent sur *P. falciparum* en synergie avec l'artémisinine [252]. Les biflavonoïdes sont également connus comme des bons anti-plasmodiaux [253]. Les chalcones prénylées (lichochalcone A et méthyllindératine) sont actives contre *Plasmodium* sp., *in vitro* et *in vivo* [251].

Le mode d'action des flavonoïdes n'est pas encore totalement élucidé mais il semblerait que certains inhibent l'influx de L-glutamine et de myoinositol dans les

érythrocytes infectés [254-255]. Ils pourraient aussi agir sur la génération de ROS, ou inhiber certains transporteurs du type P-glycoprotéine [252].

2.6.4.2. *Leishmania* sp.

Les leishmanioses sont dues à une vingtaine d'espèces de *Leishmania*. Les formes cutanées et cutanéomuqueuses entraînent notamment des nécroses du nez et de la bouche. La forme la plus sévère, la leishmaniose viscérale, ou Kala-azar, présente comme tableau clinique : fièvre, toux, douleurs abdominales, diarrhée, épistaxis, splénomégalie, hépatomégalie, cachexie et cytopénie, elle est associée à une forte mortalité (41000 morts/an). Cette forme est essentiellement due à *L. donovani* en Inde et l'Afrique de l'Est, *L. infantum* dans la région méditerranéenne et de *L. chagasi* en Amérique du Sud [256]. Alors que pour *L. donovani*, l'homme représente le seul réservoir, pour *L. infantum* et *L. chagasi* le chien joue un rôle important dans la contamination [257]. On compte 500 000 nouveaux cas par an. L'arsenal thérapeutique est très limité pour cette infection (antimoniés, amphotéricine B, pentamidine, kétoconazole, itraconazole, allopurinol), avec notamment apparition de résistance, nombreux effets indésirables et des coûts élevés de traitement [258].

Dans une étude, menée par **Tasdemir** et ses collaborateurs (2006), sur une centaine de flavonoïdes testés pour leurs activités contre *Leishmania donovani*, pratiquement toutes les flavones et les flavon-3-ols sous forme aglycone sont actives. Pour les flavones, la présence de deux OH, en particulier en positions 5, 7 et 8 augmente l'activité, alors que des méthoxylations diminuent cet effet [259]. Les composés possédant la meilleure activité sont les flavon-3-ols mais la présence de méthoxylations diminue l'activité. Les hydroxylations ont une influence sur l'activité, mais il est difficile d'établir des relations structures-activités, néanmoins le flavan-3-ol le plus actif comporte 4 hydroxyles (fisétine). De plus, une glycosylation en position 3 et 5 diminue drastiquement l'activité. Même si les flavanones aglycones et les flavan-3-ols testées possèdent une activité, ces composés sont moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondants, ce qui suggère l'importance de la double liaison C₂-C₃ dans l'activité anti-leishmanienne. De plus, la fonction cétonique en position 4 est essentielle à cette activité [259].

La prénylation semble être importante pour l'activité antiparasitaire [253], notamment les isoflavonoïdes prénylés contre *Leishmania* sp. [229].

2.6.4.3. *Trypanosoma* sp.

Trypanosoma cruzi est l'agent responsable de la trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas, parasitose endémique en Amérique latine avec 40 000 nouveaux cas et 12500 morts par an. Le nombre de personnes infectées est de 16 à 18 millions [260]. La maladie de Chagas présente deux phases : une phase aigue caractérisée par une inflammation souvent affectante le myocarde, et une phase chronique autoimmune avec destruction du muscle myocardique [260]. Le nifurtimox (Lampit®) est utilisé en phase aigue alors que la chirurgie est préconisée dans la phase chronique.

Trypanosoma brucei rhodiense et *Trypanosoma brucei gambiense* sont responsables de la trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil qui touche 500 000 personnes par an en Afrique subsaharienne [259]. Le mélarsopol, la pentamidine, la suramine et l'éflornithine constituent les traitements disponibles.

In vitro, la génistéine est active sur *T. brucei* [229]. **Tasdemir** et ses collaborateurs, ont évalués l'activité d'une centaine de flavonoïdes contre *T. brucei rhodesiense*. Les composés glycosylés ont une activité inférieure à celles des aglycones correspondantes. La double liaison C₂-C₃ est importante pour l'activité, les flavanones et les flavan-3-ols étant moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondant. La cétone en position 4 est nécessaire pour cette activité. Les isoflavonoïdes non glycosylés testés possèdent une activité importante contre *T. brucei rhodesiense* [259]. De plus, une méthylation sur les cycles B ou C tend à diminuer l'activité [261]. Des flavonoïdes proches de la génistéine (apigénine, isokaempféride) présentent également une bonne activité contre *T. cruzi*. De nombreuses flavanones prénylées sont actives contre *T. cruzi*, les dérivés portant un groupement lavandulyle apparaissent comme les plus actifs. Il semble que la prénylation joue un rôle dans l'activité, en effet la naringénine (composé non prénylé) ne possède aucune activité [262].

Le mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, néanmoins il semblerait que les flavonoïdes agiraient par modulation de protéines de phosphorylation sur la protéine kinase SPK89 chez les trypanosomes [252].

2.6.5. Activité antiproliférative et anticarcinogénique

De nombreuses études épidémiologiques ont révélé que des régimes basés sur une importante consommation de fruits et légumes riches en flavonoïdes sont corrélés avec des incidences plus faibles de cancers.

Dans une étude évaluant la cytotoxicité de plus de 100 polyphénols de bas poids moléculaire, sur des lignées cellulaires normales et tumorales, il apparaît que les composés sont plus actifs sur les souches cancéreuses que sur les lignées saines [263]. Les composés les plus actifs possèdent un groupement hydrophile (hydroxylation) en position vicinale d'un groupement hydrophobe (prényle ou phényle) [229,263]. La cytotoxicité des flavones prénylées est supérieure à celle des mêmes composés sans substituant. Par contre, il semble que la prénylation ne change pas significativement la cytotoxicité des flavanones, des isoflavanes, des chalcones et des 5-hydroxy-3- phenoxychromen-4-ones, à l'exception de la prénylation de la génistéine (isoflavone) qui augmente d'une manière significative sa cytotoxicité [263].

Les isoflavonoïdes en particulier peuvent prévenir les cancers hormonaux-dépendants en agissant sur les récepteurs ER (Partie 1, 2, 3 et 4). Le soja est l'aliment le plus riche en isoflavones avec 1-3mg/g de poids sec, le composé majoritaire parmi ces isoflavonoïdes étant la génistéine. Il semble qu'un régime riche en génistéine inhibe la croissance des tumeurs de la prostate, en réduisant à la fois le nombre et la taille des tumeurs [264-265]. Néanmoins, les métabolites de la génistéine (composés halogénés) apparaissent prépondérants dans cette activité [266].

Les flavonoïdes agissent aux à différents niveaux du processus de carcinogénèse.

2.6.5.1. Inhibition métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes

Les flavonoïdes peuvent agir comme des bloqueurs de l'activation métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes, dans ce cas ils permettent une détoxification et/ou une élimination des carcinogènes (fig. II.37).

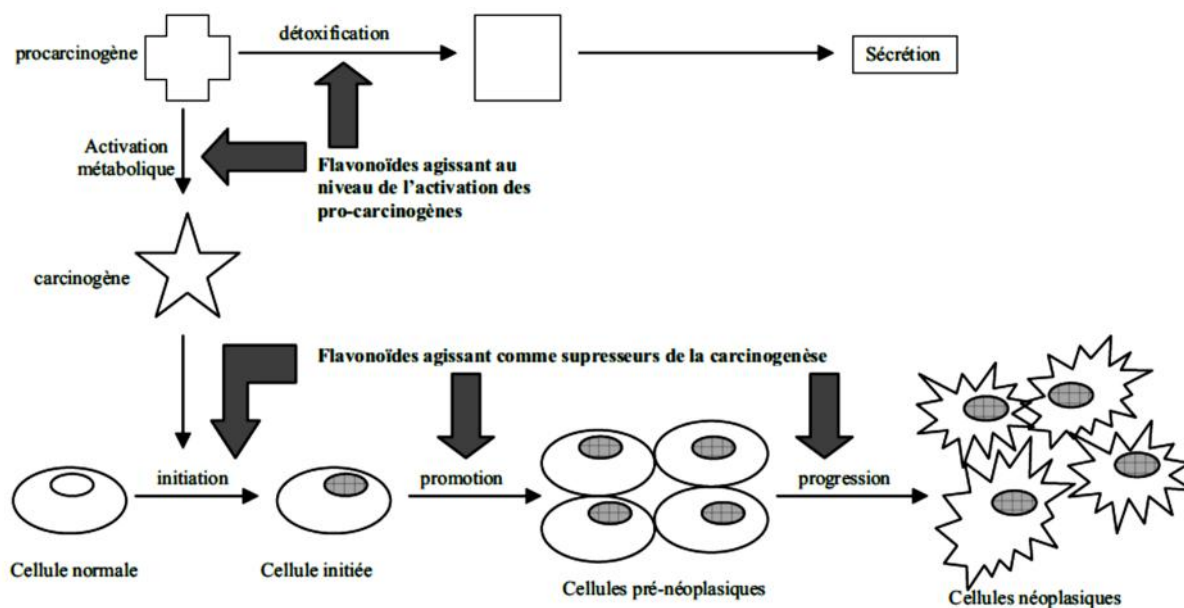


Figure II.37 : Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse (modifié d'après Kale *et al.* (2008) [242])

Les flavonoïdes réduisent l'activation de procarcinogènes en carcinogènes en interagissant avec des cytochromes P450, soit en induisant la synthèse de certains cytochromes (CYP1A1 et CYP1A2, CYP1B1), soit par ce qu'ils sont métabolisés par certains cytochromes, soit en modulant les activités enzymatiques de certains (stimulation ou inhibition). Les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1 sont surexprimés dans les tissus tumoraux et métabolisent les pro-carcinogènes en carcinogènes [266]. Par exemple, la quercétine stimule l'expression de CYP1A2, alors que les composés non hydroxylés comme la 7, 8-benzoflavone inhibe ce cytochrome. Dans le même sens, certains flavonoïdes inhibent ou induisent le cytochrome CYP3A4 qui intervient dans la métabolisation d'environ 50% de principes actifs et dans l'activation de certains carcinogènes [242,267]. Il semble important pour que les flavonoïdes puissent se lier au CYP1A2 que la molécule possède plusieurs groupements hydroxyles (de préférence en position 5 et 7, et en position 2 pour les flavanols). Néanmoins, la présence d'un trop grand nombre d'hydroxyles (quatre et plus) diminue l'affinité pour CYP1A1 et CYP1A2 [266]. De plus une structure plane de la molécule semble indispensable. Ce dernier point expliquerait pourquoi les flavanones et les flavanes (dont le cycle B est presque perpendiculaire au reste de la molécule) sont beaucoup moins actifs que les autres flavonoïdes. Notant aussi qu'une glycosylation entraîne une diminution de l'activité [242]. Une méthylation en C-4' (cycle B) augmente l'affinité [266]. Une cétone en position 4 est aussi essentielle à l'activité inhibitrice sur CYP1A2, le fait que les catéchines n'aient aucune activité semble le confirmer. Certains flavonoïdes interagissent aussi avec d'autres

enzymes impliquées dans la détoxification. Par exemple, des flavanones et des flavones augmentent l'activité de la GST et de l'UGT [242].

2.6.5.2. Agents supprimeurs de la carcinogénèse

En tant qu'agents supprimeurs de tumeurs, les flavonoïdes interviennent aux différents niveaux. Ils peuvent inhiber les topoisomérases I et II, différentes protéines kinases, ils sont également capables de cibler l'apoptose et ainsi induire une mort des cellules tumorales. L'EGCG (gallate d'épigallocatechine) et la quercétine, en se liant au récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), peuvent supprimer la prolifération ou induire l'apoptose [242].

Les isoflavonoïdes prénylés apparaissent comme des bons inhibiteurs de la PLC γ I (phosphatidylinositol phospholipase C, isoforme γ), un enzyme qui intervenant dans la prolifération anormale des cellules. De nombreux roténoïdes possèdent des propriétés antiprolifératives et anti-carcinogéniques [229].

La quercétine inhibe la β -caténine, protéine intracellulaire impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire des épithéliums gastriques et colorectaux [248].

2.6.5.3. Action sur la résistance des cellules tumorales

Certains flavonoïdes inhibent la glycoprotéine P-gp et d'autres transporteurs d'efflux [242,267-268]. Ces transporteurs jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de résistances des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. En effet, ils interfèrent avec la biodisponibilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des anticancéreux. La présence d'un hydroxyle non substitué en position 5 est importante à l'activité contre P-gp [242]. Les composés prénylés auraient une meilleure affinité pour P-gp [267].

Deux flavones (6-prénylchryisine et tectochryisine) apparaissent comme des inhibiteurs spécifiques de l'ABCG2 (transporteur impliqué dans les phénomènes MDR dans le cancer du sein). Il semble qu'une hydroxylation en position 5 (cycle A) augmente l'activité, alors qu'une hydroxylation en position 3 diminue l'activité. De plus, sur ce modèle, une prénylation en position 8 augmente plus l'activité qu'en position 6 [269].

Certaines ptérocarpanes (4-hydroxymaackiaine, érybraéine C et bitucarpine A) possèdent la même activité que l'étoposide sur des cellules humaines d'adénocarcinome de colon ou induisent l'apoptose sur cellules HL-60 (leucémie humaine) (2, 3, 9-triméthoxyptérocarpane, homotérocarpane, médicarpine et vesticarpine) [225].

2.6.5.4. Action sur la vascularisation des tumeurs

Un effet antitumoral peut-être exercé en inhibant la néovascularisation des tumeurs (composés anti-angiogéniques), ou encore en détruisant la vascularisation déjà existante (agents perturbateurs de la vascularisation tumorale). Ces derniers composés détruisent la vascularisation tumorale préexistante, entraînent un arrêt du flux sanguin dans la tumeur et mènent à une nécrose de la tumeur.

Certains flavonoïdes possèdent cette propriété soit en induisant une apoptose sélective des cellules endothéliales tumorales, soit indirectement en augmentant les concentrations dans les tumeurs en TNF-a et d'autres cytokines [270].

Le composé le plus prometteur est l'ASA404 : vadimézan ou l'acide 5, 6-diméthylxanthénone-4-acétique/DMXAA (xanthone) (fig. II.38) qui est entré en phase clinique de la phase III chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC nonsmall cell lung cancer). Cette molécule induit une apoptose des cellules endothéliales de la vascularisation tumorale. De plus, l'ASA404 peut aussi agir en synergie avec d'autres anticancéreux (docétaxel, paclitaxel et carboplatine) et quand il est administré après une radiothérapie, l'efficacité est potentialisée dans les essais de la phase II [270]. Néanmoins, l'essai clinique de la phase III a été interrompu en mars 2010, pour cause d'inefficacité dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules.

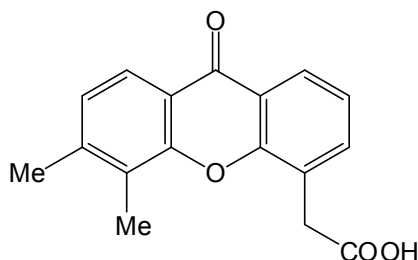


Figure II.38 : Structure de l'ASA404

De nombreuses études épidémiologiques présentent les régimes riches en flavonoïdes comme liés à une diminution de l'incidence des cancers. Les flavonoïdes apparaissent actifs contre des cellules tumorales. Toutefois, il est difficile de corréler ces deux constatations, les doses étant très différentes en général entre les études *in vitro* et dans les études épidémiologiques. De plus, étant donné la diversité des structures au sein des flavonoïdes et les différents mécanismes pouvant être mis en jeu, il est très difficile d'établir des relations structure-activité.

2.6.6. Activités estrogénique et anti-estrogénique

Ces activités sont dues essentiellement aux isoflavonoïdes qui font partie des phytoestrogènes. Un phytoestrogène peut être défini comme toute substance issue de plante qui est capable d'induire ou de moduler une réponse estrogénique chez les vertébrés en se liant à des récepteurs estrogéniques. Les phytoestrogènes regroupent des flavanones, des lignanes, des coumestanes et beaucoup d'isoflavonoïdes [271].

2.6.6.1. Les récepteurs aux estrogènes

Les phytoestrogènes se lient aux récepteurs nucléaires aux estrogènes présents sous 2 isoformes : ER α et ER β . Ces récepteurs sont tous les deux impliqués dans le développement des follicules ovariens, dans la vascularisation endothéliale et dans le fonctionnement des cellules cardiaques. Les récepteurs ER α sont impliqués dans la maturation osseuse que ce soit chez l'homme ou chez la femme, alors que l'isoforme ER β intervient dans la construction osseuse uniquement chez la femme. De plus, ER α est impliqué dans la stimulation folliculaire et dans le maintien de la concentration en lutéine dans le sang, alors que ER β est plutôt impliqué dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire [272]. Les phytoestrogènes se lieraient préférentiellement aux récepteurs ER β , alors que les estrogènes endogènes se lient aussi bien aux deux isoformes [273].

2.6.6.2. Principales sources de phytoestrogènes

Les principales isoflavones : biochanine A, daidzéine, formononétine, glycitéine et génistéine sont présentes dans le soja, les trèfles, les pois chiches, l'orge, le seigle, les arachides. On retrouve dans la réglisse, la glabrène et la glabridine, isoflavanes estrogéniques. Le houblon est également une source de nombreuses flavanones estrogéniques : naringénine, 8- et 6-prénylnaringénine, *iso*- et xanthohumol [274].

2.6.6.3. Activités des phytoestrogènes

Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré que dans les pays asiatiques, la prévalence de certains cancers est plus faible (consommateurs d'aliments à base de soja) que dans les pays occidentaux. Il apparaît que la consommation d'isoflavones de soja réduit le risque de cancer du sein. Les phytoestrogènes posséderaient une action bénéfique sur plusieurs autres types de cancers : de l'endomètre, de la prostate [265], du testicule, du colon, de la thyroïde et de la vessie [272]. Dans le même sens, les cellules impliquées dans le

remodelage osseux étant étroitement régulées par de nombreux facteurs hormonaux, les phytoestrogènes pourraient donc avoir un effet contre l'ostéoporos [275]. Néanmoins, ces effets bénéfiques sont à confirmer par d'autres études.

Les phytoestrogènes peuvent également se lier aux récepteurs nucléaires stéroïdiens comme ceux des androgènes et de la progestérone, ou agir sur d'autres fonctions nucléaires notamment sur l'inhibition de topo-isomérase II, ce qui expliquerait leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques, et sur l'inhibition de la néo-angiogénèse [271]. De plus, les phytoestrogènes peuvent agir sur le métabolisme des estrogènes, en bloquant par exemple certaines enzymes comme l'aromatase qui intervient dans la conversion des androgènes en estrogènes [265,271]. Ils peuvent également réduire la production des hormones thyroïdiennes par inhibition de la peroxydase thyroïdienne [271].

Les estrogènes ont naturellement un rôle athéroprotecteur, ainsi les phytoestrogènes permettraient de diminuer la formation de la plaque athéroscléreuse et auraient ainsi un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaire coronarienne [276]. Néanmoins, le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé.

Les récepteurs aux estrogènes étant largement présents dans le système nerveux central, il semble que les phytoestrogènes aient des effets sur les fonctions cognitives : un effet antidépresseur par inhibition de la recapture de la sérotonine, des perturbations de la fonction de reproduction en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire [272,277], une amélioration de la mémorisation et de la flexibilité mentale [278].

La génistéine et ses dérivés (isoflavonoïdes)

La génistéine induit les mêmes effets que l'oestradiol au niveau mammaire, des ovaires, de l'endomètre, de la prostate, du système vasculaire et du tissu osseux [272], mais dans certains tissus, la génistéine agit comme un antagoniste de l'oestradiol [272]. De plus, la génistéine peut agir sans se lier aux récepteurs ER, on parle alors d'effets non-génomiques, comme par exemple l'inhibition de tyrosine kinase.

La prénylation et l'hydroxylation des isoflavonoïdes sont souvent liées à un effet anti-estrogénique. Il a été démontré que la génistéine prénylée possédait une activité anti-estrogénique similaire à celle du 4-hydroxytamoxifène [279]. La prénylation en position 6 et 8, une hydroxylation de la chaîne 6-prényle et une substitution de type catéchol sont associées à une activité anti-estrogénique [229]. Au contraire, la cyclisation de la chaîne prénylée sur le cycle A et l'hydroxylation de l'unité 8-prényl entraînent une diminution de l'activité anti-estrogénique [229].

Au niveau de la remodelation osseuse, il semble que seule une prénylation en position 8 induise un effet bénéfique. En effet, la 8-prénylgénistéine et la 6, 8-diprénylgénistéine peuvent stimuler la croissance des cellules ostéoblastiques, la différenciation des ostéoblastes et la déposition minérale de la matrice extracellulaire. À l'inverse une prénylation en position 6 ne peut que supprimer la prolifération et la maturation des ostéoblastes, mais ne possède aucun effet sur les fonctions des cellules ostéoblastiques (différenciation cellulaire et minéralisation de la matrice extracellulaire) [279].

La naringénine et ses dérivés (flavanones)

La naringénine possède un effet anti-estrogénique par inhibition compétitive de la fixation aux récepteurs estrogéniques [273].

La 8-prénylnaringénine, extraite du houblon, apparaît comme l'un des meilleurs phytoestrogènes [280]. Ce composé est isolé du houblon dans des proportions équivalentes sous-forme de (*R*) et (*S*)-8-prénylnaringénine, ce qui indique que ce composé n'est pas formé d'une manière enzymatique [280]. Les deux énantiomères montrent la même activité *in vitro* et se lient de la même façon aux récepteurs ER α et ER β [280]. Il est intéressant de noter que certains de ces métabolites possèdent les mêmes activités (comme la 8-prénylapigénine), alors que d'autres ont des activités opposées [281]. Une prénylation de la naringénine en position 8 augmente l'effet estrogénique [282]. La plupart des dérivés de la naringénine prénylés en position 6 ne possèdent pas d'activité estrogénique, à l'exception de la 6-(1, 1-diméthylallyl)-naringénine [282-283].

Malgré de nombreuses études présentant les phytoestrogènes pour leurs potentiels thérapeutiques, les informations concernant la toxicité de ces molécules manquent. En effet, étant donné les résultats des études sur les traitements hormonaux substitutifs (surrisque de cancer du sein chez les femmes, augmentation du risque coronarien...), on peut s'interroger sur les effets à long terme de ces composés. Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'efficacité et l'inocuité des phytoestrogènes, en raison de:

- ✗ la complexité des mécanismes mis en jeu
- ✗ la difficulté à comparer les études (doses administrées, voies d'administration et la durée du traitement)
- ✗ la grande diversité des structures des phytoestrogènes
- ✗ leur fixation préférentiellement sur l'un ou l'autre des isoformes des récepteurs estrogéniques
- ✗ les effets parfois opposés en fonction des doses

- ✗ les nombreux effets non-génomiques

2.6.7. Activité sur le système cardio-vasculaire

Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation. Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes diminuent les ROS et agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et posséderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous [243]. Des pyranoisoflavones possèdent une activité vaso-relaxante et une activité sur la fonction érectile comparable à celle du sildénafil [229].

2.6.8. D'autres activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ne peuvent pas guérir le diabète parce que les types de cette maladie sont fondamentalement d'origine génétique et aucune drogue (seule) ne peut corriger une erreur innée. Cependant, les flavonoïdes peuvent améliorer quelques-unes des conséquences de diabète [284].

Certains flavonoïdes (la naringénine, la naringine, l'hespérétine et l'hespéridine) sont supposés apporter un intérêt contre l'obésité [285].

Les flavonoïdes sont en effet connus pour être des agents protecteurs contre la dégénérescence des neurones. Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson [286].

Une étude de **Murakamiet** ses collaborateurs sur l'activité antimalaria d'un flavonol glycosylé isolé de *Hydrangeae dulcis Folium* montre des bons résultats [287].

2.7. Étude chimique des flavonoïdes

Pour faire une investigation phytochimique qui consiste principalement en l'isolement et l'identification structurale de produits naturels à partir de végétaux, il est nécessaire de passer impérativement par les étapes suivantes :

- ✗ Récolte de la plante
- ✗ Extraction
- ✗ Séparation et purification

✧ Identification structurale des produits isolés

2.7.1. Récolte des plantes

Les espèces sélectionnées sont collectées dans leur habitat naturel. La détermination botanique des espèces est réalisée par des taxonomistes.

2.7.2. Extraction des flavonoïdes

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [9, 288]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont :

- ① **Macération** : répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol avec l'eau distillé).
- ② **Extraction** : L'extraction liquide-liquide ou LLE (Liquid-Liquid Extraction) est une opération fondamentale de transfert de matière de polarités différentes entre deux phases liquides non miscibles. Elle consiste à extraire une ou plusieurs molécules (les solutés) d'un milieu liquide (la solution) au contact d'un solvant dans lequel les solutés sont solubles. Le solvant qui contient alors les solutés est désigné sous le terme d'extrait, et la solution qui a perdu la majorité de ces mêmes constituants est appelée raffinat. Cette opération est fréquemment utilisée pour séparer d'un mélange liquide des constituants dont les polarités sont variables [289-290].

Pour que l'opération soit réalisable il est nécessaire :

- ✓ que les deux phases ne soient pas miscibles
- ✓ que leurs masses volumiques soient différentes
- ✓ qu'il n'existe pas de réactions chimiques entre les divers constituants du mélange

Cette technique est très utilisée dans les industries alimentaires, pharmaceutiques ainsi que dans les milieux de l'hydrométallurgie et de la pétrochimie. Elle a été utilisée au cours de notre travail pour tenter d'extraire des différentes phases.

Des solvants de polarité croissante sont utilisés tels que le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le n-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosylé.

- ③ Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

2.7.3. Méthodes de séparation et de purification

2.7.3.1. Généralités sur la chromatographie

C'est en 1906 que le terme de chromatographie (du grec **krôma**, couleur et **graphein**, écrire) est apparu suite à l'expérience du botaniste russe **Mikhaïl Semenovitch Tswett** qui sépara les pigments végétaux colorés d'épinard sur une colonne remplie de carbonate de calcium et d'alumine à l'aide d'éther de pétrole [291]. Il a alors observé la formation des bandes de couleurs différentes (vert, orange, jaune...) sur la colonne. Il a également défini les termes : chromatogramme, élution et rétention.

Les techniques chromatographiques telles qu'on les connaît aujourd'hui ont été développées en 1952 pour la chromatographie en phase gazeuse par **Martin** et **James** [292] et en 1967 pour la chromatographie liquide haute pression, qui s'appellera ensuite chromatographie liquide à haute performance (HPLC), avec les travaux de **Huber** et **Huzsman** [293].

2.7.3.2. Principe général de la chromatographie

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide [294].

Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles on peut citer:

- ☐ La chromatographie de partage : C'est une chromatographie liquide-liquide. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.
- ☐ La chromatographie d'exclusion : elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire ou filtration surgel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent plus lentement dans les pores du gel (séphadex).
- ☐ La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (gel de silice).
- ☐ La chromatographie d'adsorption en phase inverse: c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. C'est une

chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité (RP-HPLC).

2.7.3.3. Les différentes techniques chromatographiques

a) la chromatographie sur colonne (CC)

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes. L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients:

- ✗ de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- ✗ la durée de l'élution est généralement très grande
- ✗ la détection des composés exige une attention constante

b) la chromatographie préparative sur papier (CP)

Cette méthode est très ancienne mais intéressante car elle permet la séparation d'une grande quantité de produit et détache le maximum d'acides phénoliques [295]. Le support utilisé ici est le papier **Whatman** et les systèmes de solvants contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer la séparation et éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules [296].

c) La chromatographie sur couche mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption avec comme phase stationnaire une couche d'absorbant (gel de silice ou autres) étalée uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20, 10 x 10 ou 5 x 10 cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé [288].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'onde $\lambda = 254$ et 365 nm). Si nécessaire, les tâches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal (R_f).

d) La chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silice correspondantes aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. En utilisant diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés, on examine les bandes des constituants sous lumière UV ou on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat [297].

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

2.7.4. Identification structurale des flavonoïdes

Afin d'arriver à identifier les produits isolés, une série de méthodes est utilisée et appliquée en fonction de la nature de ces produits. Ainsi, pour les flavonoïdes, les valeurs des R_f dans des systèmes de solvants connus et la fluorescence du produit en question permettent d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément la suite des opérations.

Ces trois opérations sont appliquées d'une manière systématique pour ce genre de produits naturels avant même les analyses physiques proprement dites et qui sont par ordre d'utilisation, la spectrophotométrie UV-visible, la spectrométrie de masse et la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire.

2.7.4.1. Facteur de retardement (R_f)

Ce facteur est défini par l'équation suivante [298] :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Il existe une relation entre la structure flavonique et le R_f . Cette valeur ne peut pas être considérée comme une constante physique du corps, car elle est influencée par de nombreux facteurs tels que la qualité de la matière, la nature du solvant, la technique employée, la température [288, 299], ainsi que les substituants et leur position sur le squelette flavonique, tableau II.3.

Tableau II.3: Relation R_f -Structure flavonique.

Structure flavonique	R_f
Augmentation des groupes hydroxyls	<ul style="list-style-type: none"> • R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux.
Méthylation des hydroxyles	<ul style="list-style-type: none"> • R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
Glycosylation	<ul style="list-style-type: none"> • R_f augmente dans les systèmes de solvants aqueux et diminue dans les systèmes de solvants organiques.

2.7.4.2. La Fluorescence sous lumière de Wood

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [300].

Tableau II.4: Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

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

2.7.4.3. La spectrophotométrie UV-Visible

C'est une méthode utilisée pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanolique) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [301]. Cette technique permet la localisation des hydroxyles libres et de les positionner sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorptions par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol [302].

a) Le spectre UV-Visible des flavonoïdes dans le MeOH

Le spectre d'absorption UV-Visible des flavonoïdes en milieu méthanolique présente deux bandes d'absorptions principales: la bande I et la Bande II comme le montre la figure II.39.

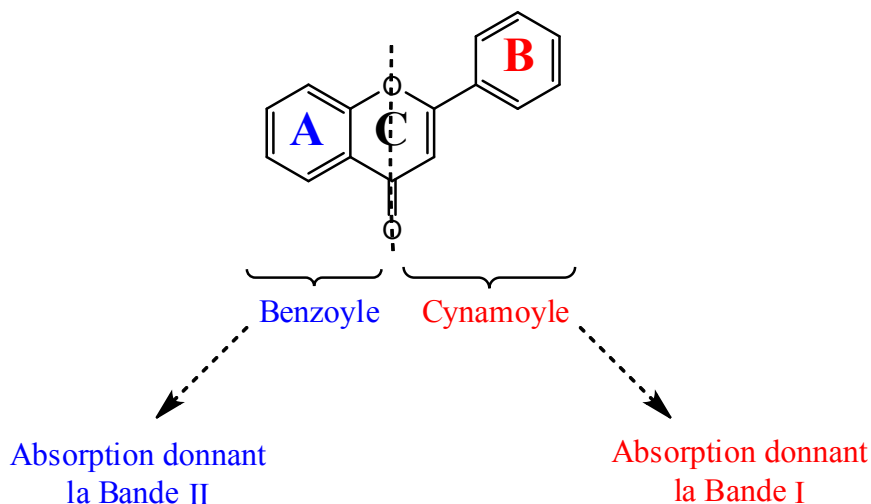


Figure II.39 : les deux bandes d'absorption dans les flavonoïdes

La bande I

Ayant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cynamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C₂-C₃) et le noyau B. Elle donne donc des renseignements sur la variation structurale du cycle B et l'hétérocycle C.

La bande II

Présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [297].

Le spectre méthanolique d'un isoflavonoïde est caractérisé par l'apparition de la bande I sous forme d'un épaulement due à l'absence de la conjugaison entre le groupement carbonyle et le noyau B [300]. Le tableau II.5 donne la relation entre le maximum d'absorption en UV et le type des flavonoïdes.

Tableau II.5 : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
flavonol	352-385	250-280
flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330 ep	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidine	465-560	270-280

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait 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 [297].

b) Addition des réactifs (la série spectrale UV)

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

Spectre en présence de NaOH:

Une base forte NaOH ou NaOMe, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. L'addition du NaOH indique le nombre et la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement les OH en positions 7, 4' et 3 par l'effet bathochrome de la bande I.

Spectre en présence de NaOAc

Une base faible (NaOAc) ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soient les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH et elle ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7. Ceci se traduit par le déplacement bathochrome de la bande II [303].

Spectre en présence de NaOAc + H₃BO₃

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H₃BO₃) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence du système orthodihydroxyle sur le

cycle B (C-3', C-4') ou sur le cycle A (C-6, C-7 ou C-7, C-8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [300].

Spectre en présence d' AlCl_3 et AlCl_3+HCl

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl_3) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles orthosubstitués du flavonoïde et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl_3 et les groupes ortho dihydroxyyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [304], par contre, ceux formés entre AlCl_3 et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables [305-306]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition d' AlCl_3 et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH.

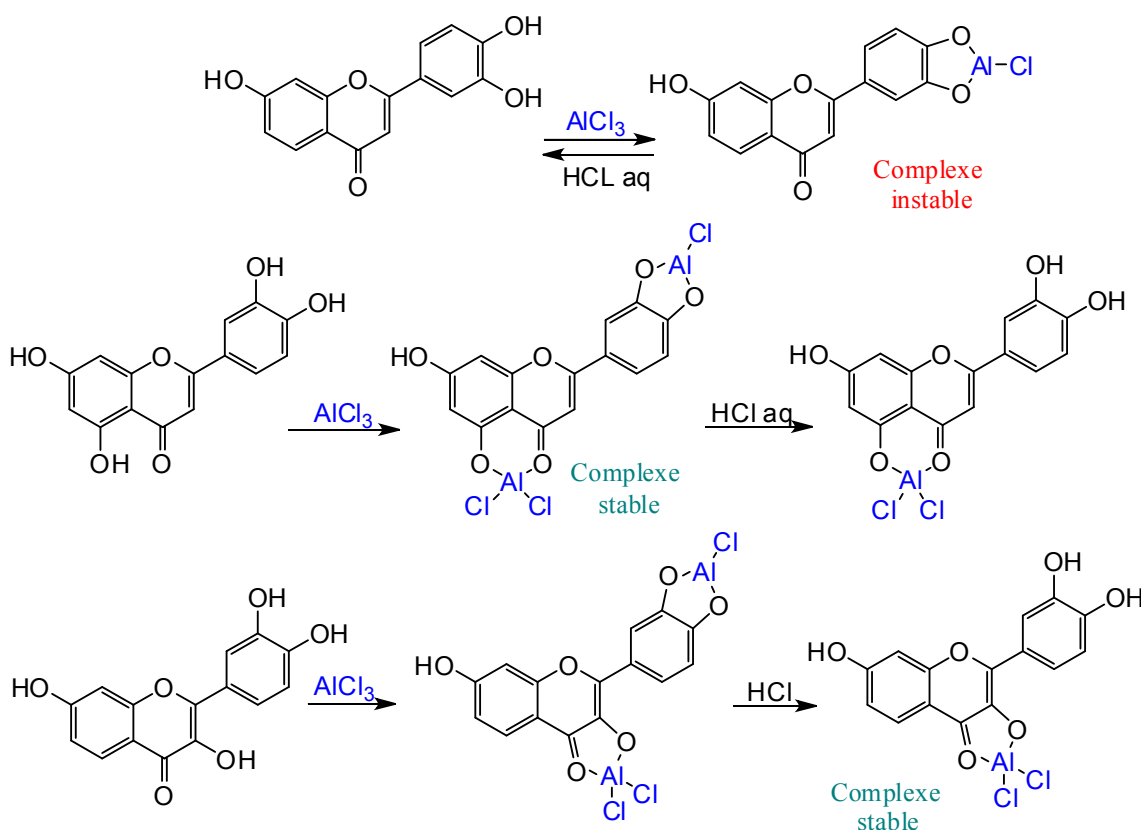


Figure II.40 : Formation des différents types de complexes après addition d' AlCl_3 et en présence de HCl

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- L'intensité ne diminue pas/ MeOH.		
	2- L'intensité diminue/ MeOH.		4'-OR; 3-OH
	- L'intensité diminue avec le temps, 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-OCH ₃
(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

2.7.4.4. L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes *O*-glycosylés, elle renseigne sur la nature du sucre qui peut être étudiée une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par Co-Chromatographie avec des solutions authentiques.

Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

2.7.4.5. La Spectrométrie de masse

a) Historique

La découverte de la spectrométrie de masse remonte au début du XX^{ème} siècle [307]. Après les expériences de Goldstein qui en 1886 découvre les ions positifs, Joseph John Thomson (Prix Nobel de Physique en 1906 pour ses travaux sur la conduction de l'électricité par les gaz) obtient en 1912 les premiers spectres de masse de gaz (N₂, O₂, CO...). Il observe ensuite des ions négatifs, des ions multichargés et des ions métastables [308]. En 1918, Dempster construit un spectromètre de masse à secteur magnétique, mais il faut attendre 1942 pour voir la commercialisation du premier appareil.

Très vite se développent de nouvelles techniques d'ionisation (SIMS en 1949, ionisation électronique en couplage GC en 1957, ionisation chimique en 1967, thermospray en 1980, FAB en 1981, MALDI en 1985, ESI en 1988...) et de détection (TOF en 1948, ICR en 1949, filtre quadripolaire en 1953). Le premier piège à ions est commercialisé en 1984) [308-309]. Depuis sa création et jusqu'en 1942, la spectrométrie de masse a été essentiellement utilisée dans le cadre de l'analyse élémentaire, puis elle a servi à l'analyse de composés organiques jusque vers 1980. Depuis plus de 25 ans, elle s'est adaptée aux exigences des chimistes et des biologistes en s'orientant vers l'analyse de mélanges de plus en plus complexes et de forte polarité ainsi qu'en permettant la détermination de masses moléculaires de plus en plus élevées [310].

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de caractériser des analyses. Par la mesure des rapports masse sur charge (m/z) des molécules ionisées et de leurs produits de fragmentation. La spectrométrie de masse peut apporter des informations relatives à la masse moléculaire d'un composé et des informations structurales. Elle peut également permettre une mesure de la quantité.

b) Principe générale

Tous les spectromètres de masse possèdent trois éléments en commun : une source, un analyseur et un détecteur [311-313]. Les molécules sont introduites dans la source où sont formés les ions. Ces derniers sont guidés vers l'analyseur où ils sont séparés, puis vers le détecteur. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un logiciel qui permet également d'assurer le pilotage du spectromètre.

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux A et B [314]. Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers modes d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la FAB, et l'électro-spray.

2.7.4.6. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN est indiscutablement l'une des méthodes d'analyse la plus importante utilisée aujourd'hui [304]. La RMN trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques [315]. En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (proton) ^1H et le carbone 13, ^{13}C . Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

a) RMN ^1H

La réalisation d'un spectre RMN- ^1H est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier.

En RMN- ^1H , trois informations sont importantes :

 Le déplacement chimique (δ)

C'est une fréquence exprimable en Hertz (Hz), qui est en pratique toujours présentée sous la forme d'une échelle de ppm (rapport de la fréquence de résonance sur celle du champ magnétique B_0), qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil. Elle donne une indication sur la nature des groupements chimiques présents [316].

 L'intégration

L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. La prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule (cf. spectrométrie de masse).

 Le couplage

Chaque proton est couplé avec ses voisins immédiats non équivalents dans la molécule. Ceci se traduit par un changement de forme des signaux observés. Le signal d'un proton indique le nombre de protons avec lesquels il est couplé ($n+1$ raies pour n voisins) et

peut même donner des renseignements d'ordre structural, via l'écartement de ces raies, mesuré en Hz et appelé constante de couplage (J).

b) RMN ^{13}C

L'isotope ^{13}C ne représente que 1% des atomes de carbone existant. La sensibilité de cette expérience n'est donc pas excellente, ce qui oblige à multiplier le nombre des expériences (scans) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité. En revanche, la résolution obtenue est très supérieure à celle des spectres du RMN- ^1H , pour un même appareil : les déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 pour le proton.


Il existe des couplages en RMN- ^{13}C , mais on utilise aujourd'hui majoritairement des expériences dites « ^1H -découplées », qui permet un gain appréciable de sensibilité.

Plusieurs expériences permettent, au moyen de séquences d'impulsions particulières de conserver une partie des informations qu'aurait apportée le couplage ^1H - ^{13}C , tout en bénéficiant du gain de sensibilité procuré par le découplage. Il s'agit d'expériences de spin-écho J -modulé (APT : Attached Proton Test encore appelé $Jmod$) pouvant impliquer un transfert de polarisation (DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer). Nous avons toujours utilisé le $Jmod$ pour ce travail. Il permet la différenciation dans le spectre des pics correspondant à des carbones portant un nombre pair d'hydrogènes (secondaires ou quaternaires) de ceux correspondant à des carbones portant un nombre impair d'hydrogènes (primaires ou tertiaires).

c) RMN bidimensionnelle

Certaines techniques permettent la visualisation, sous forme de carte, des corrélations existant entre différents signaux, qu'ils appartiennent au même spectre ou non. Des tâches, qui sont en fait une vue « de dessus », sous la forme de courbes de niveau, des pics de corrélation, matérialisent l'existence d'un lien quelconque entre deux atomes (liaison chimique, proximité dans l'espace...). Les spectres monodimensionnels concernés peuvent, pour une lecture plus facile, être reportés sur les axes des abscisses et des ordonnées.

Plusieurs expériences ont été utilisées [317-318] :

 **COSY (CORrelation SpectroscopY)** : visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). L'intérêt n'est pas énorme a priori par rapport au simple spectre du proton, mais il apporte un gain certain de clarté et permet de distinguer différents signaux dans un massif pour les attribuer précisément.

- ❏ **TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)** : indique, en plus des voisins immédiats, les voisins plus éloignés ce qui permet de reconstituer plus facilement l'enchaînement des protons sur le squelette carboné.
- ❏ **ROESY (Rotational nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)** : met en évidence les interactions dipolaires de deux atomes d'hydrogène. C'est donc une technique intéressante en matière de stéréochimie.
- ❏ **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)** : indique quel proton est directement lié à quel carbone.
- ❏ **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)** : montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situés à plusieurs liaisons de distance (typiquement trois). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

Références bibliographiques

- [1] Seghiri, R.
Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine. **2007**.
- [2] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E.
Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **2001**. 161:839–851.
- [3] Rao, SR, Ravinshankar GA.
Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **2002**. 20:101–153.
- [4] Teisseire PJ.
Chimie des substances odorantes. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris. **1991**. 9:25–30, 66–69.
- [5] Berger S, Sicker D.
Classics in spectroscopy. Isolation and Structure Elucidation of Natural Products. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim. **2009**.
- [6] Jens AP.
Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Sys. & eco*. **2000**. 28:229–253.
- [7] Itokawa H, Suto K, Takeyo K.
Studies on a novel pcoumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from *Patchouli* (Labiatae). *Chem. Pharm. Bull*. **1981**. 29:254–256.
- [8] Soldermann N.
« Etude et développement du processus Tandem réaction de Diels Alder/réarrangement de Ireland-Claisen: Application à la synthèse de la Juvabione », Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel, juin **2002**.
- [9] Bruneton J.
Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales, **3^{ème} Ed**. *Tec & Doc, Paris*. **1999**.
- [10] Penggely A.
The Constituents of Medicinal Plants. An introduction to the chemistry & Therapeutics of Herbal Medicines. Ed Sunflowers herbals, **2nd Ed**.
- [11] Nicolaou KC, Sorensen EJ.
Classics in Total Synthesis. Targets, Strategies, Methods. *VCH Publishers, Inc*. New York (USA). **1996**.
- [12] Paul MD.
Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. **2nd Ed**. *Jhon Wiley & Sons, Ltd*. New York (USA). **2002**.
- [13] Louis S.
Diversité Structurale et d'Activité Biologique des Albumines Entomotoxiques de type 1b des Graines de Légumineuses », Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Février **2004**.
- [14] Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, Beilharz MW.
Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Cancer Chemother Pharmacol*. **2010**. 66:1095–1102.
- [15] Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF.

- Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2010.** 65:877–888.
- [16] Yeruva L, Hall C, Elegbede JA, Carper SW.
Perillyl alcohol and methyl jasmonate sensitize cancer cells to cisplatin. *Anticancer Drugs.* **2010.** 21:1–9.
- [17] Zhou W, Fukumoto S, Yokogoshi H.
Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. *Nutr. Neurosci.* **2009.** 12:57–64.
- [18] Murali R, Saravanan R.
Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Preven. Nutri.* **2012.** 2:269–275.
- [19] Fisher K, Phillips C.
The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* **2009.** 106:1343–1349.
- [20] Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N.
The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008.** 47:174–179.
- [21] Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J.
The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS. Microbiol. Lett.* **2004.** 237:325–333.
- [22] Wang JX, Tang W, Zhou R, Wan J, Shi LP, Zhang Y, Yang IYF, Li Y, Zuo JP.
The new water-soluble artemisinin derivative SM905 ameliorates collagen-induced arthritis by suppression of inflammatory and Th17 responses. *Br. J. Pharmacol.* **2008.** 153:1303–1310.
- [23] Zhang S, Won YK, Ong CN, Shen HM.
Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents.* **2005.** 5:239–149.
- [24] Christensen SB, Skytte DM, Denmeade SR, Dionne C, Møller JV, Nissen P, Isaacs JT.
A Trojan Horse in Drug Development: Targeting of *Thapsigargin* Towards Prostate Cancer Cells. *Anti-cancer Agents Med Chem.* **2009.** 9:276–294.
- [25] Picman AK.
Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* **1986.** 14:255–281.
- [26] Kupchan SM, Giacobbe TJ, Krull IS, Thomas AM, Eakin MA, Fessier DC.
Tumor inhibitors. LVII. Reaction of endocyclic α , β -unsaturated γ -lactones with thiols. *J. Org. Chem.* **1970.** 35:3539–3543.
- [27] Zhang HJ, Nguyen VH, Nguyen MC, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HH, Tan GT.
Sesquiterpenes and Butenolides, Natural Anti-HIV Constituents from *Litsea verticillata*. *Planta Med.* **2005.** 71:452–457.
- [28] Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, Duraipandian V.
Normoglycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem.-Biol. Interact.* **2009.** 179:329–334.
- [29] Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JA, de Souza W, Nakamura CV.
Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2005.** 49:176–182.
- [30] Hwang DR, Wu YS, Chang CW, Lien TW, Chen WC, Tan UK, Hsu JTA, Hsieh HP.
Synthesis and anti-viral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg. Med. Chem.* **2006.** 14:83–91.
- [31] Boulanger D, Brouillette E, Jaspas F, Malouin F, Mainil J, Bureau F, Lekeux P.

- Helena lin reduces *Staphylococcus aureus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Vet Microbiol.* **2007**. 119:330–338.
- [32] Fraga B.
Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **1998**. 15:73–92.
- [33] Fischer NH, Olivier EJ, Fischer HD.
The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1979**. 38:47–320.
- [34] Holub M, Buděšínský M.
Sesquiterpene lactones of the umbelliferae. *Phytochemistry.* **1986**. 25:2015–2026.
- [35] Drew DP, Krichau N, Reichwald K, Simonsen HT.
Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2009**. 8:581–599.
- [36] Bruneton J.
« Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». **2nd Ed** université de Paris- sud, France. **1993**, 389–617.
- [37] Ogbourne SM, Suhrbier A, Jones B, Cozzi S-J, Boyle GM, Morris M, McAlpine D, Johns J, Scott TM, Sutherland KP, Gardner JM, Le TTT, Lenarczyk A, Aylward JH, Parsons PG.
Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. *Cancer Res.* **2004**. 64:2833–2839.
- [38] Challacombe JM, Suhrbier A, Parsons PG, Jones B, Hampson P, Kavanagh D, Rainger GE, Morris M, Lord JM, Le TTT, Hoang-Le D, Ogbourne SM.
Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. *J. Immunol.* **2006**. 177:8123–8132.
- [39] Li L, Shukla S, Lee A, Garfield SH, Maloney DJ, Ambudkar SV, Yuspa SH.
The skin cancer chemotherapeutic agent ingenol-3-angelate (PEP005) is a substrate for the epidermal multidrug transporter (ABCB1) and targets tumor vasculature. *Cancer Res.* **2010**. 70:4509–4519.
- [40] Anderson L, Schmieder GJ, Werschler WP, Tschén EH, Ling MR, Stough DB, Katsamas J.
Randomized, double-blind, double-dummy, vehicle-controlled study of ingenol mebutate gel 0.025% and 0.05% for actinic keratosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2009**. 60:934–943.
- [41] Bodiwala HS, Sabde S, Mitra D, Bhutani KK, Singh IP.
Anti-HIV diterpenes from *Coleus forskohlii*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**. 4:1173–1175.
- [42] Schumacher M, Juncker T, Schnekenburger M, Gaascht F, Diederich M.
Natural compounds as inflammation inhibitors. *Genes Nutr.* **2011**. 6:89–92.
- [43] Villa FA, Gerwick L.
Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2010**. 32:228–237.
- [44] Sithranga Boopathy N, Kathiresan K.
Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *J. Oncol.* **2010**. 214186:1-18.
- [45] Baquero F, Coque TM, De La Cruz F.
Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**. 55:3649–3660.
- [46] Garcia A, Bocanegra-Garcia V, Palma-Nicolas JP, Rivera G.
Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**. 49:1–23.
- [47] Stowe SD, Richards JJ, Tucker AT, Thompson R, Melander C, Cavanagh J.
Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. *Mar. Drugs.* **2011**. 9:2010–2035.
- [48] Fu L, Zhang S, Li N, Wang J, Zhao M, Sakai J, Hasegawa T, Mitsui T, Kataoka T, Oka S, Kiuchi M, Hirose K, Ando M.

- Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J. Nat. Prod.* **2005**. 68:198–206.
- [49] Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD.
Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*. **2003**. 63:81–88.
- [50] Yuan WH, Yi YH, Xue M, Zhang HW, La MP.
Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chin. J. Nat. Med.* **2008**. 6:105–108.
- [51] Kuo RY, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee KH.
Plant derived triterpenes and analogues as antitumor and antiHIV agents. *Nat. Prod. Rep.* **2009**. 26:1321–1344.
- [52] Saxena BB, Zhu L, Hao M, Kisilis E, Katdare M, Oktem O, Bomshteyn A, Rathnam P.
Boc-lysinate-betulonic acid: a potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**. 14:6349–6358.
- [53] Wen Y, Sun H, Liu J, Wu G, Zhang L, Wu X, Ni P.
Pentacyclic triterpenes. Part 1. The first example of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15:4944–4948.
- [54] De Andrade SF, Comunello E, Noldin VF, Delle Monache F, Cechinel Filho V, Niero R.
Antiulcerogenic activity of fractions and 3, 15-dioxo-21a-hydroxy-friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Arch. Pharm. Res.* **2008**. 31:41–46.
- [55] Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Seia MN.
Anticariogenic activity of licorine and glycyrrhizine I. Inhibition of *in vitro* plaque formation by *Streptococcus mutans*. *J. Pharm. Sc.* **2006**. 74:79–81.
- [56] Liu J.
Pharmacology of oleanolic and ursolic acids. *J. Ethnopharma.* **1995**. 49:57–68.
- [57] Lee MK, Kim YC.
Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J. Nat. Prod.* **2001**. 64:328–331.
- [58] Danelli MGM, Soares DC, Abreu HS, Pecanha LMT, Saraiva EM.
Leishmanicidal effect of LLD-3, a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry*. **2009**. 70:608–614.
- [59] Tapondjou LA, Lontsi D, Sondengam BL, Choi J, Lee KT, Jung HJ.
In vivo anti-conceptive and anti-inflammatory effects of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2003**. 26:143–146.
- [60] D'Abrosca B, Florentino A, Monaco P, Pacifico S.
Radical-scavenging activities of new hydroxylated ursane triterpenes from cv. *Annurca apples*. *Chem. Biodiv.* **2005**. 2:953–958.
- [61] Willstätter R.
“On plant pigments” in: “Nobel Lectures, Chemistry 1901–1921”, Elsevier, Amsterdam, **1966**.
- [62] Wackenroder, H.G.F.
“De Anthelminthicis regni vegetabilis respectu inprimis habito cum ad plantas a quibus ea desumenda tum ad partes constituentes nominatim eas quibus earum vires adscribendae sunt” [About the vermifuges of the realm of the plants, in particular with respect to the plants from which they are derived and then to their constituent parts, notably those to which their powers are attributed] *Price pamphlet of June 4, 1826*, University of Göttingen.
- [63] Jensen SR, Schripsema J.

- Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, L & Albert V. Eds. Cambridge University Press. **2002**. 573–584.
- [64] Evan WC. Trease and Evan. Pharmacognosy. **15^{ème} Ed.** W.B. Sanders Company Limited. **2002**.
- [65] Angiosperm Phylogeny Group III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**. 161:105–121.
- [66] Dewick PM. Medicinal natural products A biosynthetic approach. **2^{ème} Ed.** wiley, **2002**.
- [67] Bianco A. The chemistry of iridoids in studies in natural products chemistry. Attaur-Rahman Ed. Elsevier Science Publishers. **1990**, 7. 329. Amsterdam.
- [68] Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J. Ethnopharma.* **2000**. 71:1–21.
- [69] Wei X, Xie H, Ge X, Zhang F. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. *Phytochemistry.* **2000**. 53:837–840.
- [70] Otsuka H. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* **1993**. 33:617–622.
- [71] Taskova RM, Gotfredsen CH, Jensen SR. Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (Plantaginaceae). *Phytochemistry.* **2005**. 66:1440–1447.
- [72] Tomassini L, Foddai S, Nicoletti M, Cometa MF, Palazzino G, Galeffi C. Iridoid glucosides from *Viburnum ayavacense*. *Phytochemistry.* **1997**. 46:901–905.
- [73] Chen G, Wei SH, Yu CY. Secoiridoids from the roots of *Gentiana straminea*. *Biochem. System. & Eco.* **2009**. 37:766–771.
- [74] Kamoldinov KhSh, Eshbakova KA, Bobakulov KhM, Abdullaev ND. A new seco-iridoid glycoside from the aerial part of *Fraxinus raibocarpa*. *Chem. Nat. Comp.* **2012**. 48:51–53.
- [75] Jensen SR, Franzyk H, Wallander E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry.* **2002**. 60:213–231.
- [76] Song Y, Li SL, Wu MH, Li HJ, Li P. Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of *Lonicera* species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector. *Analytice Chimica Acta.* **2006**. 564:211–218.
- [77] Nangia A, Prasuna G. Studies on Horner-Wadsworth-Emmons reaction in base sensitive ketones: Synthesis of (–)-mitsugashiwalactone and formal synthesis of (+)-iridomyrmecin, (–)-isoiridomyrmecin and (+)-teucriumlactone. *Tetrahedron.* **1996**. 52:3435–3450.
- [78] Vajda FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J. Clin. Neurosci.* **2002**. 9:4–8.
- [79] Albright TD, Jessell TM, Kandel ER, Poster MI. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell.* **2000**. 18:1–55.
- [80] Heintz N, Zoghbi HY. Insights from mouse models into the molecular basis of neurodegeneration. *Annu. Rev. Physiol.*, **2000**. 62:779–802.

- [81] Li DQ, Bao YM, Zhao JJ, Liu CP, Liu Y, An LJ.
Neuroprotective properties of catalpol in transient global cerebral ischemia in gerbils: dose-response, therapeutic time-window and long-term efficacy. *Brain Res.* **2004.** 1029:179–185.
- [82] Li DQ, Duan YL, Bao YM, Liu CP, Liu Y, An LJ.
Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils. *Neurosci. Res.* **2004.** 50:169.
- [83] Jiang B, Liu JH, Bao YM, An LJ.
Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome C release and inactivating of caspase cascade. *Toxicol.* **2004.** 43:53–59.
- [84] Li DQ, Li Y, Liu Y, Bao YM, Hu B, An LJ.
Catalpol prevents the loss of CA1 hippocampal neurons and reduces working errors in gerbils after ischemia-reperfusion injury. *Toxicol.* **2005.** 15:845.
- [85] Tian YY, An LJ, Jiang L, Duan YL, Chen J, Jiang B.
Catalpol protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in mesencephalic neuron-glia cultures. *Life Sci.* **2006.** 80:193–199.
- [86] Li DQ, Bao YM, Li Y, Wang CF, Liu Y, An LJ.
Catalpol modulates the expressions of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury. *Brain Res.* **2006.** 1115:179–185.
- [87] Tian YY, Jiang B, An LJ, Bao YM.
Neuroprotective effect of catalpol against MPP⁽⁺⁾-induced oxidative stress in mesencephalic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **2007.** 568:142–148.
- [88] Cragg GM, Newman DJ.
Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.* **1999.** 17:153–163.
- [89] Wang CJ, Wang SW, Lin JK.
Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Lett.* **1991.** 60:95–102.
- [90] Kang JJ, Wang HW, Liu TY, Chen YC, Ueng TH.
Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Food Chem. Toxicol.* **1997.** 35:957–965.
- [91] Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Satoh S, Chiba A, Sekihashi K, Miura A, Yasagahira N, Sasaki Y.F.
Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mut. Res.* **1997.** 388:7–20.
- [92] Koo HJ, Lee S, Shin KH, Kim BC, Lim CJ, Park E.H.
Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Planta Med.* **2004.** 70:467–469.
- [94] Gálvez M, Martín-Cordero C, Ayuso MJ.
Iridoids as DNA topoisomerase I poisons. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005.** 20:389–392.
- [95] Umemura K, Yanase K, Suzuki M, Okutani K, Yamori T, Andoh T.
Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* **2003.** 66:481–487.
- [96] Willmore, E.; Errington, F.; Tilby, M.J.; Austin, C.A.
Formation and longevity of idarubicin-induced DNA topoisomerase II cleavable complexes in K562 human leukaemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **2002.** 63:1807–1815.
- [97] Akao T, Kobashi K, Aburada M.
Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biol. Pharm. Bull.* **1994.** 17:1573–1576.

- [98] Kupeli E, Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E.
Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *J. Ethnopharma.* **2007.** 110:444–450.
- [99] Jeong HJ, Koo HN, Na HJ, Kim MS, Hong SH, Eom JW, Kim KS, Shin TY, Him HM.
Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. *Cytokine.* **2002.** 18:252–259.
- [100] Recio MC, Giner RM, Manez S, Rios JL.
Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.* **1994.** 60:232–234.
- [101] Harput US, Saracoglu I, Inoue M, Ogihara Y.
Anti-inflammatory and cytotoxic activities of five *Veronica species.* *Biol. Pharm. Bull.* **2002.** 25:483–486.
- [102] Su B, Zhu Q, Jia Z.
Aquaticol, a novel bis-sesquiterpene from *Veronica anagallis-aquatica.* *Tetrahedron Lett.* **1999.** 40:357–358.
- [103] Kupeli E, Harput US, Varel M, Yesilada E, Saracoglu I.
Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. *J. Ethnopharma.* **2005.** 102:170–176.
- [104] Chander R, Kapoor NK, Dhawan BN.
Picroliv, picroside-I and kutkoside from *Picrorhiza kurrooa* are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **1992.** 44:180.
- [105] Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszeld K, Kladna A.
Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence.* **2005.** 20:81–89.
- [106] Oh H, Ko EK, Kim DH, Jang KK, Park SE, Lee HS, Kim YC.
Secoiridoid glucosides with free radical scavenging activity from the leaves of *Syringa dilatata.* *Phytother. Res.* **2003.** 17:417–419.
- [107] Wang H, Wu FH, Xiong F, Wu JJ, Zhang LY, Ye WC, Li P, Zhao SX.
Iridoids from *Neopicrorhiza scrophulariiflora* and their hepatoprotective activities *in vitro.* *Chem. Pharm. Bull.* **2006.** 54:1144–1149.
- [108] Sticker O.
In New natural products and plant drugs with pharmacological, biological, and therapeutic activity. Wagner, H.; Wolff, P. Springer-Verlag: Berlin, 1977.
- [109] Ishiguro K, Yamaki M, Takagi S.
Studies on iridoid-related compounds, II. The structure and antimicrobial activity of aglucones of galio-side and gardenoside. *J. Nat. Prod.* **1983.** 46:532–536.
- [110] Hamburger MO, Cordell GA, Ruangrunsi N.
Traditional medicinal plants of Thailand. XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra.* *J. Ethnopharma.* **1991.** 33:289–292.
- [111] Davini E, Javarone C, Trogolo C, Aureli P, Pisolini B.
The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry.* **1986.** 25:2420.
- [112] Kumarasamy Y, Nahar L, Sarker SD.
Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea.* *Fitoterapia.* **2003.** 74:151–154.
- [113] Horn MM, Drewes SE, Brown NJ, Munro OQ, Meyer JJ, Mathekga AD.
Transformation of naturally-occurring 1,9-*trans*-9,5-*cis* sweroside to all *trans* sweroside during acetylation of sweroside aglycone. *Phytochemistry.* **2001.** 57:51–56.

- [114] Dai JQ, Liu ZL, Yang L.
Non-glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica*. *Phytochemistry*. **2002**. 59:537–542.
- [115] Gupta P, Bajpai SK, Chandra K, Singh KL, Tandon JS.
Antiviral profile of *Nyctanthes arbortristis* L. against encephalitis causing viruses. *Indian J. Exp. Biol.* **2005**. 43:1156–1160.
- [116] Chen JL, Blanc P, Stoddart CA, Bogan M, Rozhon EJ, Parkinson N, Ye Z, Cooper R, Balick M, Nanakorn W, Ker-nan MR.
New iridoids from the medicinal plant *Barleria prionitis* with potent activity against respiratory syncytial virus. *J. Nat. Prod.* **1998**. 61:1295–1297.
- [117] Castillo D, Arevalo J, Herrera F, Ruiz C, Rojas R, Rengifo E, Vaisberg A, Lock O, Lemesre JL, Gornitzka H, Sauvain M.
Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J. Ethnopharma.* **2007**. 112:410–414.
- [118] Montero-Torres A, Vega MC, Marrero-Ponce Y, Rolon M, Gomez-Barrio A, Escario JA, Aran VJ, Martinez-Fernandez AR, Meneses-Marcel A.
A novel non-stochastic quadratic fingerprints-based approach for the ‘in silico’ discovery of new antitrypanosomal compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**. 13:6264–6275.
- [119] Covas MI.
Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* **2007**. 55:175–186.
- [120] Wahle KW, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL.
Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids*. **2004**. 39:1223–1231.
- [121] Hansen K, Adsersen A, Brøgger Christensen S, Rosendal Jensen S, Nyman U, Wagner Smitt U.
Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine*. **1996**. 2:319–325.
- [122] Pennacchio M, Syah YM, Ghisalberti EL, Alexander E.
Cardioactive compounds from *Eremophila* species. *J. Ethnopharma.* **1996**. 53:21–27.
- [123] Pennacchio M, Syah YM, Ghisalberti EL, Alexander E.
Cardioactive iridoid glycosides from *Eremophila* species. *Phytomedicine*. **1997**. 4:325.
- [124] Trovato, A.; Forestieri, A.M.; Iauk, L.; Barbera, R.; Monteforte, M.T.; Galati, M.E.
Hypoglycemic activity of different extracts of *Olea europea* L. in rats. *Plant. Med. Phytother.* **1993**. 26:300–308.
- [125] Al-Azzawie HF, Alhamdani MS.
Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* **2006**. 78:1371–1377.
- [126] Oztürk N, Norkmaz S, Oztürk Y, Baser KH.
Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Med.* **2006**. 72:289–294.
- [127] Takeda S, Endo T, Aburada M.
Pharmacological studies on iridoid compounds. II. The choleric mechanism of iridoid compounds. *J. Pharmacobiodyn.* **1980**. 3:485–492.
- [128] Ma SC, He ZD, Deng XL, But PP, Ooi VE, Xu HX, Lee SH, Lee SF.
In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**. 49:1471–1473.
- [129] Shoda J, Miura T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y.

- Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology*. **2004**. 39:167.
- [130] Oh SR, Lee MY, Ahn K, Park BY, Kwon OK, Joung H, Lee J, Kim DY, Lee S, Kim JH, Lee HK.
Suppressive effect of verproside isolated from *Pseudolysimachion longifolium* on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int. Immunopharmacol.* **2006**. 6:978–986.
- [131] Toriizuka K, Kamiki TH, Ohmura NY, Fujii M, Hori Y, Fukumura M, Hirai Y, Isoda S, Nemoto Y, Ida Y.
Anxiolytic effect of *Gardeniae Fructus*-extract containing active ingredient from Kamishoyosan, a Japanese traditional Kampo medicine. *Life Sci.* **2005**. 77:3010–3020.
- [132] Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW.
Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer Letter.* **2007**. 257:216–226.
- [133] Salvador JAR, Carvalho JFS, Neves MAC, Silvestre SM, Leitão AJ, Silva MMC, Sá e Melo ML.
Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2013**. 30:324–374.
- [134] Park SK, Hwang YS, Park KK, Park HJ, Seo JY, Chung WY.
Kalopanaxsaponin A inhibits PMA-induced invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 via PI3K/Akt- and PKCdelta-mediated signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* **2009**. 30:1225–1233.
- [135] Zhao YY, Chao X, Zhang YM, Lin R-C, Sun W-J.
Cytotoxic steroids from *Polyporus umbellatus*. *Planta Med.* **2010**. 76:1755–1758.
- [136] Veličković AS, Ristić MS, Veličković DT, Ilić SN, Mitić ND.
The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. *J. Serb. Chem. Soc.* **2003**. 68:435–445.
- [137] Cho JY, Baik KU, Jung JH, Park MH.
In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, sesquiterpene lactones, from *Saussura lappa*. *Pharmacology.* **2000**. 398:399–407.
- [138] Li DW, Hyun JE, Jeong CS, Kim YS, Lee EB.
Antiinflammatory activity of α -hederin methyl ester from the alkaline hydrolysate of the butanol fraction of *Kalopanax pictus* bark extract. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**. 26:429–433.
- [139] Chung HS.
Guaianolide Sesquiterpene Lactone from *Ixeris sonchifolia* Hance with Cytotoxicity in Cultured Human Stomach and Colon Cancer Cell Lines. *Food Sci. Biotech.* **2001**. 10:433–436.
- [140] Zhou XQ, Bi ZM, Li P, Tang D, Cai HX.
A new iridoid glycoside from *Gardenia jasminoides*. *Chinese Chemical Letters.* **2007**. 18:1221–1223.
- [141] Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Tshikawa H, Haraguchi H.
Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica.* **1996**. 62:427–430.
- [142] Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y.
Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**. 33:1725–1728.
- [143] Duval C, Duval R.
Dictionnaire de la Chimie et de ses Applications. Edition. *Tec & Doc Lavoisier*, Paris. **1978**.
- [144] Pal-Pađl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Varadé J, Villa AM, Sanz J, Brophy JJ.

- Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain, *J. Chromatogr. A.* **2005**. 1074:235–239.
- [145] Iwashina T.
The Structure and Distribution of the flavonoids in Plants. *J. Plant Res.* **2000**. 113:287–299.
- [146] Williams CA, Grayer RJ.
Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**. 21:539–573.
- [147] Paris M, Hurabielle M.
Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome **1**. **1981**, 82.
- [148] Guignard JL.
Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants en pharmacie. **1974**, 165.
- [149] Harborne JB.
The flavonoids, Advances in research since 1980. *Chapman & Hall.* **1988**. London.
- [150] Aliouche L, Zater H, Zama D, Bentamene A, Seghiri R, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F.
Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. *Chem. Nat. Compd.* **2007**. 43:618–619.
- [151] Sahu NP, Achari B, Banerjee S.
7, 3'-Dihydroxy-4-methoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry.* **1998**. 49:1425–1426.
- [152] Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J.
Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* **1993**. 45:13–19.
- [153] Agrawal PK.
Carbon-13 NMR of flavonoids. *Amsterdam: Elsevier.* **1989**. 152–153.
- [154] Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL.
Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. *Fitoterapia.* **2010**. 81:998–1002.
- [155] Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K.
Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm. Behav.* **2003**. 44:140–145.
- [156] Deodhar M, Black DSC, Kumar N.
Acid catalyzed stereoselective rearrangement and dimerization of flavones: synthesis of dependensin. *Tetrahedron.* **2007**. 63:5227–5235.
- [157] Bystrom LM, Lewis BA, Brown DL, Rodriguez E, Obendorf RL.
Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chem.* **2008**. 111:1017–1024.
- [158] Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang Y-C, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL.
Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from *Tart Cherries*. *J. Nat. Prod.* **1999**. 62:294–296.
- [159] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.
Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. nutr. Biochem.* **2002**. 13:572–584.
- [160] Yamamoto K, Kakegawa H, Ueda H, Matsumoto H, Sudo T, Miki T, Satoh T.
Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. *Planta Med.* **1992**. 58:389–393.
- [161] Abu N, Ho WY, Yeap SK, Akhtar MN, Abdullah MP, Omar AR, Alitheen NB.
The flavokawains: uprising medicinal chalcones. *Cancer Cell International.* **2013**. 13:102–108.
- [162] Nenadis N, Sigalas MP.

- A DFT study on the radical scavenging activity of maritimetin and related aurones. *The Journal of Physical Chemistry A*. **2008**. 112:12196–12202.
- [163] Nenadis N, Sigalas MP.
A DFT study on the radical scavenging potential of selected natural 3',4'-dihydroxy aurones. *Food Res. Inter.* **2011**. 44:114–120.
- [164] Stefane M, Axel M.
Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*. **2005**. 66:2399–2407.
- [165] Effend L.
Metabolic Engineering. **2005**. 1426.
- [166] Ur-Rahman A, Nasim S, Baig I, Jalil S, Orhan I, Sener B, Choudhary MI.
Anti inflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *J Ethnopharma*. **2003**. 86:177–180.
- [167] Wollenweber E, Stevens JF, Klimo K, Knauff J, Frank N, Gerhäuser C.
Cancer chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Med.* **2003**. 69:15–20.
- [168] Lapcik O.
Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry*. **2007**. 68:2909–2916.
- [169] Qin MJ, Ji WL, Wang ZT, Ye WC.
A new isoflavonoid from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *J. Integr. Plant. Biol.* **2005**. 47:1404–1408.
- [170] Gumula I, Heydenreich M, Derese S, Ndiege IO, Yenesew A.
Four isoflavanones from the stem bark of *Platyclaphium voëense*. *Phytochemistry Lett.* **2012**. 5:150–154.
- [171] Tao W-W, Duan J-A, Yang N-Y, Tang Y-P, Liu M-Z, Qian Y-F.
Antithrombotic phenolic compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *Fitoterapia*. **2012**. 83:422–425.
- [172] Ganapaty S, Pannakal ST, Srilakshmi GVK, Lakshmi P, Waterman PG, Brun R.
Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Lett.* **2008**. 1:175–178.
- [173] Koyomboon S, Altena IV, Kato S, Chantrapromma K.
Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*. **2006**. 67:1034–1040.
- [174] Fowler ZL, Koffas MAG.
Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl. Microbio. & Biotech.* **2009**. 83:799–808.
- [175] Songsiang U, Hahnvajjanawong C, Yenjai C.
Cytotoxicity of chemical constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia*. **2011**. 82:1169–1174.
- [176] Uddin N, Siddiqui BS, Begum S, Bhatti HA, Khan A, Parveen S, Choudhary MI.
Bioactive flavonoids from the leaves of *Lawsonia alba* (Henna). *Phytochemistry Lett.* **2011**. 4:454–458.
- [177] Lou CH, Wang MY, Yang GM, Cai H, Li Y, Zhao F, Yang H, Tong L, Cai B.
Preliminary studies on anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxychalcone isolated from *Herba Oxytropis* in human gastric cancer MGC-803 cells. *Toxicol In Vitro*. **2009**. 23:906–910.
- [178] Nakayama T, Sato T, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Hayashi H, Tanaka Y, Kusumi T, 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.
- [179] Richter, G.
Métabolisme des végétaux. *physiologie et biochimie*. **1933**. 333.

- [180] Mol J, Cornish E, Mason J, Koes R.
Novel coloured flowers. *Curr. Opin. Biotech.* **1999**. 10:198–201.
- [181] Ma C, Li G, Zhang D, Liu K, Fan X.
One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* **2005**. 1078:188–192.
- [182] Innok P, R ukachaisirikul T, Phongpaichit S, Suksamrarn A.
Fuscacarpans A–C, new pterocarpans from the stems of *Erythrina fusca*. *Fitoterapia.* **2010**. 81:518–523.
- [183] Ejike Chukwunonso ECC, Gong M, Udenigwe CC.
Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food Res. Inter.* **2013**. 52:167–177.
- [184] Ghedira K.
Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.* **2005**. 4:162–169.
- [185] Ferreira D, Marais Jannie PJ, Slade D.
Heterogeneity of the interflavanyl bond in proanthocyanidins from natural sources lacking C-4 (C-ring) deoxy flavonoid nucleophiles. *Phytochemistry.* **2005**. 66:2216–2237.
- [186] Chygyrynets OE, Galchenko GY, Vorobyova VI, Pylypenko TM, Lipatov CY.
Corrosion inhibition efficiency hop cones. Scientific whist - Technical University of Natsyonalnyy of Ukraine "Kiev Polytechnic Institute". **2012**. 3:137–148.
- [187] Liang S, Tian JM, Feng Y, Liu XH, Xiong Z, Zhang WD.
Flavonoids from *Daphne aurantiaca* and Their Inhibitory Activities against Nitric Oxide Production. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**. 59:653–656.
- [188] Narayanan V, Seshadri TR.
Proanthocyanidins of *Cassia fistula*. *Indian J. Chem.* **1972**. 10:379–381.
- [189] Stafford HA.
In Flavonoid metabolism. *CRC Press. Boca Raton, FL.* **1990**, 1–59.
- [190] Heller W, Forkmann G.
The flavonoides advances in research since 1986. *Chapmann & Hall.* **1993**. 499–535.
- [191] Heller W, Forkmann G, British L, Grisebach H.
Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R. Br. *Planta.* **1985**. 163:191–196.
- [192] Forkmann G.
In Proc. 16th Int. Conf. Groupe Polyphenols, Lisbon. **1992**. 16:19–27.
- [193] Harborne JB.
Flavonoids in phytochemistry, Edition Lawrence, P.L; *Litton Educational Publishing*; Vol II, **1991**.
- [194] Savi LA, Caon T, de Oliveira AP, Sobottka AM, Werner W, Reginatto FH, Schenkel EP, Monte Barardi CR, Oliveira Simões CM.
Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia.* **2010**. 81:1142–1146.
- [195] Recio MC, Rios JL, Villar A.
A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phototherapy.* **1989**. 3:117–125.
- [196] Cannac M, Ferrat L, Chiaramonti N, Pasqualini V, Barboni T, Morandini F.
Identification of flavonoids in *Pinus Laricio* needles and changes occurring after prescribed burning. *Chemoecology.* **2011**. 21:9–17.
- [197] Leporatti ML, Ivancheva S.

- Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharma.* **2003.** 87:123–142.
- [198] Harborne JB, Williams CA.
Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **2000.** 55:481–504.
- [199] Hahlbrock K, Grisebach H.
The Flavonoids. Chapter 16: Biosynthesis of Flavonoids. **1975.** 866–915.
- [200] Ong KC, Khoo HE.
Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* **1997.** 29:121–126.
- [201] Saitoh T, Kinoshita T, Shibata S.
Chemical studies on oriental plant drugs. 41. Flavonols of licorice root. *Chem Pharm Bull.* **1976.** 24:1242–1245.
- [202] Heller W, Forkmann G.
Biosynthesis. In: The flavonoids. Ed. Harborne J. *Chapman & Hall.* London. **1988.** 399–425.
- [203] Hiller K, Pohl B, Franke P.
Flavonoid spectrum of *Eryngium maritimum* L; Components of some Saniculoideae. *Pharmazie.* **1981.** 35:113–114.
- [204] Chiruvella KK, Mohammed A, Dampuri G, Ghanta RG, Raghavan SC.
Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-O-glucoside isolated from callus cultures of *Soymida febrifuga*. *Int. J. Biomed. Sci.* **2007.** 3:269–278.
- [205] Thuy TT, Sung TV, Hao NT.
An eudesmane glycoside from *Fissistigma pallens*. *Die Pharmazie.* **2006.** 61:570–571.
- [206] Harbone JB, Williams CA.
The flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne, *Chapman and Hall. Ltd.* **1988.** 303.
- [207] Zhang L, Zhao Z-X, Lin C-Z, Zhu C-C, Gao L.
Three new flavonol glycosides from *Nervilia fordii*. *Phytochemistry Lett.* **2012.** 5:104–107.
- [208] Peng Q, Li G, Maa Y, Huang J, Wei X, Wang J.
Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. *Biochem. System. & Eco.* **2012.** 43:64–66.
- [209] Chopin J.
Actualité de phytochimie fondamentale, II^{ème} série, édition Masson, Paris. **1966,** 119.
- [210] Dos Santos RI, dos Santos MA, Schenkel EP.
Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Int. J. Pharmacogn.* **1996.** 34:300–302.
- [211] Treutter D.
Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology.* **2005.** 7:581–591.
- [212] Shirley BW.
Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science.* **1996.** 1:377–382.
- [213] Zhang WJ, Bjorn LO.
The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia.* **2009.** 80:207–218.
- [214] Vanetten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE.
Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell.* **1994.** 6:1191–1192.
- [215] Dixon RA, Steele CL.
Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science.* **1999.** 4:394–400.
- [216] Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN.

- Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**. 26:965–1096.
- [217] Hodek P, Trefil P, Stiborova M.
Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.* **2002**. 139:1–21.
- [218] Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G.
Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **2006**. 184:271–178.
- [219] Babayi H, Kolo I, Okogum JI.
The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri.* **2004**. 16:102–105.
- [220] Didrak M.
Antimicrobial activities of the extracts of various plants (*Valex*, *Mimosa* bark, *Gallnut* powders, *Salvia sp* and *Phlomis sp*). *J. Biol.* **1999**. 23:241–248.
- [221] Modak B.
Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quin.* **2001**. 47:366–421.
- [222] Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO.
Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopi aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* **2005**. 1:392–397.
- [223] Das S, Rosazza JP.
Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J. Nat. Prod.* **2006**. 69:499–508.
- [224] Cushnie TP, Lamb AJ.
Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* **2005**. 26:343–356.
- [226] Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC.
Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry.* **1999**. 2:1419–1482.
- [227] Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ.
Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* **2003**. 158:281–289.
- [228] Martini A, Katerere DR, Eloff JN.
Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharma.* **2004**. 93:207–212.
- [229] Botta B, Menendez P, Zappia G, Lima RAD, Torge R, Monache GD.
Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Curr. Med. Chem.* **2009**. 16:3414–3468.
- [230] Halbwirth H.
The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *Int. J. Molec. Sci.* **2010**. 11:595–621.
- [231] Ilić SB, Konstantinović SS, Todorović ZB.
Antimicrobial activity of biological activity component from flower of antimicrobial *Linum capitatum* Kit. *Phys. Chem. Technol.* **2004**. 3:73–73.
- [232] Takashima J, Chiba N, Yoneda K, Ohsaki A.
Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plain and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. *J. Nat. Prod.* **2002**. 65:611–613.
- [233] Dadi PK, Ahmad M, Ahmad Z.
Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**. 45:72–79.

- [234] Grayer RJ, Harborne JB.
A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. **1994**. 37:19–42.
- [235] Ortuno A, Baidez A, Gomez P, Arcas MC, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA.
Citrus paradisi and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem*. **2006**. 98:351–358.
- [236] Batawita K, Kokon K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P.
Fungicide activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae)). *Acta Bot. Gal*. **2002**. 149:41–48.
- [237] Kuster RM, Arnold N, Wessjohann L.
Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol*. **2009**. 37:63–65.
- [238] Spedding G, Ratty A, Middleton E.
Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res*. **1989**. 12:99–110.
- [239] Choi HJ, Song JH, Park KS.
Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci*. **2009**. 37:329–333.
- [240] Andres A, Donovan SM, Kuhlenschmidt MS.
Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2009**. 20:563–569.
- [241] Kongkum N, Tuchinda P, Pohmakotr M, Reutrakul V, Piyachaturawat P, Jariyawat S, Suksen K, Yoosook C, Kasisit J, Napaswad C.
DNA topoisomerase II α inhibitory and anti-HIV-1 flavones from leaves and twigs of *Gardenia carinata*. *Fitoterapia*. **2012**. 83:368–372.
- [242] Kale A, Gawande S, Kotwal S.
Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*. **2008**. 22:567–577.
- [243] Mladinka P, Zatloukalova L, Filipisky T, Hrdina R.
Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. **2010**. 49:963–975.
- [244] Rufer CE, Kulling SE.
Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**. 54:2926–2931.
- [245] Leopoldini M, Russo N, Toscano M.
The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **2010**. 125:288–306.
- [246] Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V.
Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology & Medicine*. **2001**. 31:1570–1581.
- [247] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*. **1996**. 20:933–956.
- [248] Pierini R, Gee JM, Belshaw NJ, Johnson IT.
Flavonoids and intestinal cancers. *British J. Nutri*. **2008**. 99:53–59.
- [249] Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin JK.
Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters*. **2001**. 496:12–18.

- [250] 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, Kim SH.
Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* **2008**. 31:1303–1311.
- [251] Wright CW.
Recent developments in research on terrestrial plants used for treatment of malaria. *Nat. Prod. Rep.* **2010**. 27:961–968.
- [252] Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL.
Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research.* **2003**. 90:S55–S62.
- [253] Batista R, Junior ADJS, Oliveira ABD.
Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicine. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules.* **2009**. 14:3038–3072.
- [254] Magadula JJ, Erasto P.
Bioactive natural products derived from the East African flora. *Nat. Prod. Rep.* **2009**. 26:1535–1554.
- [255] Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R.
Antimalarials from nature. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**. 17:3229–3256.
- [256] Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Simon SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM.
Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious disease.* **2002**. 2:494–501.
- [257] Romero GAS, Boelaert M.
Control of visceral leishmaniasis in Latin America-A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* **2010**. 4:1–17.
- [258] Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M.
Combination therapy for visceral leishmaniasis. *The Lancet Infectious disease.* **2010**. 10:184–194.
- [259] Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Ruedi P.
Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2006**. 50 :1352–1364.
- [260] Lescure FX, Loup GL, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G.
Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet Infectious disease.* **2010**. 10:556–570.
- [261] Izumi E, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Junior VFV, Nakamura CV.
Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.* **2011**. 28:809–823.
- [262] Uchiyama N.
Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *J. Health Sci.* **2009**. 55:31–39.
- [263] Fukai T, Sakagami H, Toguchi M, Takayama F, Iwakura I, Atsumi T, Ueha T, Nakashima H, Nomura T.
Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Research.* **2000**. 20:2525–2536.
- [264] Boersma BJ, Barnes S, Kirk M, Wang CC, Smith M, Kim H, Xu J, Patel R, Darley-Usmar VM.
Soy isoflavonoids and cancer-metabolism at the target site. *Mutation Res.* **2001**. 480:121–127.
- [265] Morton MS, Turkes A, Denis L, Griffiths K.
Can dietary factors influence prostatic disease. *British J. Urology Inter.* **1998**. 84:549–554.

- [266] Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*. **2010**. 126:9–20.
- [267] Alvarez A, Real R, Perez M, Mendoza G, Prieto JG, 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.
- [268] Colabufo NA, Berardi F, Cantore M, Contino M, Inglese C, Niso M, Perrone R. Perspectives of P-Glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J. Med. Chem.* **2010**. 53:1883–1897.
- [269] Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Munoz-Martinez F, Bates SE, Castanys S, Gamarro F, Petro AD, Perez-Victoria JM. Flavonoid structure-activity studies identify 6prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.* **2005**. 65:4852–4860.
- [270] Mckeage MJ, Baguley BC. Disrupting established tumor blood vessels: an emerging therapeutic strategy for cancer. *Cancer*. **2010**. 116:1859–1871.
- [271] Chatenet C. Les phytoestrogènes. *Actualités pharmaceutiques*. **2008**. 473:10–23.
- [272] Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. **2004**. 65:995–1016.
- [273] Strauss L, Santti R, Saarinen N, Streng T, Joshi S, Makela S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependant disease. *Toxicology Lett.* **1998**. 102-103:349–354.
- [274] Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Med.* **2010**. 76:1132–1142.
- [275] Marie P, Halbout P. OPG/RANKL Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose. *Médecine/Sciences*. **2008**. 24:105–109.
- [276] Tikkanen MJ, Adlercreutz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens-Could they have UN role in coronary heart disease prevention? *Biochemical Pharmacology*. **2000**. 60:1–5.
- [277] Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KDR, Adlercreutz H, Lund TD. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicology and Teratology*. **2002**. 24:5–16.
- [278] Jamali K, Shinkaruk S, Lamothe V, Potier M, Enneta-Pelissero C. Phyto-estrogènes et le déclin mnésique hippocampo-dépendant lié à l'âge. *Médecine et Longévité*. **2010**. 2:12–21.
- [279] Zhang Y, Li XL, Yao XS, Wong MS. Osteogenic activities of genistein derivatives were influenced by the presence of prenyl group at ring A. *Archives of Pharmaceutical Research*. **2008**. 31:1534–1539.
- [280] Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, Cooman LD, Rong H, Keukeleire DD. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*. **2002**. 123:235–242.
- [281] Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P, Breemen RBV. Metabolism of prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metabolism & Disposition*. **2004**. 32:272–279.
- [282] Kretzschmar G, Zierau O, Wober J, Tischer S, Metz P, Vollmer G.

- Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *J. Steroid Biochem. Molecu Biol.* **2010**. 118:1–6.
- [283] Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, Ichikawa K, Taki M, Takaishi S, Lijima Y, Tsutsumi S, Boriboon M, Akiyama T.
Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.* **1998**. 64:511–515.
- [284] Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A.
Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* **1999**. 48:176–181.
- [285] Morikawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, Hirota K.
Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**. 56:11030–11037.
- [286] Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW.
Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* **2008**. 448:175–179.
- [287] Murakami N, Mostaqul HM, Tamura S, Itagak S, Horii T.
A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium (Hydrangea macrophylla)*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**. 11:2445–2447.
- [288] Ribereau-Gayou JB.
The phenolic compounds of vegetals, *Ed Dundo*, Paris. **1968**.
- [289] Skoog DA, West DM, Holler FJ.
Chimie Analytique. Traduction de la 7ème Ed américaine par Buess-Hermann, C., Dauchot-Weymeers, J., Dumont, F., *De Boeck Université*. **1997**, 996.
- [290] Rhode R.
Extraction Liquide/Liquide. Cours du Lycée Pradeau la Sède, *Tarbes*. **1998**.
- [291] Tswett M.
Über die nächsten Säurederivate der Chlorophylline. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* **1908**. 41:1352–1354.
- [292] Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P.
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson*, Paris. **1995**.
- [293] Rosset R, Caude M, Jardy A.
Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique. *Ed. Masson*, Paris. **1991**.
- [294] Berthillier A.
La chromatographie et ses applications. *Dunod paris*. **1972**.
- [295] Harborne JB.
Phytochemical methods. *Chapman and Hall*. **1973**.
- [296] Loiseleur J.
Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique, Tome 1, *Editeurs MASSON et CIE*. **1973**.
- [297] Markham KR.
Technique of flavonoides identification, *Academic press*, London. **1982**.
- [298] Harborne JB.
The flavonoids. *Chapman and Hall*. London. **1975**. 1056–1095.
- [299] Ramderath K.
Chromatographie sur couche mince. *Gautier-Villars Ed.*, Paris. **1971**.
- [300] Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB.

- The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag*, New York, Heidelberg. Berlin. **1970**, 254.
- [301] Jurd L.
Spectral properties of flavonoid compounds. In: Geissman TA, ed. The chemistry of flavonoid compounds. Oxford: *Pergamon Press*. **1962**. 107–155.
- [302] Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H.
The Flavonoids. *Academic Press, New York*. **1975**.
- [303] Beltran F, Viguera JM, Casabuena A.
Farmacognosia. **1985**. 10:197–215.
- [304] Terence N, Mitchell BC.
NMR – From spectra to structures. An experimental approach. **2 Ed.** *Springer-Verlag Berlin*. Heidelberg. **2007**.
- [305] Hörhammer L, Hänsel R.
Zur Analytik der Flavone I. Über die Stöchiometrie gelöster Metallsalzkomplexe des Rutins und Quercetins. *Arch. Pharm.* **1952**. 285:438–444.
- [306] Jurd L, Geissman TA.
Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J. Org. Chem.* **1956**. 21:1395–1401.
- [307] De Hoffman E, Charrette J, Stroobant V.
Spectrométrie de Masse. **1ère Ed.** *Masson*. **1994**. 1–10.
- [308] Richardin P.
Les Techniques d'Ionisation en Spectrométrie de Masse - Application à l'Étude des Œuvres d'Art. <http://mistrall.culture.fr/culture/conservation/fr/cours/richardi.htm#Historique>.
- [309] Hoppilliard Y.
20 ans de rétrospective en spectrométrie de masse organique et bioorganique. *Spectra 2000*. **1991**. 159:16–24.
- [310] Botter R.
Développements récents en spectrométrie de masse. *Spectra Analyse*. **1996**. 191:13–26.
- [311] Bouchonnet S, Libong D.
Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *L'Actualité Chimique*. **2004**. 275:7–14.
- [312] Tranchant J.
Manuel Pratique de la Chromatographie en Phase Gazeuse. *Masson*. **1995**.
- [313] Bouchonnet S, Hoppilliard Y, Kargar-Grisel T.
Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bioorganiques. *Spectra Analyse*. **1999**. 207:11–25.
- [314] Brandão MG, Krettli AU, Soares LS, Nery CG, Marinuzzi HC.
Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J. Ethnopharma*. **1997**. 57:131–138.
- [315] Markham KR, Geiger H.
¹H NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides, in hexadeuterodimethylsulfoxide. In the flavonoids, 1994. edited by Harborne, J. B. *Chapman & Hall*. **1993**. London.
- [316] Canet D, Boubel JC, Canet-Soulas E.
La RMN-concepts, méthodes et applications. **II^{ème} édition**. *Sunod*. Paris. **2002**.
- [317] Crossmun WR, Carlson RMK.
TWO-dimensional NMR spectroscopy applications for chemists and biochemists. **Second Edition** *VCH*. New-York. **1987**.

[318] Lambert JB, Mazzola EP.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy –An introduction to principles, applications and experimental methods. *Upper Saddle River*. New Jersey. **2003**.



Chapitre

Étude

**Phytochimique
et biologique**

1. Les critères de choix des deux espèces

Les critères de choix de ces deux espèces, reposent essentiellement sur le fait que:

- ☐ Ces espèces appartiennent au genre *Linaria* (Scrophulariaceae), très connu pour son utilisation comme remède populaire en particulier laxatives, toniques, antiscorbutiques, antidiabétiques, diurétiques, drogues anti-inflammatoire pour le traitement des hémorroïdes des catarrhes de la vessie et ulcères [1-2] notant aussi que plusieurs études biologiques ont montré des activités antiprolifératives, cytotoxiques, analgésique, inhibition de l'acétylcholinestérase, anti-inflammatoires, antimicrobienne, antioxydante et inhibition de l' α -glucosidase [3-9].
- ☐ Les espèces de ce genre ont réputées par leur accumulation des métabolites secondaires de type flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes et phénylétanoïdes [8-16].
- ☐ L'endémisme de *Linaria tingitana* pour l'Algérie et le Maroc et l'absence d'études phytochimique ou biologique sur cette espèce. L'étude de *L. reflexa* a permis l'isolement de 7 produits et donnant des très bons résultats sur l'activité antiproliférative *in vitro* et l'activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase [3, 17, 18].

2. Place dans la systématique botanique

Ce classement se réfère à la classification botanique [19] (Tableau III.1) :

Tableau III.1 : classification botanique des espèces étudiées

Embranchement	Viridaplantae
Royaume	Plante
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Scrophulariales
Famille	Scrophulariaceae
Sous-famille	Scrophularioidea
Tribu	Antirrhineae
Genre	<i>Linaria</i>
Espèces	<i>Linaria tingitana</i> Boiss. & Reut. <i>Linaria reflexa</i> Desf.

3. Description botanique des espèces étudiées

3.1. *Linaria tingitana* Boiss. & Reut.

Linaria tingitana Boiss. & Reut. (fig. III.1) est une plante des sables maritimes à feuilles linéaires charnues, à tiges florifères juneiformes en générale aphylls. Fleurs à corolle

élargie, fortement ventrue à la gorge. Sépales obtus, aussi long que la capsule. Inflorescence presque glabre [20].



Figure III.1 : Les parties aériennes de *Linaria tingitana* Boiss. & Reut.

La matière végétale a été récoltée durant le mois de May 2009, dans le parc national d'El-Kala de Wilaya Tarf. La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par monsieur le Dr. Sarri Djamel, du département de biologie, Université de M'Sila.

3.2. *Linaria reflexa* Desf.

Linaria reflexa Desf. (fig. III.2) est une plante annuelle à tiges prostrées, souvent peu nombreuses. Feuilles ovales-ancéolées larges de 1 cm environ. Fleurs de 10-15 mm à éperon bien plus long que la corolle. Sépales lancéolés aigus. Graines scrobiculées – distribué dans toute l'Algérie très polymorphe [20]. Connue sous les noms : « Chaïba » et « Halib el Ouaal ».



Figure III.2 : Les parties aériennes de *Linaria reflexa* Desf.

Elle a été récoltée durant le mois mars 2012, dans la région de Constantine. La détermination botanique a été réalisée aussi par monsieur le Dr. Sarri Djamel.

4. Matériels et méthodes chromatographiques utilisés pour l'étude phytochimique

➤ **Solvants utilisés**

Le *n*-hexane, l'éther de pétrole, le toluène, l'éther di-éthylique, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme, le *n*-butanol, l'*isopropanol*, le méthanol, l'acétonitrile et l'eau.

➤ **Révéléateur**

La révélation a été réalisée avec l'anisaldéhyde préparée comme suit :

En mélanger 0.5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 85 ml de méthanol et on termine par 5 ml d'acide sulfurique concentré. La solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 04 °C pendant toute la durée d'utilisation. On pulvérise le chromatogramme puis on chauffe à 100 °C pendant 10 minutes. Ce dernier peut être examiné à la lumière UV (365 nm).

➤ **Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)**

Les analyses des extraits, des fractions et des produits séparés, ont été faites sur plaques CCM avec la silice comme phase stationnaire, le type de plaques est 60 GF₂₅₄ **Merck**, 0.1 mm sur support d'aluminium ou en verre (20 × 20 cm) et **Merck** RP-18 F₂₅₄ (phase inverse).

➤ **Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC)**

Une colonne ouverte (1200 × 40 mm), le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0.063–0.200 mm (70–230 mesh), **Merck** H60.

Une colonne ouverte (1000 × 40 mm), avec le polyamide comme support.

➤ **Flash chromatographie sur colonne**

Flash colonne avec gel de silice Si 60 (15–25µm) **Merck**.

Flash colonne avec comme support RP-18 (15–25 µm) **Merck**.

➤ **Chromatographie sur plaques préparative**

Les chromatographies sur plaques préparatives sont effectuées sur des plaques en verre (20 × 20 cm) pré-étalées avec du gel de silice **Merck 60 F₂₅₄** de 0.3 ou 0.5 mm d'épaisseur.

➤ **GC-MS**

La spectrométrie de masse a été réalisée sur un gaz spectromètre de masse Agilent chromatographe (GC-MS) Modèle 7890/5975, équipée d'une colonne capillaire HP-5 (25 m × 0.25 mm, épaisseur du film 0.25 pm) programmée à partir de 50 °C (5 min) jusqu'à 250 °C

pour 3 °C/min et maintenue pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et le détecteur d'ionisation de flamme étaient de 280 et 300 °C, respectivement. L'ionisation du spectre de masse (MS) a été réglée en mode impacte électronique positif à 70 eV et multiplicateur d'électrons a été réglée à 220 V. Les températures de source d'ion et MS quadripolaires étaient de 230 °C et 180 °C, respectivement. Les Données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme m/z 33-450.

➤ HPLC

Quelques fractions des extraits de deux espèces ont été étudiées par HPLC Merck avec une colonne kinetex C-18 (250 mm x 4.6 mm de diamètre, 5 µm), le solvant est de acétonitrile-eau (AcN/H₂O 92.5/7.5), DAD 200-350, canal : 204, 220, 254, 280 nm avec un débit de 1 ml/min pour déterminer la présence des iridoïdes dans ces fractions.

