

République Algérienne Démocratique Et Populaire

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR
BATNA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Spécialité : *Chimie Organique*

Présenté par :

FERHAT MARIA

THEME

METABOLITES SECONDAIRES DE *LINARIA*
AEGYPTIACA (SCROPHULARIACEAE)

JURY

Amar DIBI

Mohammed BENKHALED

Belkacem LEGSEIR

Kaddour LAAMARA

Abdelhamid BENKOUIDER

Prof.- Université de Batna

Prof.- Université de Batna

Prof.- Université de Annaba

Prof.- Université d'Oum El Bouaghi

M.C.- Université de Batna

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Année Universitaire : 2009-2010



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

METABOLITES SECONDAIRES DE
LINARIA AEGYPTIACA
(SCROPHULARIACEAE)

MEMOIRE DE MAGISTER

Présenté par :

FERHAT MARIA

JURY

<i>Amar DIBI</i>	<i>Prof.- Université de Batna</i>	<i>Président</i>
<i>Mohammed BENKHALED</i>	<i>Prof.- Université de Batna</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Belkacem LEGSEIR</i>	<i>Prof.- Université de Annaba</i>	<i>Examineur</i>
<i>Kaddour LAAMARA</i>	<i>Prof.- Université d'Oum El Bouaghi</i>	<i>Examineur</i>
<i>Abdelhamid BENKOUIDER</i>	<i>M.C.-Université de Batna</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2009-2010

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu puissant de m'avoir procuré patience et volonté durant toutes les années de mes études.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans le Laboratoire de Synthèse Organique et de Phytochimie du Département de Chimie, de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna sous la direction de Monsieur **Mohammed Benkhaled**.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier vivement Monsieur le Professeur **Mohammed Benkhaled**, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait bénéficier de son expérience, sa rigueur scientifique et professionnelle, sa compétence et ses encouragements, son attention, ses réactivité et optimisme. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **Amar Dibi**, Professeur à l'Université de Batna, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

J'aimerais également exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur **Belkacem Legseir**, de l'Université de Annaba, Monsieur le Professeur **Kaddour Laamara**, de l'Université d'Oum El Bouaghi et Monsieur **Abdelhamid Benkouider**, Maître de conférences de l'Université de Batna, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Un grand merci au Docteur **Hassina Harkat** pour ses conseils dans le domaine de la phytochimie, ses commentaires, sa patience et son soutien pendant la période ardue qu'est la rédaction.

Je souhaite encore remercier Monsieur le Docteur **Hamada Haba** et le Docteur **Souad Arrif** pour leur aide précieuse et leurs conseils tout le long de mon travail de mémoire.

J'adresse de sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Tahar Bendaikha**, de l'université de Batna, pour la réalisation des spectres infra-rouge.

Mes plus vifs remerciements au Professeur **Catherine Lavaud**, de l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, pour la réalisation des spectres de RMN, **Christophe Long** du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597- Toulouse pour la réalisation des spectres de masse.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail : **Boutamja Mabrouka, Nadia Hammami, Amel Agagna, Habiba Laraoui, Samira Bouali, Ihcen Gasmi**.

Toute ma gratitude va à mes parents pour leur soutien sans faille et permanent, qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études.

Un énorme merci à mes sœurs **Radhia** et **Imene**, et mes frères, **Mohammed** et **Radhouane**, pour l'amour qu'ils me portent et à qui je souhaite plein de bonnes choses...

ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

Abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
AlCl ₃	chlorure d'aluminium
All	allose
CC	chromatographie sur colonne
CCM	chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CD ₃ OD	méthanol deutéré
CHCl ₃	chloroforme
COSY	spectroscopie de corrélation
CPP	chromatographie sur plaque préparative
1D	monodimensionnel
2D	bidimensionnel
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublet
<i>ddd</i>	doublet de doublet de doublet
DMSO- <i>d</i> ₆	diméthylsulfoxyde hexadeutéré
ESI	electroSpray Ionisation
g	gramme
Glc	glucose
H ₂ O	eau
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation
IR	infra-rouge
<i>m</i>	multiplet
Me	méthyle
MeOH	méthanol
mg	milligramme
ml	millilitre
MS	mass spectrometry
nm	nanomètre

<i>nd</i>	non déterminer
NOE	nuclear overhauser effect
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
RX	rayons X
RMN ¹ H	résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	résonance magnétique nucléaire du carbone
RP-18	reversed phase silica with C-18 functional groups
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
<i>t</i>	triplet
TMS	tétraméthylsilane
UV	ultra-violet

Symboles

Hz	hertz
<i>J</i>	constante de couplage
<i>m/z</i>	masse/ charge électrique
MHz	mégahertz
ppm	partie par million
uma	unité de masse atomique
°C	degré Celsius
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
λ	longueur d'onde
(1), (2), (3),...	désignations des composés mentionnés dans la littérature
1, 2, 3...	désignations des composés naturels isolés dans le travail présent
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
-------------------	---

Chapitre I- Rappel bibliographique

I.1 Description de la plante étudiée.....	5
I.1.1 Données botaniques.....	5
I.1.1.1 Introduction.....	5
I.1.1.2 Position systématique des Scrophulariaceae.....	5
I.1.1.3 Caractéristiques botaniques.....	6
I.2 Propriétés biologiques et pharmacologiques.....	7
I.2.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	7
I.2.2 Activités biologiques.....	7
I.3 Etudes chimiques antérieurs.....	8

Chapitre II- Etude des iridoïdes

II.1 Structure des iridoïdes.....	19
II.2 Classification des iridoïdes.....	20
II.2.1 Iridoïdes simples.....	21
II.2.2 Iridoïdes glycosilés.....	21
II.2.3 Sécoiridoïdes.....	22
II.2.4 Bisiridoïdes.....	23
II.2.5 Iridoïdes lactones.....	23
II.2.5.1 Iridoïdes lactones de type I.....	24
II.2.5.2 Iridoïdes lactones de type II.....	25
II.3 Activités biologiques des iridoïdes.....	26
II.4 Biosynthèse des iridoïdes.....	27

Chapitre III- Résultats et discussion

III.1 Extraction.....	31
III.1.1 Matériel végétal.....	31
III.1.2 Fractionnement de l'extrait méthanolique.....	32

III.2 Détermination de structure des composés isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes.....	34
III.2.1 Elucidation structurale du composé 1	34
III.2.2 Elucidation structurale du composé 2.....	39
III.2.3 Elucidation structurale du composé 3.....	47
III.2.4 Elucidation structurale du composé 4	55
III.2.5 Elucidation structurale du composé 5	63
Conclusion	70
Bibliographie	74

Chapitre IV- Partie expérimentale

IV.1 Matériels et appareillage	81
IV.1.1 Récolte de la plante <i>Linaria aegyptiaca</i>	81
IV.1.2 Chimie extractive	81
IV.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	81
IV.1.2.2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	81
IV.1.2.3 Chromatographie sur plaque préparative (CPP).....	81
IV.1.3 Chimie structurale	82
IV.1.3.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	82
IV.1.3.2 Spectroscopie de masse (SM).....	82
IV.1.3.3 Spectrométrie UV-visible.....	82
IV.1.3.4 Spectrométrie infrarouge (IR).....	82
IV.1.3.5 Radio-cristallographie	82
IV.1.3.6 Pouvoir rotatoire.....	82
IV.2 Etude de l'espèce <i>Linaria aegyptiaca</i>	83
IV.2.1 Fractionnement et purification.....	83
a. Etude des fractions F2, F3 et F4	84
1.a. Etude des fractions F'32, F'33	86
2.a Etude des fractions F'17 à F'22.....	86
3.a Etude de la fraction F'38.....	87
b. Etude de la fraction F1.....	87
c. Etude de la fraction F8.....	87
IV.3 Constantes physique et données spectrales des composés isolés.....	89
IV.3.1 Composé 1	89
IV.3.2 Composé 2	90

IV.3.3 Composé 3	92
IV.3.4 Composé 4	94
IV.3.5 Compose 5	96
Résumé	98

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les plantes constituent depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui, une majorité de la population mondiale (près de 80%), plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments. Ainsi 170.000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes: digitaline, quinine, morphine, artémisine sans oublier le taxol. Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires issus du règne végétal pour trouver de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Le présent travail rentre dans ce contexte et s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, notamment des Aurès et Nord Sahara, par la découverte de principes actifs nouveaux. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique d'une plante de la famille Scrophulariaceae, *Linaria aegyptiaca*, plante commune dans le sud Oranais et Marocain, le Tidikelt (Adrar) et le Hoggar. Cet intérêt est motivé par la richesse des plantes Scrophulariaceae en iridoïdes connus pour leurs diverses activités biologiques (notamment anti-inflammatoires) d'une part, et le fait qu'elle n'a été soumise antérieurement à aucune investigation chimique d'autre part.