➤ LC-MS

Le profile LC-MS a été réalisée sur Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) modèle 1100 séries de chromatographie liquide couplé à une matrice de détecteur photodiode (Agilent, Palo Alto, CA, USA) série 1100, et à un Esquire LC-ion piège spectromètre de masse (Bruker, Billerica, MA, USA) équipé par une ionisation électronébuliseur (ESI) d'interface. Le détecteur photodiode a été fixée à 330 nm. Le système d'élution est de 80:20 (H₂O + 1 ml d'acétate d'ammonium (10 mM) : CH₃CN + 1 ml d'acétate d'ammonium (10 mM)) pendant 30 min puis il passe à 0:100 jusqu'à 56 min, le fractionnement de l'effluent de la colonne a été réalisé avec un débit de 1 ml/min s'écoulant dans le spectromètre de masse. Le spectre LC-MS a été exécuté sur une colonne de type Nucleosil C18 Macherey-Nagel (250 mm x 4.6 mm de diamètre, diamètre de 5 µm, coiffe terminale). L'azote de haute pureté a été utilisé comme le nébuliseur et également en tant que gaz de séchage à 300 °C à une vitesse d'écoulement constante de 6 l/min. Les spectres complets ont été acquis en mode d'ions négatifs dans la région m/z 100-1000, en adoptant les paramètres suivants : unités d'entraînement de piège, 55.1; capillaire tension de sortie, -120.4 V; skimmer 1 tension, -43,3 V. Les expériences de fragmentation MS/MS ont été réalisées sur l'ion précurseur choisi. Les analyses des données (version 3.0, Bruker Daltonik GmbH) ont été utilisés pour élucidés les spectres de masse.

Pour l'étude du profil des iridoïdes de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* : une colonne de type C18 phenomenex Kinetex 5 µm 100A 250 mm x 4.6 mm (00G-4601-E0) a été utilisée. Avec comme conditions : un débit de 1 ml/min, l'éluant: A = H₂O + 0.1% l'acide formique, B = CH₃OH + 0.1% l'acide formique. Gradient: A = 80% à 0% pendant 40 min. UV-DAD 200-

700 nm; la chaîne UV: 204, 234, 254, 470 et 665 nm. La source *ESI* : mode positive et négative; l'injection: 5µl.

5. Étude phytochimique de *Linaria tingitana*

5.1. L'extraction

Les parties aériennes (1285.15 g) ont été mises en macération à la température ambiante, dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/H₂O 80/20). Cette macération a été répétée 4 fois pour une période de 72 heures. Le solvant a été évaporé à 38 °C et sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'extrait concentré. Ce dernier a été dilué avec l'eau distillé (514 ml), après on a utilisé une extraction successive de type liquide-liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. La figure III.3 présente les différentes étapes d'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

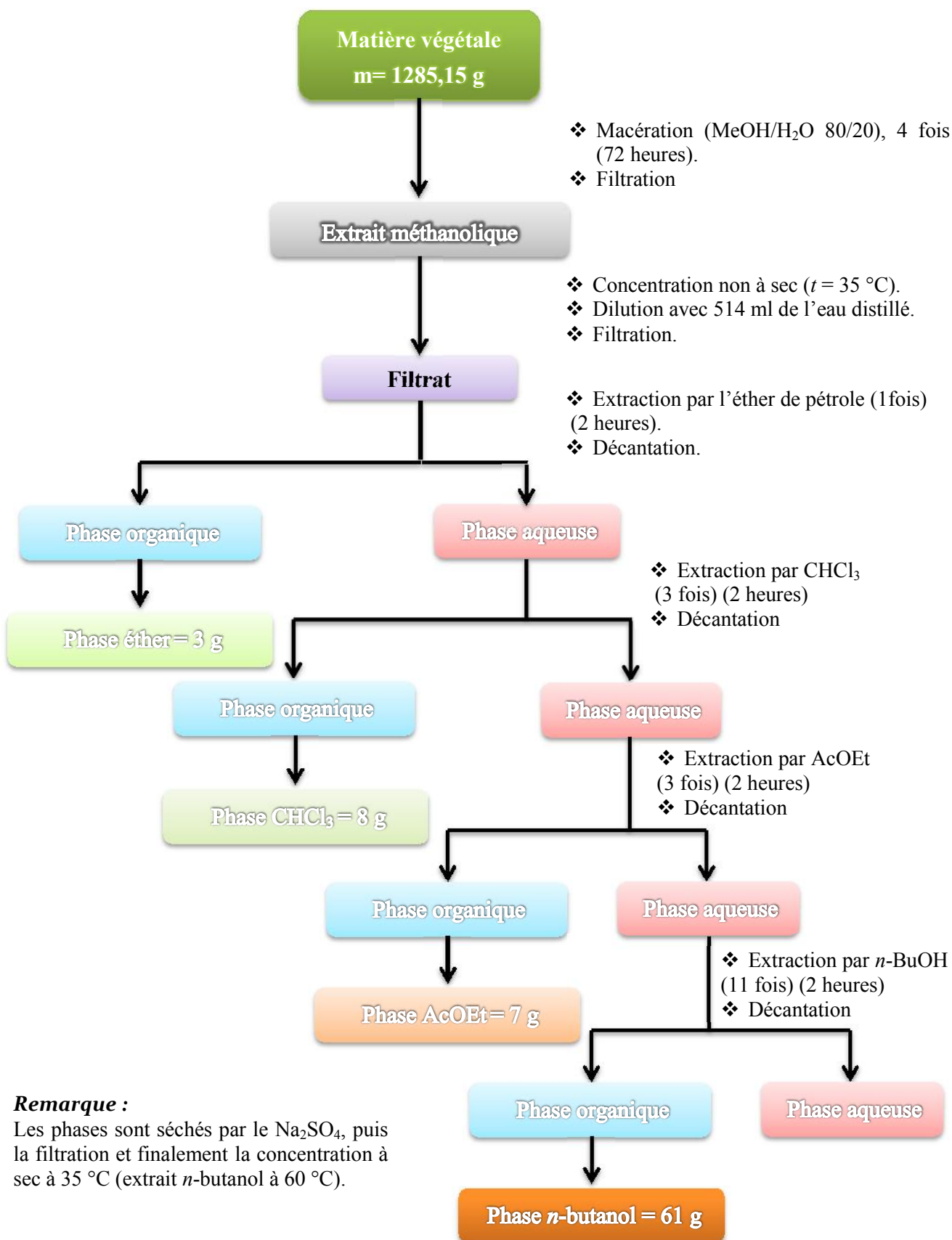


Figure III.3 : Extraction des parties aériennes de *L. tingitana* Boiss. & Reut.

Le tableau suivant présente les poids et les rendements des extraits obtenus.

Tableau III.2: Rendement des phases

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
1285.15 g	Éther de pétrole	3	0.23
	Chloroforme	8	0.62
	Acétate d'éthyle	7	0.54
	<i>n</i> -Butanol	61	4.74

L'étude de l'investigation phytochimique de l'espèce *L. tingitana* a été faite en commençant par un fractionnement puis une purification de différents composés en utilisant diverses techniques chromatographiques suivi par l'élucidation structurale des composés isolés en utilisant la combinaison de différentes techniques d'analyses soit la spectrophotométrie : UV-visible ou bien la spectroscopie : RMN 1D (^1H - ^{13}C) & 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) et la spectroscopie de masse. Les études des phases éther de pétrole et *n*-butanol ont été réalisées avec les techniques GC-MS et LC-MS respectivement afin de déterminer leurs compositions chimiques.

5.2. Étude phytochimique de la phase chloroforme de *L. tingitana*

L'extrait chloroforme a subi des séparations successives afin d'isoler des molécules pures. En commençant par la recherche sur plaques CCM analytiques du système d'élution donnant une meilleure séparation. Ce dernier est le *n*-hexane/AcOEt (9/1).

5.2.1. Fractionnement de la phase chloroforme

L'extrait chloroforme (8 g) dissout dans le méthanol est mélangé avec une petite quantité de gel de silice pour colonne, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le *n*-hexane. La masse de gel de silice utilisée est de 240 g. L'élution a été effectuée par le *n*-hexane enrichi progressivement avec l'acétate d'éthyle. Les fractions obtenus sont regroupées suivant la similitude de leurs profils chromatographique sur des plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes approprié, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 1 min à 100 °C, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Résultats de la séparation par CC de la phase CHCl₃ de *L. tingitana*

Lots	Fractions	Système d'élution %		Poids de la fraction (mg)	Volume des lots (ml)
		<i>n</i> -hexane	AcOEt		
1-6	LT C 1	100	0	10.43	600
7-25	LT C 2	100	0	16.98	1900
26-32	LT C 3	98	2	9.13	700
33-37	LT C 4	96	4	7.96	500
38-40	LT C 5	94	6	34.4	300
41-44	LT C 6	92	8	32.5	400
45-50	LT C 7	90	10	64.86	600
51-55	LT C 8	88	12	21.7	500
56-65	LT C 9	85	15	46.76	1000
66-76	LT C 10	80	20	154.2	1100
77-86	LT C 11	80	20	73.56	1000
87-102	LT C 12	75	25	125.8	1600
103-116	LT C 13	70	30	103.23	1400
117-123	LT C 14	70	30	169.43	700
124-129	LT C 15	65	35	186.3	600
130-132	LT C 16	65	35	44.81	300
133-153	LT C 17	60	40	365.65	2100
154-156	LT C 18	55	45	64.9	300
157-162	LT C 19	55	45	348.81	600
163-170	LT C 20	55	45	170.83	800
171-180	LT C 21	50	50	239.54	1000
181-200	LT C 22	40	60	648.21	1000
201-230	LT C 23	20	80	574.63	3000
231-250	LT C 24	0	100	305.1	2000

5.2.2. Séparation des composés de la phase chloroforme

La richesse de l'extrait et la difficulté de certaines séparations surtout par la présence de la chlorophylle, on a eu recours à divers systèmes chromatographiques. Pour les fractions étudiées, on a utilisé les petites colonnes, les plaques préparatives et la recristallisation.

a. Étude de la fraction LT C7

La chromatographie de la fraction LT C7 (64.86 mg) sur CCM avec comme système d'élution éther de pétrole/AcOEt (85/15), a révélée qu'elle renferme différents tâches avec un produit majoritaire invisible sous UV 254 ou 365 nm et donne une coloration violette après révélation. Ce composé est présent sous-forme de cristaux (des aiguilles). Après plusieurs lavages avec du méthanol, on a obtenu le produit pur LT C-7 (9 mg, soluble dans le CHCl₃).

b. Étude de la fraction LT C9

La Fraction LT C9 (46.76 mg) est semblable à la 7^{ème}, elle renferme des cristaux sous-forme aiguilles, son test sur CCM avec le système éther de pétrole/AcOEt (85/15) a révélé la présence de plusieurs produits, une tâche rose majoritaire apparaît après révélation (invisible sous l'UV 254 et 365 nm), après plusieurs lavages avec du méthanol, on a obtenu le composé LT C-9 (5 mg, soluble dans le CHCl₃).

c. Étude de la fraction LT C19

La chromatographie sur colonne de cette fraction (348,81 mg) avec comme système le chloroforme enrichi progressivement avec l'éther di-éthylique. On a obtenu 4 sous-fractions. La chromatographie de la sous-fraction LT C19-4 avec le système CHCl₃/MeOH (9/1), a permis la séparation du produit LT C-19-4-1 (14 mg, soluble dans le MeOH) avec une fluorescence noire-violette sous lumière de Wood.

d. Étude de la fraction LT C22

Elle renferme un précipité blanc, après plusieurs lavages avec les solvants MeOH, CHCl₃ et Acétone), on a obtenu le composé LT C-22 (208 mg, soluble dans la pyridine).

5.3. Étude phytochimique de la phase acétate d'éthyle de *L. tingitana*

Dans la continuité de l'investigation phytochimique de l'extrait AcOEt de *L. tingitana* (thèse de magister), l'étude d'autres fractions nous a permis d'isoler d'autre composés.

a. Étude de la fraction LT Ac10

La chromatographie de cette fraction sur plaque CCM avec comme système CHCl₃/MeOH (95/5), a montré la présence de plusieurs taches sous la lumière UV (254 et 365 nm) dont trois ont une fluorescence noir violette sous la lumière de Wood et une coloration jaune après exposition à la vapeur d'ammoniaque, ce qui oriente vers des composés de type flavonoïdes. La séparation sur plaques préparatives (CHCl₃/MeOH 95/05) nous a permis d'isoler le produit Ac-10-1 (10 mg soluble dans le MeOH).

5.4. Étude phytochimique de la phase *n*-butanol de *L. tingitana*

Après plusieurs tests chromatographique sur plaques CCM avec différents systèmes d'élution. Le système donnant une bonne séparation est celui du CH₂Cl₂/MeOH (95/05). Pour la phase inverse est celui de l'acétonitrile/eau (20/80), ce dernier est utilisé pour la technique LC-MS afin de déterminer la composition chimique de cette phase.

5.4.1. Fractionnement de la phase *n*-butanol

L'extrait *n*-butanol (25 g) dissout dans le méthanol est mélangé avec une quantité de gel de silice, séché sous vide puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice (750 g), préparée dans le dichlorométhane. L'éluion a été réalisée avec le dichlorométhane enrichi progressivement avec le méthanol. Les lots obtenus sont regroupés suivant la similitude de leurs profils chromatographiques sur plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes appropriés, elles ont été visualisées sous lampe UV 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 1 min à 100 °C, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultats de la séparation par CC de la phase *n*-butanol de *L. tingitana*

Lots	Fractions	Système d'éluion %		Poids de la fraction (mg)	Volume des fractions (ml)
		CH ₂ Cl ₂	MeOH		
1-3	LT B 1	100	0	16.7	750
4-21	LT B 2	100	0	20	4500
22-23	LT B 3	98	2	42.4	500
24-45	LT B 4	98	2	98.5	5250
46-47	LT B 5	96	4	34.4	500
48-50	LT B 6	96	4	47.8	750
51-66	LT B 7	96	4	1357.5	4000
67-86	LT B 8	94	6	4100.3	5000
87-113	LT B 9	92	8	5429.8	6750
114-123	LT B 10	90	10	597.8	2500
124-126	LT B 11	85	15	499.8	750
127-129	LT B 12	85	15	1039.6	750
130-131	LT B 13	85	15	410	500
132-136	LT B 14	80	20	1416	1250
137-141	LT B 15	80	20	617.1	1250
142-145	LT B 16	75	25	375.2	1000
146-158	LT B 17	75	25	1244.7	3250
159-165	LT B 18	70	30	443	1750
166-170	LT B 19	55	45	299.7	1250
171-174	LT B 20	40	60	402.4	1000
175-177	LT B 21	25	75	101.8	750
178-180	LT B 22	25	75	88.3	750
181-188	LT B 23	10	90	165.87	2000
189-200	LT B 24	0	100	392.1	3000

5.4.2. Séparation des composés de la phase *n*-butanol

Plusieurs techniques chromatographiques (CC, FC, CCM et plaques préparatives) ont été utilisées pour étudier les fractions suivantes :

a. Étude de la fraction LT B9

Afin d'étudier la fraction B9 (5.4298 g), on a utilisé la CC avec comme système dichlorométhane/acétone, elle nous a permis l'obtention de 15 sous-fractions (B9-1 – B9-15).

- ✓ L'investigation de la sous-fraction LT B9-4 (386 mg) sur plaques préparatives (CHCl₃/MeOH 95/05) nous a permis de séparer le B9-4-6 (13 mg). La purification de ce dernier a permis l'obtention du composé LT B9-4-6-1 (10 mg, soluble dans l'acétone).
- ✓ La chromatographie de la sous-fraction B9-6 (402 mg) sur des plaques préparatives avec comme système CHCl₃/MeOH (9/1) a donné le composé LT B9-6-1B (12 mg), sa purification par RP-HPLC avec le système acétonitrile/H₂O (0.75/9.25) dans les conditions d'UV 220 nm, montre la présence d'autres pics, la purification a permis d'isoler le produits LT B9-6-1B-6-4 (4 mg, soluble dans le MeOH).

b. Profile LC-MS

L'étude de l'extrait *n*-BuOH par la technique LC-MS a permis l'obtention de deux profiles, le premier renferme 12 pics avec deux produits majoritaire de la même masse correspondant à $[M-H]^-$ $m/z = 593$. Le second profile a été enregistré avec un système spécifique pour les iridoïdes, trois des pics obtenus sont identifiés pour ceux des iridoïdes.

5.5. Le profile GC-MS de la phase éther de pétrole

L'étude phytochimique de l'extrait éther de pétrole a été réalisée par GC-MS pour déterminer la composition chimique et surtout les acides gras.

Au total, neuf produits sont identifiés des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aérienne de *L. tingitana*, ainsi que neuf différents méthyle esters sont détectés dans la phase éther de pétrole par la technique GC-MS.

6. Étude phytochimique de *Linaria reflexa* Desf.

L'investigation phytochimique de cette espèce est divisée en deux parties, la première concerne l'investigation phytochimique des parties aériennes de *L. reflexa*. La seconde est une étude comparative entre deux technique d'extraction : la macération (extrait hydroalcoolique) et l'extraction ultrasonique (extrait méthanol). On a utilisé la technique LC-MS pour différencier le rendement et la composition chimique ainsi que l'activité biologique pour chaque extrait.

6.1. L'extraction hydroalcoolique

La matière végétale (feuilles, fleurs et tiges; 1500g) est mise en macération à température ambiante, dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/H₂O 80/20 v/v). Cette macération a été répétée 4 fois, avec renouvellement de solvant chaque 72 heures. On a évaporais le solvant à 38 °C, sous pression réduite jusqu'à la concentration de l'extrait. Ce dernier a été dilué avec de l'eau distillé (600 ml). La solution obtenue subit des affrontements avec des solvants de polarités croissantes (extraction liquide-liquide) : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. La figure III.4 présente les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

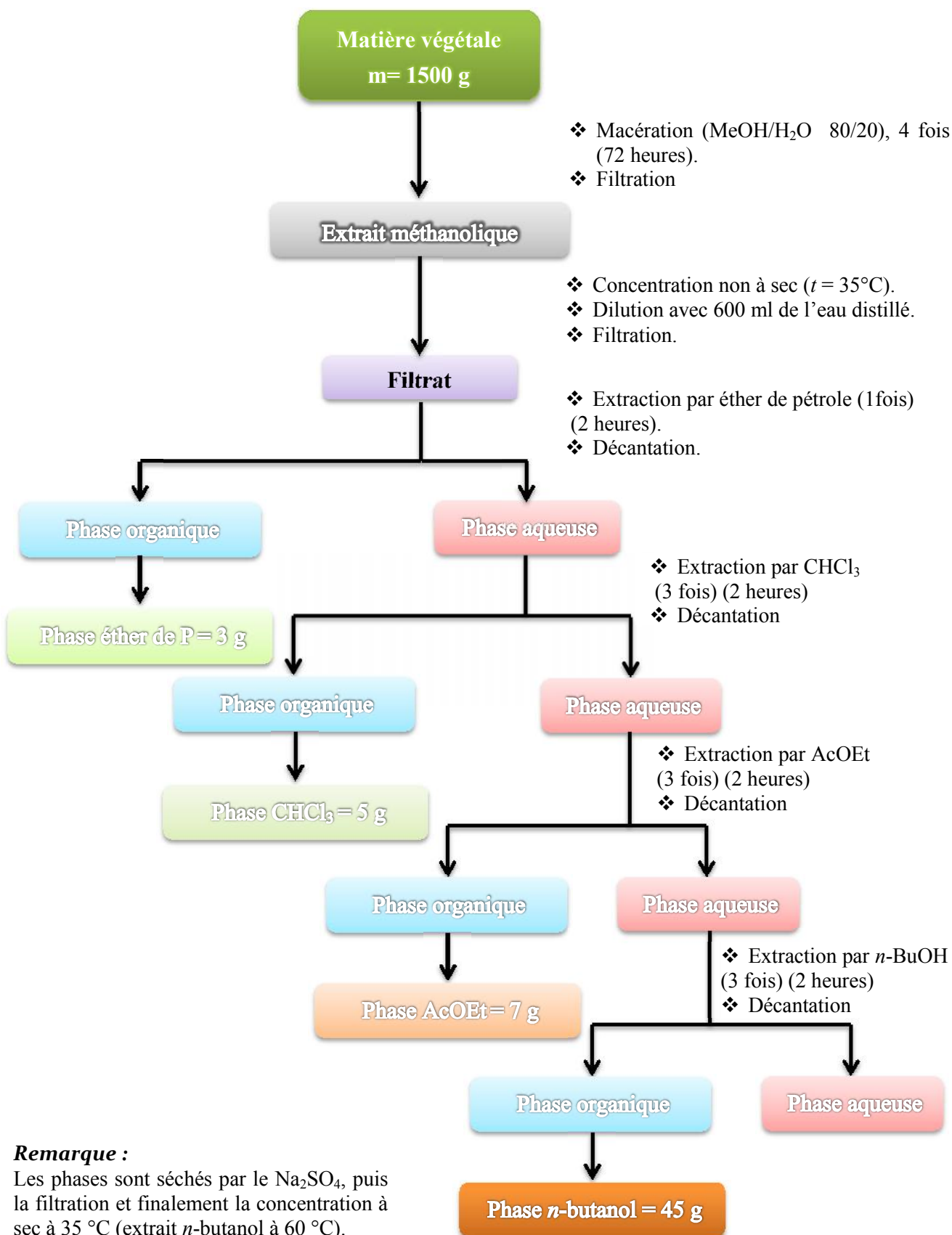


Figure III.4 : macération hydroalcoolique des parties aériennes de *L. reflexa* Desf.

Le tableau suivant présente les rendements des extraits obtenus.

Tableau III.5 : les rendements des extraits

Matière végétale	phase	Masse (g)	Rendement (%)
1500 g	Éther de pétrole	3	0.23
	Chloroforme	5	0.33
	Acétate d'éthyle	7	0.54
	<i>n</i> -butanol	45	3

L'étude faite par d'autres chercheurs sur *L. reflexa* a permis l'isolement et l'identification de deux iridoïdes, le β -sitostérol glucosylé et quatre flavones glycosylés. Ces derniers ont donné une activité antiproliférative importante [3] et une inhibition de l'acétylcholinestérase et aussi pour les extraits obtenus [18]. Notre but est d'isoler d'autres composés actifs ou bien investiguer d'autres axes biologique pour les composés et les extraits de notre espèce (Algérienne). Ce travail concerne l'investigation phytochimique et biologique par extraction, fractionnement et purification en utilisant différentes techniques chromatographiques. Les composés purs obtenus sont élucidés structurellement par la combinaison de différentes techniques d'analyses spectroscopiques.

Dans la macération hydroalcoolique de *L. reflexa*, on a eu la formation d'un précipité, après filtration, le précipité obtenu insoluble dans le MeOH, a subi des lavages successive avec du MeOH ce qui a permis l'obtention du composé pur LR C-1 (40 mg, soluble dans DMSO).

6.1.1. Étude phytochimique de la phase chloroforme

L'extrait chloroforme a été fractionné sur flash colonne (FC) de gel de silice (Si 60, 15-25 μ m, Merck) avec un système gradient d'élution *n*-hexane- acétate d'éthyle pour obtenir dix fractions (F1-F10).

Tableau III.6 : Résultats de la séparation par FC de la phase chloroforme de *L. reflexa*

Lots	Fractions	Système d'élution %		Poids de la fraction (mg)	Volume des lots (ml)
		<i>n</i> -hexane	AcOEt		
1-5	LR C1	100	0	15	250
6-17	LR C 2	95	5	142.7	600
18-30	LR C 3	90	10	289	650
31-45	LR C 4	80	20	198.6	750
46-49	LR C 5	70	30	78.6	200
50-57	LR C 6	60	40	143	400
58-69	LR C 7	50	50	276.9	600
70-86	LR C 8	65	35	542.4	850
87-100	LR C 9	80	20	264.8	700
101-145	LR C 10	0	100	765.3	2250

6.1.2. Séparation des composés de la phase chloroforme

a. Étude de la fraction LR C1

La chromatographie de la fraction LR C1 (15 mg) sur plaques préparatives avec comme système *n*-hexane/AcOEt (7/3) a permis l'isolement du composé pur LR C1-1-1 (5 mg, CHCl₃).

b. Étude de la fraction LR C4

L'étude de la fraction LR C4 (198.6 mg) sur flash colonne (FC) de gel de silice, a permis l'obtention de six sous-fractions, la chromatographie de LR C4-3 (17 mg) sur plaques préparatives avec comme éluant *n*-hexane/AcOEt (7/3), nous a permis d'isoler trois produits purs LR C4-3-1 (5.2 mg, CHCl₃), LR C4-3-2 (4 mg, CHCl₃) et LR C4-3-3 (3.7 mg, CHCl₃). La purification de LR C4-5 nous a permis d'isoler le composé LR C4-5-1 (9.6 mg, MeOH).

c. Étude de la fraction LR C8

La chromatographie sur flash colonne de la fraction LR C8 a permis l'obtention de 10 sous-fractions, la purification du LR C8-4 (14 mg) sur plaques préparatives a donné le composé LR C8-4-2 (7 mg, MeOH) et celle de LR C8-11 (17.7 mg) a permis l'isolement du produit LR C8-11-4 (3 mg, MeOH).

6.1.3. Étude phytochimique de la phase AcOEt

L'extrait AcOEt renferme un produit majoritaire sous-forme de cristaux jaune, après plusieurs lavages avec du méthanol, on a obtenu le composé LT AC-1 (700 mg). Le reste de l'extrait a été fractionné avec FC sur gel de silice pour obtenir 7 fractions. La chromatographie de la Fraction LR AC2 sur plaques préparatives avec comme système CHCl₃/MeOH (9/1) a donné le composé pur LR AC2-1 (4 mg, MeOH).

Étude de la phase *n*-BuOH : un précipité blanc a été trouvé dans la phase *n*-butanol. Lavage avec du méthanol nous a permis l'obtention du composé LR B-1 (48 mg, DMSO).

6.2. Étude comparative du profil LC-MS de *L. reflexa*

Une étude comparative des rendements, la composition chimique et l'activité biologique de deux extraits avec deux techniques différentes (macération hydroalcoolique et extraction par ultrason).

6.2.1. L'extraction hydroalcoolique

La macération des parties aériennes (15 g) de *L. reflexa*, a été réalisée avec un mélange hydroalcoolique MeOH/H₂O (8/2). Le profil LC-MS de l'extrait obtenu (0.69 g) a permis la détection de 12 pics ainsi que leurs rendements.

6.2.2. L'extraction ultrasonique

On utilisant un bain ultra-son sonicator Bandelin Sonorex RK510H (Germany) à 35 KHz et P180/320W, 15 g des parties aériennes de *L. reflexa* ont été macérées dans le méthanol pendant 2h à une température ambiante. Le solvant a été évaporé avec un évaporateur rotatif pour obtenir l'extrait méthanol (3.5 g).

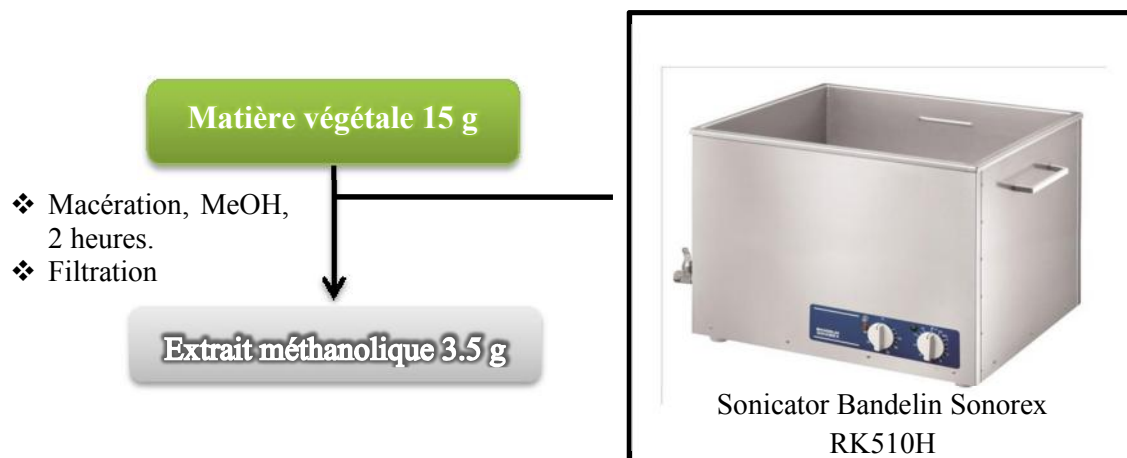


Figure III.5 : l'extraction par ultrason

Le profil LC-MS de cet extrait a permis la détermination de la composition chimique avec la détection de 16 pics.

6.2.3. Étude phytochimique de l'extrait MeOH de *L. reflexa*

Une investigation phytochimique par CC (RP-18), en commençant par MeOH/H₂O 2/8 (v/v) jusqu'à 100% méthanol, a été effectuée pour obtenir 25 fractions. Le choix des fractions étudiées a été réalisé en se basant sur le profil LC-MS.

a. Étude de la fraction LR Me 7

L'étude de cette fraction sur CCM avec comme système d'élution CH₂Cl₂/MeOH (85/15) et après purification par HPLC en utilisant le système acétonitrile/H₂O (15/85) comme éluant, nous a permis d'isoler deux produits : LR Me 7-1 (3.2 mg, MeOH) et LR Me 7-2 (1.4 mg, MeOH).

b. Étude de la fraction LR Me 10

L'investigation de LR Me10 sur colonne de gel de silice (2 g) avec un système gradient CHCl₃/isopropanol nous a permis l'obtention de 12 sous-fractions dans la quelle LR

Me 10-9 (67 mg) est la plus importante. La séparation de cette fraction sur plaques préparatives a donné le composé LR Me 10-9-3 (5 mg, MeOH).

7. Activités biologiques

Les espèces de ce genre sont connus pour leurs utilisations en médecine traditionnelle, l'activité biologique est indispensable pour notre étude. Elle est divisée en trois axes : le premier concerne les tests *in vitro* des extraits, le second axe couvre les tests *in vivo* de quelques extraits et le dernier axe c'est le *Docking*, qui est le calcul de l'activité de nos produits sur quelques enzymes. Ce calcul est utilisé pour les produits majoritaires de l'espèce *L. reflexa*.

Les activités biologiques étudiées pour les extraits sont l'activité antioxydante (*in vivo* & *in vitro*), anti-inflammatoire (*in vitro*), antidiabétique (*in vivo*) et antimicrobienne (*in vitro*).

7.1. Activité antioxydante

7.1.1. *In vitro*

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par trois techniques chimiques à savoir : l'effet scavenger du radical DPPH, l'activité du pouvoir réducteur et le teste de blanchissement du β -carotène.

7.1.1.1. L'effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH des deux espèces a été évaluée par le test de DPPH° (1, 1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyle) on se basant sur la méthode de Magalhaes *et al.* [21]. Après 30 minutes d'incubation d'un mélange d'un 1 ml d'une solution de DPPH (0.2 mM) et 1 ml de l'extrait, la lecture spectrophotométrique a été effectuées à 517 nm. Les références standards utilisées pour la comparaison sont la vitamine C, trolox et la quercétine. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon l'équation suivante:

$$\% \text{ Inhibition du DPPH} = (\text{Abs control} - \text{Abs échantillon}) / (\text{Abs control} \times 100)$$

où Abs est l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

7.1.1.2. L'activité du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur du fer par l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* et *L. reflexa* a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu [22]. Différentes concentrations de l'extrait ont été ajoutées à 1 ml de tampon phosphate (0.2 M; pH 6.6) et 1 ml $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %).

Après avoir chauffé le mélange à 50 °C dans un bain marie durant 20 min, 1 ml de TCA (10 %) a été ajouté ensuite le mélange fut centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance de 1.5 ml du surnageant mélangé avec 2.5 ml d'eau fut lu à 700 nm. Trolox et BHA ont été utilisés comme références.

7.1.1.3. Teste de blanchissement de la β -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène exprimée via sa décoloration par les produits issus de l'oxydation de l'acide linoléique en adoptant la méthode décrite par Miller (1971) [23] modifiée par Miraliakbari et Shahidi (2008) [24]. L'émulsion de β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation complète du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, 200 μ l de la solution de l'extraits ou de la référence (Trolox) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) furent additionnés à 4 ml de l'émulsion. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs}_{t=48h} (\text{échantillon})}{\text{Abs}_{t=48h} (\text{BHT})} \times 100$$

7.1.2. *In vivo* (l'activité antioxydante et hepatoprotectrice)

Les rats ont été traités simultanément par une dose de 300 mg/kg de Dépakine et une dose de 200 mg/kg des extraits *n*-butanol de *L. tingitana* ou *L. reflexa* par jour durant 14 jours. L'effet protecteur des deux plantes, a été évalué en dosant les transaminases (enzymes hépatocytaires) ALT et AST au niveau du sérum ainsi que le taux du malonaldehyde (MDA) au niveau des homogénats et qui représente un indicateur important du stress oxydant [25].

7.2. Activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

La solution d'Alsever est préparée en dissolvant le dextrose (2%), l'acide citrique (0.8%), le citrate de sodium (0.05%) et le chlorure de sodium (0.42%) dans l'eau distillée. Le sang a été collecté est mélangé avec un volume équivalant de la solution d'Alsever et centrifugé à 3000 rpm. Les cellules récupérées (HRBC) ont été lavées avec une solution saline isotonique. Différentes concentrations de l'extrait *n*-butanol de *L. tingitana* et *L. reflexa* ont été préparées dans 1 ml de solution tampon phosphate. 1 ml de chacune a été ajouté à 2 ml d'une solution hyposaline et 0.5 ml de la suspension HRBC. Après l'incubation à 37 °C

durant 30 minutes et la centrifugation, le taux d'hémoglobine dans le surnageant issu a été estimé à 560 nm [26]. Le sodium diclofenac a été utilisé en tant que standard. Le pourcentage de la stabilité membranaire des HRBC est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Le pourcentage de l'inhibition d'hémolyse} = 100 \times (1 - \text{Abs Echantillon} / \text{Abs Controle})$$

7.3. Activité antidiabétique

Vu l'inexistence d'une recherche bibliographique sur l'activité antidiabétique du genre *Linaria*, on a étudié cette activité sur l'espèce *L. reflexa* connu pour ces effets cicatrisants en médecine traditionnelle.

7.3.1. Matériel végétal et préparation des extraits

Les parties aériennes de la plante ont été lavées, séchées à température ambiante dans l'obscurité et ensuite finement broyées.

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode traditionnelle; environ 6 g de la poudre de plante sont mis dans de l'eau bouillante. L'infusé est laissé refroidir pendant 15 minute à température ambiante. Après filtration, le volume final est noté pour le calcul des différentes doses administrées. Il est utilisé tel qu'il est pour le test antidiabétique sur les animaux.

7.3.2. Les animaux

Des rats *Wistar albinos* pesant entre 180 et 200 g ont été ramenés de l'Institut Pasteur d'Algérie (Centre d'élevage, Kouba, Alger). Ils ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une semaine. Les animaux ont été alimentés ad libitum avec le régime de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont la composition est citée au tableau III.7, et de l'eau. Ils ont été gardés et maintenus dans les conditions de température et de lumière ambiante.

Tableau III.7 : Composition du régime croquette (ONAB Bejaia)

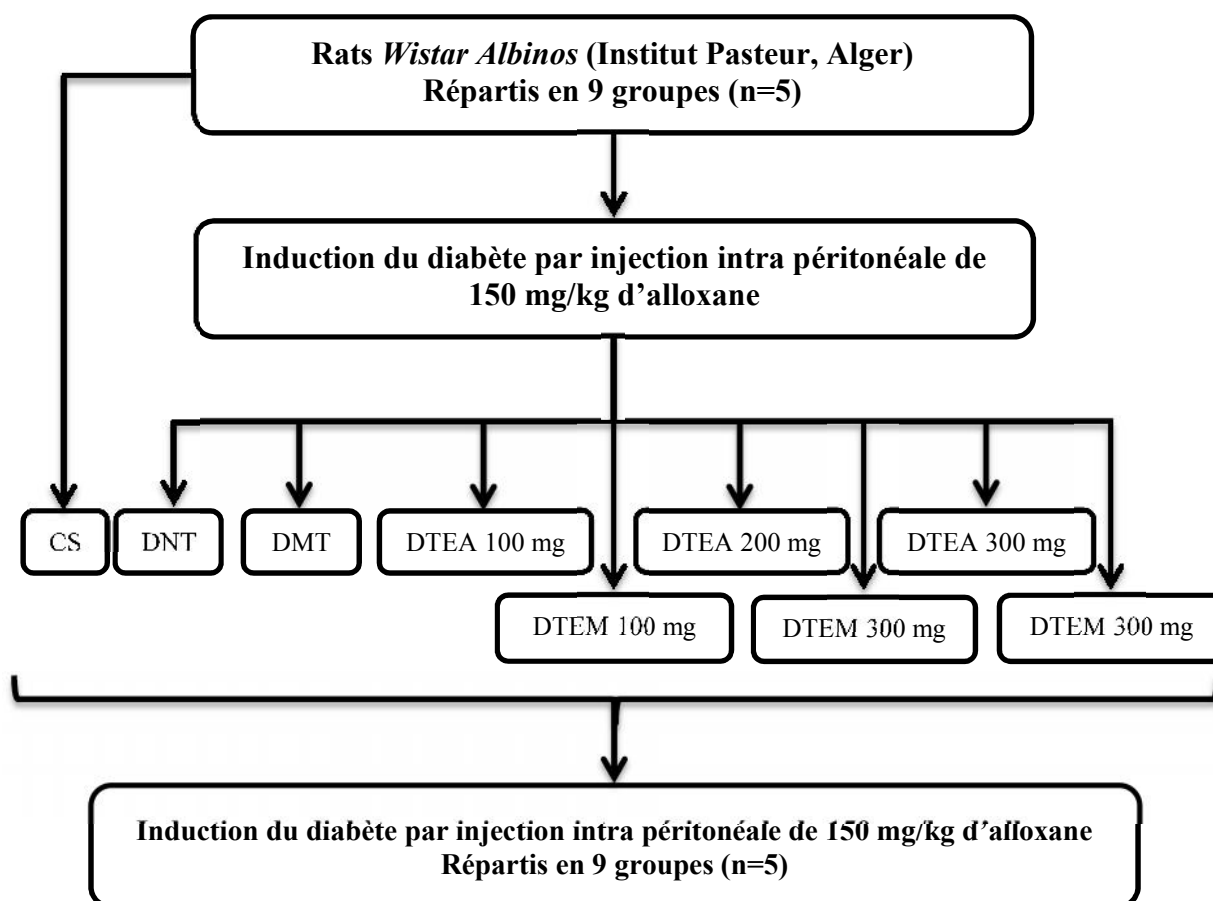
Composants	%
Mais	52.80
Son	10.80
Soja	32.10
Calcaire	01.50
Phosphate	00.80
Complément vitaminique	02.00

7.3.3. Induction du diabète

Les rats ont été injectés par voie intra péritonéale avec du monohydrate d'Alloxane (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans l'eau saline stérile à une dose de 150 mg/kg de poids corporel [27]. Après 3 jours, l'hyperglycémie a été confirmée en utilisant un glucomètre Actif Accu-Chek (Roche Diagnostic, Allemagne). Seuls les rats ayant des taux de glucose sanguin supérieur à 200 mg/dl ont été choisis et utilisés dans cette étude [27].

7.3.4. Protocole expérimentale

Les rats ont été aléatoirement divisés en neuf groupes, chaque groupe est composé de cinq rats, selon la figure III.6.



CS: contrôle sain; DNT: Diabétiques non traités; DTM: Diabétiques traités par 5 mg/kg de glibenclamide; DTEA 100 mg: Diabétiques traités par 100 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante; DTEA 200 mg: Diabétiques traités par 200 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante; DTEA 300 mg: Diabétiques traités par 300 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante; DTEM 100 mg: Diabétiques traités par 100 mg/kg p.c. l'extrait méthanolique de plante; DTEM 200 mg: Diabétiques traités par 200 mg/kg p.c. l'extrait méthanolique de plante; DTEM 300 mg: Diabétiques traités par 300 mg/kg p.c. l'extrait méthanolique de plante.

Figure III.6 : Protocole expérimental.

Les préparations (médicament, infusé, extrait méthanolique et eau) sont données oralement aux rats des neuf groupes deux fois par jour pendant 15 jours.

7.3.5. Suivi des animaux avant sacrifice

- **Poids corporel**

Les rats ont été pesés chaque cinq jour grâce à une balance (KERN)

- **Glycémie**

Le sang a été prélevé de la queue du rat avant l'administration d'extraits pour la détermination du taux de glucose sanguin en utilisant un glucomètre Accu-Chek. Les résultats ont été exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = \frac{\text{glycémie finale} - \text{glycémie initiale}}{\text{glycémie initiale}} \times 100$$

- (+) : indique une augmentation de la glycémie.
- (-) : indique une diminution de la glycémie.

7.3.6. Dosage biochimique sanguin après sacrifice

A la fin des 15 jours du traitement, les rats sont sacrifiés le matin à jeun. Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Le taux du glucose, cholestérol, triglycérides, lipides totaux, HDL, LDL, protéines totales, TGO, TGP, urée et créatinine ont été mesurés. Tous les paramètres ont été dosés selon la fiche technique Spinreact.

7.3.7. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm écart type et les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0,05$.

Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB Version 13 d'analyse et de traitement statistique des données. Des comparaisons de groupe ont été exécutées par l'analyse de variance ANOVA. La différence significative entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux a été évalué par le test t de Student.

7.4. Activité antimicrobienne

Cette activité est effectuée par les extraits des deux plantes étudiées à savoir : *L. tingitana* et *L. reflexa*. Ces extraits représentent ceux de l'éther de pétrole, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle, du *n*-butanol et du méthanol. Cette étude est basée sur les tests biologiques afin de déterminer l'efficacité de ces deux plantes par rapport à leurs compositions chimiques.

Selon la littérature, l'activité antimicrobienne de *L. tingitana* et *L. reflexa* n'a pas été investiguée auparavant.

7.4.1. Activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri-Constantine. Cependant, le calcul *Docking* a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie Bio-Organique, Université de Trento, Italie.

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose.

7.4.1.1. Souches bactériennes

Le test antibactérien est effectué par trois bactéries de Gram différents, dont deux sont fournies par l'hôpital militaire de Constantine, il s'agit d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* (Gram -) et un *Bacillus sp* (Gram +) fournie par le LaMyBAM.

7.4.1.2. Milieux de culture

Deux milieux de cultures, destinés au développement bactériens, sont utilisés pour la réalisation des tests antibactériens, il s'agit de la Gélose Nutritive et de la gélose Mueller Hinton, leurs compositions en gramme par litre est la suivante :

- Gélose nutritive (**G.N** : peptone 10 g, extrait de viande 5 g, chlorure de sodium 5 g, gélose 15 g, l'eau distillé 1 L).
- Gélose Mueller Hinton (**M.H** : infusion de bœuf 300 g, l'hydrolysat acide de Caséine 17.5 g, amidon 1.5 g, gélose 17 g, l'eau distillé 1 L).

7.4.1.3. Méthode de diffusion en milieu gélose**✓ Principe****Préparation de l'inoculum bactérien**

Chaque souche a étéensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice (gélose nutritive et gélose Mueller Hinton) pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24 heures à 37 °C pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et à 30 °C pour *Bacillus sp.*, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, cette préparation est bien homogénéisée en utilisant un vortex.

Ensemencement et incubation

Un volume de 0.1 ml est prélevé à partir de la solution bactérienne précédente et est déposé sur la surface des boîtes de Pétri contenant de la Gélose Nutritive. Un étalement de ce volume est effectué à l'aide d'un étaleur stérile à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Après séchage des boîtes, la gélose est perforée, à l'aide d'un perforateur stérile de 6mm de diamètre, afin de former des puits qui vont contenir, par la suite, les différents extraits de chaque plante. Des puits témoins, contenant uniquement les solvants d'extraction, sont réalisés afin de tester l'éventuelle activité antibactérienne de ces solvants. La même méthode est appliquée avec la Gélose Mueller Hinton. Les préparations sont incubées à 37°C pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et à 30 °C pour *Bacillus sp.* Pendant 24 à 48 heures.

Expression des résultats

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

7.4.1.4. Les calculs de *Docking* pour l'enzyme 3HO2

On a utilisé le logiciel vina AutoDock pour calculer l'inhibition de nos trois flavones la pectolarine, la linariine et la pectolarigenine, les deux premiers sont majoritaires pour l'espèce *L. reflexa*. Le test a été réalisé sur une protéine isolée à partir d'*Escherichia Coli* K-12. L'enzyme investigué est nommé 3HO2, une structure sous-forme d'une chaîne, isolée à partir d'*Escherichia coli*.

7.4.2. Activité antifongique

Ce test est effectué au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Constantine 1. L'activité antifongique des extraits a été déterminée selon les méthodes de diffusion en milieu gélosé [28].

7.4.2.1. Souches fongiques

Les souches fongiques utilisées englobent une levure du genre *Yarrowia*, une du genre *Candida* et une moisissure du genre *Alternaria*.

7.4.2.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans le présent travail sont favorables pour le développement des souches fongiques utilisées il s'agit des milieux suivants :

- Yeast Starch Agar (YSA : extrait de levure 4 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, amidon soluble 15 g, gélose 20 g, eau distillé 1 L).
- Potato Dextrose Agar (PDA : D-glucose 20 g, l'extrait de pomme de terre 200 g, gélose 20 g, eau distillé 1 L)

7.4.2.3. Méthode de diffusion en milieu gélose

✓ Principe

Deux méthodes sont utilisées pour le test antifongique, la première, destinée à la levure, est celle de la diffusion sur milieu gélose (décrite pour le test antibactérien), et la deuxième, destinée à la moisissure, est celle de la confrontation à distance.

La première méthode est celle appliquée pour le test antibactérien. Après étalement et séchage de la suspension levurienne sur la surface du milieu de culture, la gélose est perforée, à l'aide d'un perforateur stérile de 6mm de diamètre, afin de former des puits contenant les différents extraits de chaque plante à tester. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 2 à 3 jours.

Par ailleurs, le test antifongique réalisé par la méthode de confrontation à distance, vis-à-vis d'*Alternaria sp.* est effectué selon le principe suivant :

Après avoir coulé la gélose PDA sur les boîtes de Pétri, un puits est formé sur la gélose à droite de la boîte de Pétri. Ensuite, un disque gélosé contenant la souche d'*Alternaria sp.*, pure et âgée de 6 jours, est placé à côté du puits précédant séparé d'une distance d'environ 3 cm. La présence de l'activité antifongique, se manifeste par l'inhibition de la

croissance de la moisissure en développant une zone de lyse par le solvant testé qui va diffuser sur la gélose. Les préparations sont incubées à 30°C pendant 5 à 6 jours.

✓ Expression des résultats

L'activité antifongique a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition développée sur la gélose.

Conclusion :

L'investigation phytochimique en utilisant différentes méthodes chromatographiques de deux espèces : *L. tingitana* et *L. reflexa* nous a permis d'isoler 21 produits ainsi que la détection par LC-MS et GC-MS de quelques composés pour différents extraits étudiés.

Références bibliographiques

- [1] Pahlow M.
El Gran Libro de las Plantas Medicinales. Ed. Everest S.A. Madrid, 4. **1979**.
- [2] Baytop T.
Therapy with Medicinal Plants in Turkey, Past and Present. *Nobel Tip Kitapevi*. Istanbul. **1999**.
- [3] Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F.
Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15:4757–4760.
- [4] Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, de la Puente ML, Garcia-Grávalos MD, San Feliciano A.
Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**. 7:1649.
- [5] Akkol EK, Ercil D.
Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharm. Biol.* **2009**. 47:188–194.
- [6] Gonuz A, Dujger B, 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.
- [7] Liman R, Gökçe UG, Akyıl D, Eren Y, Konuk M.
Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*. *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**. 22:541–548.
- [8] Aydogdu I, Zihnioglu F, Karayildirim T, Gulcemal D, Alankus-Caliskan O, Bedir E.
 α -glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *ericalyx*. *Nat. Prod. Commun.* **2010**. 5:841–844.
- [9] Vrchovska V, Spilkova J, Valentao P, Sousa C, Andrade PB, Seabra RM.
Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. *Nat. Prod. Res.* **2008**. 22:735–746.
- [8] Hua H, Cheng M, Li X, Pei Y.
A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**. 50:1393–1394.
- [9] Otsuka H.
Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* **1995**. 39:1111–1114.
- [10] Ilieva E, Handjieva N, Spassov S, Popov S.
5-O-allosylantirrhinoside from *Linaria* species. *Phytochemistry.* **1993**. 32:1068–1070.
- [11] Maria F, Hassina H, Catherine L, Hamada H, Christophe L, Mohammed B.
Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum. subsp. *fruticosa*. *Bioch. Sys. & eco.* **2010**. 38:833–835.
- [12] Otsuka H.
Isolation of isolinariin A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J. Nat. Prod.* **1992**. 55:1252–1255.
- [13] Tundis R, Deguin B, Dodaro D, Statti GA, Tillequin F, Menichini F.
Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.) Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). *Bioch. Sys. & eco.* **2008**. 36:142–145.
- [14] Kouichi M, Takashi T, Isao K, Toshihiro F, Yuki Y, Kanji I.
New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J. Nat. Med.* **2011**. 65:172–175.
- [15] Ahmed UV, Kousar F, Zubair M, Khan A, Ali MS, Choudhary I, Sener B.

- A new iridoid glycoside from *Linaria genestifolia*. *Fitoterapia*. **2006**. 77:12–14.
- [16] Otsuka H.
Phenylethanoids from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1993**. 32:979–981.
- [17] Bonesi M, Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Menichini F, Tillequin F, Menichini F.
In vitro biological evaluation of novel 7-*O*-dialkylaminoalkyl cytotoxic pectolinarigenin derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**. 18:5431–5434.
- [18] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Statti GA, Deguin B, Tillequin F, Menichini F, Houghton PJ.
Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2007. 2:759–763.
- [19] www.ZipcodeZoo.com
- [20] Quezel P, Santa S.
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS*. Paris. **1963**. vol 2.
- [21] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC.
Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta*. **2006**. 558:310–318.
- [22] Oyaizu M.
Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **1986**. 44:307–315.
- [23] Miller HE.
A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Amer. Oil Chem Soci.* **1971**. 48:91.
- [24] Miraliakbari H, Shahidi F.
Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* **2008**. 111:421–427.
- [25] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.
Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**. 95:351–358.
- [26] Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantiwar AS, Dikshit VJ, Saraf VO.
Membrane stabilizing activity a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*. **1999**. 70:251–257.
- [27] Matteucci E, Giampietro O.
Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharma.* **2008**. 115:163–172.
- [28] Perez C, Paul M, Bazerque P.
An antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta. Biol. Med. Exp.* **1990**. 15:113–115.



Chapitre

Résultats et

discussion

Introduction

L'investigation phytochimique de sept extraits de deux espèces du genre *Linaria* de la flore Algérienne, a permis d'isoler et d'identifier plusieurs produits. Ces extraits correspondant aux phases éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *L. tingitana* et chloroforme, acétate d'éthyle, *n*-butanol et méthanol de *L. reflexa*. Quelques extraits sont ensuite soumis à des tests biologiques: antioxydante (*in vitro*, *in vivo*), l'anti-inflammatoire (*in vitro*), l'antidiabétique (*in vivo*) et l'antimicrobienne (*in vitro*, Docking).

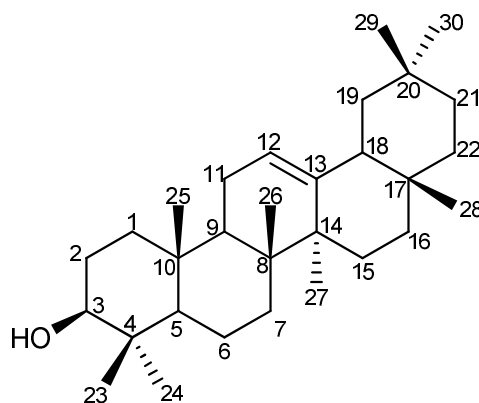
1. Identification des produits isolés de *L. tingitana*

1.1. Éluclation structurale du composé LT C-7

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.1.1) enregistré dans le CDCl_3 ainsi que son spectre étalé (figure IV.1.2), sont semblables à ceux attendus pour un oléane par la présence des signaux caractéristiques de ce squelette [1]:

- ✓ six singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 1.06, 0.92, 0.90, 0.87, 0.76$ et 0.71 ppm et un singulet d'intégration 6H à $\delta_{\text{H}} = 0.80$ ppm, attribuables aux protons de huit méthyles.
- ✓ un doublet dédoublé ($J = 11.3, 4.5$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 3.14$ ppm, qui ne peut être que le H-3 caractéristique de l'oléane.
- ✓ Un triplet ($J = 3.7$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 5.11$ ppm attribuable à un proton oléfinique le H-12.

La présence de huit méthyles sous-forme de singulets et des protons H-12 et H-3 oriente vers la structure d'un β -amyrine. Cette proposition sera confirmée par les expériences RMN ^{13}C et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY).



L'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.1.3) permet l'attribution des carbones suivants :

- Le proton H-12 permet l'attribution ducarbone C-12 à $\delta_C = 121.8$ ppm.
- Le proton H-3 permet l'attribution ducarbone oxygéné C-3 à $\delta_C = 79.1$ ppm.

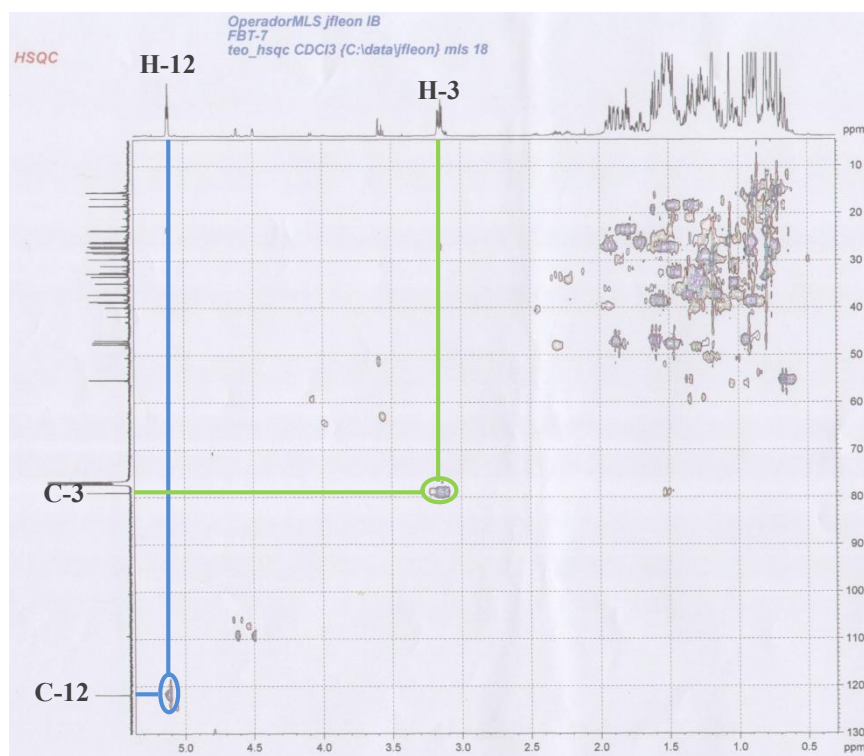


Figure IV.1.3: Spectre RMN HSQC de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'analyse des spectres RMN ^{13}C et ses séquences DEPT 90 et 135 (figure IV.1.4, IV.1.5) et par comparaison avec les résultats de la bibliographie [1] permettent l'attribution des signaux des atomes de carbones:

- Le spectre RMN ^{13}C compte 30 signaux d'atomes de carbones, dont 5 CH (DEPT 90) et 18 autres signaux de type CH_2 et CH_3 (DEPT 135 et DEPT 90) et 7 carbones quaternaires.
- Le signal à $\delta_C = 145.2$ ppm attribuable à un carbone éthylénique qui ne peut être que le C-13.
- Trois signaux à $\delta_C = 55.3$, 47.7 et 47.3 ppm dans le DEPT 90 attribuables aux carbones C-5, C-9 et C-18 respectivement.
- Dix signaux dans le DEPT 135 à $\delta_C = 46.9$, 38.7, 37.2, 34.8, 32.5, 27.3, 27, 26.2, 23.6 et 18.4 ppm correspondent aux groupements CH_2 en positions 1, 2, 6, 7, 11, 15, 16, 19, 21 et 22.

- Huit signaux à $\delta_C = 33.3, 28.4, 28.1, 26.0, 23.7, 16.8, 15.6$ et 15.5 ppm attribuables aux groupements méthyles (ils sont présents dans la partie supérieur du spectre DEPT 135 et absents dans celui du DEPT 90): CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-27, CH₃-28, CH₃-29 et CH₃-30.
- Sept signaux des carbones quaternaire à $\delta_C = 41.8, 39.9, 38.8, 37.0, 32.5, 31.1$ et 145.2 ppm attribuables aux carbones C-4, C-8, C-10, C-13, C-14, C-17 et C-20.

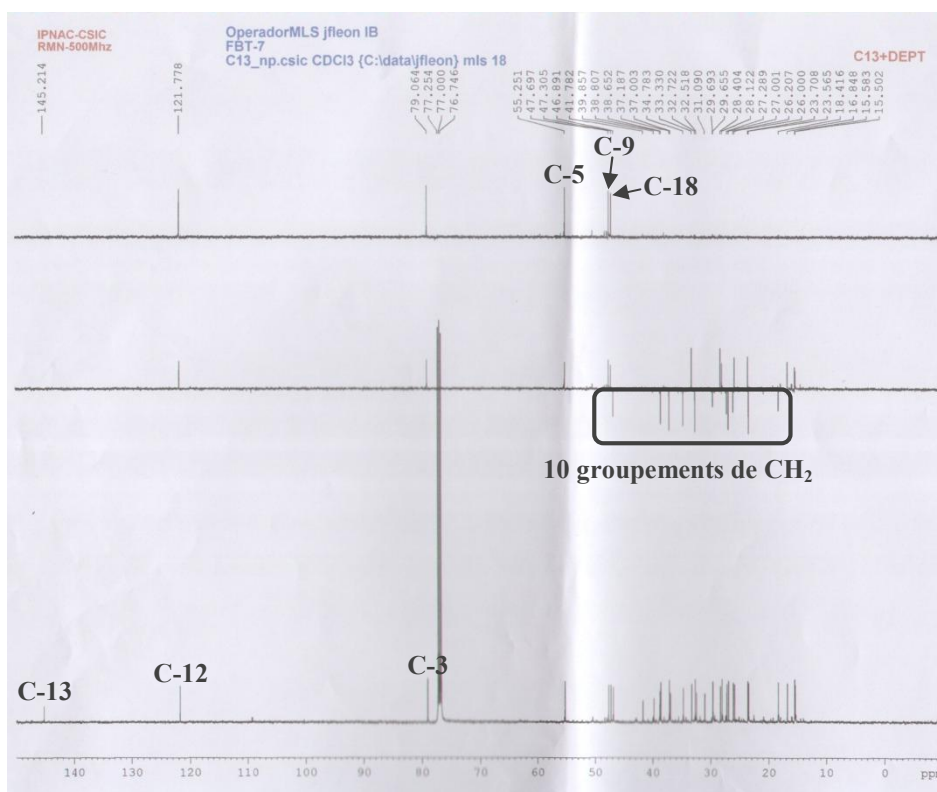


Figure IV.1.4: Spectre RMN ¹³C et DEPT de LT C-7 (125 MHz, CDCl₃, δ ppm)



Figure IV.1.5: Spectre RMN ^{13}C et DEPT alé de LT C-7 (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'étude des spectres relatifs à l'expérience HMBC (figures IV.1.6, IV.1.7, IV.1.8, IV.1.10, IV.1.11, IV.1.14 et IV.1.15) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indices suivantes :

- ✓ Le proton H-12 montre six tâches de corrélation :
 - ✓ La première avec le signal du carbone C-13 à $\delta_{\text{C}} = 145.2$ ppm.
 - ✓ La deuxième est une tâche autocorrélation avec le carbone C-12 à $\delta_{\text{C}} = 121.8$ ppm.
 - ✓ La troisième et la quatrième avec les deux signaux à $\delta_{\text{C}} = 47.7$ et 47.3 ppm des CH attribuables aux carbones C-9 et C-18, respectivement.
 - ✓ La cinquième avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 41.8$ ppm qui ne peut être que le C-14.
 - ✓ La sixième avec le signal d'un CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 23.6$ ppm, attribuable à C-11.
 - ✓ Le proton H-3 montre six tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal du carbone C-3 à $\delta_{\text{C}} = 79.6$ ppm.
 - ✓ La deuxième avec le signal d'un CH_3 à $\delta_{\text{C}} = 28.1$ ppm qui ne peut être que le C-23.
 - ✓ La troisième avec le signal à $\delta_{\text{C}} = 15.6$ ppm attribuable au méthyle CH_3 -24.
 - ✓ La quatrième avec le signal d'un CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 27.3$ ppm qui peut être le C-2 ou le C-1. Le spectre HSQC permettra de localiser les protons correspondant à ce signal ($\delta_{\text{C}} = 27.3$ ppm)

à $\delta_H = 1.52$ ppm, ces derniers dans le spectre HMBC (figure IV.1.10) corrélient avec le C-4 ($\delta_C = 38.8$ ppm) donc ces protons sont ceux du carbone C-2.

- ✓ La cinquième et la sixième sont avec deux signaux à $\delta_C = 38.8$ et 38.7 ppm, le premier est le C-4, le second est un CH_2 qui ne peut être le C-1.

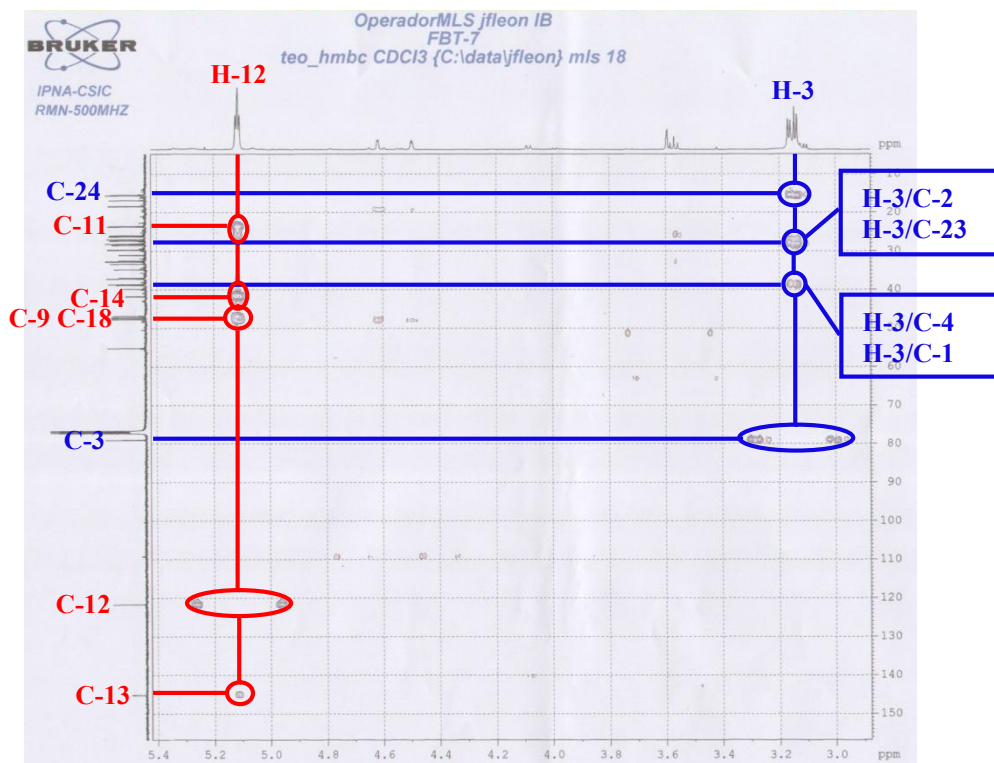
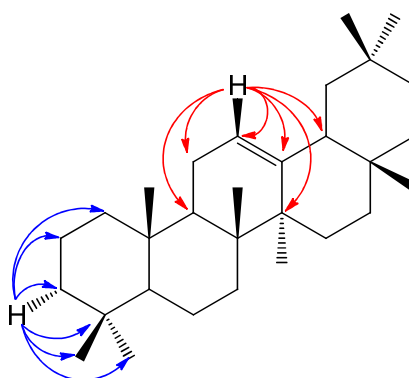


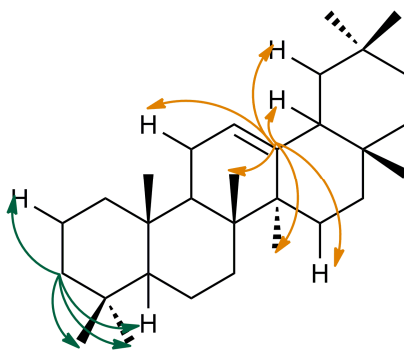
Figure IV.1.6: Spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)



- ✓ Le C-3 montre quatre tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal d'un CH sous-forme de doublet dédoublé à $\delta_H = 0.67$ ppm attribuable à H-5, ce dernier montre dans le spectre HSQC une tâche de corrélation avec le C-5 à $\delta_C = 55.3$ ppm.
- ✓ La seconde avec le signal des protons sous-forme d'un singulet à $\delta_H = 0.71$ ppm attribuable aux protons du méthyle CH_3 -24.

- ✓ La troisième avec le signal des protons sous-forme d'un singulet à $\delta_H = 0.92$ ppm attribuable aux protons du méthyle CH₃-23.
- ✓ La quatrième avec le signal des protons sous-forme de multiplet dans la zone 1.4-1.6 ppm (CH₂-1 ou CH₂-2). Ces derniers, dans le spectre COSY, couplent avec le H-3, donc ces protons sont attribuables à ceux de CH₂-2.
 - ✓ Le carbone C-13 montre six tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 1.06$ ppm attribuable aux protons du méthyle CH₃-27 ($\delta_C = 26$ ppm).
 - ✓ La deuxième avec les signaux de deux protons sous-forme de multiplet d'un CH₂ à $\delta_H = 1.60$ et 0.95 ppm (DEPT 135 et HSQC), attribuables aux deux protons CH₂-15 ou bien CH₂-19, mais l'absence d'une tâche de corrélation de ces protons (HMBC) avec le carbone du méthyle CH₃-27 prouve que ces protons sont ceux de CH₂-19.
 - ✓ La troisième avec les signaux de deux protons sous-forme de multiplet d'un CH₂ à $\delta_H = 1.70$ et 0.90 ppm ($\delta_C = 26.2$ ppm), ces protons montrent aussi une tâche de corrélation (HMBC) avec le carbone de CH₃-27 ($\delta_C = 26$ ppm) donc ils ne peuvent être que ceux de CH₂-15.
 - ✓ La quatrième avec un signal sous-forme de multiplet d'un CH à $\delta_H = 1.90$ ppm ($\delta_C = 47.3$ ppm), qui ne peut être que le proton de C-18.
 - ✓ La cinquième avec deux signaux de deux protons à $\delta_H = 1.79$ ppm de C-11 déterminés en dessus par leurs corrélation avec le proton de C-12 dans le spectre COSY (spectre IV.1.9), notant aussi la présence de deux tâches de corrélation dans le spectre HMBC avec le carbone C-9 ($\delta_C = 47.7$ ppm). L'attribution de ce dernier est confirmée par ces deux tâches de corrélation avec les deux singulet des protons de deux méthyles CH₃-25 ($\delta_H = 0.86$ ppm) et CH₃-26 ($\delta_H = 0.89$ ppm).
 - ✓ La sixième avec le signal des protons d'un CH₃ à $\delta_H = 0.89$ ppm ($\delta_C = 16.8$ ppm), attribuable à CH₃-26.



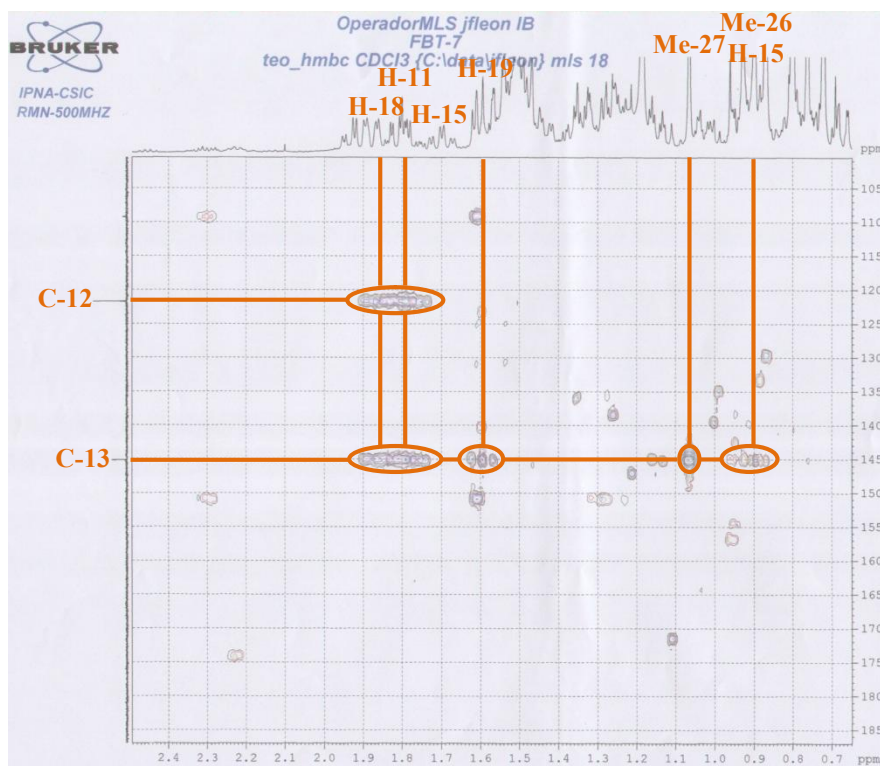


Figure IV.1.7: Spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl₃, δ ppm)

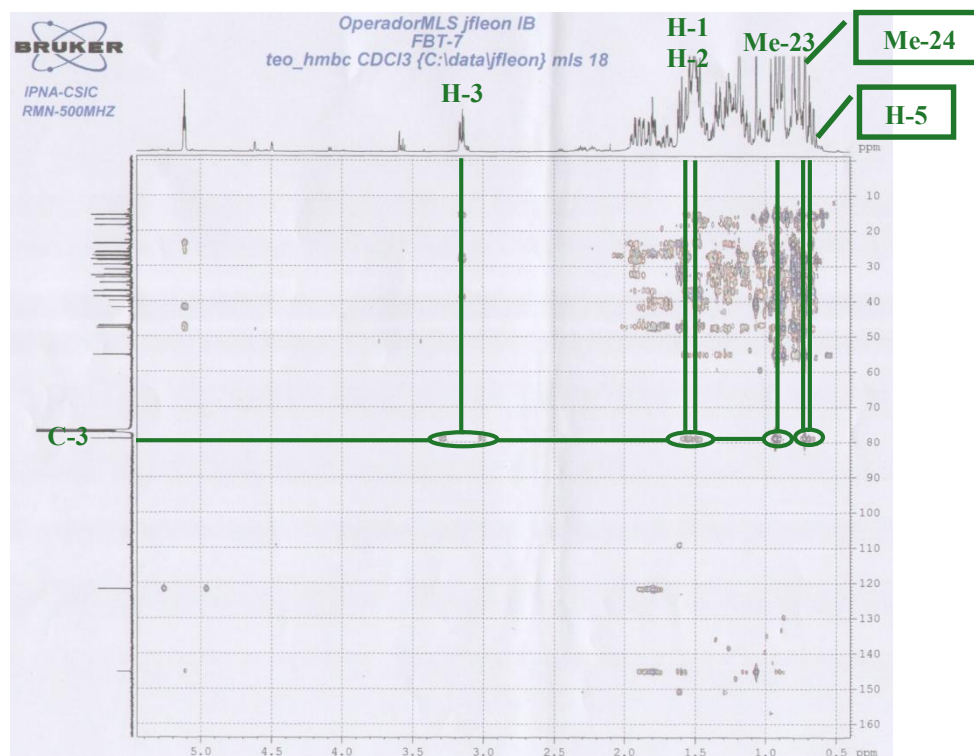


Figure IV.1.8: Spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl₃, δ ppm)

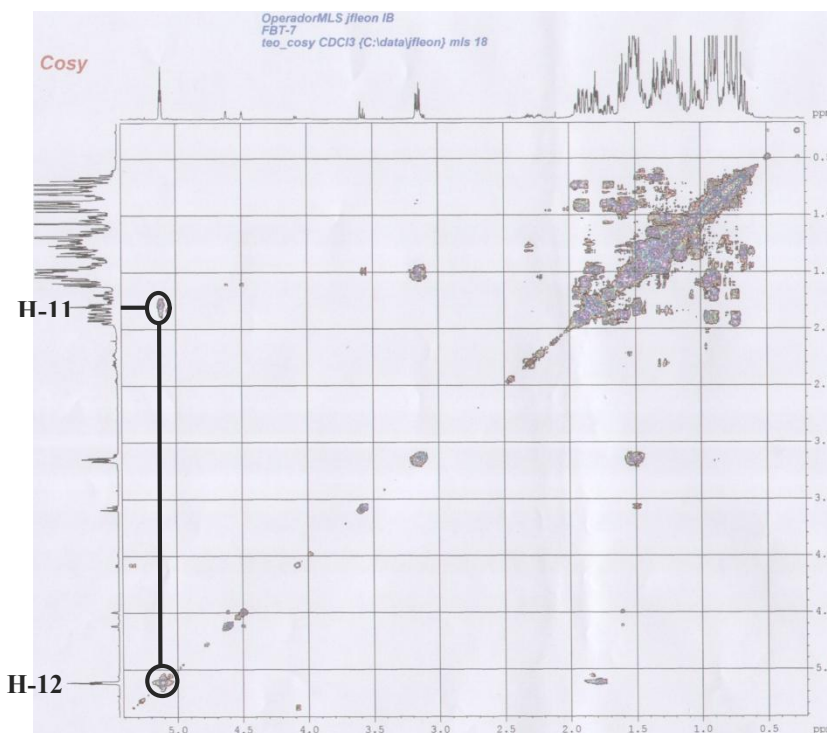
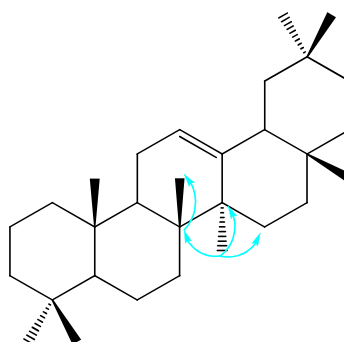


Figure IV.1.9: Spectre COSY de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

- ✓ Les protons de CH_3 -27 montrent trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le carbone quaternaire C-14 à $\delta_{\text{C}} = 41.8$ ppm.
 - ✓ La deuxième avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 39.9$ ppm qui ne peut être que le C-8, ce dernier montre une tâche de corrélation avec le singulet des protons de CH_3 -26 à $\delta_{\text{H}} = 0.89$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 16.8$ ppm).
 - ✓ La troisième avec le signal du carbone C-15 à $\delta_{\text{C}} = 26.2$ ppm.



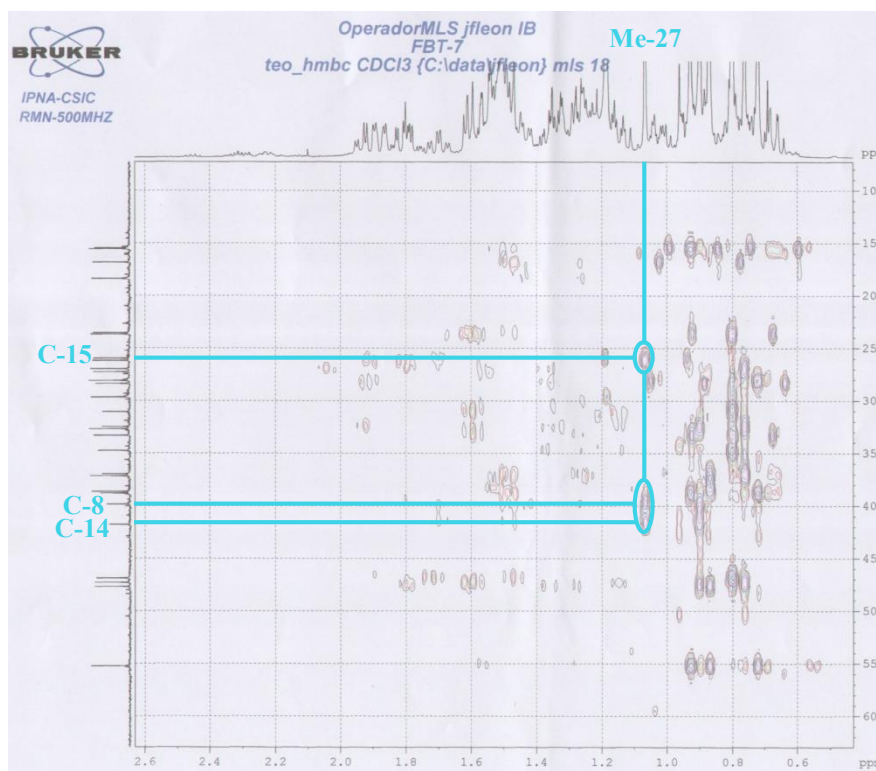


Figure IV.1.10: Spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

- ✓ Le H-5 montre huit tâches de corrélation:
- ✓ La première grande tâche avec deux carbones, le premier à $\delta_C = 15.6$ ppm qui est celui de CH_3 -24 ($\delta_H = 0.71$ ppm) et le second à $\delta_C = 15.5$ ppm qui ne peut être que le CH_3 -25 ($\delta_H = 0.86$ ppm).
- ✓ La deuxième et la troisième avec deux CH_2 à $\delta_C = 32.5$ et 18.4 ppm attribuables aux carbones C-7 et C-6 respectivement.
- ✓ La quatrième avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_C = 37$ ppm, ce dernier dans le spectre HMBC montre aussi une tâche de corrélation avec les protons de CH_3 -25 ce qui prouve que c'est le C-10.
- ✓ La cinquième avec le signal du carbone quaternaire C-4 à $\delta_C = 38.8$ ppm, ce dernier dans le spectre HMBC montre deux tâches de corrélation avec deux singulets des protons des méthyles CH_3 -23 et CH_3 -24 ($\delta_H = 0.92$ et 0.71 ppm).
- ✓ La sixième avec le signal du carbone C-3 à $\delta_C = 79.1$ ppm.
- ✓ La septième avec le signal du carbone d'un CH de C-9 à $\delta_C = 47.7$ ppm.
- ✓ La huitième avec le signal du carbone d'un CH_2 de C-1 à $\delta_C = 38.7$ ppm.

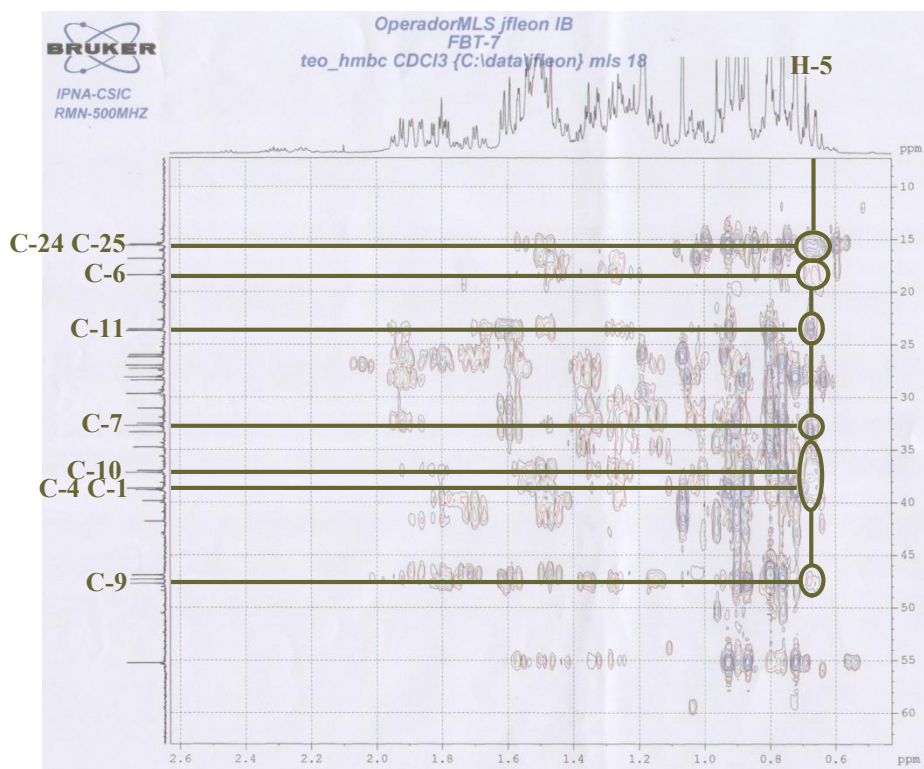
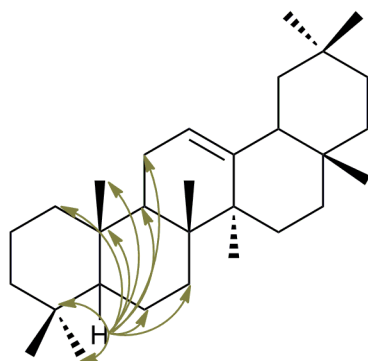


Figure IV.1.11: Spectre HMBC étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

Dans le spectre COSY, on nota la présence de deux tâches de corrélation des deux protons de CH_2 -19 et le signal du proton à $\delta_{\text{H}} = 1.90$ ppm, ce dernier donne une tâche de corrélation dans le spectre NOESY avec le proton vinylique H-12 (figure. IV.1.13), donc ce proton ne peut être que celui du H-18.

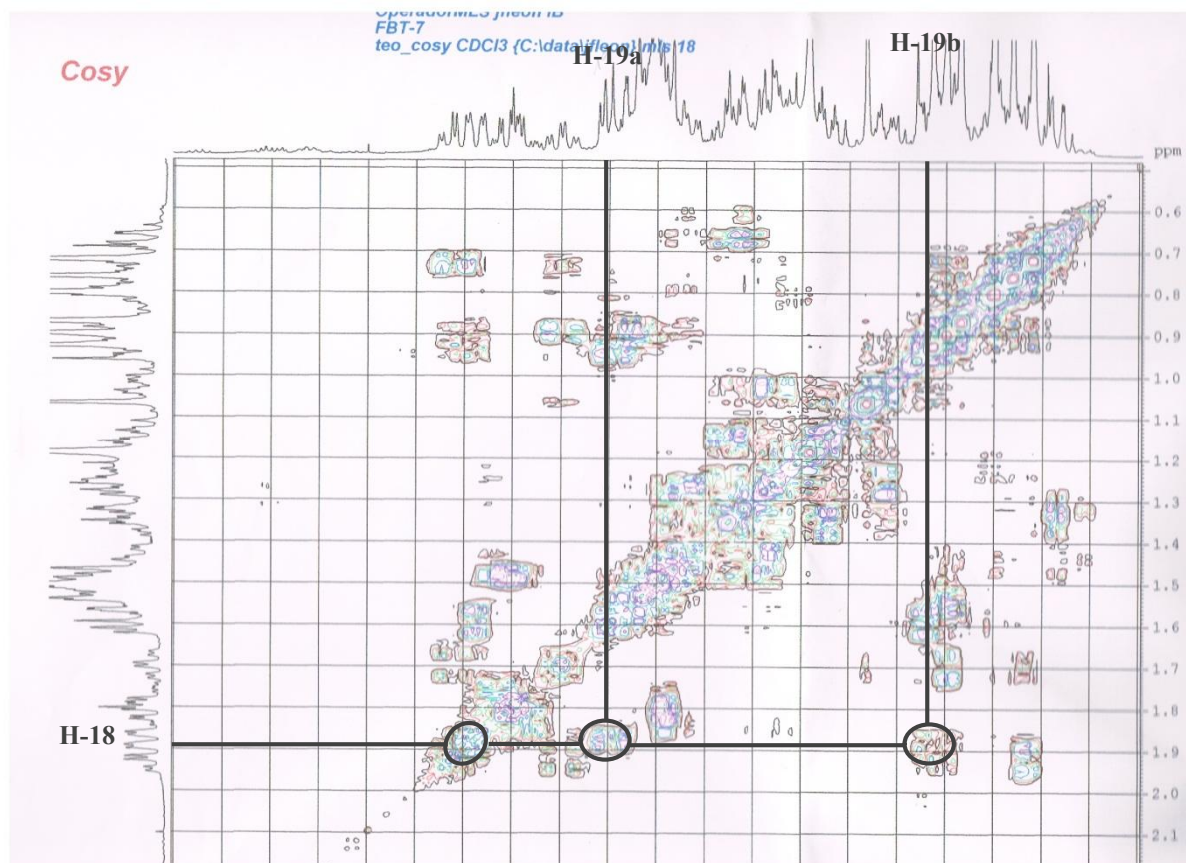


Figure IV.1.12: Spectre COSY étalé de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

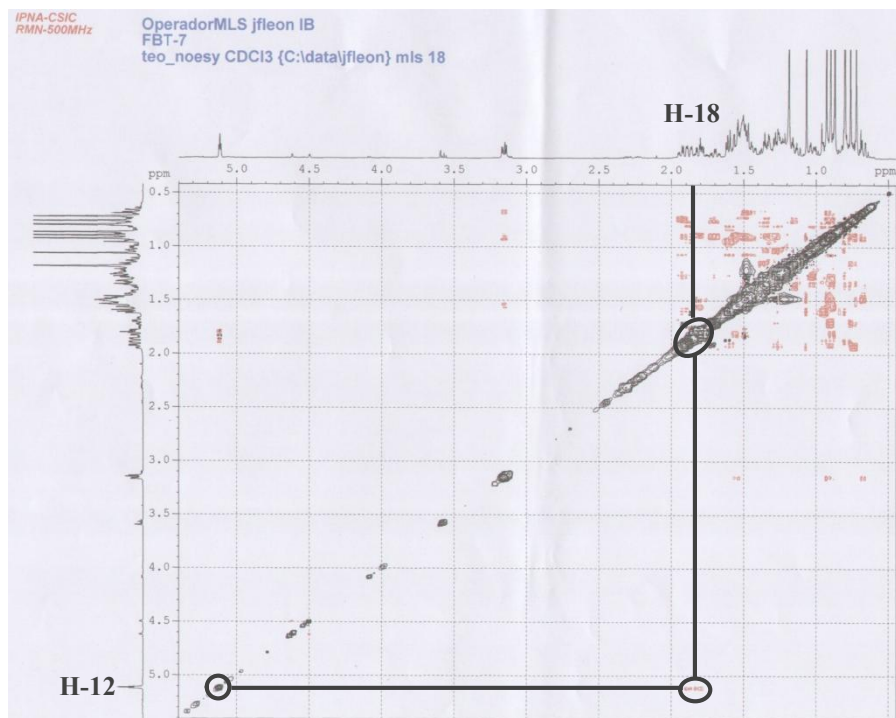


Figure IV.1.13: Spectre NOESY de LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

- ✓ Le H-19 donne quatre tâches de corrélation dans le spectre HMBC (spectre IV.14):

- ✓ La première avec le signal d'un carbone d'un CH_3 à $\delta_{\text{C}} = 23.7$ ppm attribuable à C-30, ce dernier corrèle avec le signal des protons du singulet d'intégration 6H à $\delta_{\text{H}} = 0.80$ ppm, donc ce méthyle est le CH_3 -29 ($\delta_{\text{C}} = 33.3$ ppm).
- ✓ La seconde avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 31.09$ ppm, ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons des deux méthyles CH_3 -29 et CH_3 -30 donc ce carbone ne peut être que le C-20.
- ✓ La troisième avec deux signaux, le premier est le C-29 à $\delta_{\text{C}} = 33.3$ ppm et le second est un signal d'un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 32.7$ ppm qui ne peut être que le C-17.
- ✓ La quatrième avec le C-18 à $\delta_{\text{C}} = 47.3$ ppm.

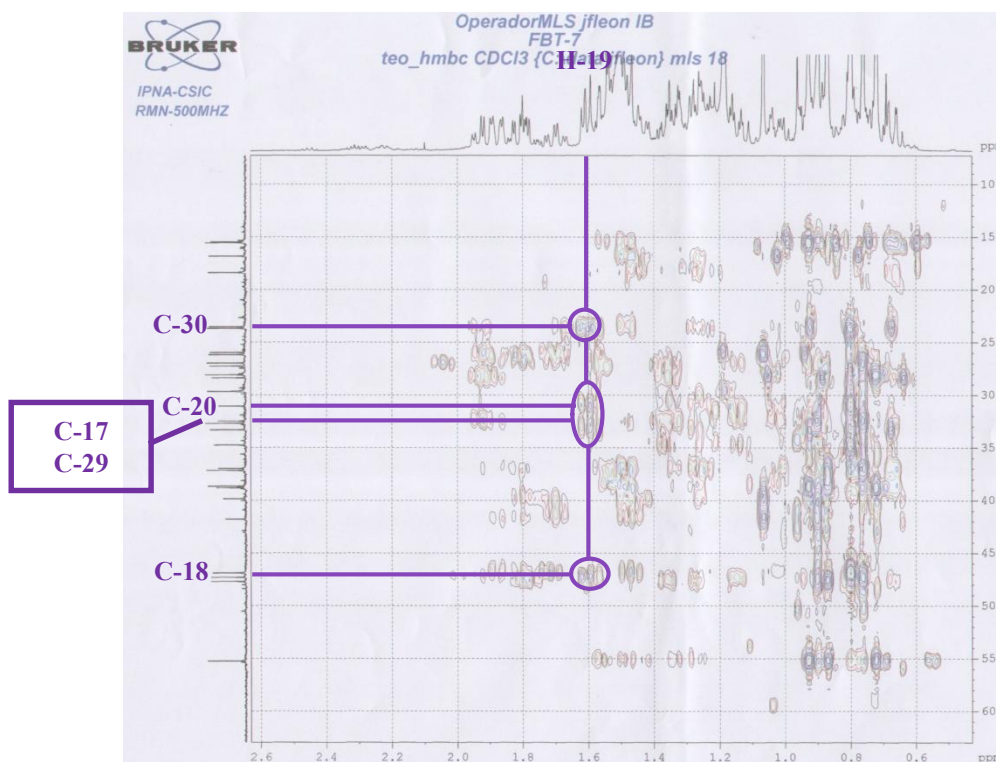
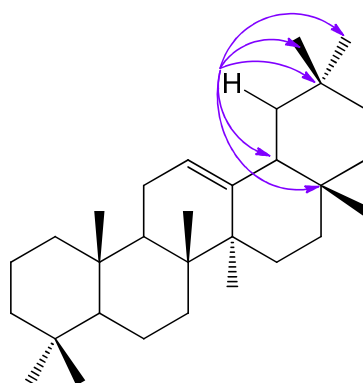


Figure IV.1.14: RMN HMBC étalé du LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

- ✓ Le singulet des protons des deux méthyles CH_3 -29 et CH_3 -30 montre six tâches de corrélation:

- ✓ Les trois premières tâches sont avec les carbones C-29, C-20 et C-30 à $\delta_C = 33.3, 31.1$ et 23.7 ppm, respectivement.
- ✓ La quatrième avec le carbone d'un CH_2 à $\delta_C = 34.8$ ppm attribuable à C-21. Ce dernier dans le spectre HSQC, corrèle avec ses deux protons à $\delta_H = 1.27$ et 1.03 ppm (H-21a et H-21b). Notant aussi que ces derniers montrent des tâches de corrélation dans le spectre COSY avec les signaux des protons à $\delta_H = 1.36, 1.15$ ppm, donc ces derniers sont ceux de H-22a et H-22b.
- ✓ La cinquième avec le signal du C-22 à $\delta_C = 37.2$ ppm.
- ✓ La sixième avec les deux carbones C-18 et C-19 ($\delta_C = 47.3$ et 46.9 ppm).

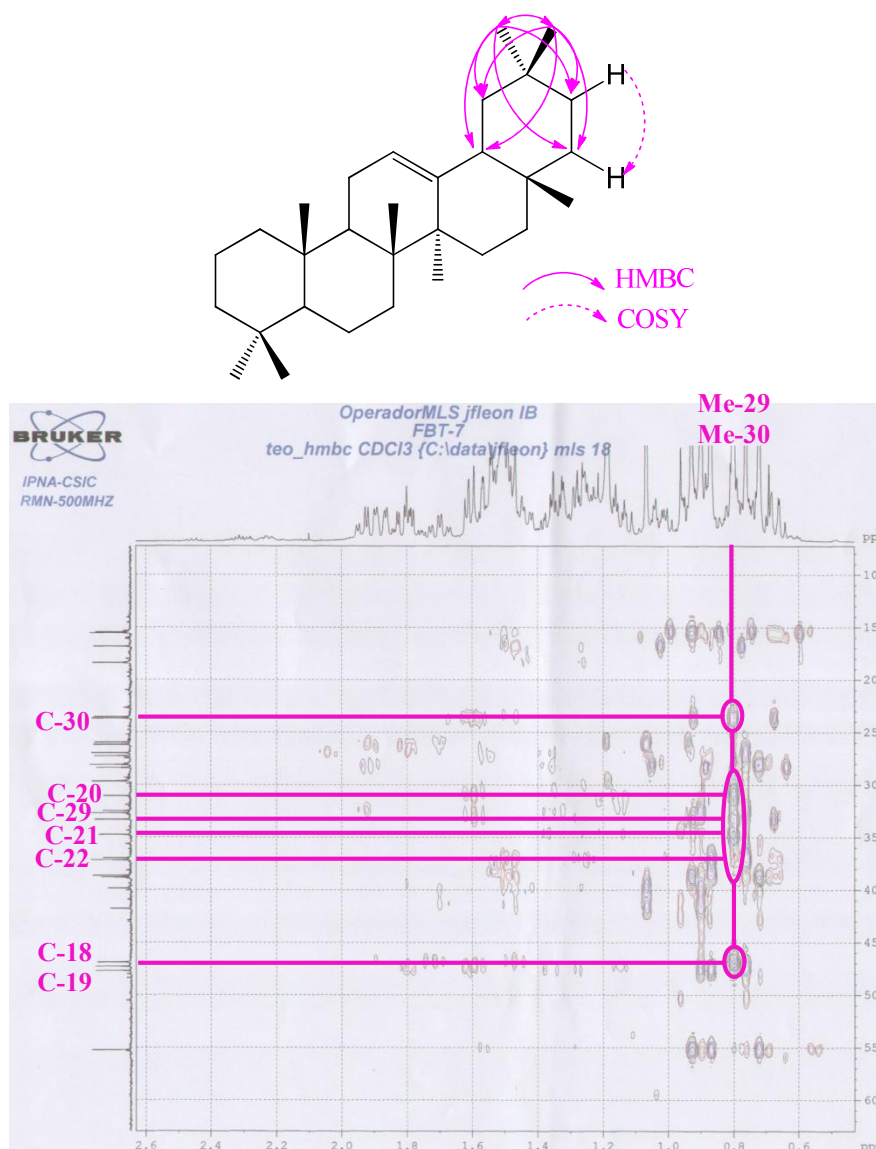


Figure IV.1.15: RMN HMBC étalé du LT C-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

Une analyse complète des spectres RMN mono et bidimensionnelle a permis de déterminer les attributions des carbones et protons de la β -amyrine (tableau IV.1). En effet, ces résultats sont en accord avec la littérature [1].

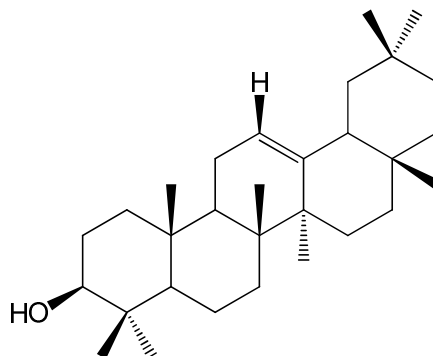


Tableau IV.1: les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du β -amyrine

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1	38.7	1.56, 0.90	16	27	1.93, 0.75
2	27.3	1.52, 0.72	17	32.7	-
3	79.6	3.14	18	47.3	1.9
4	38.8	-	19	46.9	1.6, 0.95
5	55.3	0.68	20	31.1	-
6	18.4	1.57, 1.33	21	34.8	1.27, 1.03
7	32.5	1.29, 1.45	22	37.2	1.15-1.36
8	39.9	-	23	28.1	0.92
9	47.7	1.49	24	15.6	0.71
10	37	-	25	15.5	0.86
11	23.6	1.79, 0.80	26	16.8	0.89
12	121.8	5.11	27	26	1.06
13	145.2	-	28	28.4	0.76
14	41.8	-	29	33.3	0.80
15	26.2	1.7, 0.9	30	23.7	0.80

1.2. Élucidation structurale du composé LT C-9

Ce produits a été isolé à partir de la phase chloroforme sous-forme des cristaux(aiguilles blanches) de la fraction LT C9.

L'examen du spectre RMN ^1H (figureIV.2.1) enregistré dans le CDCl_3 ainsi que son spectre étalé (figureIV.2.2), montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type triterpénoïde (stéroïde) que l'on peut identifier par comparaison avec la littérature [2]:

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}}=0.93$ et 0.61 ppm, attribuables aux protons des méthyles CH_3 -18 et CH_3 -19 respectivement.

- ✓ Troisdoublets à $\delta_H = 0.84$ ppm ($J = 6.5$ Hz), $\delta_H = 0.76$ ppm ($J = 6.4$ Hz) et $\delta_H = 0.63$ ppm ($J = 6.4$ Hz) correspondent respectivement aux protons des méthyles CH₃-21, CH₃-27, et CH₃-26.
- ✓ Un doublet large à $\delta_H = 5.27$ ppm ($J = 6.4$ Hz) correspond à un proton oléfinique le H-6.
- ✓ Un multiplet à $\delta_H = 3.45$ ppm attribuable à un proton d'un carbone oxygéné, c'est le H-3.

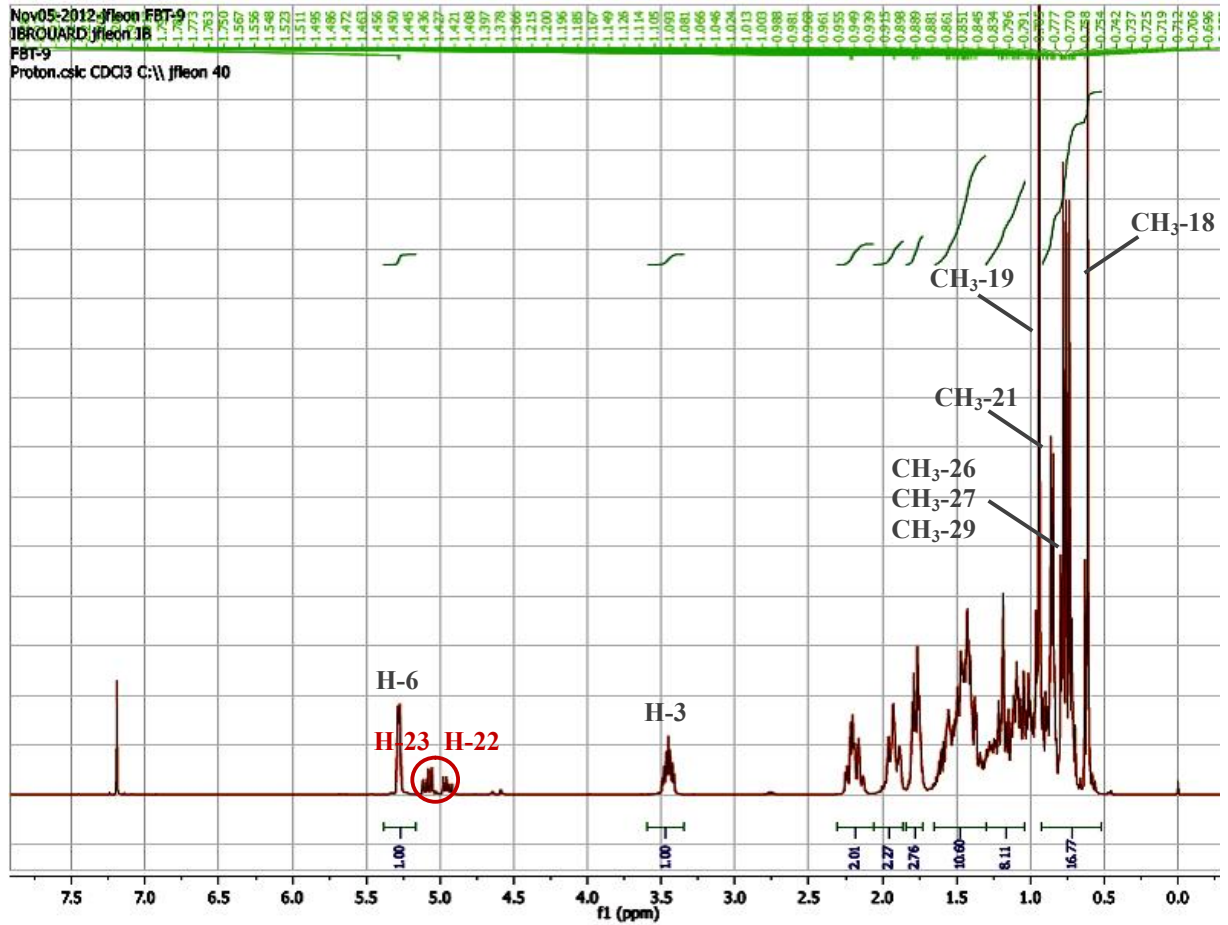


Figure IV.2.1: RMN ¹H du LT C-9 (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

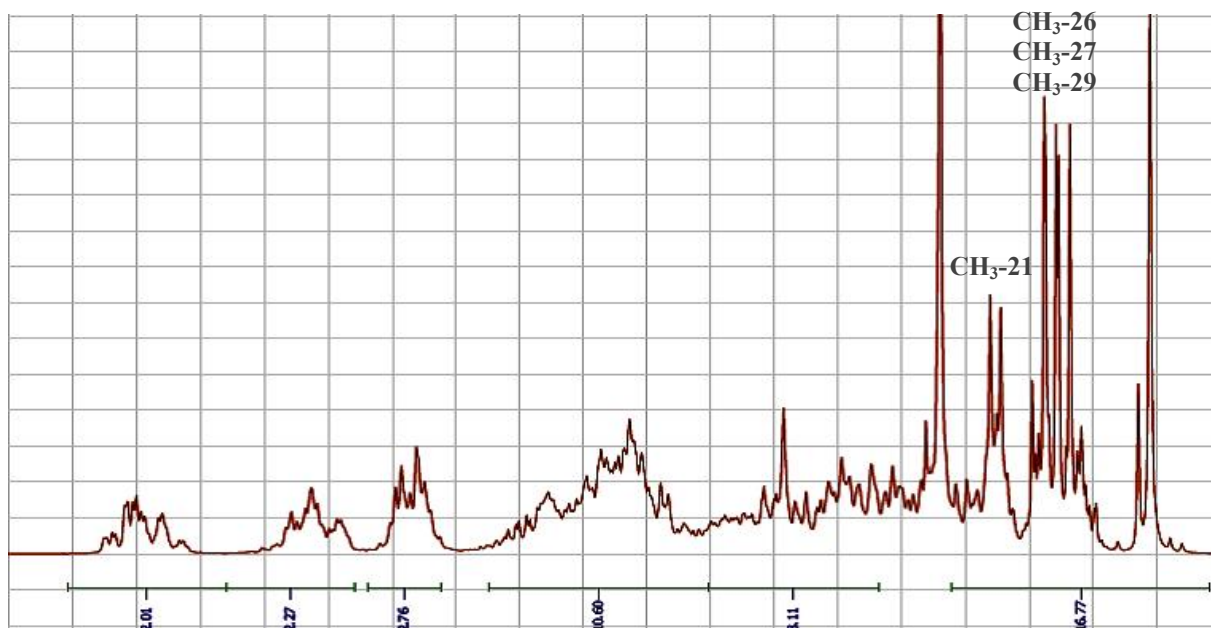
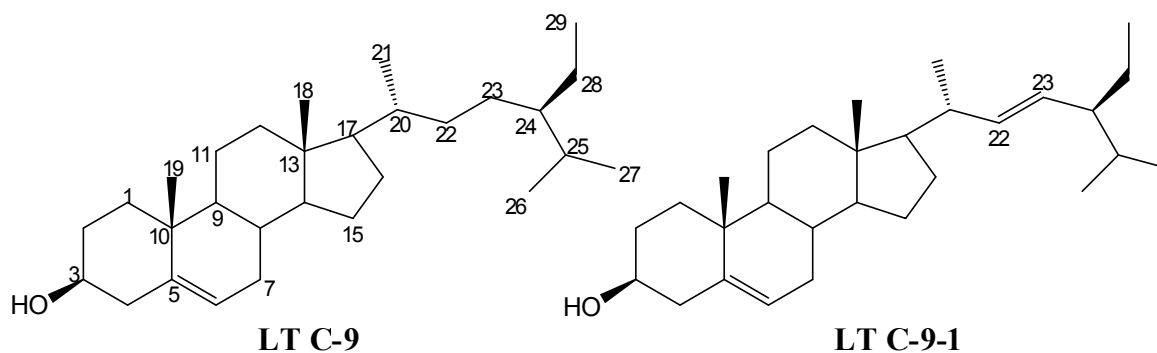


Figure IV.2.2: RMN ^1H étalé du LT C-9 (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

On remarque la présence de deux protons vinylique sous-forme de doublet dédoublé ($J = 15.1, 8.6$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.10$ et 4.95 ppm de la double liaison entre les carbones C-22 et C-23 du stigmasterol, donc ce produit est un mélange de deux stérols, un majoritaire le β -sitostérol (LT C-9) et le second minoritaire est le stigmasterol (LT C-9-1).



1.3. Élucliation structurale du composé LT C19-9

La fluorescence noir-violette du produit LT C19-9 sous la lumière de Wood ainsi que le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 344 nm (figure IV.3.3), orientent vers la structure d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.3.1) enregistré dans l'acétone- d_6 ainsi que son spectre étalé (figure IV.3.2) montre:

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12.8$ ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- ✓ Une tri-substitution du noyau B déduit de l'existence d'un doublet dédoublé ($J = 8.5, 2.3$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.44$ ppm et deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7.37$ et 7.01 ppm ($J = 2.3$ Hz) et ($J = 8.5$ Hz), attribuables aux protons H-6', H-2' et H-5' respectivement.
- ✓ Une substitution du noyau A en position 7 déduit de la présence du OH-5 et deux doublets d'intégration 1 H chacun avec la même constante de couplage ($J = 2.1$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6.43$ et 6.13 ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.52$ ppm attribuable à H-3.
- ✓ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3.83$ ppm, attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle.

Tableau IV.2: Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; acétone- d_6) du LT C19-9

déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12.80	1H	<i>s</i>	OH-5
7.44	1H	<i>dd</i> (8.5, 2.3)	H-6'
7.37	1H	<i>d</i> (2.1)	H-2'
7.01	1H	<i>d</i> (8.5)	H-5'
6.52	1H	<i>s</i>	H-3
6.43	1H	<i>d</i> (2.1)	H-8
6.13	1H	<i>d</i> (2.1)	H-6
3.83	3H	<i>s</i>	O-CH ₃

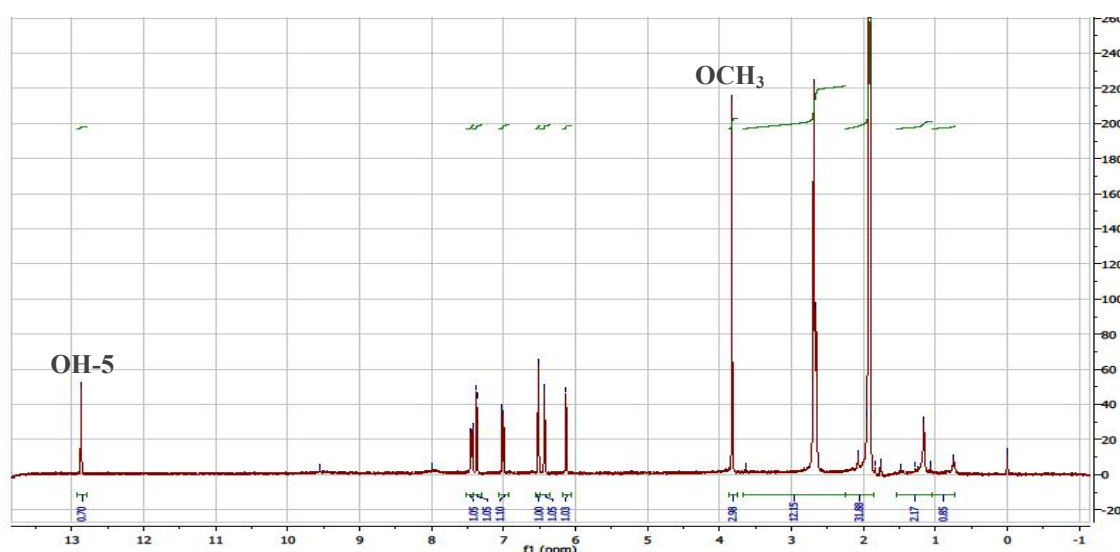


Figure IV.3.1: RMN ^1H du LT C19-9 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

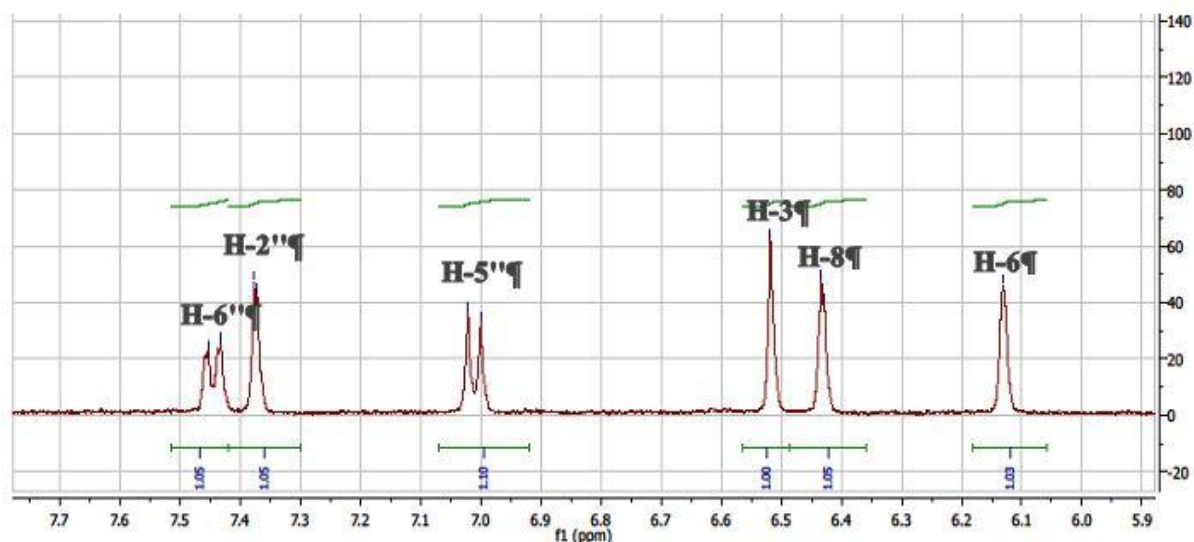


Figure IV.3.2: RMN ^1H étalé du LT C19-9 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

L'examen de la série spectral UV (figure IV.3.3):

- ✓ L'addition de NaOH conduit à un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +40$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, avec une diminution de l'intensité, ce qui révèle la présence d'un OR (OCH_3) en C-4'.
- ✓ L'ajoute de AlCl_3 provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda_I = +41$ nm) de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, révèle la présence d'un OH en position 5.
- ✓ L'addition du HCl sur AlCl_3 , provoque un déplacement bathochrome la bande I ($\Delta\lambda_I = +48$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirme l'absence d'oxygénation en position 6 et la présence d'un OH en position 5.
- ✓ L'ajoutede HCl+ AlCl_3 donne un déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = -7$ nm) très faible par rapport au spectre enregistré dans AlCl_3 , confirment l'absence de système ortho dihydroxylé sur le noyau A ou B.
- ✓ L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome faible de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +3$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, révèle la présence d'un OH libre en position 7.
- ✓ L'addition de H_3BO_3 à NaOAc donne un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +5$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, qui prouve l'absence de système ortho dihydroxylé sur les carbones C-7 et C-8.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible du LTC19-9 sont rassemblés dans le tableau IV.3 :

Tableau IV.3 : les données spectroscopique d' l'UV du LT C19-9

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	344	270
NaOH	384	271
AlCl ₃	385	273
AlCl ₃ +HCl	392	274
NaOAc	352	273
NaOAc+H ₃ BO ₃	349	270

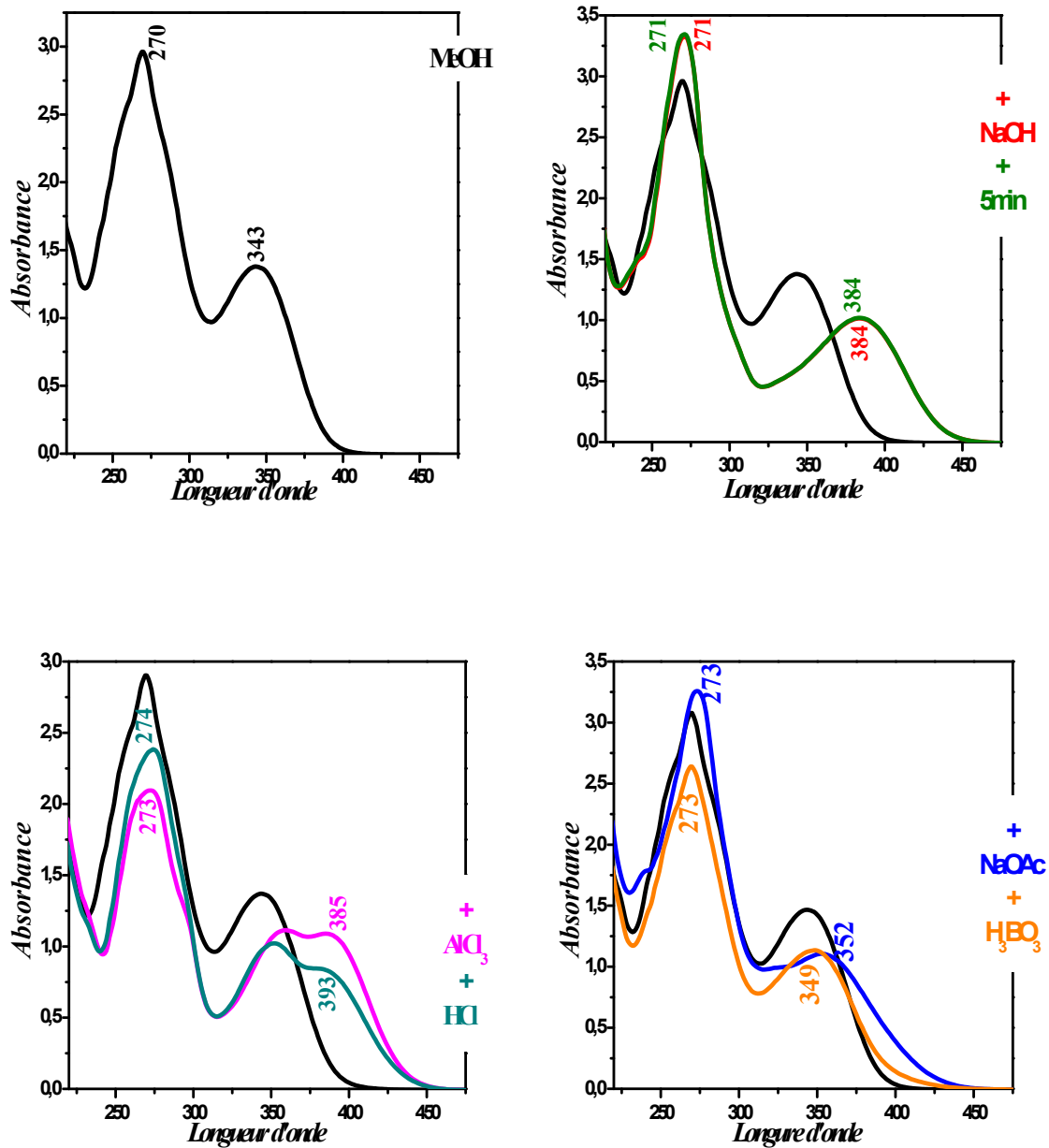
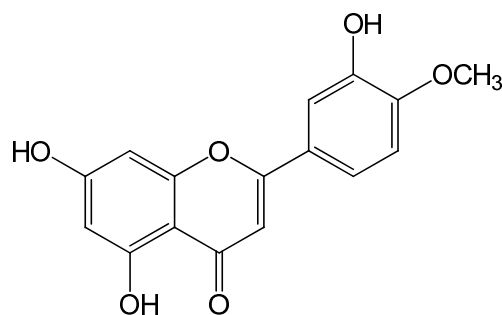


Figure IV.3.3: série spectrale UV du LT C19-9

Lacombinaison des donnés de laRMN ¹H et ceux de l'absorption ultraviolette mène à la structure d'une flavone, connu sous le nom diosmétine[3].

**Diosmétine**

1.4. Élucliation structurale du composé LT C-22

Ce produit a été isolé sous-forme d'un précipité blanc de la fraction LT C-22 de la phase chloroforme. Le spectre de mass *ESI* enregistré en mode positif (+) montre deux pics, le premier à $m/z = 599.6$ correspond à $[M+Na]^+$ et le second à $m/z = 1175.8$ attribuable à $[2M+Na]^+$, on note également que le spectre enregistré en mode négatif (-) montre aussi deux pics, le premier à $m/z = 575.2$ attribuable à $[M-H]^-$ et le second à $m/z = 611.2$ correspond à $[M+Cl]^-$ (figure IV.4.1), donc la masse de notre composé est de 576 Da.

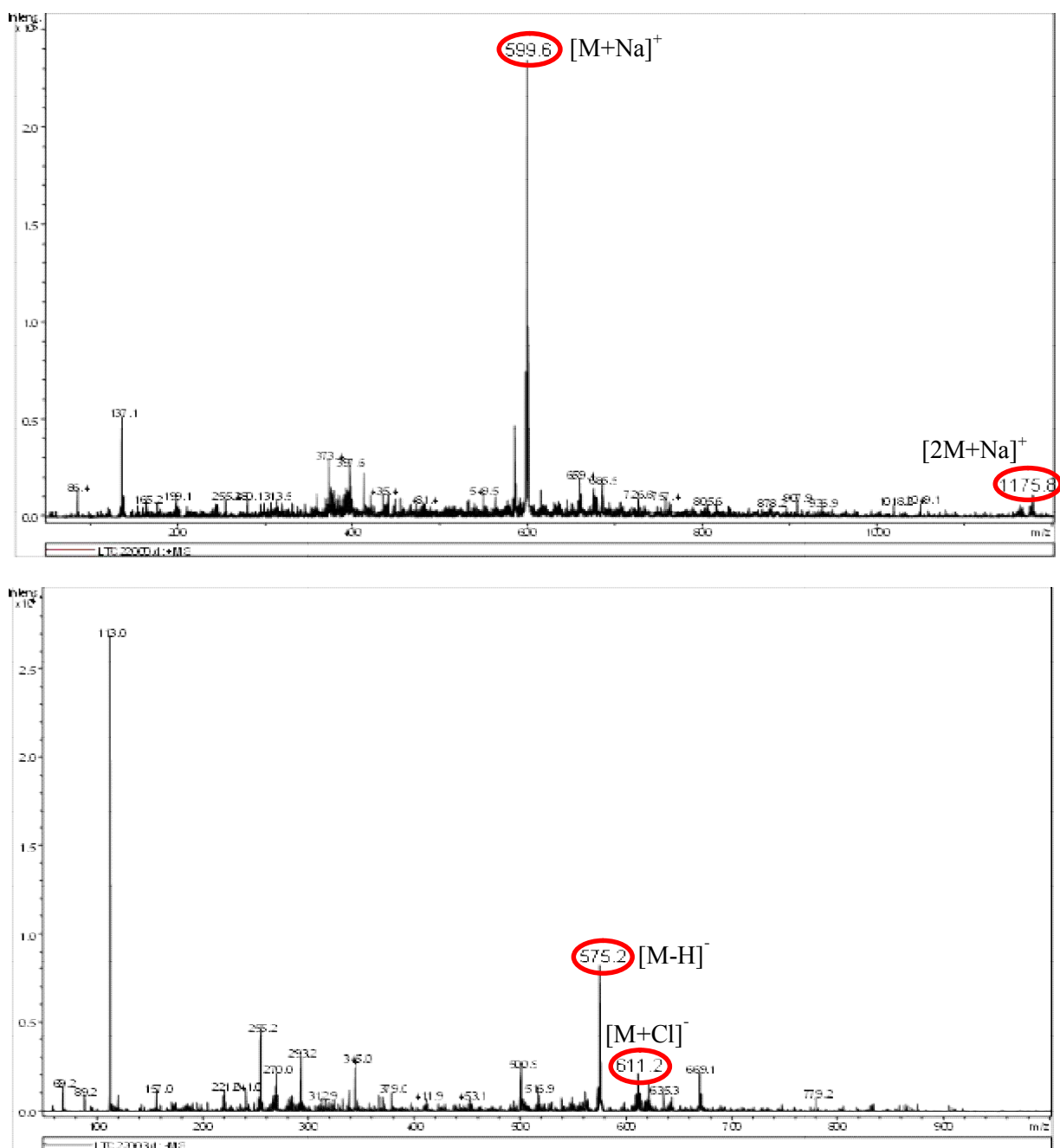


Figure IV.4.1: spectre de masse ESIMS +/- du LT C22.

Par comparaison des données des spectres RMN ^1H et ^{13}C avec ceux de la bibliographie, les signaux des protons d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=3.97$ et 5.37 ppm sont caractéristiques de H-3 et H-6 d'un β -sitostérol, on remarque également que ce stérol est glycosylé par la présence d'un signal d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}= 5.08$ ppm correspondant à un proton anomérique.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.4.2) enregistré dans la pyridine, montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type triterpénoïde (stéroïde) que l'on peut identifier par :

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_H=0.96$ et 0.68 ppm attribuables aux protons des méthyles CH_3-19 et CH_3-18 respectivement.
- ✓ Un doublet ($J = 6.4$ Hz) d'intégration 3H à $\delta_H=1.01$ ppm attribuable à CH_3-21 .
- ✓ Un ensemble de signaux d'intégration 9H à $\delta_H=0.90$ ppm correspondent aux protons des méthyles CH_3-26 , CH_3-27 et CH_3-29 .
- ✓ Un singulet large à $\delta_H=5.37$ ppm attribuable au proton vinylique H-6.
- ✓ Un doublet ($J = 7.6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H=5.08$ ppm et un ensemble des signaux dans la zone $\delta_H = 3.9-4.7$ ppm suppose la présence d'une unité osidique. La valeur du déplacement du proton anomérique H-1' ($\delta_H = 5.08$ ppm) et la constante de couplage ($J_{1'-2} = 7.6$ Hz) indique qu'il s'agit d'un glucose ou un galactose de configuration β .
- ✓ Un signal sous-forme de multiplet d'intégration 1H à $\delta_H=3.97$ ppm attribuable à un proton oxygéné, c'est le H-3.

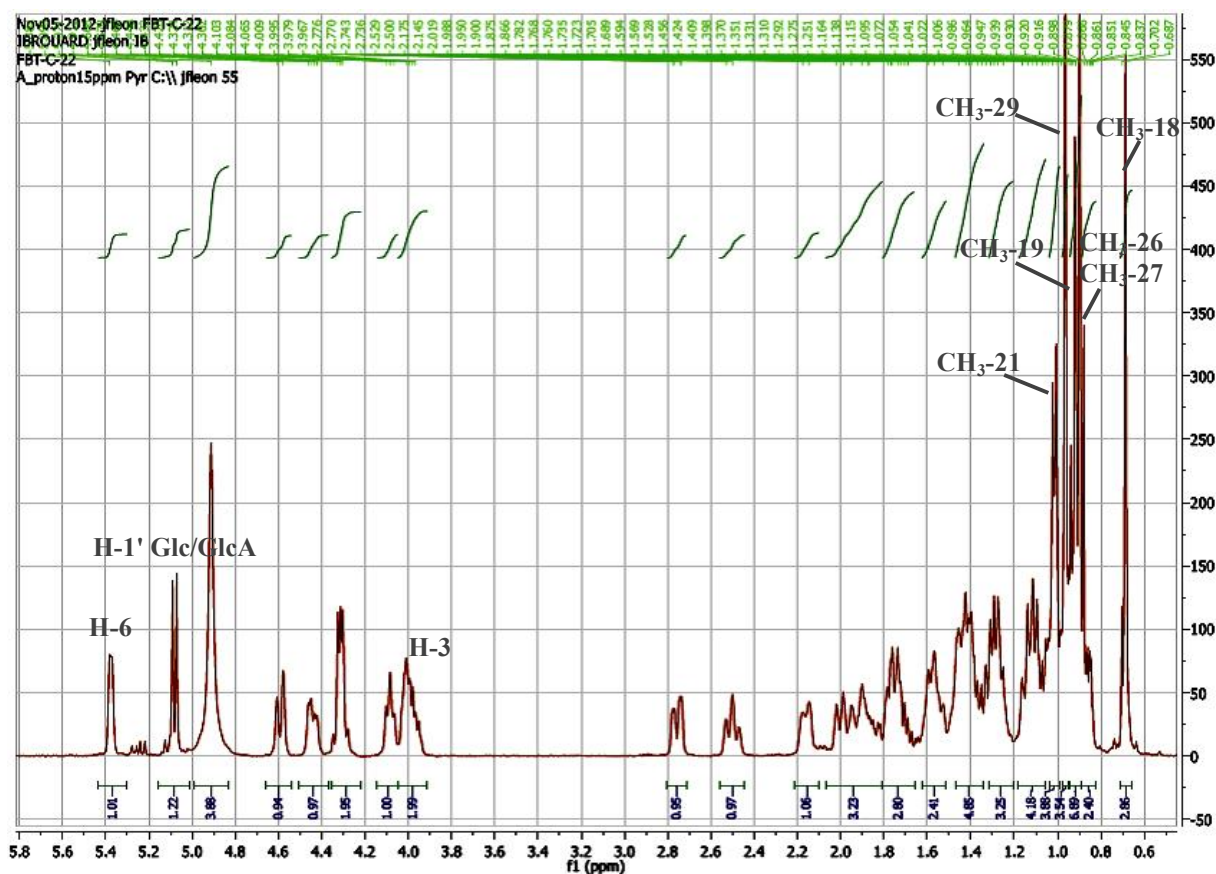
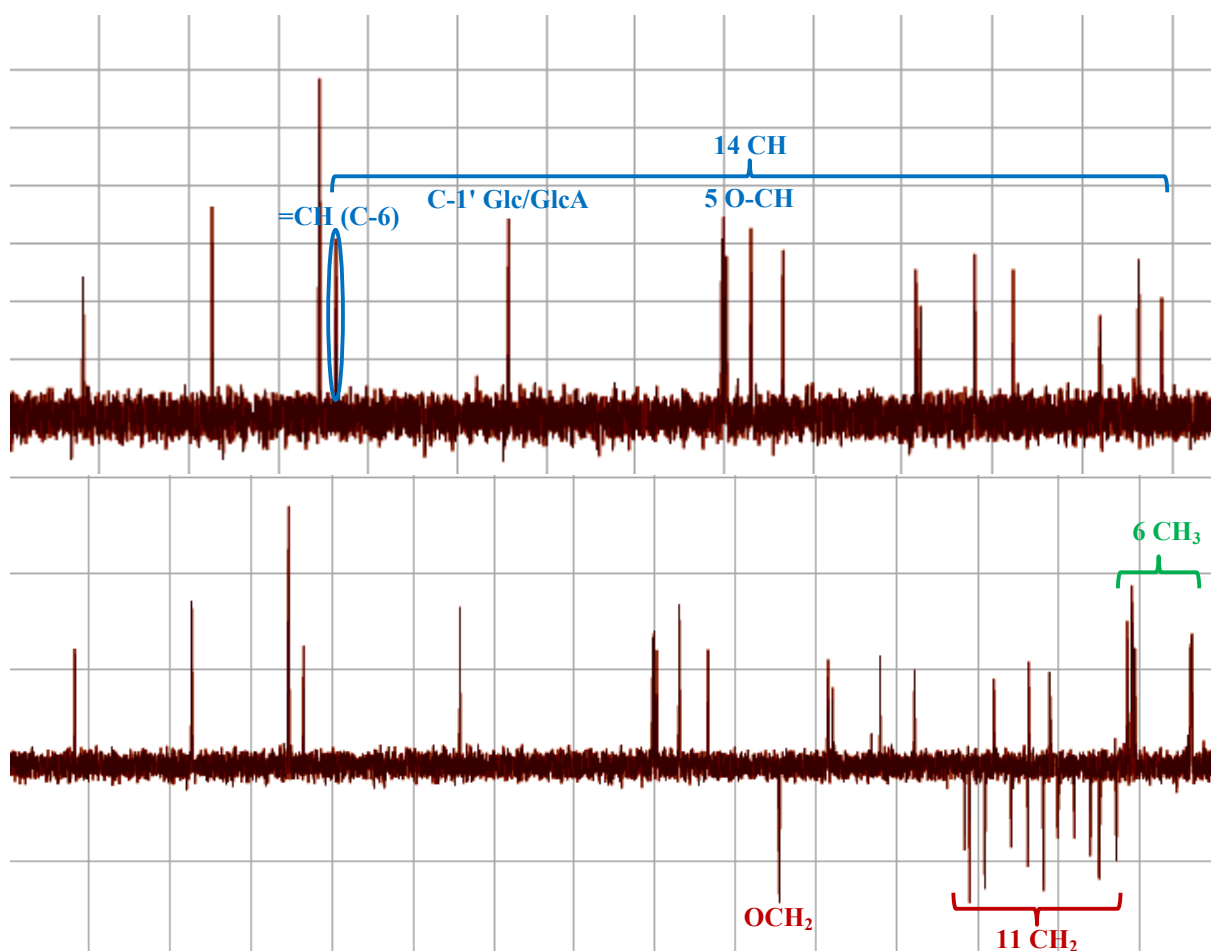


Figure IV.4.2: RMN 1H du LT C-22 (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm)

L'étude des spectres RMN ^{13}C et les séquences DEPT 90 et 135 (figure IV.4.3) et par comparaison avec les résultats de la bibliographie [4] permettent l'attribution des signaux des atomes de carbones comme suite:

- Dans le spectre RMN ^{13}C , il y'a 35 signaux d'atomes de carbones, dont 14 CH (DEPT 90), 12 CH_2 et 6 CH_3 (DEPT 135) ainsi que 3 carbones quaternaires.
- Un carbone quaternaire vinylique à $\delta_{\text{C}} = 142.6$ ppm attribuable à C-5.
- Un CH vinylique à $\delta_{\text{C}} = 123.5$ ppm attribuable à C-6.
- Un CH oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 104.2$ ppm correspond au carbone anomérique C-1'.
- Un CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 64.5$ ppm attribuable à C-6' du groupement glycosyle.
- Les signaux apparaissant à $\delta_{\text{C}} = 80.2, 80, 77$ et 73.4 ppm correspondent aux autres CH osidique.
- Un CH oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 79.8$ ppm correspond à C-3.
- Un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 44.1$ ppm attribuable à C-13.
- Le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 38.6$ ppm, ne peut être que le C-10.



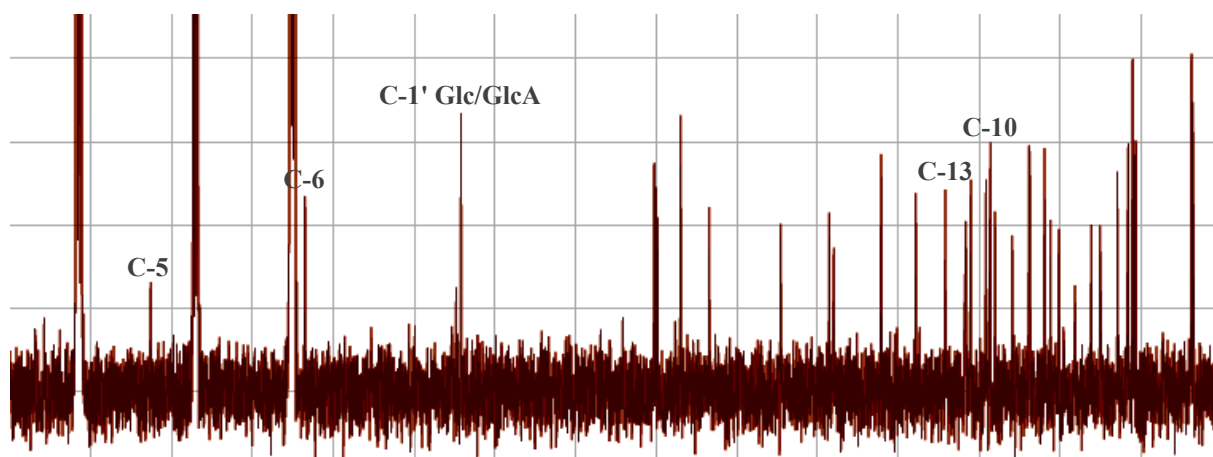


Figure IV.4.3: RMN ^{13}C du LT C-22 (100 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience COSY (figure IV.4.4) permet de donner les indications suivantes:

- Deux tâches de corrélation entre le proton H-3 et deux protons d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=2.75$ et 2.50 ppm portés par le même atome de carbone ($\delta_{\text{C}}=41$ ppm, spectre HSQC, fig. IV.4.5), notant aussi que ces derniers dans le spectre COSY corrélaient aussi entre eux, donc ils sont attribuables aux protons H-4a et H-4b.
- Une corrélation entre le proton H-3 et le multiplet de deux protons à $\delta_{\text{H}}=1.75$ ppm, ces derniers dans le spectre HSQC (figure IV.4.5) sont portés par le carbone C-2 ($\delta_{\text{C}}=39.1$ ppm). On remarque aussi que ces deux protons (H-2a et H-2b) dans le spectre COSY (figure IV.4.4) corrélaient avec un doublet large d'intégration 1H ($\delta_{\text{H}}=2.15$ ppm, $J=12$ Hz) d'un CH_2 déduit du spectre HSQC avec $\delta_{\text{C}}=31.7$ ppm, qui ne peut être que le C-1.
- Le proton H-6 corréla avec les deux protons dont le signal est à $\delta_{\text{H}}=1.90$ ppm, ce dernier dans le spectre HSQC montre une tâche de corrélation avec un CH_2 ($\delta_{\text{C}}=33.8$ ppm), donc ces deux protons sont attribuables à H-7a et H-7b.
- Les deux protons H-7a et H-7b corrélaient avec le signal du proton H-8 à $\delta_{\text{H}}=1.56$ ppm.
- Le proton anomérique H-1' corréla avec un triplet ($J=7.6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=4.08$ ppm qui ne peut être que le H-2'. Ce dernier corréla avec un des deux protons à $\delta_{\text{H}}=4.31$ ppm, donc l'un des deux est le H-3', l'autre proton corréla avec le proton à $\delta_{\text{H}}=4.06$ ppm, ce dernier montre une corrélation avec les deux protons H-6'b et H-6'a à $\delta_{\text{H}}=4.58$ et 4.45 ppm portés par le même atome de carbone à $\delta_{\text{C}}=64.5$ ppm (spectre HSQC), on déduit que ces protons à $\delta_{\text{H}}=4.06$ et 4.31 ppm sont H-5' et H-4' respectivement.

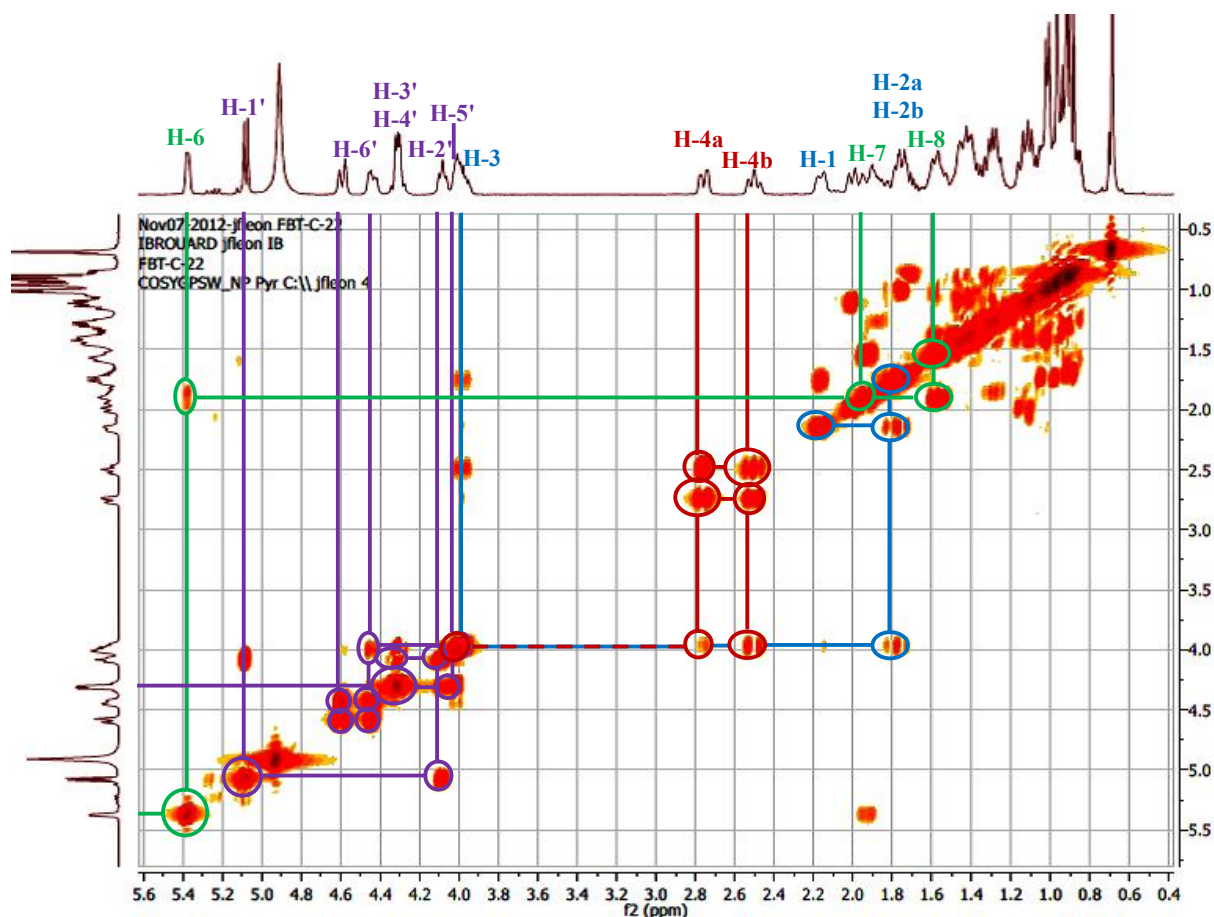


Figure IV.4.4: RMN COSY du LT C-22 (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.4.5) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi:

- Les protons obtenus du groupement glycosyle permettent l'attribution des signaux à $\delta_C = 104.2, 80.2, 80, 77, 73.4$ et 64.5 ppm aux carbones C-1', C-5', C-3', C-2', C-4' et C-6' respectivement. Par comparaison de ces déplacements avec ceux de la littérature [5], on conclue que ce groupement glycosyle est un glucosyle.
- Une tâche de corrélation entre le H-6 et le C-6 à $\delta_C = 123.5$ ppm.
- Une tâche de corrélation entre le H-3 et le C-3 à $\delta_C = 79.8$ ppm.
- Une tâche de corrélation entre les protons du CH₃-18 et le carbone C-18 à $\delta_C = 13.6$ ppm.
- Une tâche de corrélation entre les protons de CH₃-29 et le C-29 à $\delta_C = 13.8$ ppm.
- Une corrélation entre le H-4b, le H-4a ($\delta_H = 2.74$ et 2.50 ppm) et le C-4 à $\delta_C = 41$ ppm.

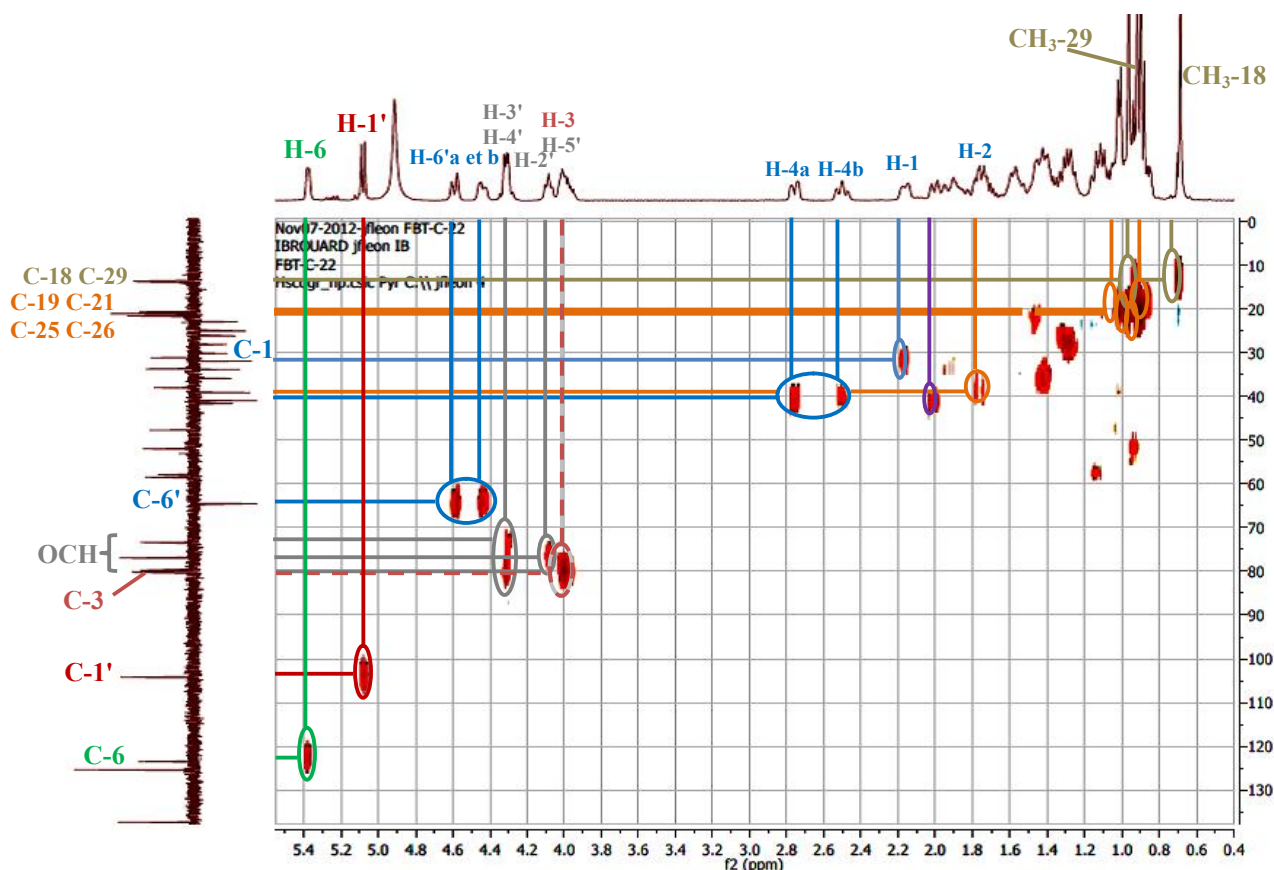



Figure IV.4.5: RMN HSQC du LT C-22 (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.4.6) met en évidence les corrélations proton-carbones à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes:

- ✓ Les protons des CH_3 -18 montrent quatre tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal du carbone à $\delta_C=41.6$ ppm d'un CH_2 dans le spectre DEPT 135 et qui ne peut être que le C-12.
 - ✓ La seconde avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_C=44.1$ ppm qui ne peut être que le C-13.
 - ✓ La troisième avec le signal à $\delta_C=57.9$ ppm d'un CH attribuable à C-17.
 - ✓ La dernière avec le signal à $\delta_C=58.5$ ppm qui est un CH dans le spectre DEPT 90 et qui ne peut être que le C-14.
- ✓ Les protons de CH_3 -19 montrent trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal à $\delta_C=142.6$ ppm d'un carbone quaternaire le C-5.
 - ✓ La seconde avec le carbone à $\delta_C=52$ ppm d'un CH dans le spectre DEPT 90 attribuable à C-9.
 - ✓ La troisième avec le signal à $\delta_C=38.6$ ppm d'un carbone quaternaire et qui ne peut être que le C-10.

 Le H-6 montre deux tâches de corrélation:


- ✓ La première avec le signal à $\delta_C=33.7$ ppm d'un CH dans le spectre DEPT 135 et 90, donc ce carbone ne peut être que le C-8.
- ✓ La seconde avec le signal à $\delta_C=33.8$ ppm d'un CH₂ dans le spectre DEPT 135 attribuable à C-7.

 Les protons du méthyle CH₃-21 montrent trois tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal du C-17 à $\delta_C=57.9$ ppm.
- ✓ La seconde avec le signal à $\delta_C=35.9$ ppm d'un CH₂ dans le DEPT 135 et qui ne peut être que le C-22.
- ✓ La troisième avec le signal à $\delta_C=38$ ppm d'un CH dans le DEPT 90 et qui ne peut être que le C-20.

 Les protons des méthyles CH₃-26 et CH₃-27 montrent deux tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal à $\delta_C=47.7$ ppm qui d'un CH (spectre DEPT 90), ce carbone montre aussi une tâche de corrélation avec les protons du CH₃-29, ce qui confirme que c'est le C-24.
- ✓ La seconde avec le signal à $\delta_C=31.1$ ppm d'un CH dans le DEPT 90 et qui ne peut être que le C-25.

 Les protons du méthyle CH₃-29 montrent trois tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal à $\delta_C=25$ ppm d'un CH₂ (spectre DEPT 135) qui ne peut être que le C-28.
- ✓ La seconde avec le signal du carbone C-24 à $\delta_C=47.7$ ppm.
- ✓ La troisième avec le signal à $\delta_C=30.2$ ppm d'un CH₂ (spectre DEPT 135) attribuable au C-23.

 Le H-1' du glucose montre quatre tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal de C-1' du glucose à $\delta_C=104.2$ ppm.
- ✓ La seconde avec le signal de C-3' à $\delta_C=80$ ppm.
- ✓ La troisième avec le signal à $\delta_C=79.8$ ppm d'un CH (spectre DEPT 90) attribuable à C-3 (HSQC) de la génine ce qui impose la substitution de la génine par le groupement glycosyle en position 3.
- ✓ La dernière avec le signal à $\delta_C=80.2$ ppm d'un CH attribuable à C-5'.

Le H-3' montre une tâche de corrélation avec le C-4' à $\delta_C=73.4$ ppm.

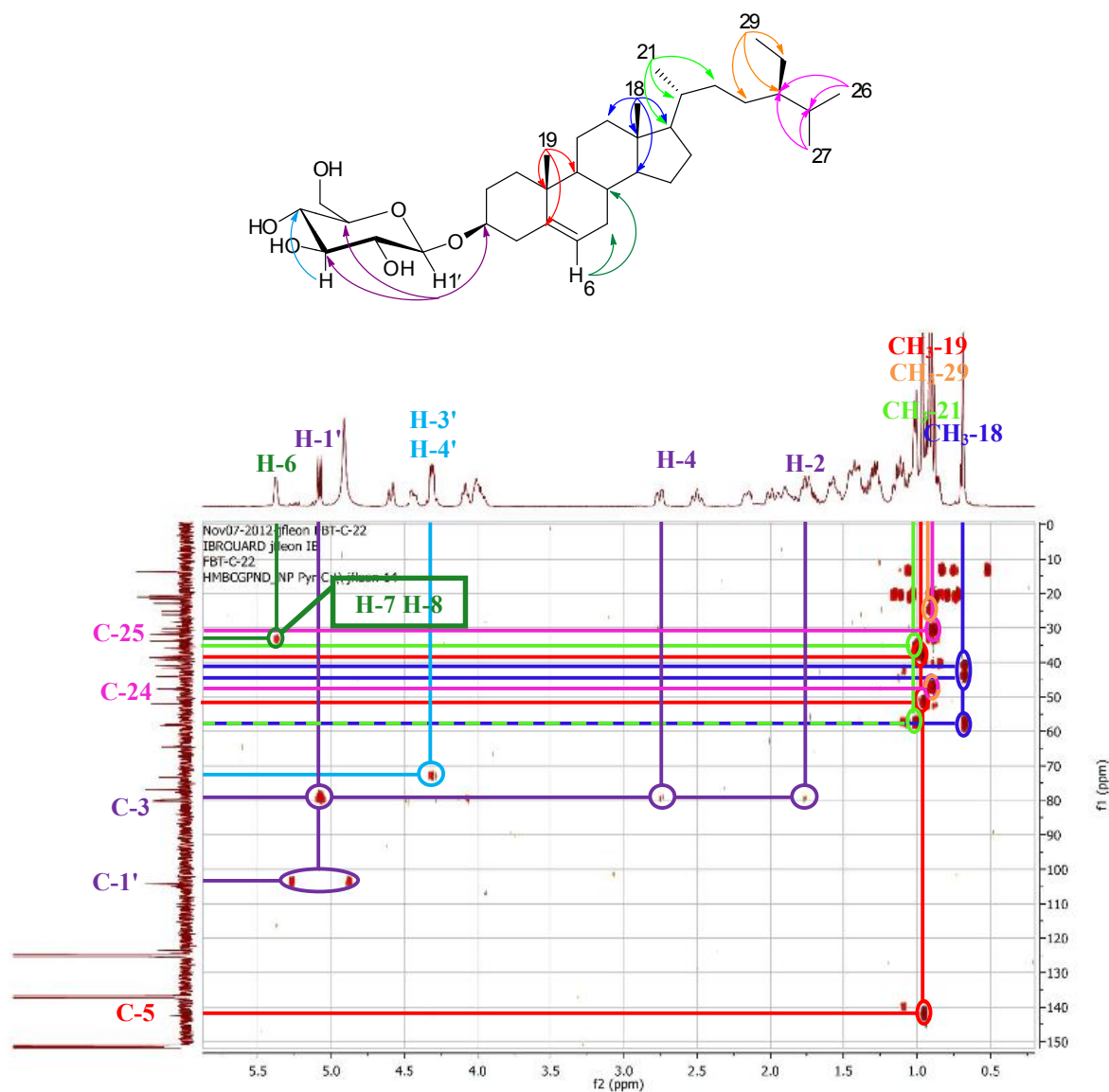


Figure IV.4.6: RMN HMBC du LT C-22 (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm)

La masse 576 Da est bien connue pour le β -sitosterol-3- O - β -D-glucoside (daucostérol) et pour confirmer ça, on a utilisé ESI/MSMS (-) (figure IV.4.7) pour remarquer le pic à $m/z=178.8$ correspond à l'unité du sucre (glucose).

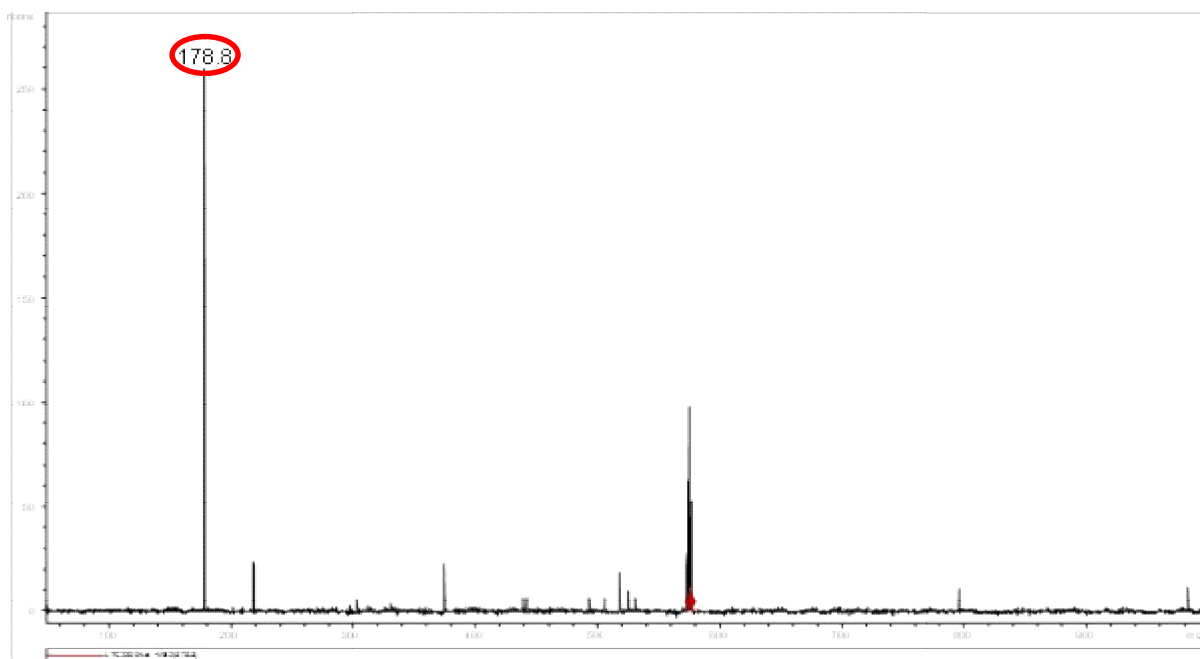


Figure IV.4.7: spectre de masse ESI/MSMS(-) du LT C22

Tableau IV.4: les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du daucostérol

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1	31.7	2.15	19	21	0.96
2	39.1	1.75	20	38	0.8-2.05
3	79.8	3.97	21	21.6	1.01
4	41	2.75, 2.50	22	35.9	1.6, 0.95
5	142.6	-	23	30.2	0.8-2.05
6	123.5	5.37	24	47.7	1.03
7	33.8	1.9	25	31.1	0.8-2.05
8	33.7	1.56	26	20.6	0.92
9	52	1.49	27	20.9	0.9
10	38.6	-	28	26.1	0.86
11	22.9	0.8-2.05	29	13.8	0.89
12	41.6	0.8-2.05	1'	104.2	5.08
13	44.1	-	2'	77	4.08
14	58.5	0.8-2.05	3'	80	4.31
15	25	0.8-2.05	4'	73.4	4.31
16	27.6	0.8-2.05	5'	80.2	4.06
17	57.9	0.8-2.05	6'	64.5	4.58, 4.45
18	13.6	0.68			

1.5. Éluclidation structural du composé LT Ac10-1

Ce composé a été isolé de l'extrait AcOEt, sous-forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. La tâche de ce composé sur plaque analytique donne une fluorescence noire violette sous la lumière de Wood ainsi qu'une coloration jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque laissant envisager une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

L'examen du spectre RMN ^1H enregistré dans le $\text{MeOH-}d_4$ et ses étalements (figure IV.5.1, IV.5.2 et IV.5.3) du composé LT Ac10-1 permet de tirer les indications suivantes:

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 3.87$ et 3.98 ppm attribuables aux protons de deux groupements OCH_3 .
- ✓ Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6.58$ et 6.46 ppm attribuables aux H-3 et H-6 ou H-8.
- ✓ Un doublet ($J = 8.1$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.95$ ppm attribuable à H-5'.
- ✓ Deux signaux l'un est un doublet dédoublé ($J = 8.1, 2.1$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.52$ ppm partiellement recouvert par l'autre signal qui est un doublet ($J = 2.1$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.52$ ppm attribuables aux protons H-6' et H-2' respectivement.

Donc le noyau A est trisubstitué en 5, 7 et 8 ou bien en 5, 6 et 7 alors que le noyau B est disubstitué en position 3' et 4'.

Les données relatives à la RMN ^1H sont rassemblées dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5: Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; $\text{MeOH-}d_4$) du LT Ac10-1

δ_{H} (ppm)	Intégration	J (Hz)	Attribution
3.87	3H	<i>s</i>	OCH_3
3.98	3H	<i>s</i>	OCH_3
6.46	1H	<i>s</i>	H-6 ou H-8
6.58	1H	<i>s</i>	H-3
6.95	1H	<i>d</i> (8.1)	H-5'
7.52	1H	<i>dd</i> (8.1, 2.1)	H-6'
7.52	1H	<i>d</i> (2.1)	H-2'

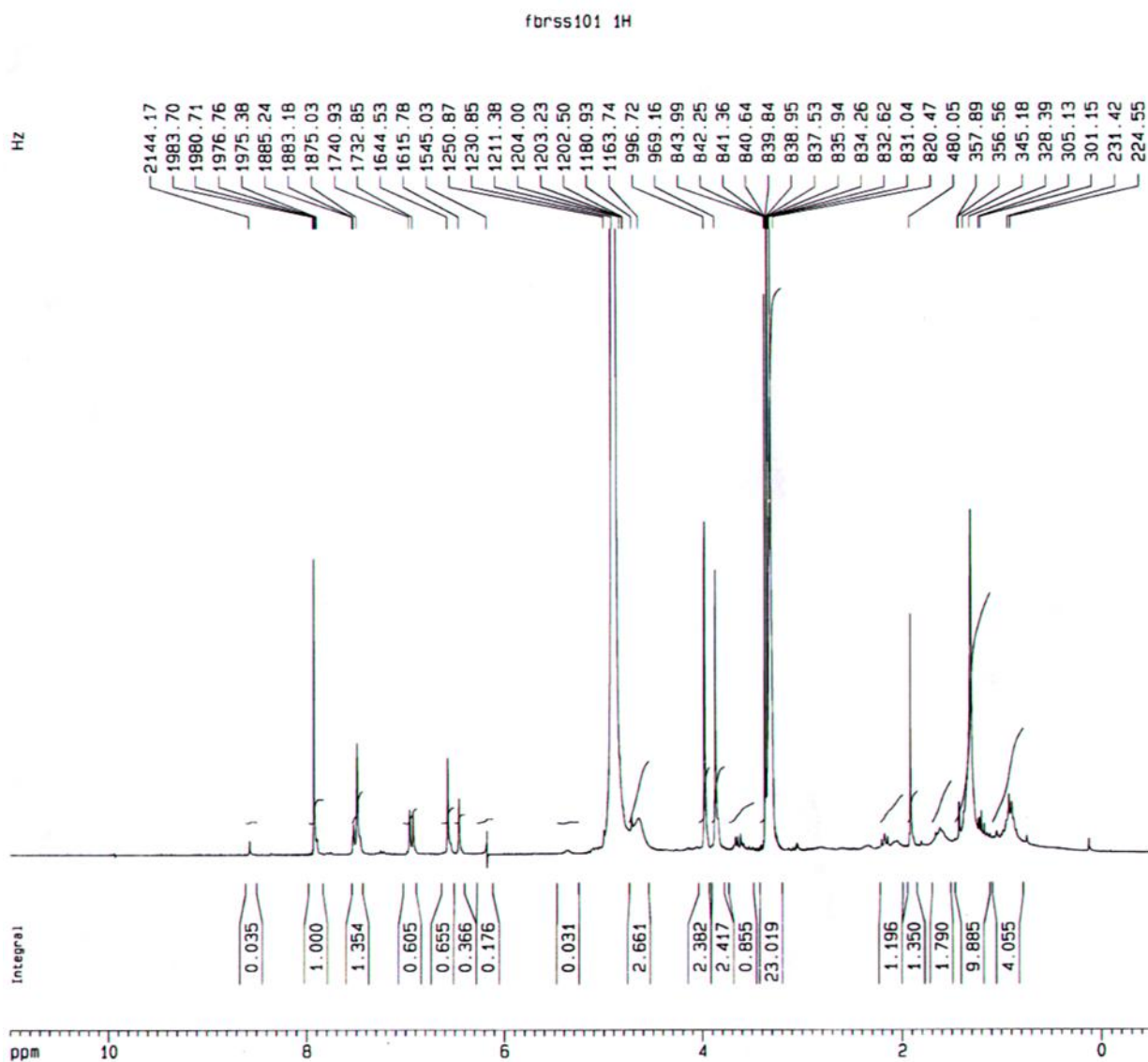


Figure IV.5.1: RMN ^1H du LT Ac10-1 (250 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

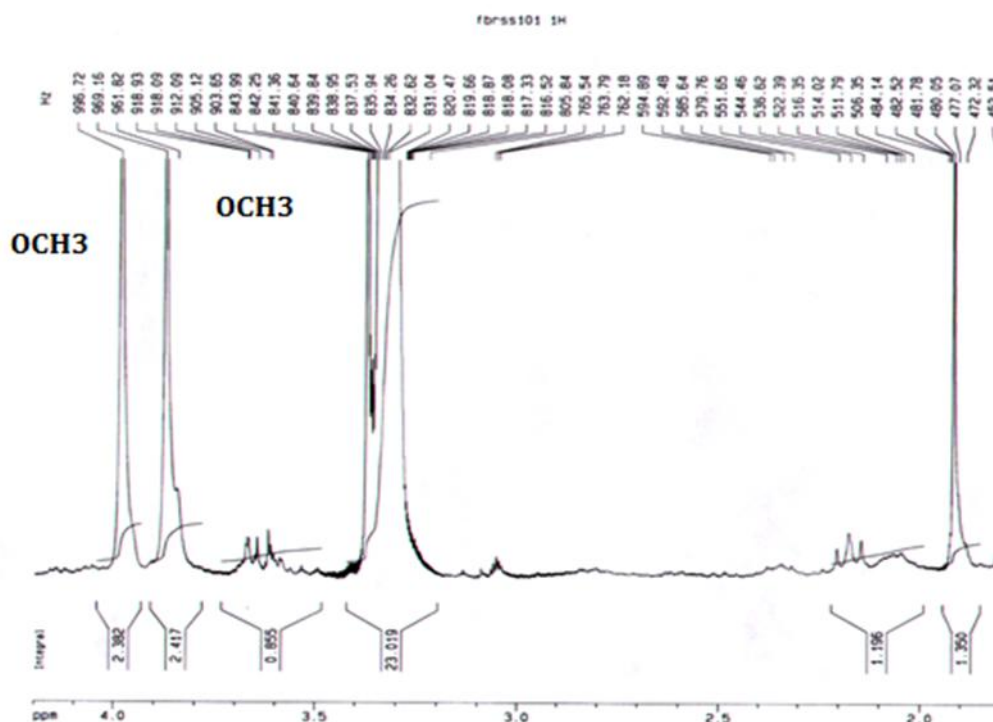


Figure IV.5.2: RMN ^1H étalé du LT Ac10-1 (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm)

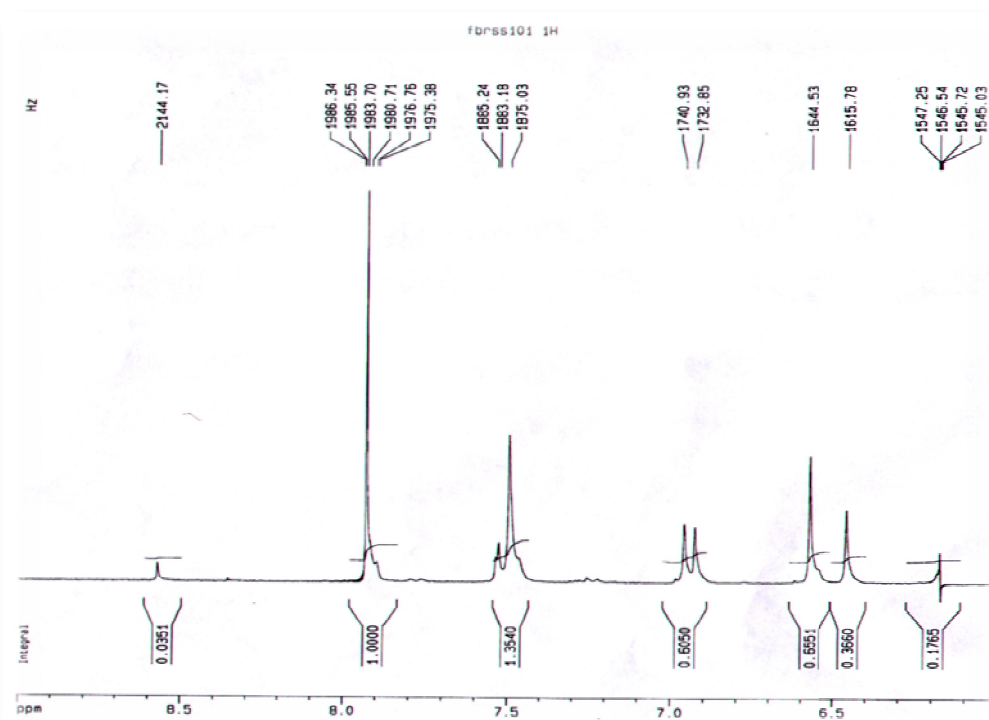
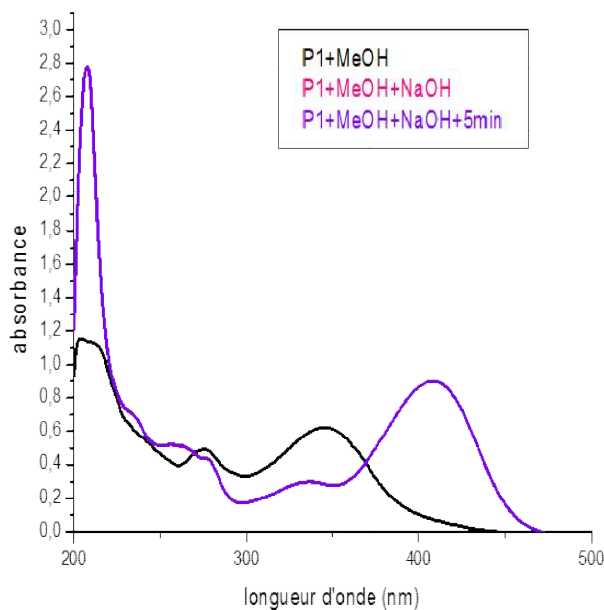
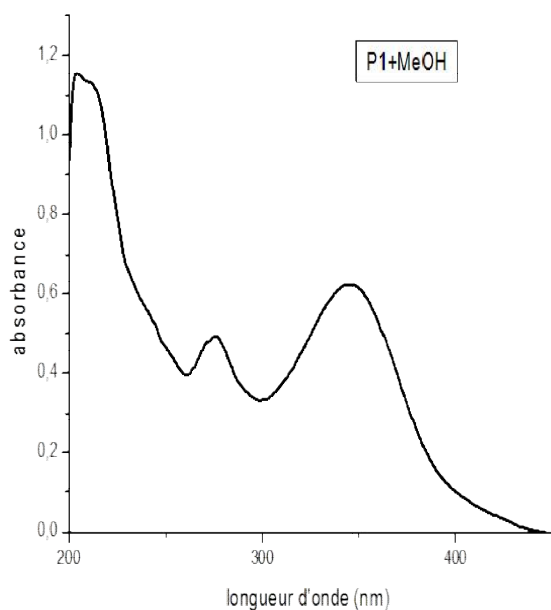


Figure IV.5.3: RMN ^1H étalé du LT Ac10-1 (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm)

L'examen de la série spectrale UV-visible du composé LT Ac10-1 (figure IV.5.4) permet de tirer les indications suivantes :

- ✓ La valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du MeOH ($\lambda_I = 345$ nm) confirme la structure d'une flavone.
- ✓ L'addition du réactif NaOH conduit à un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda_I = +62$ nm) de la bande I avec une augmentation de l'intensité ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande $\lambda_N = 334$ nm indique la présence d'un OH libre en position 7.
- ✓ L'absence d'un déplacement bathochrome 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 de groupements ortho di OH sur le cycle B. Cela est confirmé par l'absence de déplacement bathochrome de la bande I du spectre enregistré dans le milieu ($\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) par rapport à celui enregistré dans le MeOH. On déduit la présence du groupement OCH_3 en position 3'.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I du spectre enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_I = +20$ nm) montre la présence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en position 6. Vu qu'il reste un OCH_3 non attribué donc il est en position 6.



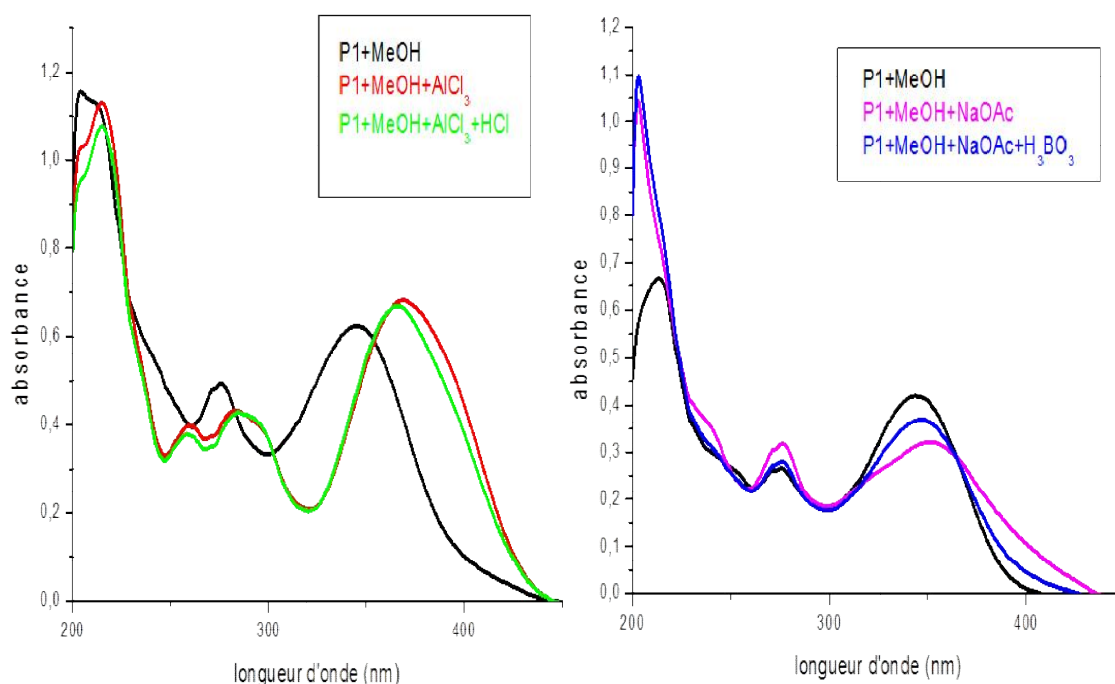


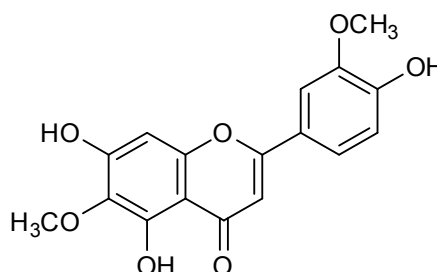
Figure IV.5.4: la série spectrale UV du composé LT Ac10-1

Les résultats de la série spectrale UV-visible du composé LT Ac10-1 sont rassemblés dans le tableau suivant (tableau IV.6).

Tableau IV.6: les données spectroscopique de l'UV du LT Ac10-1

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autre band
MeOH	345	275	-
NaOH	407	275	334
AlCl ₃	368	284	258
AlCl ₃ +HCl	365	284	258
NaOAc	352	276	-
NaOAc+H ₃ BO ₃	348	276	-

L'ensemble des données spectrales de RMN ¹H et de la série spectrale UV-visible indique que la structure finale du composé LT Ac10-1 est comme suit:



5, 7, 4'-trihydroxy-6, 3'-diméthoxyflavone
(3'-méthyléther népetine, jacosidine)

Le produit jacosidine [6] est isolé pour la première fois de la famille Scrophulariaceae.

1.6. Élucliation structurale du composé LT B9-4-6-1

L'étude du spectre de masse mode ESI/MS (+) montre un pic à $m/z = 467$ attribuable à $[M+Na]^+$ et un autre pic à $m/z = 483.1$ correspond à $[M+K]^+$ ainsi que l'étude du spectre ESI/MS (-) montre trois pics, le premier à $m/z = 443$ qui est le $[M-H]^-$, le second à $m/z = 479.2$ attribuable à $[M+Cl]^-$ et le dernier à $m/z = 887$ attribuable à $[2M-H]^-$. Tous ces pics confirment que la masse de notre composé est de $444 m/z$.

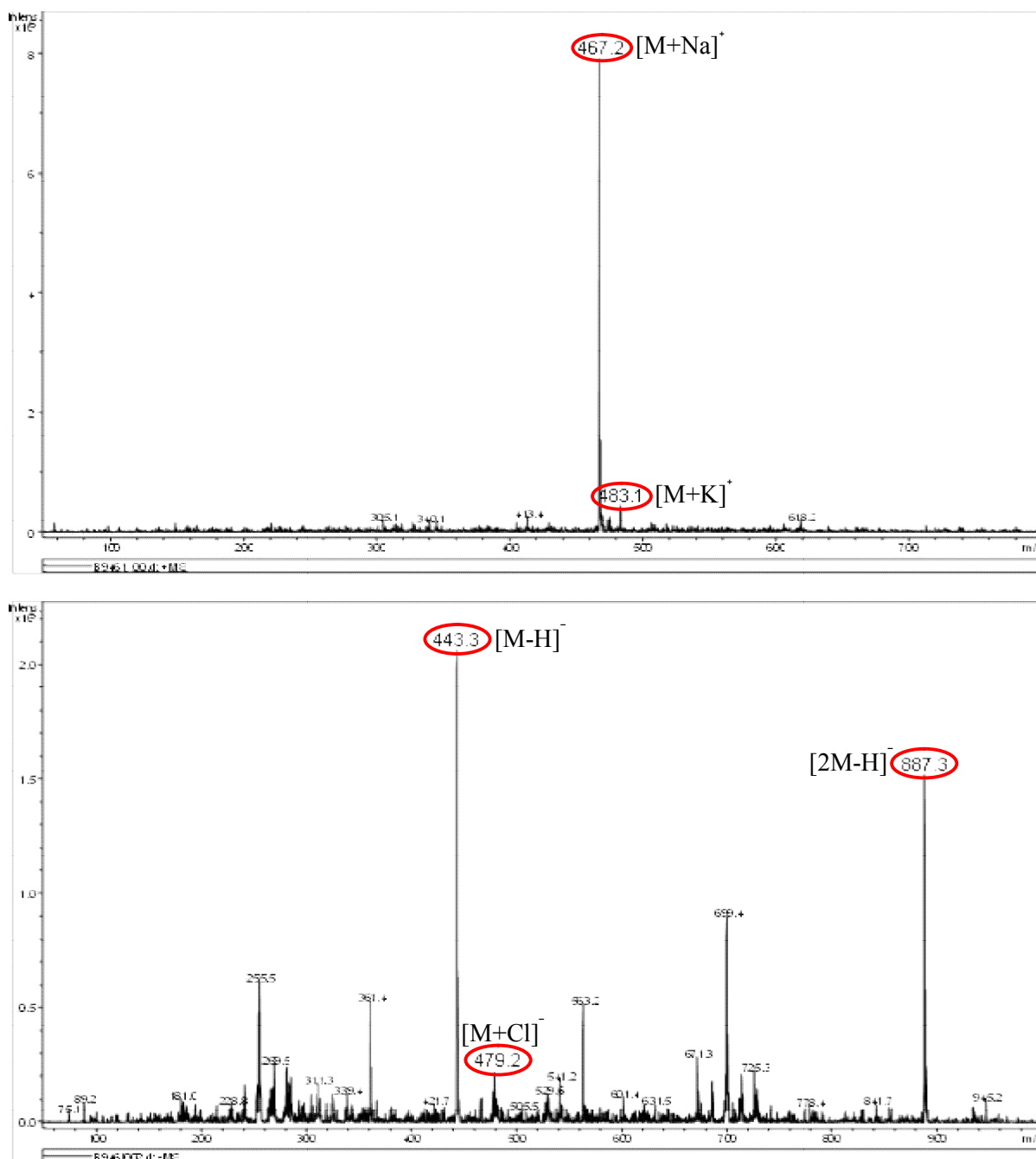


Figure IV.6.1 : spectre de masse ESI/MS (+/-) du LT B9-4-6-1.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.6.2) enregistré dans l'acétone- d_6 , montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type iridoïde que l'on peut identifier par :

- ✓ Deux doublets ($J=6.2$ Hz) d'intégration 1H chacun, à $\delta_{\text{H}} = 6.36$ et 4.89 ppm, correspondant aux deux protons vinyliques attribuables à H-3 et H-4 respectivement.
- ✓ Deux doublets ($J=8.7$ Hz) d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 5.41$ et 2.33 ppm, correspondant aux protons H-1 et H-9 respectivement, la valeur de déplacement du proton H-1 indique que ce dernier est porté par un atome de carbone d'oxygène.
- ✓ Un singulet large à $\delta_{\text{H}} = 5.08$ ppm d'intégration 1H correspondant à H-6, la valeur de déplacement de ce proton indique qu'il est porté par un carbone oxygéné.
- ✓ Un doublet ($J=7.9$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4.78$ ppm, attribuable à un proton anomérique H-1' d'un groupement glycosyle.
- ✓ deux signaux d'intégration 1H chacun, sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}} = 3.67$ et 3.86 ppm, attribuables aux deux protons H-6'a et H-6'b du CH_2 du groupement glycosyle.
- ✓ Un ensemble de signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.2$ et 3.6 ppm correspondant aux autres protons osidiques du sucre.
- ✓ Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 1.53$ ppm d'intégration 3H, attribuable aux protons du méthyle CH_3 -10.

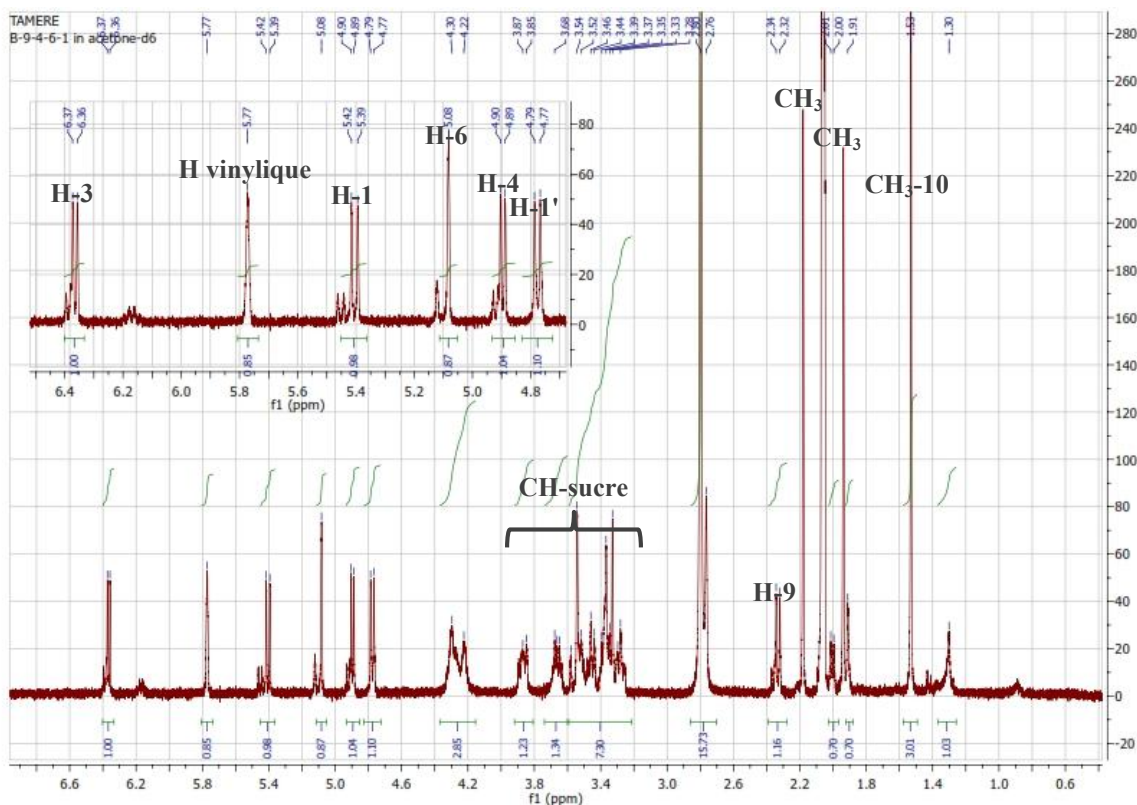
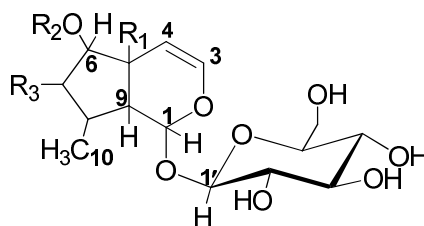


Figure IV.6.2: Spectre RMN ^1H du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

Trois singulets sont observés dans le spectre RMN ^1H , le premier à $\delta_{\text{H}} = 5.77$ ppm d'intégration 1H correspondant à un proton vinylique et les deux autres à $\delta_{\text{H}} = 2.19$ et 1.91 ppm d'intégration 3H chacun, attribuables aux protons de deux méthyles portés par un carbone vinylique. L'analyse des spectres relatifs à l'expérience HSQC (figure IV.6.3 et IV.6.4) confirme cette observation et permet l'attribution des autres signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- ✓ Une corrélation entre le proton en position 3 et le carbone C-3 à $\delta_{\text{C}} = 140.9$ ppm.
- ✓ le proton vinylique à $\delta_{\text{H}} = 5.77$ ppm permet l'attribution de son carbone à $\delta_{\text{C}} = 115.1$ ppm.
- ✓ Une corrélation entre le H-1 et le signal du carbone C-1 à $\delta_{\text{C}} = 93.9$ ppm.
- ✓ Le H-6 permet la détermination de C-6 à $\delta_{\text{C}} = 77.4$ ppm, la valeur de ce dernier indique qu'il est porté par un carbone oxygéné.
- ✓ Le H-4 corréle avec le C-4 à $\delta_{\text{C}} = 106.8$ ppm.
- ✓ Le H-1' permet l'attribution du carbone C-1' à $\delta_{\text{C}} = 98.2$ ppm.
- ✓ Une corrélation entre les deux protons H-6'a et H-6'b et le C-6' à $\delta_{\text{C}} = 62$ ppm.
- ✓ Une corrélation entre le proton en position 9 et le C-9 à $\delta_{\text{C}} = 53.3$ ppm.
- ✓ Le H-10 corréle avec le C-10 à $\delta_{\text{C}} = 16$ ppm.
- ✓ Les protons des deux méthyles à $\delta_{\text{H}} = 2.19$ et 1.91 ppm permettent l'attribution de ses carbones à $\delta_{\text{C}} = 19.3$ et 26.3 ppm respectivement.

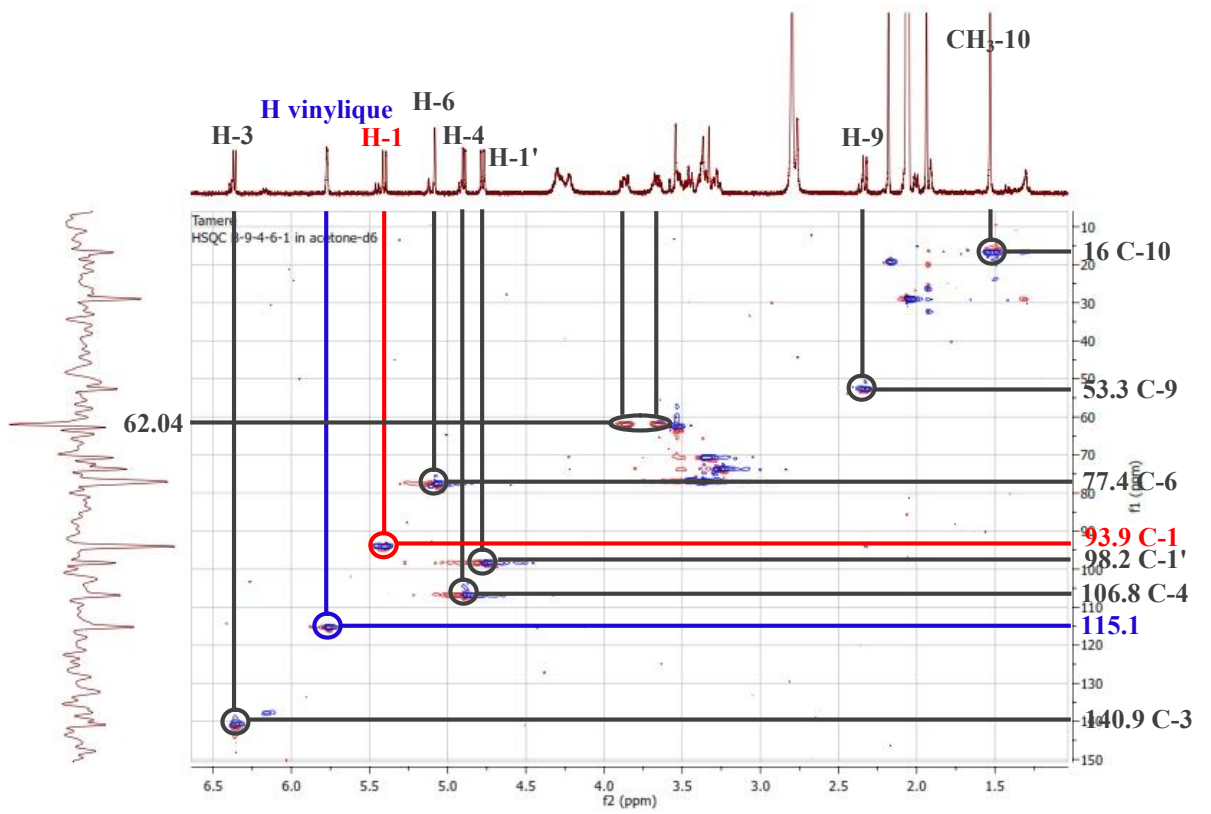


Figure IV.6.3: Spectre HSQC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

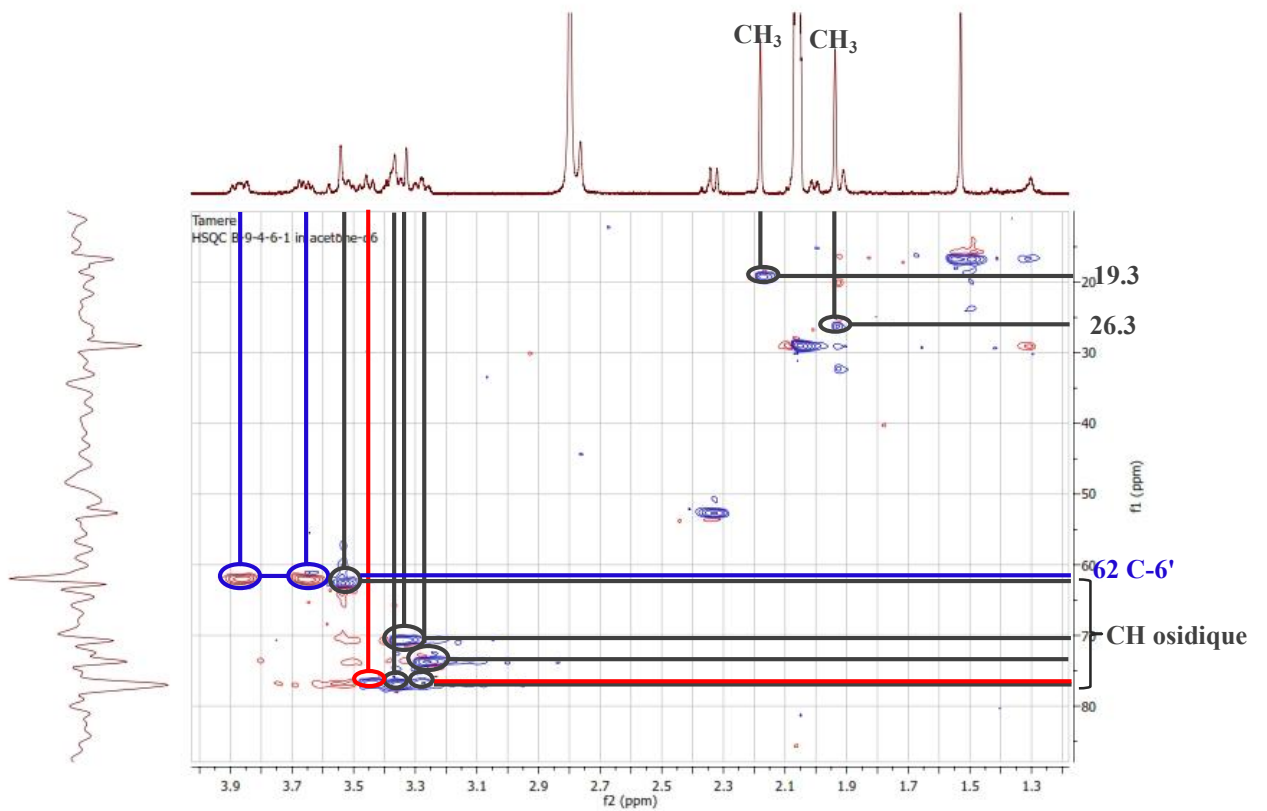
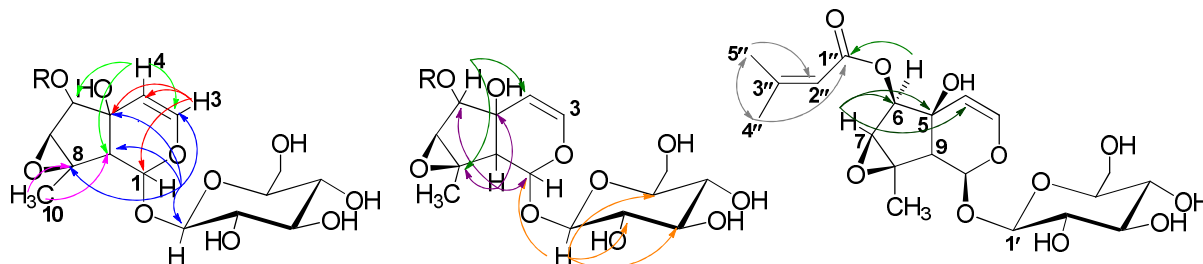


Figure IV.6.4: Spectre HSQC étalé du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.6.5) permet de tirer les indications suivantes :

- ✓ Le proton H-3 montre trois tâches de corrélation avec les carbones à $\delta_C = 72.7, 93.9$ et 106.8 ppm attribuables aux carbones C-5, C-1 et C-4 respectivement. La valeur de δ_C du carbone 5 indique qu'il est oxygéné.
 - ✓ Le proton H-1 montre cinq tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-9 à $\delta_C = 53.3$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_C = 62.2$ ppm, qui ne peut être que le C-8.
 - ✓ La troisième avec le C-5 à $\delta_C = 72.7$ ppm.
 - ✓ La quatrième avec le carbone du proton anomérique du sucre C-1' à $\delta_C = 98.2$ ppm.
 - ✓ La cinquième avec le C-3 à $\delta_C = 140.9$ ppm.
 - ✓ Le proton H-4 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première tâche avec le C-9 à $\delta_C = 53.3$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le carbone à $\delta_C = 77.3$ ppm, ce dernier montre aussi une tâche de corrélation avec le H-9, donc ce carbone ne peut être que le C-6.
 - ✓ La troisième avec le C-3 à $\delta_C = 140.9$ ppm.
 - ✓ Les protons de méthyle CH₃-10 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le carbone C-9 ($\delta_C = 53.3$ ppm) confirmé déjà par ses corrélations avec les protons H-1 et H-4.
 - ✓ La seconde avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 62.4$ ppm, ce dernier montre trois tâches de corrélation avec les protons en positions 1, 6 et 9, donc ce carbone ne peut être que le C-8 substitué par le CH₃-10.
 - ✓ Le proton H-9 montre quatre tâches de corrélation avec les carbones C-8, C-5, C-6 et C-3 ($\delta_C = 62.4, 72.7, 77.3$ et 140.9 ppm) respectivement, confirmant ainsi leurs attributions.
 - ✓ Le proton anomérique H-1' montre une tâche de corrélation avec le carbone C-1 ($\delta_C = 93.9$ ppm) ce qui confirme la localisation du groupement glycosyle en position C-1.
 - ✓ Le proton H-6 montre trois tâches de corrélation, les deux premières avec le C-8 et le C-4 ($\delta_C = 62.4$ et 106.8 ppm) respectivement et la dernière avec un carbone quaternaire d'un carbonyle à $\delta_C = 165.3$ ppm (C-1"), ce dernier est lié au carbone C-6 par un pont oxygéné.
 - ✓ Les protons des deux méthyles (CH₃-4" et CH₃-5") à $\delta_H = 2.19$ et 1.91 ppm montrent cinq tâches de corrélation chacun:
 - ✓ La première est entre CH₃-4" et C-5" à $\delta_C = 19.3$ ppm.

- ✓ La seconde est entre $\text{CH}_3\text{-5''}$ et C-4'' à $\delta_{\text{C}} = 26.3$ ppm
- ✓ La troisième avec un carbone CH vinylique ($\delta_{\text{H}} = 5.77$ ppm) à $\delta_{\text{C}} = 115.1$ ppm attribué à C-2'' .
- ✓ La quatrième avec un carbone quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 157.4$ ppm), attribuable à C-3'' .
- ✓ La cinquième avec le C-1'' à $\delta_{\text{C}} = 165.4$ ppm.
- ✓ Le H-7 montre trois tâches de corrélation avec le C-6 , C-5 et C-4 à $\delta_{\text{C}} = 77.3$, 72.7 et 106.8 ppm respectivement.