La première partie de ce travail concerne tout d'abord l'état des connaissances bibliographiques, botaniques et phytochimiques sur cette plante et son genre. Elle commence par une description botanique de *Linaria aegyptiaca*, description qui permet de positionner cette espèce dans la systématique des Scrophulariaceae. Elle se poursuit par une synthèse des principaux résultats phytochimiques antérieurs sur le genre.

La deuxième partie est consacrée à une étude bibliographique impliquant la structure, la classification, l'activité biologique et enfin la biosynthèse des iridoïdes qui constituent les composés chimiques dominants de la famille Scrophulariaceae en général et du genre *Linaria* en particulier.

La troisième partie est consacrée aux travaux personnels. Les résultats de l'étude phytochimique de *Linaria aegyptiaca* seront présentés. Les différentes étapes de

fractionnement, d'isolement et d'élucidation structurale des composés isolés y seront bien détaillées.

CHAPITRE 1

Rappel

Bibliographique



I.1 Description de la plante étudiée

I.1.1 Données botaniques

I.1.1.1 Introduction

La famille Scrophulariaceae comporte environ 190 genres et 4000 espèces. Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tempérées de l'hémisphère nord^[1].

I.1.1.2 Position systématique des Scrophulariaceae

Sous-familles	Tribu	Genre
Verbascoideae	Verbasceae	<i>Verbascum</i>
Scrophularioideae	Scrophularieae	<i>Scrophularia</i>
		<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	Sibthorpieae	<i>Digitalis</i>
		<i>Veronica</i>
		<i>Bartisia</i>
		<i>Ballardia</i>
		<i>Odentites</i>
		<i>Parentucellia</i>
		<i>Pedicularis</i>

Tableau I.1 : Classification de la famille Scrophulariaceae d'après Valdés (1987)^[2].

I.1.1.3 Caractéristiques botaniques de *Linaria aegyptiaca*

Le genre *Linaria* est très largement représenté en Algérie. On y rencontre *Linaria dissita* (Hauts plateaux oranais), *Linaria laxiflora* (Mzab), *Linaria peltieri*, *Linaria tingitana* et *Linaria virgata* ^[3].

Les plantes de ce genre sont annuelles ou vivaces, parfois ligneuses. Elles ne diffèrent que par la corolle éperonnée à la base ^[4]. L'espèce *aegyptiaca*, sujet de notre travail, est un petit buisson à nombreux rameaux ^[5], dressés en général, très ramifiés, spinescents au sommet. C'est une plante vivace, finement pubescente ^[4], très variable dont on a distingué diverses formes différant notamment par des caractères de pilosité ^[5]. Les feuilles sont très petites de moins de 1 cm, hastées ou lancéolées, avec une couleur verte grisâtre ou jaunâtre ^[4]. Les fleurs sont jaunes de 12 à 15 mm.



Figure I.1 : Photographie de *Linaria aegyptiaca*



Figure I.2 : *Linaria aegyptiaca*
d'après Ozenda

I.2 Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Linaria*

I.2.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Linaria* est le plus connu de la famille Scrophulariaceae. Il inclut plusieurs espèces réputées pour leurs vertus thérapeutiques. Ainsi *Linaria vulgaris* Mill., poussant en Bulgarie ^[6], est particulièrement utilisée en médecine traditionnelle pour ses diverses propriétés: laxative, traitement des inflammations de la vessie, éruptions cutanées ainsi que les hémorroïdes ^[7]. 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 ^[8].

Linaria japonica Miq., espèce annuelle qui se rencontre en bordures de mer dans certaines régions côtières du Japon, est employée traditionnellement pour ses propriétés diurétique, purgative ^[9] et laxative ^[10].

Linaria reflexa Desf., plante connue vernaculairement sous le nom de « Oum lajrah » en raison de son pouvoir cicatrisant, est également employée en usage externe dans le traitement de certaines dermatoses ^[11].

Il en ressort que la plupart des espèces constituant le genre *Linaria* sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs diverses propriétés: laxative, spasmolytique et anti-inflammatoire, cholagogue, antirhume ^[12], antihémorroïdaire, traitement des blessures et des troubles vasculaires ^[13].

I.2.2 Activités biologiques

Il est bien prouvé que les produits naturels sont une excellente source de structures chimiques dotées d'une large diversité d'activités biologiques, y compris l'activité anticancéreuse. Cette dernière a ouvert de nouveaux champs sur les composés d'activité antitumorale ^[14]. Dans ce contexte, Tundis et collaborateurs ont mis en évidence le potentiel antitumoral de dérivés flavoniques, dont la pectolinarine, isolés de *L. reflexa* ^[15].

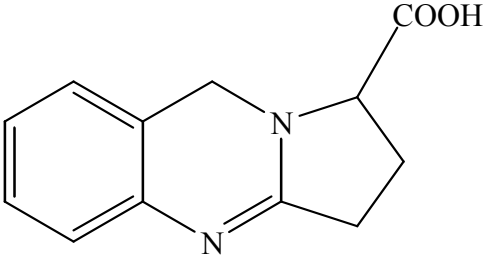
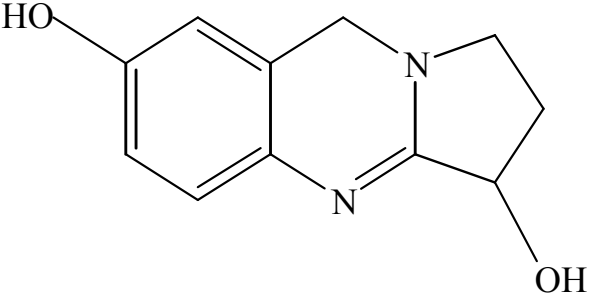
Pendant plusieurs années, Marina Gordaliza et collaborateurs ont particulièrement étudié la composition chimique de certaines variétés de *Linaria saxatilis*. Il s'avère que *L. saxatilis* var. *saxatilis*, plante native du nord et du centre de la péninsule ibérique, a fait

l'objet d'une investigation chimique qui a conduit à l'isolement de diterpénoïdes à squelette néo-clérodane. Ces derniers ont montré une activité cytotoxique contre une série de cellules cancéreuses cultivées in vitro ^[16]. Une autre étude effectuée sur l'espèce *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*, par Terencio et collaborateurs, a révélé que quelques néo-clérodanes ont un effet inhibiteur sur les enzymes impliqués dans les processus inflammatoires ^[17].

I.3 Etudes chimiques antérieures

Une recherche bibliographique exhaustive réalisée sur les plantes du genre *Linaria*, a mis en évidence l'isolement et l'identification de divers métabolites secondaires, composés essentiellement de: flavonoïdes, alcaloïdes, diterpénoïdes et iridoïdes ^[18,19]. Ces derniers, connus pour leurs diverses activités biologiques, notamment anti-inflammatoire ^[20], sont les constituants dominants du genre.

Une étude chimique effectuée sur l'extrait éthanolique des parties aériennes de *L. vulgaris* poussant en Chine, a permis d'isoler et de caractériser deux alcaloïdes à squelette pyrroloquinazoline, l'acide linarinique (**1**) et le 7-hydroxy vasicine (**2**), en plus d'un lignane à squelette pinorésinole (**3**) et un alcool phénolique nommé syringine (**4**) ^[21]. Leurs structures sont répertoriées dans le tableau I.2 ci-dessous.