L'examen de l'étalement des spectres HMBC et HSQC permet l'attribution des carbones du groupement glycosyle et par comparaison avec la bibliographie [5] on déduit que notre sucre est le glucose.

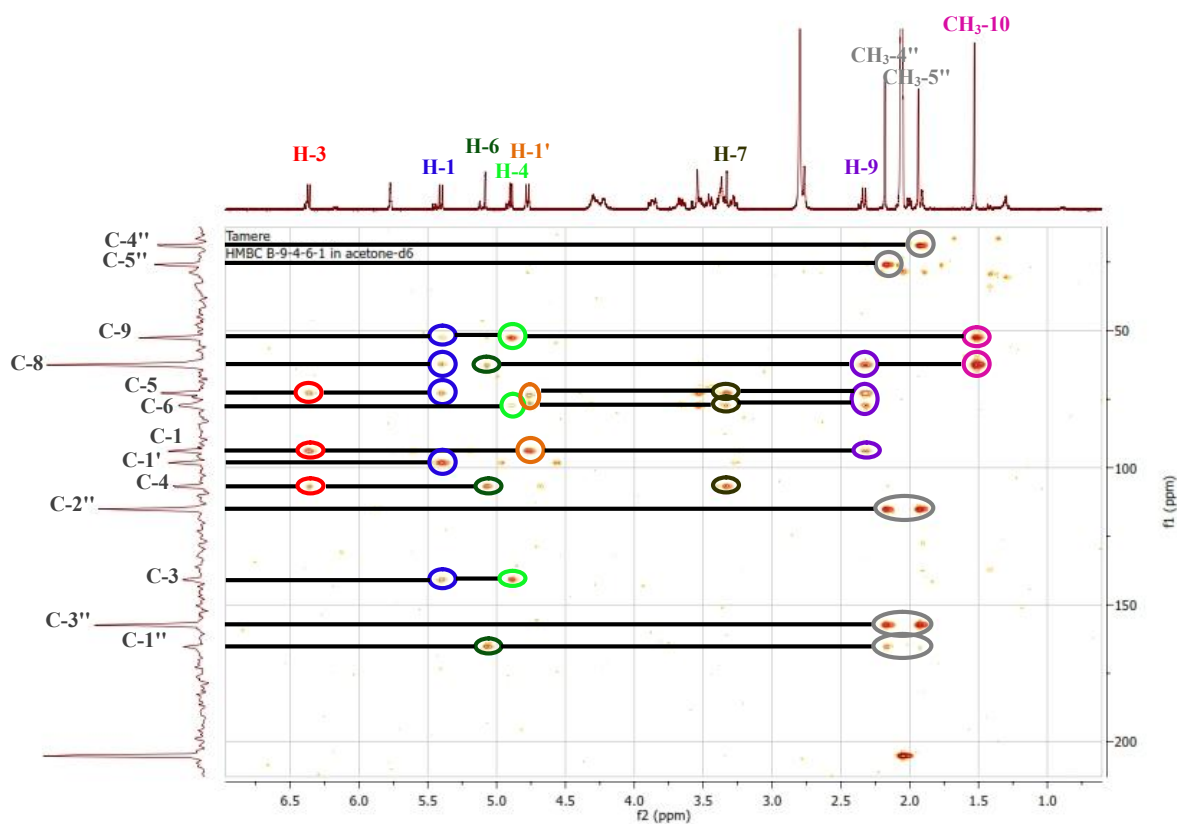


Figure IV.6.5: Spectre HMBC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

L'ensemble des résultats RMN 1 & 2D sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau IV.7: les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LT B9-4-6-1

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1	93.9	5.41	2'	76.6	3.24-3.57
2	-	-	3'	77	3.24-3.57
3	140.9	6.36	4'	70.8	3.24-3.57
4	106.8	4.89	5'	76.8	3.24-3.57
5	72.7	-	6'	62	3.67, 3.86
6	77.3	5.08	1''	165.3	-
7	77.1	3.24-3.57	2''	115.1	5.77
8	62.4	-	3''	157.4	-
9	53.3	2.33	4''	26.3	2.19
10	16	1.53	5''	19.3	1.91
1'	98.2	4.78			

L'étude des spectres ESI/MSMS (-) et ESI/MSMS (+) indique la présence des fragments relatif à la structure de notre composé. La majorité des pics sont interpréter comme des possibilités de fragmentation pour confirmer la structure de notre composé.

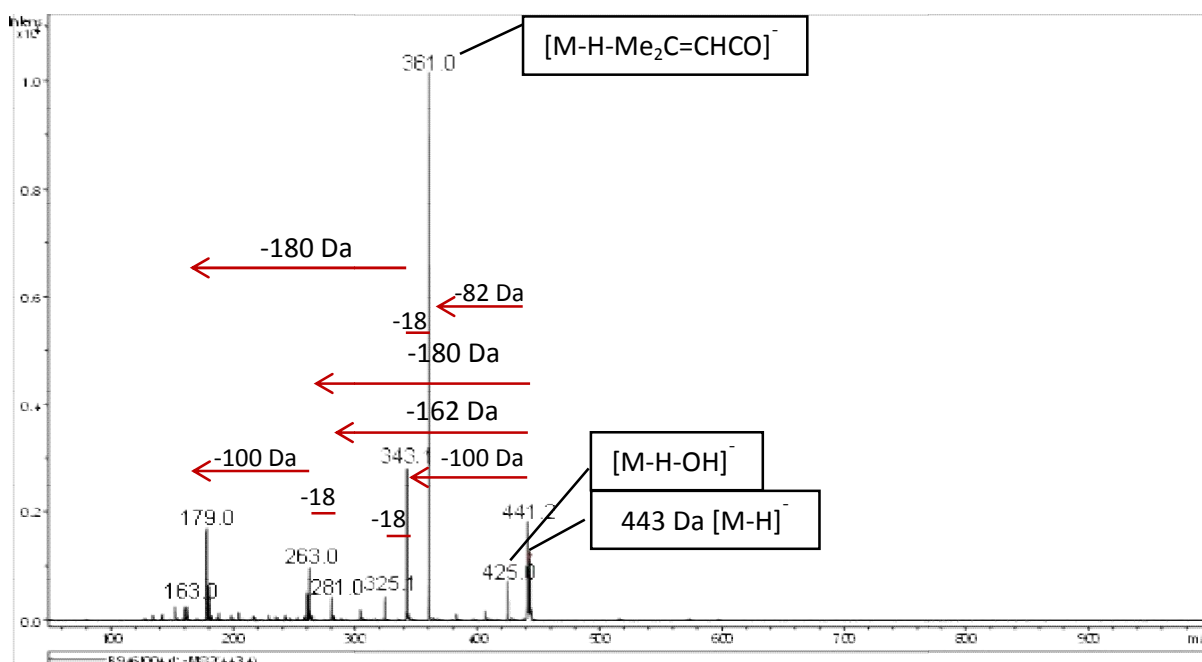
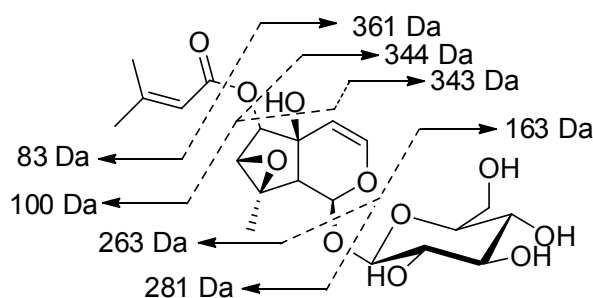


Figure IV.6.6: spectre de masse ESI/MSMS(-) du LT B9-4-6-1.

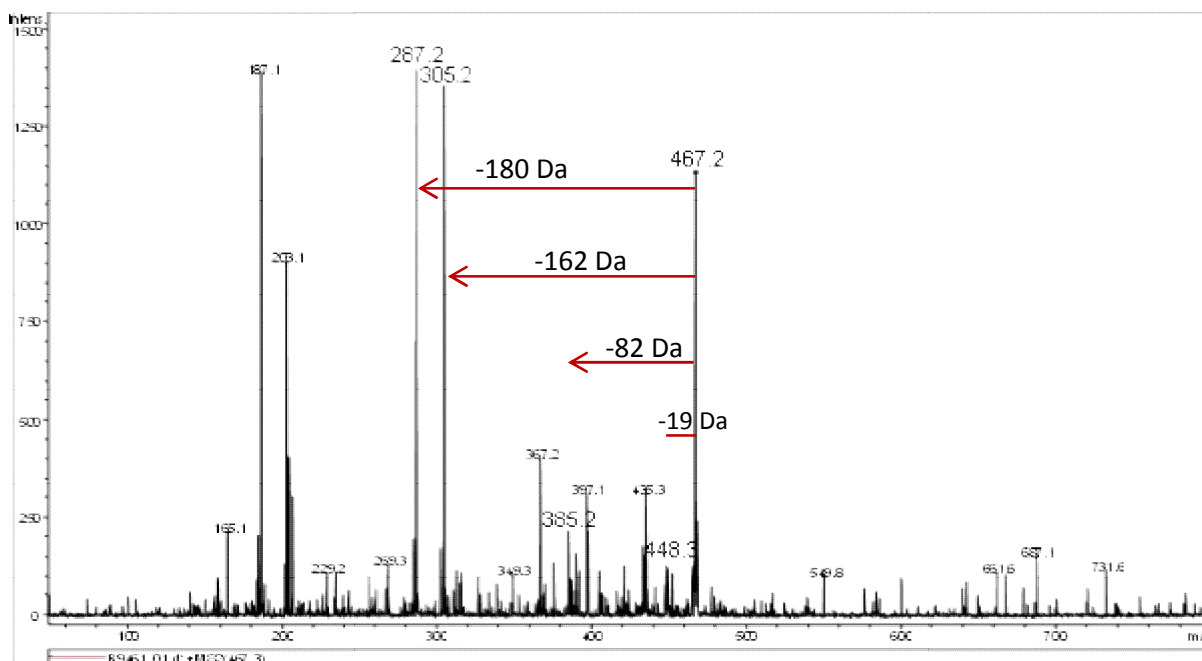
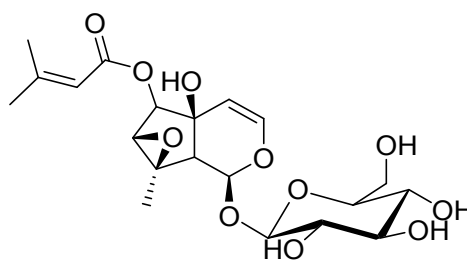


Figure IV.6.7: spectre de masse ESI/MSMS(+) du LT B9-4-6-1.

Ces données confirment la structure de notre composé le 6-*O*-seneciolyantirrhinoside [7].



Un réexamen des spectres RMN ^1H et HSQC de ce composé, montre que notre produit contient un autre minoritaire par la présence d'autres pics et par comparaison à la littérature [7-9], ce produit a été isolé sous-forme d'un mélange de 6-*O*-seneciolyantirrhinoside et son dérivé 6-*O*-angeloylantirrhinoside, ce dernier est confirmé par la présence de deux CH vinylique H-2'' et H-3'' ($\delta_{\text{H}} = 6.34$ ppm) et aussi par les deux doublets des deux méthyles porté par les carbonnes C-2'' et C-3'' ($\delta_{\text{H}} = 1.93, 1.87$ ppm) (Spectre IV.6.8).

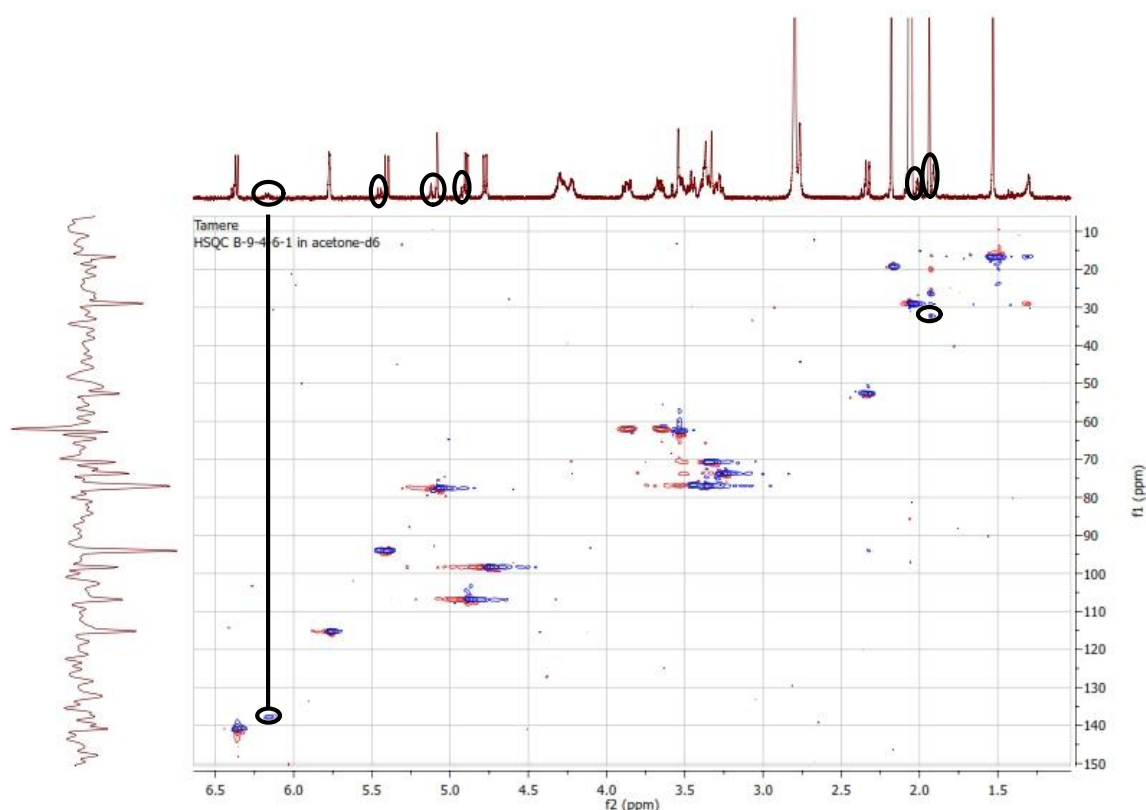
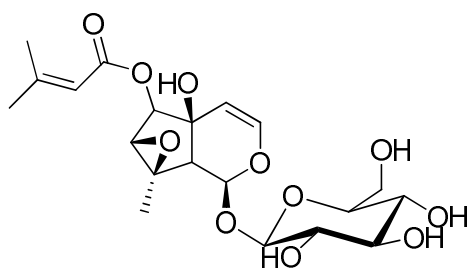
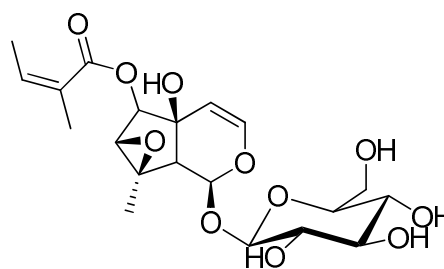


Figure IV.6.8: Spectre HSQC du LT B9-4-6-1 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

Donc on a un mélange de deux composés, le premier est le 6-*O*-seneciolyantirrhinoside (majoritaire) et le second est le 6-*O*-angeloylantirrhinoside (minoritaire). Ces deux composés sont isolés seulement de trois espèces du genre *Linaria*: *L. multicaulis* [7], *L. clementei* [8] et *L. heterophylla* [9].



6-*O*-seneciolyantirrhinoside



6-*O*-angeloylantirrhinoside

1.7. Éluclation structurale du composé LT B9-6-1B-6-4

L'étude des spectres ESI/MS du composé LT B9-6-1B-6-4 enregistrés en mode positif (figure IV.7.1) et négatif (figure IV.7.2) montre des pics identiques pour notre composé, le spectre ESI/MS(+) montre les pics à $m/z = 348.3$ $[M+NH_4]^+$, 353 $[M+Na]^+$, 380 $[M+NH_4+MeOH]^+$, 385 $[M+Na+MeOH]^+$, 678.7 $[2M+NH_4]^+$, 683 $[2M+Na]^+$, 710 $[2M+NH_4+MeOH]^+$ et 715 $[2M+Na+MeOH]^+$. Le spectre ESI/MS(-) montre les pics à $m/z =$

329.5 [M-H]⁻, 365.5 [M+Cl]⁻, 375.4 [M+COOH]⁻, 389.5 [M+COOCH₃]⁻, 705 [2M+COOH]⁻ et 719.6 [2M+COOCH₃]⁻. Tous ces pics confirment que la masse de notre composé est de 330 Da.

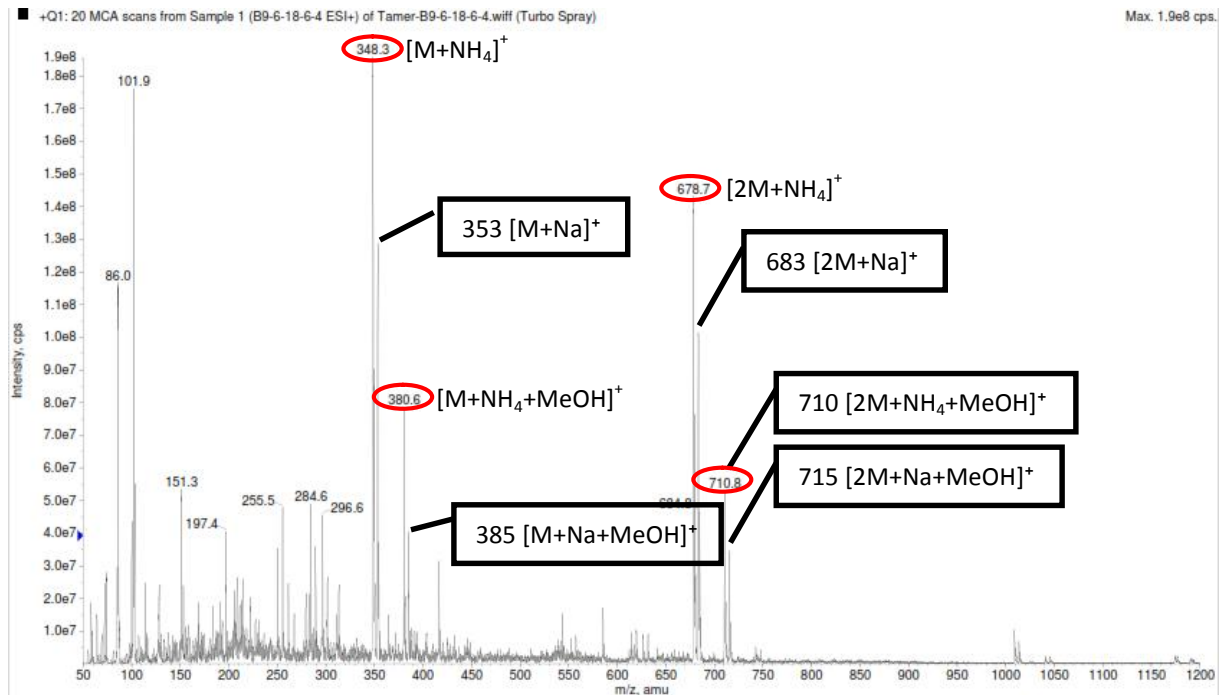


Figure IV.7.1 : spectre de masse ESI/MS + du LT B9-6-1B-6-4.

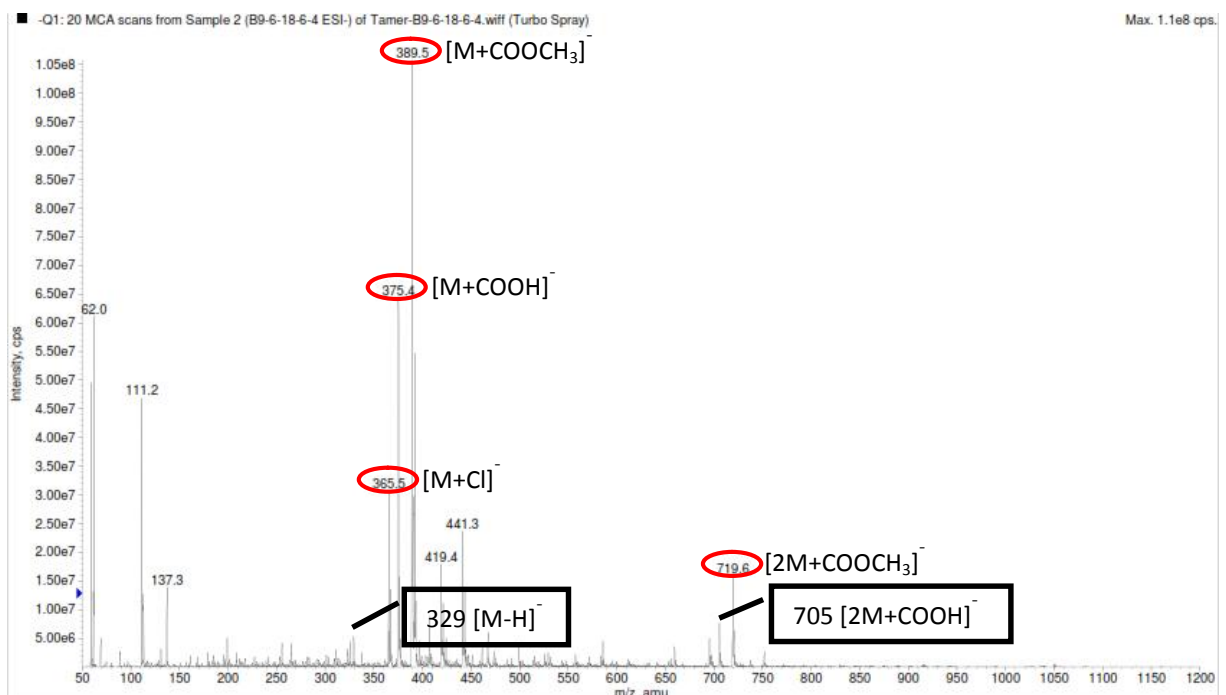
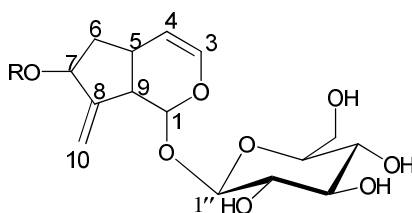


Figure IV.7.2 : spectre de masse ESI/MS - du LT B9-6-1B-6-4.

Le composé LT B9-6-1B-6-4 visible sous UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.7.3) enregistré dans CD_3OD , montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type iridoïde que l'on peut identifier par:

- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 6.3, 1.8$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.17$ ppm attribuable au proton vinylique H-3.
- ✓ Un doublet ($J = 2.9$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.47$ ppm d'intégration 1H correspond à le H-1.
- ✓ Deux singulets large ($J = 2.2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.33$ et 5.26 ppm d'intégration 1H chacun, attribuables aux deux protons vinylique H-10a et H-10b.
- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 6.3, 2.7$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 4.72$ ppm d'intégration 1H attribuable au proton vinylique H-4.
- ✓ Un doublet ($J = 7.9$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4.66$ ppm correspond à le proton anomérique H-1' d'un groupement glycosyle.
- ✓ Un triplet ($J = 2.4$ Hz, 1H) à $\delta_{\text{H}} = 4.54$ ppm, attribuable à H-7. La valeur de δ_{H} de ce proton indique qu'il est porté par un carbone oxygéné.
- ✓ Un groupement des signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.1$ et 4 ppm attribuables aux protons osidiques du groupement glycosyle.
- ✓ Un signal sous-forme multiplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 2.96$ ppm attribué au H-9.
- ✓ Un signal sous-forme multiple ($\delta_{\text{H}} = 2.86$ ppm) d'intégration 1H attribuable au H-5.
- ✓ deux signaux sous-forme multiplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 1.92$ et 1.74 ppm chacun attribuables aux protons d'un CH_2 -6 du squelette de l'iridoïde.



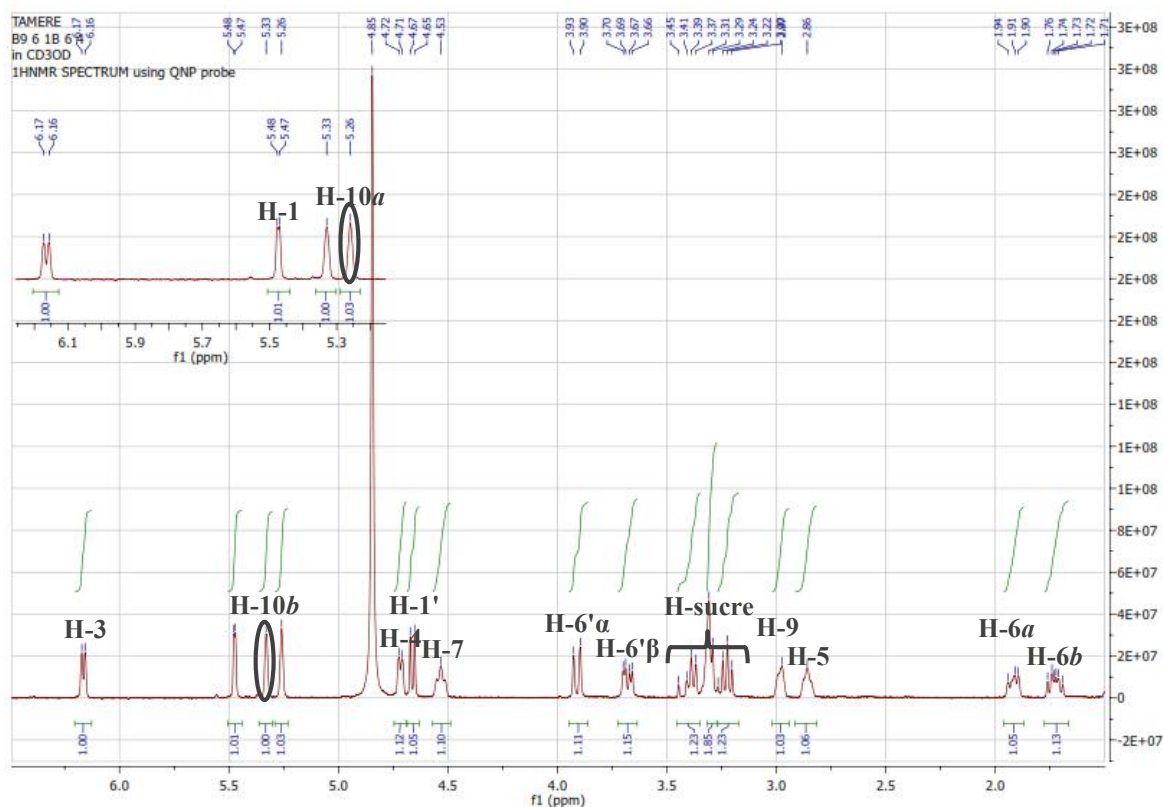


Figure IV.7.3: spectre RMN ^1H du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience COSY (figure IV.7.4) permet de tirer les indications suivantes :

- ✓ Le H-4 montre deux tâches de corrélation, la première avec le H-3 à $\delta_{\text{H}} = 6.17$ ppm et la seconde avec le H-5 à $\delta_{\text{H}} = 2.86$ ppm.
- ✓ Le H-1 ($\delta_{\text{H}} = 5.47$ ppm), les deux protons H-10 ($\delta_{\text{H}} = 5.33$ et 5.26 ppm) et le H-5 corrélient avec le signal du proton H-9 à $\delta_{\text{H}} = 2.93$ ppm.
- ✓ Le H-7 montre une tâche de corrélation avec les deux protons H-6a et H-6b à $\delta_{\text{H}} = 1.87$ et 1.68 ppm respectivement. Ces deux derniers montrent une tâche de corrélation avec le H-5 à $\delta_{\text{H}} = 2.86$ ppm.
- ✓ Le H-1' montre une tâche de corrélation avec un signal dans l'ensemble des signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.1$ et 4 ppm.

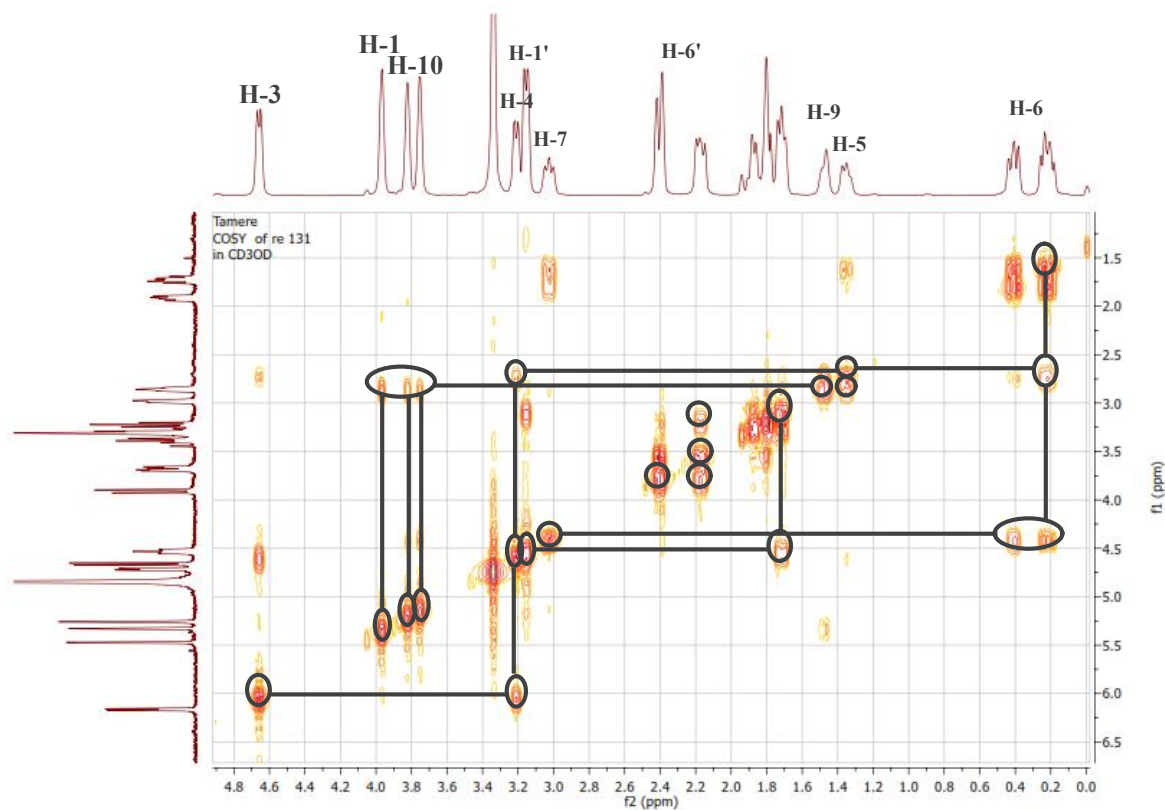


Figure IV.7.4: spectre COSY du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience RMN ^{13}C (figure IV.7.5) montre la présence de 15 atomes de carbones attribuables comme suit:

- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 140.9$ ppm attribuable à C-3.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 111.1$ ppm attribuable à C-10.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 107.5$ ppm attribuable à C-4.
- ✓ Le carbone C-1' attribué pour le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 99.5$ ppm.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 95.4$ ppm attribuable à C-1.
- ✓ Les quatre signaux des carbones à $\delta_{\text{C}} = 78.3, 78, 74.9$ et 74.3 ppm attribuables aux carbones C-2', C-3', C-4' et C-5' de l'unité du glycosyle.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 74.9$ ppm attribuable à C-7.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 62.8$ ppm attribuable à C-6' de l'unité du glycosyle.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 45.3$ ppm attribuable à C-9.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 40.9$ ppm attribuable à C-6.
- ✓ Le signal du carbone à $\delta_{\text{C}} = 30$ ppm attribuable à C-5.

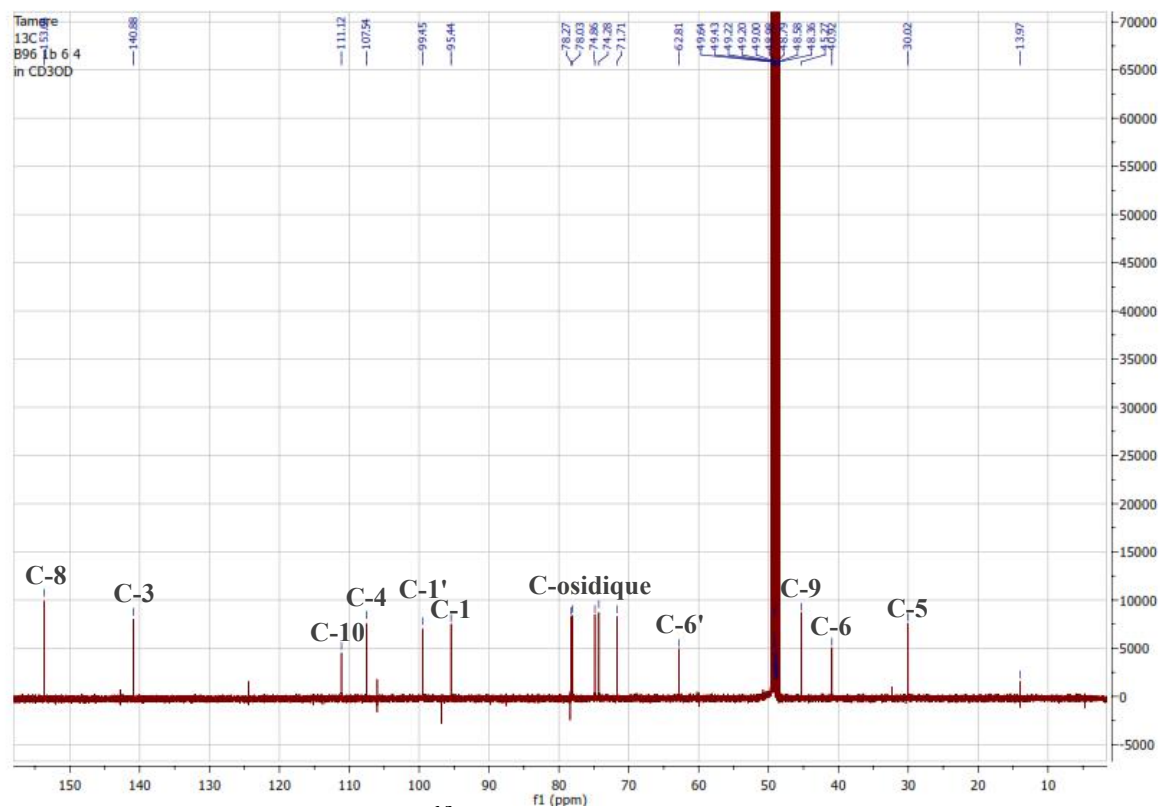


Figure IV.7.5: spectre RMN ^{13}C du LT B9-6-1B-6-4 (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.7.6) confirme l'attribution des signaux du RMN ^{13}C .

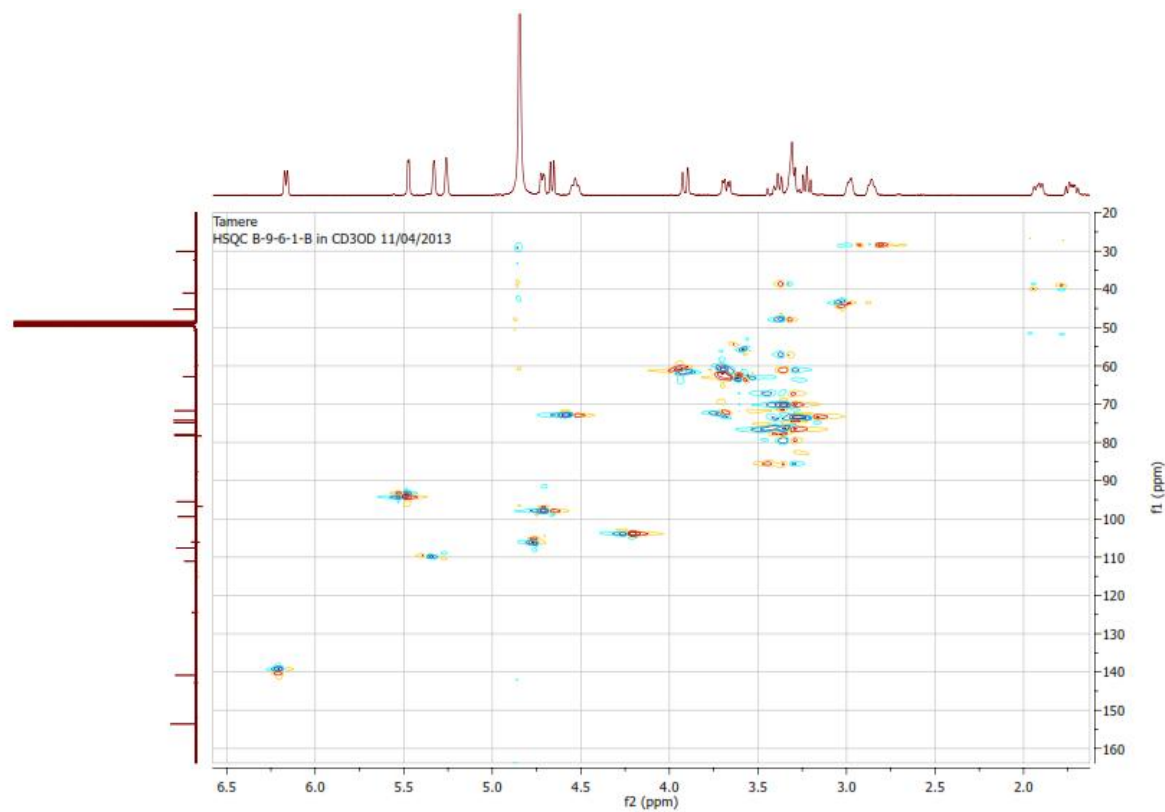


Figure IV.7.6: Spectre HSQC du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.7.7) permet de tirer les indications suivantes :

- ✓ Le proton H-3 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal du carbone à $\delta_C = 30$ ppm, ce dernier corrèle avec les protons H-1 et H-6, donc ce carbone ne peut être que le C-5.
 - ✓ La seconde avec le C-1 à $\delta_C = 95.4$ ppm.
 - ✓ La troisième avec le C-4 à $\delta_C = 107.5$ ppm.
 - ✓ Le H-1 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-5 à $\delta_C = 30$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le signal à $\delta_C = 99.5$ ppm, déjà attribué à C-1'.
 - ✓ La troisième avec le carbone à $\delta_C = 140.9$ ppm attribué à C-3.
 - ✓ Le H-4 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-5 à $\delta_C = 30$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le C-9 à $\delta_C = 45.3$ ppm.
 - ✓ La troisième avec le C-3 à $\delta_C = 140.9$ ppm.
 - ✓ Le H-1' montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le carbone à $\delta_C = 74.3$ ppm attribuable à C-2'.
 - ✓ La seconde avec les deux signaux à $\delta_C = 78$ et 78.3 ppm attribuables aux C-5' et C-3' respectivement.
 - ✓ La troisième avec le C-1 à $\delta_C = 95.4$ ppm.
 - ✓ Les deux protons H-6a et H-6b montrent cinq tâches de corrélation chacun:
 - ✓ La première avec le C-5 à $\delta_C = 30$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le C-9 à $\delta_C = 45.3$ ppm.
 - ✓ La troisième avec le carbone à $\delta_C = 74.9$ ppm attribué à C-7.
 - ✓ La quatrième avec le signal à $\delta_C = 107.5$ ppm déjà attribué à C-4.
 - ✓ La cinquième avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 153.6$ ppm, attribuable à C-8.
 - ✓ Les deux protons H-10a et H-10b montrent trois tâches de corrélation chacun :
 - ✓ Avec le C-9 à $\delta_C = 45.3$ ppm.
 - ✓ Avec le C-7 à $\delta_C = 74.9$ ppm.
 - ✓ Avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 153.6$ ppm qui ne peut être que le C-8.
 - ✓ Le H-5 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-6 à $\delta_C = 40.9$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le C-7 à $\delta_C = 74.9$ ppm.

✓ La troisième avec le C-4 à $\delta_C = 107.5$ ppm.

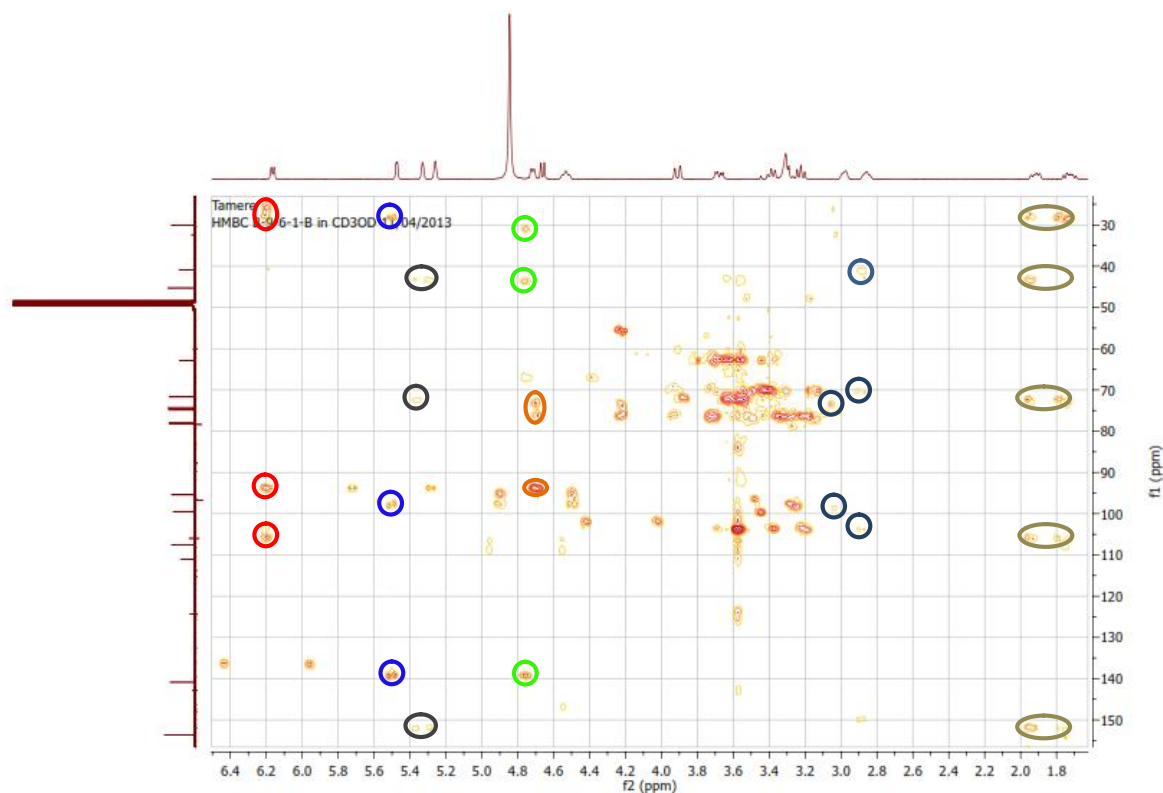
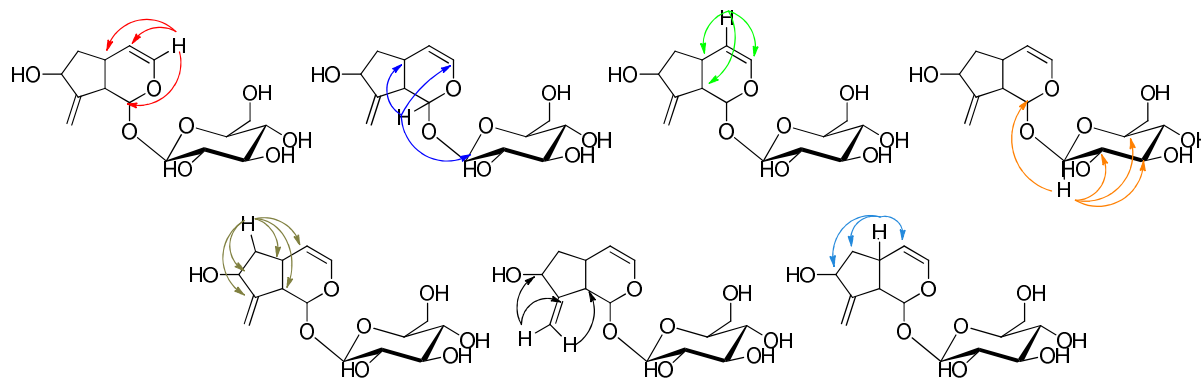
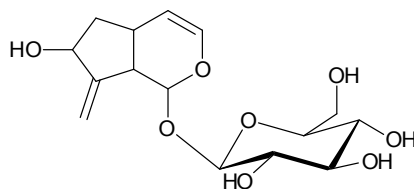


Figure IV.7.7: spectre RMN HMBC du LT B9-6-1B-6-4 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

Les données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C sont résumés dans le tableau suivant, elles orientent la structure de notre composé vers l'iridoïdes antirrhide [10].

Tableau IV.8: les données spectroscopique du RMN ^1H et ^{13}C du LT B9-6-1B-6-4

position	δ_C	δ_H	position	δ_C	δ_H
1	95.4	5.47	9	45.3	2.93
2	-	-	10	111.1	5.33, 5.26
3	140.9	6.17	1'	99.5	4.78
4	107.5	4.72	2'	74.3	3.1-3.5
5	30	2.86	3'	78.3	3.1-3.5
6	40.9	1.87, 1.68	4'	71.7	3.1-3.5
7	74.9	4.54	5'	78	3.1-3.5
8	153.6	-	6'	62.8	3.67, 3.86



Le spectre ESI/MSMS (figure IV.7.8) enregistré en mode positif montre des pics confirment la proposition de notre structure.

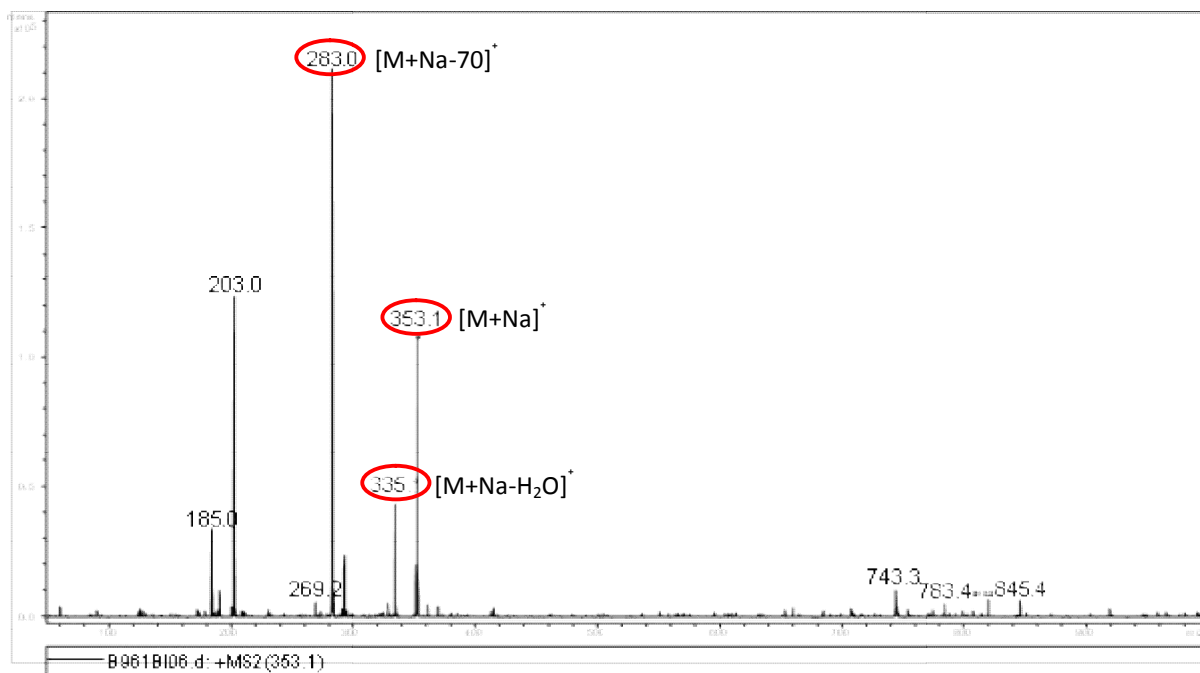
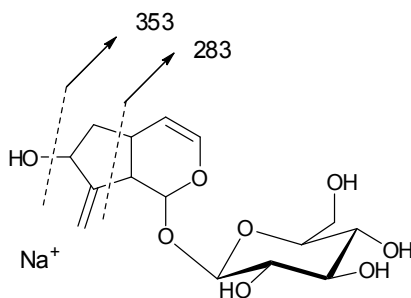


Figure IV.7.8: spectre de masse ESI/MSMS + du LT B9-6-1B-6-4.

1.8. Le profil GC-MS de la phase éther de pétrole

L'investigation de la phase éther de pétrole par GC-MS dans le but de déterminer sa composition chimique en acides gras et ses dérivés, montre la présence de 11 pics (Figure IV.8) dont 9 sont déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

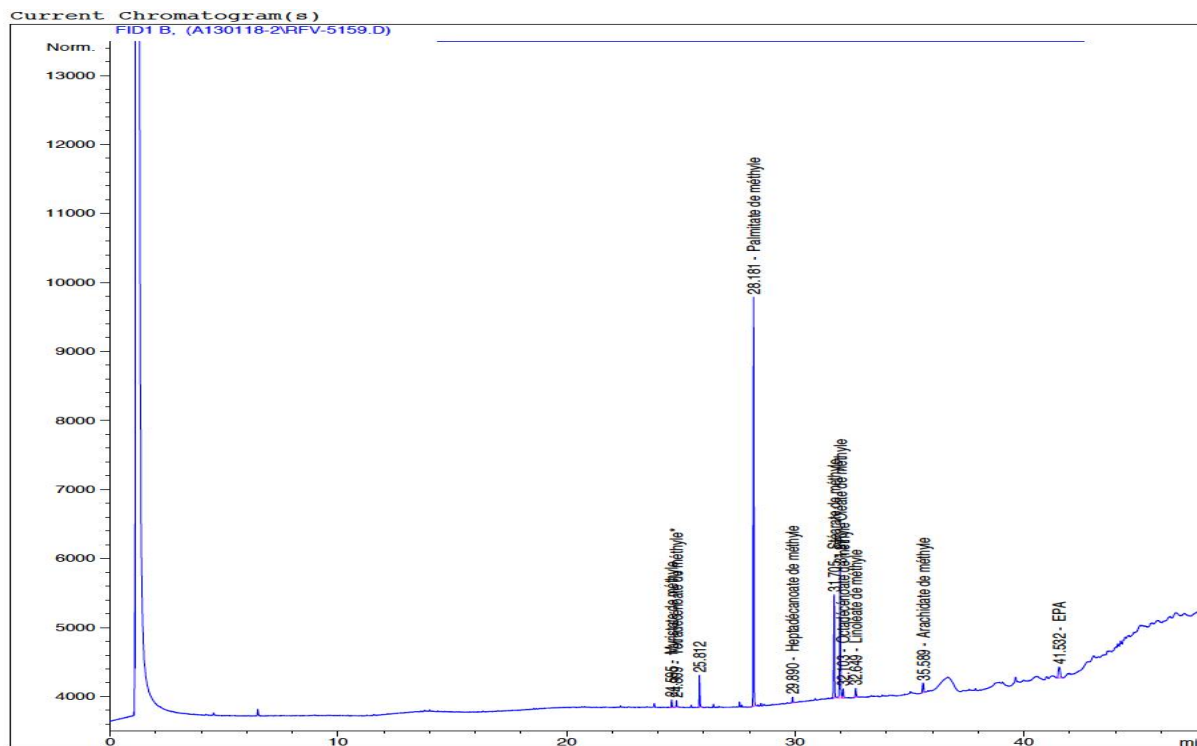
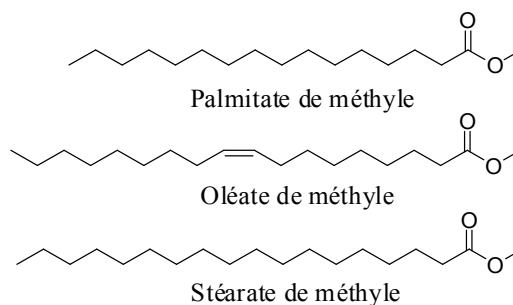


Figure IV.8: Profil GC-MS de la phase éther de pétrole

Tableau IV.9: composition chimique de la phase éther de pétrole de *L. tingitana*

Composé	R _t	%
Myristate de méthyle	24.595	1.04812
Tétradécénoate de méthyle	24.809	0.99960
Palmitate de méthyle	28.181	53.83782
Heptadécénoate de méthyle	29.890	0.83461
Stéarate de méthyle	31.705	15.81679
Oléate de méthyle	31.970	21.28226
Octadécénoate de méthyle	32.103	1.48831
Linoléate de méthyle	32.649	1.69678
Arachidate de méthyle	35.589	1.78081
totale		98.7851

On remarque que l'extrait éther de pétrole contient trois produits majoritaires qui sont palmitate de méthyle (PM 53.83 %), oléate de méthyle (OM 21.28 %) et stéarate de méthyle (SM 15.81 %). Les deux produits PM et SM sont détectés déjà dans *L. reflexa*[\[11\]](#) et *L. multicaulis*[\[7\]](#).



1.9. Le profil LC-MS de la phasen-BuOH

L'investigation de la phasen-butanol de *L. tingitana* avec la méthode LC-MS en utilisant deux profils a montré la présence de quelque types des métabolites notamment les terpénoïdes. Les conditions du premier profil (figure IV.9.1) sont spécifiques pour les flavonoïdes (voir chapitre III), les résultats montrent presque l'absence des flavonoïdes dans cette phase, mais la présence de deux pics majoritaires $[M-H]^-$ avec la même masse de $m/z = 593$, leurs identification reste à faire, par contre le second profil (spectre n° IV.9.2) contient quelques pics identifiés par masse comme le composé LT B9-4-6-1 et aussi le composé A présenté par la masse $m/z = 385$ attribuable à $[M+Na]^+$ (spectre n° IV.9.3) donc la masse de notre produit est de 362 Da, cette masse est connu pour l'iridoïde antirrhinoside qui est bien distribué dans le genre *Linaria* et le composé LT B9-4-6-1 est un dérivé de ce produit.

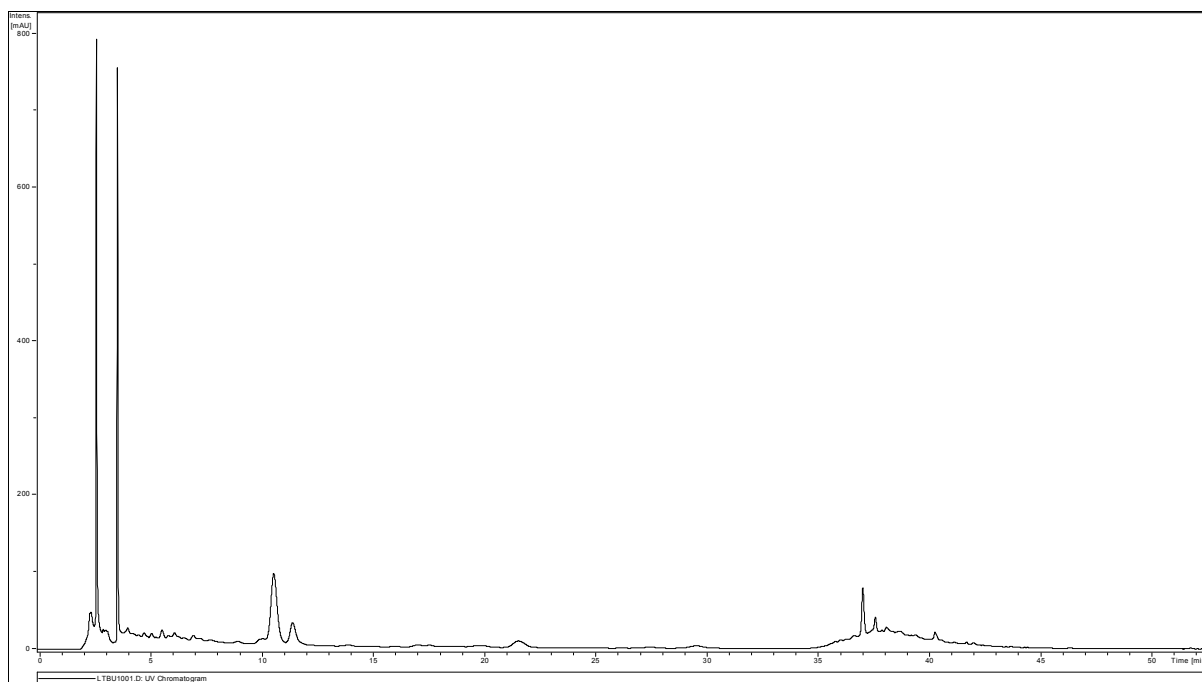


Figure IV.9.1: Profil LC-MS (1) en mode positif de l'extrait *n*-BuOH

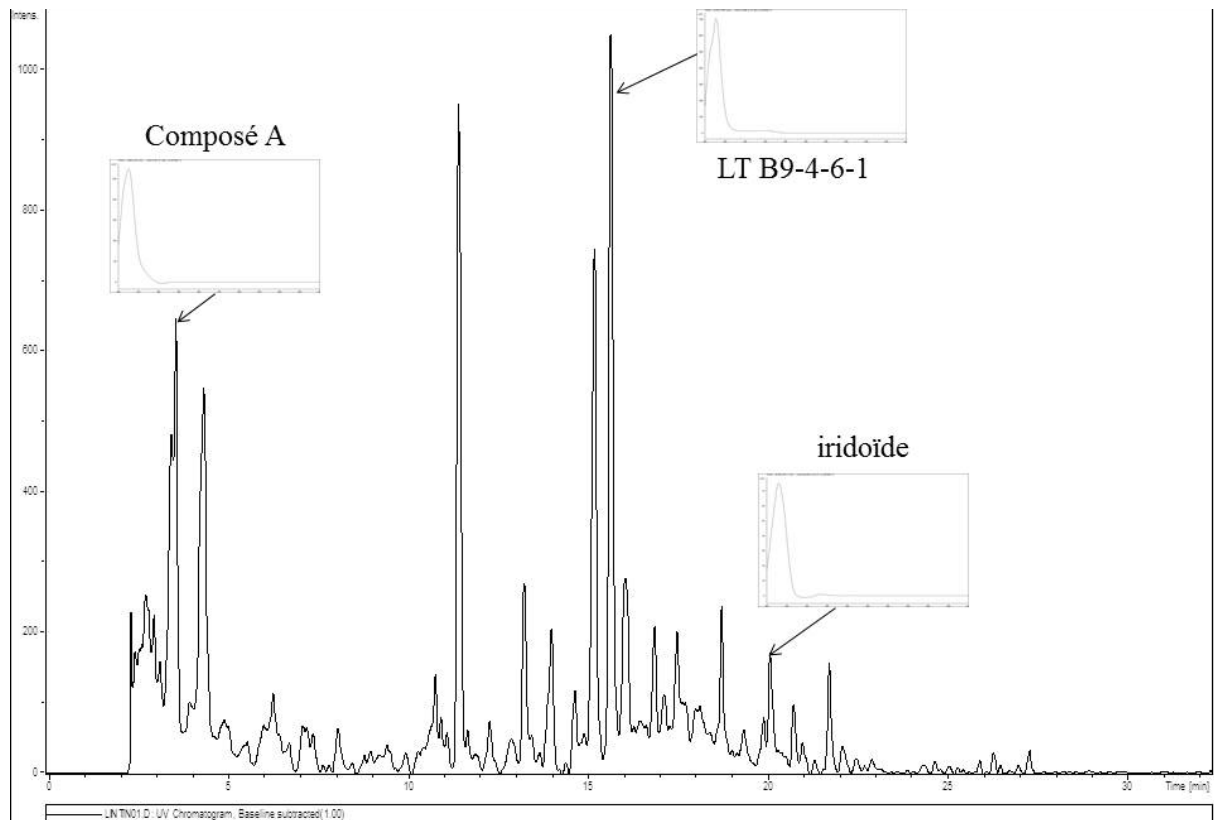


Figure IV.9.2: Profile LC-MS (2) en mode positif de l'extrait *n*-BuOH

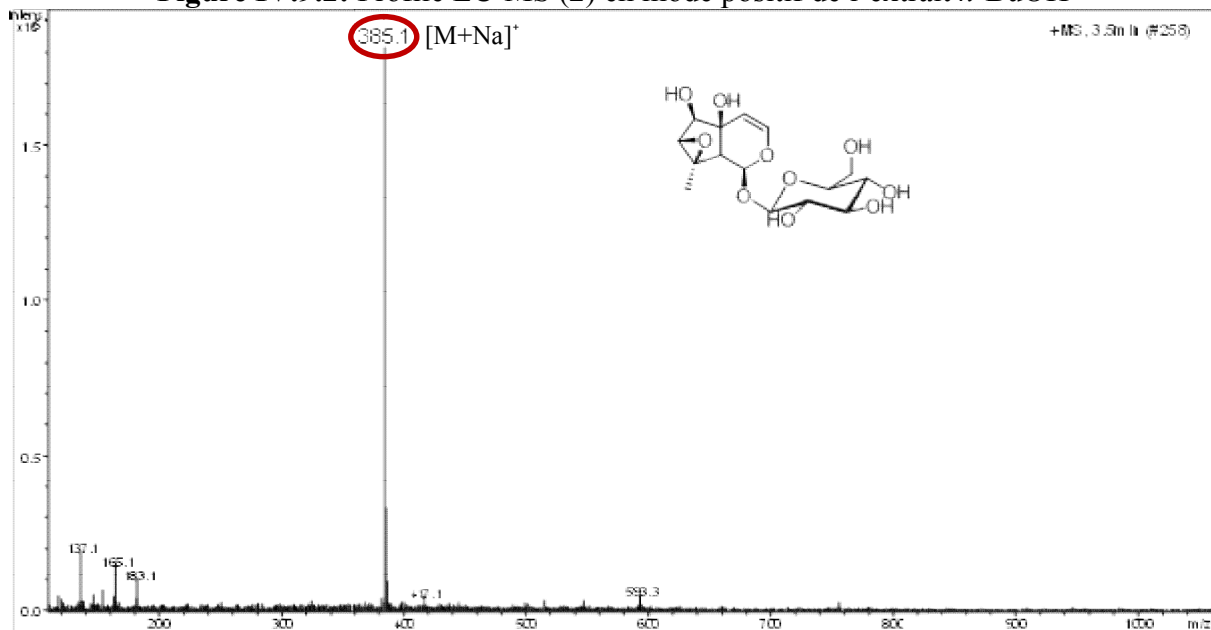


Figure IV.9.3: masse ESI/MS (+) du composé A (antirrhinoside)

2. Identification des produits isolés de *L. reflexa*

2.1. Éluclation structurale du composé LR M-1

La fluorescence noire-violette de ce flavonoïde sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.10.1) enregistré dans le DMSO- d_6 ainsi que ces spectres étalés (fig. IV.10.2 et IV.10.3) montre:

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=12.96$ ppm, que l'on ne peut attribuer qu'au proton du OH en position 5 (OH-5).
- ✓ Une para substitution du noyau B (OR-4) déduit de:

L'existence d'un doublet ($J = 8.8$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=8.05$ ppm, attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration à $\delta_{\text{H}}=7.18$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.

- ✓ Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=6.95$ et 6.94 ppm, attribuables aux H-3 et H-6 ou H-8.
- ✓ La Présence de deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier est un doublet ($J=6.9$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=5.13$ ppm, caractéristique d'un proton anomérique identifiant une liaison O-sucre, ce sucre est probablement un Glucose ou un Galactose vu la valeur de la constante de couplage qui écarte la possibilité du mannose et le second est un singulet large à $\delta_{\text{H}}=4.58$ ppm attribuable à un proton anomérique d'un groupement rhamnosyle de configuration α (J très petite).
- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}}=3.87$ et 3.7 ppm, attribuables aux deux groupements méthoxyles.
- ✓ Un doublet ($J=6.2$ Hz) d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}=1.07$ ppm attribuable à CH_3 -6''' du groupement rhamnosyle.

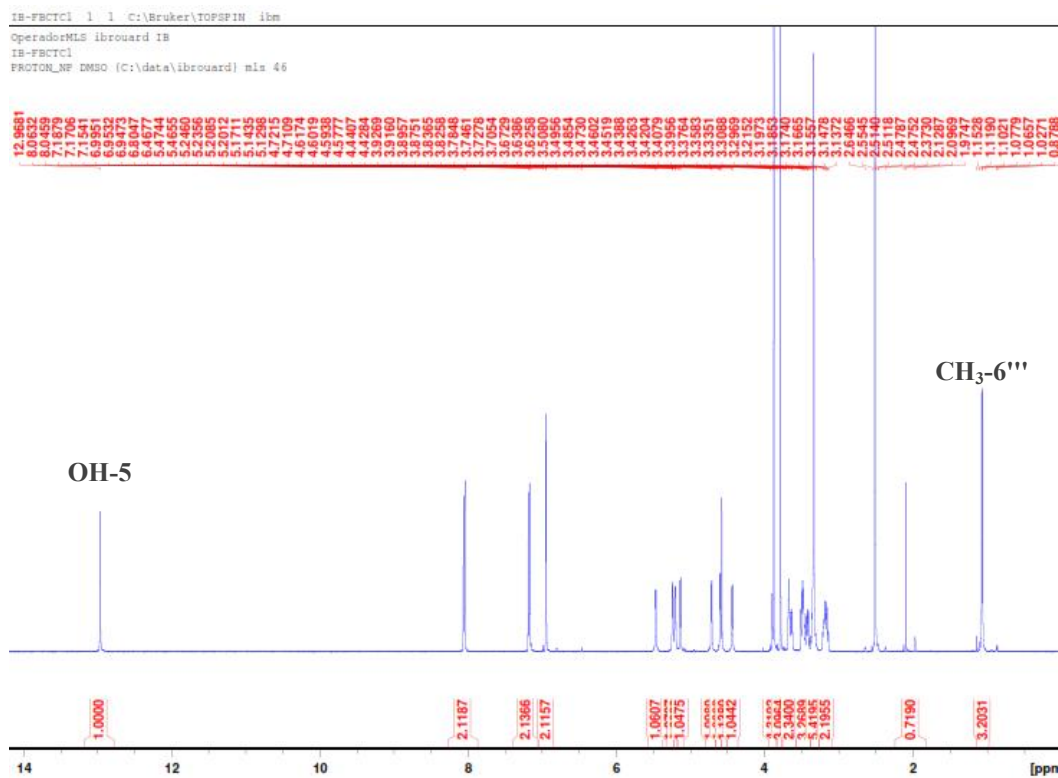


Figure IV.10.1: RMN ¹H du LR M-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

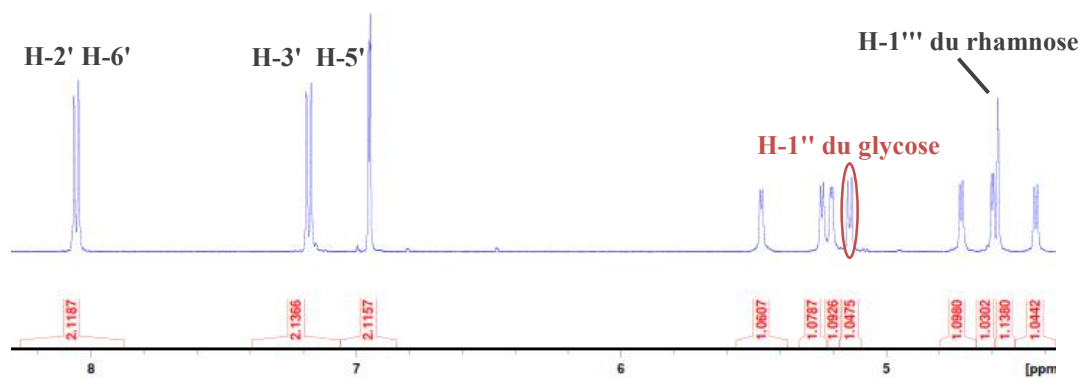


Figure IV.10.2: RMN ¹H étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

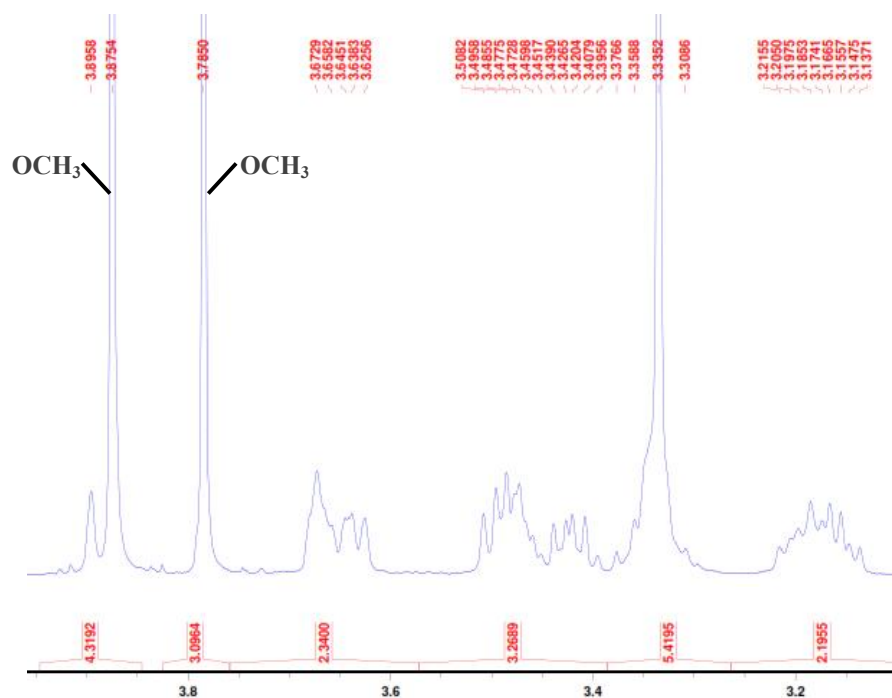


Figure IV.10.3: RMN ^1H étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Le tableau IV.10 rassemble les données RMN ^1H .

Tableau IV.10: Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) du LR M-1

δ_{H} (ppm)	Intégration	J (Hz)	Attribution
12.96	1H	<i>s</i>	OH-5
8.05	2H	<i>d</i> (8.8)	H-2' et H-6'
7.18	2H	<i>d</i> (8.8)	H-3' et H-5'
6.94	1H	<i>s</i>	H-3, H-6 ou H-8
6.95	1H	<i>s</i>	H-3, H-6 ou H-8
5.13	1H	<i>d</i> (6.85)	H-1" Glc
4.58	1H	<i>br. s</i>	H-1" Rhm
3.87	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3.7	3H	<i>s</i>	OCH ₃
1.07	3H	<i>d</i> (6.15)	CH ₃ -6" du Rhm

L'analyse des spectres relatifs à l'expérience HSQC (figure IV.10.4 et IV.10.5) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone qui les portent :

- Les deux protons H-2' et H-6' permettent l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 128.4$ ppm aux carbones C-2' et C-6'.
- Les deux protons H-3' et H-5' permettent l'attribution du signal à $\delta = 114.8$ ppm aux carbones C-3' et C-5'.
- Le H-1" du glucose ou galactose permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 100.4$ ppm à l'atome de carbone C-1" du glucose ou galactose.

- Le H-1''' du groupement rhamnosyle permet l'attribution du signal à $\delta_C = 100.4$ ppm au carbone C-1'''.
- Les protons des deux groupements méthoxyles à $\delta_H = 3.7$ et 3.87 ppm permettent l'attribution des carbones respectifs à $\delta_C = 60.3$ et 55.6 ppm.
- Les protons du méthyle permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 17.7$ ppm à l'atome de carbone C-6''' du rhamnose.

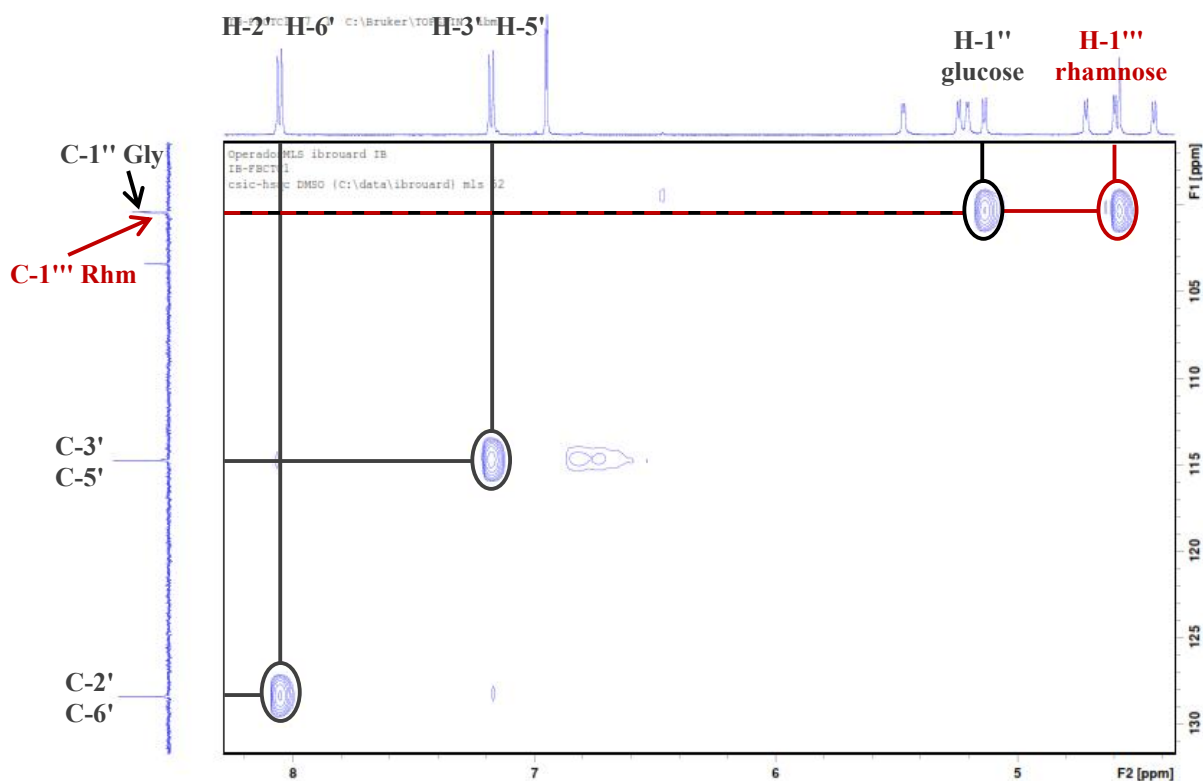


Figure IV.10.4: Spectre HSQC étalé du LR M-1 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm)

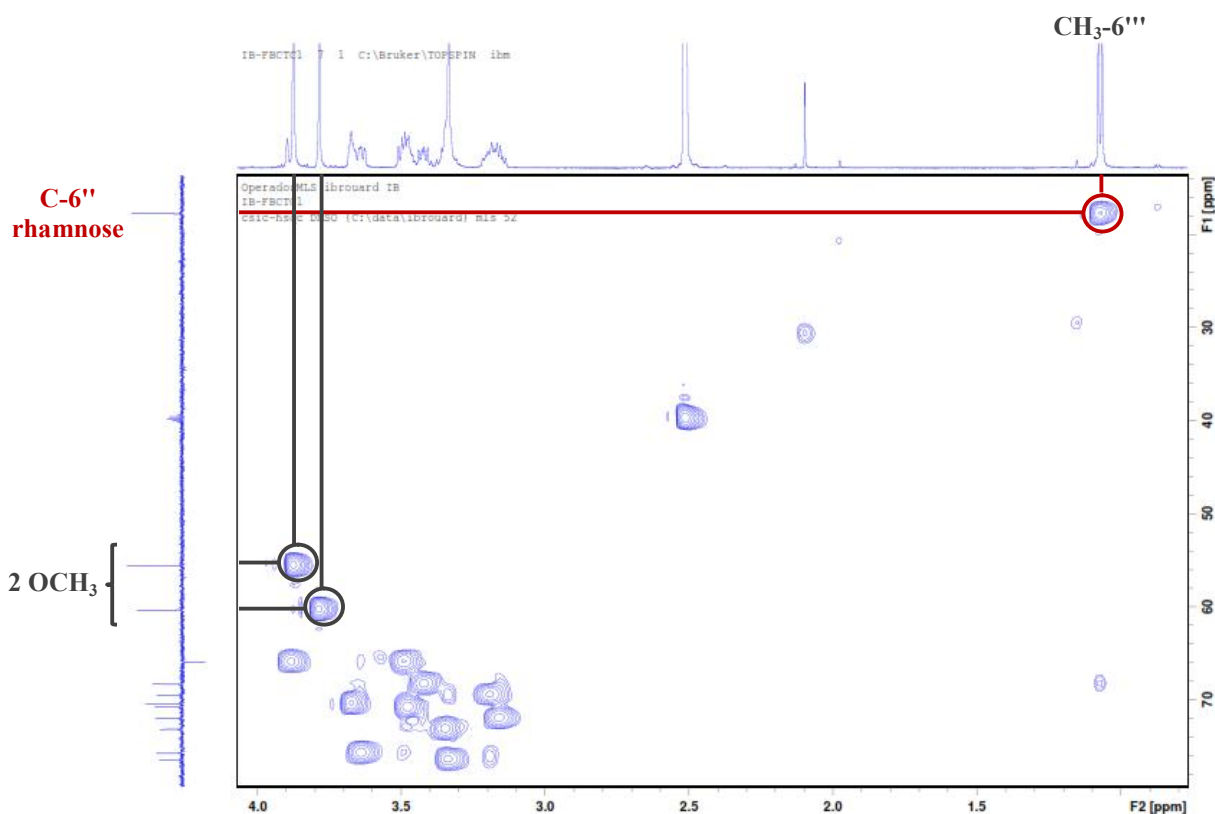


Figure IV.10.5: Spectre HSQC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'analyse du spectre ^{13}C , DEPT 90 et DEPT 135 (figure IV.10.6) permet l'attribution des signaux aux atomes de carbones correspondants :

- Le spectre de RMN ^{13}C montre la présence de 26 pics, avec un méthyle ($\delta_{\text{C}} = 17.7$ ppm), deux méthoxyles ($\delta_{\text{C}} = 60.3$ et 55.6 ppm) déjà attribués par l'expérience HSQC.
- Le spectre DEPT 90 renferme 13 pics, les carbones déjà attribués par l'expérience HSQC (C-2', C-6') et (C-3', C-5'), à $\delta_{\text{C}} = 128.4$ et 114.8 ppm ainsi que les carbones C-1'' et C-1''' du glucose ou galactose et du rhamnose à $\delta_{\text{C}} = 100.4$ et 100.4 ppm respectivement et la présence également de 10 pics des autres CH.
- Le spectre DEPT 135 montre un pic à $\delta_{\text{C}} = 65.9$ ppm attribuable à OCH_2 (C-6'' du glucose ou galactose).
- Le spectre RMN ^{13}C révèle également la présence de 9 pics de carbones quaternaires dont un carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 182.4$ ppm attribuable à C-4.

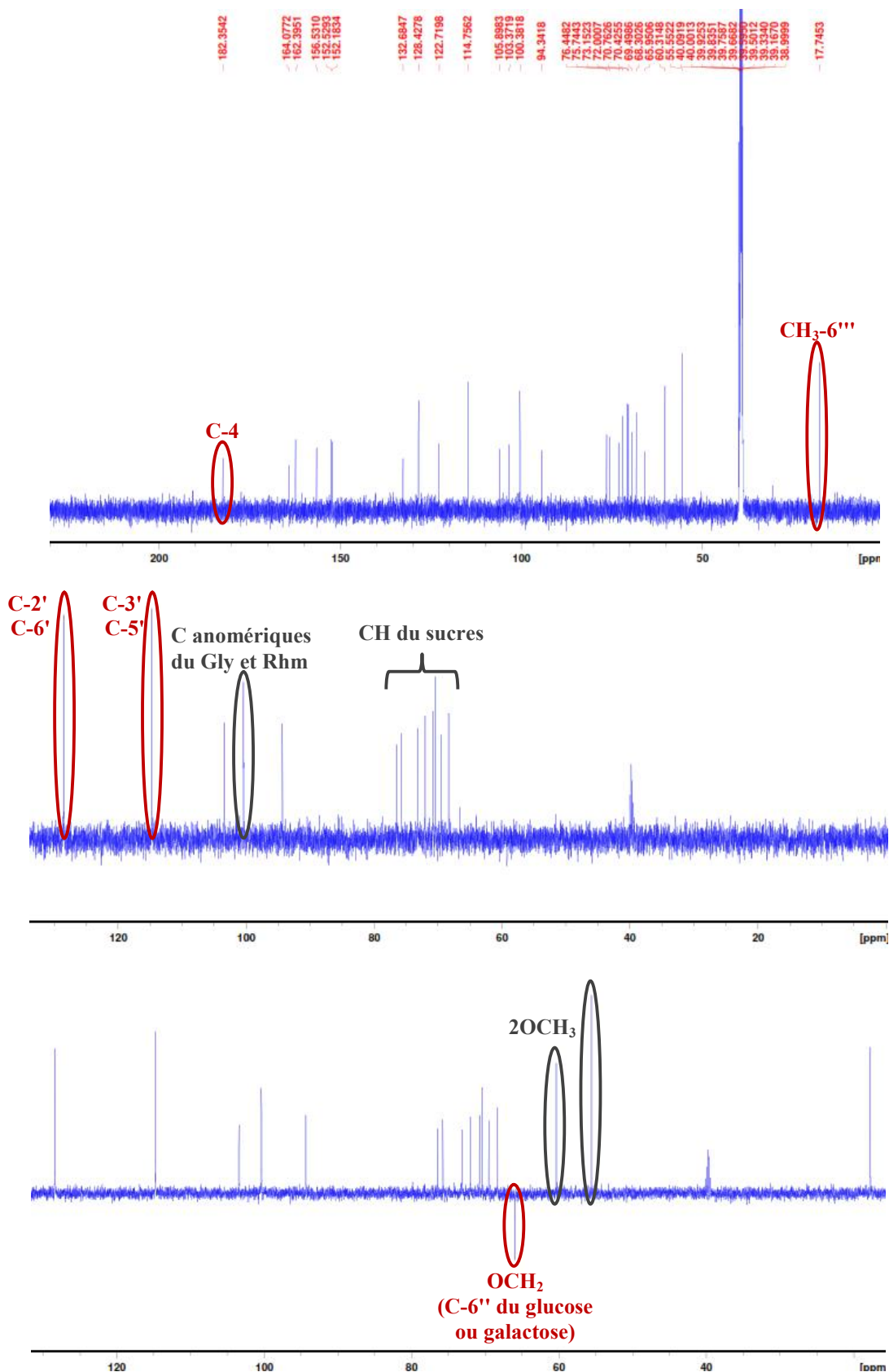


Figure IV.10.6: RMN ¹³C DEPT 90 et 135 du LR M-1 (100 MHz, DMSO-d₆, δ ppm)

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figureIV.10.7) et son étalement (figureIV.10.8) permet de tirer les indications suivantes :

- ✓ Le proton du groupement hydroxyle OH-5 montre trois tâches de corrélation :
 - ✓ La première avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 105.9$ ppm attribuable à C-10.
 - ✓ La seconde avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 132.7$ ppm qui ne peut être que le C-6. Ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3.7$ ppm ($\delta_C = 60.3$ ppm), ceci mène à localiser ce groupement méthoxyle sur le carbone C-6 et permet en même temps d'éliminer la probabilité d'existence du H-6, donc les deux singulets à $\delta_H = 6.94$ et 6.95 ppm ne peuvent être que les protons H-3 et H-8 respectivement. Cela est justifié par la tâche de corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton H-8 et C-6.
 - ✓ La troisième avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 152.5$ ppm qui ne peut être que le C-5.
 - ✓ Les protons H-2' et H-6' donnent trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec C-3' et C-5' ($\delta_C = 114.8$ ppm).
 - ✓ La seconde avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 162.4$ ppm, ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons du second groupement méthoxyle à $\delta_H = 3.87$ ppm ($\delta_C = 55.6$ ppm), donc ce carbone ne peut être que le C-4', substitué par ce méthoxyle.
 - ✓ Le troisième avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 164.1$ ppm, qui ne peut être que le C-2.
 - ✓ Les protons H-3' et H-5' donnent deux tâches de corrélation :
 - ✓ La première avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 122.7$ ppm, qui ne peut être que le C-1'.
 - ✓ La seconde avec le C-4' à $\delta_C = 162.4$ ppm.
 - ✓ Les protons H-3 et H-8 montrent sept tâches de corrélation:
 - ✓ La première entre les deux protons H-3 et H-8 avec le C-10 à $\delta_C = 105.9$ ppm.
 - ✓ La seconde entre le H-3 et le C-1' à $\delta_C = 122.7$ ppm.
 - ✓ La troisième entre le H-8 et le C-6 à $\delta_C = 132.7$ ppm.
 - ✓ La quatrième entre le H-8 et un carbone quaternaire à $\delta_C = 152.2$ ppm qui ne peut être que le C-9.
 - ✓ La cinquième entre le H-8 et un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 156.5$ ppm qui ne peut être que le C-7.
 - ✓ La sixième entre le H-3 et le C-4 à $\delta_C = 182.4$ ppm.
 - ✓ La septième entre le H-3 et le C-2 à $\delta_C = 164.1$ ppm.

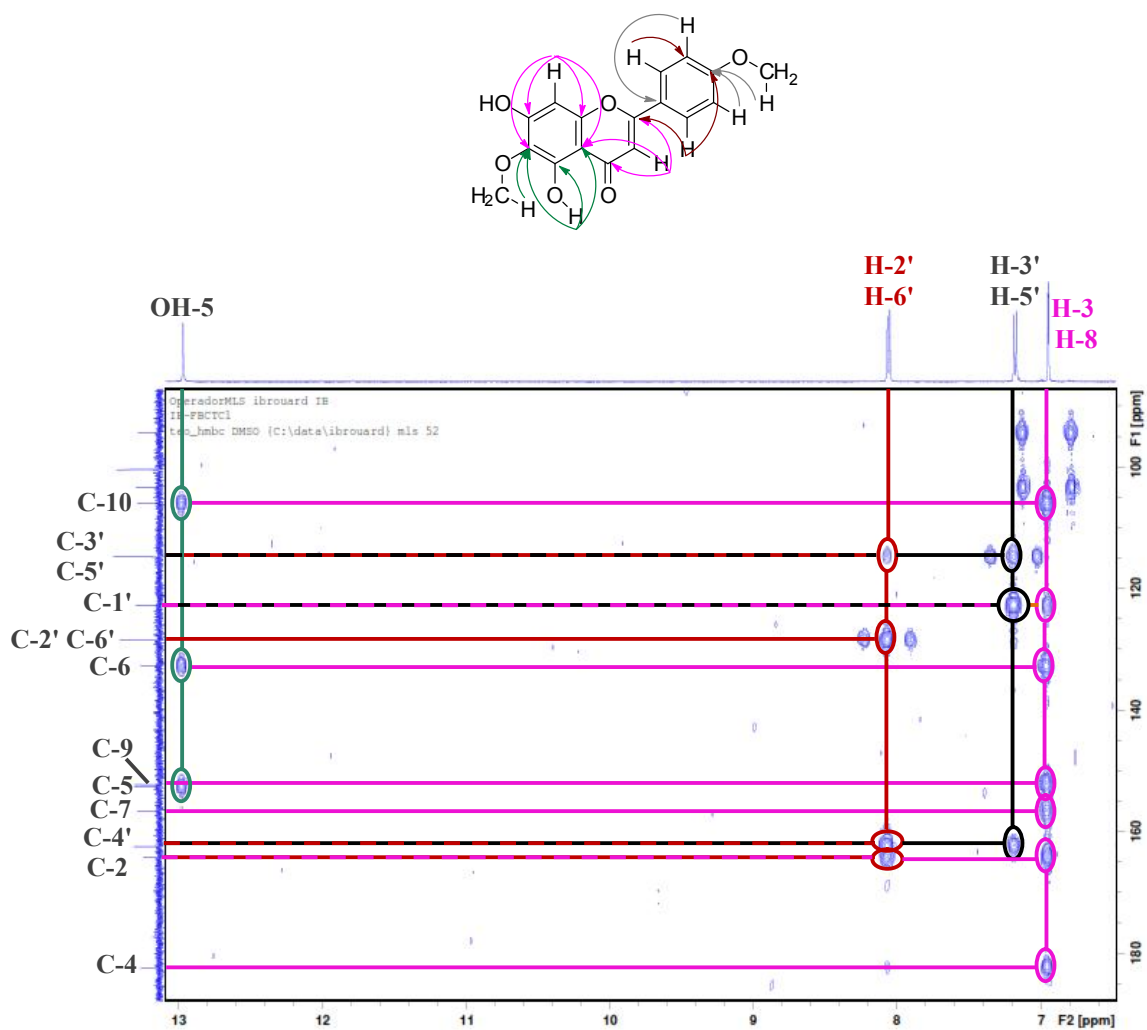


Figure IV.10.7: Spectre HMBC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

- Une corrélation entre le proton anomérique du glucose ou galactose à $\delta_H = 5.13$ ppm et le C-7 ceci mène à localiser le groupement glycosylé sur le carbone C-7.

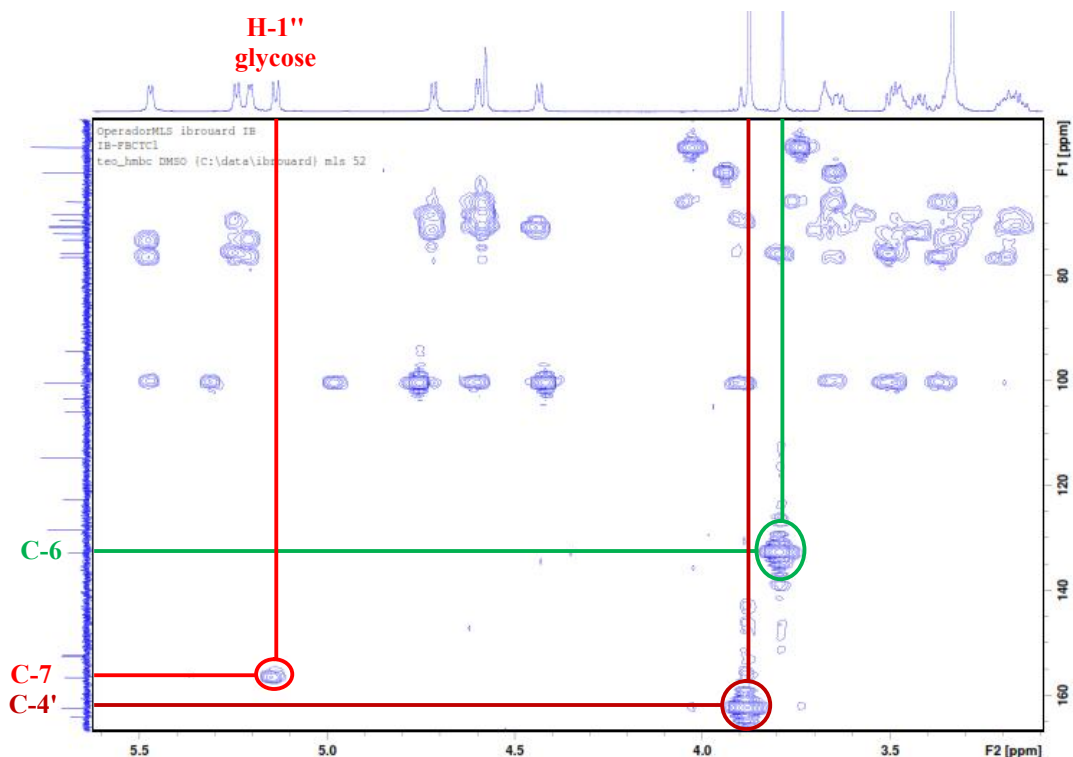
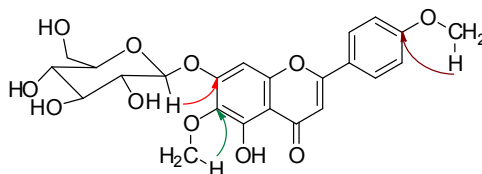


Figure IV.10.8: Spectre HMBC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)



L'étude du spectre relatif à l'expérience COSY (figure IV.10.9 et IV.10.10) permet de tirer les indications suivantes :

- Les protons du rhamnose sont attribués comme suit:
 - ✓ Une corrélation entre le signal des protons de méthyle $\text{CH}_3\text{-6}'''$ du rhamnosyle et un signal sous-forme multiplet à $\delta_{\text{H}} = 3.42$ ppm qui ne peut être que le $\text{H-5}'''$.
 - ✓ Le $\text{H-5}'''$ montre une tâche de corrélation avec le proton (m) à $\delta_{\text{H}} = 3.17$ ppm attribuable à $\text{H-4}'''$.
 - ✓ Une corrélation entre le $\text{H-4}'''$ et le proton à $\delta_{\text{H}} = 3.47$ ppm attribuable à $\text{H-3}'''$.
 - ✓ Le $\text{H-3}'''$ corréle avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 3.66$ ppm, attribuable à $\text{H-2}'''$, ce dernier donne une tâche de corrélation avec le proton anomérique du rhamnosyle $\text{H-1}'''$ ($\delta_{\text{H}} = 4.58$ ppm).
- Les protons du glucoseou galactose sont attribués comme suit :
 - ✓ Une corrélation entre le $\text{H-1}''$ et un signal à $\delta_{\text{H}} = 3.35$ ppm attribuable à $\text{H-2}''$. ce dernier corréle avec un signal à $\delta_{\text{H}} = 3.63$ ppm qui ne peut être que le $\text{H-3}''$.

✓ Le H-3'' montre une corrélation avec le signal à $\delta_H = 3.19$ ppm attribuable à H-4''.

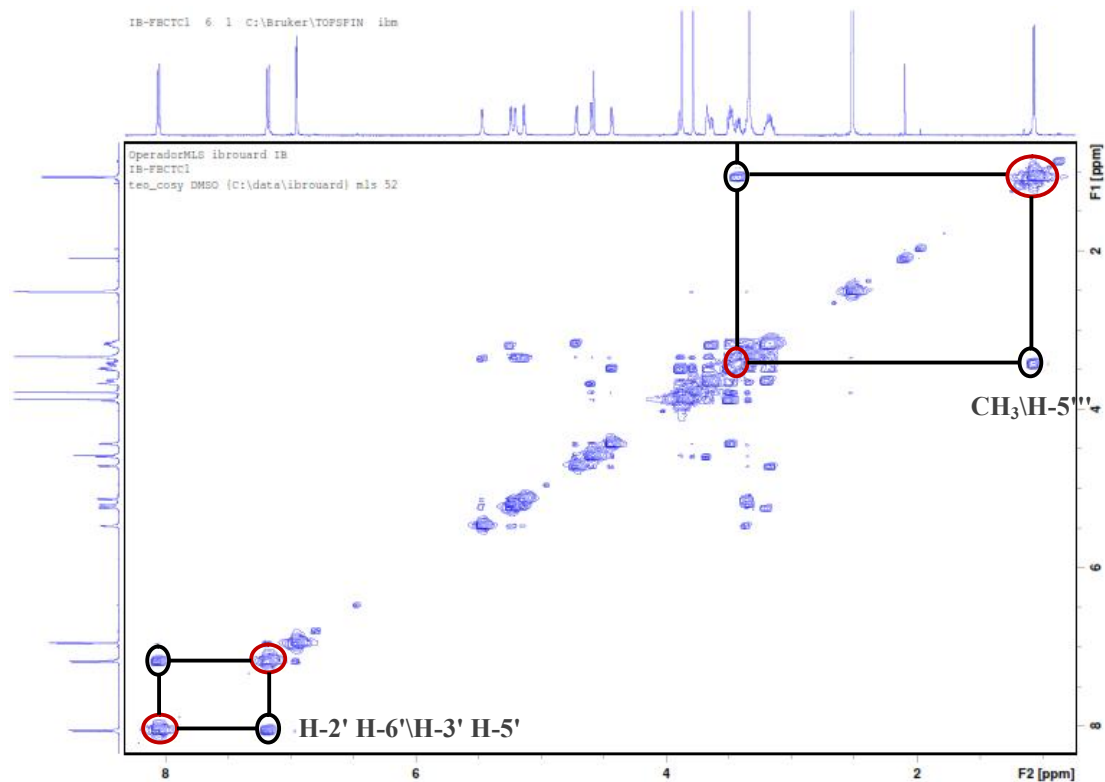


Figure IV.10.9: Spectre COSY du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

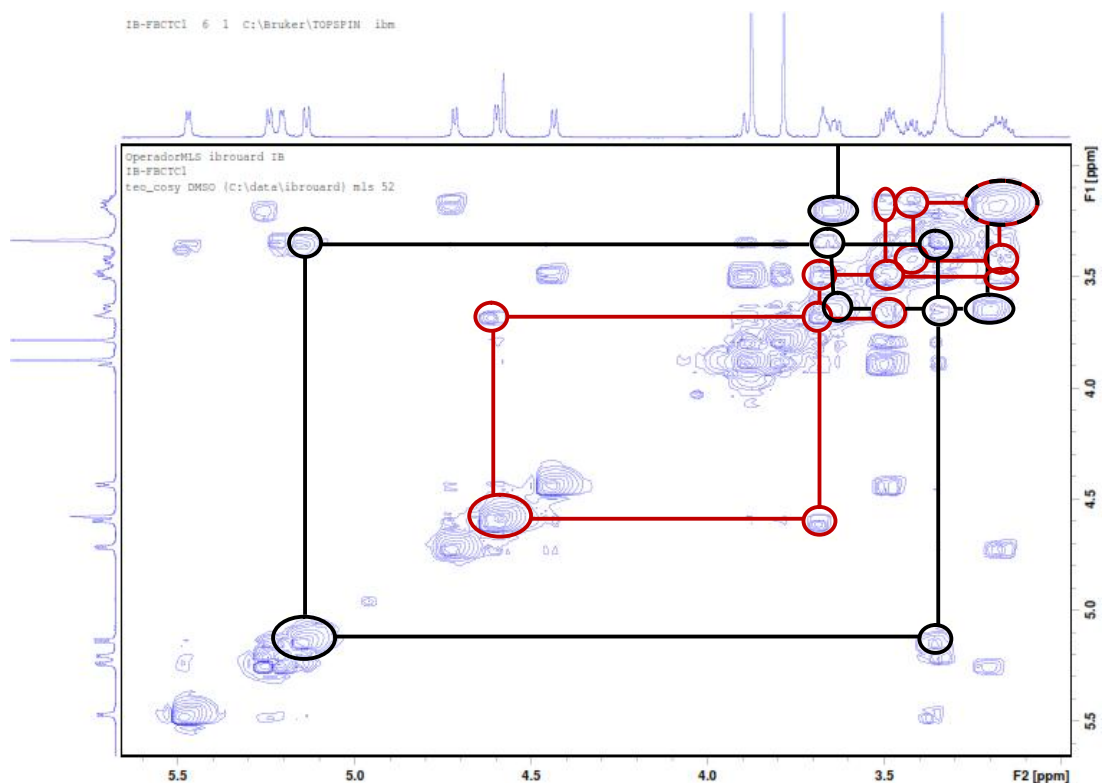


Figure IV.10.10: Spectre COSY étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.10.11) permet de tirer les indications suivantes :

Les carbones du rhamnosyle sont attribués comme suit:

- ✓ Le proton H-5''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 68.3$ ppm à le C-5'''.
- ✓ Le proton H-4''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 72$ ppm à le C-4'''.
- ✓ Le proton H-3''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 70.8$ ppm à le C-3'''.
- ✓ Le proton H-2''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 70.4$ ppm à le C-2'''.

Les carbones du glucose ou galactose sont attribués comme suit :

- ✓ Les deux protons de OCH₂ donnent le carbone C-6'' à $\delta_C = 65.9$ ppm.
- ✓ Le proton H-2'' permet l'attribution C-2'' à $\delta_C = 73.1$ ppm.
- ✓ Le proton H-3'' permet l'attribution C-3'' à $\delta_C = 75.7$ ppm.
- ✓ Le proton H-4'' permet l'attribution C-4'' à $\delta_C = 69.5$ ppm.
- ✓ Le proton H-5'' permet l'attribution C-5'' à $\delta_C = 76.4$ ppm.

Une étude comparative des données du groupement glucosyle ou galactosyle avec ceux de la littérature [5], montre que notre sucre est un glucose. La nature des deux sucres glucose et rhamnose a été confirmée par l'hydrolyse acide de ce composé et la co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons authentiques.

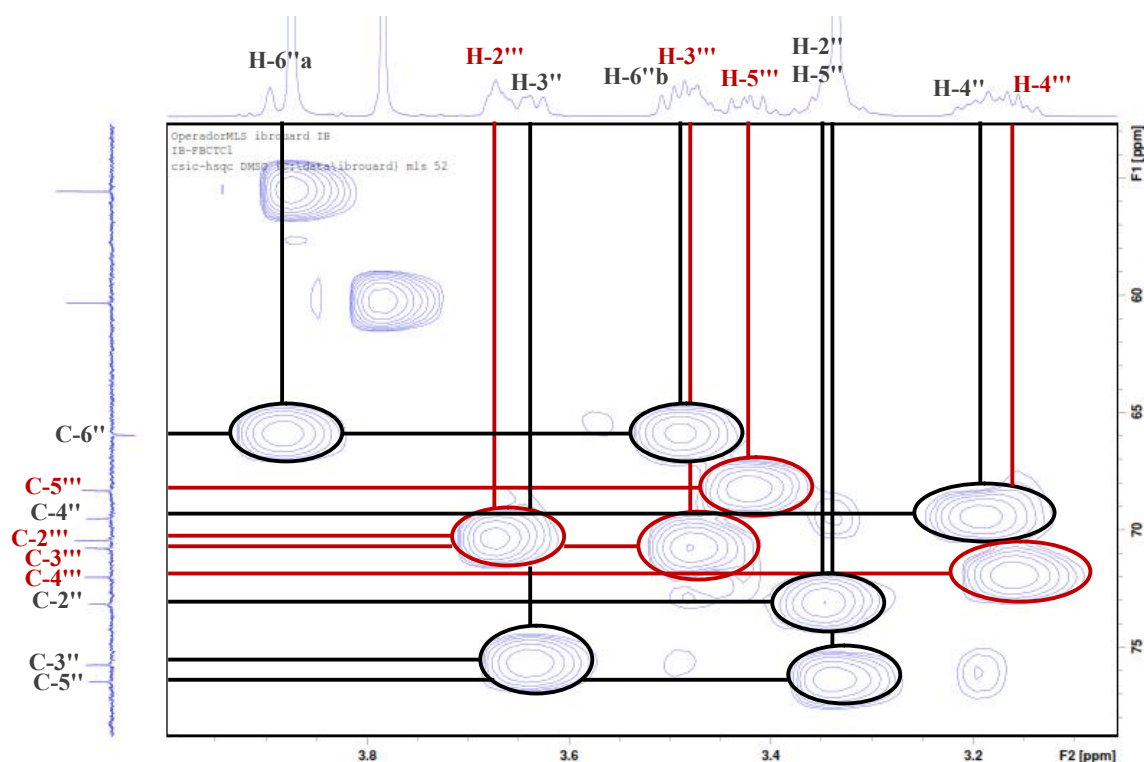


Figure IV.10.11: RMN HSQC étalement du LR M-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.10.12) montre que le proton anomérique du rhamnose donne quatre tâches de corrélations, la première avec le carbone C-6'' à $\delta_C = 65.9$ ppm, ceci mène à localiser le rhamnose en position C-6'' du

glucosyle et les trois autres tâches avec les carbones C-2''', C-3''' et C-1''' à $\delta_C = 68.3, 70.8$ et 100.4 ppm respectivement.

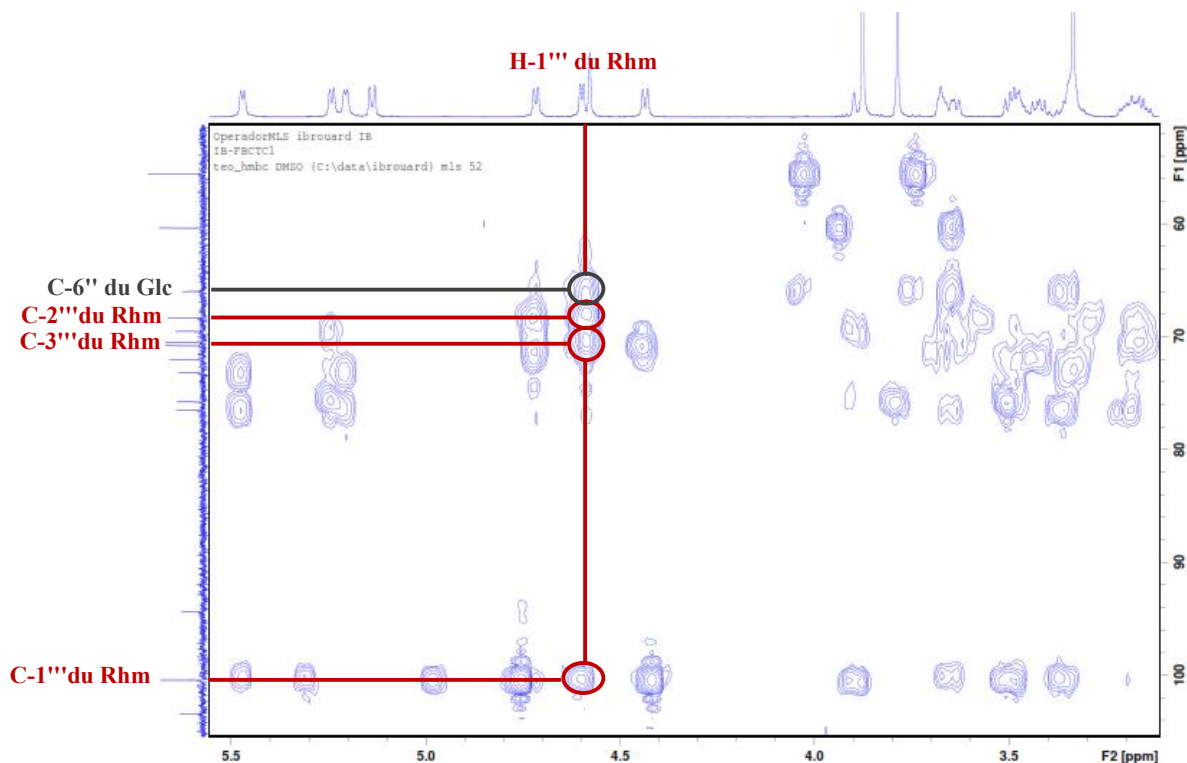


Figure IV.10.12: Spectre HMBC étalé du LR M-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'ensemble des données spectroscopique RMN 1 & 2D sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau IV.11: Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C du LR M-1 (400 MHz; DMSO- d_6)

position	δ_C	δ_H	position	δ_C	δ_H
2	164.1	-	1''	100.4	5.13
3	103.4	6.94	2''	73.1	3.35
4	182.4	-	3''	75.7	3.63
5	152.5	-	4''	69.5	3.19
6	132.7	-	5''	76.4	3.36
7	156.5	-	6''	65.9	3.49, 3.88
8	94.3	6.94	1'''	100.4	4.58
9	152.2	-	2'''	70.4	3.66
10	105.9	-	3'''	70.8	3.47
1'	122.7	-	4'''	72	3.17
2'	128.4	8.05	5'''	68.3	3.42
3'	114.8	7.18	6'''	17.7	1.07
4'	162.4	-	4'-OMe	55.6	3.87
5'	114.8	7.18	6'-OMe	60.3	3.70
6'	128.4	8.05			

Le spectre de masse HR-ESI montre un pic moléculaire de masse exacte $m/z=645.1795$ correspondant à la formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $m/z=1267.3663$ correspondant à $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ qui définit la masse à 622Da.

Elemental Composition Report

Page 1

Multiple Mass Analysis: 4 mass(es) processed

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -20.0, max = 1000.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

780 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 O: 0-20 Na: 0-1

H-2394-1.msk (FBCTC1) 42 (1.831)

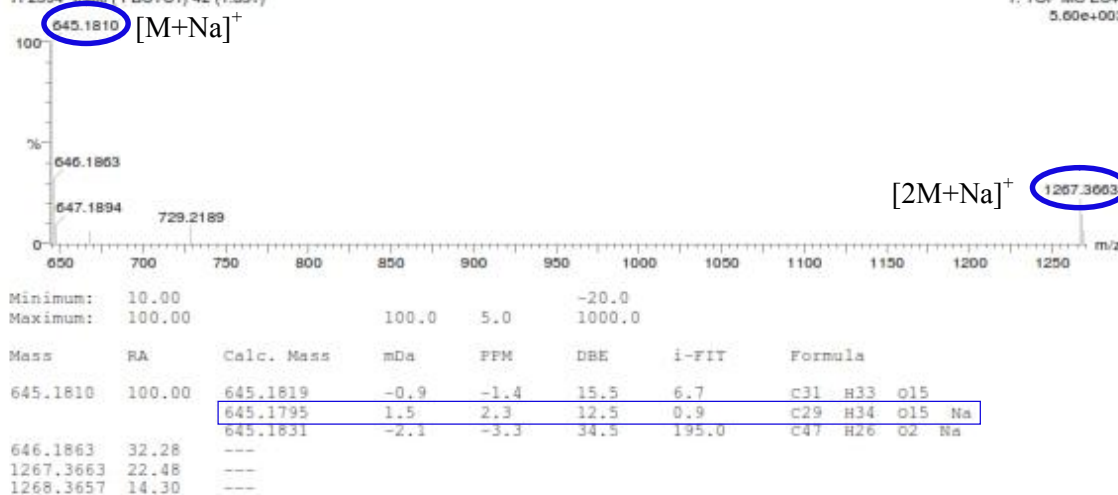
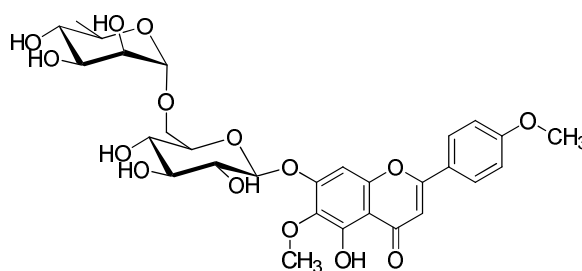
1: TOF MS ES+
5.60e+003

Figure IV.10.13: spectre de masse HR-ESI du LR M-1

L'ensemble de ces données spectroscopique du RMN et masse, mène à la structure 6,4'-diméthoxy-5,7-dihydroxyflavone-7-O- β -rutinoside flavone, ce composé est connu sous le nom pectolarine[12] et bien connu pour l'espèce et le genre *Linaria*.



Pectolarine

2.2. Éluclation structurale du composé LR C1-1-1

L'examen du spectre RMN ^1H (figureIV.11.1) du produit LR C1-1-1 enregistré dans CDCl_3 , montre la présence des signaux des protons caractéristiques d'un squelette d'un méthyle ester d'acide gras avec une chaîne latérale que l'on peut identifier par :

- ✓ Un multiplet à d'intégration 4H à $\delta_{\text{H}} = 5.35$ ppm attribuable aux CH vinyliques CH-9, CH-10, CH-12 et CH-13.

- ✓ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3.65$ ppm, que l'on peut attribuer à un groupement méthoxyle.
- ✓ Un multiplet à $\delta_H = 2.80$ ppm avec intégration 2H attribuable à CH₂-11.
- ✓ Un triplet d'intégration 2H à $\delta_H = 2.29$ ppm attribué à CH₂-2.
- ✓ Un multiplet d'intégration 4H à $\delta_H = 2.05$ ppm attribuables aux protons CH₂-8 et CH₂-14.
- ✓ Un multiplet d'intégration 2H à $\delta_H = 1.61$ ppm, attribué à CH₂-3.
- ✓ Un singulet large d'intégration 14H à $\delta_H = 1.24$ ppm attribuable aux CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-15, CH₂-16 et CH₂-17.
- ✓ Un triplet d'intégration 3H à $\delta_H = 0.9$ ppm attribué à CH₃-18.

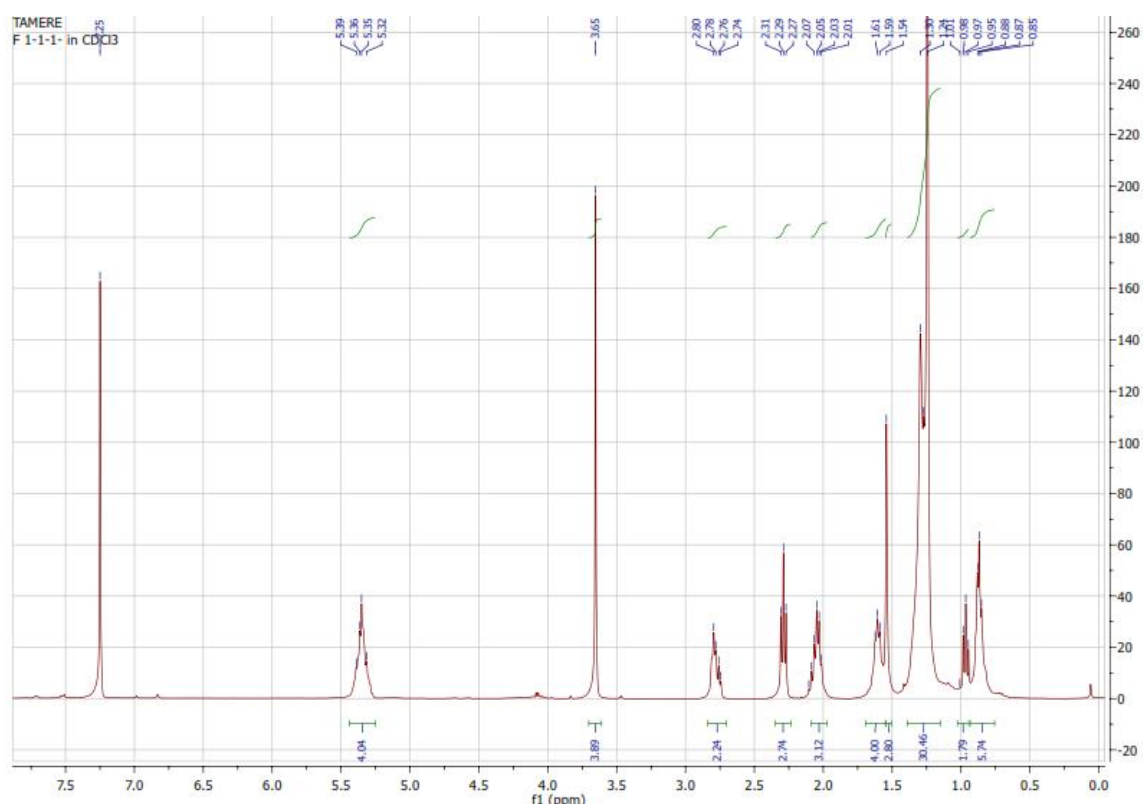


Figure IV.11.1: spectre RMN ¹H du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

L'expérience HSQC (figure IV.11.2) permet l'attribution des carbones par corrélation avec leurs protons comme suit:

- ✓ Les protons H-9, H-10, H-12 et H-13 montrent une tâche de corrélation avec leurs carbones C-9, C-10, C-12 et C-13 à $\delta_C = 128$ ppm.
- ✓ Les protons du groupement méthoxyle montre une tâche de corrélation avec son carbone à $\delta_C = 51.3$ ppm.
- ✓ Les protons de CH₂-2 corrèle avec le C-2 à $\delta_C = 37.7$ ppm.

- ✓ Les protons CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-15 et CH₂-16 corrélient avec leurs carbones (C-4, C-5, C-6, C-7, C-15 et C-16) à $\delta_C = 29.2$ ppm.
- ✓ Les protons CH₂-8 et CH₂-14 corrélient avec ses carbones à $\delta_C = 26.6$ ppm.
- ✓ Les protons CH₂-11, CH₂-3, CH₂-17 et CH₃-18 corrélient avec ses carbones C-11, C-3, C-17 et C-18 à $\delta_C = 25.3, 24.9, 23.1$ et 12.9 ppm respectivement.

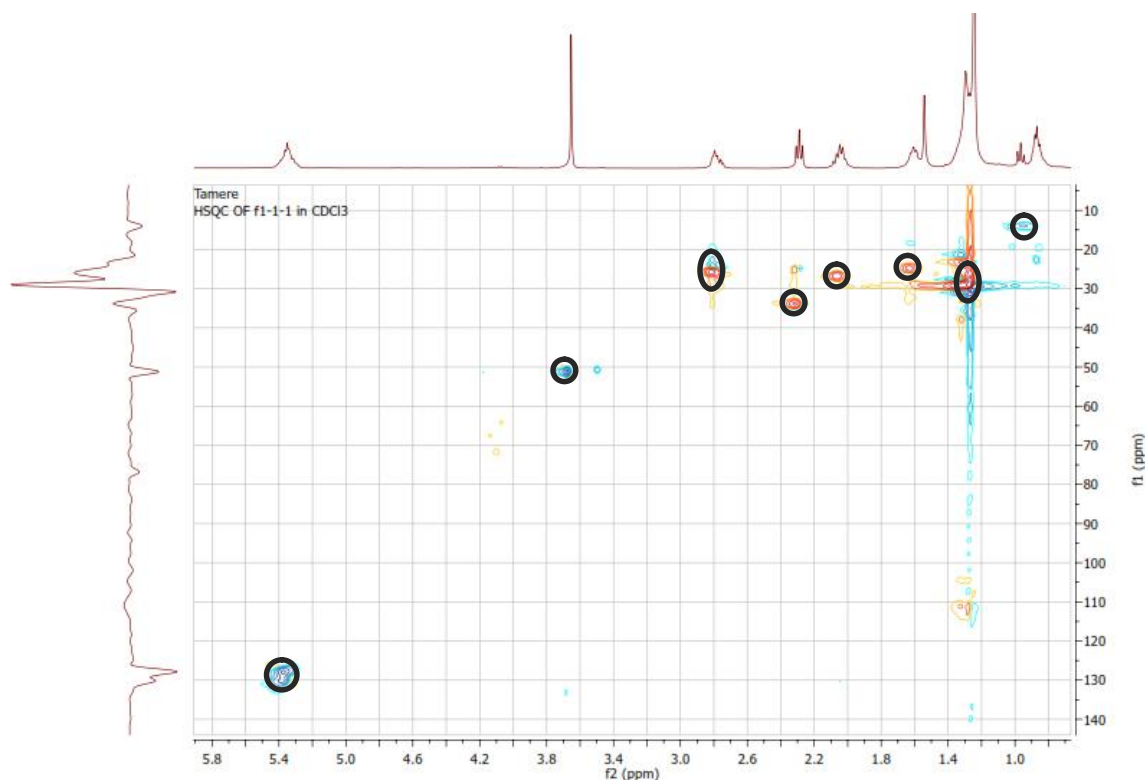


Figure IV.11.2: spectre RMN HSQC du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.11.3) permet de tirer les corrélations suivantes :

- ✓ Les protons CH-9, CH-10, CH-12 et CH-13 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-11 à $\delta_C = 25.3$ ppm.
 - ✓ La seconde est entre ces protons et ses carbones à $\delta_C = 128$ ppm.
- ✓ Les protons du groupement méthoxyle corrélient avec un signal d'un carbone quaternaire à $\delta_C = 174.43$ ppm, qui ne peut être que la fonction carbonyle C-1.
- ✓ Les protons CH₂-11 corrélient avec le carbone à $\delta_C = 128$ ppm (C-9, C-10, C-12 et C-13).
- ✓ Le proton CH₂-2 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ Avec le C-3 à $\delta_C = 24.9$ ppm.
 - ✓ Avec le C-4 à $\delta_C = 29.2$ ppm.

- ✓ Avec le C-1 à $\delta_C = 174.4$ ppm.
 - ✓ Les protons CH₂-8 et CH₂-14 montrent deux tâches de corrélation:
- ✓ La première avec les carbones C-6, C-7, C-15 et C-16 à $\delta_C = 29.2$ ppm.
- ✓ La seconde avec les carbones C-9, C-10, C-12 et C-13 à $\delta_C = 128$ ppm.
 - ✓ Les protons de CH₂-3 corréle avec les carbones C-4 et C-5 à $\delta_C = 29.2$ ppm et avec le C-1 à $\delta_C = 174.4$ ppm.
 - ✓ Les protons CH₂-4, CH₂-5 corrélent avec le C-2 à $\delta_C = 33.7$ ppm.
 - ✓ Les protons CH₃-18 montrent 2 tâches de corrélation, la première avec le C-17 à $\delta_C = 23.1$ ppm et la seconde avec le C-16 à $\delta_C = 29.2$ ppm.

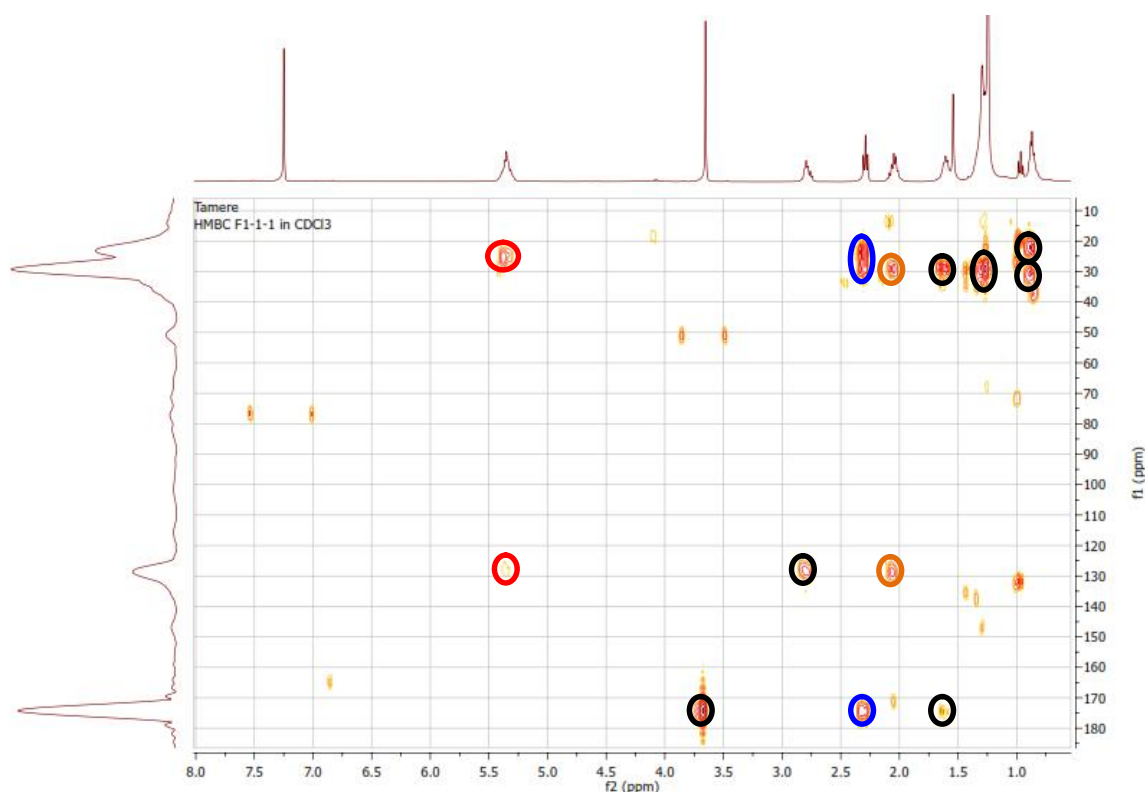
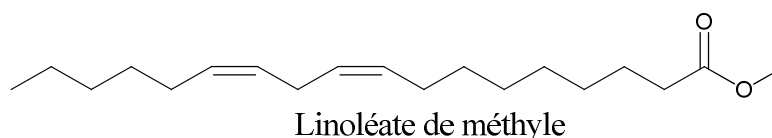


Figure IV.11.3: spectre RMN HSQC du LR C1-1-1 (400 MHz, CDCl₃, δ ppm)

Les données spectroscopiques du RMN 1 et 2D et la comparaison avec la littérature [13] orientent la structure de ce composé vers le produit linoléate de méthyle.



2.3. Élucliation structurale du composé LR C4-3-1

Les spectres ESI/MS (figure IV.12.1) du composé LR C4-3-1 enregistrés en mode positif (+) et négatif (-) montrent la présence de trois pics, les deux premiers (ESI/MS +) à $m/z = 381.2$ correspondant à $[M+Na]^+$ et $m/z = 403.1$ attribuable à $[M+COOH]^+$, le dernier (ESI/MS -) à $m/z = 357.4$ attribuable à $[M-H]^-$ ce qui prouve que notre composé a une masse de 358 Da. Cette dernière est correspondante à la formule brute $C_{20}H_{22}O_6$.

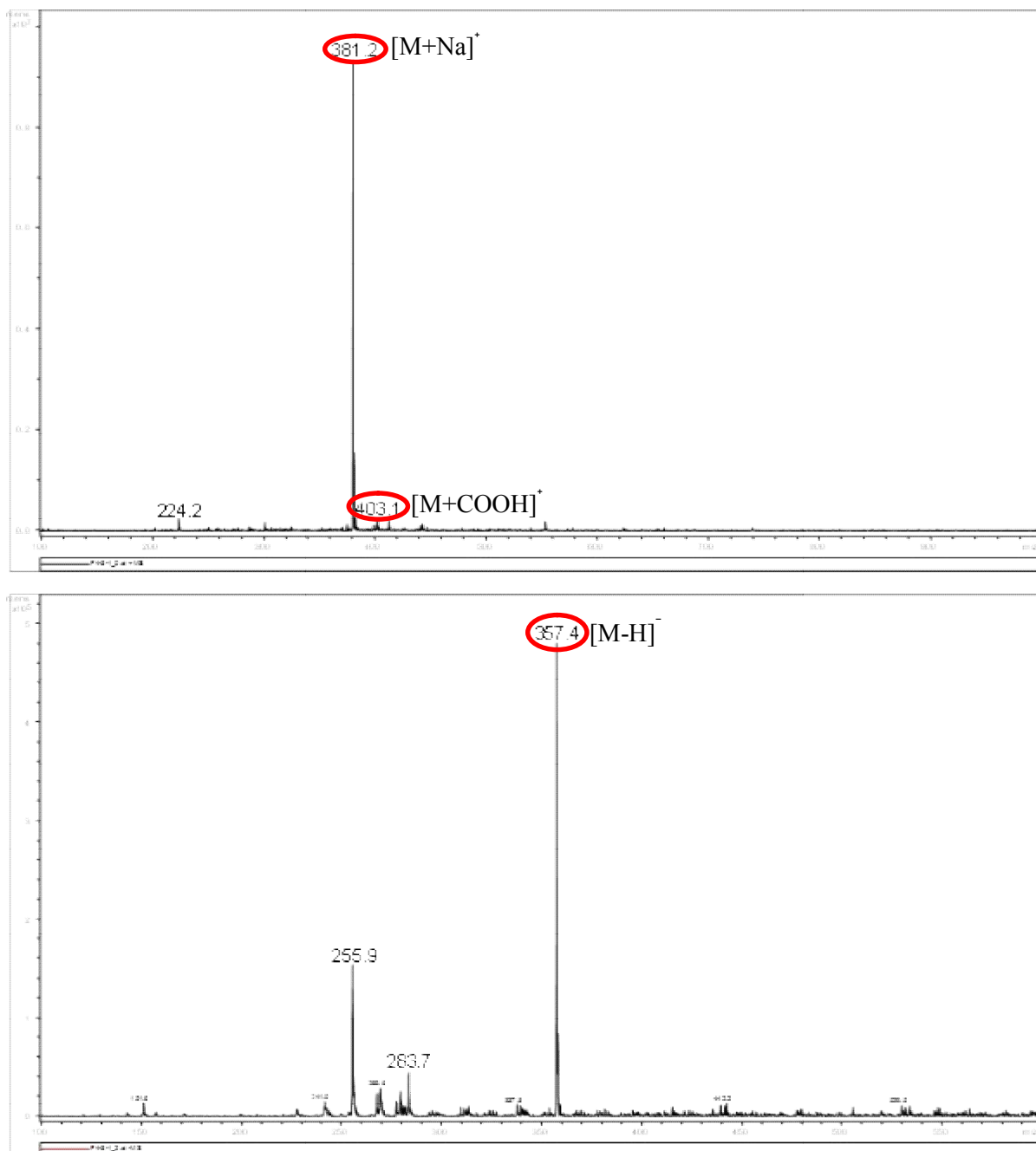


Figure IV.12.1 : Spectre de masse ESI/MS (+/-) du LR C4-3-1

L'examen du spectre RMN 1H (figure IV.12.2) enregistré dans $CDCl_3$, montre la présence de huit signaux des protons, et à cause de la formule brute ($C_{20}H_{22}O_6$) on peut dire

qu'on a une symétrie dans la structure de notre composé. Ces signaux sont caractéristiques à un squelette aromatique d'un lignane, que l'on peut identifier par :

- ✓ Un doublet ($J = 1.9$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_H = 6.88$ ppm attribuable à deux protons aromatique identiques H-2 et H-2'.
- ✓ Un doublet d'intégration 2H à $\delta_H = 6.87$ ppm, attribuable à deux protons aromatique H-5 et H-5', magnétiquement équivalent.
- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 8.2, 1.8$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_H = 6.81$ ppm attribuable à deux protons aromatique semblable H-6 et H-6'.
- ✓ Un signal large d'intégration 2H à $\delta_H = 5.58$ ppm attribuable à deux hydroxyles (aucune corrélation avec aucun atome de carbone dans le spectre HSQC).
- ✓ Un doublet ($J = 4.2$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_H = 4.73$ ppm attribuable à H-7 et H-7'.
- ✓ Un signal sous-forme de doublet dédoublé ($J = 9.0, 6.8$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_H = 4.24$ ppm attribuable à H-9a et H-9'a.
- ✓ Un singulet d'intégration 6H à $\delta_H = 3.89$ ppm attribuable aux deux méthoxyes.
- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 9.0, 3.5$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_H = 3.87$ ppm attribuable à H-9b et H-9'b.
- ✓ Un multiplet d'intégration 2H à $\delta_H = 3.08$ ppm attribuable à H-8 et H-8'.

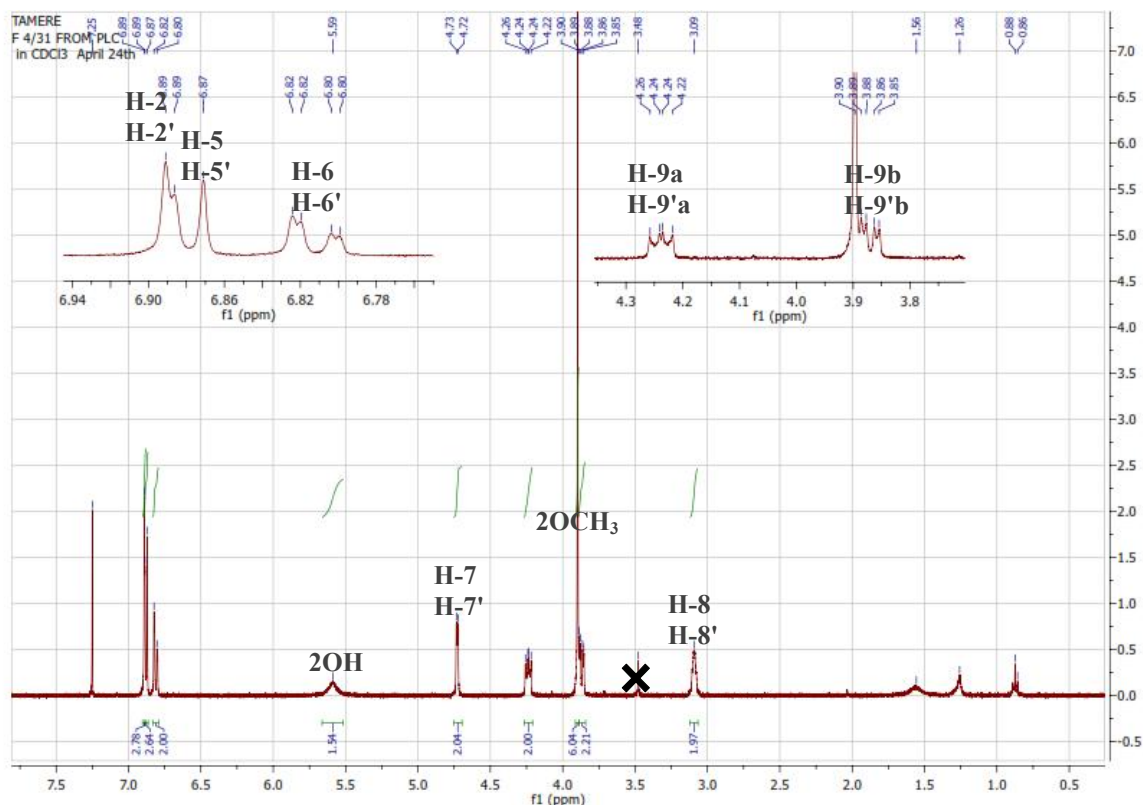


Figure IV.12.2: spectre RMN ^1H du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'expérience HSQC (figure IV.12.3) permet l'attribution des carbones par corrélation avec leurs protons comme suit:

- ✓ Les deux protons H-2 et H-2' montrent une tâche de corrélation avec le signal à $\delta_C = 108.4$ ppm attribuable aux deux carbones C-2 et C-2'.
- ✓ Une tâche de corrélation entre les protons H-5, H-5' et le carbone à $\delta_C = 114.1$ ppm attribuable aux carbones C-5 et C-5'.
- ✓ Les deux protons H-6 et H-6' montrent une tâche de corrélation avec le signal à $\delta_C = 118.8$ ppm attribuable aux deux carbones C-6 et C-6'.
- ✓ Les deux protons H-7 et H-7' permettent l'attribution du C-7 et C-7' à $\delta_C = 85.6$ ppm.
- ✓ La tâche de corrélation entre les protons H-9a, H-9a', H-9b, H-9b' et le signal du carbone à $\delta_C = 71.4$ ppm permet l'attribution de ce dernier aux carbones C-9 et C-9'.
- ✓ Une tâche de corrélation entre les protons des deux groupements méthoxyles et les carbones qui les portent à $\delta_C = 55.8$ ppm.
- ✓ Les deux protons H-8 et H-8' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 54$ ppm aux carbones C-8 et C-8'.

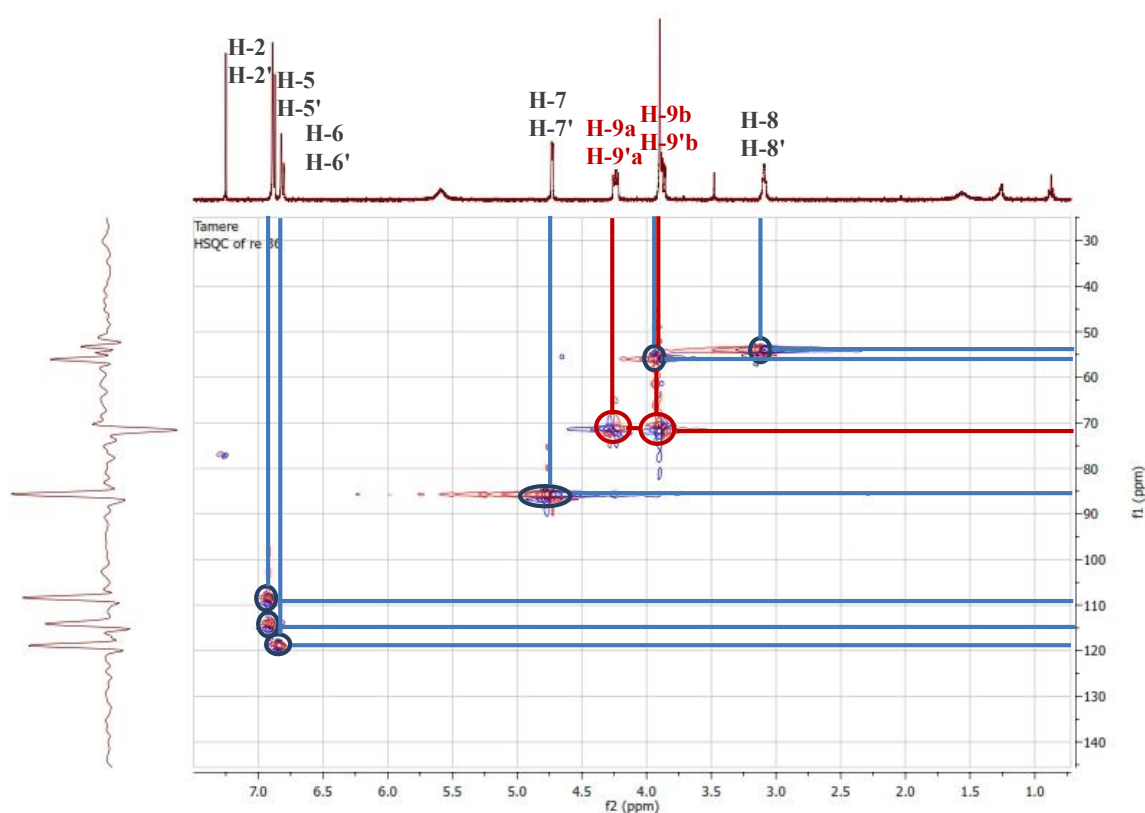
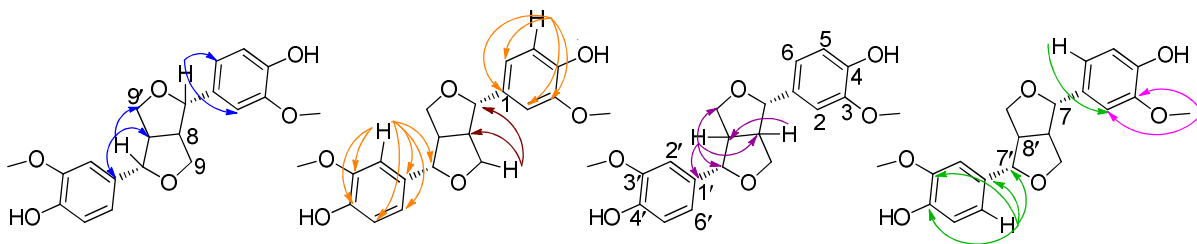


Figure IV.12.3: Spectre HSQC du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.12.4) permet de tirer les corrélations suivantes :

- ✓ Les deux protons H-7 et H-7' montrent cinq tâches de corrélation:
 - ✓ Les quatre premières tâches sont avec les signaux déjà attribués aux carbones à $\delta_C = 53.9$ (C-8, C-8'), 71.4 (C-9, C-9'), 108.4 (C-2, C-2') et 118.8 ppm (C-6, C-6').
 - ✓ La dernière est avec le signal d'un carbone quaternaire à $\delta_C = 132.8$ ppm, ce dernier corréle avec les protons aromatique H-2, H-2', H-5, H-5', H-6 et H-6', donc ce signal est attribuable aux deux carbones C-1 et C-1'.
- ✓ Les deux protons H-9 et H-9' montrent deux tâches de corrélation avec les carbones C-8, C-8' ($\delta_C = 54$ ppm) et C-7, C-7' ($\delta_C = 85.6$ ppm).
- ✓ Les deux protons H-8 et H-8' montrent quatre tâches de corrélation avec les carbones C-8, C-8' ($\delta_C = 53.9$ ppm), C-9, C-9' ($\delta_C = 71.4$ ppm), C-7, C-7' ($\delta_C = 85.6$ ppm) et C-1, C-1' ($\delta_C = 132.8$ ppm).
 - ✓ Les protons H-6 et H-6' montrent cinq tâches de corrélations:
 - ✓ La première avec les carbones C-7 et C-7' à $\delta_C = 85.6$ ppm.
 - ✓ La seconde avec les carbones C-2 et C-2' à $\delta_C = 108.4$ ppm.
 - ✓ La troisième avec les carbones C-1 et C-1' à $\delta_C = 132.8$ ppm.
 - ✓ La quatrième avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 145.1$ ppm attribuable à C-4 et C-4'.
 - ✓ La cinquième avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 146.5$ ppm attribuable à C-3 et C-3'.
 - ✓ Les protons H-5, H-5', H-2 et H-2' montrent sept tâches de corrélations:
 - ✓ La première est entre H-2, H-2' et C-7, C-7' ($\delta_C = 85.6$ ppm).
 - ✓ La seconde est entre H-5, H-5' et C-2, C-2' ($\delta_C = 108.4$ ppm).
 - ✓ La troisième est entre H-2, H-2' et C-5, C-5' ($\delta_C = 114.1$ ppm).
 - ✓ La quatrième est entre les protons H-2, H-2', H-5 et H-5' avec C-6, C-6' ($\delta_C = 118.8$ ppm).
 - ✓ La cinquième est entre les protons H-2, H-2', H-5 et H-5' avec C-1, C-1' ($\delta_C = 132.8$ ppm).
 - ✓ La sixième est entre les protons H-2, H-2', H-5 et H-5' avec C-4, C-4' ($\delta_C = 145$ ppm).
 - ✓ La septième est entre les protons H-2, H-2', H-5 et H-5' avec C-3, C-3' ($\delta_C = 146.6$ ppm).
 - ✓ Les protons des deux groupements méthoxyles montrent une tâche de corrélation avec les carbones qui les portent (C-3, C-3') à $\delta_C = 146.6$ ppm.



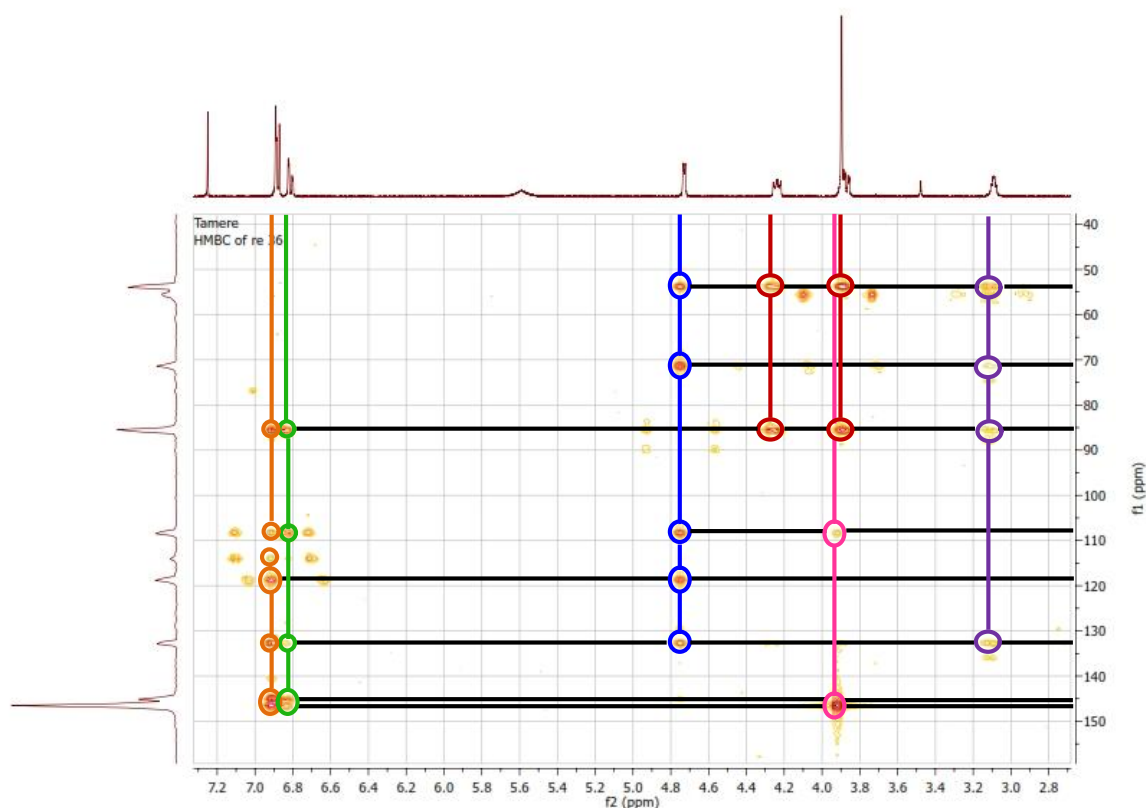
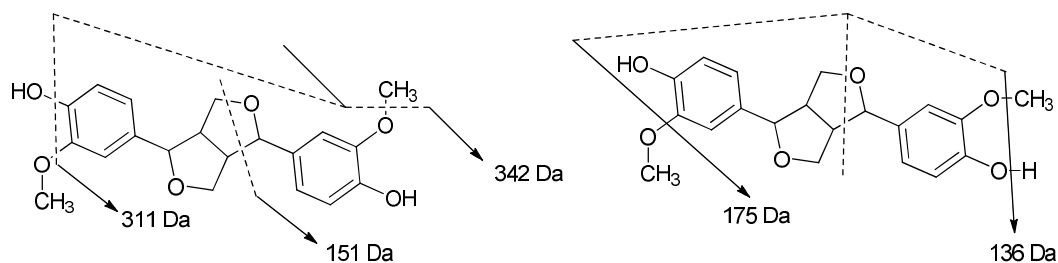


Figure IV.12.4: Spectre HMBC du LR C4-3-1 (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm)

L'étude du spectre ESI/MSMS(-) montre quelques pics attribuables à des fragments que l'on peut utiliser pour confirmer la structure et la symétrie de ce composé. On propose deux façons de fragmentation pour ce composé:



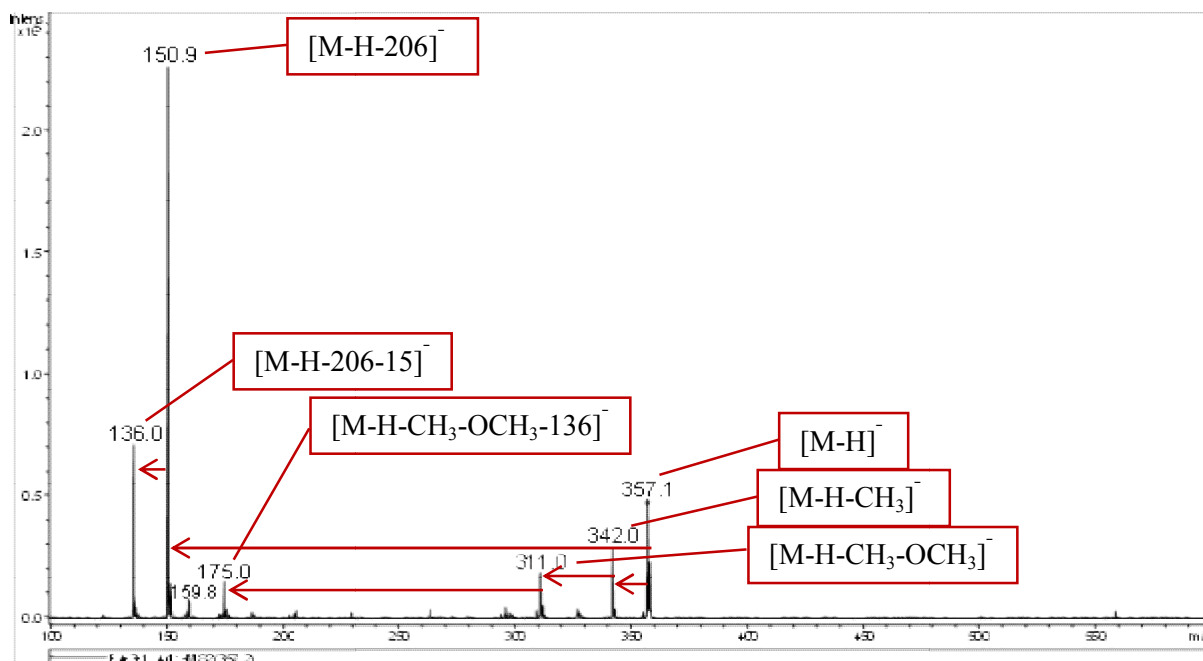


Figure IV.12.5: Spectre de masse ESI/MSMS (-) du LR C4-3-1

Toutes ces données spectroscopiques confirment la structure de notre composé qui est le pinoresinol [14], la recherche bibliographique indique que ce composé a été isolé pour la première fois de la famille Scrophulariaceae.

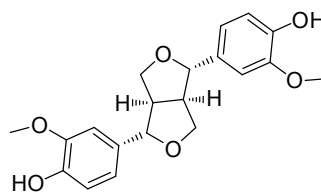


Tableau IV.12: les données spectroscopiques du RMN ^1H et ^{13}C du pinoresinol

position	$\delta_{\text{H}}(J, \text{Hz})$	δ_{C}	Position	$\delta_{\text{H}}(J, \text{Hz})$	δ_{C}
1, 1'	-	132.8	7, 7'	4.73 2H (<i>d</i> , 4.0)	85.6
2, 2'	6.88 2H (<i>d</i> , 2.0)	108.4	8, 8'	3.08 2H (<i>m</i>)	53.9
3, 3'	-	146.6	9, 9'	a 4.24 2H (<i>dd</i> , 8.8, 6.4)	71.4
4, 4'	5.58 (OH) 2H (<i>s</i>)	145		b 3.87 2H (<i>dd</i> , 8.8, 3.2)	
5, 5'	6.87 2H (<i>d</i> , 8.0)	114.1	OMe	3.89 6H (<i>s</i>)	55.8
6, 6'	6.81 2H (<i>dd</i> , 8.0, 2.0)	118.8			

2.4. Éluclidation structurale du composé LR C8-4-2

La fluorescence noir-violette sous la lumière de Wood indique que ce composé est de type flavone ou flavonol 3-OR.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.13.1) enregistré dans le MeOH- d_4 a montré la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- ✓ Une para substitution du noyau B (OR-4') déduit de l'existence à $\delta_H = 7.94$ ppm, d'un doublet ($J = 9$ Hz) d'intégration 2H, attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration (2H) à $\delta_H = 7.08$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 6.64$ et 6.58 ppm attribuables aux protons H-3 et H-8 ou H-6 respectivement.
- ✓ Un singulet à $\delta_H = 3.89$ ppm d'intégration 6H attribuable à 2 groupements méthoxyles.

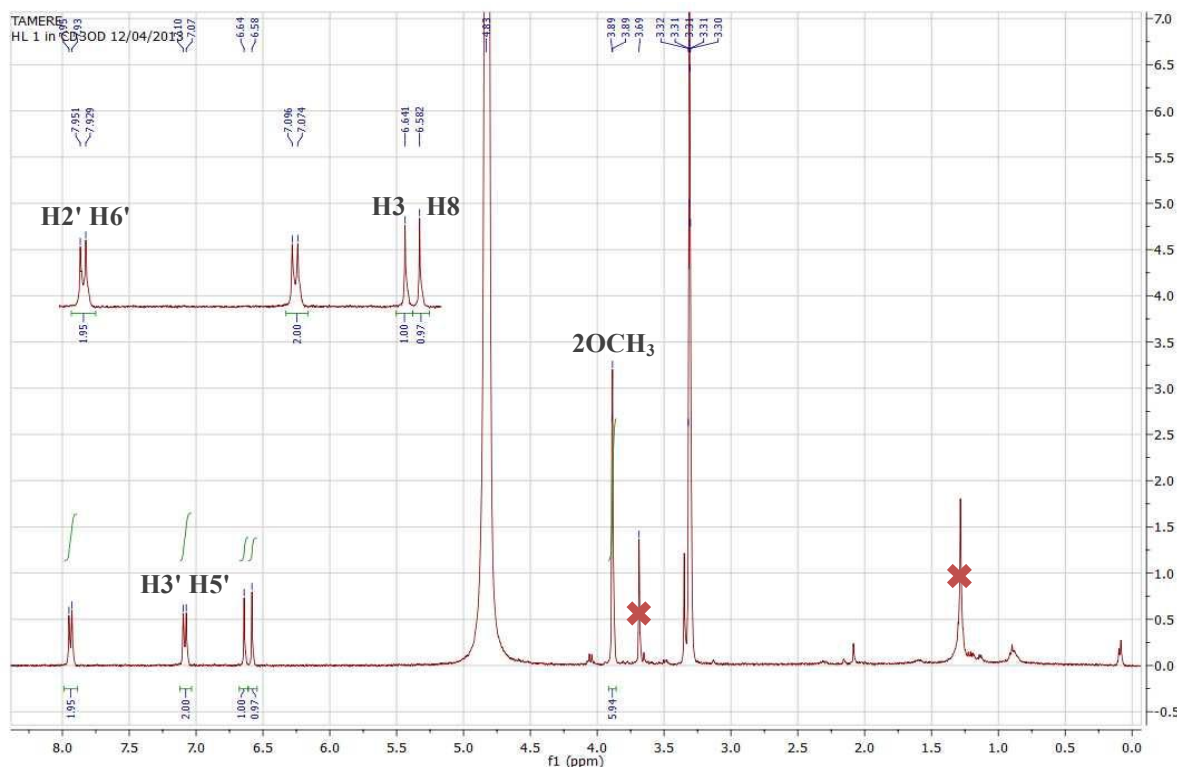


Figure IV.13.1: Spectre RMN ^1H du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

Le tableau IV.13 rassemble les données de RMN ^1H .

Tableau IV.13: Les résultats de la RMN ^1H (400 MHz; MeOH- d_4) du LR C8-4-2

δ_H (ppm)	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.94	2H	d (9.2)	H-2' et H-6'
7.08	2H	d (9.2)	H-3' et H-5'
6.64	1H	s	H-3
6.58	1H	s	H-8
3.89	6H	s	2 OCH ₃

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.13.2) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants:

- Les deux protons H-2' et H-6' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 127.5$ ppm aux carbones C- 2' et C- 6'.
- Les deux protons H-3' et H-5' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 114.1$ ppm aux carbones C-3' et C-5'.
- Les protons H-3 et H-8 ou H-6 permettent l'attribution des signaux à $\delta_C = 102.2$ et 93.7 ppm aux carbones C-3 et C-8 ou C-6.
- Le singulet de deux OCH₃ permet l'attribution des atomes de carbones respectif deux à $\delta_C = 58.7$ et 53.7 ppm.

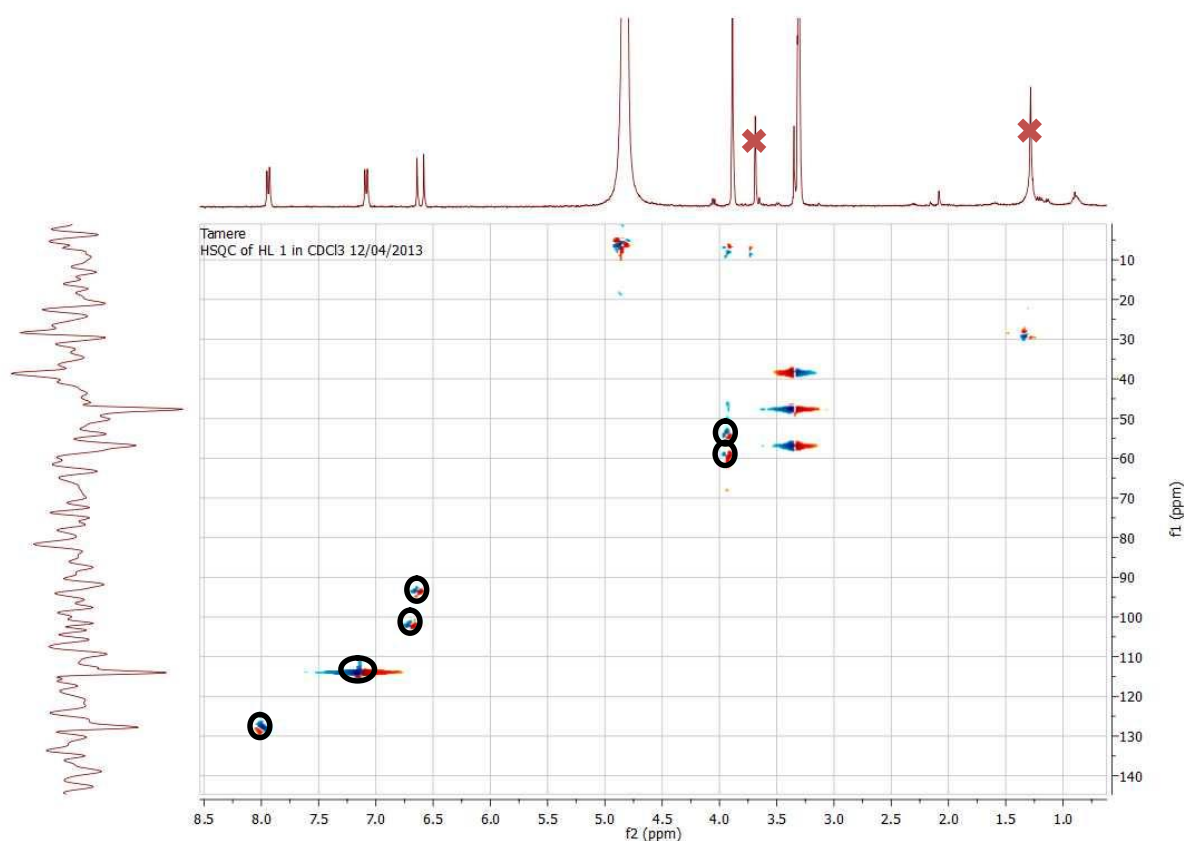


Figure IV.13.2: Spectre HSQC du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm)

L'étude de spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.13.3) permet de tirer les indications suivantes:

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent deux tâches de corrélation, la première avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 162.8$ ppm, ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3.89$ ppm, donc ce carbone est le C-4', substitué par ce méthoxyle. La seconde est avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 164.4$ ppm, attribuable au carbone C-2.

- ✓ Les protons H-3' et H-5' donnent deux tâches de corrélation, la première avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 122.4$ ppm, qui ne peut être que le C-1' et la seconde avec le carbone C-4' à $\delta_C = 162.8$ ppm.
- ✓ Le proton H-3 donne quatre tâches de corrélation, la première avec le signal à $\delta_C = 104.3$ ppm attribuable à C-10, la deuxième et la troisième avec les carbones C-1' et C-2 à $\delta_C = 122.9$ et 164.4 ppm. La dernière est avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 182.8$ ppm attribuable à C-4.
- ✓ Le H-8 ou H-6 montre cinq tâches de corrélation, la première avec le C-10 à $\delta_C = 104.3$ ppm, la deuxième avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 131.1$ ppm, ce dernier montre aussi une tâche de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3.89$ ppm, donc ce carbone est le C-6 ou C-8 substitué par un groupement méthoxyle. La troisième et la quatrième tâches sont avec les carbones quaternaire à $\delta_C = 157.4$ et 153.1 ppm attribuables aux carbones C-7 et C-9 respectivement. La dernière est avec le C-4 à $\delta_C = 182.8$ ppm.

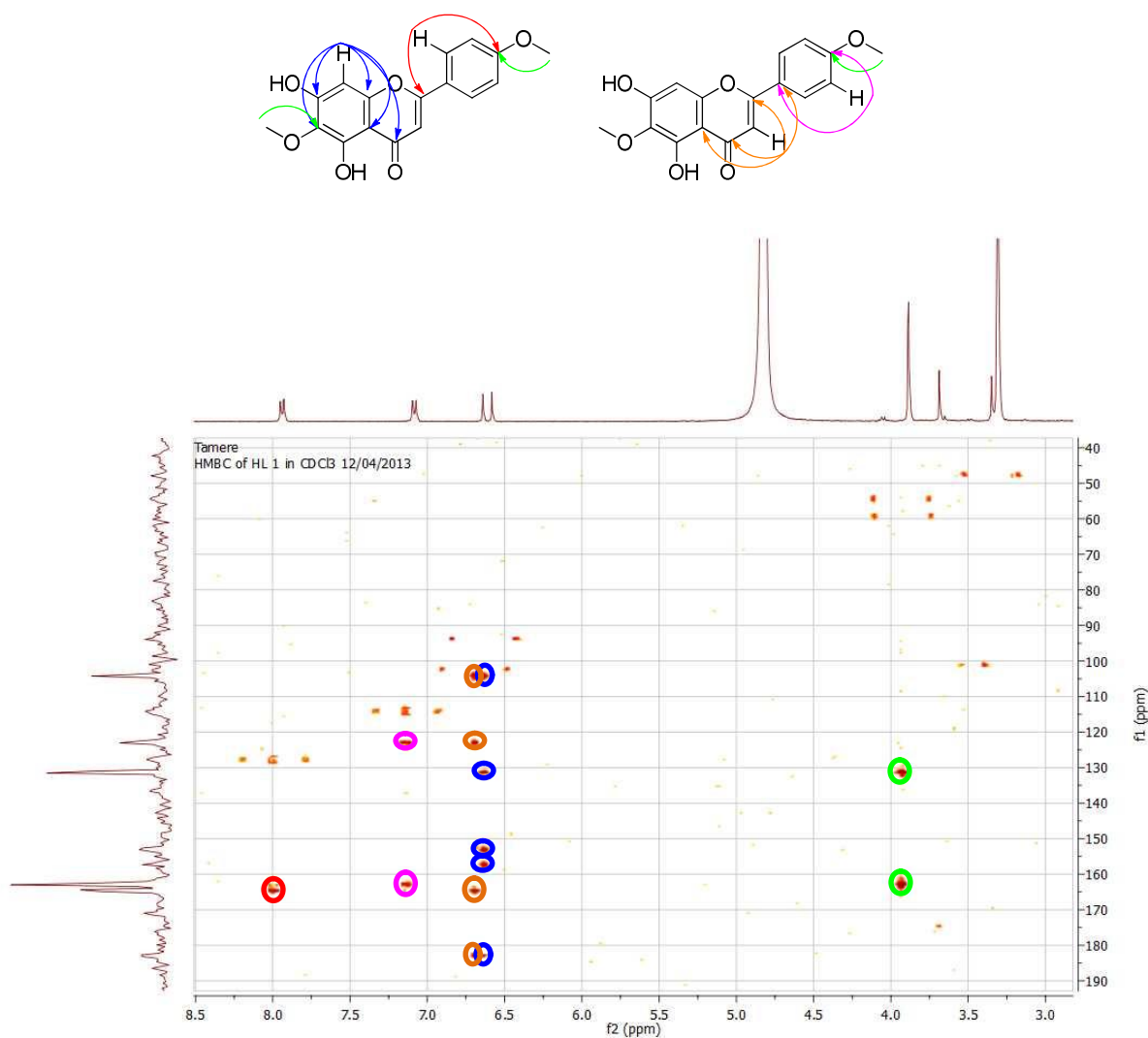


Figure IV.13.3: Spectre HMBC du LR C8-4-2 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

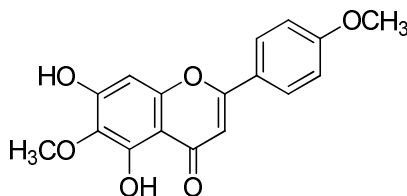
Ces données mènent à la possibilité de deux structures probables, la première on a le H-6 et la seconde avec le H-8. Par comparaison avec la littérature, Le composé avec un H-8 est bien répondu dans les espèces du genre *Linaria*.

L'ensemble des données spectroscopique RMN 1 & 2D sont rassemblés dans le tableau suivant:

Tableau IV.14: Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C du LR C8-4-2 (400 MHz; MeOH- d_4)

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
2	164.4	-	1'	122.9	-
3	102.2	6.64	2'	127.5	7.94
4	182.8	-	3'	114.1	7.08
5	152.5	-	4'	162.8	-
6	131.1	-	5'	114.1	7.08
7	157.4	-	6'	127.5	7.94
8	93.7	6.58	OCH ₃ -6	58.7	3.89
9	153.1	-	OCH ₃ -4'	53.7	3.89
10	104.3	-			

Les données spectroscopiques montrent que la structure de notre composé est : 5,7-dihydroxy 6,4'-diméthoxyflavone (pectolarigénine)[15].



2.5. Éluclidation structurale du composé LR Ac-1

Le Composé LR Ac-1, a été isolé sous-forme de cristaux jaune insoluble dans le méthanol. La fluorescence noire violette sous la lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.14.1) enregistré dans le DMSO- d_6 ainsi que ces spectres étalés (fig. IV.14.2 et IV.14.3), montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=12.83$ ppm, attribuable au proton d'un OH en C-5.
- ✓ Une para substitution du noyau B (OR-4') déduit de l'existence à $\delta_{\text{H}}= 7.92$ ppm, d'un doublet ($J= 9.2$ Hz) d'intégration 2H, attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre

- doublet avec la même constante de couplage et la même intégration 2H à $\delta_H = 7.4$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_H=6.88$ et 6.74ppm, attribuables aux protons H-6 ou H-8 et H-3.
 - ✓ La présence de deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier un doublet ($J= 7.2$ Hz) à $\delta_H=5.12$ ppm caractéristique d'un proton anomérique identifiant une liaison O-sucre, ce sucre est probablement un glucose ou un galactose vu la valeur de la constante de couplage qui écarte la possibilité du mannose et le second un singulet large (*br*) à $\delta_H =4.59$ ppm attribuable à un proton anomérique d'un groupement rhamnosyle de configuration α (J petite), cela est justifié par la présence du méthyle du rhamnose.
 - ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun entre $\delta_H=3.7$ et 4 ppm recouvert par le signal du DMSO, attribuables aux deux groupements méthoxyles.
 - ✓ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H=1.91$ ppm attribuable à un CH_3 lié à une fonction carbonyle.
 - ✓ Un doublet ($J= 6$ Hz) d'intégration 3H à $\delta_H=0.77$ ppm attribuableaux protons du $\text{CH}_3\text{-6}'''$ du groupement rhamnosyle qui corrèle dans le spectre COSY avec le proton H-5'''.

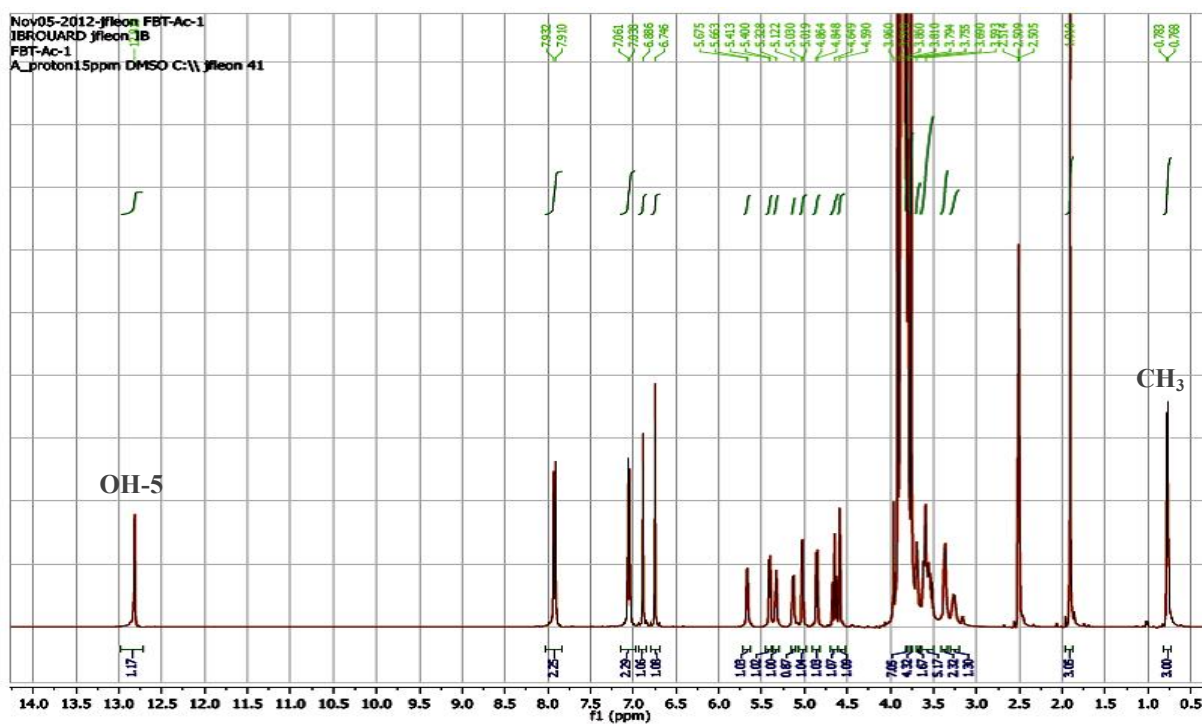


Figure IV.14.1: RMN ^1H du LR Ac-1 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm)

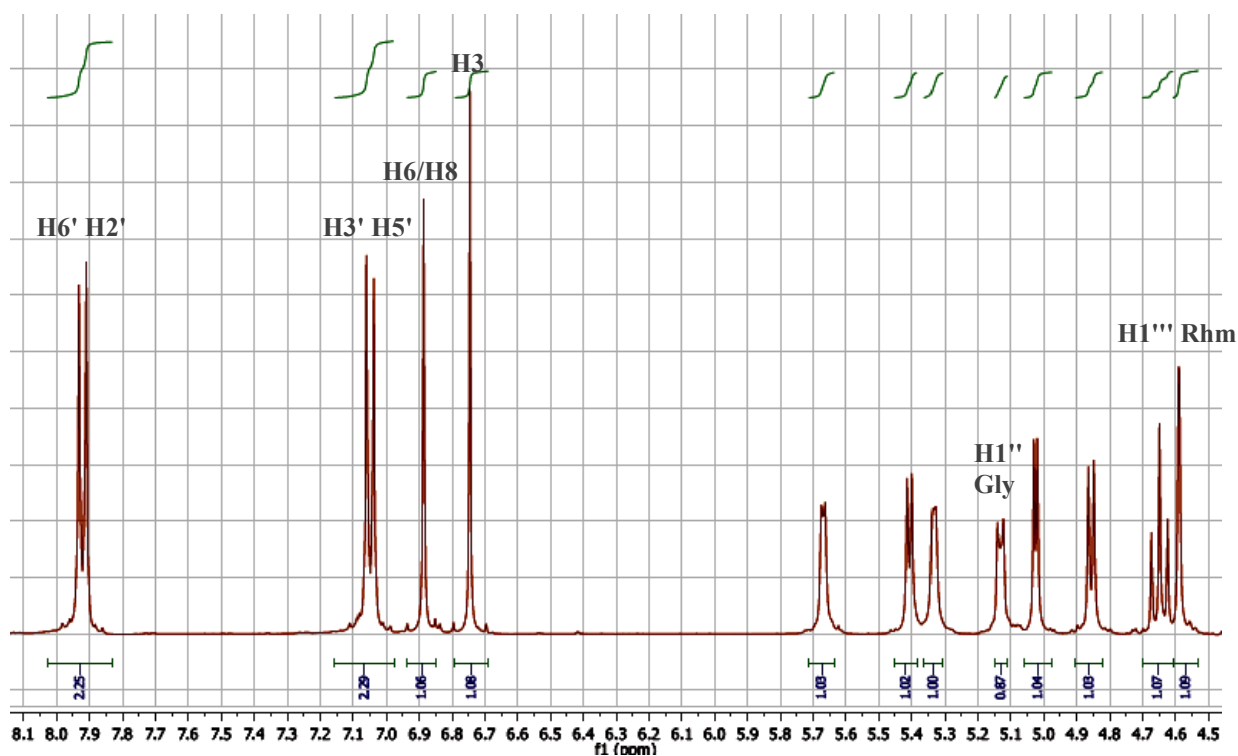


Figure IV.14.2: RMN ¹H étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

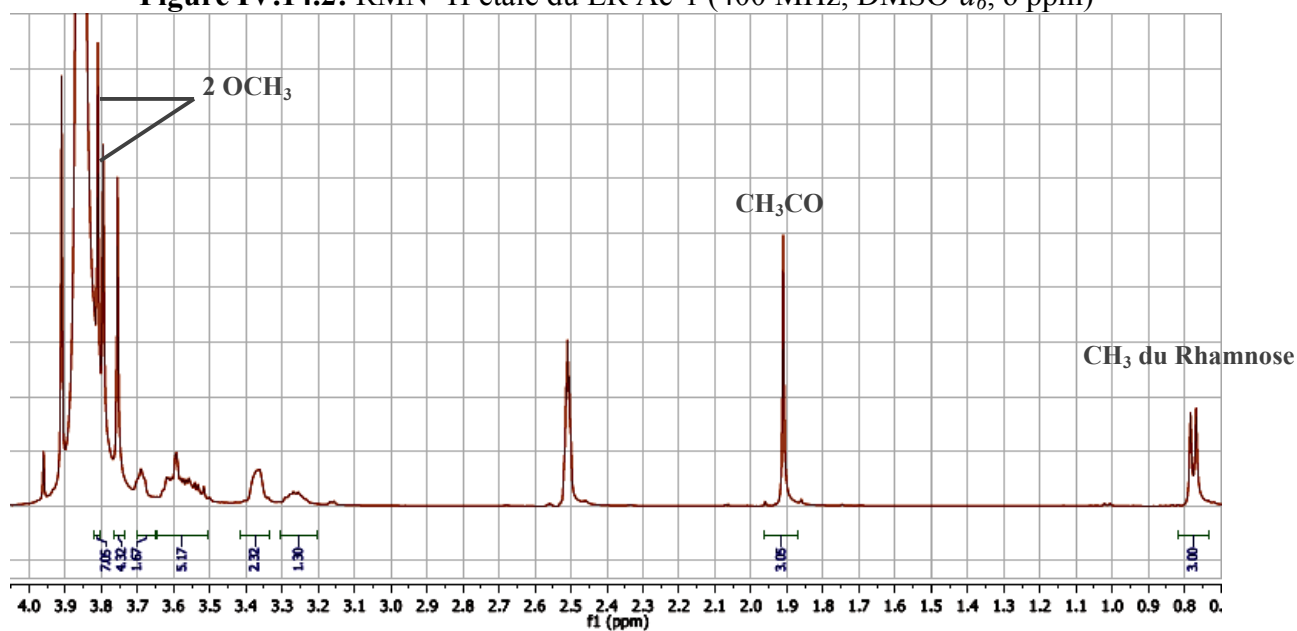


Figure IV.14.3: RMN ¹H étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

Le tableau IV.15 a rassemblé les données de RMN ¹H.

Tableau IV.15: Les résultats de la RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆) du LR Ac-1

δ _H (ppm)	Intégration	J(Hz)	Attribution
12.83	1H	<i>s</i>	OH-5
7.92	2H	<i>d</i> (9.2)	H-2' et H-6'
7.40	2H	<i>d</i> (9.2)	H-3' et H-5'
6.88	1H	<i>s</i>	H-6 ou H-8
6.74	1H	<i>s</i>	H-3

5.12	1H	<i>d</i> (7.2)	H-1" Gly
4.59	1H	<i>br. s</i>	H-1''' Rhm
3.81	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3.80	3H	<i>s</i>	OCH ₃
1.91	3H	<i>s</i>	CH ₃ CO
0.77	3H	<i>d</i> (6)	CH ₃ -6'''Rhm

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure IV.14.4) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants:

- Les deux protons H-2' et H-6' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 128.2$ ppm aux carbones C- 2' et C- 6'.
- Les deux protons H-3' et H-5' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 114.6$ ppm aux carbones C-3' et C-5'.
- Les protons H-3 et H-6 ou H-8 permettent l'attribution des signaux à $\delta_C = 103$ et 94.4 ppm aux carbones C-3 et C-6 ou C-8.
- Le signal de H-1" du glycosyle permet l'attribution du signal à $\delta_C = 99.9$ ppm à C-1".
- Le H-1''' du rhamnosyle permet l'attribution du signal à $\delta_C = 99.7$ ppm à C-1'''.
- Les protons des deux groupements méthoxyles à $\delta_C = 3.81$ et 3.80 ppm permettent l'attribution des atomes de carbones respectifs à $\delta_C = 55.4$ et $\delta_C = 60.3$ ppm.
- Les protons du méthyle avec le carbone relié au carbonyle à $\delta_C = 20.6$ ppm.
- Les protons du méthyle CH₃-6''' permettent l'attribution du signal à $\delta_C = 16.9$ ppm à C-6'''.

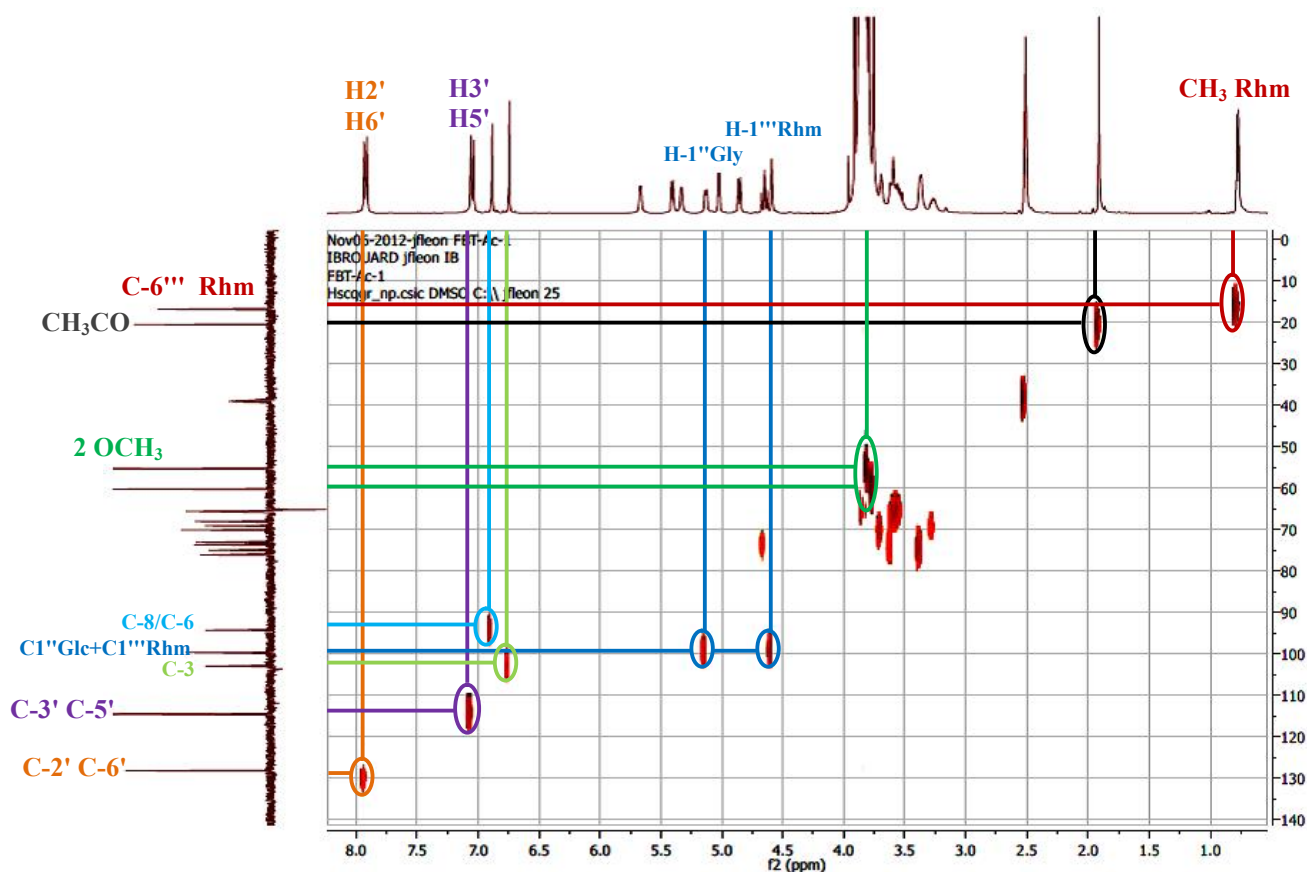


Figure IV.14.4: Spectre HSQC du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les analyses des spectres RMN¹³C, DEPT 90 et DEPT 135 (figure IV.14.5) permettent de noter la présence de 31 signaux d'atome de carbone:

- Le méthyle d'un groupement rhamnosyle CH₃-6''' ($\delta_C = 16.9$ ppm), un méthyle ($\delta_C = 20.6$ ppm) lié à une cétone, deux méthoxyles ($\delta_C = 55.4$ et 60.3 ppm), les carbones C-1'' et C-1''' des groupements glycosyle et rhamnosyle ($\delta_C = 99.9$ et 99.7 ppm), les carbones du cycle B du noyau flavonique C-2', C-6' ($\delta_C = 128.2$ ppm) et C-3', C-5' ($\delta_C = 114.6$ ppm) déjà attribués par l'expérience HSQC.
- un signal à $\delta_C = 65.3$ ppm dans les spectres de RMN¹³C et DEPT 135, attribuable au carbone OCH₂ du groupement glycosyle (OCH₂-6'').
- Dix atomes de carbones quaternaires, deux à $\delta_C = 182.2$ et 170.3 ppm qui ne peuvent être que le C-4 et le carbonyle lié au CH₃.

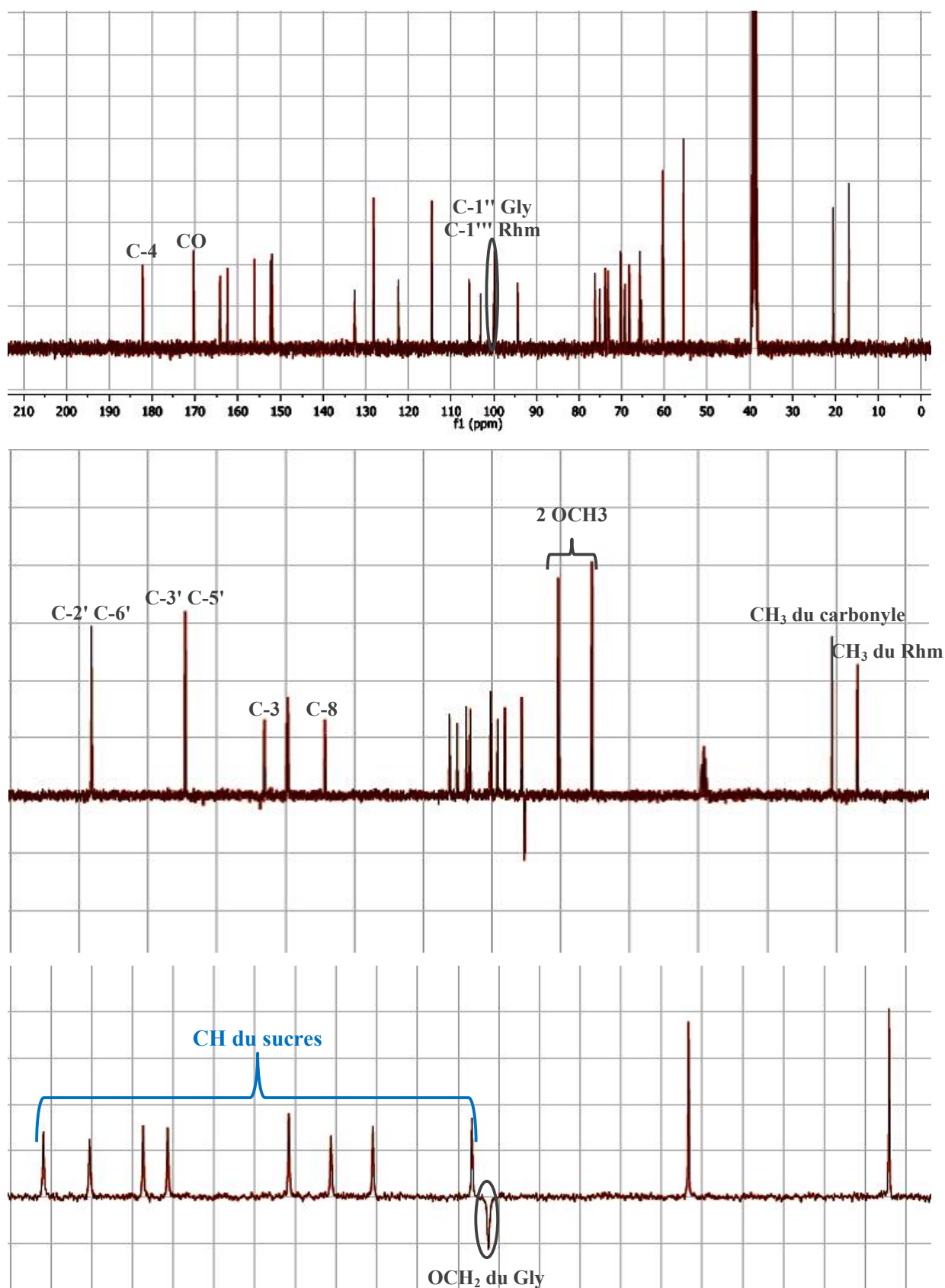


Figure IV.14.5: RMN ^{13}C du LR Ac-1 (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'étude de spectre relatif à l'expérience HMBC (figure IV.14.6) permet de tirer les indications suivantes:

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent deux tâches de corrélation, la première avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 162.4\text{ppm}$, ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3.81\text{ ppm}$ ($\delta_C = 55.4\text{ ppm}$), donc ce carbone est le C-4', substitué par ce méthoxyle. La seconde tâche est avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 164.1\text{ ppm}$, attribuable à C-2.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' donnent deux tâches de corrélation, la première avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 122.4\text{ ppm}$, qui ne peut être que le C-1' et la seconde avec le carbone C-4' à $\delta_C = 162.4\text{ ppm}$.
- ✓ Le proton H-3 donne quatre tâches de corrélation, la première avec le signal à $\delta_C = 105.8\text{ ppm}$ attribuable à C-10, les trois autres tâches sont avec les carbones C-1', C-2 et C-4 à $\delta_C = 122.4, 164.1\text{ et }182.2\text{ ppm}$, respectivement.

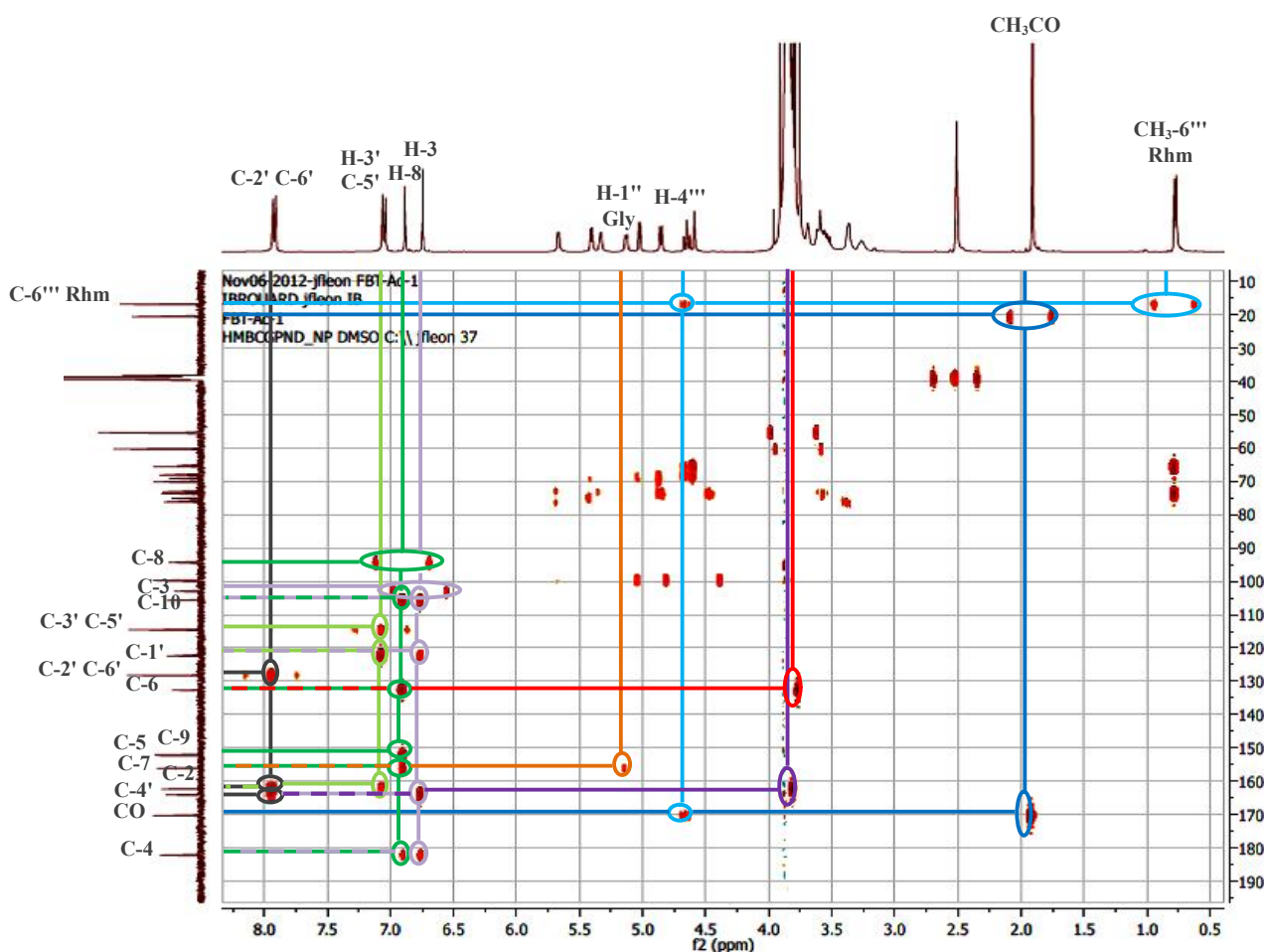


Figure IV.14.6: Spectre HMBC du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'examen du spectre NOESY (figure IV.14.7) montre une tâche de corrélation de type NOE entre le H-6 ou H-8 avec les deux protons H-2' ou H-6', donc ce proton ne peut être que le H-8. Ce dernier montre une autre tâche de corrélation de type NOE avec le proton

anomérique H-1'' du groupement glycosyle ce qui suppose que ce dernier est en position C-7 et le méthoxyle restant est en position C-6.

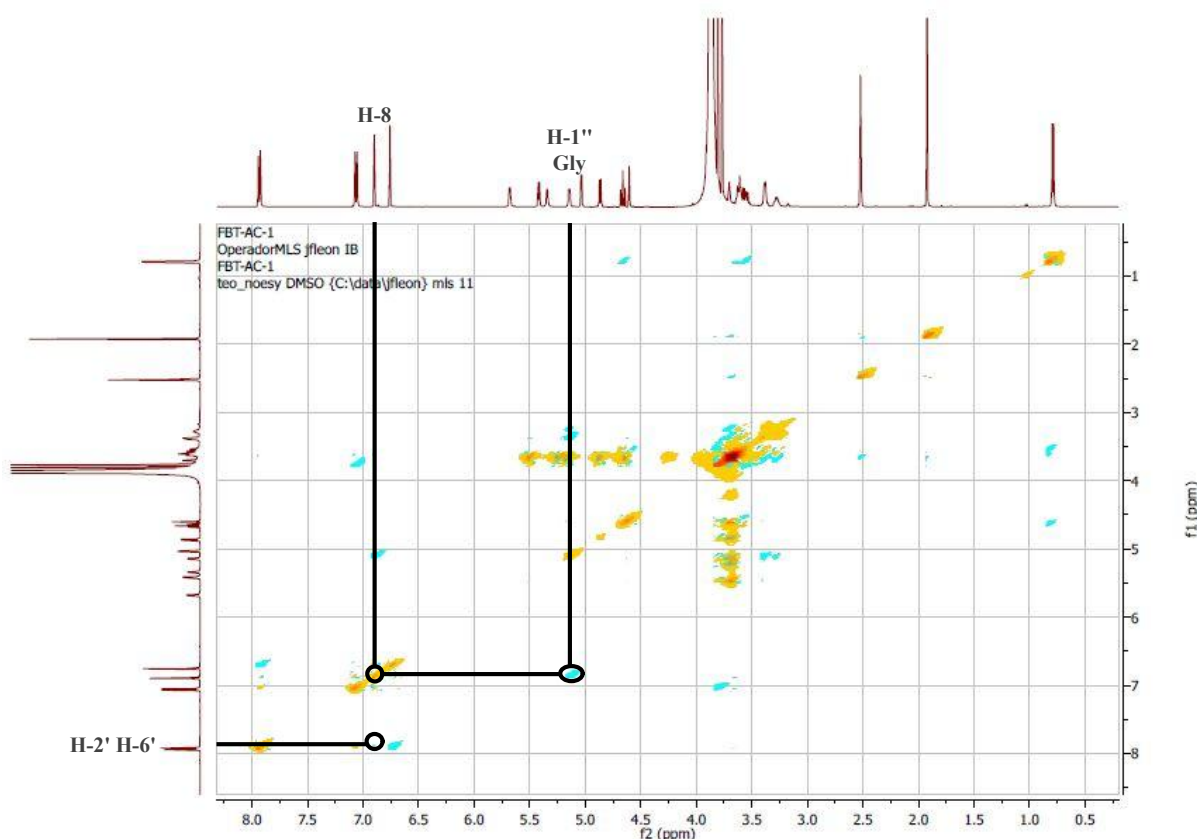


Figure IV.14.7: Spectre NOESY du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Un réexamen du spectre HMBC (figure IV.14.6), montre que le proton H-8 donne cinq tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le carbone C-10 à $\delta_C = 105.8$ ppm.
- ✓ La seconde avec le carbone C-6 à $\delta_C = 132.7$ ppm, ce dernier montre une tâche de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,80$ ppm ($\delta_C = 60.3$ ppm), ce qui confirme sa substitution par ce méthoxyle.
- ✓ La troisième avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 152.3$ ppm attribuable à C-9.
- ✓ La quatrième avec un carbone à $\delta_C = 156.1$ ppm, ce dernier montre une tâche de corrélation avec le proton anomérique H-1'' du glycosyle, donc ce signal ne peut être que le C-7 substitué par ce groupement glycosyle.
- ✓ La cinquième avec le carbone quaternaire C-4.