NOM	STRUCTURES
Acide linarinique (1)	
7-Hydroxy vasicine (2)	

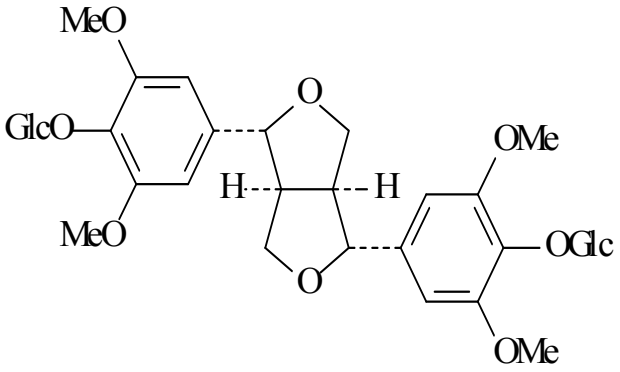
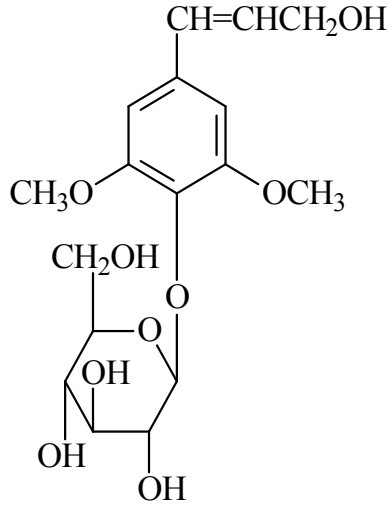
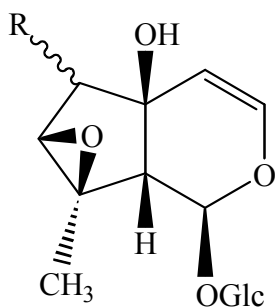
Liriodendrine (3)	
Syringine (4)	

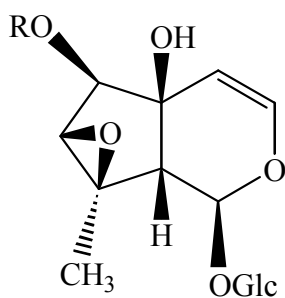
Tableau I.2 : Structures chimiques des composés isolés de *Linaria vulgaris*

D'autres études ont montré la présence d'iridoïdes au sein de cette espèce. L'antirrhinoside (5) isolé de l'extrait éthanolique ^[22] est connu comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille Scrophulariaceae. Trois autres iridoïdes de l'extrait méthanolique des parties aériennes sont : 6-O-*trans*-*p*-coumaroyl antirrhinoside (6), 6-O-*cis*-*p*-coumaroyl antirrhinoside (7) et procumbide (8) ^[23].



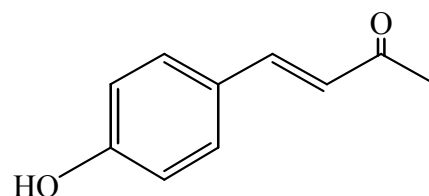
(5) R = β OH

(8) R = α OH



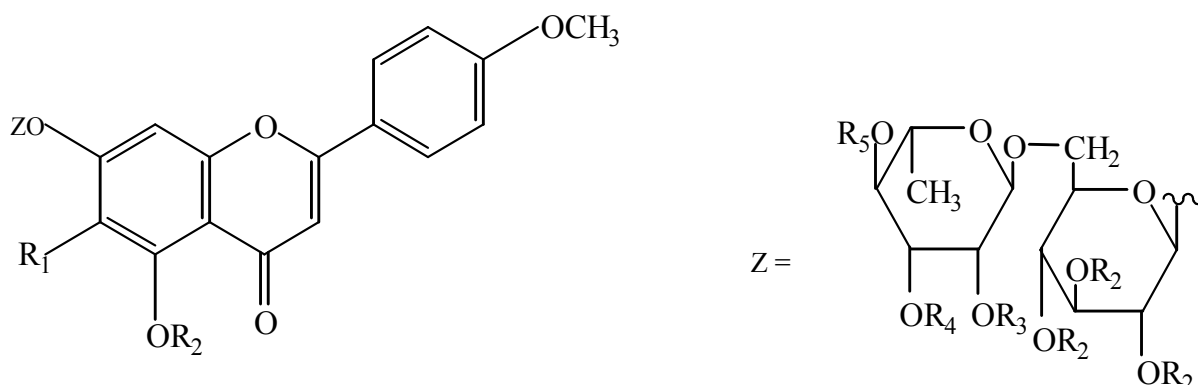
(6) R = *trans*-*p*-coumaroyl

(7) R = *cis*-*p*-coumaroyl



p-coumaroyl

Une étude chimique réalisée sur l'extrait méthanolique de *Linaria japonica*, a permis d'identifier cinq flavonoïdes glycosilés: isolinarine A (**9**) et isolinarine B (**10**) nouveaux, linarine (**11**), pectolinarine (**12**) et linariine (**13**) connus ^[24].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(9)	OMe	H	Ac	H	H
(10)	OMe	H	H	Ac	H
(11)	H	H	H	H	H
(12)	OMe	H	H	H	H
(13)	OMe	H	H	H	Ac

Une autre étude phytochimique effectuée sur le même extrait, a permis d'isoler deux phénols glycosilés appelés salidroside (**14**), syringine (**4**) et β -D-glucopyranose-1-ferulate (**15**), ainsi que cinq iridoïdes glycosilés connus. Il s'agit de: antirrhine (**16**), antirrhinoside (**5**), linarioside (**17**), linaride (**18**) et 7 β -hydroxy-8-épi-iridodial glucoside (**19**) ^[25]. Leurs structures sont répertoriées dans le tableau I.3 ci-dessous.

NOM	STRUCTURES
Salidroside (14)	The structure of Salidroside (14) shows a phenyl ring with a hydroxyl group (HO-) at position 1 and a propyl chain at position 4, which is terminated by a glucose moiety (OGlc).

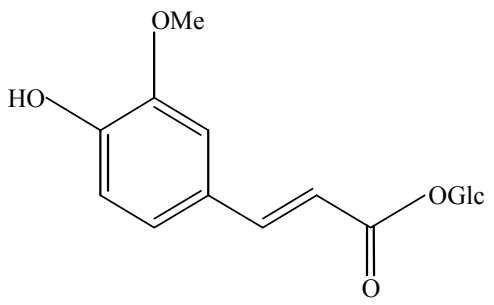
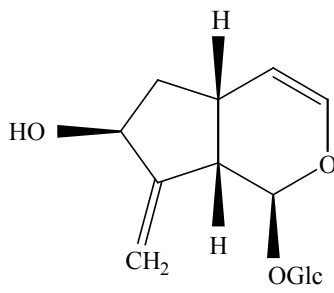
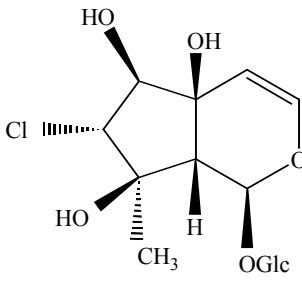
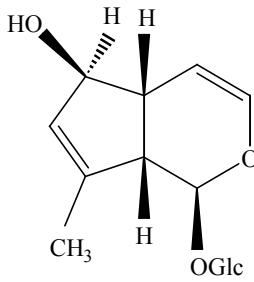
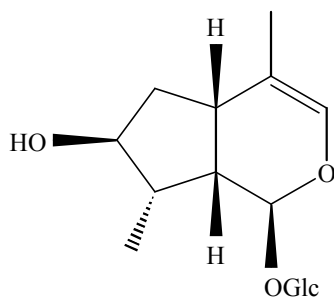
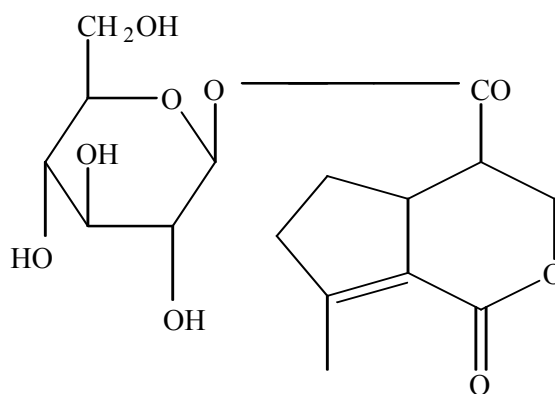
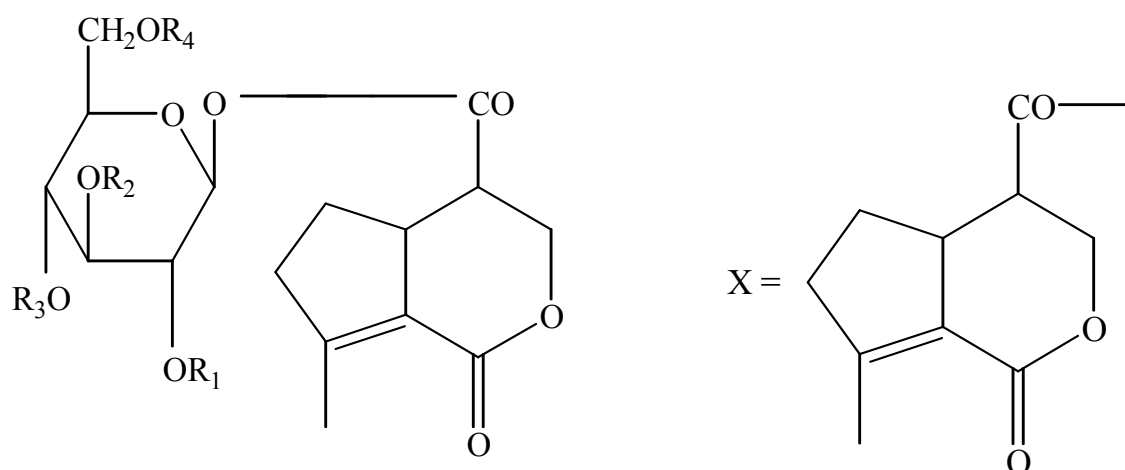
β -D-glucopyranose-1-ferulate (15)	
Antirrhide (16)	
Linarioside (17)	
Linaride (18)	
7 β -hydroxy-8-épi-iridodial glucoside (19)	

Tableau I.3 : Structures chimiques des composés isolés de *Linaria japonica*

D'autres études phytochimiques complémentaires réalisées sur le même extrait de *L. japonica* qui s'avère richement fournie en métabolites secondaires de grande importance, ont permis de séparer et d'identifier par les méthodes spectroscopiques, quatre iridolinarosides : A (20), B (21), C (22), D (23) ^[26].

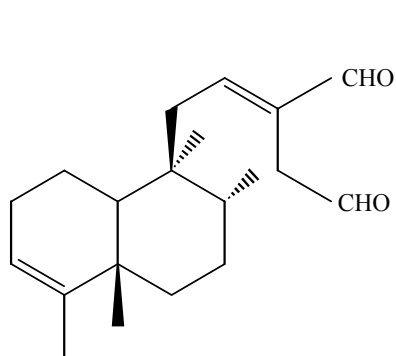


A (20)

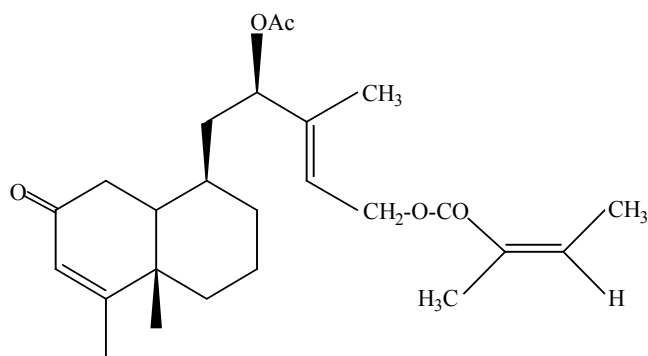


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B (21)	H	X	X	H
C (22)	X	H	X	H
D (23)	H	X	H	X

Des diterpènes dialdéhydes, nommés linaridial (24) ^[27], linarienone (25) ^[28] de type *cis*-clérodane ont été isolés de l'extrait éthéré des racines de la plante en question.

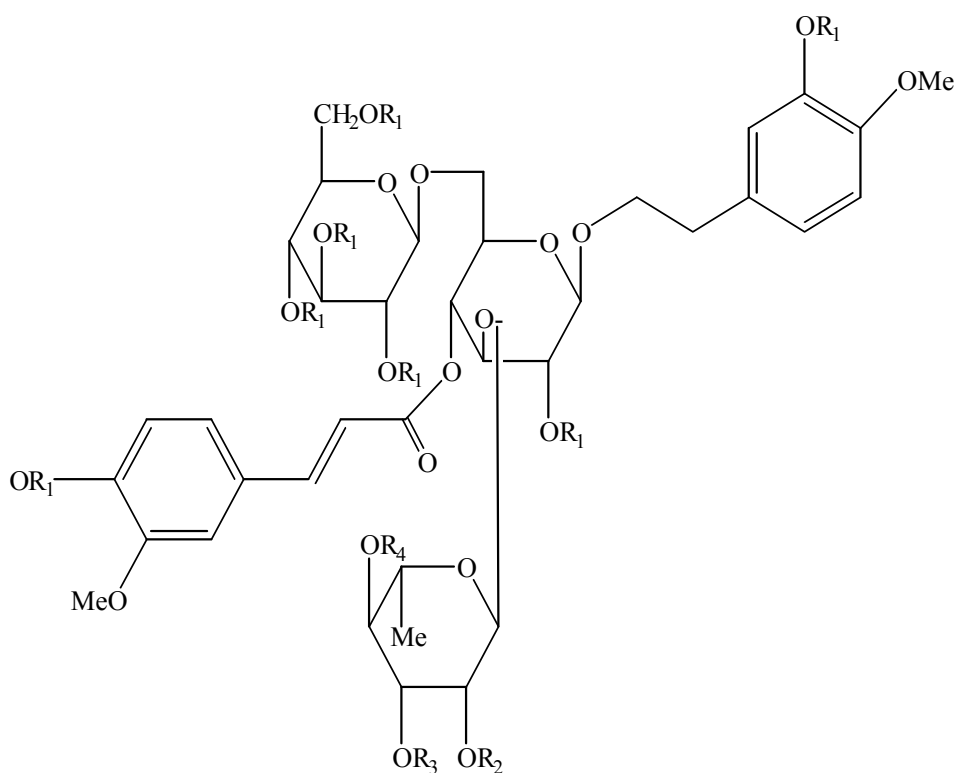


(24)

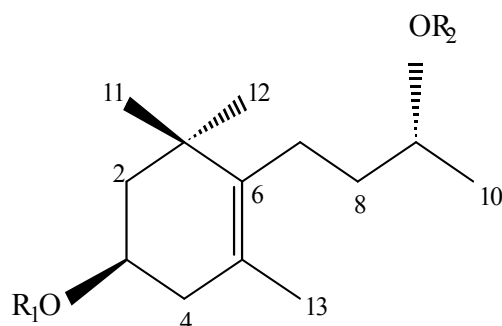


(25)

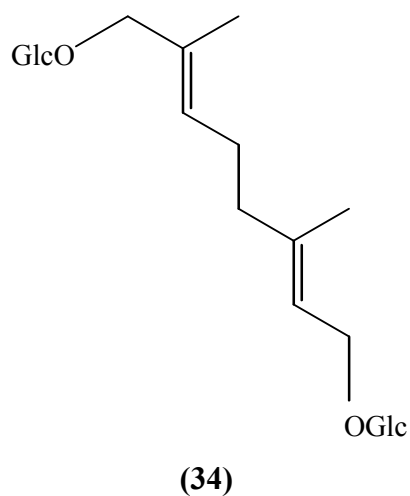
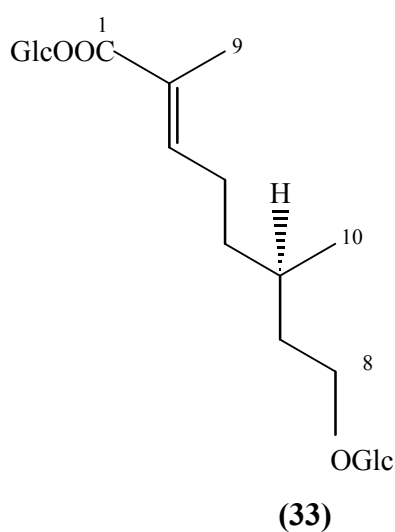
Quatre phényléthanoïdes **(26)**, **(27)**, **(28)** et **(29)** ^[29], trois ionol glycosides **(30)**, **(31)** et **(32)**, de même que deux monoterpènes acycliques diglycosilés **(33)** et **(34)**, ont été également isolés à partir de l'extrait méthanolique de *L. japonica* ^[30].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(26)	H	H	H	H
(27)	H	Ac	H	H
(28)	H	H	Ac	H
(29)	H	H	H	Ac

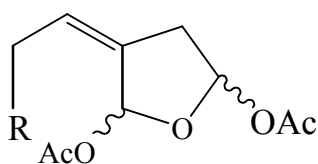
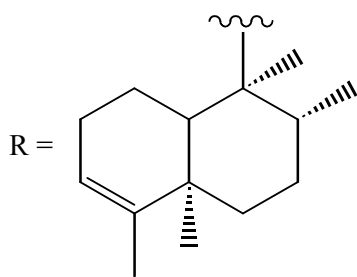


	R ₁	R ₂
Linarionoside A (30)	Glc	H
Linarionoside B (31)	H	Glc
Linarionoside C (32)	Glc	Glc

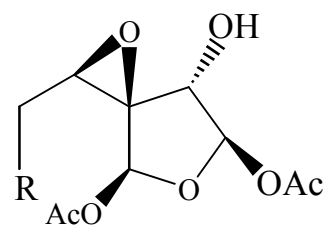


L'espèce *L. reflexa* Desf. a également fait l'objet d'une investigation chimique. Investigation qui a abouti d'isoler quatre composés flavonoïdiques : linarine **(11)**, pectolinarine **(12)** et l'isolinarine A **(9)** et B **(10)** ^[15].