L'étude du spectre HMBC étalé (figure IV.14.8) montre une tache de corrélation entre le proton anomérique du groupement rhamnosyle (H-1''') et le carbone C-6'' du glycosyle (OCH₂), ce qui permet de localiser le rhamnosyle en position C-6''.

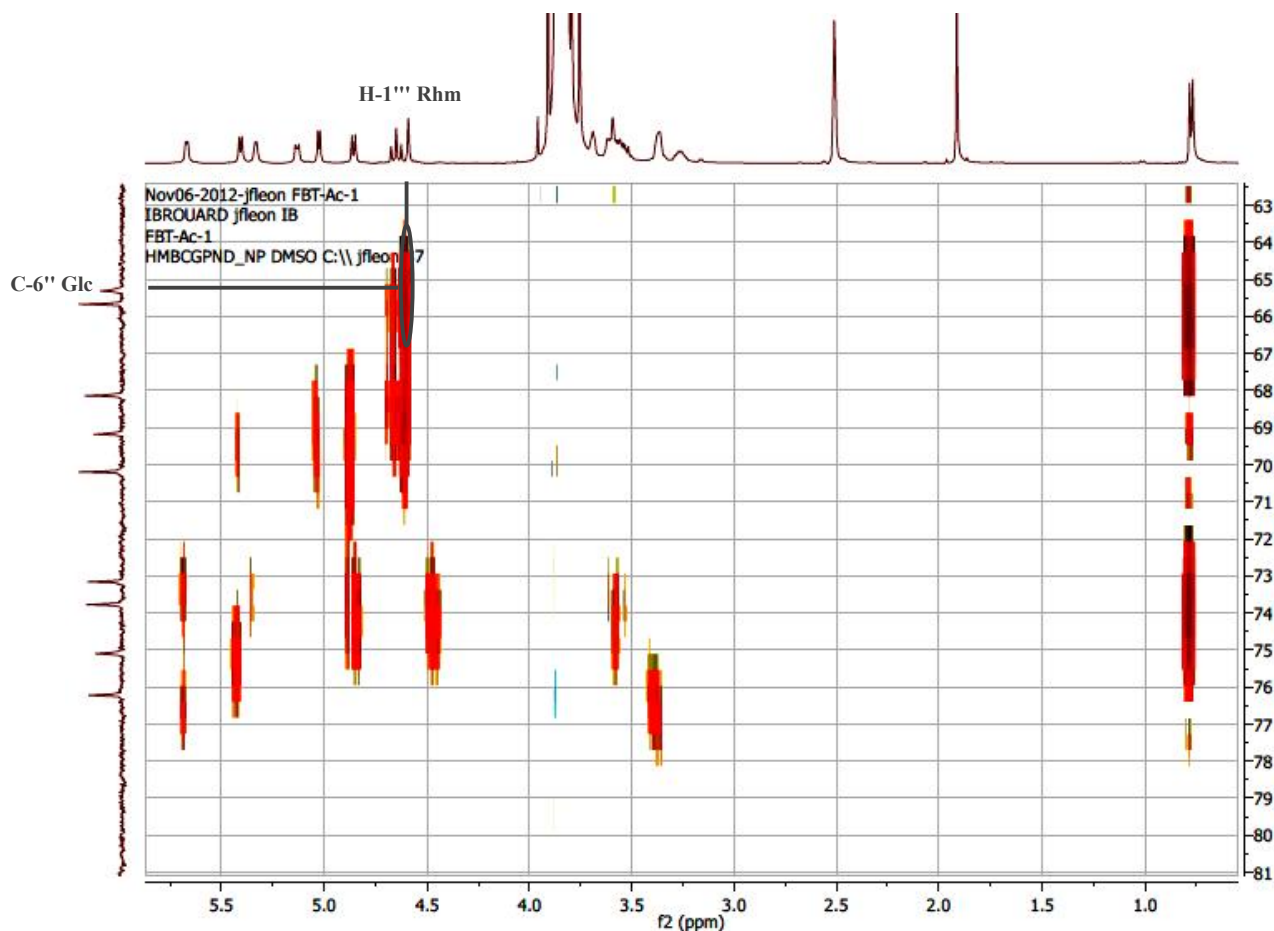


Figure IV.14.8: Spectre HMBC étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm)

L'examen du spectre HMBC (figure IV.14.9) montre une tâche de corrélation entre le carbone CH₃-6''' et un triplet d'un proton à δ_H = 4.64 ppm (*J* = 10 Hz), ce dernier montre deux tâches de corrélation avec deux autres carbones osidique du rhamnose, et ces deux derniers corrélaient avec le H-1''' donc ils ne peuvent être que les carbones C-2''' et C-3''', ces données permettent l'attribution de ce triplet à H-4'''. On remarque aussi une tâche de corrélation entre le H-4''' et le carbonyle de l'ester à δ_C = 170.3 ppm, donc le C-4''' du rhamnosyle est substitué par une fonction acétate (CH₃COO) par un pont oxygéné.

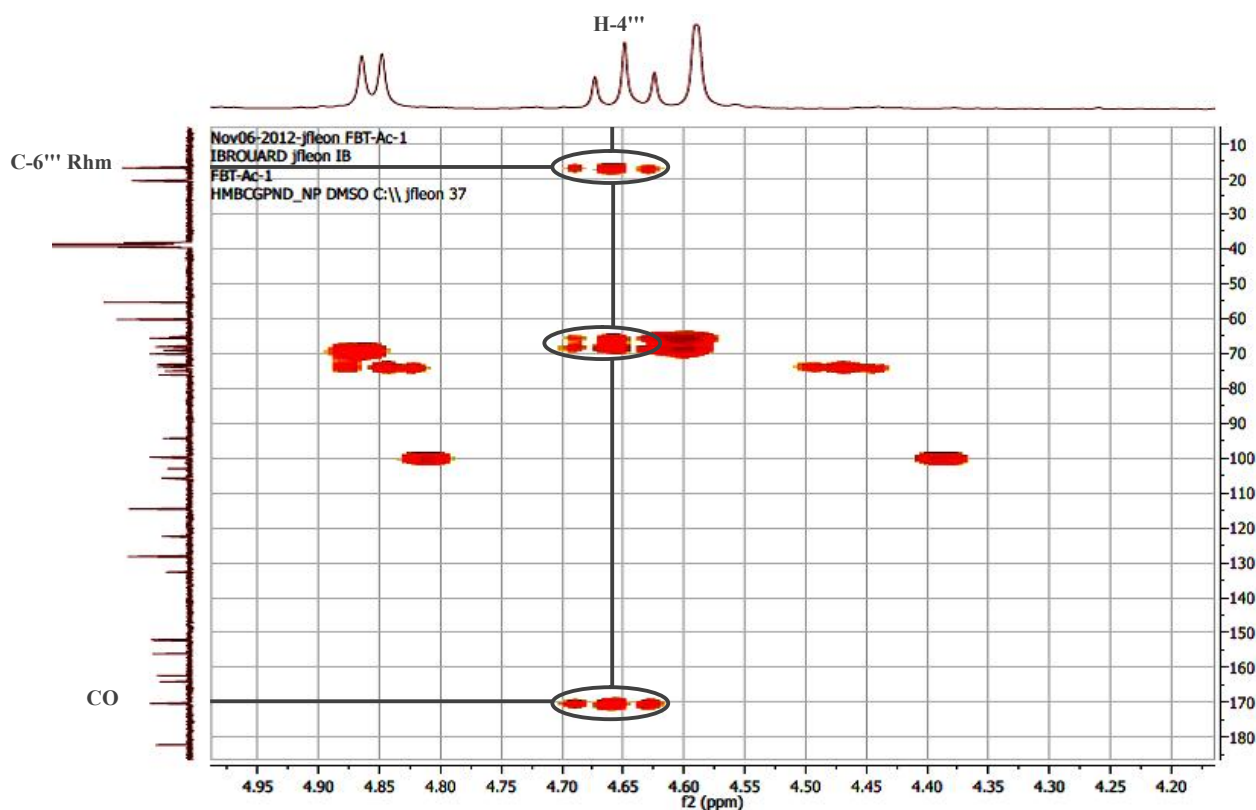


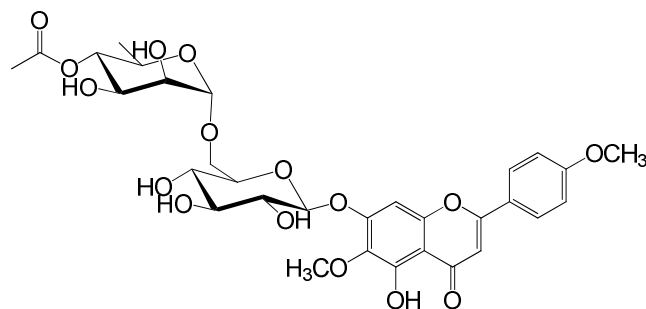
Figure IV.14.9: Spectre HMBC étalé du LR Ac-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'examen des spectres HSQC et HMBC, permet l'attribution des signaux à $\delta_C = 73.1, 76.2, 69.1$ et 75 ppm au carbone du groupement glycosyle (C-2'', C-3'', C-4'' et C-5'' respectivement) et les carbones à $\delta_C = 70.2, 68.1, 73.7$ et 65.7 ppm du groupement rhamnosyle (C-2''', C-3''', C-4''' et C-5''' respectivement). La comparaison des déplacements chimiques des carbones du groupement glycosylé avec ceux de la littérature [5], nous permet d'attribuer ce groupement au glucose.

Tableau IV.16: Les résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du LR Ac-1 (400 MHz; DMSO- d_6)

position	δ_C	δ_H	position	δ_C	δ_H
2	164.1	-	2''	73.1	3-4
3	103	6.74	3''	76.2	3-4
4	182.2	-	4''	69.1	3-4
5	152.1	-	5''	75	3-4
6	132.7	-	6''	65.3	3-4
7	156.1	-	1'''	99.7	4.59
8	94.4	6.88	2'''	70.2	3-4
9	152.3	-	3'''	68.1	3-4
10	105.8	-	4'''	73.7	4.64
1'	122.4	-	5'''	65.7	3-4
2'	128.2	7.92	6'''	16.9	0.77
3'	114.6	7.4	4'-OMe	55.4	3.81
4'	162.4	-	6'-OMe	60.3	3.8
5'	114.6	7.4	CH ₃	20.6	1.91
6'	128.2	7.92	CO	170.3	-
1''	99.9	5.12	OH-5	-	12.83

L'ensemble de ces données spectroscopiques mène à la structure reportée dans le schéma suivant.



L'examen du spectre de masse (figure IV.14.10) en HR-ESI confirme la masse totale de ce produit avec la valeur 687.1901 correspondant à la structure $C_{31}H_{36}O_{16}Na$. Ce produit est bien connu dans le genre *Linaria* sous le nom linariine [16].

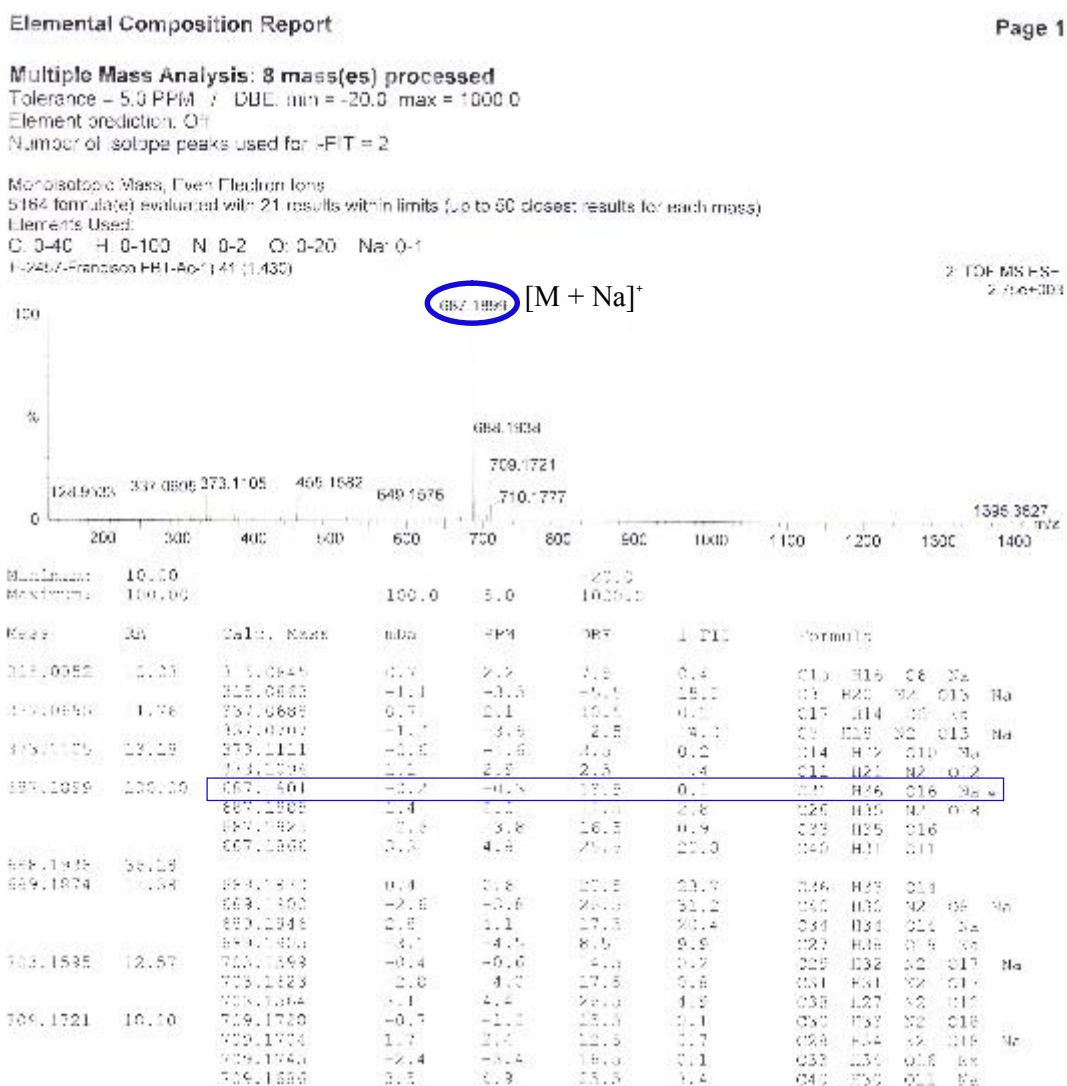


Figure IV.14.10: spectre de masse HR-ESI du LR Ac-1

2.6. Élucidation structural du composé LR Ac-2

Le Composé LR Ac-2 isolé de l'espèce *L. reflexa*, 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 du spectre RMN ^1H (figure IV.15.1 MeOH- d_4 , figure IV.15.2 acétone- d_6) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par:

- ✓ Une para substitution du noyau B(OR-4') déduite de l'existence à $\delta_{\text{H}} = 7.83$ ppm d'un doublet ($J = 8.8$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration à $\delta_{\text{H}} = 6.92$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.49$ ppm, attribuable à H-3.
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun avec la même constante de couplage ($J = 2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6.31$ et 6.1 ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.

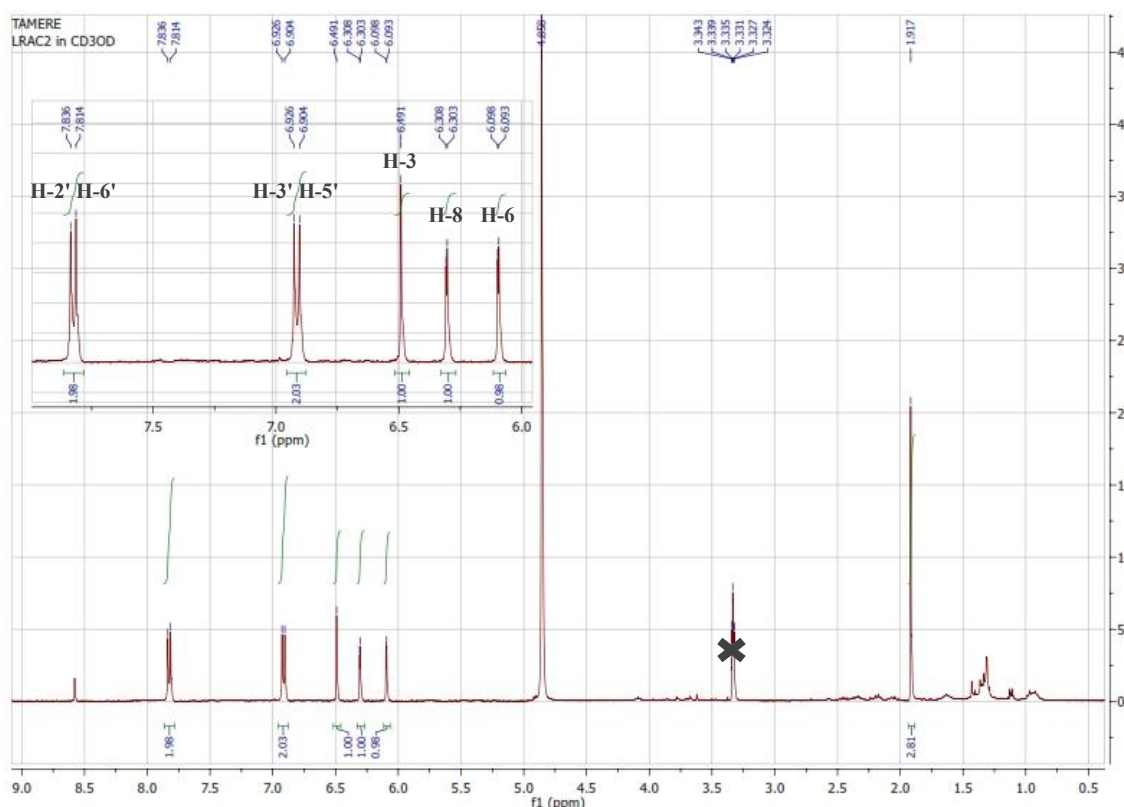


Figure IV.15.1: RMN ^1H du LR Ac-2 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

Le signal à $\delta_{\text{H}} = 1.92$ ppm est celui de l'acétone, un réexamen du spectre enregistré dans l'acétone- d_6 montre l'absence de ce signal.

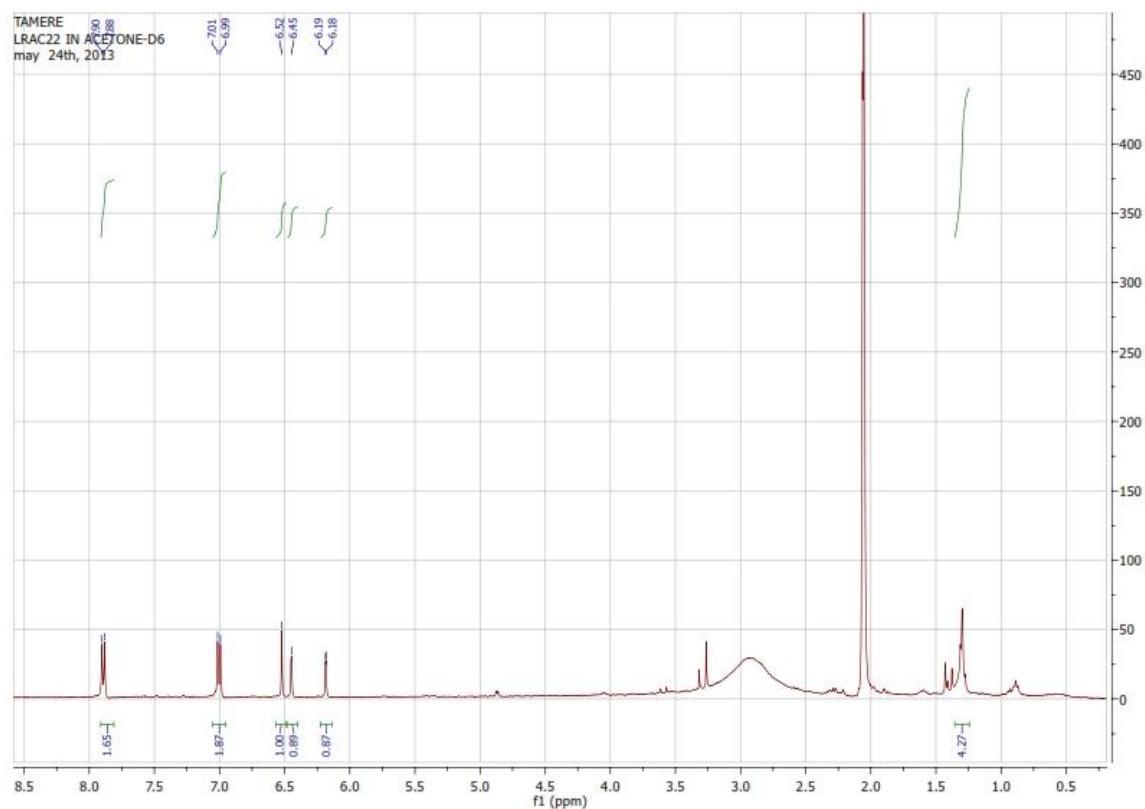


Figure IV.15.2: RMN ^1H du LR Ac-2 (400 MHz, acétone- d_6 , δ ppm)

L'examen du spectre RMN 2D, l'expérience HSQC (figure IV.15.3) enregistré dans le CD_3OD montre la présence des tâches de corrélation identifiée comme suit :

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent une corrélation avec les carbones C-2' et C-6' à $\delta_{\text{C}} = 127.6$ ppm.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' montrent une corrélation avec les carbones C-3' et C-5' à $\delta_{\text{C}} = 116.4$ ppm.
- ✓ Les protons H-3, H-8 et H-6 corrélient avec les carbones C-3, C-8 et C-6 à $\delta_{\text{C}} = 101.8, 94.2$ et 101.1 , ppm respectivement.

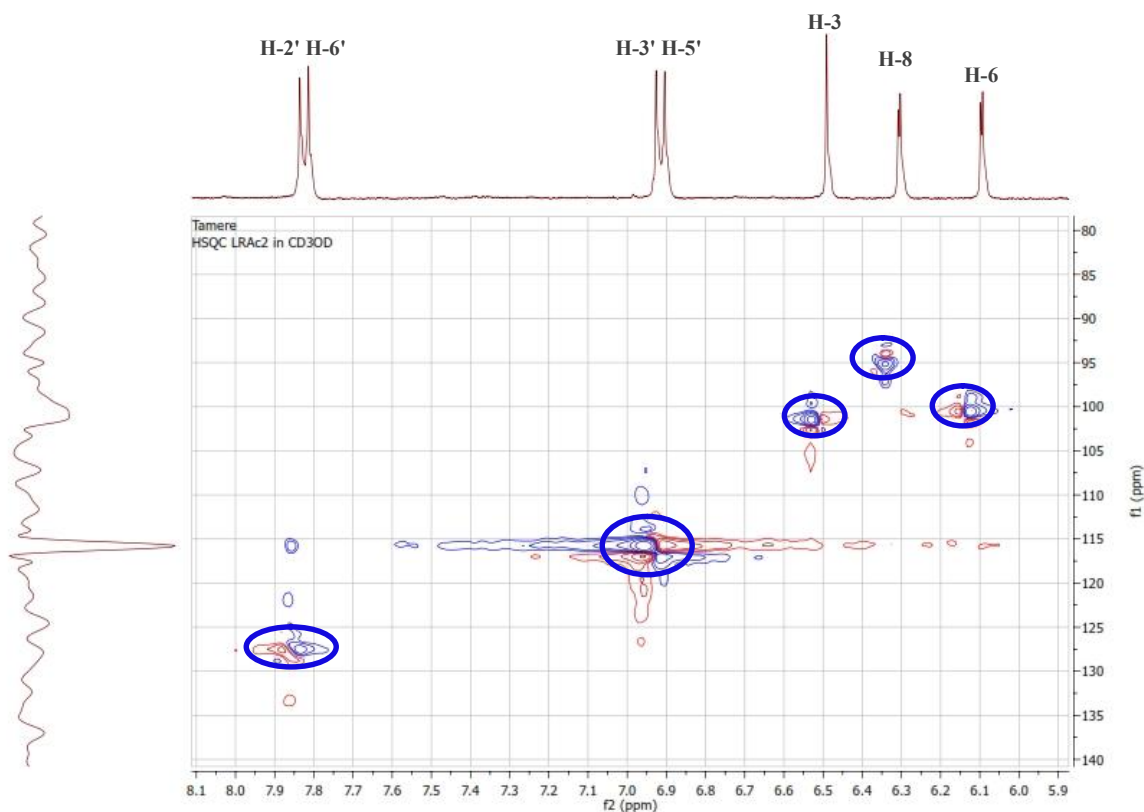


Figure IV.15.3: Spectre RMN HMBC du LR B-1 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

L'examen du spectre RMN 2D, l'expérience HMBC (figure IV.15.4) enregistré dans le CD₃OD montre la présence des tâches de corrélation identifié comme suit:

- ✓ Le proton H-6 montre trois tâches de corrélation:
- ✓ La première est avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 102.1$ ppm, ce dernier montre deux autres tâches de corrélation avec les protons H-8 et H-3, donc ce carbone ne peut être que le C-10.
- ✓ La seconde est avec le carbone à $\delta_C = 162.2$ ppm, l'absence d'une corrélation de ce dernier avec le H-8, confirme que ce carbone est le C-5.
- ✓ La troisième est avec le carbone à $\delta_C = 172.7$ ppm, attribuable à C-7.
 - ✓ Le proton H-8 montre trois tâches de corrélation:
 - ✓ La première est avec le carbone C-10 à $\delta_C = 102.1$ ppm.
 - ✓ La seconde est avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 158.2$ ppm, attribuable à C-9.
 - ✓ La troisième est avec le C-7 à $\delta_C = 172.7$ ppm.
 - ✓ Le proton H-3 montre quatre tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-10 à $\delta_C = 102.1$ ppm.
 - ✓ La seconde et la troisième sont avec deux carbones quaternaire à $\delta_C = 118.4$ et 163.3 ppm, attribuables aux carbones C-1' et C-2' respectivement.

✓ La dernière est avec le carbone à $\delta_C = 179.5$ ppm, qui ne peut être que le C-4.

Les protons H-3' et H-5' montrent deux tâches de corrélation, la première avec le C-1' à $\delta_C = 118.4$ ppm et la seconde avec le C-2 à $\delta_C = 163.3$ ppm.

Les protons H-2' et H-6' montrent une tâche de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 164.4$ ppm, attribuable à C-4'.

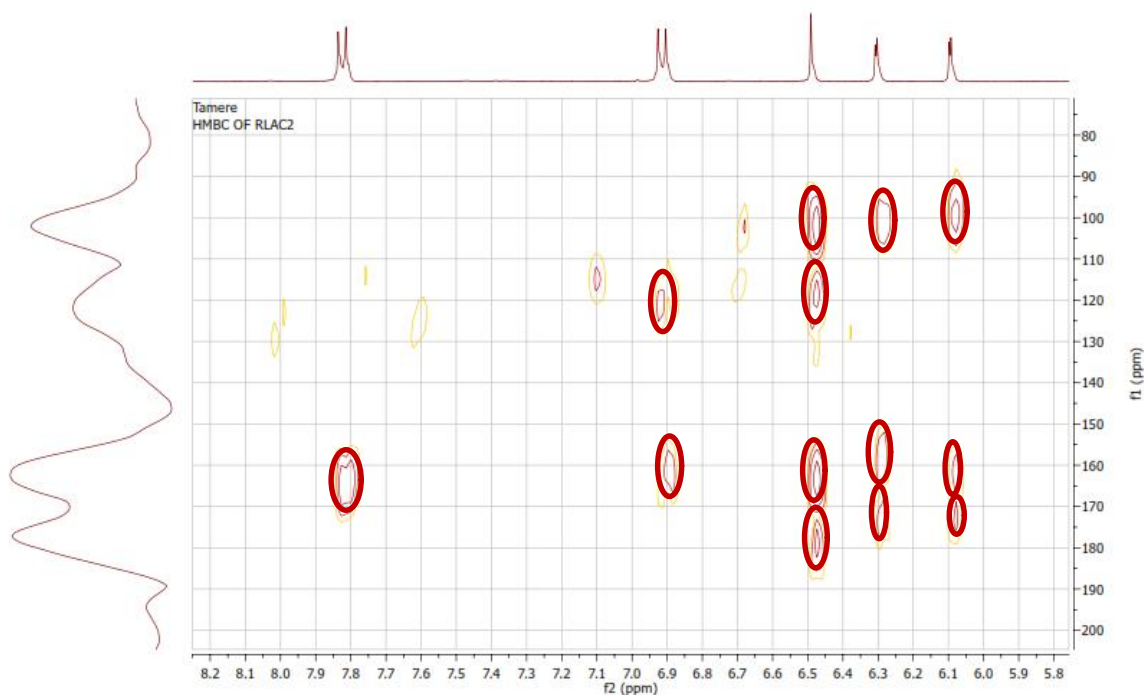


Figure IV.15.4: Spectre HMBC du LR Ac-2 (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm)

Tableau IV.17: Les résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du LR Ac-2 (400 MHz; MeOH- d_4)

position	δ_C	δ_H	position	δ_C	δ_H
2	163.3	-	10	102.1	-
3	101.8	6.49	1'	118.4	-
4	179.5	-	2'	127.6	7.83
5	162.2	-	3'	116.4	6.92
6	101.1	6.1	4'	164.4	-
7	172.7	-	5'	116.4	6.92
8	94.2	6.31	6'	127.6	7.83
9	158.2	-			

L'examen du spectre de masse (fig. IV.15.5) ESI/MS en mode négative montre un pic à $m/z = 269$ correspond à $[\text{M-H}]^-$ confirme la structure de notre composé.

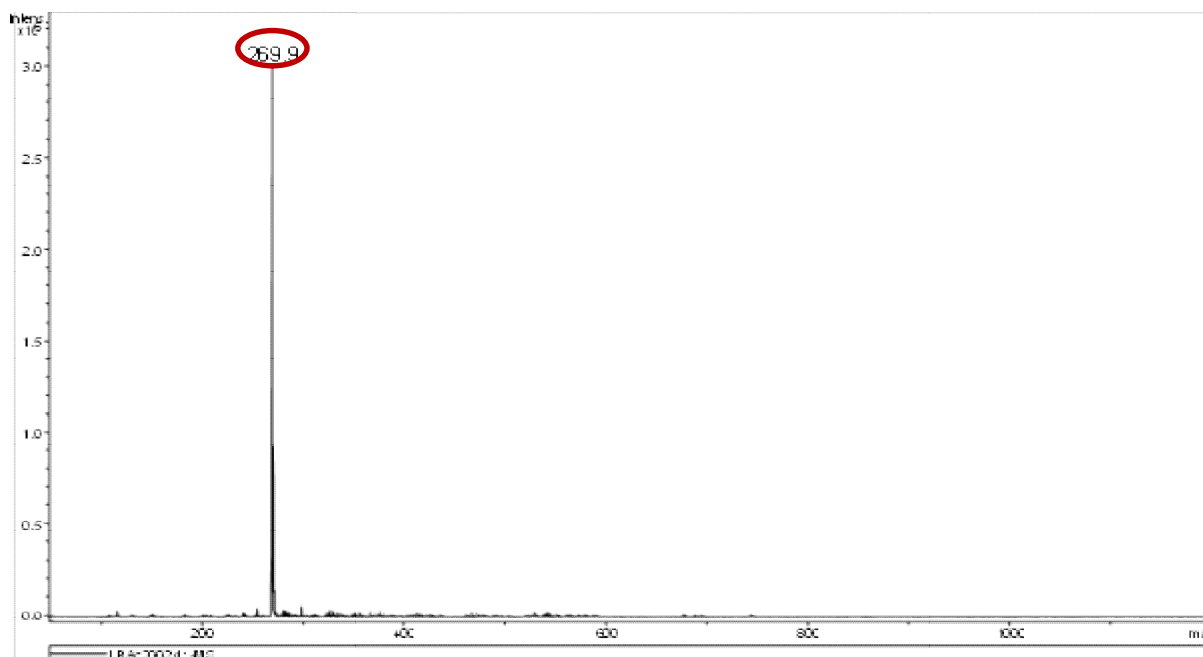
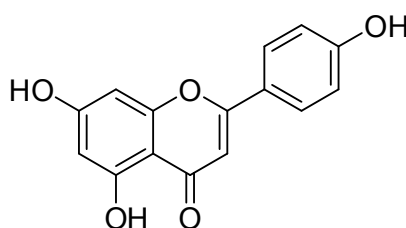


Figure IV.15.5: spectre de masse ESI/MS (-) du LR Ac-2

Les données spectroscopiques RMN 1 et 2D ainsi que le spectre de masse montrent que notre produit est une flavone connu sous le nom apigénine[17], ce produit est nouveau pour l'espèce.



2.7. Éluclation du composé LR B-1

L'examen du spectre RMN ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 (figure IV.16.1) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$, montre la présence de trois signaux que l'on peut identifier comme suit :

- ✓ Le premier signal à $\delta_{\text{C}} = 63.8$ ppm attribuable à un CH_2 oxygéné (DEPT 135).
- ✓ Les deux autres signaux à $\delta_{\text{C}} = 69.7$ et 71.3 ppm sont attribuables à deux CH oxygéné (Dept 90).

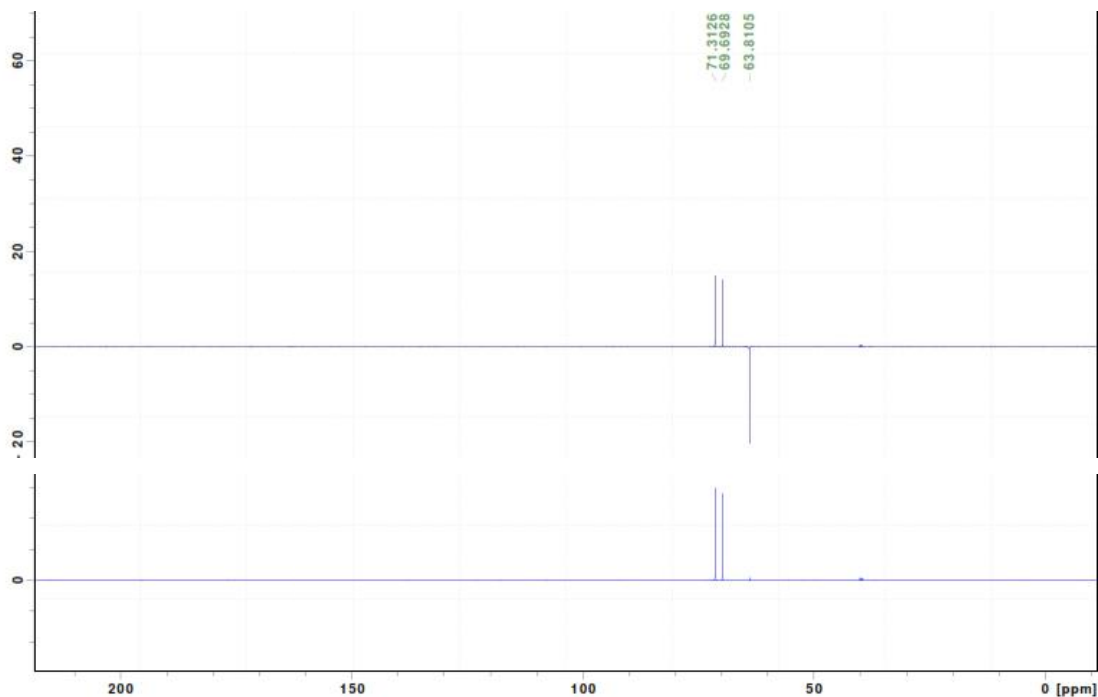


Figure IV.16.1: spectre DEPT 90 et DEPT 135 du LR B-1(100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Le spectre de masse HR-EI présente deux pics, le premier à $m/z = 205.0688$ correspond à $[M+Na]^+$ et le deuxième à $m/z = 387.1478$ correspond à $[2M+Na]^+$, ce qui oriente vers un pic moléculaire $m/z = 182$ correspondant à la formule brute $C_6H_{14}O_6$.

Elemental Composition Report

Page 1

Multiple Mass Analysis: 4 mass(es) processed
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -20.0, max = 1000.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
1095 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
Elements Used:
C: 0-60 H: 0-120 N: 0-1 O: 0-12 Na: 0-1
H-2614-Francisco (FB-CE -P1-But) 17 (0.749)

1: TOF MS ES+
3.84e+003

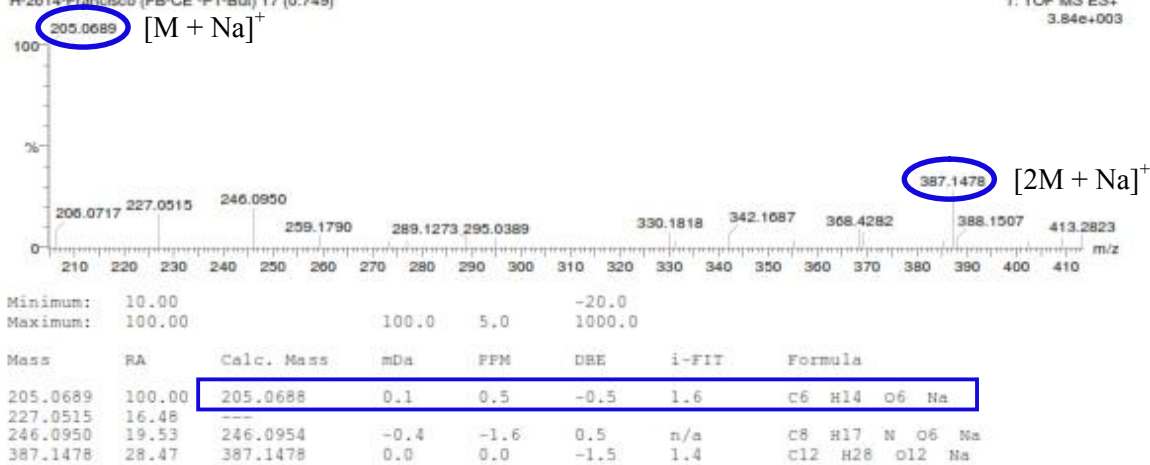


Figure IV.16.2: spectre de masse HR-EI du LR B-1

La formule brute de ce composé $C_6H_{14}O_6$ ainsi que la présence de trois signaux de carbone dans le spectre RMN ^{13}C , orientent vers une symétrie dans cette structure.

L'examen du spectre RMN 2D, l'expérience HSQC (figure IV.16.3) enregistré dans le DMSO- d_6 montre la présence des tâches de corrélation identifiées comme suit :

- ✓ Deux tâches de corrélation entre le carbone de OCH_2 ($\delta_C = 63.8$ ppm) et deux signaux de deux groupements de protons d'intégration 2H chacun, la première tâche avec le signal sous-forme de multiplet à $\delta_H = 3.61$ ppm et la seconde avec un autre à $\delta_H = 3.38$ ppm, cela montre la présence de deux groupements OCH_2 en position 1 et 6 et confirme la symétrie de notre molécule.
- ✓ Une tâche de corrélation entre le signal du carbone OCH à $\delta_C = 69.7$ ppm et le signal d'intégration à $\delta_H = 3.54$ ppm, cela suppose aussi la présence de deux groupements CH oxygénés.
- ✓ Une tâche de corrélation entre le dernier signal du carbone oxygéné (OCH) à $\delta_C = 71.7$ ppm le signal sous-forme de multiplet de deux protons à $\delta_H = 3.45$ ppm, ce qui montre la présence de deux groupements CH oxygénés.

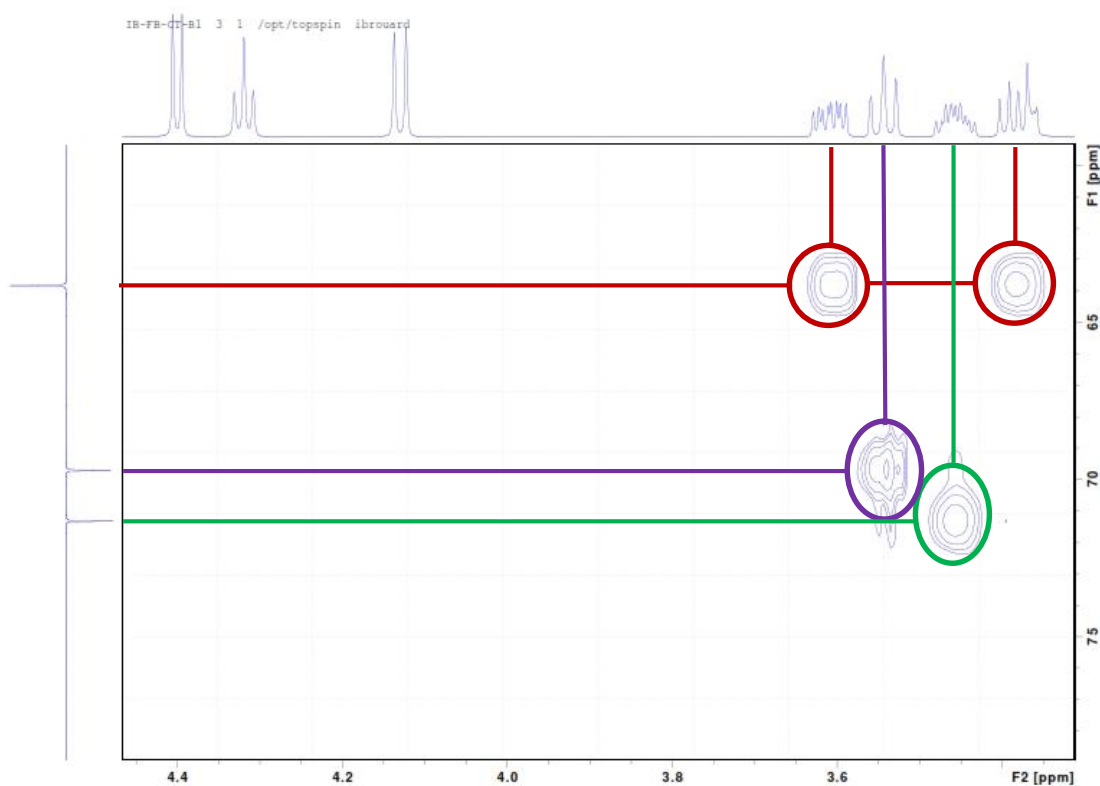


Figure IV.16.3: Spectre HMBC étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

A ce stade là, cette structure renferme deux CH_2O et quatre OCH , confirmant ainsi la symétrie.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.16.4) enregistré dans le DMSO- d_6 ainsi que ces spectres étalés (fig. IV.16.5 et IV.16.6), montrent la présence des signaux suivant:

- ✓ Trois signaux d'intégration 2H chacun, deux doublets ($\delta_{\text{H}} = 4.4$ ppm, $J = 4.4$ Hz) et ($\delta_{\text{H}} = 4.13$ ppm, $J = 5.7$ Hz) et le troisième un triplet ($\delta_{\text{H}} = 4.32$ ppm; $J = 4.6$ Hz), ces signaux sont des protons d'hydroxyles, les deux doublets sont quatre hydroxyles substitués sur des CH et le triplet est celui de deux groupement hydroxyles substitués sur deux CH_2 .
- ✓ Un signal sous-forme de multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3.61$ ppm attribuable à deux proton d'un CH_2 oxygénés.
- ✓ Un signal sous-forme de triplet ($J = 6$ Hz) d'intégration de 2H à $\delta_{\text{H}} = 3.54$ ppm, attribuable à deux protons CH oxygénés.
- ✓ Un signal sous-forme de multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3.45$ ppm, attribuable à deux protons CH oxygénés.
- ✓ Un signal sous-forme de multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3.38$ ppm, attribuable à un deux protons CH_2 oxygéné.

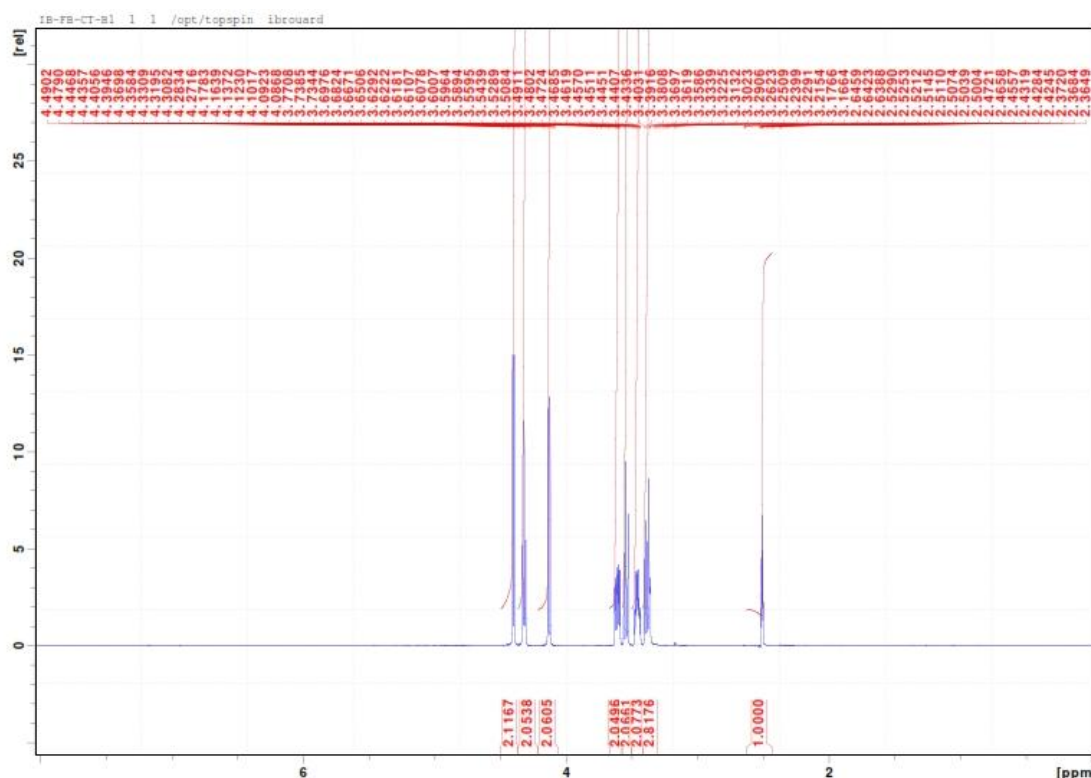


Figure IV.16.4: RMN ^1H du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

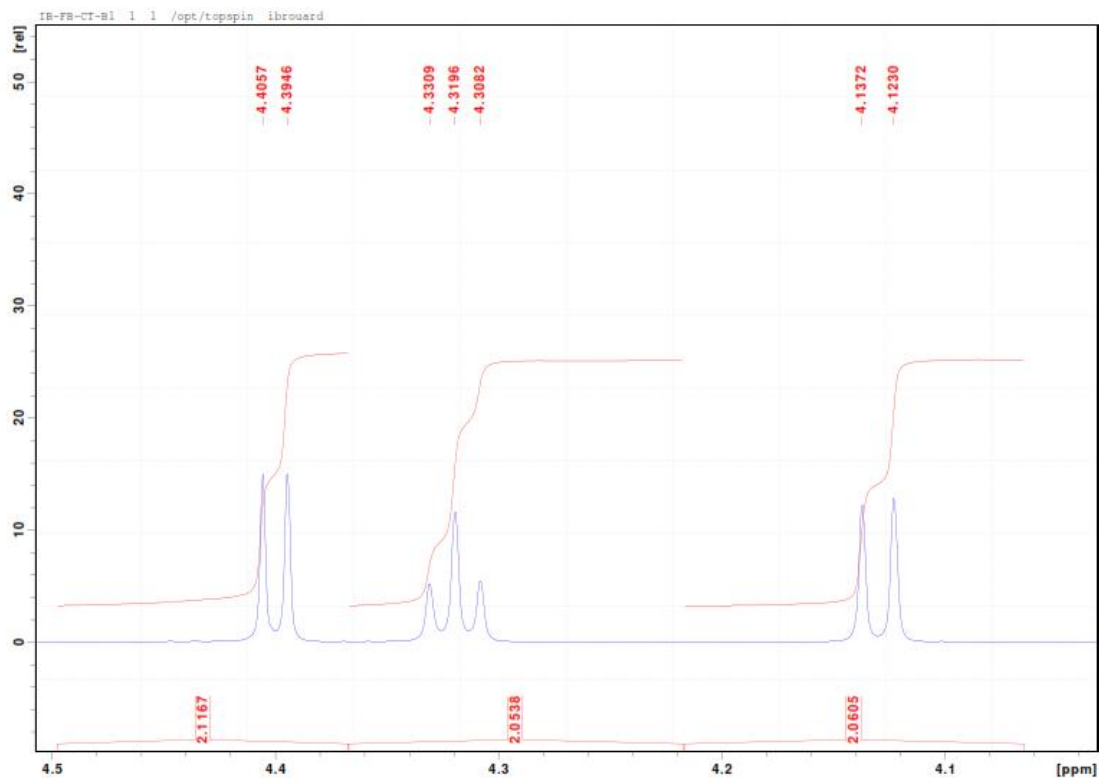


Figure IV.16.5: RMN ^1H étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

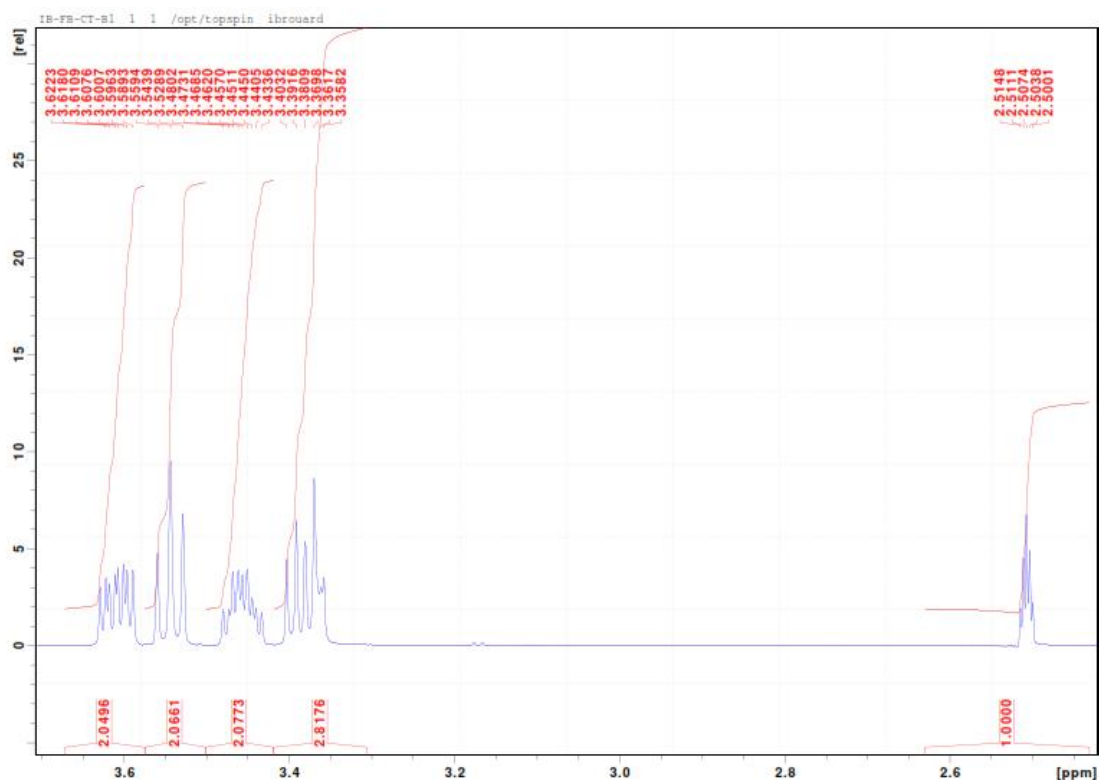


Figure IV.16.6: RMN ^1H étalé du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'examen du spectre RMN 2D, l'expérience COSY (figure IV.15.7) enregistré dans le DMSO- d_6 montre la présence des tâches de corrélation identifié comme suit :

- ☐ Les deux protons de l'hydroxyle à $\delta_H = 4.4$ ppm montre une tâche de corrélation avec le signal des deux protons à $\delta_H = 3.45$ ppm correspondant à deux CH, attribuables deux groupement HOCH.
- ☐ Les deux protons de l'hydroxyle à $\delta_H = 4.31$ ppm montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal du proton sous-forme de multiplet à $\delta_H = 3.38$ ppm qui correspond à un OCH_2 .
 - ✓ La seconde avec le signal du proton à $\delta_H = 3.61$ ppm qui correspond à un second OCH_2 .

Donc ces deux groupements CH_2 (position 1 et 6) sont substitués par deux hydroxyles.

- ☐ Le proton de hydroxyle à $\delta_H = 4.12$ ppm montre une tâche de corrélation avec le signal du proton à $\delta_H = 3.45$ ppm correspond à un groupement CH et comme y a la symétrie de structure, donc on a deux groupement CH substitués par deux OH.

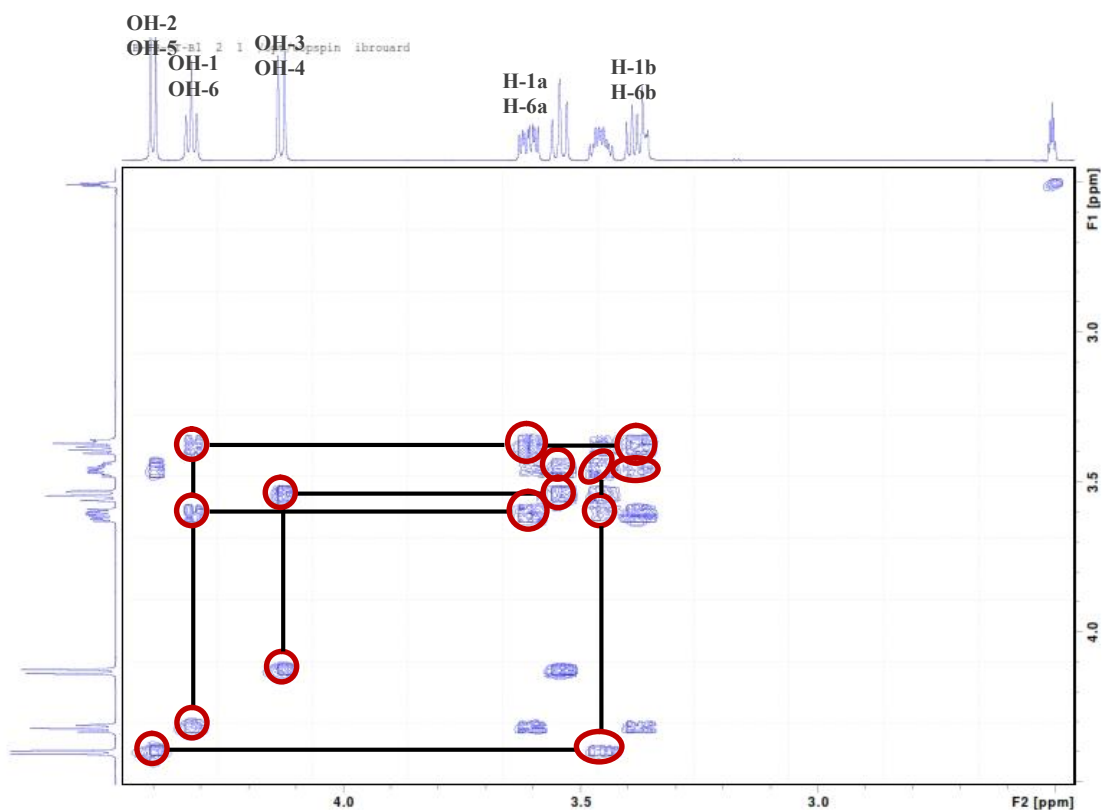
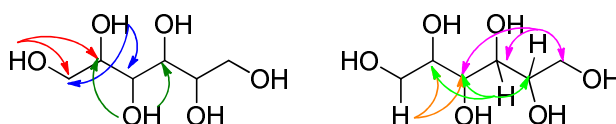


Figure IV.16.7: Spectre COSY du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

L'examen du spectre RMN 2D, l'expérience HMBC (figure IV.16.8), montre la présence des tâches de corrélation identifié comme suit:

- ☐ Le proton d'hydroxyle à $\delta_H = 4.4$ ppm montre trois tâches de corrélation:

- ✓ La première avec le signal du carbone du CH₂-1 et CH₂-6 ($\delta_C = 63.8$ ppm) et ça prouve que cet hydroxyle est substitué sur le carbone voisin du CH₂ qui est CH-2 et CH-5.
- ✓ La seconde avec le signal du carbone CH à $\delta_C = 69.7$ ppm attribuable aux deux groupements CH-3 et CH-4.
- ✓ La troisième est avec le CH-2 et CH-5.
- 🖼 Le H de hydroxyle à $\delta_H = 4.31$ ppm montre deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec les carbones C-1 et C-6 à $\delta_C = 63.8$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le carbone à $\delta_C = 71.3$ ppm attribuable aux carbones C-2 et C-5.
- 🖼 les protons des OH-3 et OH-5 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ la première avec le signal à $\delta_C = 69.7$ ppm attribuable aux deux carbones C-3 et C-4.
 - ✓ La seconde avec le carbone à $\delta_C = 71.3$ ppm attribuable aux carbones C-2 et C-5.
- 🖼 Les deux protons H-1 et H-6 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-3 et C-4 à $\delta_C = 69.7$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le C-2 et C-5 à $\delta_C = 71.3$ ppm.
- 🖼 Les deux protons H-3 et H-4 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le signal du carbone correspond à C-1 et C-6.
 - ✓ La seconde avec les carbones C-2 et C-5.
- 🖼 Les deux protons H-2 et H-5 montrent deux tâches de corrélation:
 - ✓ La première avec le C-1 et C-6 à $\delta_C = 63.8$ ppm.
 - ✓ La seconde avec le C-3 et C-4 à $\delta_C = 69.7$ ppm.



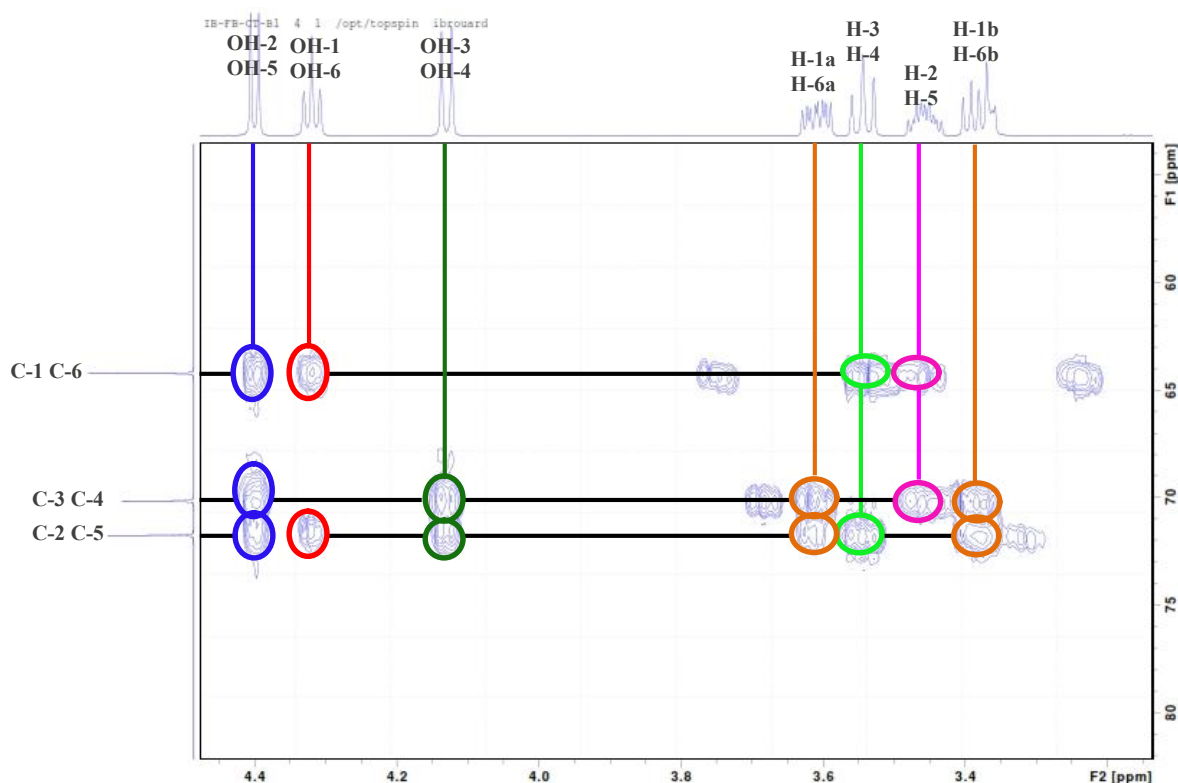


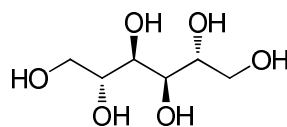
Figure IV.16.8: Spectre HMBC du LR B-1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau IV.18: Les résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du LR B-1 (400 MHz; DMSO- d_6)

position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1, 6α	63.8	3.61	OH-3, 4	-	4.12
1, 6β	63.8	3.38	OH-1, 6	-	4.31
2, 5	71.3	3.45	OH-2, 5	-	4.40
3, 4	69.7	3.54			

Les données spectroscopiques soit RMN 1 & 2D ou bien la masse confirme la structure nommée mannitol [18].



Mannitol

2.8. Élucidation structurale du composé LR Me10-9-3

Le composé LR Me10-9-3 visible sous UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). L'examen du spectre RMN ^1H (figure IV.17.1) enregistré dans CD_3OD , montre que ce produit est le même que produit LT B9-6-1B-6-4 isolé de *L. tingitana* et on peut l'identifier par:

- ✓ Un doublet ($J = 6.4, 1.8$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6.16$ ppm d'intégration 1H correspond à H-3.
- ✓ Un doublet ($J = 2.4$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.47$ ppm d'intégration 1H correspond à H-1.

- ✓ Un doublet large ($J = 2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.33$ ppm d'intégration 1H correspond à H-10a.
- ✓ Un doublet large ($J = 2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5.26$ ppm d'intégration 1H correspond à H-10b.
- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 6.3, 1.2$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4.72$ ppm attribuable à H-4.
- ✓ Un doublet ($J = 8$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4.66$ ppm correspond au proton anomérique H-1' d'un glycoside.
- ✓ Un triplet ($J = 2.4$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4.53$ ppm, attribuable à H-7.
- ✓ Un ensemble de signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.1$ et 4 ppm attribuables aux autres protons osidiques du glycoside.
- ✓ Un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 2.96$ ppm d'intégration 1H attribué à H-9.
- ✓ Un multiple à $\delta_{\text{H}} = 2.86$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-5.
- ✓ deux signaux sous-forme multiplet à $\delta_{\text{H}} = 1.92$ et 1.74 ppm d'intégration 1H chacun attribuable aux protons de CH₂-6.

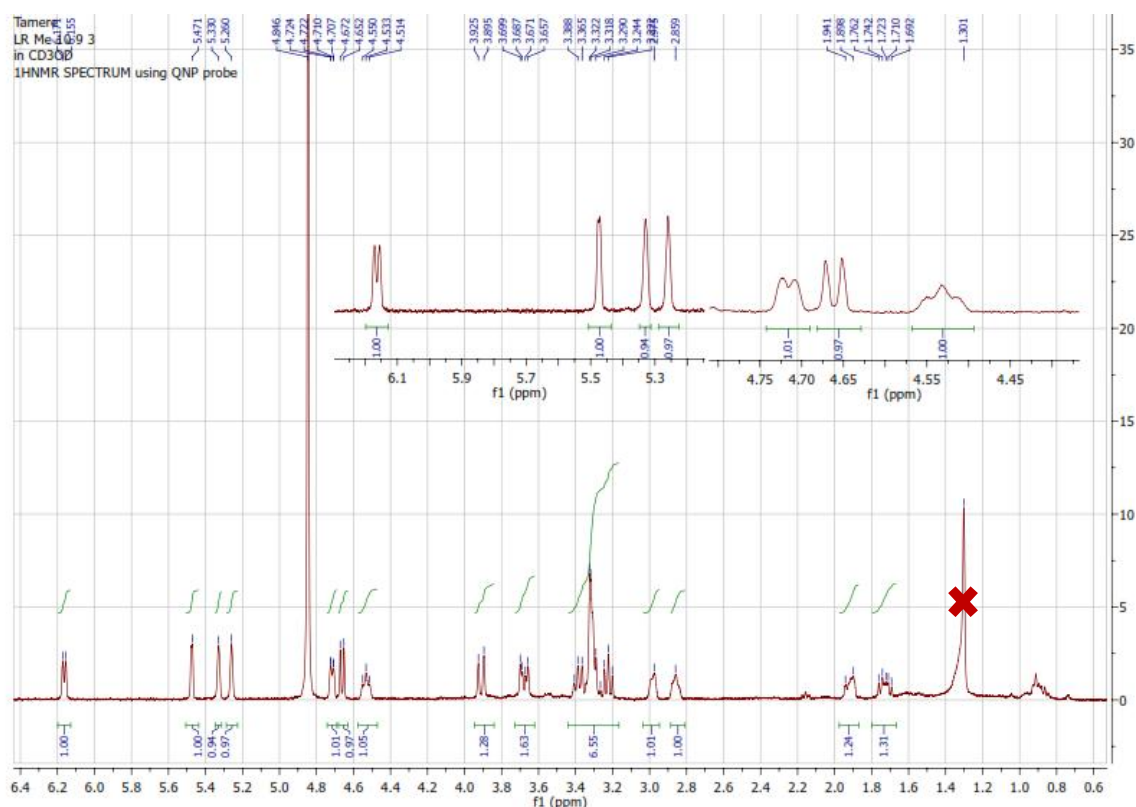


Figure IV.17: RMN ¹H du LR Me10-9-3 (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm)

Ces données montrent que notre composé est l'antirrhide [10].

2.9. Détermination par LC-MS et activités biologiques de deux extraits:

Une étude comparative de deux méthodes d'extraction, par macération (**EHA**) et par extraction ultra-sonique (**EUS**), a nécessité l'investigation des profils LC-MS des deux extraits obtenus ainsi que leurs activités biologiques.

2.9.1. Rendement des deux extraits étudiés :

La méthode d'extraction par ultra-son (**EUS**), a donné un rendement nettement meilleur que celle par macération (**EHA**), elle a également nécessité peu de solvant et moins de temps (tableau IV.19).

Tableau IV.19: résultats de deux méthodes d'extraction

	solvant	temps	rendement
EHA	80% MeOH:20% H ₂ O	72h 3 fois	0.72 g (4.66%)
EUS	MeOH	2h 1 fois	3.5 g (23.33%)

L'étude des profils LC-MS des deux extraits a révélé que la composition chimique est presque la même, alors que les rendements des composés détectés par la méthode (**EUS**) est meilleur que ceux par macération (**EHA**).

2.9.2. Identification de la composition chimique:

L'investigation des profils des deux extraits EUS et EHA, a montré la présence de 16 et 12 pics respectivement (figure IV.18.1). En utilisant les masses de ces composés, on a pu déterminer la structure probable de **six** flavonoïdes glycosylés des deux extraits.

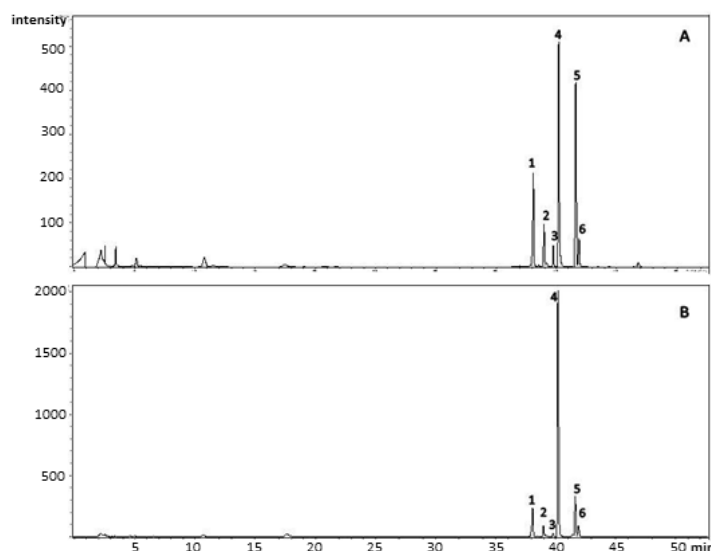


Figure IV.18.1: PDA-HPLC chromatogrammes à partir de l'analyse LC-MS d'EUS (A) et EHA (B) des parties aérienne de *L. reflexa* Desf.

Tableau IV.20: LC-MS détermination du EUS et EHA

pic	R_t (min)^a	R_t (min)^b	[M-H]⁻	MS²	Identification
1	38.0	38.1	621	313	pectolarine

2	38.9	39.0	663	313	Isolariniine A
3	39.7	39.8	663	313	Isolariniine B
4	40.1	40.2	663	313	linariine
5	41.6	41.7	705.3	663.2, 313	3''-acétyl linariine *
6	41.8	41.9	705	675.2, 313, 283	2''-acétyl linariine *

*détermination provisoire, ^aEUS, ^bEHA

Les flavones déterminées 1-4 sont connus dans le genre *Linaria* et même pour leurs activités importantes [11, 19-20]. Les deux autres composés (5 et 6) sont des dérivés de la linariine (4) avec un groupement acétyle de plus.

Composé 1 (LR MS1pectolarine) : ($t_R=38$ min) avec un pic $[M-H]^-$ à $m/z=621$ et un ion de fragmentation à $m/z=313$ correspond à la perte de 308 Da attribuable à une rutinose (glucose + rhamnose) et le reste attribué à la partie aglycone qui le pectolarigénine. Ce composé est connu sous le nom pectolarine (déjà isolé et identifié).

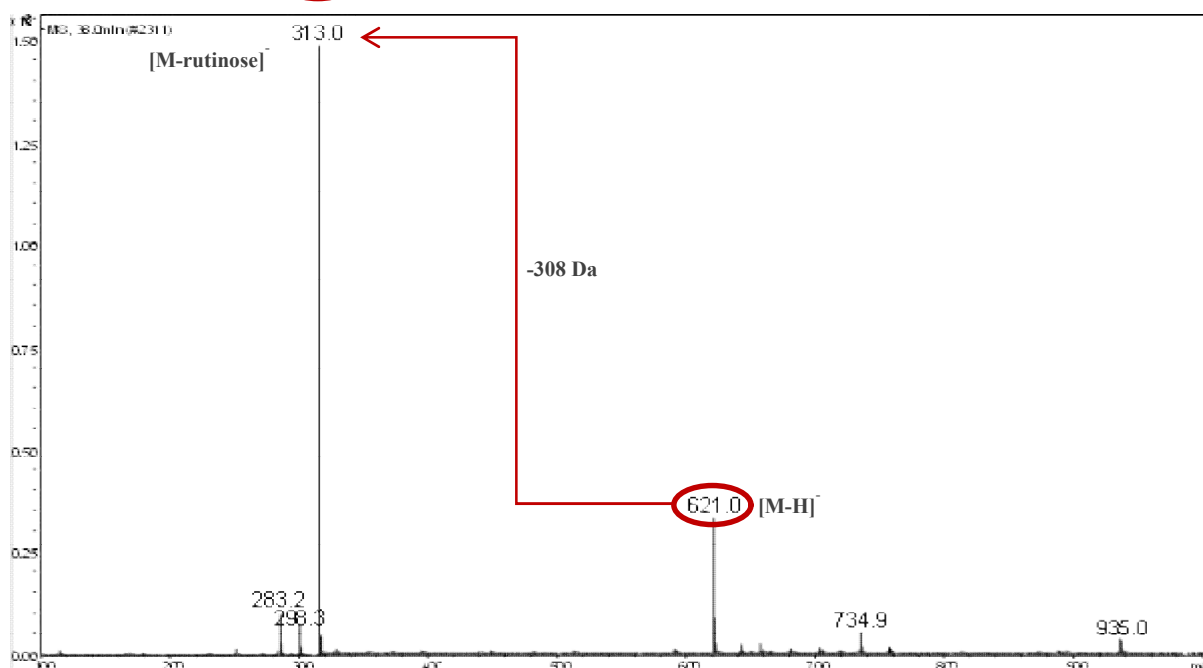
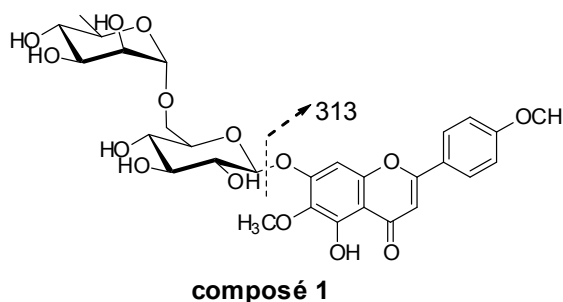


Figure IV.18.2: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 1



Composé 2 (LR MS2isolinariin A) : ($t_R=38.9$ min) un pic $[M-H]^-$ à $m/z=663$ avec deux ions de fragmentations, le premier à $m/z=603.1$ avec la perte de 60 Da attribuable à une fragmentation dans l'unité du rhamnosyle interprétée à la coupure de OH-CH-CH-OH (C-3''' et C-4''') $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ et le second à $m/z=313$ avec la perte d'un groupement rutinosyle acétylé à partir de $[M-H]^-$ (-350 Da), ce pic est attribué à pectolarigenine. Donc notre composé est un dérivé du composé 1 avec en plus un groupement acétyle dans le groupement du rhamnosyle sur le C-2'''.

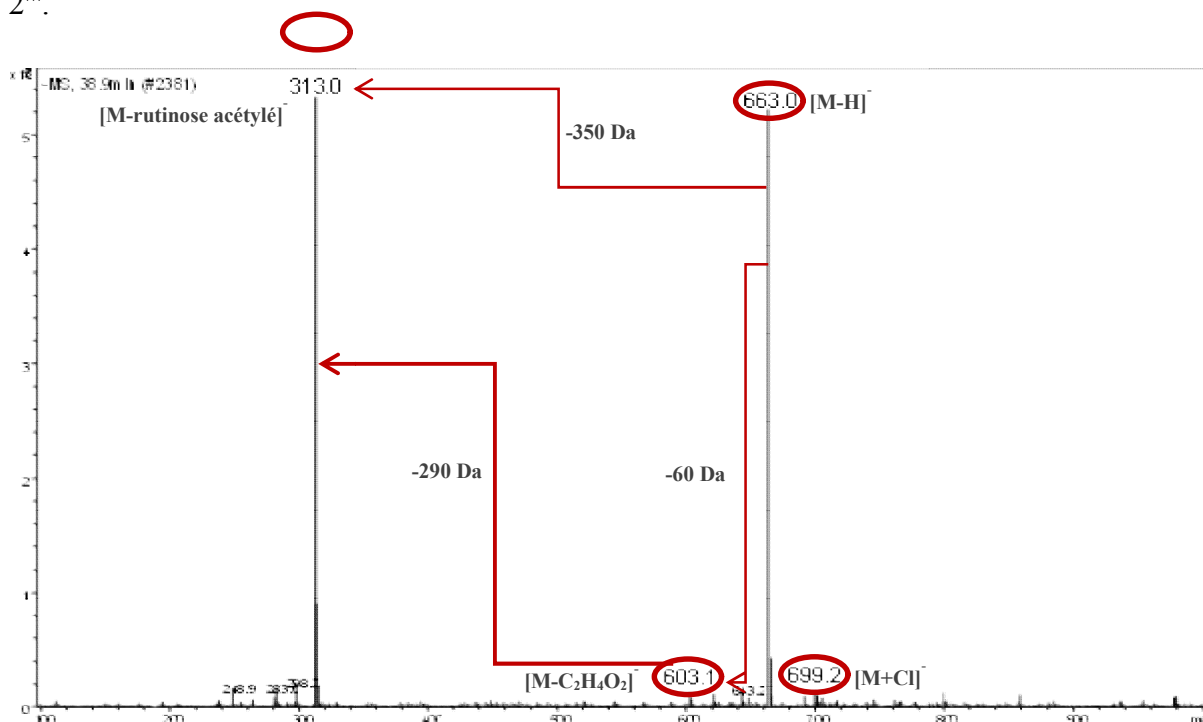
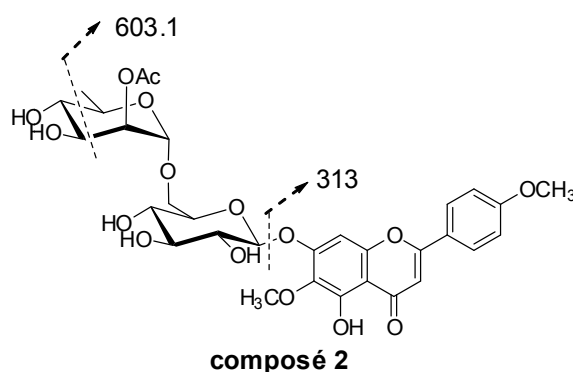


Figure IV.18.3: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 2



Composé 3 (LR MS3isolinariineB) : ($t_R=39.7$ min) le pic $[M-H]^-$ à $m/z=663$ avec un ion de fragmentation à $m/z=313$ correspond à une coupure du rutinosyle acétylé $[M-H-350]^-$, ce composé est similaire au composé 2 avec une différence de la position du groupement acétyle, donc ce composé est l'isolinariine B.

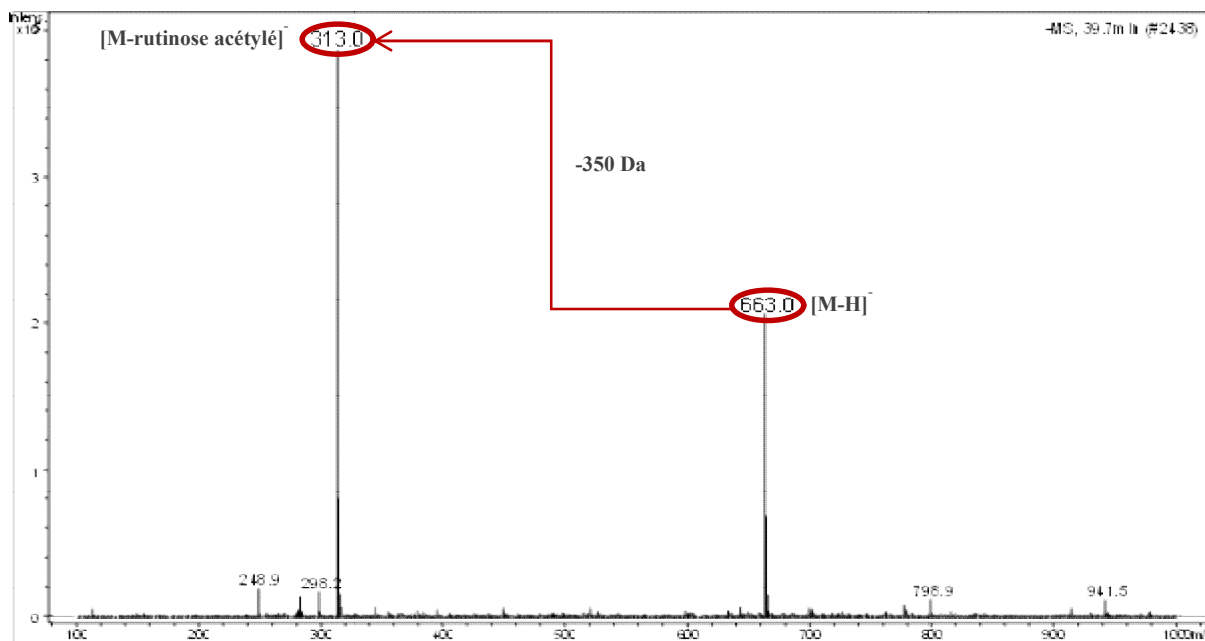
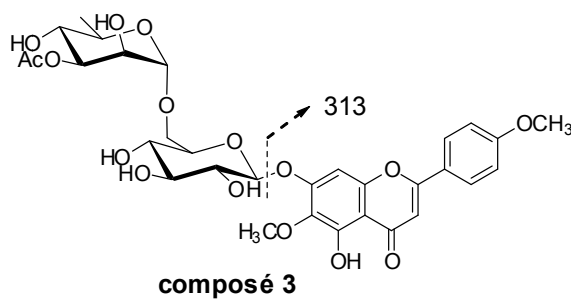


Figure IV.18.4: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 3

Composé 4(LR MS4 linariine): ($t_R=40.1$ min) il a la même masse que les composés **2** et **3**, mais la différence c'est le rendement de ce composé, c'est le produit majoritaire de cette espèce et dans la partie d'isolement, on a isolé ce produit et ce dernier a été identifié comme linariine et cela est confirmé par le pic $[M-H]^-$ à $m/z = 663$ et l'ion de fragmentation à $m/z = 313$ pour la partie aglycone.

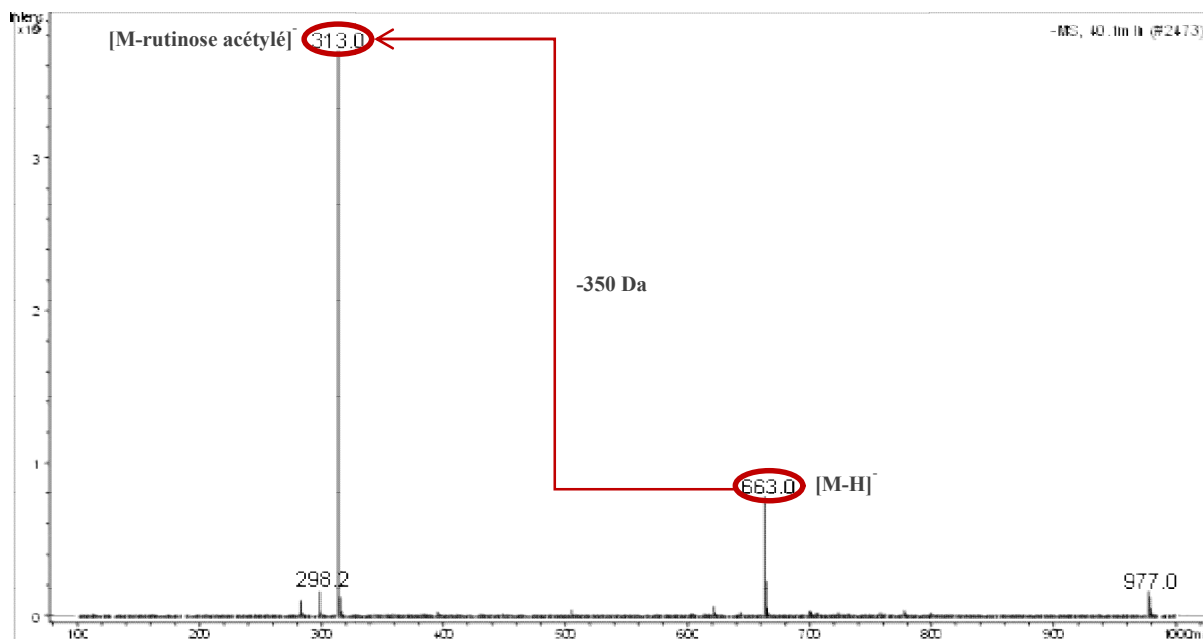
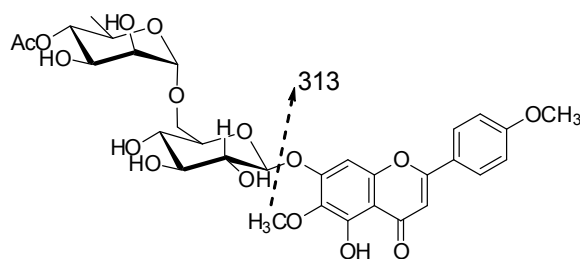


Figure IV.18.5: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 4



composé 4

Composé 5 (LR MS⁵³-acétylé linariine): ($t_R=41.6$ min) avec un pic $[M-H]^-$ à $m/z = 705.3$ et deux ions de fragmentation à $m/z = 663.2$ et $m/z = 313$, cela confirme que ce composé est un dérivé du composé 4 mais la différence entre le pic à $m/z = 705.3$ et le pic du composé 4 (663) est de 42 Da attribuable à une molécule cétène, donc on peut dire que le composé 5 est un dérivé avec deux groupements acétylé sur l'unité du rhamnose (C-3'', C-4'').

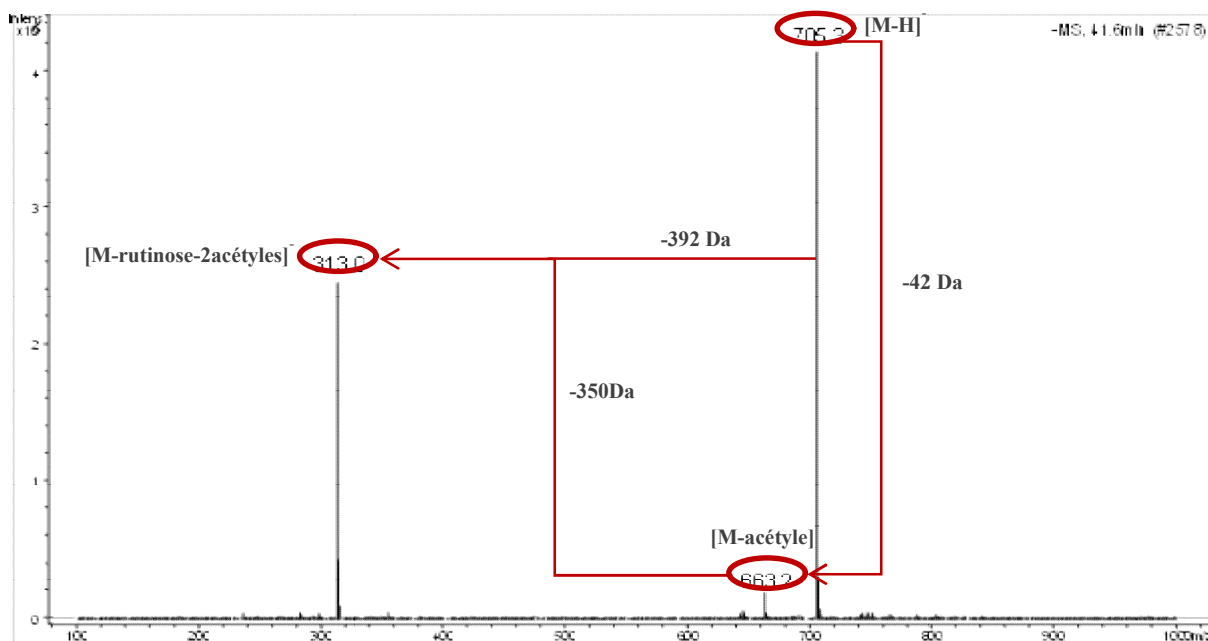


Figure IV.18.6: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 5

Composé 6 (LR MS62^{'''}-acétyle linariine): ($t_R=41.8$ min) la même masse que le composé 5 avec l'absence du pic 663 Da indiquant ainsi qu'on n'a pas de groupement acétyle en position C-4^{'''}, donc on peut dire que les deux groupements acétyles sont sur les carbones C-2^{'''} et C-3^{'''}.

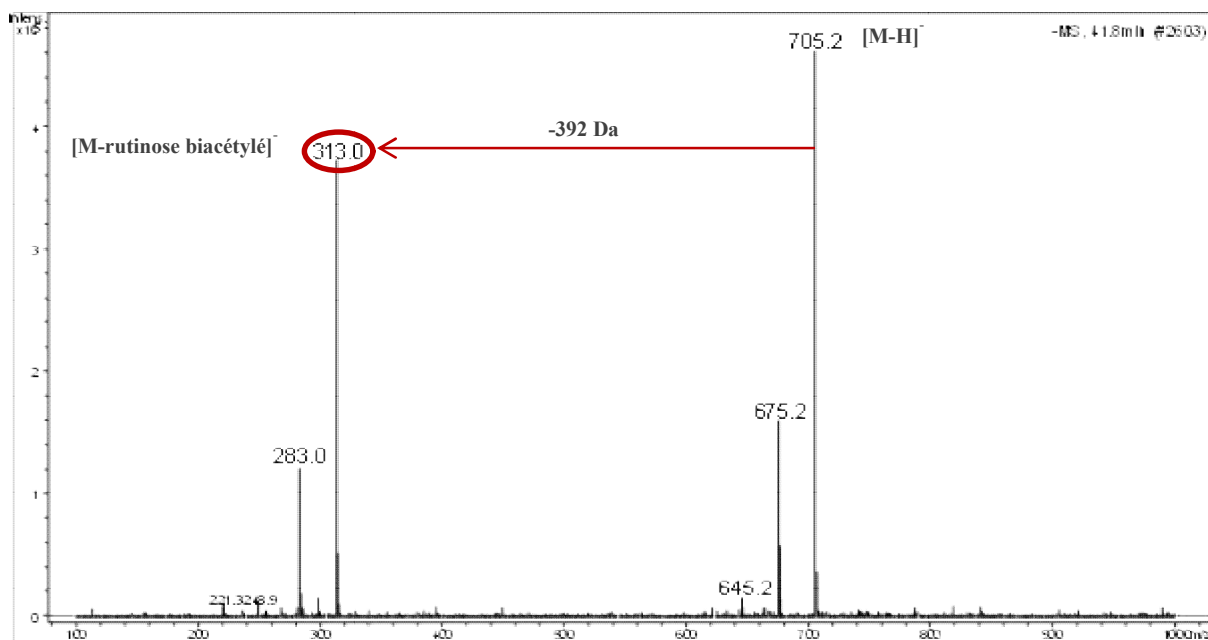


Figure IV.18.7: spectre de masse ESI/MS (-) du pic 6

2.9.3. Résultats des activités biologiques :

2.9.3.1. L'activité antidiabétique(*in vivo*):

Effets des extraits aqueux et méthanolique de *L.reflexa* sur la glycémie

L'effet des différentes doses des extraits aqueux et méthanolique de *L. reflexa* sur la glycémie des rats diabétiques est présenté dans le tableau IV.21.

Les résultats montrent que dans le groupe diabétique non traité, les taux du glucose sont significativement plus élevés que celui du groupe contrôle sain. Une baisse dans le niveau du glucose du sang a été observée après le traitement des rats diabétiques pour l'extrait aqueux que l'extrait méthanolique de *L. reflexa* et aussi dans le groupe traité avec le médicament de référence, la glibenclamide. Le traitement par l'extrait méthanolique à la dose de 300 mg/kg p.c. a montré une baisse très nette de la glycémie de - 72.09%, cette baisse est non significative par rapport au médicament de référence (- 63.29%).

On note aussi que dans le groupe diabétique non traité, les taux du glucose sont significativement plus élevés que celui du groupe contrôle sain. L'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux et méthanolique est dose dépendant. A 300 mg/kg, le maximum effet hypoglycémiant est trouvé de 72.09% et 69.89% chez les rats traités par les extraits méthanolique et aqueux, respectivement. Tandis que, le médicament de référence à 5 mg/kg (glibenclamide) a réduit la glycémie de 63.29%. La variation du potentiel hypoglycémiant de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux pourrait être expliquée par une différence quantitative et/ou qualitative de molécules contenues dans chaque extrait. Ceci peut aussi nous conduire à présumer que l'extraction par le méthanol semble une méthode judicieuse pour avoir des substances douer d'un pouvoir hypoglycémiant.

Ces résultats montrent la grande efficacité de *L. reflexa* dans la diminution du taux de glucose sanguin, ce qui confirme que cette plante médicinale peut être considérée comme un agent dans le traitement du diabète. Cette activité pourrait être attribuée à la présence de flavonoïdes dans l'extrait de la plante connu pour leurs activités antidiabétiques. Il est bien admis que ces molécules bioactives stimulent et régénèrent les cellules β du pancréas qui secrète l'insuline hormone hypoglycémiant [21].

Tableau IV.21: évaluation antidiabétique *In vivo*: Variation du niveau du glucose dans le sang, après administration orale d'EUS et l'EHA de *L. reflexa* pendant 15 jours

groupes	Dose (mg/kg)	Glucose du sang (moyenne ± SD) (mg/dL) Nombre de jours										% diminution de glycémie
		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14				
CS	-	89.20 ± 1.02	88.00 ± 1.58	92.20 ± 1.79	85.20 ± 1.92	102.20 ± 1.48	89.00 ± 1.58	86.00 ± 2.00	< ± 1			
DNT	-	350.80 ± 3.77 ^a	401.60 ± 3.36 ^b	445.80 ± 4.02 ^a	454.80 ± 3.96 ^a	473.80 ± 2.68 ^a	472.80 ± 4.44 ^a	585.40 ± 3.58 ^a	(+) 66.87			
DTM	5	375.40 ± 2.70 ^b	308.20 ± 2.39 ^b	279.40 ± 2.41 ^b	183.80 ± 2.59 ^b	169.20 ± 1.30 ^b	168.60 ± 1.14 ^b	137.80 ± 1.92 ^b	(-) 63.29			
DTEA	100	276.60 ± 2.70 ^b	266.80 ± 2.50 ^b	249.00 ± 1.58 ^b	238.40 ± 1.34 ^b	210.40 ± 2.70 ^b	190.20 ± 1.70 ^b	183.60 ± 1.50 ^b	(-) 33.62			
	200	348.40 ± 1.24 ^b	291.40 ± 1.67 ^b	250.80 ± 1.64 ^b	236.20 ± 1.30 ^b	220.20 ± 1.33 ^b	160.40 ± 1.82 ^b	128.00 ± 2.17 ^b	(-) 63.26			
	300	370.00 ± 1.08 ^b	216.00 ± 2.55 ^b	156.60 ± 1.52 ^b	130.00 ± 1.85 ^b	121.20 ± 2.32 ^b	115.80 ± 2.05 ^b	111.40 ± 2.51 ^b	(-) 69.89			
DTEM	100	380.20 ± 2.97 ^b	361.60 ± 2.41 ^b	256.40 ± 2.39 ^b	197.80 ± 1.48 ^b	167.00 ± 1.55 ^b	138.40 ± 2.30 ^b	119.00 ± 1.52 ^b	(-) 69.70			
	200	370.00 ± 1.24 ^b	289.80 ± 1.36 ^b	270.40 ± 1.25 ^b	180.40 ± 1.05 ^b	158.40 ± 1.48 ^b	132.00 ± 1.35 ^b	107.80 ± 2.77 ^b	(-) 70.86			
	300	381.60 ± 1.44 ^b	204.00 ± 2.01 ^b	187.20 ± 1.70 ^b	160.50 ± 1.80 ^b	124.70 ± 2.02 ^b	107.30 ± 1.90 ^b	106.50 ± 1.40 ^b	(-) 72.09			

^a p < 0,001 Lorsque le lot des sains est comparé au lot diabétique contrôle. ^b p < 0,001 Lorsque les différents groupes diabétiques traités sont comparés au groupe diabétique contrôle.

 Effets des extraits aqueux et méthanolique de *L.reflexa* sur le poids

Les résultats présentés dans le tableau IV.22 montrent des changements dans le poids corporel des rats diabétiques et normaux.

Tableau IV.22 : Effet de l'extrait aqueux et méthanolique de *L. reflexa* sur les poids corporels.

groupes	Dose (mg/kg)	Poids corporel (g)			
		Nombre de jours			
		1	5	10	15
CS	-	130.90 ± 2.63	135.64 ± 2.40	138.24 ± 1.70	146.34 ± 1.85
DNT	-	152.12 ± 2.96	147.28 ± 2.33	134.92 ± 2.56	130.48 ± 3.20
DTM	5	148.83 ± 1.32	140.40 ± 1.63	143.06 ± 2.05	147.08 ± 1.80
DTEA	100	145.20 ± 1.73	138.58 ± 1.14	142.26 ± 2.51	148.29 ± 1.33
	200	141.20 ± 2.84	136.84 ± 2.10	137.60 ± 1.90	140.80 ± 2.30
	300	136.20 ± 1.90	132.73 ± 2.23	134.75 ± 2.20	137.30 ± 1.99
DTEM	100	137.70 ± 1.65	135.33 ± 1.89	135.90 ± 1.42	139.20 ± 2.75
	200	154.04 ± 2.45	151.80 ± 1.89	153.10 ± 1.79	158.50 ± 1.10
	300	158.50 ± 1.50	155.25 ± 2.24	157.80 ± 2.84	162.57 ± 1.82

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 5 rats)

Dans ces conditions expérimentales, on a enregistré un déficit pondéral chez les rats diabétiques non traités suite à l'injection de l'Alloxane. Cet effet peut être dû au manque d'insuline qui conduit à la dégradation des lipides et des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids corporel[21]. Par ailleurs, le groupe contrôle sain a subi durant toute la période expérimentale une augmentation régulière du poids, liée à la croissance des animaux.