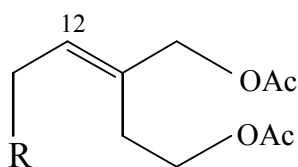
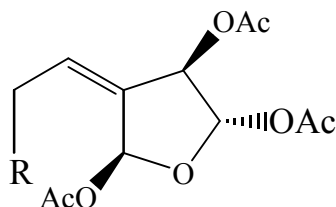
Une autre étude chimique réalisée par Marina et collaborateurs sur l'extrait hexanique des racines de *Linaria saxatilis* var. *saxatilis*, a révélé la présence de six néo-clérodane diterpénoïdes : 15,16-diacétoxy-15,16-époxy-néo-cléroda-3,12 Z-diène **(35)**, 15,16-diacétoxy-12,13-15,16-diépoxy-14-hydroxy-néo-clérod-3-ène **(36)**, **(37)**, **(38)**, **(39)** et **(40)** ^[31].



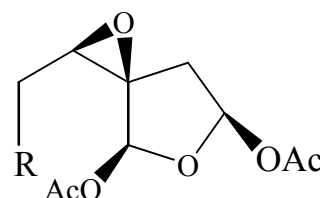
(35)



(36)

(37) : $\Delta^{12} E$ 

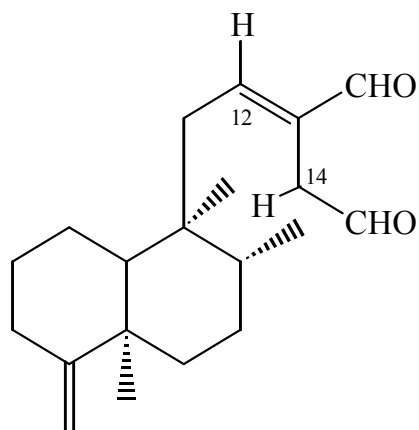
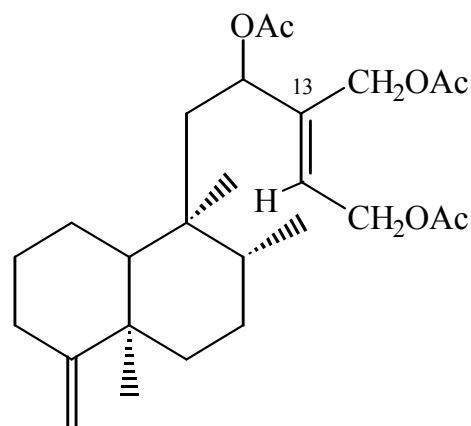
(39)



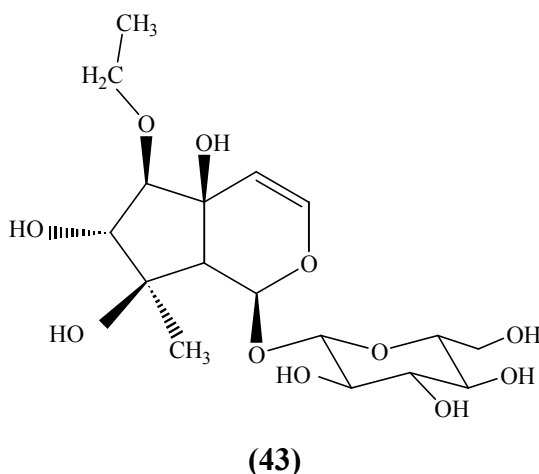
(40)

(38) : $\Delta^{12} Z$

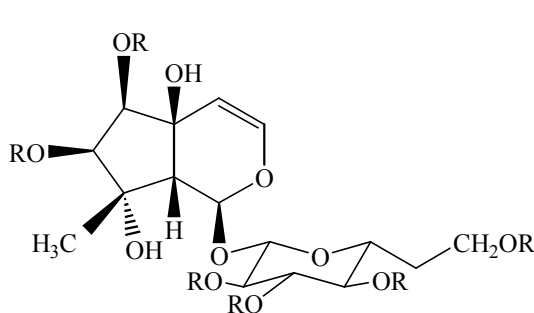
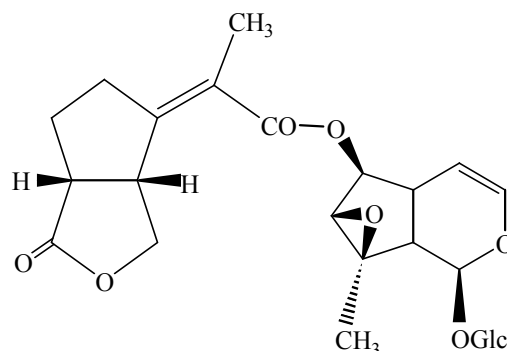
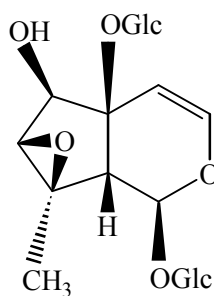
Deux autres néo-clérodane diterpénoïdes (41) et (42), ont été isolés des parties aériennes et des racines de *L. saxatilis* var. *glutinosa*. Ces derniers sont responsables de l'activité cytotoxique décrite précédemment ^[16].

(41) : $\Delta^{12} E$ (42) : $\Delta^{13} E$

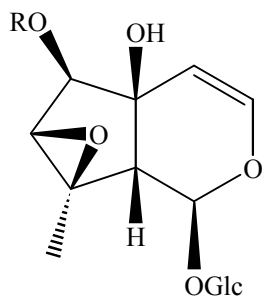
Un iridoïde glycosilé nouveau et nommé genestifolioside (43) ^[32] a été isolé de l'extrait éthanolique de *Linaria genestifolia*.



Linaria arcusangeli s'avère particulièrement riche en iridoïdes. En effet, l'investigation chimique de cette dernière a permis d'isoler deux iridoïdes glycosilés nommés 8-épi-muralioside **(44)**, et macfadienoside **(45)** ^[33], un bisiridoïde nouveau appelé arcusangeloside **(46)** ainsi que d'autres iridoïdes connus que sont: antirrhinoside **(5)**, linarioside **(17)**, antirrhide **(16)**, linaride **(18)** et 5-O-glucosylantirrhinoside **(47)** ^[34].

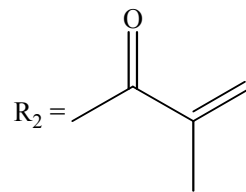
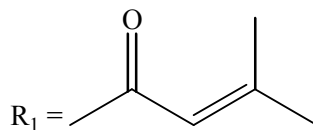
**(44)** R = H**(45)** R = Ac**(46)****(47)**

L'investigation chimique des parties aériennes de *Linaria multicaulis* (L.) Mill. a conduit à l'isolement des iridoïdes suivants : antirrhinoside **(5)**, 6-O-seneciolyantirrhinoside **(48)**, 6-O-angeloylantirrhinoside **(49)** et antirrhide **(16)** ^[35].

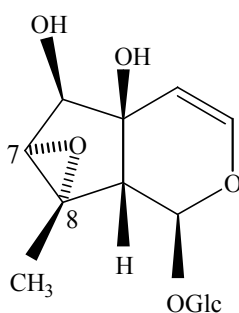


(48) $R = R_1$

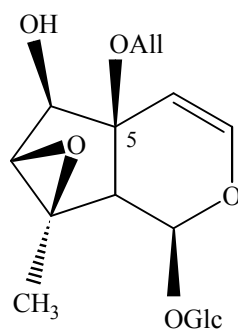
(49) $R = R_2$



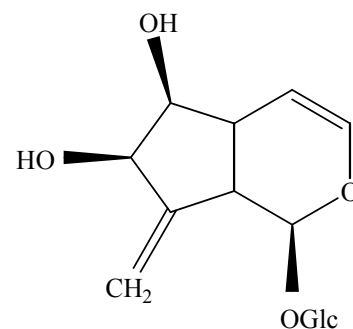
Simeon et collaborateurs ont étudié chimiquement quatre plantes du genre. Il s'agit de : *L. dalmatica*, *L. genistifolia*, *L. peloponnesiaca* et *L. simplex*. Il a isolé, à partir de l'extrait méthanolique de *L. dalmatica* les iridoïdes suivants : 7,8-épi-antirrhinoside (50) linarioside (17), 5-O-glucosylantirrhinoside (47), 5-O-allosylantirrhinoside (51) et 6-β-hydroxyantirrhidine (52) ^[12].



(50)

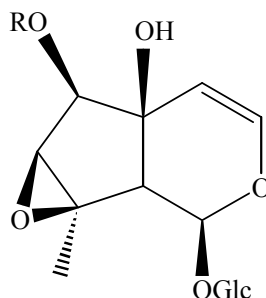


(51)



(52)

Une investigation chimique de l'extrait acétone de *L. clementei*, a abouti à l'isolement des trois iridoïdes suivants : antirrhinoside (5), 6-seneciolyantirrhinoside (53) et 6-angeloylantirrhinoside (54) ^[36].



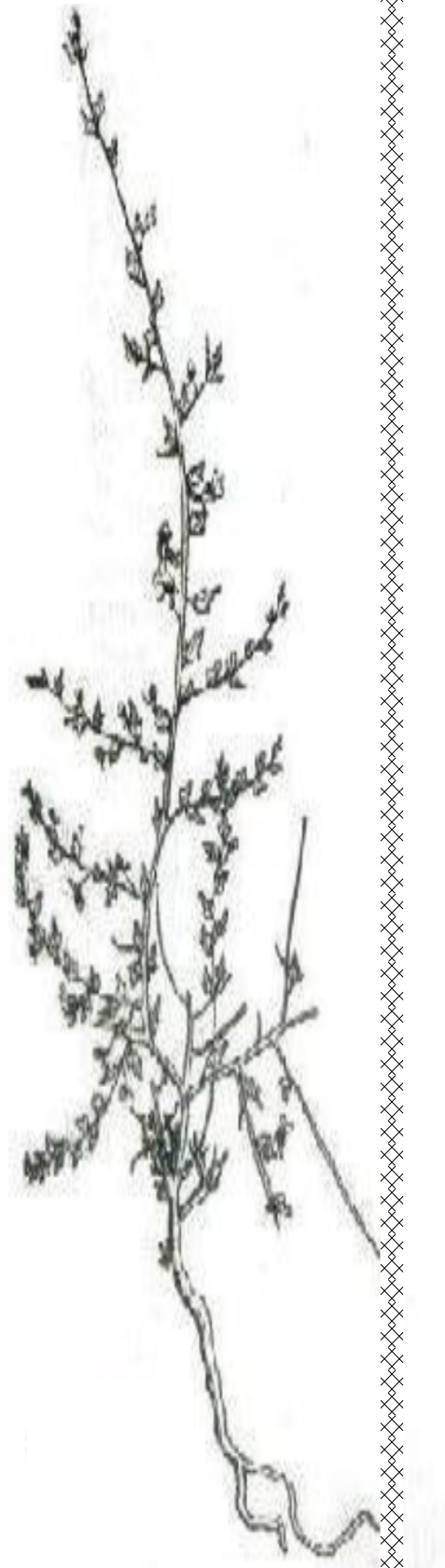
(53) $R = \text{COCH}=\text{CMe}_2$

(54) $R = \text{COCMe}=\text{CHMe (Z)}$

A l'issue de cette étude relative aux travaux chimiques antérieurs réalisés sur le genre, il apparaît que ce dernier est particulièrement riche en flavonoïdes et iridoïdes notamment ^[37], considérés de ce fait comme des marqueurs chimiotaxonomiques du genre en question. Il est utile de rappeler que les iridoïdes glycosilés de type aucubine, catalpol, antirrhinoside et harpagide, sont les marqueurs chimiotaxonomiques de la famille Scrophulariaceae en général. Famille à laquelle appartient le genre *Linaria*.

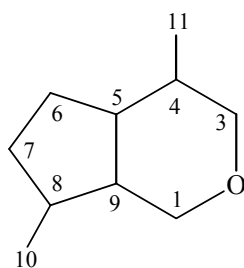
CHAPITRE 2

Etude des Iridoiïdes



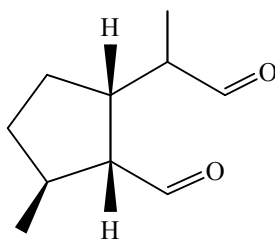
II.1 Structure des iridoïdes

Les iridoïdes sont un groupe de composés naturels appartenant à la grande classe des terpénoïdes^[38]. Ils sont définis par une structure commune, en l'occurrence le noyau iridane (**55**) de nature cyclopentapyranique (*cis*-2-oxabicyclo [4,3,0]-nonane)^[39].

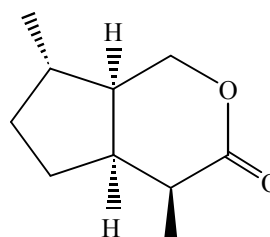


(55)

Les iridoïdes tirent leur nom de celui de fourmis du genre *Iridomirmex*, à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense qui leur sont propres. On citera notamment l'iridodial (**56**) et l'iridomyrmécine (**57**)^[39].

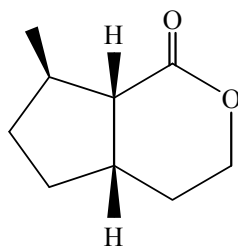


(56)

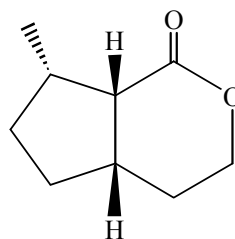


(57)

La plupart des iridoïdes naturels se caractérisent par un squelette à dix atomes de carbone. Cependant, quelques iridoïdes comme la mitsugashiwalactone (**58**) et l'onikulactone (**59**)^[40], constituent une exception notable car renfermant neuf atomes de carbone. Ils constituent les principes actifs attracteurs de certains insectes de la plante *Boschniakia rossica*^[41].

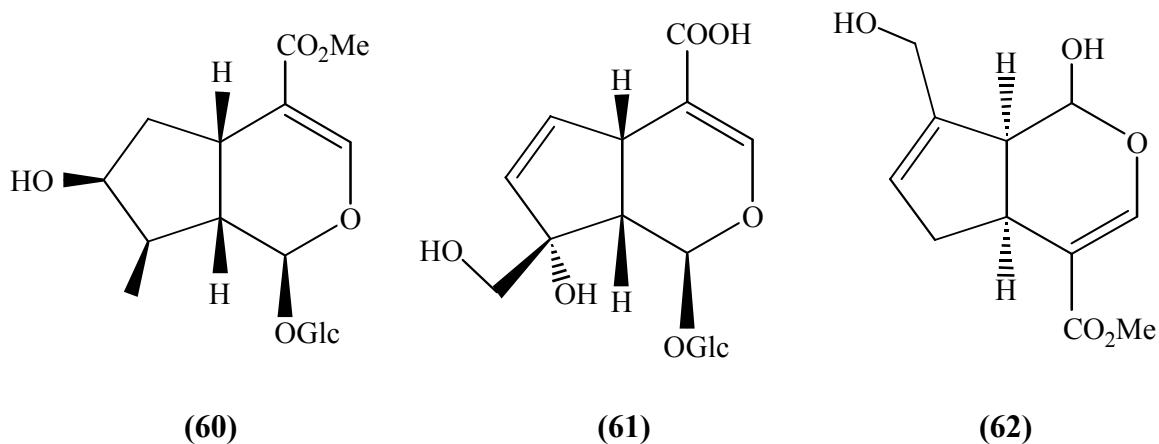


(58)

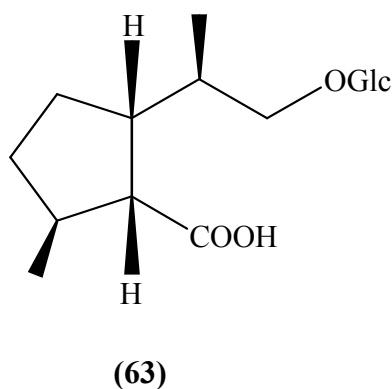


(59)

Le carbone C-11 peut être fonctionnalisé par un groupe carbométhoxyle (loganoside **(60)**), acide carboxylique (monotropéoside **(61)**)^[39], ou carrément supplanté par un groupement hydroxyle (génépine **(62)**)^[42].