L'administration orale de l'extrait méthanolique de *L. reflexa* a induit une augmentation remarquable du poids par rapport aux rats diabétiques non traités surtout chez le lot traité par la dose 300 mg/kg de p.c. Un rétablissement dans le poids est aussi observé dans le groupe diabétique traité avec le médicament.

Effets de des extraits aqueux et méthanolique de *L.reflexa* sur les paramètres biochimiques

Le tableau IV.23 montre les résultats obtenus des différents paramètres biochimiques dosés après le sacrifice des rats.

Tableau IV.23 : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats

paramètres	groupes										
	CS	DNT	DTM	DTEA100	DTEA200	DTEA300	DTEM100	DTEM200	DTEM300		
Glucose (mg/dl)	100.00 ± 1.53	441.00±4.22	140.20±3.29	139.75±2.22	130.60±1.20	124.00±0.94	118.40±1.00	115.30±0.66	110.00±0.20		
Cholestérol (g/l)	0.56 ± 0.10	0.67±0.25	0.55±0.14	0.46±0.10	0.39±0.16	0.40±0.12	0.60±0.08	0.48±0.12	0.60±0.42		
Triglycérides (g/l)	0.43±0.10	0.57±0.25	0.46±0.14	0.33±0.22	0.33±0.17	0.40±0.18	0.47±0.03	0.56±0.01	0.50±0.02		
Lipides totaux (g/l)	2.36±0.46	8.83±1.75	3.25±0.53	1.76±1.12	1.81±1.34	1.78±0.5	1.50±0.49	1.35±0.28	1.05±0.14		
LDL (g/l)	0.50±0.10	0.61±0.12	0.52±0.16	0.44±0.04	0.33±0.13	0.39±0.12	0.47±0.08	0.33±0.20	0.32±0.06		
HDL (g/l)	0.30±0.12	0.45±0.07	0.43±0.03	0.35±0.10	0.38±0.16	0.33±0.14	0.45±0.12	0.42±0.20	0.32±0.05		
Protéines totales (mg/l)	60.40±0.54	86.00±0.71	82.00±0.16	77.00±0.18	73.00±0.25	69.67±0.01	67.75±0.41	66.8±0.14	65.20±0.38		
TGO (UI/l)	136.40±0.24	158.00±0.31	147.00±0.55	120.00±0.07	140.40±0.13	110.67±0.09	121.20±0.48	121.60±0.20	120.00±0.22		
TGP (UI/l)	42.00±0.55	47.33±0.45	44.33±0.66	41.50±0.03	46.40±0.78	38.33±0.23	33.80±0.08	32.40±0.14	35.60±0.09		
Urée (g/l)	0.41±0.07	0.85±0.09	0.84±0.10	0.47±0.09	0.54±0.55	0.48±0.25	0.60±0.39	0.58±0.16	0.45±0.07		
Créatinine (mg/l)	6.14±0.10	8.40±0.19	7.83±0.27	7.15±0.19	7.20±0.50	7.53±0.08	7.56±0.12	7.52±0.17	6.26±0.13		

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 5 rats)

Les résultats obtenus révèlent aussi une augmentation de la concentration sérique du profil lipidique chez les rats diabétiques non traités. Cette augmentation peut s'expliquer par

la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux. L'administration orale des extraits aqueux et méthanol de *L. reflexa* aux différentes doses notamment l'extrait méthanol à la dose 300 mg/Kg de p.c. a diminué considérablement la cholestérolémie, la lipidémie et le taux sérique des triglycérides chez les rats diabétiques.

Nous avons constaté également chez le lot diabétique non traité une augmentation de la teneur sérique en urée et en créatinine considéré comme marqueurs significatifs du dysfonctionnement rénal. En revanche le taux sérique des protéines totales est diminué. Ceci est expliqué par le fait que les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration sérique de la créatinine et d'urée causée par le diabète a été déclinée après l'administration des extraits.

En ce qui concerne les paramètres enzymatiques, nous avons remarqué une augmentation de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le sérum des rats diabétiques non traités par rapport à celle du contrôle. Les transaminases sont présentes dans tous les tissus, comme le foie, les muscles du squelette et le cœur, mais leur concentration est plus élevée dans le foie. Leur augmentation dans le sérum reflète une toxicité hépatique par l'alloxane [22]. La diminution de l'activité des transaminases (TGO et TGP) chez les rats traités par l'extrait aqueux ou méthanolique de *L. reflexa*, est donc le signe d'une amélioration des fonctions hépatiques.

2.9.3.2. L'activité antioxydante (*in vitro*):

L'effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH est un radical libre stable largement utilisé pour tester la capacité des extraits à agir comme des scavengers des radicaux libres ou comme des donneurs d'hydrogène [23].

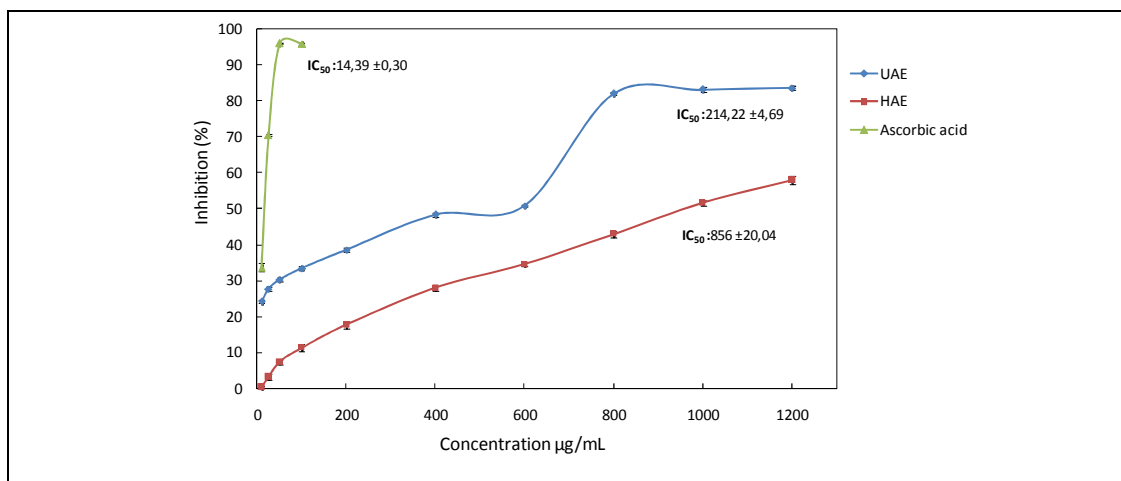


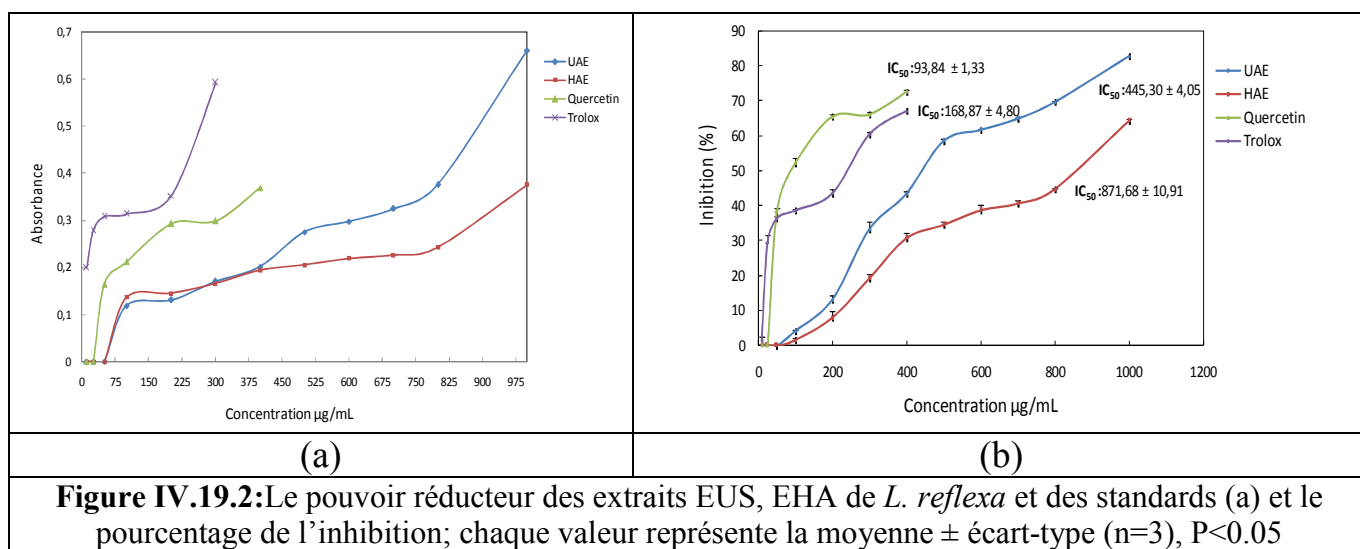
Figure IV.19.1: L'activité antioxydante des extraits EUS, EHA de *L. reflexa* et de standard vis-à-vis le DPPH. Le pourcentage de l'inhibition; chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type (n=3), P<0.05

La figure IV.19.1 montre que, d'une manière dépendante de la dose, les deux extraits EUS et EHA ont prouvé un effet scavenger significatif vis-à-vis au radical DPPH. Cette activité est plus prononcée dans le cas de l'extrait EUS à 1000 $\mu\text{g/ml}$. Les valeurs IC_{50} obtenues étaient dans l'ordre suivant : l'acide Ascorbique (14.39 $\mu\text{g/ml} \pm 0.30$) >EUS (214.22 $\mu\text{g/ml} \pm 4.69$) >EHA (856 $\mu\text{g/ml} \pm 20.04$).

L'effet scavenger du radical DPPH est attribué à la capacité donatrice d'hydrogène des polyphénols ou des iridoïdes fournis par la méthode d'extraction EUS. Cette activité serait influencée par le nombre et les positions d'hydroxyles [23].

L'activité du pouvoir réducteur

La capacité de réduction peut servir comme indicateur signifiant de l'activité antioxydante potentielle.



La présence des réducteurs (le taux élevé des polyphénols (23.35 %) dans l'extrait d'EUA a provoqué une conversion très importante (82.73 %) du Fe^{3+} / du complexe du cyanure ferrique utilisé dans cette méthode à la forme ferreuse comparativement à l'extrait EHA (64.33%) à la même concentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) (Figure IV.19.2b). Les valeurs d'absorbance élevées d'EUS, comme le présente la (Figure IV.19.2a) montrent que l'extrait d'EUS possède beaucoup plus de composés antioxydants; seulement, cet effet est moins prononcé comparativement aux références standard (quercétine, trolox). Les valeurs d' IC_{50} étaient dans l'ordre : quercétine (93.84 $\mu\text{g/ml} \pm 1.33$) >trolox (168.87 $\mu\text{g/ml} \pm 4.80$) >EUA (445.30 $\mu\text{g/ml} \pm 4.05$) >EHA (871.68 $\mu\text{g/ml} \pm 10.91$).

L'activité blanchissante du β -carotène

La peroxydation lipidique est considérée comme le mécanisme moléculaire principal impliqué dans des dommages oxydatifs dans la cellule et qui provoque la diminution de la fluidité des membranes et par conséquent dans la fonction des barrières membranaires. Le test de β -carotène blanchissant vise à mesurer la capacité des extraits d'EUS et d'EHA à inhiber l'oxydation du β -carotène dépendant des hydroperoxydes produits par l'acide linoléique. Le β -carotène est le système modèle qui subit une décoloration rapide en absence d'antioxydant.

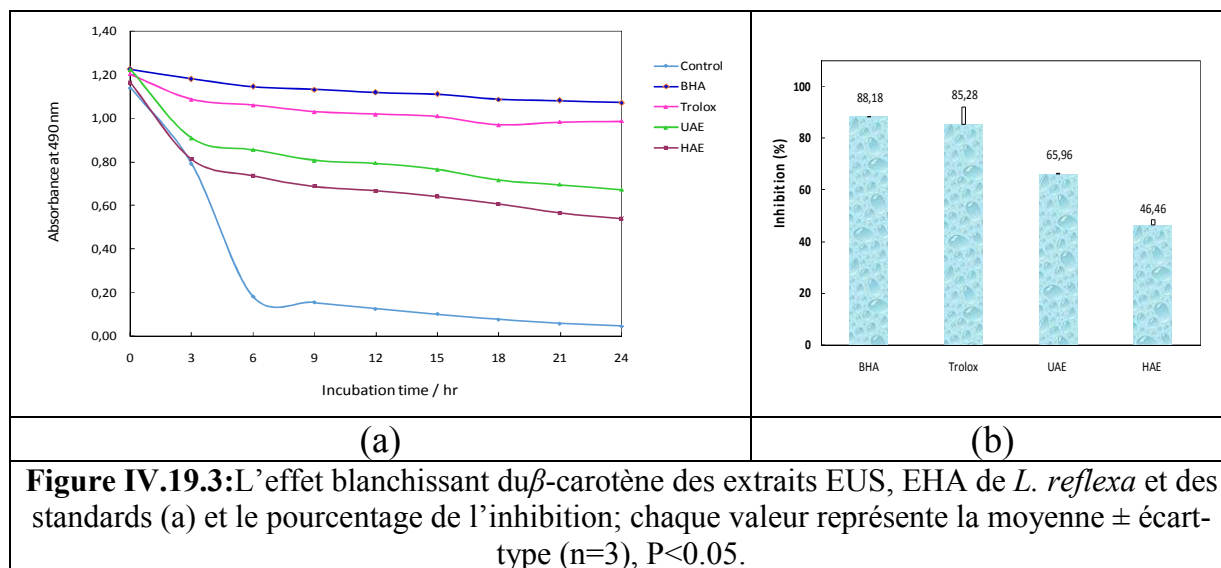


Figure IV.19.3: L'effet blanchissant du β -carotène des extraits EUS, EHA de *L. reflexa* et des standards (a) et le pourcentage de l'inhibition; chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type ($n=3$), $P<0.05$.

La présence des polyphénols dans l'extrait d'EAU est capable d'atténuer l'oxydation du β -carotène (Figure IV.19.3a) et peut minimiser l'auto-oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes [24]. Cet effet est moins prononcé par EHA (46.45 %), ce qui correspond à son faible taux en polyphénols comparativement à l'extrait EUS (65.96 %) et aux standards (85-88 %) (Figure IV.19.3b).

Cette étude décrit pour la première fois la capacité antioxydante de *L. reflexa*. Les résultats obtenus montrent que la réponse de chaque extrait est spécifique vis-à-vis les trois tests antioxydants étudiés. L'effet bénéfique avantageux de l'extrait UAE est associé principalement au taux des polyphénols (rendement d'extraction : 23.35 %) obtenu par la méthode d'extraction par ultrason et décrit par le profil LC-MS. Certains composés identifiés par le profil LC-MS sont dotés de diverses activités biologiques [19, 20]. Les différents systèmes de défense antioxydants sont complémentaires parce que chacun a un profil d'efficacité propice neutralisant les ROS.

L'activité antioxydante modérée des deux extraits, comparativement aux références BHA, trolox, quercétine et l'acide ascorbique peut être attribuée à la position d'hydroxyle

réactif du cycle aromatique C qui a la capacité de neutraliser le radical via le transfert d'un électron ou d'un hydrogène. Le groupement fonctionnel carboxyle et la liaison non saturée C=C adjacente fournissent un site supplémentaire permettant la trempe des ROS [23].

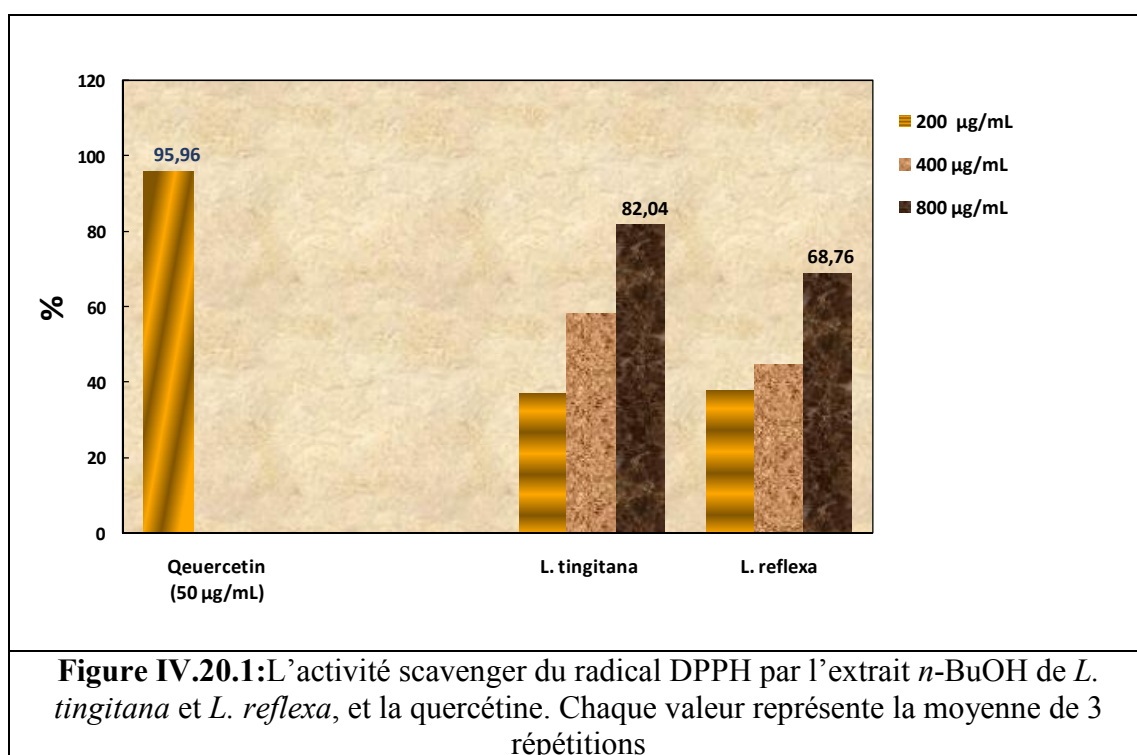
Les taux différents des polyphénols des deux extraits EUS et EHA peuvent refléter le comportement antioxydant des deux extraits; et l'effet qui pourrait être probablement dû à l'activité d'autres métabolites secondaires pas encore identifiées.

3. Études biologiques des deux espèces *L. tingitana* et *L. reflexa*

3.1. L'activité antioxydante (*in vitro*)

3.1.1. L'effet scavenger du radical DPPH

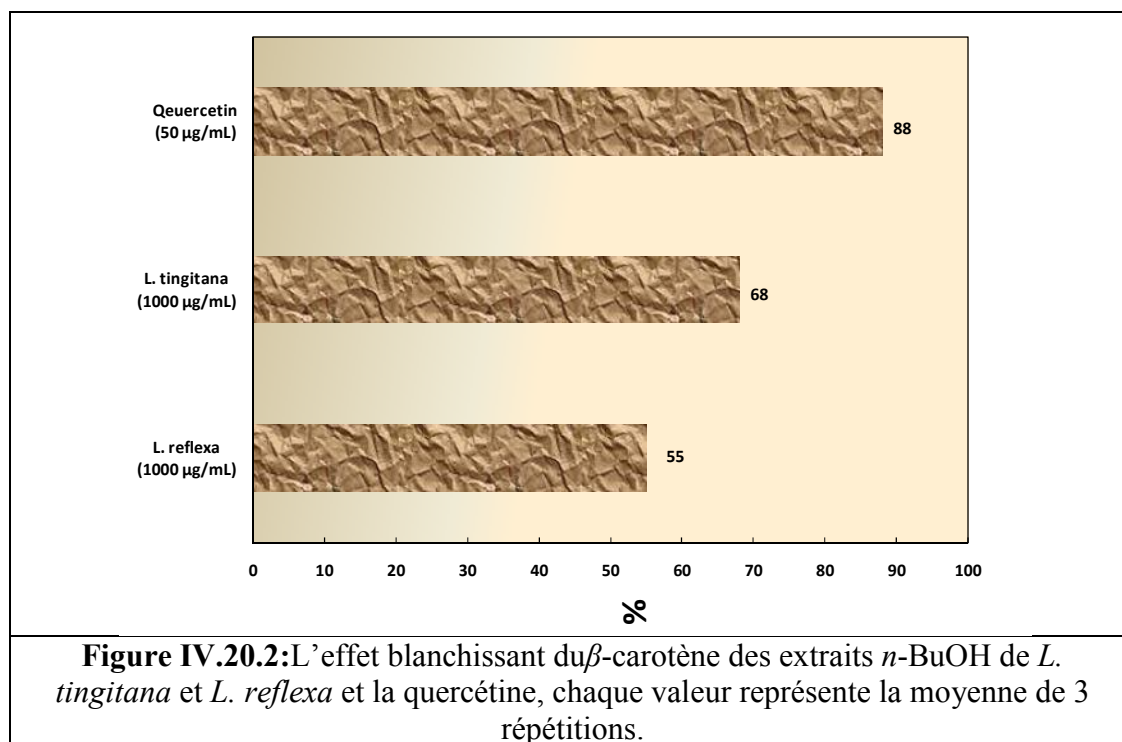
L'activité antioxydante des deux extraits de *L. tingitana* and *L. reflexa* vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Une relation dose-réponse a été observée concernant les deux extraits testés (Figure IV.20.1).



Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que les extraits de *L. tingitana* et *L. reflexa* possèdent une activité antioxydante. À 800 µg/ml, l'extrait de *L. tingitana* (82 %) était plus efficace comparativement à l'extrait de *L. reflexa* (68 %).

3.1.2. Le blanchissement du β -carotène

D'après les résultats mentionnés dans la figure IV.20.2, il est évident que les deux extraits *n*-butanol de *L. tingitana* et *L. reflexa* ainsi que le standard quercétine inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. A 1000 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition maximale de *L. reflexa* (55 %) est significativement inférieure à celle de *L. tingitana* (68 %) et celle de la quercétine (88 %).



Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes. Seulement, la présence des molécules antioxydantes aux niveaux des deux extraits *n*-butanol des deux espèces pourraient neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Figure IV.20.2).

3.2. L'activité antioxydante (*in vivo*): L'effet hépatoprotecteur des extraits *n*-butanols de *L. tingitana* et *L. reflexa*

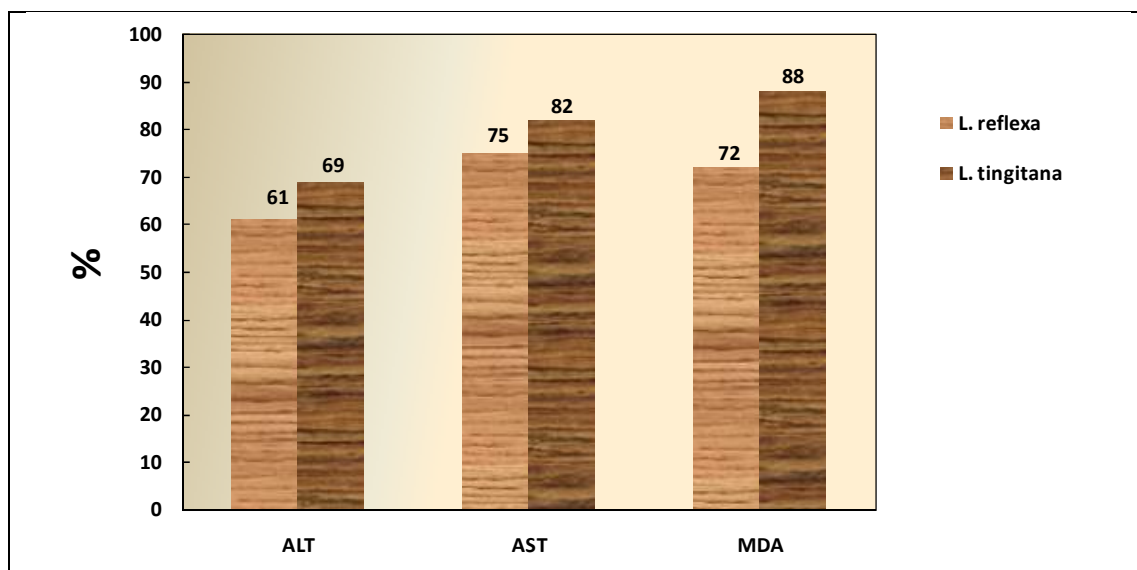


Figure IV.20.3: L'activité hépatoprotectrice de l'extrait *n*-butanol de *L. tingitana* et *L. reflexa*, Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions

L'étude *in vivo* a porté sur les activités hépatoprotectrices de *L. tingitana* et *L. reflexa* vis-à-vis la depakine. Ce médicament souvent utilisé comme anticonvulsivant [26] peut provoquer une toxicité hépatique chez les patients subissant un traitement chronique [27]. L'hépatotoxité induite par la depakine, chez les rats *Albino Wistar*, a été évaluée en dosant les activités des transaminases (ALT et AST). La fuite des transaminases est nettement réduite (61-69%), (75-82%) chez les groupes recevant (200 mg/Kg. ip. 14 jours) de l'extrait *n*-butanol de *L. tingitana* ou *L. reflexa* respectivement (Figure IV.20.3). Le stress oxydant exprimé en taux de MDA a été également réduit (72-88 %) (Figure IV.20.3). L'effet hépatoprotecteur de ces deux extraits dû à leurs pouvoirs antioxydant déjà confirmés par les résultats *in vitro*, serait probablement assurés par les polyphénols (notamment les flavonoïdes), les iridoïdes et les triterpènes.

3.3. L'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

L'utilisation des agents anti-inflammatoires peut être utile dans le traitement des troubles inflammatoires [28]. L'inhibition d'hypotonicité induisant la lyse membranaire des HRBC, synonyme de stabilisation des membranes HRBC, a été adoptée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire.

Le pourcentage de la stabilisation membranaire de l'extrait *n*-butanol des deux plantes *L. tingitana* et *L. reflexa* a été réalisé en utilisant les concentrations 300 µg/ml, 600 µg/ml et 900 µg/ml (Tableau IV.24). Les résultats obtenus révèlent que *L. tingitana* et *L. reflexa* ont prouvés une inhibition efficace vis-à-vis l'hémolyse des HRBC aux différentes concentrations

étudiées. Le Tableau montre clairement que l'hémolyse des membranes a diminué avec l'augmentation des concentrations des extraits. L'effet inhibiteur maximal de *L. tingitana* et *L. reflexa* à 900 µg/ml étaient 53.38 % et 65.52 % comparativement au diclofenac de sodium (82.56 %) à 300 µg/ml (TableauIV.24). L'activité anti-inflammatoire de *L. tingitana* et *L. reflexa* pourrait être due à la présence d'un profil chimique comprenant des flavones, des triterpénoïdes, des iridoïdes et des polyphénols. Notre étude confirme les données de la littérature citant que le genre *Linaria* (Scrophulariaceae) comme étant laxatives, spasmodiques, cholagogues et anti-inflammatoires [1, 29].

TableauIV.24.: L'activité anti-inflammatoire des extraits (%) *n*-butanol de *L. tingitana* et *L. reflexa*, et diclofenac. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions

Concentration µg/ml	<i>L. tingitana</i> (%)	<i>L. reflexa</i> (%)	Diclofenac (%)
300	38,96±2,38	40,3±1,23	82,56±0,86
600	46,68±1,66	55,2±1,9	
900	53,38±1,49	65,52±0,43	

3.4. L'activité antimicrobienne (*in vitro*)

Le potentiel antibactérien et antifongique des extraits ont été évalués en termes de zone d'inhibition de la croissance bactérienne. Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sont présentés dans le tableau IV.24.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des deux extraits éthère de pétrole (PE) et *n*-BuOH contre les souches bactériennes avec deux Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus sp.*), Une Gram négatif (*Escherichia coli*) et deux champignons (*Yarrowiasp.* et *Alternariasp.*) a montré que les deux extraits développent une activité assez bonne contre les souches à Gram positif, en particulier contre *Bacillus sp.*, (figure IV.22.1), mais aucune activité n'a été observée contre les souches de Gram négatif ou bien les champignons. Calce et ses collaborateurs [30] ont montré que, parmi les acides gras testés, les acides oléate et linoléate présentaient la meilleure activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*) par rapport aux bactéries à Gram négatif. Dans une autre étude, divers acides gras des espèces *Agaricus* n'ont montré aucune activité antibactérienne contre les bactéries de Gram négatif dans le teste de la concentration, toutefois, les bactéries Gram-positive ont été inhibées par ces extraits [31].

Table IV.25: L'activité antimicrobiennedes extraits PE &n-BuOH de*L. tingitana*

extraits	Diamètredela zone d'inhibition (mm)				
	Microorganismes				
	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>S. aureus</i> (Gram +)	<i>Bacillus sp.</i> (Gram +)	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Yarrowia sp.</i>
PE	0	9	10	0	0
<i>n</i> -BuOH	0	1	6	0	0

**Figure IV.21:**zone d'inhibition de PE et*n*-BuOH contre*Bacillus sp.*

Dans une étude comparative entre les extraits des deux espèces :*L. tingitana*(*LT* : EP, CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) et *L. reflexa* (*LR* : EP, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH et MeOH) sur l'activité antimicrobienne, en utilisant deux souches bactériennes, deux fongiques et deux moisissures. Les résultats montrent que les deux espèces ne sont pas actives pour l'activité antimicrobienne.

Table IV.26: L'activité antimicrobienne des extraits de *L. tingitana* et *L. reflexa*

Es.	extraits	Diameter of zone of inhibition (mm)			
		Microorganisms			
		<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Yarrowia sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>LT</i>	PE	++ (6)	- (0)	+ (1)	- (0)
	CHCl ₃	- (0)	+ (4)	- (0)	- (0)
	AcOEt	+ (4)	- (0)	- (0)	- (0)
	<i>n</i> -BuOH	+ (4)	- (0)	+ (6)	+ (4)
<i>LR</i>	EP	- (0)	+ (1)	+ (6)	+ (6)
	CHCl ₃	- (0)	+ (1)	- (0)	- (0)
	AcOEt	+ (1)	- (0)	+ (4)	+ (4)
	<i>n</i> -BuOH	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
	MeOH	- (0)	- (0)	+ (1)	+ (6)

3.5.Docking de flavones de *L. reflexa*

Avant to commencer les calculs, on a validé le système re-docking l'original ligand,cela donneune énergie à -8.8 Kcal/mol. Les résultats de nos produits sont comme suit

pectolarigenine E= -8.0 Kcal/mol, linariine E= -8.5 Kcal/mol et pectolarine E= -8.3 Kcal/mol. La figure suivante présente l'emplacement des flavones dans 3HO2.

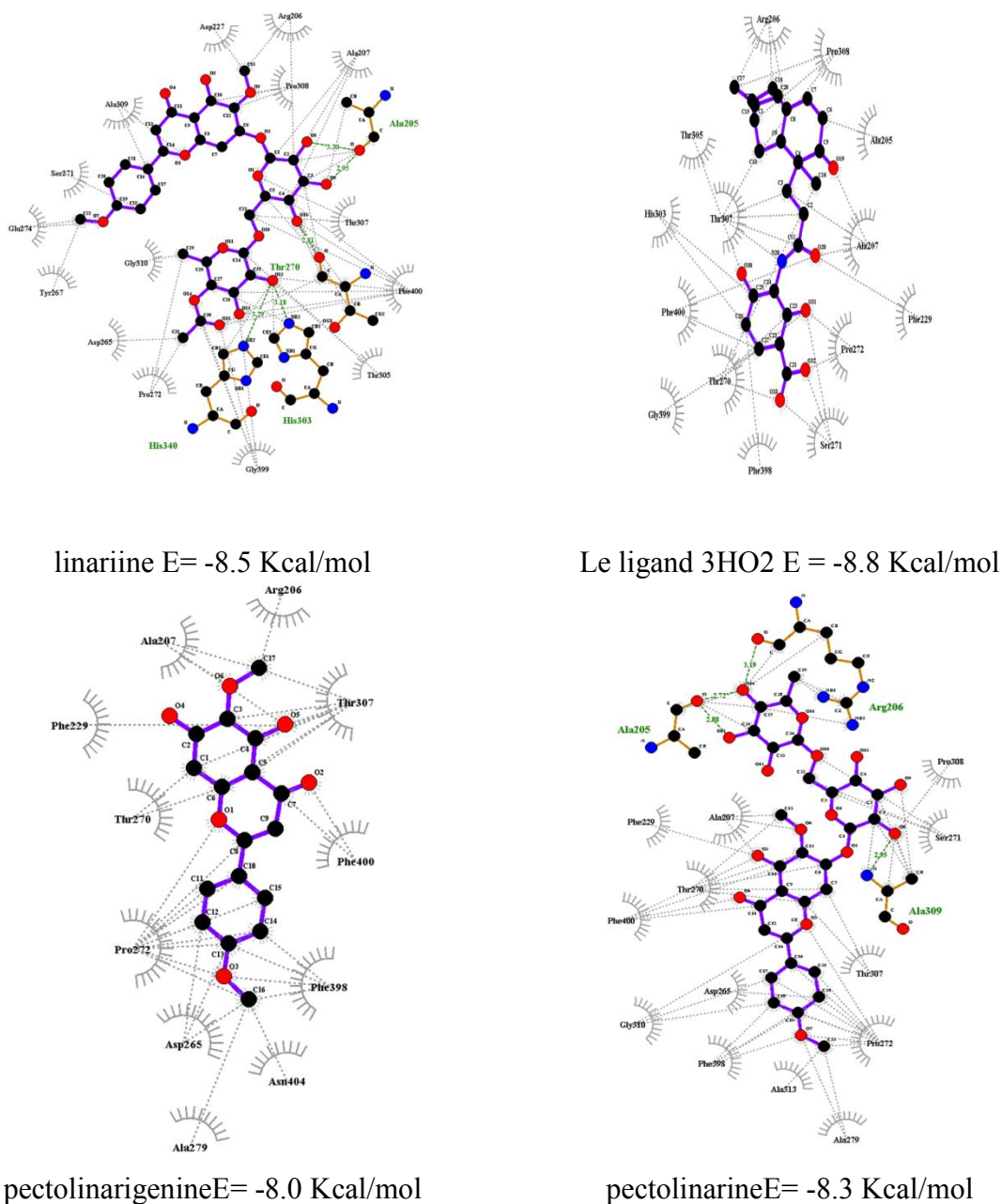


Figure IV.22: les résultats de docking pour les flavones de *L. reflexa*

Conclusion :

Cette partie renferme les résultats de la partie phytochimique avec l'identification structurale de 22 produits isolés et détectés de deux espèces *L. tingitana* et *L. reflexa* et la partie biologique avec les résultats des tests obtenus pour les extraits étudiés. Des bons résultats sont observés pour les tests antioxydant, antidiabétique et anti-inflammatoire reliés à la

composition chimique de ces extraits. Ces résultats présentent la nouveauté de l'activité antidiabétique pour le genre *Linaria*.

Références bibliographiques

- [1] Dilek EM, Koray S, Del Olmo E, San Feliciano A. Chemical Constituents of *Linaria aucheri*. *Turk. J. Chem.* **2004**. 28:133–139.
- [2] Prakash Chaturvedula VS, Prakash I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Inter. Curre. Pharma. J.* **2012**, 1: 239–242.
- [3] Wan Chun Peng. Constituents from charred *Cirsium japonicum*. *Chem. Nat. Comp.* **2011**. 47:279–280.
- [4] Rai NP, Adhikari BB, Paudel A, Masuda K, Mckelvey RD, Manandhar MD. Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *J. Nepal Chem. Soc.* **2006**. 21:486–547.
- [5] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. **1992**. 31:3307–3330.
- [6] Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Máthé I, Molnár J, Zupkó I. Antiproliferative Activity of *Artemisia asiatica* Extract and Its Constituents on Human Tumor Cell Lines. *Planta Med.* **2014**. 80:1692–1697.
- [7] Tundis R, Deguin B, Dodaro D, Statti GA, Tillequi F, Menichini F. Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.) Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). *Bioch. Sys. & eco.* **2008**. 36:142–145.
- [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, 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] Otsuka H. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry*. **1993**. 33:617–622.
- [11] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Statti GA, Deguin B, Tillequin F, Menichini F, Houghton PJ. Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat. Prod. Commun.* **2007**. 2:759–763.
- [12] Lahloub MF. Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J. Pharmac.Sci.* **1992**. 8:78–95.
- [13] Diaz MF, Gavin JA. Characterization by NMR of Ozonized methyl linoleate. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**. 18:513–518.
- [14] Sriphana U, Thongsri Y, Ardwichai P, Poopasit K, Prariyachatigul C, Simasathiansophon S, Yenjai C. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Fitoterapia*. **2013**. 91:39–43.
- [15] Hua H, Sun J, Li X. Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). *Chin. Trad. Herbal Drugs*. **1999**. 30:332–334.

- [16] Otsuka H.
Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J. Nat. Prod.* **1992**. 55:1252–1255.
- [17] Kouichi M, Takashi T, Isao K, Toshihiro F, Yuki Y, Kanji I.
New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.)Dum. *J. Nat. Med.* **2011**. 65:172–175.
- [18] Hua H, Li X, Xing SE, Pei YH.
Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin. Pharm. J.* **2005**. 40:653–656.
- [19] Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F.
Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15:4757–4760.
- [20] Lim H, Son KH, Chang HW, Bae K, Kang SS, Kim HP.
Anti-inflammatory Activity of Pectolinarigenin and Pectolinarin Isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Bio. Pharmac. Bull.* **2008**. 31:2063–2067.
- [21] Prabhakar P.K., Doble M. A.
Target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr. Diabetes Rev.* **2008**. 4:291–308.
- [22] El-Demerdash FM, Yousef MI, El-Naga NIA;
Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **2005**. 43: 57-63
- [23] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**. 20:933–956.
- [24] Markowicz Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN.
Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. **2007**. 12:423–432.
- [25] Ismail M, Mariod A, Bagalkotkara G, Ling HS.
Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of *Cantaloupe* extracted by supercritical fluid extraction. *Grasas Y Aceites*. **2010**. 61:37–44.
- [26] Hodges BM, Mazur JE.
Intravenous valproate in *status epilepticus*. *Ann. Pharmacol. Ther.* **2001**. 35:1465–1470.
- [27] König A, Siemens H, Bläker F, Boenigk E, Gross-Selbeck G, Hanefeld F.
Severe hepatotoxicity during valproate therapy: an update and report of eight new fatalities. *Epilepsia*. **1994**. 35:1005–1015.
- [28] Singh A, Malhotra S, Subban R.
Anti-inflammatory and analgesic agents from Indian medicinal plants. *Inter. J. of Integrative Bio.* **2008**. 3:57–72.
- [29] Handjieva NV, Ilieva EI, Spassov SL, Popov SS.
Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron*. **1993**, 49:9261–9266.
- [30] Calce E, Mignogna E, Bugatti V, Galdiero M, Vittoria V, De Luca S.
Pectin functionalized with natural fatty acids as antimicrobial agent. *Inter. J. Biol. Macromolecules*. **2014**. 68:28–32.
- [31] Öztürk M, Emin Duru M, Kivrak S, Mercan-Doğan N, Turkoglu A, Özler MA.
in vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem. Toxicol.* **2011**. 49:1353–1360.



Conclusion

Conclusion générale

Le but principal de ce travail est de déterminer la composition chimique et les effets biologiques des extraits des deux espèces du genre *Linaria* : *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. et *Linaria reflexa* Desf., appartenant à la flore algérienne.

Notre choix pour ces deux espèces est justifié par le fait que le genre *Linaria* est bien distribué en Algérie mais une seule investigation chimique sur l'espèce (*L. aegyptica*) est reportée en bibliographie ainsi que l'utilisation de *L. reflexa* dans la médecine traditionnelle et l'endémisme de *L. tingitana* pour l'Algérie et le Maroc.

Après extraction hydroalcoolique des parties aériennes des deux espèces et l'extraction ultrasonique pour *L. reflexa*, on procède à la concentration des extraits hydroalcoolique et leurs affrontements par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol successivement. Nous soumettons ensuite les divers extraits organiques obtenus aux différentes techniques de séparation notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice, de la phase inverse, des plaques préparatives de gel de silice et par HPLC. Les structures des produits isolés sont déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN1D (¹H et ¹³C) et 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY).

L'étude phytochimique menée sur *L. tingitana* Boiss. & Reut. a permis l'obtention et l'identification de 10 produits. Il s'agit de quatre triterpénoïdes, trois iridoïdes, deux flavonoïdes et un sucre :

- **LT C-7** : β -amyrine
- **LT C-9** : β -sitostérol
- **LT C-9-1** : stigmastérol
- **LT C19-4-1** : diosmétine
- **LT C22** : daucostérol
- **LT Ac10-1** : jacéosidine
- **LT B9-4-6-1** : 6-*O*-seneciolyantirrhinoside
- **LT B9-4-6-1'** : 6-*O*-angeloylantirrhinoside

➤ **LT B9-6-1B-6-4** : antirrhide

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

L'extrait éther de pétrole montre la présence de neuf méthyles ester détectés par GC-MS, et le profile LC-MS du *n*-butanol montre la présence de l'antirrhinoside.

L'investigation phytochimique de *Linaria reflexa* a mené à l'identification de **12** produits et l'établissement à l'heure actuelle de huit flavonoïdes, un iridoïde, un lignane et un acide gras :

- **LRM-1** : pectolarine
- **LR C1-1-1** : linoléate de méthyle
- **LR C4-3-1** : pinosésinol
- **LR C8-4-2** : pectolarigenine
- **LR Ac-1** : linariine
- **LR Ac 2-1** : apigénine
- **LR B-1** : mannitol
- **LR Me10-9-3** : antirrhide
- **LR MS3** : isolinariine A
- **LR MS4** : isolinariine B
- **LR MS5** : 3"-acétyl linariine
- **LR MS6** : 2"-acétyl linariine

Les résultats obtenus montrent que cette espèce est riche en composés phénoliques notamment les flavones glycosylés.

Les activités biologiques étudiées sur les extraits (antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique et antimicrobienne) montrent que les deux espèces ont une efficacité pour l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire mais l'activité antimicrobienne est non significative par rapport aux autres activités.

Résumé

Une recherche bibliographique sur le genre *Linaria* (Scrophulariaceae), un genre bien distribué en Algérie, montre qu'il n'a pas fait objet de beaucoup d'études, ce qui nous a encouragé à entreprendre cette étude portant sur l'investigation phytochimique de deux espèces dont la première, *L. tingitana* est endémique pour l'Algérie et le Maroc avec l'absence de documentation biologique et phytochimique, alors que la deuxième, *L. reflexa* est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle comme anti-cicatrisante. La séparation et la purification des extraits de *L. tingitana*, en utilisant différentes techniques chromatographiques ont permis l'isolement de dix produits et l'identification de leurs structures à l'aide des méthodes spectroscopiques : quatre triterpène (1 triterpène pentacyclique et 3 stéroles), quatre iridoïdes (1 détecté par LC-MS), deux flavones et un sucre. L'étude phytochimique de *L. reflexa* a permis la détection par LC-MS de six flavonoïdes glycosylés et l'isolement et l'identification de huit produits dans les quels 2 sont détecter par LC-MS: quatre flavones (2 glycosylés et 2 aglycones), un iridoïde, un lignane, un méthyle ester et un sucre. Les tests biologiques portant sur les activités : antioxydante (*in vivo* et *in vitro*), antidiabétique (*in vivo*), anti-inflammatoire et antimicrobienne (*in vitro*), ont montrés que les deux espèces présentent une activité antidiabétique et anti-inflammatoire remarquable.

Mots clés : *Linaria tingitana* Boiss. & Reut., *Linaria reflexa* Desf., étude phytochimique, *in vivo*, *in vitro*, antioxydante, antidiabétique, anti-inflammatoire, antimicrobienne.

Abstract

A bibliographic research on the genus *Linaria* (Scrophulariaceae), a genus well distributed in Algeria, shows that it has not used for much studies, which encouraged us to undertake this phytochemical investigation of two species which the first is an endemic one for Algeria and Morocco with the absence of biological and phytochemical literature data, whereas the second one is an used plant in traditional medicine for the treatment of certain skin diseases. The separation and purification of the extracts of *L. tingitana* with various chromatographic techniques, allowed the identification of ten products, and the identification of their structures using spectroscopic methods: four triterpenes (1 pentacyclic triterpene and 3 sterols), four iridoids (1 detected with LC-MS), two flavones and one sugar. The study of *Linaria reflexa* led the detection with LC-MS of six glycosylated flavonoids and the isolation and the identification of eight products in which 2 are detected by LC-MS: four flavones (2 glycosylated and 2 aglycones), one iridoid, one lignan, one methyl ester and one sugar. The biological tests on antioxidant (*in vivo* and *in vitro*), anti-diabetic (*in vivo*), anti-inflammatory and antimicrobial (*in vitro*) activities, showed that both plants have remarkable anti-diabetic and anti-inflammatory activities.

keywords: *Linaria tingitana* Boiss. & Reut., *Linaria reflexa* Desf., phytochemical study, *in vivo*, *in vitro*, antioxidant, anti-diabetic, anti-inflammatory, antimicrobial.

ملخص

البحث البليوغرافي على الجنس *Linaria* (Scrophulariaceae)، وهو جنس منتشر بشكل جيد في الجزائر، لم يكن موضوع بحث لعديد الدراسات و هذا ما شجعنا على تعهد هذه الدراسة المتعلقة بالدراسة الفيتوكيميائية لنبتين حيث الأولى هي نبتة مستوطنة في الجزائر والمغرب مع غياب بحوث بيولوجية و فيتوكيميائية، في حين الثانية هي نبتة تستخدم في الطب التقليدي كشفاء للجروح. فصل و تنقية لمستخلصات *L. tingitana* ، وذلك باستخدام تقنيات مختلفة الكروماتوغرافي، سمحت بعزل عشرة مركبات، و تحديد هيكلها بمساعدة الطرق الطيفية : أربع تربتيربين (1 تربتيربين خماسي الحلقات و 3 ستيرول) أربعة إيريدويد 1 كشف ب LC-MS، فلافونين و سكر. الدراسة الفيتوكيميائية ل *Linaria reflexa* مكنت من كشف عن طريق LC-MS ست فلافونات سكرية و عزل و تحديد ثمانية حيث أن إثنين عثر عليهما في طيف LC-MS: أربع فلافونات (2 تحتوي على سكر و 2 من دون سكر)، احادي تربين (iridoïde)، مركب بوليفينولي، ميثيل استر و سكر. الاختبارات البيولوجية على النشاطات المضاد للأكسدة (في الجسم الحي و في المختبر)، المضادة لمرض السكر (في الجسم الحي)، المضادة للالتهابات و مضادة للميكروبات (في المختبر) بينت أن النبتتين لهما فعالية ملحوظة في النشاطات المضادة لمرض السكر و الإلتهابات.

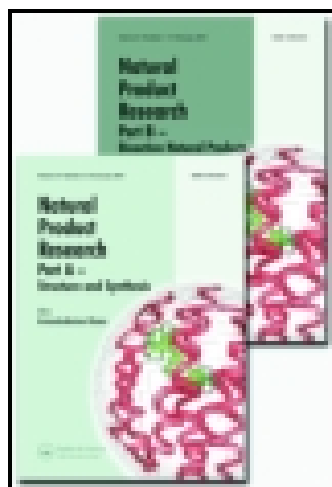
الكلمات المفتاحية: *Linaria reflexa* Desf., *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. , الدراسة الفيتو كيميائية, في الجسم الحي, في المختبر, المضاد للأكسدة, المضادة لمرض السكر, المضادة للالتهابات, مضادة للميكروبات.

This article was downloaded by: [cheriet thamere]

On: 18 February 2015, At: 10:34

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae)

Thamere Cheriet^a, Ines Mancini^b, Ramdane Seghiri^a, Fadila Benayache^a & Samir Benayache^a

^a Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie

^b Laboratorio di Chimica Bioorganica, Dipartimento di Fisica, Università di Trento, I-38123 Povo-Trento, Italy

Published online: 12 Feb 2015.



[Click for updates](#)

To cite this article: Thamere Cheriet, Ines Mancini, Ramdane Seghiri, Fadila Benayache & Samir Benayache (2015): Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae), *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, DOI: [10.1080/14786419.2014.999243](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.999243)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.999243>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms &

Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

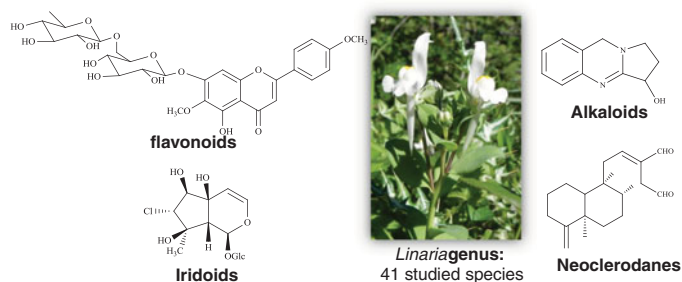
REVIEW

Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae)

Thamere Cheriet^{a*}, Ines Mancini^b, Ramdane Seghiri^a, Fadila Benayache^a and Samir Benayache^a

^aUnité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie; ^bLaboratorio di Chimica Bioorganica, Dipartimento di Fisica, Università di Trento, I-38123 Povo-Trento, Italy

(Received 14 October 2014; final version received 12 December 2014)



This is a review on 95 references dealing with the genus *Linaria* (Scrophularioideae-Antirrhineae tribe), a known genus of the Scrophulariaceae family, which comprises about 200 species mainly distributed in Europe, Asia and North Africa. The use of some *Linaria* species in folk medicine has attracted the attention for chemical and biological studies. This report is aimed to be a comprehensive overview on the isolated or identified known and often new metabolites from the 41 *Linaria* species so far cited. It is organised presenting first the phytochemical classes of alkaloids, polyphenols including flavonoids, the latter being quite diffused and mostly present as flavones, flavonols and their glycosides, and terpenoids including iridoids and steroids. Second, the results from biological investigation on plant extracts, pure natural products isolated from *Linaria* species and some synthetic derivatives are reported, with antitumour, anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory and analgesic, antioxidant and antibacterial activities.

Keywords: *Linaria* plants; Scrophulariaceae; phytochemical; biological activities

1. Introduction

The genus *Linaria* belongs to the Scrophularioideae-Antirrhineae tribe of the Scrophulariaceae family and comprises about 200 species (Handjieva et al. 1993), widely distributed throughout the northern hemisphere, mainly in the Mediterranean basin and Eastern Asia. Several *Linaria* species were used in folk medicine as tonics, anti-scorbutics, laxatives, anti-diabetics and

*Corresponding author. Email: tamercheriet@umc.edu.dz

diuretics, as well as for the treatment of wounds, haemorrhoids and vascular disorders (Pahlow 1979; Ercil et al. 2004). For years this genus was the source of many kinds of compounds including iridoids, flavonoids, diterpenoids, alkaloids and phenylethanoids. The reported pharmacological activities of both plant extracts and isolated natural compounds refer to anti-proliferative, cytotoxic, acetylcholinesterase (AChE) inhibition, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and diuretic effects. A substructure search, performed in the SciFinder database and other databases such as Science Direct, Springer Link, PubMed, Medline, Taylor & Francis, Scopus and mdpi, indicated that so far, 41 species have been cited. Some review articles have reported on the botanical and biological aspects of *Linaria* species and only one on the chemical aspect, confined to chemotaxonomy by nor-iridoids distribution of Italian species (Serafini et al. 2008). We report here a comprehensive overview on the isolated or identified compounds from *Linaria* species, organised according to phytochemical classes and their biological activities.

2. Phytochemicals

2.1. Alkaloids

If alkaloids are apparently not very common in *Linaria*, the tricyclic quinazoline compounds are the most known, represented by vasicine (peganine, **1**) isolated from many *Linaria* species such as *Linaria popovii* (Yunusov & Ismailov 1956), *Linaria vulgaris* (Men'shikov et al. 1959) and *Linaria genistifolia* (Groeger & John 1965). Three other analogues of vasicine (**1**) were identified in *Linaria*; they are vasicinone (**2**) isolated from *Linaria macroura* and *Linaria kurdica* (Plekhanova & Sheveleva 1965), 7-hydroxyvasicine (**3**) together with the new alkaloid named linarinic acid (1,2,3,9-tetrahydropyrrolo(2,1-*b*)quinazolin-1-carboxylic acid, **4**) from *L. vulgaris*. Analytical studies proved that *L. vulgaris* is the most common alkaloid source of the genus *Linaria* (Harkiss 1972), detecting the presence of choline (**5**) and the new 7-methyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[2,3-*c*]pyridine (linavuline, **6**) (Figure 1, Table 1).

2.2. Polyphenols

More than 8000 phenolic structures have been reported, widely dispersed throughout the plant kingdom (Strack 1997). This class includes compounds showing a series of molecular skeletons such as flavonoids, phenolic acids, coumarins and xanthenes. The genus *Linaria* contains some of these structures, especially phenolic acids and phenylethanoids.

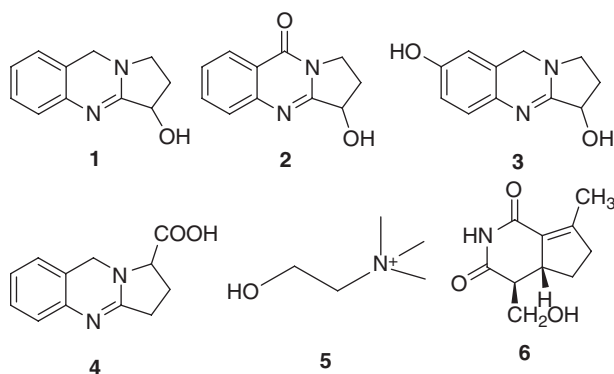


Figure 1. Alkaloids (**1–6**) isolated from *Linaria* species.

Table 1. Alkaloids from *Linaria* species.

Compound	Source	Reference
Vasicine (peganine, 1)	<i>L. popovii</i>	Yunusov and Ismailov (1956)
	<i>L. vulgaris</i>	Men'shikov et al. (1959)
	<i>L. genistifolia</i>	Groeger and Johne (1965)
	<i>L. purpurea</i>	
	<i>L. ventricosa</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. transiliensis</i>	Plekhanova and Sheveleva (1965)
	<i>L. vulgariformis</i>	
	<i>L. alpina</i>	Johne and Groeger (1968)
	<i>L. anticaria</i>	
	<i>L. avenaria</i>	
	<i>L. pseudo-laxiflora</i>	
	<i>L. repens</i>	
Vasicinone (2)	<i>L. triornithophora</i>	
	<i>L. verticillata</i>	
7-Hydroxyvasicine (3)	<i>L. macroura</i>	Plekhanova and Sheveleva (1965)
	<i>L. kurdica</i>	
Linarinic acid (4)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2002)
Choline (5)		Harkiss (1972)
Linavuline (6)		Hua et al. (1997)

2.2.1. Phenolic acids

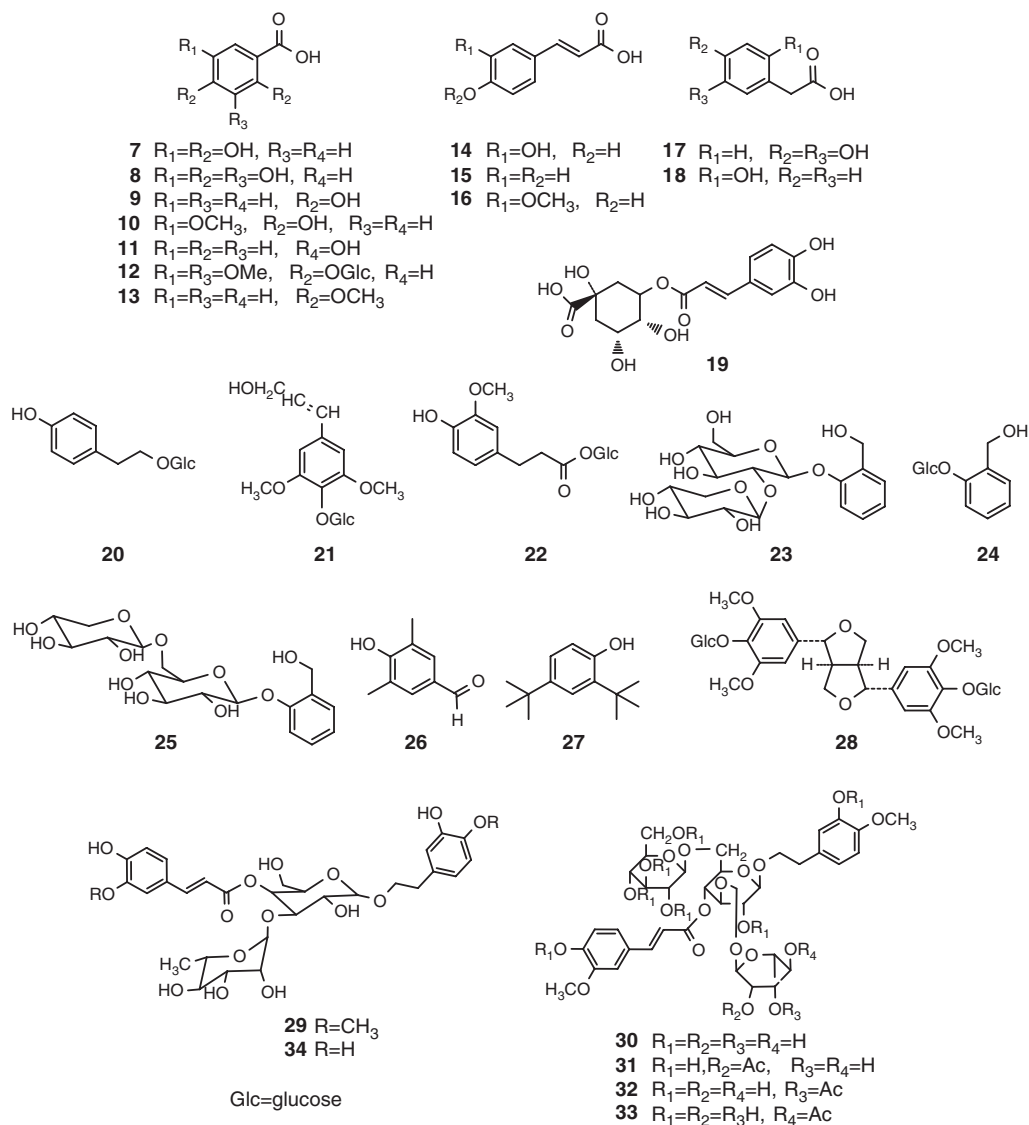
Phenolic acids are common in some *Linaria* species. From *L. vulgaris* were identified protocatechuic acid (**7**), gallic acid (**8**), *p*-hydroxybenzoic acid (**9**), vanillic acid (**10**) and salicylic acid (**11**) by reversed-phase HPLC analysis (Sokolowska-Wozniak et al. 2003), caffeic acid (**14**), *p*-coumaric acid (**15**), ferulic acid (**16**), homoprotocatechuic acid (**17**), *O*-hydroxyphenylacetic acid (**18**), gluco-syringic acid (**12**) (Hua et al. 2002, 2005) and *p*-methoxybenzoic acid (**13**) (Hua et al. 2005). The known chlorogenic acid (**19**) was isolated from *L. macroura* (Degot et al. 1983), (Figure 2, Table 2).

2.2.2. Phenolic glycosides

Phenolic glycosides were not commonly isolated from this genus, but are known in some *Linaria* species such as *Linaria japonica* producing salidroside (**20**), syringine (**21**) and β -D-glucopyranose-1-ferulate (**22**) (Otsuka 1993a), *L. vulgaris* containing benzyl alcohol β -D-(2'-*O*- β -xylopyranosyl)-glucopyranoside (**23**), benzyl alcohol *O*- β -D-glucopyranoside (**24**), benzyl alcohol *O*- β -D-primveroside (**25**), 3,5-dimethyl-4-hydroxy benzaldehyde (**26**), 2,4-ditert butyl phenol (**27**) and liriiodendrin (**28**) (Hua et al. 2005). Several phenylethanoids have been also identified in *L. japonica*, including martynoside (**29**), the first reported glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) martynoside (**30**) and three new related uranoside A (**31**), uranoside B (**32**), uranoside C (**33**) (Otsuka 1993b). The phenylpropanoid glycoside acetoside (verbascoside, **34**) similar to martynoside (**29**) was described in *Linaria haelava* (Lahloub 1992) (Figure 2, Table 2).

2.2.3. Flavonoids

Flavonoids are present in significant levels in the genus *Linaria* (Smirnova, Boryaev, et al. 1974; Otsuka 1992; Kouichi et al. 2011), being mostly identified as flavones, flavonols and their glycosides.

Figure 2. Phenolic acids (7–19) and phenolic glycosides (20–34) from *Linaria* species.

2.2.3.1. *Flavone and flavonol glycosides* (Figure 3, Table 3). Flavone *O*-glycosides are commonly present in *Linaria*. In particular, flavone 7-rutinosides (where rutinose is the disaccharide 6-*O*- α -L-rhamnosyl-D-glucose) are specific for this genus and include scutellarein-4',6-dimethoxy-7-*O*- β -D-rutinoside known as pectolinarin (**35**), first described about one century ago from *L. vulgaris* (Klobb 1907) with the 6-demethoxyl analogue named linarin (**36**). Other acetylated pectolinarin derivatives were identified in *Linaria* species such as liniarin (4'-*O*-acetylpectolinarin, **37**) isolated for the first time from *L. japonica* and *L. vulgaris* (Morita et al. 1974). From *L. japonica*, Otsuka (1992) described the isolation of two new **37** analogues, named isolinariin A (2'''-*O*-acetylpectolinarin, **38**) and isolinariin B (3'''-*O*-acetylpectolinarin, **39**). 4'-Methoxy-7-*O*- β -D-rutinoside (diosmin, **40**) was reported from two *Linaria* species (Degot et al. 1983; Lahloub 1992). It is noteworthy that glycoside flavones **35**–**37** are the most known flavonoids in *Linaria* sp., whereas genkwanin-4'-*O*-rutinoside (**41**) is the only 4'-*O*-rutinoside

Table 2. Polyphenols from *Linaria* species.

Compound	Source	Reference
Protocatechuic acid (7)	<i>L. vulgaris</i>	Sokolowska-Wozniak et al. (2003)
Gallic acid (8)		
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (9)		
Vanillic acid (10)		
Salicylic acid (11)		
Gluco-syringic acid (12)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2002, 2005)
<i>p</i> -Methoxybenzoic acid (13)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)
Caffeic acid (14)	<i>L. macrourea</i>	Degot et al. (1983)
	<i>L. vulgaris</i>	Sokolowska-Wozniak et al. (2003) Kelemen and Scedo (2003)
<i>p</i> -Coumaric acid (15)	<i>L. vulgaris</i>	Sokolowska-Wozniak et al. (2003) Kelemen and Scedo (2003)
Ferulic acid (16)	<i>L. vulgaris</i>	Sokolowska-Wozniak et al. (2003)
Homoprotocatechuic acid (17)		
<i>O</i> -hydroxyphenylacetic acid (18)		
Chlorogenic acid (19)	<i>L. macrourea</i>	Degot et al. (1983)
Salidoside (20)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
Syringine (21)		
β -D-Glucopyranose-1-ferulate (22)		
Benzyl alcohol β -D-(2'- <i>O</i> - β -xylopyranosyl)-glucopyranoside (23)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)
Benzyl alcohol <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (24)		
Benzyl alcohol <i>O</i> - β -D-primveroside (25)		
3,5-Dimethyl-4-hydroxy benzaldehyde (26)		
2,4-Ditert butyl phenol (27)		
Liriodendrin (28)		Hua et al. (2002, 2005)
Martynoside (29)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993b)
Glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) martynoside (30)		
Uranoside A (31)		
Uranoside B (32)		
Uranoside C (33)		
Acetoside (34)	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)

flavone described in *Linaria*, by the isolation from *Linaria canadensis* (Kouichi et al. 2011). Belonging to flavone 7-glycoside class, there are metabolites such as apigenin-7-*O*- β -D-glucoside (42), the two luteolin (43)-derivatives 7-*O*-glucoside (44) obtained from *L. macrourea* (Degot et al. 1983) and 7-*O*-glucuronide (45) from *L. canadensis* (Kouichi et al. 2011), together with 4'-methoxy-7-*O*- β -D-glucoside (diosmetin-7-*O*- β -D-glucoside, 46) isolated from *L. macrourea* (Degot et al. 1983), one acetin (47)-derivative named 7-*O*- β -D-glucopyranoside (48) reported from a study of *L. kurdica* (Smirnova, Boryaev, et al. 1974) and a pectolinarigenin (49) related compound named linarioside (scutellarein-4',6-dimethoxy-7-*O*- β -D-glucopyranoside, 50) first isolated from *L. sessilis* (Smirnova, Zapesochayaya, et al. 1974). Glycoside flavonols are not common in *Linaria*. Only quercetin-7-*O*-rutinoside (51) has so far been reported from *L. canadensis* (Kouichi et al. 2011).

2.2.3.2. *Flavone and flavonol aglycones* (Figure 3, Table 3). Most of flavones isolated from *Linaria* present the scutellarein methyl ether skeleton. In detail, they include pectolinarigenin (49) and hispidulin (52) (Hua et al. 1999), scutellarein-4'-methyl ether (5,6,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone, 53) the latter reported as a new flavone isolated from *Linaria aeruginea* (Harborne & Valdes 1971) and ladanein (54) from *Linaria aegyptiaca*, first described from the Scrophulariaceae family (Ferhat et al. 2010). Apigenin (55) and its 4'-methyl ether acetin (47)

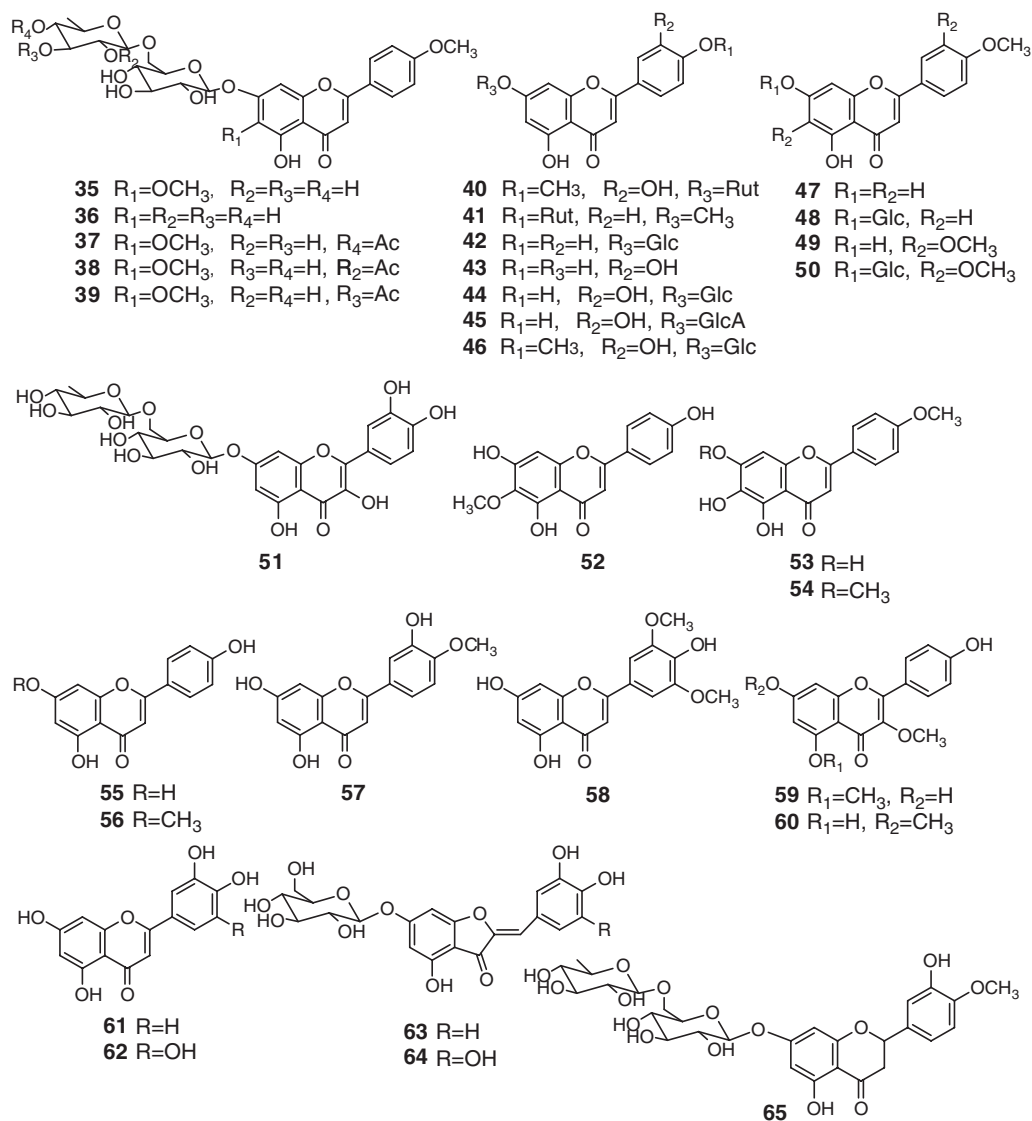


Figure 3. Common glycoside flavonoids (**35–50**), quercetin-7-*O*-rutinoside (**51**), flavone and flavonol products (**52–62**), aurones (**63, 64**) and flavanone (**65**) from *Linaria* species.

are common in *Linaria*, while the 7-methyl ether analogue genkwanin (**56**) has been found only in *L. canadensis* (Kouichi et al. 2011). Luteolin (**43**) and its 4'-methyl ether derivative diosmetin (**57**) were commonly found in some *Linaria* species such as *L. vulgaris* (Hua et al. 1999). Only one flavone bearing two methoxyl groups was described in *L. vulgaris* and named chrysin (4',5,7-trihydroxy-3',5'-bimethoxyflavone, **58**) (Hua et al. 2005). Four flavonols have so far been found in *Linaria*. They include the new kaempferol derivative 3,5-di-*O*-methylkaempferol (**59**) and the analogue 3,7-di-*O*-methylkaempferol (**60**) reported in *Linaria dalmatica* (Kapoor et al. 1985). Quercetin (**61**) was present in *L. vulgaris* (Pethes et al. 1974) and *L. macrourea* (Degot et al. 1983). Myricetin (3',4',5',5,7-pentahydroxyflavonol, **62**) was identified in *L. macrourea* (Degot et al. 1983).

Table 3. Flavonoids from *Linaria* species.

Compound	Source	Reference
Pectolinarin (35)	<i>L. vulgaris</i>	Klobb (1907), Kuptsova and Ban'kovskii (1970), Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Hua et al. (1999)
	<i>L. vulgariformis</i>	Kuptsova and Ban'kovskii (1970)
	<i>L. popovii</i>	
	<i>L. japonica</i>	Mun et al. (1979) and Otsuka (1992)
	<i>L. kurdica</i>	Kuptsova and Ban'kovskii (1970) and Smirnova, Boryaev, et al. (1974)
	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)
	<i>L. simplex</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992)
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. sp.</i>	
Linarin (36)	<i>L. reflexa</i>	Tundis et al. (2005) and Cheriet et al. (2014)
	<i>L. vulgaris</i>	Klobb (1907), Wagner et al. (1969) and Smirnova, Boryaev, et al. (1974)
Linarin (36)	<i>L. japonica</i>	Takahashi et al. (1973) and Otsuka (1992)
	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)
	<i>L. kurdica</i>	Aydogdu et al. (2010)
	<i>L. vulgaris</i>	Morita et al. (1974)
	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1992)
Linarin (37)	<i>L. aucheri</i>	Ercil et al. (2004)
	<i>L. reflexa</i>	Tundis et al. (2005) and Cheriet et al. (2014)
	<i>L. kurdica</i>	Aydogdu et al. (2010)
	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1992)
	<i>L. aucheri</i>	Ercil et al. (2004)
Isolinarin A (38)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1992)
Isolinarin B (39)	<i>L. reflexa</i>	Tundis et al. (2005)
Diosmin (40)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)
Genkwanin-4'-O-rutinoside (41)	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Apigenin-7-O-β-D-glucoside (42)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
Luteolin (43)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (1999)
	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Luteolin 7-O-glucoside (44)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Luteolin-7-O-glucuronide (45)	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Diosmetin-7-O-β-D-glucoside (46)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
Acacetin (47)	<i>L. aeruginea</i>	Harborne and Valdes (1971)
	<i>L. kurdica</i>	Smirnova, Boryaev, et al. (1974)
	<i>L. macroura</i>	Pethes et al. (1974)
	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (1999)
Acacetin-7-O-β-D-glucopyranoside (48)	<i>L. kurdica</i>	Smirnova, Boryaev, et al. (1974)
Pectolinarigenin (49)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (1999)
	<i>L. reflexa</i>	Cheriet et al. (2014)
Linaroside (50)	<i>L. kurdica</i>	Smirnova, Boryaev, et al. (1974)
	<i>L. sessilis</i>	Smirnova, Zapesochnaya, et al. (1974)
	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Quercetin-7-O-rutinoside (51)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (1999)
Hispidulin (52)	<i>L. aeruginea</i>	Harborne and Valdes (1971)
Scutellarein-4'-methyl ether (53)	<i>L. aegyptiaca</i>	Ferhat et al. (2010)
Ladanein (54)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
Apigenin (55)	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
	<i>L. reflexa</i>	Cheriet et al. (2014)

(Continued)

Table 3. (Continued)

Compound	Source	Reference
Genkwanin (56)	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Diosmetin (57)	<i>L. macroua</i>	Degot et al. (1983)
	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (1999)
	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
Chrysin (58)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)
3,5-Di- <i>O</i> -methylkaempferol (59)	<i>L. dalmatica</i>	Kapoor et al. (1985)
3,7-Di- <i>O</i> -methylkaempferol (60)		
Quercetin (61)	<i>L. vulgaris</i>	Pethes et al. (1974)
	<i>L. macroua</i>	Degot et al. (1983)
Myricetin (62)	<i>L. macroua</i>	Degot et al. (1983)
Aureusin (63)	<i>L. maroccana</i>	Harborne (1966)
Bracteatin 6-glucoside (64)		
Hesperidin (65)	<i>L. vulgaris</i>	Guan et al. (2009)

2.2.3.3. *Aurones and flavanones* (Figure 3, Table 3). Flavonoids bearing aurone structure (a benzofuran linked in 2-position at a benzylidene unit) named aureusin (anreusidin 6-glucoside, 63) and bracteatin 6-glucoside (64) were isolated from *Linaria maroccana* (Harborne 1966), along with hesperidin (65), the only flavanone identified by HPLC in *L. vulgaris* subsp. *sinensis* (Bebeaux) Hong (Guan et al. 2009).

2.3. Terpenoids

As an extensive group of natural products, very abundant in the plant kingdom, terpenoids are common products in *Linaria*. Most of them are iridoids, with some neo-clerodane diterpene and triterpene structures.

2.3.1. Iridoids

Iridoids and their glycoside derivatives are chemotaxonomic markers of the family Scrophulariaceae, to which the genus *Linaria* belongs. Antirrhinoside (66) and related compounds are the chemical feature for the genera of the Scrophularioideae-Antirrhineae tribe, including *Linaria*, *Antirrhinum*, *Asarina*, *Kickxia*, *Cymbalaria* and *Maurandia* (Kooiman 1970; Nicoletti et al. 1988; Serafini et al. 2004). The most frequent iridoids are 6-acyl antirrhinoside and 5-deoxyantirrhinoside derivatives.

Antirrhinoside (66, Figure 4 and Table 4), first isolated from *L. vulgaris* (Sticher 1971), is widely distributed in *Linaria*. Its new derivatives 6-*O*-*trans*-*p*-coumaroylantirrhinoside (67) and 6-*O*-*cis*-*p*-coumaroylantirrhinoside (68) have been reported from *L. vulgaris* (Ilieva, Khandzheva, et al. 1992; Ilieva et al. 1993), along with 66 and procumbide (69), the latter first isolated from plants belonging to the family Scrophulariaceae. 5-*O*-Glucosylantirrhinoside (70) was identified in six *Linaria* species together with the new 5-*O*-allosylantirrhinoside (71) (Ilieva et al. 1993). 6-*O*-Seneciolyantirrhinoside (72), 6-*O*-angeloylantirrhinoside (73) and two new 68-derivatives were identified in *Linaria clementei* (Marco 1985). Additional antirrhinoside-like metabolites include the 5-dehydroxyl analogue named 5-deoxyantirrhinoside (74), reported only from *Linaria arcusangeli* and *Linaria flava* (Bianco, Guiso, Martino, et al. 1996; Bianco, Guiso, Mazzel, et al. 1996) and genistifolin (6-*O*-acetylantirrhinoside, 75) isolated from *L. genistifolia* (Ilieva, Handjjeva & Popov 1992). Only three antirrhinoside derivatives with an acyl residue at C-6 position in the glucose unit were reported. They are the new 6'-*O*-acetylantirrhinoside (76) from *L. flava* subsp. *sardoa* (Bianco, Guiso, Mazzel, et al. 1996), 6'-*O*-seneciolyantirrhinoside (77) and 6'-*O*-angeloylantirrhinoside (78) from *Linaria capraria* (Bianco et al. 2004). A new

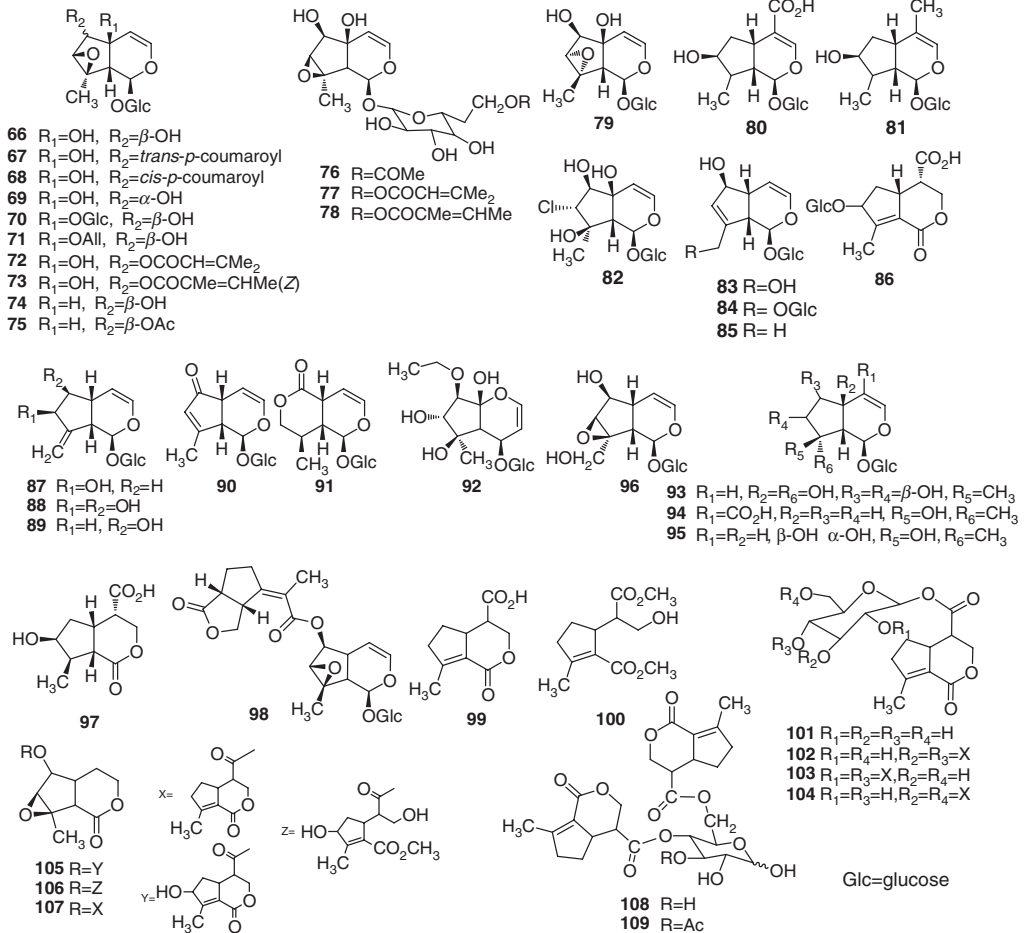


Figure 4. Antirrhinoside (66) and other iridoids (67–109) from *Linaria* species.

iridoid isolated from *L. dalmatica* named 7,8-*epi*-antirrhinoside (79, Figure 4) was described to be the first iridoid glucoside with an α -orientation of the 7,8-epoxide ring (Ilieva, Handjieva, et al. 1992). Two new iridoids named 8-*epi*-loganin acid (80, Figure 4) and 7- β -hydroxy-8-*epi*-iridodial glucoside (81) were isolated from *Linaria cymbalaria* (Bianco et al. 1982). Due to the unusual presence of halide atoms in the structures of plant metabolites, the finding of linarioside (82) is peculiar, first reported from *L. japonica* (Kitagawa et al. 1972) and later detected in many other *Linaria* species, including *L. dalmatica*, *Linaria simplex*, *Linaria pelisseriana*, *Linaria* sp., *L. genistifolia* (Ilieva, Handjieva, et al. 1992; Ilieva, Handjieva & Popov 1992), *L. arcusangeli* and *L. flava* (Bianco, Guiso, Martino, et al. 1996), *L. vulgaris* (Hua et al. 2005) and *L. aegyptiaca* (Ferhat et al. 2010). This rare chlorinated iridoid glycoside seems to be a good chemotaxonomic marker of *Linaria*.

Iridoids based on aucubin structure have also been identified in *Linaria* sp. Aucubin (83, Figure 4, Table 4) itself was present in *L. vulgaris* (Esposito & Scarpati 1970) and *L. macrourea* (Degot et al. 1983), 10-*O*- β -glucosylaucubin (84) was identified in *L. vulgaris* (Esposito & Scarpati 1970; Guiso et al. 2007) and *Linaria purpurea* (Bianco, Guiso, Procaccio, et al. 1997) and linaride (10-deoxyaucubin, 85) was first isolated from *Linaria muralis* (Bianco et al. 1977).

Table 4. Iridoids from *Linaria* species.

Compound	Source	Reference
Antirrhinoid (66)	<i>L. vulgaris</i>	Sticher (1971), Ilieva, Handjieva, et al. (1992), Ilieva, Khandzheva, et al. (1992), Ilieva, Handjieva and Popov (1992), Ilieva et al. (1993), Otsuka (1994a), Guiso et al. (2007), Beninger et al. (2009) and Jamieson and Bowers (2010)
	<i>L. japonica</i>	Kitagawa et al. (1973) Otsuka (1993a)
	<i>L. clementi</i>	Marco (1985)
	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)
	<i>L. genistifolia</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Ilieva et al. (1993)
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. cymbalaria</i>	
	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996)
	<i>L. flava</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. purpurea</i>	Bianco, Guiso, Procaccio, et al. (1997)
	<i>L. capraria</i>	Bianco et al. (2004)
	<i>L. aucheri</i>	Ercil et al. (2004)
	<i>L. reflexa</i>	Tundis et al. (2005)
	<i>L. multicaulis</i>	Tundis et al. (2008)
	<i>L. heterophylla</i>	Tekaya-Karoui et al. (2008)
	<i>L. aegyptiaca</i>	Ferhat et al. (2010)
	<i>L. kurdica</i>	Aydogdu et al. (2010)
<i>L. vulgaris</i>	Ilieva, Khandzheva, et al. (1992) and Ilieva et al. (1993)	
6- <i>O</i> - <i>trans-p</i> -coumaroylantirrhinoid (67)		
6- <i>O</i> - <i>cis-p</i> -coumaroylantirrhinoid (68)		
Procumbide (69)	<i>L. vulgaris</i>	Ilieva, Khandzheva, et al. (1992)
5- <i>O</i> -Glucosylantirrhinoid (70)	<i>L. haelava</i>	Lahloub (1992)
	<i>L. vulgaris</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Ilieva et al. (1993)
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. flava</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996), Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1997)
	<i>L. arcusangeli</i>	
	<i>L. purpurea</i>	
5- <i>O</i> -Allosylantirrhinoid (71)	<i>L. vulgaris</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Ilieva et al. (1993)
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. dalmatica</i>	
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
6- <i>O</i> -Seneciolyantirrhinoid (72)	<i>L. kurdica</i>	Aydogdu et al. (2010)
	<i>L. clementi</i>	Marco (1985)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Compound	Source	Reference
6- <i>O</i> -Angeloylantirrhinose (73)	<i>L. heterophylla</i>	Tekaya-Karoui et al. (2008)
	<i>L. multicaulis</i>	Tundis et al. (2008)
5-Deoxyantirrhinose (74)	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. flava</i>	
Genistifolin (75)	<i>L. genistifolia</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Ilieva, Handjieva and Popov (1992)
6'- <i>O</i> -Seneciolyantirrhinose (77)	<i>L. capraria</i>	Bianco et al. (2004)
6'- <i>O</i> -Angeloylantirrhinose (78)		
7,8- <i>epi</i> -Antirrhinose (79)	<i>L. dalmatica</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992)
8- <i>epi</i> -Loganic acid (80)	<i>L. cymbalaria</i>	Bianco et al. (1982)
7- β -Hydroxy-8- <i>epi</i> -iridodial glucoside (81)	<i>L. cymbalaria</i>	Bianco et al. (1982)
	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
Linarioside (82)	<i>L. japonica</i>	Kitagawa et al. (1972)
	<i>L. dalmatica</i>	Ilieva, Handjieva, et al. (1992) and Ilieva, Handjieva and Popov (1992)
	<i>L. simplex</i>	
	<i>L. pelisseriana</i>	
	<i>L. sp.</i>	
	<i>L. genistifolia</i>	
	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)
	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. flava</i>	
	<i>L. aegyptiaca</i>	Ferhat et al. (2010)
Aucubin (83)	<i>L. vulgaris</i>	Esposito and Scarpati (1970)
	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
10- <i>O</i> - β -Glucosylaucubin (84)	<i>L. vulgaris</i>	Esposito and Scarpati (1970)
		Guiso et al. (2007)
Linaride (85)	<i>L. muralis</i>	Bianco et al. (1977)
	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
	<i>L. flava</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. arcusangeli</i>	
Purpureoside (86)	<i>L. purpurea</i>	Bianco, Guiso, Procaccio, et al. (1997)
Antirrhide (87)	<i>L. japonica</i>	Kitagawa et al. (1973)
		Otsuka (1993a)
	<i>L. clementi</i>	Marco (1985)
	<i>L. simplex</i>	Handjieva et al. (1993)
	<i>L. flava</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996)
	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. purpurea</i>	Bianco, Guiso, Procaccio, et al. (1997)
	<i>L. reflexa</i>	Tundis et al. (2005)
	<i>L. vulgaris</i>	Guiso et al. (2007)
	<i>L. multicaulis</i>	Tundis et al. (2008)
	<i>L. kurdica</i>	Aydogdu et al. (2010)
6- β -Hydroxyantirrhide (88)	<i>L. genistifolia</i>	Handjieva et al. (1993)
	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
	<i>L. purpurea</i>	Bianco, Guiso, Procaccio, et al. (1997)
	<i>L. vulgaris</i>	Guiso et al. (2007)
Linariolose (89)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
5-Deoxyteuhircoside (90)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1993a)
Seco-linarioside (91)		

(Continued)

Table 4. (Continued)

Compound	Source	Reference
Genestifolioside (92)	<i>L. genistifolia</i>	Ahmad et al. (2006)
8- <i>epi</i> -Muralioside (93)	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Martino, et al. (1997)
Mussaenosidic acid (94)	<i>L. aegyptiaca</i>	Ferhat et al. (2010)
7 α -Hydroxyharpagide (95)	<i>L. heterophylla</i>	Tekaya-Karoui et al. (2008)
Catalpol (96)	<i>L. macroura</i>	Degot et al. (1983)
4-Carboxy-boonein (97)	<i>L. vulgaris</i>	Guiso et al. (2007)
Arcusangeloside (98)	<i>L. arcusangeli</i>	Bianco, Guiso, Mazzel, et al. (1996) and Bianco, Guiso, Martino, et al. (1996)
	<i>L. flava</i>	
7-Deoxyiridolactonic acid (99)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1995)
7-Deoxyiridolactonic acid dimethyl ester (100)		
Iridolinaroside A (101)		
Iridolinaroside B (102)		
Iridolinaroside C (103)		
Iridolinaroside D (104)		
Iridolinarin A (105)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1994a)
Iridolinarin B (106)		
Iridolinarin C (107)		
4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (108)	<i>L. canadensis</i>	Kouichi et al. (2011)
3-Acetyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-Glucopyranose (109)		

Purpureoside (**86**, Figure 4 and Table 4), showing a bicyclic nepetalactone-type structure and a sugar moiety linked to the cyclopentene ring was first isolated from *L. purpurea* (Bianco, Guiso, Procaccio, et al. 1997). The known antirrhine (**87**) is a well-known constituent in *Linaria*, while the related 6- β -hydroxyantirrhine (**88**) and linarioloside (**89**), together with 5-deoxyteuhircoside (**90**) and seco-linarioside (**91**) were isolated as new iridoids from *L. japonica* (Otsuka 1993a). The new genestifolioside (**92**) was identified in *L. genistifolia* (Ahmad et al. 2006) and the polyhydroxylated iridoid glucoside 8-*epi*-muralioside (**93**) was first isolated from *L. arcusangeli* (Bianco, Guiso, Martino, et al. 1997). Some known iridoids including mussaenosidic acid (**94**) reported from *L. aegyptiaca*, 7 α -hydroxyharpagide (**95**) from *Linaria heterophylla*, catalpol (**96**) and isocatalpol (CAS Registry Number: 61090-19-5, unspecified structure in Chem. Abstr.) (Figure 4) from *L. macroura* are however not common in *Linaria* sp.

Additional new iridoids presenting structural variation are represented by 4-carboxy-boonein (**97**, Figure 4) from *L. vulgaris* (Guiso et al. 2007) and arcusangeloside (**98**) as the only bisiridoid described in the genus. The known 7-deoxyiridolactonic acid (**99**) and 7-deoxyiridolactonic acid dimethyl ester (**100**), together with their new derivatives iridolinaroside A–D (**101–104**) (Otsuka 1995) and iridolinarin A–C (**105–107**) (Otsuka 1994a) were reported from *L. japonica*. 4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl) D-glucopyranose (**108**) and 3-acetyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (**109**) were first isolated from *L. canadensis* (Kouichi et al. 2011) (Figure 4, Table 4).

2.3.2. Monoterpenes

Monoterpenes are not very common in *Linaria* sp. since just three acyclic monoterpenes have been isolated. They are 6,7-dihydrofoliamenthic acid diglucoside (**110**) and 2,6-dimethyloctan-1,8-diol diglucoside (**111**) from *L. japonica* (Otsuka 1994b) and 8-*O*-glucosyl-methoxy-6,7-dihydrofoliamenthoy (**112**) from *L. capraria* (Bianco et al. 2004) (Figure 5, Table 5).

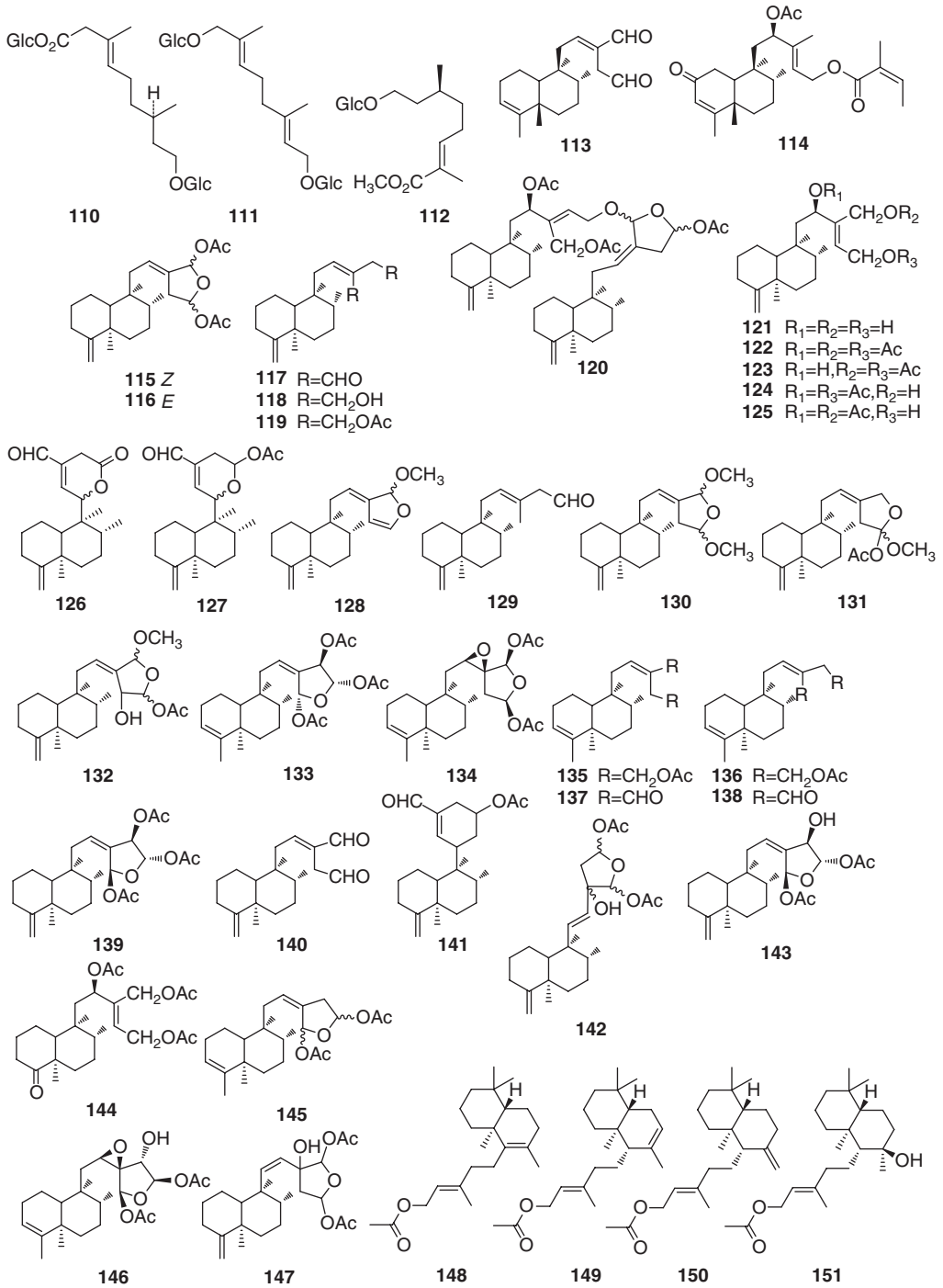


Figure 5. Acyclic monoterpenes (**110**–**112**), neo-clerodane diterpenoids (**113**–**147**) and labdanes (**148**–**151**) from *Linaria* species.

Table 5. Other phytochemicals from *Linaria* species.