Le cycle pyranique n'est que très exceptionnellement ouvert à l'instar du népétariaside **(63)**^[39].



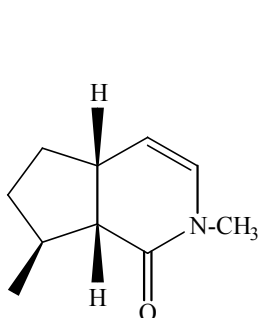
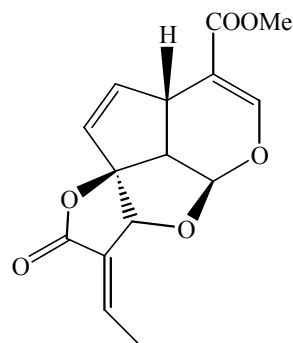
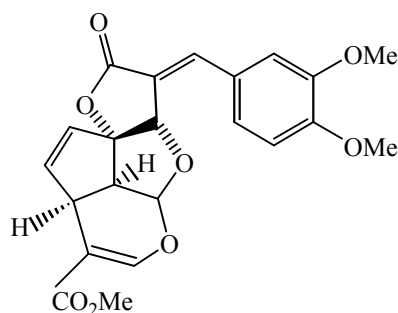
II.2 Classification des iridoïdes

Les iridoïdes qui constituent la famille la plus nombreuse des dérivés monoterpéniques à squelette cyclopentanoïde, peuvent être divisés en cinq groupes^[43] :

- ❖ Iridoïdes simples ou non glycosilés.
- ❖ Iridoïdes glycosilés.
- ❖ Sécoiridoïdes
- ❖ Bisiridoïdes.
- ❖ Iridoïdes lactones

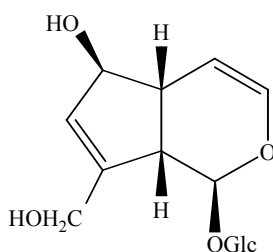
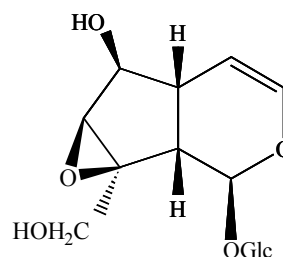
II.2.1 Les iridoïdes simples

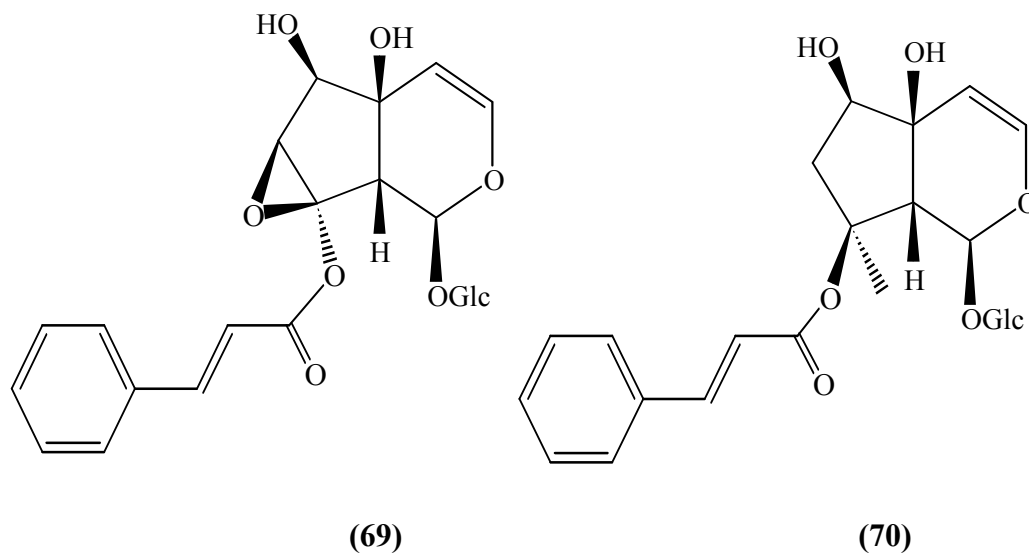
Les iridoïdes simples ou non hétérosidiques peuvent être alcaloïdiques (skytanthine **(64)**), polycycliques (pluméricine **(65)** ^[39] et oruwacine **(66)** ^[42]), esters ou éthers internes ^[39].

**(64)****(65)****(66)**

II.2.2 Les iridoïdes glycosilés

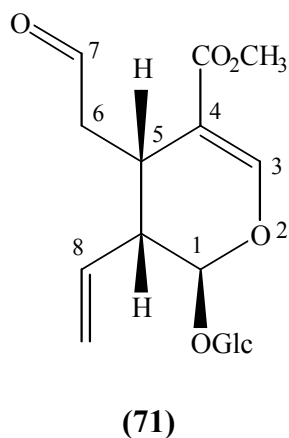
La majorité des iridoïdes sont des glucosides. La liaison hétérosidique s'établit entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose et l'hydroxyle en C-1 de la génine ^[39]. Ces iridoïdes sont les métabolites secondaires communs des Scrophulariaceae, particulièrement les iridoïdes à neuf atomes de carbone. On citera entre autres: l'aucubine **(67)** et dérivés, le catalpol **(68)** et dérivés, le picroside **(69)** et l'harpagoside **(70)** ^[44].

**(67)****(68)**



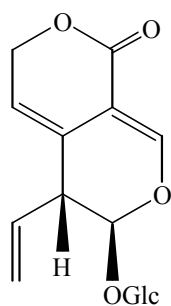
II.2.3 Sécoiridoïdes

Ils sont issus de rupture de la liaison C-7-C-8 du noyau cyclopentanique. Les sécoiridoïdes non hétérosidiques sont rares. La sécologanine (**71**) est un sécoiridoïde ayant un groupement vinyle en C-9. Les diverses autres modifications structurales donnent différents sécoiridoïdes ^[45].

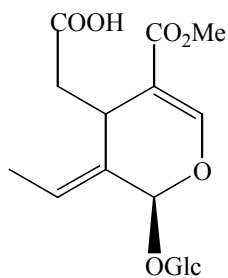


Il existe plusieurs types de génine sécoiridoïdique ^[39]:

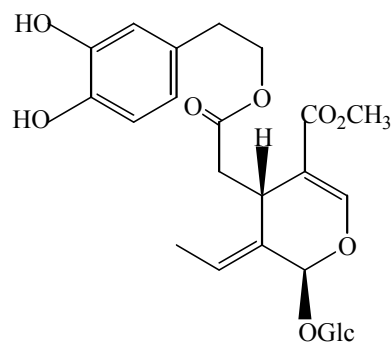
- Génine résultant de la polyfonctionnalisation de la sécologanine (gentiopicroside (**72**)).
 - Génine à groupement éthylidène ou hydroxyéthylidène en C-9 (oléoside (**73**)).
- L'estérification du carboxyle conduit à l'oleuropéoside (**74**).



(72)



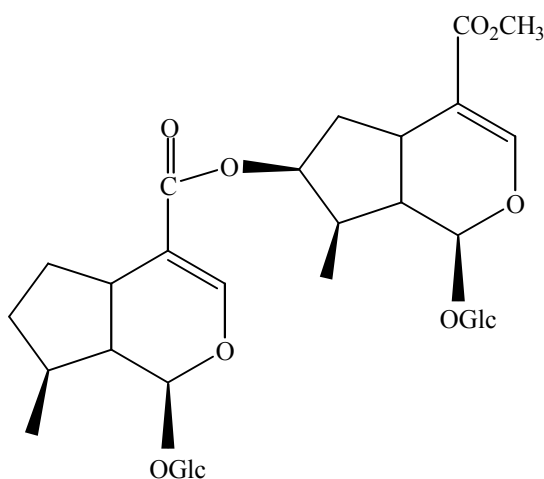
(73)



(74)

II.2.4 Bisiridoïdes

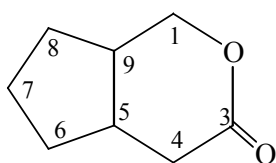
Ces composés sont issus de la dimérisation de deux iridoïdes et sécoiridoïdes. Ainsi le picconioside (75) est un bisiridoïde constitué de la loganine estérifiée par la déoxyloganine ^[46].