Compound	Source	Reference
6,7-Dihydrofoliamenthic acid diglucoside (110)	<i>L. japonica</i>	Otsuka (1994b)
2,6-Dimethyl-octan-1,8-diol diglucoside (111)		
8-O-Glucosyl-methoxy-6,7-dihydrofoliamenthoy (112)	<i>L. capraria</i>	Bianco et al. (2004)
Dialdehyde linaridial (113)	<i>L. japonica</i>	Ilieva, Khandzheva, et al. (1992)
Linarinenone (114)		
15,16-Acetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (115)	<i>L. saxatilis</i> (L.) Chaz	De Pascual Teresa et al. (1982), San Feliciano et al. (1985a, 1985b)
15,16-Acetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12E-diene (116)		
Isolaridial (117)		
Isolaridial (118)	<i>L. saxatilis</i> (L.) Chaz	San Feliciano et al. (1985a, 1985b)
Isolaridial diacetate (119)		
Bis-clerodane (120)		
Isolaritriol (121)		
Isolaritriol triacetate (122)		
15,16-Diacetate of isolaritriol (123)		
12,15-Diacetate of isolaritriol (124)		
12,16-Diacetate of isolaritriol (125)		
16-Oxo-ent-cleroda-4(18),12-dien-15,11-lactone (126)		
15-Acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18),12-dien-16-al (127)		
15,16-Epoxy-16-methoxy-ent-cleroda-4(18),12Z,14-triene (128)		
Ent-cleroda-4(18),12-dien-15-al (129)		
15,16-Epoxy-15,16-dimethoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (130)		
15-Acetoxy-15,16-epoxy-15-methoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (131)		
15-Acetoxy-15,16-epoxy-16-methoxy-ent-cleroda-4(18),12E-dien-14-ol (132)		
14,15,16-Triacetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-3,12Z-diene (133)	<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	San Feliciano et al. (1993a)
15,16-Diacetoxy-12,13-15,16-diepoxy-ent-clerod-3-ene (134)		
15,16-Diacetoxy-ent-cleroda-3,12E-diene (135)		
15,16-Diacetoxy-ent-cleroda-3,12Z-diene (136)		
ent-Cleroda-3,12E-dien-15,16-dial (137)		
ent-Cleroda-3,12Z-dien-15,16-dial (138)		
14,15,16-Triacetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12E-diene (139)	<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	San Feliciano, Gordaliza, Miguel del Corral, de la Puente, Garcia-Granda, et al. (1993)
<i>E</i> -isolaridial (140)		
15-Acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18),12-dien-16-al (141)		
15,16-Diacetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-4(18),11E-dien-13 ξ -ol (142)	<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	Gordaliza et al. (1994)
15 α ,16 β -Diucetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-4(18),12Z-dien-14 β -ol (143)		

(Continued)

Table 5. (Continued)

Compound	Source	Reference
(12 <i>R</i>)-18-nor-12,15,16-triacetoxy-neo-cleroda-4(18),13 <i>E</i> -dien (144)		
15,16-Diacetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-3,12 <i>Z</i> -diene (145)	<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	Gordaliza et al. (1995)
15,16-Diacetoxy-12,13-15,16-diepoxy-14-hydroxy-neo-clerod-3-ene (146)		
Compound (147)		Gordaliza et al. (1997)
Labda-8,13 <i>E</i> -dien-15-yl acetate (148)	<i>L. saxatilis</i> var. <i>glutinosa</i>	San Feliciano et al. (1993b)
Labda-7,13 <i>E</i> -dien-15-yl acetate (149)		
Labda-8(17),13 <i>E</i> -dien-15-ol acetate (150)		
Labda-13 <i>E</i> -en-8,15-diol 15-monoacetate (151)		
β-Sitosterol (152)	<i>L. dalmatica</i> <i>L. vulgaris</i>	Kapoor et al. (1985) Rzadkowska-Bodalska et al. (1996) Hua, Li, et al. (2000)
3- <i>O</i> -β-D-Glucopyranoside (153)	<i>L. multicaulis</i> <i>L. vulgaris</i>	Tundis et al. (2008) Rzadkowska-Bodalska et al. (1996)
Stigmasterol (154)	<i>L. reflexa</i> <i>L. dalmatica</i> <i>L. multicaulis</i> <i>L. vulgaris</i>	Tundis et al. (2005) Kapoor et al. (1985) Tundis et al. (2008) Hua, Li, et al. (2000)
6β-Hydroxystigmast-4-en-3-one (155)		
3β-Hydroxystigmast-5-en-7-one (156)		
Daucosterol palmitate (157)		
5α,8α-Epidioxysterosta-6,22-diene-3β-ol (158)		
Ergosta-7,22-diene-3β,5α,6β-triol (159)		
Cycloart-25-ene-3β-,24ε-diol (160)	<i>L. vulgaris</i>	Hua, Hou, et al. (2000)
Cycloart-23-ene-3β,25-diol (161)		
Stigmastadienone (162)	<i>L. vulgaris</i>	Rzadkowska-Bodalska et al. (1996)
9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (163)	<i>L. multicaulis</i>	Tundis et al. (2008)
Fucoesterol (164)		
Campesterol (165)		
Stigmasta-5,24-dien-3-ol (166)		
Ergost-7-en-3β-ol (167)	<i>L. aucheri</i>	Ercil et al. (2004)
Stigmasta-5,22 <i>E</i> -dien-3β-ol (168)		
Stigmast-5-en, 24 <i>S</i> -3β-ol (169)		
Isomultiflorenol (170)	<i>L. vulgaris</i>	Hua, Hou, et al. (2000)
Isomultiflorenone (171)		
Ursolic acid (172)		
Maslinic acid (173)		
α-Amyrin (174)	<i>L. vulgaris</i>	Rzadkowska-Bodalska et al. (1996)
Soyasapogenol B (175)		
β-Amyrin (176)	<i>L. aucheri</i>	Ercil et al. (2004)
Betulic acid (177)	<i>L. vulgaris</i>	Rzadkowska-Bodalska et al. (1996) Otsuka (1994b)
Linarionside A (178)		
Linarionside B (179)		
Linarionside C (180)		
Shikimic acid (181)	<i>L. vulgaris</i>	Vrchovska et al. (2008)
Ascorbic acid (182)		

(Continued)

Table 5. (Continued)

Compound	Source	Reference
Oxalic acid (183)		
Aconitic acid (184)		
Citric acid (185)		
Ketoglutaric acid (186)		
Malic acid (187)		
Fumaric acid (188)		
Succinic acid (189)		Hua et al. (2005)
Mannitol (190)	<i>L. dalmatica</i>	Kapoor et al. (1985)
	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)
	<i>L. reflexa</i>	Cheriet et al. (2014)
Galactitol (191)	<i>L. vulgaris</i>	Hua et al. (2005)

2.3.3. Diterpenes

The neo-clerodane skeleton is only present in metabolites from two *Linaria* species, mostly present in *Linaria saxatilis*. Both new dialdehyde linaridial (**113**) (Kitagawa et al. 1975) and linarienone (**114**) (Kitagawa et al. 1977) were isolated from *L. japonica* (Figure 5). Eleven neo-clerodane diterpenoids and two acetyl derivatives were reported (San Feliciano et al. 1985a, 1985b) from the aerial parts of *L. saxatilis* (L.) Chaz, namely 15,16-acetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (**115**), 15,16-acetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12E-diene (**116**), isolinaridial (**117**) (De Pascual Teresa et al. 1982), isolinaridiol (**118**), isolinaridiol diacetate (**119**), bis-clerodane (**120**), isolinaritriol (**121**), isolinaritriol triacetate (**122**), 15,16-diacetate of isolinaritriol (**123**), 12,15-diacetate of isolinaritriol (**124**), 12,16-diacetate of isolinaritriol (**125**), 16-oxo-ent-cleroda-4(18),12-dien-15,11-lactone (**126**), 15-acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18),12-dien-16-al (**127**), 15,16-epoxy-16-methoxy-ent-cleroda-4(18),12Z,14-triene (**128**), ent-cleroda-4(18),12-dien-15-al (**129**), 15,16-epoxy-15,16-dimethoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (**130**), 15-acetoxy-15,16-epoxy-15-methoxy-ent-cleroda-4(18),12Z-diene (**131**), 15-acetoxy-15,16-epoxy-16-methoxy-ent-cleroda-4(18),12E-dien-14-ol (**132**). Further investigation involving the whole plant *L. saxatilis* var. *glutinosa* was carried out by the same authors. Starting from the roots, they isolated six new compounds, namely 14,15,16-triacetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-3,12Z-diene (**133**), 15,16-diacetoxy-12,13-15,16-diepoxy-ent-clerod-3-ene (**134**), 15,16-diacetoxy-ent-cleroda-3,12E-diene (**135**), 15,16-diacetoxy-ent-cleroda-3,12Z-diene (**136**), ent-cleroda-3,12E-dien-15,16-dial (**137**) and ent-cleroda-3,12Z-dien-15,16-dial (**138**) (San Feliciano et al. 1993a). From the aerial parts of the plant, they obtained the new 14,15,16-triacetoxy-15,16-epoxy-ent-cleroda-4(18),12E-diene (**139**), together with *E*-isolinaridial (**140**) and the known 15-acetoxy-11,15-epoxy-ent-cleroda-4(18),12-dien-16-al (**141**) (San Feliciano, Gordaliza, Miguel del Corral, de la Puente, Garcia-Granda, et al. 1993). From the aerial part of *L. saxatilis* var. *glutinosa*, Gordaliza et al. (1994) reported the isolation of the new 15,16-diacetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-4(18),11E-dien-13 ξ -ol (**142**), 15 α ,16 β -diacetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-4(18),12Z-dien-14 β -ol (**143**) and (12*R*)18-nor-12,15,16-triacetoxy-neo-cleroda-4(18),13E-dien (**144**). A study on the plant roots carried out in 1995 has allowed to first report 15,16-diacetoxy-15,16-epoxy-neo-cleroda-3,12Z-diene (**145**) and 15,16-diacetoxy-12,13-15,16-diepoxy-14-hydroxy-neo-clerod-3-ene (**146**) by Gordaliza et al. Compound **147** was isolated from the roots and the aerial parts of *L. saxatilis* var. *glutinosa* and subjected to bioactivity evaluation (Gordaliza et al. 1997). The first report on products belonging to labdane family isolated from *Linaria* includes labda-8,13E-dien-15-yl acetate (**148**), labda-7,13E-dien-15-yl acetate (**149**), labda-8(17),13E-dien-15-ol acetate (**150**) and labda-13E-en-8,15-diol 15-monoacetate (**151**) (San Feliciano et al. 1993b) (Figure 5, Table 5).

2.3.4. Triterpenes

Triterpenoids have been mostly isolated from *L. vulgaris*, although they are not very common in *Linaria*. Most of them are steroids, with some structures corresponding to oleanane and lupane groups.

2.3.4.1 Steroids. A series of steroids have been reported from *Linaria* sp., including β -sitosterol (**152**) (Rzadkowska-Bodalska et al. 1996), 3-*O*- β -D-glucopyranoside (daucosterol, **153**) (Tundis et al. 2005) and stigmasterol (**154**) (Kapoor et al. 1985). Hua et al. (2000) reported that *L. vulgaris* contains 6 β -hydroxystigmast-4-en-3-one (**155**), 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one (**156**), daucosterol palmitate (**157**), 5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-diene-3 β -ol (**158**), ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol (**159**) together with **152** (Hua, Li, et al. 2000), in addition to cycloart-25-ene-3 β ,24 ϵ -diol (**160**), cycloart-23-ene-3 β ,25-diol (**161**) (Hua, Hou, et al. 2000). Stigmastadienone (**162**) was detected by using GC-MS (Rzadkowska-Bodalska et al. 1996) in the lipophilic fraction of *L. vulgaris*. Using the same method, 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol (**163**), fucosterol (**164**), campesterol (**165**), stigmasta-5,24-dien-3-ol (**166**), along with **152** and **154**, were detected in the *n*-hexane extract of *Linaria multicaulis* subsp. *multicaulis* (Tundis et al. 2008). Ergost-7-en-3 β -ol (**167**), stigmasta-5,22 E -dien-3 β -ol (**168**) and stigmast-5-en, 24 S -3 β -ol (**169**) were identified from *Linaria aucheri* (Ercil et al. 2004) (Figure 6, Table 5).

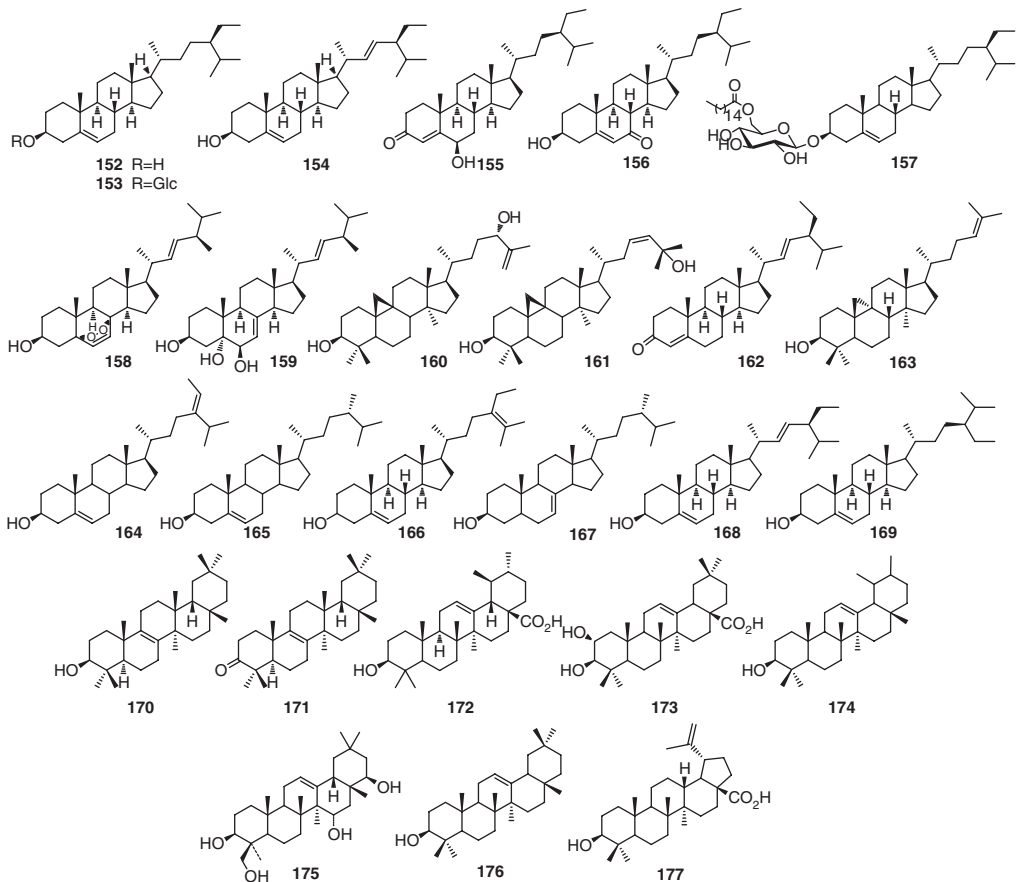


Figure 6. Triterpenes (**152**–**177**) from *Linaria* species.

2.3.4.2 *Oleananes*. Isomultiflorenol (**170**), isomultiflorenone (**171**), ursolic acid (**172**), maslinic acid (**173**) (Hua, Hou, et al. 2000), α -amyrin (**174**), soyasapogenol B (**175**) (Rzadkowska-Bodalska et al. 1996) and β -amyrin (**176**) were isolated from *L. aucheri* (Ercil et al. 2004) (Figure 6, Table 5).

2.3.4.3 *Lupanes*. Only betulinic acid (**177**) was reported as a lupane triterpenoid from *L. vulgaris* (Figure 6, Table 5) (Rzadkowska-Bodalska et al. 1996).

2.4. Other constituents

Compounds belonging to other classes of natural compounds have been also isolated, such as the new inols from *L. japonica* named linarionside A–C (**178–180**) (Otsuka 1994b), organic acids identified by using HPLC/UV technique from *L. vulgaris* including shikimic acid (**181**), ascorbic acid (**182**), oxalic acid (**183**), aconitic acid (**184**), citric acid (**185**), ketoglutaric acid (**186**), malic acid (**187**), fumaric acid (**188**), succinic acid (**189**) (Vrchovska et al. 2008), and the sugars mannitol (**190**) from *Linaria reflexa* (Cheriet et al. 2014) and galactitol (**191**) from *L. vulgaris* (Hua et al. 2005) (Figure 7, Table 5).

3. Biological activities

3.1. In folk medicine

Some species of the genus *Linaria* are used in folk medicine for treating various diseases in many geographical areas. Fresh or dried flowering of *L. vulgaris* is internally administered to treat digestion problems and urinary disorders. Externally, the plant is employed in the treatment of haemorrhoids, ulcus cruris, for ablation of festering wounds and skin rashes. It was also reported to have anti-inflammatory effect (Gruenwald 1998) and to treat coughs and asthma (Hua et al. 2002). *L. japonica* is known under the name ‘unran’ used in the folk medicine as diuretic, purgative (Otsuka 1993b) and laxative (Kitagawa et al. 1973). *L. cymbalaria* is used for its diuretic, tonic and anti-scorbutic effects (San Feliciano et al. 1993a), and *L. reflexa* has been found to be applied in the North African folk medicine in the treatment of certain skin diseases (Boukef 1986).

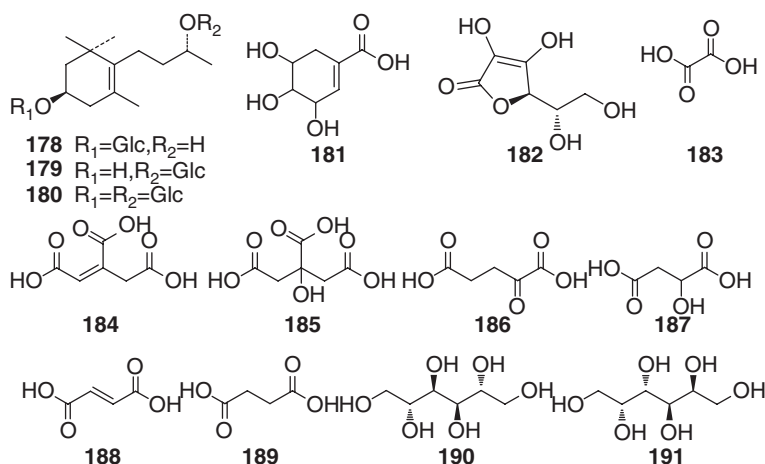


Figure 7. Other constituents (**178–191**) from *Linaria* species.

3.2. Antitumour activity

Diterpenoids and flavones are the *Linaria* components evaluated for their antitumour activity. The first study in this area was carried out by Gordaliza et al. (1997). For many years, *L. saxatilis* led to the isolation of several new neo-clerodane-diterpenoids and it encouraged them to investigate the cytotoxicity of these products (118, 122, 123, 134, 135, 140, 141 and 147). IC₅₀ values in the range 0.4–0.5 μM were obtained against leukaemia cell, P-388, lung tumour cells H-549 and colon adenocarcinoma cells HT-29 for 134, 135 and 141, whereas the semi-synthetic derivatives resulted less active than their natural parent compounds (Gordaliza et al. 1997). The anti-proliferative activity of pectolinarin (35, Figure 4), linariin (37), isolinariin A (38), isolinariin B (39), pectolinarigenin (49) and derivative 50 (obtained by hydrolysis of the rutinose and rhamnose unit in 35, respectively) and peracetylpectolinarin (192, Figure 8) obtained by acetylation of 35 isolated from *L. reflexa* (Tundis et al. 2005), was evaluated for *in vitro* cytotoxicity by the sulforhodamine B colorimetric assay against a set of human cancer cell lines. Compound 35 exhibited a significant activity against lung carcinoma (COR-L23), colorectal adenocarcinoma (Caco-2) and amelanotic melanoma (C32) cell lines (IC₅₀ = 5.03, 6.18, and 7.17 μM, respectively). Similar activities were recorded for compounds 37–39, whereas pectolinarigenin (49) showed the highest effect on COR-L23 and C32 cells (IC₅₀ = 4.07 and 7.02 μM) (Tundis et al. 2005). These results encouraged in extending the evaluation on synthetic derivatives of 49. Among them, compound 193 (Figure 8) displayed a significant activity against human skin fibroblast (142 BR), hepatocellular carcinoma (Huh-7D12), Caco-2, COR-L23, ACHN, C32, lung carcinoma (A549) and malignant melanoma (A375). None of the tested compounds (35, 49 and 193 and five synthetic derivatives) affected the proliferation of skin fibroblasts 142 BR, suggesting a selective activity against tumour cells (Bonesi et al. 2008).

Gordaliza et al. (1997) evaluated the *in vitro* cytotoxicity of several neo-clerodane diterpenes isolated from the roots and the aerial parts of *L. saxatilis* var. *glutinosa*, including 147 (Figure 5) and the semi-synthetic product 194 (Figure 8). The investigated compounds could be divided into five groups relating to their structure: with a Δ⁴⁽¹⁸⁾ *exo*-cyclic double bond (type A), their *endo*-cyclic Δ³ analogue (type B), with an epoxide function at 4,18 position (type C), the corresponding 4,18 diols (type D) and the C-18 degraded ketone (type E). They were tested against P-388 murine leukaemia, A-549 lung carcinoma, HT-29 colon carcinoma and Mel-28 malign melanoma human cell cultures, obtaining the best IC₅₀ values (0.2 μM) with type A–C compounds. Product 194 showed a selectivity proving to be four times more sensible to the

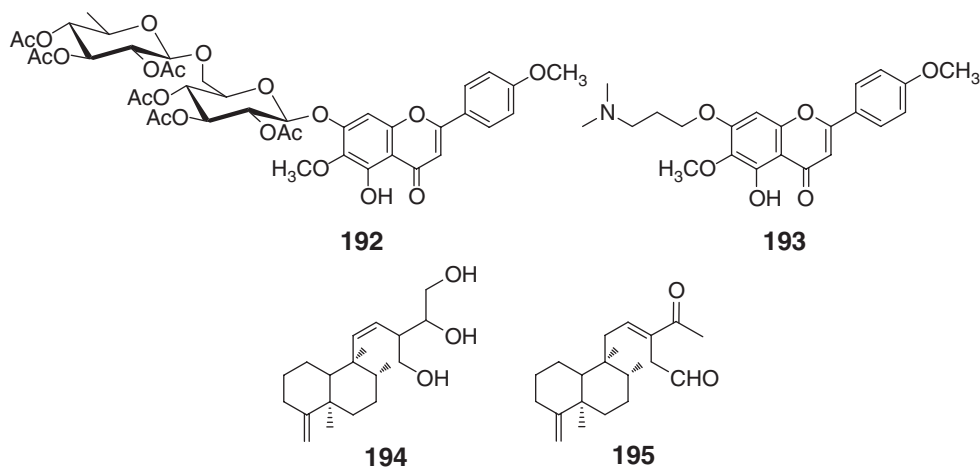


Figure 8. Peracetylpectolinarin (192), the synthetic derivative (193–195) used in bioactivity evaluation.

multi-drug-resistant HT-29 system, though without a great efficacy. Similar behaviour was observed for **147** towards murine leukaemia P-388, although in a lower degree. In general, most of the tested semi-synthetic derivatives were less active than their natural parent compounds.

3.3. Anti-AChE activity

Linarin (**36**), which is commonly present in *Linaria* sp., the flavanone naringenin and some chalcones have been reported to inhibit anti-AChE, with values ranging from 28.2 to 134.5 μM . *L. reflexa* extracts were able to inhibit the AChE in a dose-dependent manner. The observed activity on the *n*-hexane extract ($\text{IC}_{50} = 220.7 \mu\text{g/mL}$) could be related to the detected presence of fatty acids, which have recently shown a weak AChE inhibition (Loizzo et al. 2007). The AcOEt extract was found to be the most active ($\text{IC}_{50} = 185.6 \mu\text{g/mL}$) and three flavones responsible for the bioactivity were isolated from the extract: linariin (**37**), isolinariin A (**38**) and isolinariin B (**39**), displaying anti-AChE values ($\text{IC}_{50} = 0.30, 0.27$ and $0.28 \mu\text{M}$, respectively) comparable to the commercial drug physostigmine. It is noteworthy that the structures of these three compounds present the same rhamnoglycoside moiety, which has shown to be involved in the interaction with AChE enzyme (Oinonen et al. 2006).

3.4. Anti-inflammatory and analgesic activities

Extracts from *Linaria grandiflora* Desf., *L. genistifolia* subsp. *confertiflora* (Boiss.) Davis and *L. aucheri* Boiss have shown anti-inflammatory and analgesic effects, but linariin (**37**) and antirrhinoside (**66**) isolated from the bioactive extract of *L. aucheri* did not exhibit activity by carrageenan- and PGE2-induced hind paw oedema, 12-*O*-tetradecanoyl-13-acetate (TPA)-induced ear oedema and *p*-benzoquinone induced writhing reflex tests in mice (Akkol & Ercil 2009). Oral administration of both *L. aucheri* AcOEt or aqueous extract and isolated **66** significantly inhibited TPA-induced ear oedema in mice. On the contrary, the extracts and pure **37** did not show any activity on carrageenan-, PGE2-induced hind paw oedema and TPA-induced ear oedema models. Moreover, *L. aucheri* aqueous extract and **66** displayed a significant anti-nociceptive activity by *p*-benzoquinone-induced writhing reflex in mice (Akkol & Ercil 2009).

Extracts and isolated compounds **15**, **35–37**, **47** and **50** from *L. vulgaris* have shown anti-inflammatory and anti-allergic effects (Kelemen & Scedo 2003). Flavonoids **35**, **43**, **47**, **49**, **52** and **57** from the same origin have been reported as useful antitussive and anti-inflammatory in traditional Chinese medicine (Hua et al. 1999). The neo-clerodane diterpenoids *E*-isolinaridial (**140**, Figure 5) isolated from *L. saxatilis* var. *glutinosa* and its methylketone derivative (**195**, Figure 8) was found to be active on phospholipase PLA2. In addition, both compounds inhibited human synovial sPLA2 in a concentration-dependent manner with IC_{50} values of 0.20 and 0.49 μM , respectively, similar to scalaridial. Besides, they decreased the cell-free 5-lipoxygenase activity and A23187-induced neutrophil leukotriene B4 biosynthesis, as well as significantly reduced receptor-mediated degranulation, another function of human neutrophils. In contrast, none of the compounds affected superoxide generation in leucocytes, or cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase activities in cell-free assays (Benrezzouk et al. 1999).

3.5. Antioxidant activity

The biological study on *L. japonica* extract with the title of cosmetic composition has shown free radical scavenging, lipid peroxidation, hyaluronidase inhibition, lipoxygenase inhibition and

immunocyte degranulation inhibition effects, supporting the antioxidant and anti-inflammatory effects of the cosmetic composition (Jung et al. 2007).

Recently, Vrchovska et al. have investigated the ability of *L. vulgaris* infusion to act as a scavenger of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, reactive oxygen species (superoxide radical, hydroxyl radical, hypochlorous acid) and nitric oxide. The potent antioxidant activity could be mainly ascribed to flavonoid derivatives present in the infusion (Vrchovska et al. 2008).

3.6. Antibacterial activity

A biological study on *Linaria corifolia* ethanol extract has shown a selective antibacterial activity against Gram-positive bacteria. The same plant extract also had a strong effect against acid-fast bacterium *Mycobacterium smegmatis*, evaluated in comparison to the cephalosporic antibiotic cefotaxime (CTX30). In addition, the ethanolic extracts of leaf, flowers, stem and roots displayed anti-yeast effects especially against *Kluyveromyces fragilis* (Gonuz et al. 2005).

3.7. Other bioactivities

Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *L. genistifolia* (L.) Mill. subsp. *genistifolia* were investigated by using both *Allium cepa* root meristematic cells and bacterial reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, with or without metabolic activation system (S9), respectively. The results indicated that *L. genistifolia* extract was cytotoxic and genotoxic in *Allium* test, but not mutagenic in Ames test (Liman et al. 2012). In 2010, Aydogdu et al. reported the isolation of compounds **36**, **37**, **66**, **71** and **87** from the aerial parts of *L. kurdica* Boiss & Hohen. subsp. *ericalyx* and their biological evaluation in the α -glucosidase inhibition assay. The results indicated that antirrhinoside (**66**), 5-*O*-allosylantirrhinoside (**71**) and antirrhidine (**87**) showed a high inhibitory potential against α -glucosidase.

Flavonoids **35**, **36**, **47** and **65** isolated from *L. vulgaris* were used in the Chinese medicine as antitussive and anti-asthmatic and also in the preparation of medicines for treating cardiovascular disease (Liu et al. 2009).

Very recently, the use in folk medicine of *Linaria ramosissima* due to its diuretic activity encouraged the investigation of the pharmacological property of this species in albino rats. Leaves of *L. ramosissima* weakly enhanced urine volume, but significantly increased urinary electrolyte excretion. The pattern was similar to the one obtained with thiazide diuretics, wherein increases in sodium, potassium and urine formation was observed. The major chemical components in the plant resulting positive by qualitative tests were carbohydrate, steroids, saponins, flavonoids, alkaloids, tannins, phenolic compounds and cardiac glycosides. The significant diuretic activity observed for *L. ramosissima* leaves is indicative of the potential of this *Linaria* species, promising for further studies, on the isolation and characterisation of the active principles and the investigation of their mechanism of action (Pandya et al. 2012).

4. Conclusion

In this review, we reported a list of selected and studied plants belonging to the genus *Linaria* which furnished a great structural variety of metabolites. Phytochemical investigations led to the isolation of about 191 components including iridoids, flavonoids, triterpenoids and alkaloids. Some crude extracts and isolated metabolites were found to have significant biological and pharmacological activities, supporting the uses of some species of this plant in folk medicine. This overview highlights that the chemotaxonomic markers of the genus *Linaria* are iridoids. For now, only 41 species of this genus were investigated by chemical and biological studies,

corresponding to 21% from the *Linaria* genus, with the isolation of 49 new compounds, found to be in many cases bioactive. These data support the relevance of the genus *Linaria* as a source of further studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to Andrea Defant for his help in bibliographic research.

References

- Ahmad VU, Kousar F, Zubair M, Khan A, Ali MS, Choudhary MI, Sener B. 2006. A new iridoid glycoside from *Linaria genistifolia*. *Fitoterapia*. 77:12–14.
- Akkol EK, Ercil D. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharm Biol*. 47:188–194.
- Aydogdu I, Zihnioglu F, Karayildirim T, Gulcemal D, Alankus-Caliskan O, Bedir E. 2010. α -Glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *ericalyx*. *Nat Prod Commun*. 5:841–844.
- Beninger CW, Cloutier RR, Grodzinski B. 2009. A comparison of antirrhinoid distribution in the organs of two related Plantaginaceae species with different reproductive strategies. *J Chem Ecol*. 35:1363–1372.
- Benrezzouk R, Terencio MC, Ferrandiz ML, San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML, Alcaraz MJ. 1999. Inhibition of human sPLA2 and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. *Life Sci*. 64:PL205–PL211.
- 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*. 18:241–246.
- Bianco A, Guiso M, Iavarone C, Passacantilli P, Trogolo C. 1977. Iridoids. XXIV. Linaride (10-deoxyaucubin), a new iridoid from *Linaria muralis*. *Gazz Chim Ital*. 107:83–85.
- Bianco A, Guiso M, Martino M, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L. 1997. 8-epi-Muralioside, an iridoid glucoside from *Linaria arcusangeli*. *J Nat Prod*. 60:366–367.
- Bianco A, Guiso M, Martino M, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L, Mossa L, Poli F. 1996. Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. *Phytochemistry*. 42:89–91.
- Bianco A, Guiso M, Mazzel RA, Piccioni F, Nicoletti M, Serafini M, Ballero M. 1996. Iridoids in the flora of Italy 14. 6'-*O*-acetylantirrhinoid, a new iridoid glucoside from *Linaria flava* subsp. *sardoa*. *Fitoterapia*. 67:364–366.
- Bianco A, Guiso M, Procaccio C, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L. 1997. Iridoids in the flora of Italy. 8. A new methyl-cyclopentanoid monoterpene from *Linaria purpurea*. *Gazz Chim Ital*. 127:407–409.
- Bianco A, Passacantilli P, Polidori G. 1982. 8-Epiloganic acid and 7- β -hydroxy-8-epiiridodial glucoside. Two new iridoid glucosides from *Linaria cymbalaria*. *Planta Med*. 46:38–41.
- Bonesi M, Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Menichini F, Tillequin F, Menichini F. 2008. *In vitro* biological evaluation of novel 7-*O*-dialkylaminoalkyl cytotoxic pectolarigenin derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*. 18:5431–5434.
- Boukef MK. 1986. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne [Plants in the traditional Tunisian medicine]. Paris: Agence de coopération culturelle et technique.
- Cheriet T, Aouabdia S, Mancini I, Defant A, Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Sarri D, León F, Brouard I, et al. 2014. Chemical constituents of *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Der Pharm Lett*. 6:54–57.
- Degot AV, Fursa NS, Zaitsev VG, Chaika EA, Popova TP, Litvinenko VI, Kornievskii YI. 1983. Study of *Linaria macroua*. *Chem Nat Compd*. 3:388–389. Russian.
- De Pascual Teresa J, San Feliciano A, Barrero AF, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, Medarde M. 1982. Isolinaridial, new clerodane diterpenoid from *Linaria saxatilis*. *Ann Chem C Org Chem Biochem*. 78:425–426. Spanish.
- Ercil D, Sakar MK, Del Olmo E, San Feliciano A. 2004. Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turk J Chem*. 28:133–139.
- Esposito P, Scarpati ML. 1970. Iridoids. IX. 10-*O*- β -glucosylaucubin from *Linaria vulgaris*. *Gazz Chim Ital*. 100:836–845. Italian.
- Ferhat M, Harkat H, Lavaud C, Haba H, Long C, Benkhaled M. 2010. Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum. subsp. *fruticosa*. *Biochem Syst Ecol*. 38:833–835.
- Gonuz A, Dujger B, Kargioglu M. 2005. The morphological, anatomical properties and antimicrobial activity of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pak J Biol Sci*. 8:220–226.
- Gordaliza M, Del Corral Jose MM, de la Puente ML, Garcia-Gravalo MD, San Feliciano A. 1997. Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg Med Chem Lett*. 7:1649–1654.
- Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML, San Feliciano A. 1994. Neo-clerodane diterpenoids from *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Phytochemistry*. 36:1453–1456.

- Gordaliza M, Miguel del Corral JM, Mahiques MM, Castro MA, San Feliciano A. 1995. Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* var. *saxatilis*. *Phytochemistry*. 40:1307–1309.
- Groeger D, John S. 1965. Occurrence of peganine in *Linaria* species. *Planta Med.* 13:182–188.
- Gruenwald J. 1998. PDR for herbal medicines. 1st ed. Montvale (NJ): Medical Economics Company.
- Guan HF, Liu XQ, Lan Z, Wang RR, Hua H. 2009. Content determination of pectolinarin and hesperidin in *Linaria vulgaris* subsp. *sinensis* (Bebeaux) Hong by HPLC. *Sheng Pharm Univ.* 26:119–122. Chinese.
- Guiso M, Tassone G, Nicoletti M, Serafini M, Bianco A. 2007. Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat Prod Res.* 21:1212–1216.
- Handjieva NV, Ilieva EI, Spassov SL, Popov SS. 1993. Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* 49:9261–9266.
- Harborne JB. 1966. Comparative biochemistry of flavonoids. I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry.* 5:111–115.
- Harborne JB, Valdes B. 1971. Identification of scutellarein 4'-methyl ether in *Linaria aeruginea*. *Phytochemistry.* 10:2850–2851.
- Harkiss KJ. 1972. Scrophulariaceae. VI. Quantitative determination of choline in *Antirrhinum majus*, *A. orontium*, and *Linaria vulgaris*. *Planta Med.* 21:353–357.
- Hua H, Cheng M, Li X, Pei Y. 2002. A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem Pharm Bull.* 50:1393–1394.
- Hua H, Hou B, Li W, Li X, Zhang Y. 2000. Triterpenes from butter-and-eggs (*Linaria vulgaris*). *Chin Tradit Herb Drugs.* 31:409–412. Chinese.
- Hua H, Li X, Xing SE, Pei YH. 2005. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin Pharm J (Beijing, China).* 40:653–656. Chinese.
- Hua H, Li X, Zhang H. 2000. Steroids from *Linaria vulgaris* Mill. *J Sheng Pharm Univ.*, 17:40–42, 48. Chinese.
- Hua H, Piao F, Wang S, Li X, Qiao B, Li P. 1997. Study on a new alkaloid of *Linaria vulgaris*. *J Sheng Pharm Univ.* 14:219–220. Chinese.
- Hua H, Sun J, Li X. 1999. [Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*)]. *Chin Tradit Herb Drugs.* 30:332–334. Chinese.
- Ilieva E, Handjieva N, Bankova V, Popov S, Evstatieva L. 1992. Iridoid and flavonoid glycosides from *Linaria* species. *Bulg Chem Commun.* 25:400–406.
- Ilieva E, Handjieva N, Popov S. 1992. Genistifolin and other iridoid glucosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. *Z Naturforsch C.* 47:791–793.
- Ilieva E, Handjieva N, Spassov S, Popov S. 1993. 5-O-allosylantirrhinoside from *Linaria* species. *Phytochemistry.* 32:1068–1070.
- Ilieva E, Khandzheva N, Popov S. 1992. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry.* 31:1040–1041.
- Jamieson MA, Bowers MD. 2010. Iridoid glycoside variation in the invasive plant Dalmatian toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae), and sequestration by the biological control agent, *Calophasia lunula*. *J Chem Ecol.* 36:70–79.
- John S, Groeger D. 1968. Alkaloids in *Linaria* species. *Pharmazie.* 23:35–36.
- Jung US, Yoon JU, Ji OP, Park SG, Yoo JH, Cha YG. 2007. Cosmetic composition containing *Linaria japonica* extract with antioxidant and antiinflammatory effects. *Repub Korea* 782972 B1 1207. Korean.
- Kapoor R, Rishi AK, Atal CK. 1985. A rarely methylated new flavonol aglycone from *Linaria dalmatica*. *Fitoterapia.* 56:296–297.
- Kelemen L, Scedo C. 2003. Data about the polyphenol content of *Linaria vulgaris* Mill species. Note I. *Farmacia (Bucharest, Romania)* 51:86–89.
- Kitagawa I, Tani T, Akita K, Yosioka I. 1972. Linarioside, a new chlorine containing iridoid glucoside, from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* 5:419–422.
- Kitagawa I, Tani T, Akita K, Yosioka I. 1973. Constituents of *Linaria japonica*. I. Structure of linarioside, a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides. *Chem Pharm Bull.* 21:1978–1987.
- Kitagawa I, Yoshihara M, Kamiguchi T. 1977. Linarienone, a new *cis*-clerodane-type diterpene from the subterranean part of *Linaria japonica* Miq. *Tetrahedron Lett.* 14:1221–1224.
- Kitagawa I, Yoshihara M, Tani T, Yosioka I. 1975. Linaridial, a new *cis*-clerodane-type diterpene dialdehyde, from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* 1:23–26.
- Klobb T. 1907. Two new glucosides: linarine and pectolinarine. *C R.* 145:331–334.
- Kooiman P. 1970. The occurrence of iridoid glycosides in the Scrophulariaceae. *Acta Bot Neerl.* 19:329–340.
- Kouchi M, Takashi T, Isao K, Toshihiro F, Yuki Y, Kanji I. 2011. New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J Nat Med.* 65:172–175.
- Kuptsova LP, Ban'kovskii AI. 1970. [New flavonoid from some species of *Linaria*]. *Chem Nat Compd.* 6:128–129. Russian.
- Lahloub MF. 1992. Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J Pharm Sci.* 8:78–95.

- Liman R, Gökçe UG, Akyıl D, Eren Y, Konuk M. 2012. Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*. *Braz J Pharmacogn.* 22:541–548.
- Liu X, Hua H, Guan H, Lan Z. 2009. Extraction method of flavones from for Chinese medicine *Linaria* and its application as antitussive and antiasthmatic agent. Faming Zhuanli Shenqing. CN 101475619 A 0708. Chinese.
- 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.
- Marco JL. 1985. Iridoid glucosides of *Linaria clementei*. *Phytochemistry.* 24:1609–1610.
- Men'shikov GP, Ban'kovski AI, Frolova VI. 1959. Alkaloids of *Linaria vulgaris* Mill. *J Gen Chem.* 29:3846–3848.
- Morita N, Shimizu M, Arisawa M, Kobayashi K. 1974. Medicinal resources. 37. Components of leaves of *Linaria japonica* and *L. vulgaris* (Scrophulariaceae). *J Pharm Sci.* 94:913–916.
- Mun GS, Song HY, Kim IG. 1979. Analysis of flavonoid-components of *Linaria Japonica* Mig. *Punsok Hwahak.* 3:28–32.
- Nicoletti M, Serafini M, Garbarino JA, Gambaro V. 1988. Chemosystematic study of Scrophulariaceae: iridoid glycosides. *Giorn Bot Ital.* 122:13–24.
- Oinonen PP, Jokela JK, Hatakka AI, Vuorela PM. 2006. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia.* 77:429–434.
- Otsuka H. 1992. Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J Nat Prod.* 55:1252–1255.
- Otsuka H. 1993a. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 33:617–622.
- Otsuka H. 1993b. Phenylethanoids from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 32:979–981.
- Otsuka H. 1994a. Iridolinarins A, B, and C: iridoid esters of an iridoid glucoside from *Linaria japonica*. *J Nat Prod.* 57:357–362.
- Otsuka H. 1994b. Linarionosides A–C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 37:461–465.
- Otsuka H. 1995. Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 39:1111–1114.
- Pahlow M. 1979. *El Gran Libro de las Plantas Medicinales* [The great book of medicinal plants]. 4th ed. Madrid: Everest S.A.
- Pandya PN, Aghera HB, Ashok BK, Acharya R. 2012. Diuretic activity of *Linaria ramosissima* (Wall.) Janch. Leaves in albino rats. *AUY.* 33:576–578.
- Pethes E, Marczal G, Kery A, Petho M. 1974. Flavonoids as biologically active agents and their occurrence in the Scrophulariaceae family. *Acta Pharm Hung.* 44:83–90.
- Plekhanova NV, Sheveleva GP. 1965. Alkaloids of *Linaria transiliensis* and *Linaria vulgariformis*. *Issled. Flory Kirgizii na Alkaloidonosnost, Akad. Nauk Kirg. SSR, Inst Organ Khim.* 54–56. Russian.
- Rzadzowska-Bodalska H, Kowalczyk-Ohem B, Lamer-Zarawska E. 1996. Chemical and biological investigation of lipophilic fraction of *Linaria vulgaris* Mill. (Scrophulariaceae). *Bull Pol Acad Sci Biol Sci.* 43:179–184.
- San Feliciano A, Barrero AF, Miguel del Corral JM, Gordaliza M, Medarde M. 1985a. Further neo-clerodane diterpenes from *Linaria saxatilis* (L.) Chaz. *Tetrahedron.* 41:671–680.
- San Feliciano A, Barrero AF, Miguel del Corral JM, Gordaliza M, Medarde M. 1985b. Clerodane diterpenes from *Linaria saxatilis*. II. *Ann Chem C Org Chem Biochem.* 81:244–247. Spanish.
- San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML. 1993a. Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Phytochemistry.* 33:631–633.
- San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML. 1993b. Labdanes from *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Fitoterapia.* 64:184.
- San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, de la Puente ML, Garcia-Granda S, Salvado MA. 1993. Neo-clerodane diterpenoids from aerial parts of *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Tetrahedron.* 49:9067–9078.
- Serafini M, Foddai S, Ballero M, Guiso M, Bianco A. 2004. The occurrence of iridoid glycosides in *Cymbalaria* spp. in Italy. *Nat Prod Res.* 18:325–327.
- Serafini M, Piccin A, Stanzione A, Petitto V, Nicoletti M. 2008. Chemotaxonomy of *Linaria* genus by nor-iridoids distribution. *Nat Prod Commun.* 3:847–848.
- Smirnova LP, Boryaev KI, Ban'kovskii AI. 1974. Acacetin and its glycosides in plants of the genus *Linaria*. *Chem Nat Compd.* 10:96–97. Russian.
- Smirnova LP, Zapesochaynaya GG, Ban'kovskii AI, Boryaev KI. 1974. Linaroside, a new flavonol glycoside from some species of *Linaria*. *Chem Nat Compd.* 10:249–250. Russian.
- Sokolowska-Wozniak A, Szewczyk K, Nowak R. 2003. Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L.) Mill. *Herba Pol.* 49:161–165.
- Sticher O. 1971. Isolation of antirrinin from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry.* 10:1974–1975.
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Plant biochemistry*. London: Academic Press; p. 387–416.

- Takahashi K, Tanabe Y, Kishihara S. 1973. Constituents of medicinal plants. XII. Constituents of the flowers of *Linaria japonica*. J Pharm Sci. 93:707–710.
- Tekaya-Karoui A, Hammami S, Ben Jannet H, Hamza MA, Abreu P, Mighri Z. 2008. Iridoid glycosides from the aerial parts of *Linaria heterophylla* Desf growing in Tunisia. J Soc Alg Chim. 18:149–158.
- Tundis R, Deguin B, Dodaro D, Statti GA, Tillequin F, Menichini F. 2008. Iridoid glycosides from *Linaria multicaulis* (L.) Miller subsp. *multicaulis* (Scrophulariaceae). Biochem Syst Ecol. 36:142–145.
- Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F. 2005. Potential antitumor agents: flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. Bioorg Med Chem Lett. 15:4757–4760.
- Vrchovska V, Spilkova J, Valentao P, Sousa C, Andrade PB, Seabra RM. 2008. Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. Nat Prod Res. 22:735–746.
- Wagner H, Aurnhammer G, Hoerhammer L, Farkas L. 1969. Acacetin glycosides. II. Identity comparison of acaciin from *Robinia pseudoacacia* and linarin from *Linaria vulgaris*. Chem Ber. 102:1445–1446.
- Yunusov SY, Ismailov ZF. 1956. Alkaloids of *Linaria popovii*. Dokl. Akad. Nauk. SSR + . 1:25–27.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2014, 6 (1):54-57
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Chemical constituents of *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae)

T. Cheriet¹, S. Aouabdia¹, I. Mancini², A. Defant², R. Seghiri^{1*}, O. Boumaza¹, R. Mekkiou¹,
D. Sarri³, F. León⁴, I. Brouard⁴, F. Benayache¹ and S. Benayache¹

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie

²Laboratorio di Chimica Bioorganica, Università di Trento, I-38050 Povo-Trento, Italy

³Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, 28000, M'Sila, Algérie

⁴Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-C.S.I.C.-Instituto Universitario de Bio-Orgánica 'Antonio González', Universidad de La Laguna, Av. Astrofísico F. Sánchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

ABSTRACT

The phytochemical study on the aerial parts of *Linaria reflexa* Desf., belonging to the scrophulariaceae family led the isolation and structural elucidation of pectolarin (1), liniarin (2), methyl linoleate (3), apigenin (4), mannitol (5) and pectolarigenin (6). These compounds were identified by 1D and 2D NMR as well as by mass spectrometry.

Keywords: Chemical Constituents; *Linaria reflexa* Desf.; Scrophulariaceae.

INTRODUCTION

The genus *Linaria*, one of 220 genus of the Scrophulariaceae family, comprises about 200 species [1], widely distributed in the Mediterranean basin and eastern Asia. Several *Linaria* species are used in folk medicine in many areas for treatment of various diseases, for example fresh or dried flowers of *L. vulgaris* are used internally to help digestive problems and urinary disorders. Externally, the plant is applied in the treatment of hemorrhoids, ulcus cruris, for ablation of festering wounds, and skin rashes. It is also reported to have anti-inflammatory effect [2] and to treat coughs and asthma [3]. *L. japonica* known under the name "unran" is used as diuretic, purgative [4] and laxative [5]. *L. cymbalaria* is used for its diuretic, tonic and antiscorbutic effects [6].

Previous phytochemical studies on this genus showed the presence of iridoids [7-12], flavonoids [13-16], diterpenoids [17-20], monoterpenoids [21], triterpenoids [22, 23], alkaloids [24, 25] and phenylethanoids [4]. Many biological effects have been reported for some isolated compounds from *L. saxatilis* var. *saxatilis* and *L. reflexa* Desf. such as neo-clerodane diterpenoids and flavonoids [26, 27].

As a part of our on-going program of research on Algerian plants [28-35], we report our results on the phytochemical investigation of the aerial parts of *L. reflexa* Desf., a North African folk medicine herb used for the treatment of certain skin diseases [36]. A previous study on this plant, reports the isolation of flavones, iridoids, sterol and the cytotoxic activity of the isolated compounds [26]. In the present work on the chemical constituents the aqueous-MeOH extract of the aerial parts, we have obtained 6 compounds (1-6) among which three (3-5) are reported for the first time from this spice (Figure 1). The structures were established by spectral analysis, mainly ESIMS, UV and 2D-NMR experiments (COSY, NOESY, HSQC and HMBC).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The aerial parts of *Linaria reflexa* Desf., were collected in March 2012 from El-Meridj near Constantine city, Algeria. The plant was identified by Dr. D. Sarri on the basis of Quezel and Santa [37]. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL Unit Research, University of Constantine1 under n° 06/2012/SLR.

Extraction and isolation

Air-dried aerial parts of *L. reflexa* (1.5 kg) were macerated with 80% aqueous methanol at room temperature four times. After filtration, a yellow precipitate appeared in the solution. This precipitate which was filtered, led to the isolation of compound **1** (40 mg). The filtrate was concentrated and dissolved in H₂O (600 ml). The resulting solution was successively extracted with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. In the EtOAc phase yellow needles appeared giving after filtration the compound **2** (700 mg). The CHCl₃ extract (5 g) was further fractioned by silica gel column chromatography, eluted with *n*-hexane containing increasing percentages of EtOAc to obtain ten fractions (F1-F10). F1 (45 mg) and F2 (27 mg) were purified on preparative plates of silica gel *n*-hexane/EtOAc 7:3 and *n*-hexane/EtOAc 8:2 respectively, to obtain compound **3** (5 mg) and compound **4** (4 mg) respectively. During the concentration, the *n*-BuOH extract gave a white precipitate which was filtered to obtain compound **5** (48 mg). Compound **6** is the result of the acid hydrolysis using the microwave method, in which 30 mg of compound **2** were added to 2 ml of ethanol and 100 µl of concentrated HCl, after 30 min in the microwave, the aglycone part was purified on PLC plates.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolated and identified compounds

Compound 1: C₂₉H₃₄O₁₅; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}, J/Hz): 12.96 (1H, s, OH-5), 8.05 (2H, d, J=8.8, H-2', H-6'), 7.18 (2H, d, J=8.8, H-3', H-5'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.94 (1H, s, H-8), 5.13 (1H, d, J=6.9, H-1''Glc), 4.58 (1H, br. s, H-1''Rhm), 3.87 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 6-OCH₃), 1.07 (3H, d, J=6.2, CH₃ Rhm); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, δ_{ppm}) 164.1 (C-2), 103.4 (C-3), 182.4 (C-4), 152.5 (C-5), 132.7 (C-6), 156.5 (C-7), 94.3 (C-8), 152.2 (C-9), 105.9 (C-10), 122.7 (C-1'), 128.4 (C-2', C-6'), 114.8 (C-3', C-5'), 162.4 (C-4'), 100.4 (C-1''), 73.1 (C-2''), 75.7 (C-3''), 69.5 (C-4''), 76.4 (C-5''), 65.9 (C-6''), 100.4 (C-1'''), 70.4 (C-2'''), 70.8 (C-3'''), 72.0 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 17.7 (C-6'''), 55.6 (4'-OMe), 60.31 (6-OMe); HR-ESIMS (+): m/z 645.1810 [M+Na]⁺ corresponding to C₂₉H₃₄O₁₅Na (calculated: 645.1795). This compound was characterized as pectolarin [16].

Compound 2: C₃₁H₃₆O₁₆; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}, J/Hz): 12.83 (1H, s, OH-5), 7.92 (2H, d, J=9.2, H-2', H-6'), 7.40 (2H, d, J=9.2, H-3', H-5'), 6.88 (1H, s, H-3), 6.74 (1H, s, H-8), 5.12 (1H, d, J=7.2, H-1''Glc), 4.59 (1H, br. s, H-1''Rhm), 3.81 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 6-OCH₃), 1.91 (3H, s, CH₃CO), 0.77 (3H, d, J=6, CH₃Rhm); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, δ_{ppm}) 164.1 (C-2), 103 (C-3), 182.2 (C-4), 152.1 (C-5), 132.7 (C-6), 156.1 (C-7), 94.4 (C-8), 152.3 (C-9), 105.8 (C-10), 122.4 (C-1'), 128.2 (C-2', C-6'), 114.6 (C-3', C-5'), 162.4 (C-4'), 99.9 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.2 (C-3''), 69.1 (C-4''), 75 (C-5''), 65.3 (C-6''), 99.7 (C-1'''), 70.2 (C-2'''), 68.1 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 66.7 (C-5'''), 20.6 (CH₃CO), 16.9 (C-6'''), 170.3 (CO), 55.4 (4'-OCH₃), 60.3 (6-OCH₃). HRESI-MS (+): m/z 687.1899, [M+Na]⁺, corresponding to C₃₁H₃₆O₁₆Na (calculated: 687.1901). This compound was characterized as linariin [16].

Compound 3: C₁₉H₃₄O₂; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃, δ_{ppm}, J/Hz): 5.35 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13), 3.65 (3H, s, OCH₃), 2.80 (2H, m, H₂-11), 2.29 (2H, t, H₂-2), 2.05 (4H, m, H₂-8, H₂-14), 1.61 (2H, m, H₂-3), 1.24 (14H, br. s, H₂-4, H₂-5, H₂-6, H₂-7, H₂-15, H₂-16, H₂-17), 0.9 (3H, t, H₃-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ_{ppm}) 174.1 (C-1), 127.5 (C-9, C-10, C-12, C-13), 51.3 (OCH₃), 33.7 (C-2), 29.2 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-15, C-16), 26.6 (C-8, C-14), 25.3 (C-11), 24.9 (C-3), 23.1 (C-17), 12.9 (C-18). This compound was identified as methyl linoleate [38].

Compound 4: C₁₅H₁₀O₅; ¹HNMR (400 MHz, MeOH-d₄, δ_{ppm}, J/Hz): 7.89 (2H, d, J=8.8, H-2', H-6'), 7.00 (2H, d, J=8.8, H-3', H-5'), 6.52 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, J=1.6, H-8), 6.18 (1H, d, J=1.6, H-6); ¹³C NMR (MeOH-d₄, 100 MHz, δ_{ppm}) 163.3 (C-2), 101.2 (C-3), 179.5 (C-4), 162.2 (C-5), 100.3 (C-6), 172.7 (C-7), 95.1 (C-8), 158.23 (C-9), 102.1 (C-10), 118.4 (C-1'), 127.6 (C-2', C-6'), 115.9 (C-3', C-5'), 164.4 (C-4'); ESI-MS (-): m/z 269 [M-H]⁻. This compound was identified as apigenin [12].

Compound 5: C₆H₁₄O₆; ¹HNMR (400 MHz, D₂O, δ_{ppm}, J/Hz): 4.40 (2H, d, J=5.6, 2OH), 4.31 (2H, t, J=5.6, 2OH), 4.13 (2H, d, J=7.1, 2OH), 3.60 (2H, m, H-1a, H-6a), 3.54 (2H, m, H-3, H-4), 3.46 (2H, m, H-2, H-5), 3.38 (2H, m, H-1b, H-6b); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, δ_{ppm}) 71.3 (C-2, C-5), 69.7 (C-3, C-4), 63.8 (C-1, C-6); HRESI-MS (+): m/z

205.0689 [M+Na]⁺, corresponding to C₆H₁₄O₆Na (calculated: 205.0688). This compound was characterized as mannitol [15].

Pectolarigenin (6)

C₁₇H₁₄O₆; ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄, δ_{ppm}, J/Hz): 7.94 (2H, d, J=8.8, H-2', H-6'), 7.08 (2H, d, J=8.8, H-3', H-5'), 6.64 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, s, H-8), .88 (6H, s, 2OCH₃); ¹³C NMR (MeOH-d₄, 100 MHz, δ_{ppm}) 164.4 (C-2), 102.2 (C-3), 182.8 (C-4), 152.5 (C-5), 131.3 (C-6), 157.3 (C-7), 94.1 (C-8), 153.2 (C-9), 104.4 (C-10), 122.8 (C-1'), 128.5 (C-2', C-6'), 114.1 (C-3', C-5'), 164 (C-4'), 59 (6-OCH₃), 54.7 (4'-OCH₃) [39].

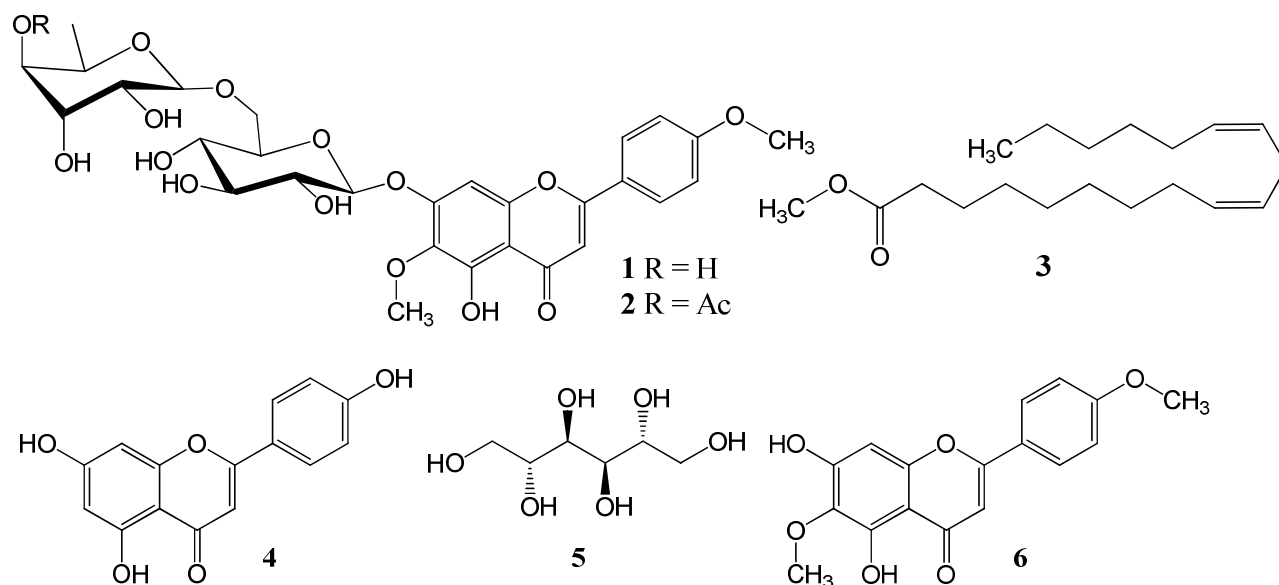


Figure 1: Structure of compounds 1-6

CONCLUSION

The previous study reported the presence of seven constituents such as flavonoids, iridoids and sterol in both the flowers and stems of *L. reflexa* Desf. In this investigation six compounds mainly, pectolarigenin (1); larniirin (2); methyl linoleate (3); apigenin (4); mannitol (5) and pectolarigenin (6) have been obtained from the aerial parts of *L. reflexa*. Compounds 3, 4 and 5 were reported for the first time from *L. reflexa* Desf.

Acknowledgments

We are grateful to MESRS (DGRSDT) Algeria for financial supports. Many thanks for Pr. Mancini for supporting a part of this research and Dr. A. Defant for his help.

REFERENCES

- [1] N. V. Handjieva, E. I. Ilieva, S. L. Spassov, S. S. Popov, *Tetrahedron*, **1993**, 49(41), 9261-9266.
- [2] PDR for Herbal Medicines (1st ed.). New Jersey: Medical Economics Company, **1998**, 1, 683-684.
- [3] H. Hua, M. Cheng, X. Li, Y. Pei, *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, 50(10), 1393-1394.
- [4] H. Otsuka, *Phytochemistry*, **1993**, 32(4), 979-981.
- [5] I. Kitagawa, T. Tani, K. Akita, I. Yosioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, 21(9), 1978-1987.
- [6] A. San Feliciano, M. Gordaliza, J. M. Miguel Del Corral, M. L. De La Puente, *Phytochemistry*, **1993**, 33(3), 631-633.
- [7] I. Kitagawa, T. Tani, K. Akita, I. Yosioka, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 5, 419-422.
- [8] J. L. Marco, *Phytochemistry*, **1985**, 24(7), 1609-1610.
- [9] H. Otsuka, *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57(3), 357-362.
- [10] H. Otsuka, *Phytochemistry*, **1995**, 39(5), 1111-1114.
- [11] A. Bianco, M. Guiso, M. Martino, M. Nicoletti, M. Serafini, L. Tomassini, L. Mossa, F. Poli, *Phytochemistry*, **1996**, 42(1), 89-91.
- [12] M. Kouichi, T. Takashi, K. Isao, F. Toshihiro, Y. Yuki, I. Kanji, *J. Nat. Med.*, **2011**, 65(1), 172-175.
- [13] J. B. Harborne, B. Valdes, *Phytochemistry*, **1971**, 10(11), 2850-2851.
- [14] L. P. Smirnova, K. I. Boryaev, A. I. Ban'kovskii, *Chem. Nat. Comp.*, **1974**, 10(1), 96-97.

- [15] R. Kapoor, A. K. Rishi, C. K. Atal, *Fitoterapia*, **1985**, 56(5), 296-297.
- [16] H. Otsuka, *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55(9), 1252-1255.
- [17] I. Kitagawa, M. Yoshihara, T. Tani, I. Yosioka, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 1, 23-26.
- [18] A. San Feliciano, A. F. Barrero, J. M. Miguel del Corral, M. Gordaliza, M. Medarde, *Tetrahedron*, **1985**, 41(4), 671-680.
- [19] A. San Feliciano, M. Gordaliza, J. M. Miguel Del Corral, M. L. De La Puente, *Phytochemistry*, **1993**, 33(3), 631-633.
- [20] M. Gordaliza, J. M. M. del Corral, M. M. Mahiques, M. A. Castro, A. San Feliciano, *Phytochemistry*, **1995**, 40(4), 1307-1309.
- [21] H. Otsuka, *Phytochemistry*, **1994**, 37(2), 461-465.
- [22] H. Hua, X. Li, H. Zhang, *J. Shenyang Pharmaceutical University*, **2000**, 17(1), 40-42, 48.
- [23] H. Hua, B. Hou, W. Li, X. Li, Y. Zhang, *Chinese herbal medicine*, **2000**, 31(6), 409-412.
- [24] H. Hua, F. Piao, S. Wang, X. Li, B. Qiao, P. Li, *J. Shenyang Pharmaceutical University*, **1997**, 14(3), 219-220.
- [25] H. Hua, M. Cheng, X. Li, Y. Pei, *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, 50(10), 1393-1394.
- [26] R. Tundis, B. Deguin, M. R. Loizzo, M. Bonesi, G. A. Statti, F. Tillequin, F. Menichini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15(21), 4757-4760.
- [27] M. Gordaliza, M. M. Del Corral Jose, M. L. De La Puente, M. D. Garcia-Gravalos, A. San Feliciano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7(13), 1649-1654.
- [28] R. Seghiri, O. Boumaza, R. Mekkiou, S. Benayache, P. Mosset, J. Quintana, F. Estévez, F. León, J. Bermejo, F. Benayache, *Phytochem. Lett.*, **2009**, 2, 114-118.
- [29] L. Hammoud, R. Seghiri, S. Benayache, P. Mosset, A. Lobstein, M. Chaabi, F. León, I. Brouard, J. Bermejo, F. Benayache, *Nat. prod. Res.*, **2012**, 26, 203-208.
- [30] F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, G. Massiot, P. Aclinou, B. Drodz, G. Nowaks, *Phytochemistry*, **1992**, 31(12), 4359-4360.
- [31] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, M. Kaabeche, F. Tillequin, E. Seguin, *Phytochemistry*, **1998**, 49, 2425-2427.
- [32] A. Bentamène, J. Creche, G. Petit, J. Bermejo-Barrera, S. Benayache, F. Benayache, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2005**, 33, 1061-1065.
- [33] E. H. Kolli, F. León, F. Benayache, S. Estévez, J. Quintana, F. Estévez, I. Brouard, J. Bermejo, S. Benayache, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, 23(5), 977-983.
- [34] S. Bicha, P. Chalard, L. Hammoud, F. León, I. Brouard, V. P. Garcia, A. Lobstein, A. Bentamene, S. Benayache, J. Bermejo, F. Benayache, *Rec. Nat. Prod.*, **2013**, 7(2), 114-118.
- [35] M. Kerkatou, A. Menad, D. Sarri, F. León, I. Brouard, R. Bouldjedj, P. Chalard, S. Ameddah, S. Benayache, F. Benayache, *Der Pharmacia Lett.*, **2013**, 5(5), 285-289.
- [36] M. K. Boukef, *Médecine traditionnelle et pharmacopée*. ISBN. **1986**.
- [37] P. Quezel, S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Editions du C.N.R.S, Paris, **1963**, Tome II; p. 840.
- [38] R. Tundis, B. Deguin, D. Dodaro, G. A. Statti, F. Tillequin, F. Menichini, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2008**, 36, 142-145.
- [39] H. Hua, J. Sun, X. Li, *Chinese herbal medicine*, **1999**, 30(5), 332-334.



Chemical constituents and antimicrobial activities of Petroleum ether and *n*-butanol extracts from *Linaria tingitana* Boiss. & Reut.

T. Cheriet^{1*}, M. Youcef-Ali², I. Mancini³, P. Chalard⁴, N. Kacem Chaouche²,
R. Seghiri¹, S. Benayache¹, F. Benayache¹

¹Unité de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie.

²Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Microbiologie, Université Constantine 1. Ain Elbey, Constantine 25017- Algérie.

³Laboratorio di Chimica Bioorganica, Dipartimento di Fisica, Università di Trento, via Sommarive 14, I-38123 Povo-Trento, Italy.

⁴Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand (ENSCCF), BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Received 3 Nov 2014, Revised 6 Feb 2015, Accepted 6 Feb 2015

*Corresponding Author. E-mail: tamercheriet@umc.edu.dz; Tel: (+213773208998 / +213661205899)

Abstract

In continuation of our phytochemical studies on the genus *Linaria* (Scrophulariaceae), we have investigated the petroleum ether (PE) and *n*-butanol (*n*-BuOH) extracts from the aerial parts of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. In this paper we describe the determination of nine methyl esters in the petroleum ether by GC-MS and the LC-MS profile of the *n*-BuOH extract together with the antimicrobial activity (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Alternaria sp.* and *Yarrowia sp.*), both extracts exhibits antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus sp.*, while no effects were observed about the antifungal activity. These results are reported for the first time for the spice.

Keywords: GC-MS, LC-MS, methyl esters, antimicrobial activity, *Linaria tingitana*, Scrophulariaceae

Introduction

The genus *Linaria*, one of 220 genus's of the scrophulariaceae family, comprises about 200 species [1], widely distributed in the Mediterranean basin and Eastern Asia. In Algeria, this genus has a good presence with 39 species and sub-species [2]. The use of some *Linaria* species in folk medicine in many area for treatment of various maladies, for example fresh or dried flowering of *L. vulgaris* is used internally to aid digestion problems and urinary disorders. Externally, the plant is applied in the treatment of hemorrhoids, ulcuscruris, for ablation of festering wounds, and skin rashes. It is also reported to have anti-inflammatory effect [3] and to treat coughs and asthma [4]. *L. japonica* known under the name "unran" used in the folk medicine as diuretic, purgative [5] and laxative [6]. *L. cymbalaria* is used for their diuretic, tonic and antiscorbutic effects [7]. *L. reflexa* Desf., an North African folk medicine herb used for the treatment of certain skin diseases [8]. Other species have been used as tonics, antiscorbutics, laxatives, antidiabetics and diuretics, as well as for the treatment of wounds, hemorrhoids and vascular disorders [7; 9]. Previous researches on the genus showed the presence of many secondary metabolites mainly iridoids, flavonoids, diterpenoids, acyclic monoterpenoids, triterpenoids and alkaloids [4; 10-19]. Many biological effects have been reported for some isolated compounds like the neo-clerodane diterpenoids and flavonoids previously isolated respectively from *L. saxatilis* var. *saxatilis* and *L. reflexa* Desf., showed cytotoxic activity [13; 20]. Flavones and extracts of *L. reflexa* Desf., showed acetyl-cholinesterase inhibition [21]. Extracts of *Linaria* spices showed antibacterial [22], anti-inflammatory and analgesic [23], anti-oxidant [24] and α -glucosidase inhibitory [25] effects.

In continuation of our research on the genus *Linaria* [26], we present in this paper, the phytochemical and the antimicrobial screening of PE and *n*-BuOH extracts of the aerial parts of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut., an endemic spice for Algeria.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *L. tingitana* Boiss. & Reut., were collected during the flowering phase in May 2010 from the national park of El-Kala, Algeria. The plant was authenticated by Dr. Sarri Djamel on the basis of Quezel and Santa [2]. A voucher specimen (No. 08/2009/CCN12) has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL unit research, University of Constantine1. No previous phytochemical or pharmacological properties have been reported.

2.2. Extracts preparation

Dry aerial parts of *L. tingitana* (1285 g) were macerated with 80% aqueous methanol at room temperature four times. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in water (514 ml). The resulting solution was extracted successively with PE (1 × 200 ml), CHCl₃ (3 × 200 ml), AcOEt (3 × 200 ml) and *n*-BuOH (11 × 200 ml). Combined solutions were concentrated under reduced pressure and dried (PE: 3 g, 0.23%; CHCl₃: 8 g, 0.62%; AcOEt: 7 g, 0.54%; *n*-BuOH: 61g, 4.74%).

2.3. GC-MS analysis

The PE extract was investigated by capillary gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). An Agilent gas chromatograph Model 7890, coupled to a Agilent MS model 5975, equipped with a DB5 MS column (30 m 0.25 mm, 0.25mm), programming from 50°C (5 min) to 300°C at 5°C 1 min - 5 min hold. Helium was used as carrier gas (1.0 ml min⁻¹); injection was in split mode (1:100); injector and detector temperatures were 250°C and 280°C, respectively.

2.4. LC-MS analysis

The *n*-BuOH extract of *L. tingitana* was subjected to the LC-MS screening looking for known secondary metabolites of the genus *Linaria*. The profile (Figure 2) was performed on a Hewlett–Packard (Palo Alto, CA, USA) Model 1100 Series liquid chromatograph coupled to a Photo Diode Array detector (Agilent, Palo Alto, CA, USA) 1100 Series, and to an Esquire LC–ion trap mass spectrometer (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray ionisation (ESI) interface. The Photo Diode Array detector was set at 200–700 nm and the UV-channel at 204, 234, 254, 470, 665 nm. The system was A=H₂O + 0.1% formic acid, B=CH₃OH + 0.1% formic acid, with gradient: A=80% to 0% 40 min of analysis, the split of the column effluent was used to achieve a flow rate of 1 ml/min into the mass spectrometer. The LC-MS was run on a phenomenexKinetex C18 (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle diameter, end-capped). High-purity nitrogen was used as the nebulizer, also as the drying gas at 300 °C at a constant flow rate of 6 l/min. Full scan spectra were acquired in negative and positive ion mode in the region *m/z* 100–1000, adopting the following parameters: trap drive units, 55.1; capillary exit voltage, –120.4 V; skimmer 1 voltage, –43.3 V. MS/MS fragmentation experiments were performed on the selected precursor ion. Data Analysis (Version 3.0, BrukerDaltonik GmbH) was used to analyze the mass spectra.

2.5. Antimicrobial activity

In order to determine the antimicrobial activity of *Linaria tingitana*, *In vitro* antibacterial and antifungal activities were examined for petroleum ether and *n*-BuOH extracts.

2.5.a. Test microorganisms

Three bacterial strains and two fungal strains were used in this study in which two bacteria were Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus sp.*) and one Gram negative (*Escherichia coli*). However the fungal strains were one yeast (*Yarrowia sp.*) and one mold (*Alternaria sp.*). The microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were obtained from the institute of Pasteur, Algeria. While *Bacillus sp.*, *Yarrowia sp.* and *Alternaria sp.* were obtained from Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity (LaMyBAM), University Constantine 1, Algeria.

2.5. b. Culture media

Nutrient Agar media (GN: peptone 10 g, Beef extract 5 g, Sodium chloride 5 g, Agar 15 g; distilled water 1L), Mueller Hinton Agar (MH: Beef, infusion from, 300 g; Casein acid hydrolysate, 17.5 g; Starch, 1.5, Agar, 17 g; distilled water 1L), Yeast Starch Agar (YSA: Yeast extract, 4g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g; Soluble starch, 15 g; agar, 20 g; 1/4L water; 3/4L distilled water), Potato Dextrose Agar (PDA: D-glucose, 20 g; Potato extract, 200 g; Agar, 20 g; distilled water 1L).

The antibacterial activity was evaluated according to the plate diffusion method [27]. Bacterial organisms were grown on GN and MH for 24 h in plats at 37°C for *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and 30°C for *Bacillus sp.* However, the antifungal activity was investigated using plate diffusion method on YSA for *Yarrowia sp.* and on PDA for *Alternaria sp.* this method was based on diffusion capacity of test chemicals through agar medium [28]. The plates were then incubated at 30°C between 48 h to 72 h. The diameter of zone of inhibition of both extracts and activities were measured.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary phytochemical screening

Using different chromatographic methods, we have investigated two PE and *n*-BuOH extracts from the aerial parts of *L. tingitana* looking for their chemical composition. The PE extract was investigated with GC-MS method, fifteen peaks were detected while nine were determinates as methyl esters (Figure 1; Table 1). Methyl palmitate (MP, methylester of palmitic acid, 53.83 %), Methyl oleate (MO, methylester of oleic acid, 21.28 %) and Methyl stearate (MS, methylester of stearic acid, 15.81 %) are the major constituents of PE extract. Methyl palmitate is an endogenous naturally occurring fatty acid methyl ester [29]. This major compound (MP) known for many biological activities like androgenic activity [30], anti-inflammatory [31-33], antioxidant and anti-fibrotic effects [33]. No previous research recorded the antimicrobial of MP or MO but many oils and plants extracts containing these two compounds knowing for good antimicrobial properties [34-36].

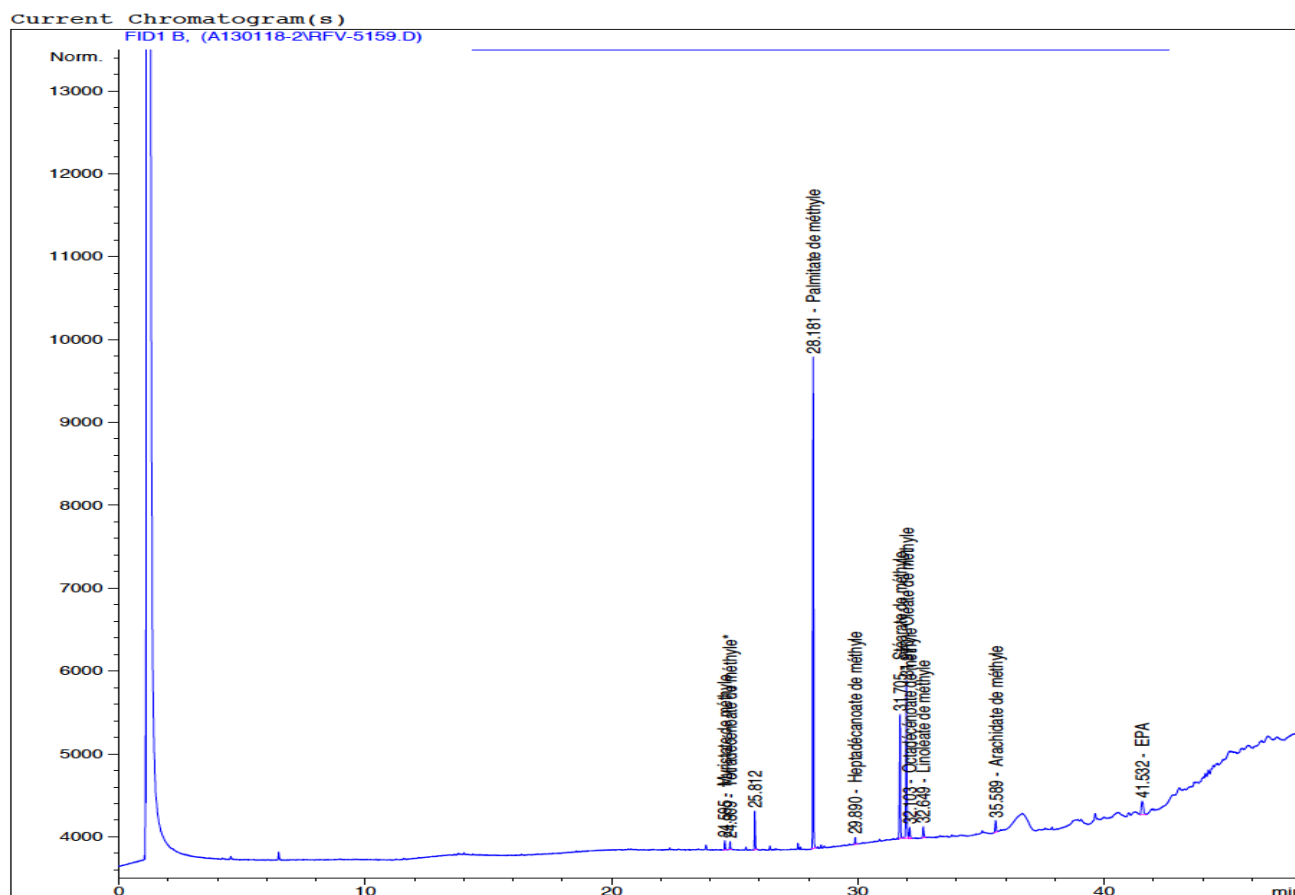


Figure 1: GC-MS profile of PE extract.

Using another chromatographic method, we have investigate the *n*-BuOH extract with LC-MS using a known profile for flavonoids, many constituents (figure 2) were detected but we are unable to determinate their structures. We think that the present constituents most of them are flavonoids and terpenoids.

Table 1:Chemical composition of the petroleum ether extract of *L. tingitana*

Compound	R _t (min)	%
Methyl myristate	24.595	1.04812
Methyl tetradecenoate	24.809	0.99960
Methyl palmitate	28.181	53.83782
Methyl heptadecanoate	29.890	0.83461
Methyl stearate	31.705	15.81679
Methyl oleate	31.970	21.28226
Methyl octadecenoate	32.103	1.48831
Methyl linoleate	32.649	1.69678
Methyl arachidate	35.589	1.78081
Total		98.7851

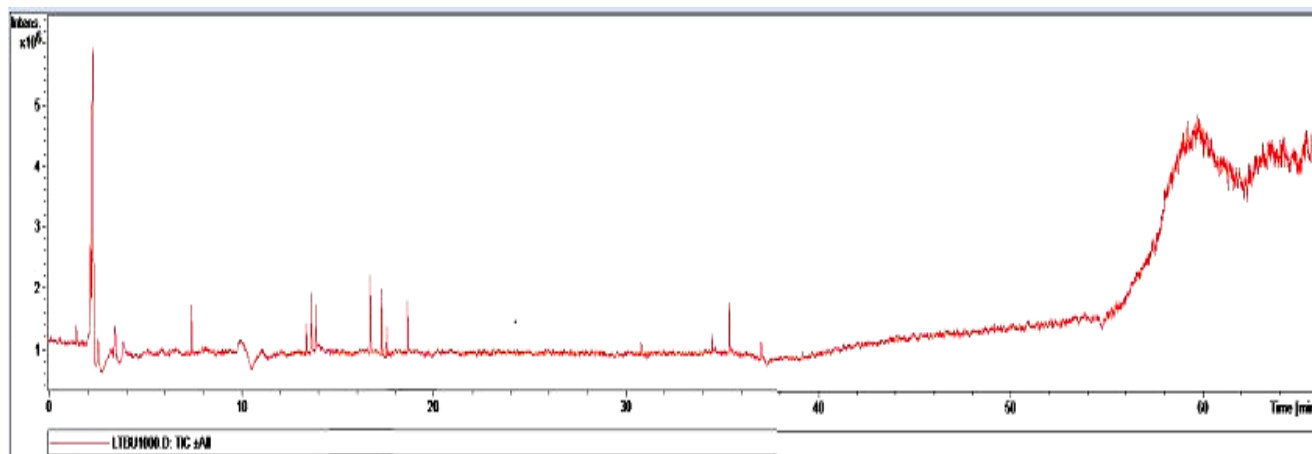


Figure 2: LC-MS profile of the *n*-BuOH extract

3.2. Microbial activity

Antibacterial and antifungal potential of extracts were assessed in terms of inhibition zone of bacterial growth. The results of the antibacterial and antifungal activities are presented in table 2.

The evaluation of the antimicrobial activity of both extracts PE and *n*-BuOH against bacterial strains with two Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus sp.*), one Gram negative (*Escherichia coli*) and two fungus (*Yarrowia sp.* and *Alternaria sp.*) showed that both extracts develop fairly well activity against Gram positive strains, especially against *Bacillus sp.*, (figure 3) but no activity was observed against Gram negative strain or against fungus. Calce et al. [37] showed that among the tested fatty acids, oleate and linoleate acids exhibited the better antimicrobial activity against Gram positive bacteria (*S. aureus*) compared with Gram negative bacteria. In another study, various fatty acids of *Agaricus* species did not show any antibacterial activity against Gram-negative bacteria at test concentration; however, Gram-positive bacteria were inhibited by these extracts [38].

Various studies have investigated the antimicrobial effect of different plants against bacterial and fungal strains [39-43]. Nevertheless, to our knowledge, no study has been reported concerning the antimicrobial activity of *Linaria tingitana*. Only one previous research presents the antimicrobial activity of *L. corifolia* Desf. [22], the author mentioned that the ethanol extract of this spice showed a good antibacterial activity against Gram positive but no significant activity was found against Gram negative which is very similar to our results. The chemical composition plays a role of the biological activity like in our case the genus *Linaria* is very well known for the presence of iridoids, diterpenoids and flavonoids but not common for alkaloids which make us understand the microbial activity results.

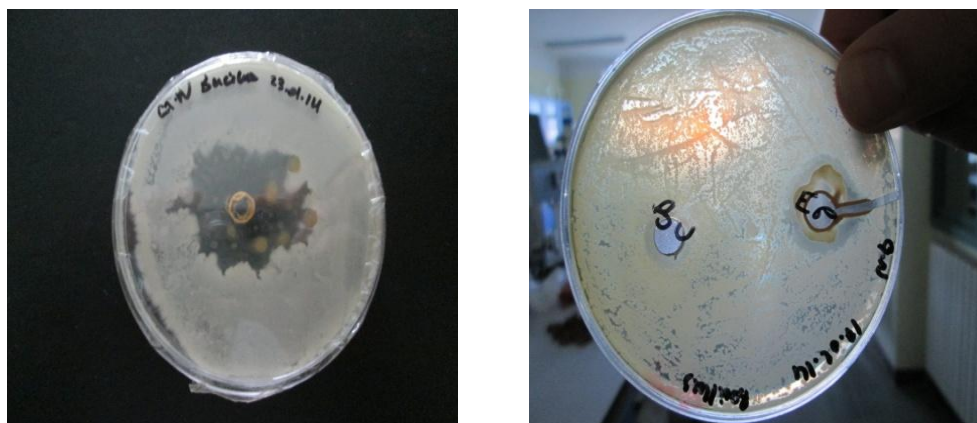


Figure 3: inhibition zone of PE and *n*-BuOH against *Bacillus* sp.

Table 2: Antimicrobial activity of PE and *n*-BuOH extracts of *L. tingitana*

extracts	Diameter of zone of inhibition (mm)				
	Microorganisms				
	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>S. aureus</i> (Gram +)	<i>Bacillus</i> sp.(Gram +)	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Yarrowia</i> sp.
PE	0	9	10	0	0
<i>n</i> -BuOH	0	1	6	0	0

Conclusion

This study about one *Linaria* species, *L. tingitana* which is an endemic spice for Algeria present the chemical composition and antimicrobial activity of PE and *n*-BuOH extracts. Good results were observed against Gram positive bacteria which are in compatibility with a previous research on one *Linaria* species. This confirms the effect of the present compounds in the PE extract with previous researches on the methyl esters compositions.

The uses of the many *Linaria* species in the folk medicine need to be understood, and also to investigate the corresponding constituents for their biological effects, in Algeria which the genus *Linaria* is very distributed with 39 species and sub-species. The need for more researches about the biological effects and the chemical composition of *Linaria* genus is important, further study is needed on the selected plant.

Acknowledgements-The author thanks Pr. Noredine Kacem Chaouche and Dr. Youcef-Ali Mounia, University of Constantine 1 for the help of the evaluation of biological activity and also Adriano Sterni, University of Trento for LC-MS recording.

References

- Handjiva N.V., Ilierva E.I., Spassov S.L., Popov S.S., *Tetrahedron* 49 (1993) 9261.
- Quezel P., Santa S., Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol II. Edition C.N.R.S: Paris, 1963, 844.
- PDR for Herbal Medicines, 1st Ed. Medical Economics Company: New Jersey, 1998, 683.
- Hua H., Cheng M., Li X., Pei Y., *Chem. Pharm. Bull.* 50 (2002) 1393.
- Otsuka H., *Phytochemistry* 32 (1993) 979.
- Kitagawa I., Tani T., Akita K., Yosioka I., *Chem. Pharm. Bull.* 21 (1973) 1978.
- San Feliciano A., Gordaliza M., Miguel Del Corral J.M., De La Puente M.L., *Phytochemistry* 33 (1993) 631.
- Boukef M.K., Médecine traditionnelle et pharmacopée. ISBN. 1986.
- Baytop T., Therapy with Medicinal Plants (Past and Present), Vol II. Edition Nobel Tip Kitabevleri Ltd.: Istanbul, 1999, 373.
- Otsuka H., *J. Nat. Prod.* 57 (1994) 357.
- Bianco A., Guiso M., Martino M., Nicoletti M., Serafini M., Tomassini L., Mossa L., Poli F., *Phytochemistry* 42 (1996) 89.
- Otsuka H., *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 1252.
- Tundis R., Deguin B., Loizzo M.R., Bonesi M., Statti G.A., Tillequin F., Menichini F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 4757.

14. San Feliciano A., Gordaliza M., Miguel del Corral J.M., de la Puente M.L., Garcia-Granda S., Salvado M.A., *Tetrahedron* 49 (1993) 9067.
15. Gordaliza M., del Corral J.M.M., Mahiques M.M., Castro M.A., San Feliciano A., *Phytochemistry* 40 (1995) 1307.
16. Otsuka H., *Phytochemistry* 37 (1994) 461.
17. Bianco A., Guiso M., Ballero M., Foddai S., Nicoletti M., Piccin A., Serafini M., Tomassini L., *Nat. Prod. Res.* 18 (2004) 241.
18. Hua H., Hou B., Li W., Li X., Zhang Y., *Zhongcaoyao* 31 (2000) 409.
19. Ercil D., Sakar M.K., Del Olmo E., San Feliciano A., *Turkish J. Chem.* 28 (2004) 133.
20. Gordaliza M., Del Corral Jose M.M., De La Puente M.L., Garcia-Gravalos M.D., San Feliciano A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 1649.
21. Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti G.A., Deguin B., Tillequin F., Menichini F., Houghton P.J., *Nat. Prod. Commun.* 2 (2007) 759.
22. Gonuz A., Dujger B., Kargioglu M., *Pakistan. J. Biol. Sci.* 8 (2005) 220.
23. Akkol E.K., Ercil D., *Pharmac. Biol.* 47 (2009) 188.
24. Vrchovska V., Spilkova J., Valentao P., Sousa C., Andrade P.B., Seabra R.M., *Nat. Prod. Res.* 22 (2008) 735.
25. Aydogdu I., Zihnioglu F., Karayildirim T., Gulcemal D., Alankus-Caliskan O., Bedir E., *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 841.
26. Cheriet T., Aouabdia S., Mancini I., Defant A., Seghiri R., Boumaza O., Mekkiou R., Sarri D., León F., Brouard I., Benayache F., Benayache S., *Der Pharmacia Lett.* 6 (2014) 54.
27. Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A., Barakate M., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2007) 1503.
28. Perez C., Paul M., Bazerque P., *Acta. Biol. Med. Exp.* 15 (1990) 113.
29. Lough A.K., Felinski L., Garton G.A., *J. Lipid Res.* 3 (1962) 478.
30. Seres A.B., Ducza E., Báthori M., Hunyadi A., Béni Z., Dékány M., Hajagos-Tóth J., Verli J., Gáspár R., *J. Ethnopharmacol.* 153 (2014) 446.
31. Cai P., Kaphalia B.S., Ansari G.A.S., *Toxicology* 210 (2005)197.
32. Sarkar S., Khan M.F., Kaphalia B.S., Ansari G.A., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20 (2006) 302.
33. Sharawy M.H., El-Agamy D.S., Shalaby A.A., Ammar El-Sayed M., *Inter. Immunopharmacology* 16 (2013) 191.
34. Badoni R., Semwal D.K., Rawat U., *J. Sci. Res.* 2 (2010) 397.
35. Dos Santos Lima L.A.R., Johann S., Cisalpino P.S., Pimenta L.P.S., Boaventura M.A.D., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44 (2011) 777.
36. Okunowo W.O., Oyedeji O., Afolabi L.O., Matanmi E., *American J. Plant Sci.* 4 (2013) 1.
37. Calce E., Mignogna E., Bugatti V., Galdiero M., Vittoria V., De Luca S., *Inter. J. Biol. Macromolecules* 68 (2014) 28.
38. Öztürk M., EminDuru M., Kivrak S., Mercan-Doğan N., Turkoglu A., Özler M.A., *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 1353.
39. Bharti D., Gupta S., AroraChugh C., *Inter. J. Phytomedicine* 5 (2013) 154.
40. Ikram M., Jan G., Dad S., Nasrulah, Suliman, Fazl H., *Inter. J. Phytomedicine* 5 (2013) 475.
41. Al-Shudiefat M., Al-Khalidi K., Abaza I., Afifi F.U., *Anal. Lett.* 47 (2014) 422.
42. Al Askari G., Kahouadji A., Khedid K., Ouaffak L., Mousaddak M., Charof R., Mennane Z., *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2013) 33.
43. Krimat S., Dob T., Toumi M., Kesouri A., Noasri A., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 70.

(2015) ;<http://www.jmaterenvirosnci.com>

SECONDARY METABOLITES FROM *Linaria tingitana*

T. Cheriet¹, S. Baatouche¹, D. Sarri², P. Chalard³, R. Seghiri^{1*}, R. Mekkiou¹, O. Boumaza¹,
F. Leon⁴, S. Benayache¹, F. Benayache¹

1) Unite de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molecules Bioactives et Analyse Physico-Chimique et Biologique (VARENBIOMOL), Universite Constantine 1, 25000, Algeria, e-mail: seghiri25000@yahoo.fr

2) Departement de Biologie, Universite de M'sila, 28000 M'sila, Algeria

3) Clermont Universite, ENSCCF, EA 987, LCHG, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

4) Instituto de Productos Naturales y Agrobiologia-C.S.I.C.-Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio Gonzalez", Universidad de La Laguna, Av. Astrofisico F. Sanchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

The genus *Linaria* belongs to the *Scrophulariaceae* family and comprises about 200 species [1]. It is represented by 39 in Algeria [2]; several species have been used in folk medicine as tonics, antiscorbutics, laxatives, antidiabetics, and diuretics [3, 4]. Previous work on this genus has shown the presence of iridoids, diterpenoids, flavonoids, alkaloids, and phenylethanoids [4–9].

The aim of the present study is to investigate phytochemical constituents of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut., which is an endemic spice. No previous phytochemical or pharmacological properties of this plant have been reported.

Aerial parts of *Linaria tingitana* were collected during the flowering phase in May 2009 in El Kala (eastern Algeria) and authenticated by Dr. D. Sarri based on Quezel and Santa [2]. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL Unit Research, University of Constantine under No. 08/2009/CCN12.

The dried powder of aerial parts (1285 g) of *Linaria tingitana* was macerated with MeOH–H₂O (80:20 v/v) for 48 h three times; after filtration, the MeOH extract was concentrated to dryness and the remaining aqueous solution extracted successively with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc, and *n*-BuOH. The chloroform extract was fractionated by CC (silica gel; hexane–EtOAc step gradients) to yield **1–4**. The ethyl acetate extract was fractionated by CC (silica gel; CHCl₃–MeOH step gradients) and separated on TLC silica gel to yield **5–8**. Methanol washing of the white crystals found in the *n*-butanolic extract yielded compound **9**, which appeared to be a sugar.

The isolated compounds were identified using UV, MS, and 1D and 2D NMR data and determined as β -amyrin (**1**), β -sitosterol (**2**), stigmasterol (**3**), diosmetin (**4**), daucosterol (**5**), hypolaetin-4'-methyl ether (**6**), luteolin-3',4'-dimethyl ether (**7**), hypolaetin (**8**), and glucose (**9**).

β -Amyrin (1): white crystals; C₃₀H₅₀O; mp 196–198°C [4].

β -Sitosterol (2): white crystals; C₂₉H₅₀O; mp 134–135°C [10].

Stigmasterol (3): white crystals; C₂₉H₄₈O; mp 166–168°C [10].

Diosmetin (4): yellow amorphous; C₁₆H₁₂O₆; mp 254°C. UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 344, 270 [11, 12].

Daucosterol (5): white powder; C₃₅H₆₀O₆; mp 290°C [6, 13].

Hypolaetin-4'-methyl ether (6): yellow amorphous, mp 263°C; C₁₆H₁₂O₇. UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 343, 270; +NaOH: 384, 270; +AlCl₃: 383, 278; +AlCl₃/HCl: 383, 278; +NaOAc: 356, 276; +NaOAc/H₃BO₃: 349, 270. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm, J/Hz): 7.42 (1H, dd, J = 2.1, 8.5, H-6'), 7.39 (1H, d, J = 2.1, H-2'), 7.04 (1H, d, J = 8.5, H-5'), 6.49 (1H, s, H-3), 6.09 (1H, s, H-6), 3.84 (1H, s, 4'-OCH₃) [14].

Luteolin-3',4'-dimethyl ether (7): yellow amorphous, C₁₇H₁₄O₆. UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 346, 269; +NaOH: 384, 269; +AlCl₃: 378, 263; +AlCl₃/HCl: 384, 276; +NaOAc: 356, 275; +NaOAc/H₃BO₃: 349, 270. ¹H NMR (250 MHz, MeOD-d₄, δ , ppm, J/Hz): 7.53 (1H, dd, J = 2.3, 8.6, H-6'), 7.43 (1H, d, J = 2.3, H-2'), 7.15 (1H, d, J = 8.6, H-5'), 6.63 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, d, J = 2.1, H-8), 6.25 (1H, d, J = 2.1, H-6), 3.99 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 4'-OCH₃) [15].

Hypolaetin (8): yellow amorphous, C₁₅H₁₀O₇; mp 287–291°C. UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 350, 268; +NaOH: 401, 268; +AlCl₃: 397, 269; +AlCl₃/HCl: 383, 276; +NaOAc: 390, 269; +NaOAc/H₃BO₃: 375, 261. ¹H NMR (250 MHz, MeOD-d₄, δ , ppm, J/Hz): 7.42 (1H, dd, J = 2.6, 8.9, H-6'), 7.4 (1H, d, J = 2.6, H-2'), 6.92 (1H, d, J = 8.9, H-5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, s, H-6) [16].

Thus, these nine compounds were isolated from *L. tingitana* for the first time. Compounds **6**, **7**, and **8** were described for the first time in the genus *Linaria*, while compound **6** was described for the first time in the scrophulariaceae family.

REFERENCES

1. N. V. Handjieva, E. I. Ilieva, S. L. Spassov, S. S. Popov, *Tetrahedron*, **49** (41), 9261 (1993)
2. P. Quezel, S. Santa, in: *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Desertiques Meridionales*, Vols. 1–2, Ed. CNRS, Paris, France, 1963
3. M. Pahlow, *El Gran Libro de las Plantas Medicinales*, fourth ed., Everest S. A., Madrid, 1979
4. D. Ercil, M. K. Sakar, E. Del Olmo, A. San Feliciano, *Turk. J. Chem.*, **28**, 133 (2004)
5. A. Bianco, M. Guiso, M. Martino, M. Nicoletti, M. Serani, L. Tomassini, L. Mossa, F. Poli, *Phytochemistry*, **42**, 89 (1996)

6. R. Tundis, B. Deguin, M. R. Loizzo, M. Bonesi, G. A. Statti, F. Tillequin, F. Menichini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4757 (2005)
7. M. Gordaliza, J. M. Miguel Del Corral, M. M. Mahiques, M. A. Castro, A. San Feliciano, *Phytochemistry*, **40**, 1307 (1995)
8. H. Hua, M. Cheng, X. Li, Y. Pei, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1393 (2002)
9. H. Otsuka, *Phytochemistry*, **32**, 979 (1993)
10. R. Kapoor, A. K. Rishi, C. K. Atal, *Fitoterapia*, **56**, 296 (1985)
11. A. V. Degot, N. S. Fursa, V. G. Zaitsev, E. A. Chaika, T. P. Popova, V. I. Litvinenko, Yu. I. Kornievskii, *Chem. Nat. Compd.*, **19**, 370 (1983)
12. M. Kouichi, T. Takashi, K. Isao, F. Toshihiro, Y. Yuki, I. Kanji, *J. Nat. Med.*, **65**, 172 (2011)
13. H. Ghopur, S. K. Usmanova, A. Ayupbek, H. A. Aisa, *Chem. Nat. Compd.*, **48**, 562 (2012)
14. P. Xia, S. Song, Z. Feng, P. Zhang, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **34**, 2604 (2009)
15. J. H. S. Luciano, M. A. S. Lima, E. R. Silveira, I. M. Vasconcelos, G. S. Fernandes, E. B. De Souza, *Quim. Nova*, **33**, 292 (2010)
16. R. C. Chiste, A. Z. Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. da Costa Lima, N. Bragagnolo, *Food Chem.*, **127**, 419 (2011)

Поступило в редакцию 18.12.13