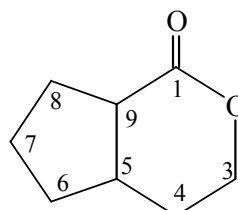
(75)

II.2.5 Iridoïdes lactones

Pour cette classe de substances, on distingue les iridoïdes lactones de types I et II ^[47], selon l'orientation régiochimique de la lactone par rapport au noyau cyclopentanique.



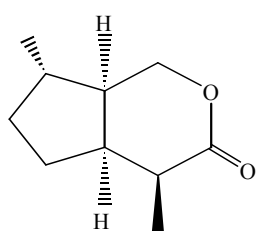
Type I



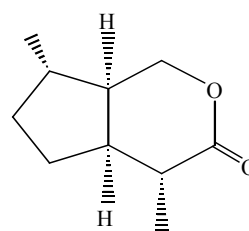
Type II

II.2.5.1 Iridoïdes lactones de type I

Les structures intéressantes de ce type de monoterpènes cyclopentanoïques sont l'iridomyrmécine (**57**) et l'isoiridomyrmécine (**76**), isolés respectivement de deux espèces de fourmis: *Iridomyrmex humilis* et *Iridomyrmex nitidus* ^[48,49]. Ces deux lactones épimères sont utilisées par les fourmis en tant qu'agents de défense vis-à-vis d'insectes offensifs. L'iridomyrmécine (**57**), connu pour être un insecticide efficace, a montré également une activité antibiotique. Elles ont été identifiées aussi dans les huiles volatiles de la plante *Actinidia polygama* Miq ^[50].

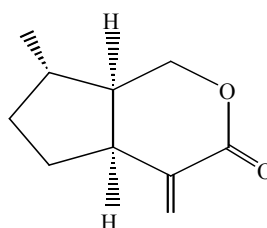


(57)



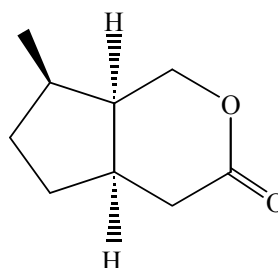
(76)

L'allodolicholactone (**77**) a été isolée de la plante *Teucrium marum* (Labiatae), espèce poussant dans les régions méditerranéennes ^[51].



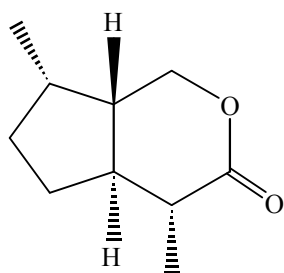
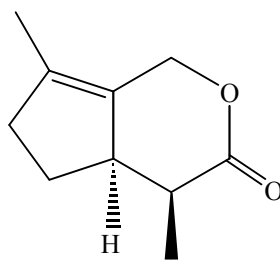
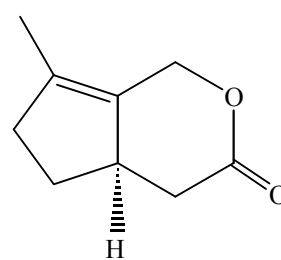
(77)

Une autre lactone nommée boschnialactone (**78**) a été isolée de *Boschniakia rossica*. Cette lactone a montré aussi une activité physiologique sur les chats, semblable aux constituants de la plante *Actinidia polygama* cités précédemment ^[52].



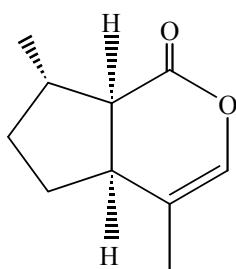
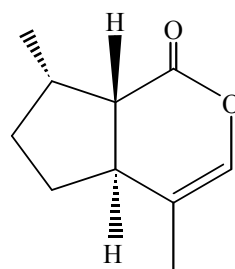
(78)

Les iridoïdes lactones de type I les plus récents sont : l'isoépiridomyrmécine **(79)**, déhydroiridomyrmécine **(80)** et l'isodéhydroiridomyrmécine **(81)** ^[53].

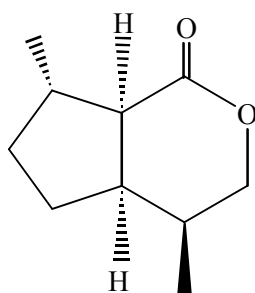
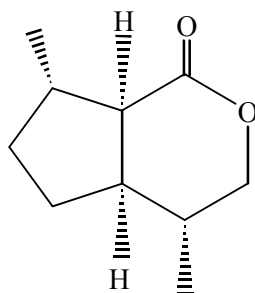
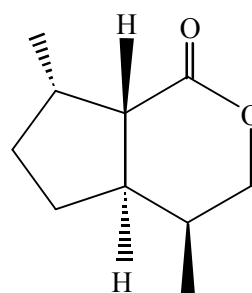
**(79)****(80)****(81)**

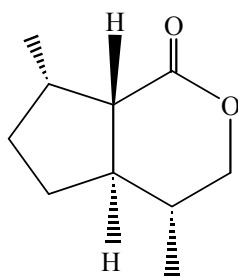
II.2.5.2 Iridoïdes lactones de type II

Pour ces composés, le groupement carboxyle de la lactone est en position C-1. On citera la népétalactone **(82)** et son épimère, l'épinépétalactone **(83)**, tous deux isolés d'une huile de *Actinidia polygama*, plante appelée vernaculairement herbe à chat ^[54].

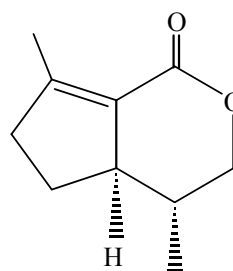
**(82)****(83)**

D'autres lactones iridoïdiques dotées du même pouvoir d'attraction sur les chats ont été isolées de la même plante. Il s'agit de: dihydronépétalactone **(84)**, isodihydronépétalactone **(85)**, dihydroépinépétalactone **(86)**, isodihydroépinépétalactone **(87)** et l'isonépétalactone **(88)** ^[53].

**(84)****(85)****(86)**



(87)



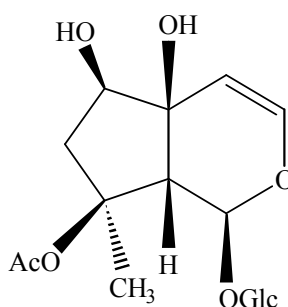
(88)

II.3 Activités biologiques des iridoïdes

Les iridoïdes sont principalement connus pour être les principes actifs possibles de plantes très utilisées en phytothérapie. A titre d'exemple, la valériane isolée de l'espèce *Valeriana officinalis* L. (Valérianacées) est sédative. De même que l'harpagophyton trouvé dans *Harpagophytum procumbens*, est réputé pour son activité anti-inflammatoire ^[55].

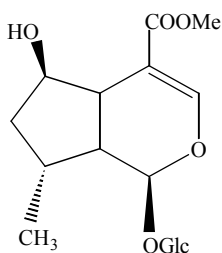
Les iridoïdes sont également connus pour d'autres activités biologiques intéressantes : anti-tumorale ^[56,57], anti-bactérienne ^[58], diurétique ^[59], purgative ^[60], cholérétique ^[61]. Ils sont également caractérisés par des propriétés antioxydantes ^[62] inhibitrices de la croissance des plantes ^[63]. Les esters iridoïdes peuvent être utilisés comme produits de départ pour la synthèse de substances cyclopentanoïdiques biologiquement actives comme les prostaglandines ^[64] et les sesquiterpènes à squelette triquinane ^[65].

La cytotoxicité avérée de quelques iridoïdes les prédispose à une utilisation dans le traitement du cancer. Ainsi le 8-O-Acétylharpagide (**89**), isolé de l'espèce *Ajuga decumbens* (Lamiaceae), a montré une forte activité contre le cancer de la peau et les tumeurs hépatiques des souris ^[66].



(89)

Les peracétates de l'aucubine (**69**), du catalpol (**68**) et du penstemonoside (**90**), isolés de *Parentucillia latifolia* L., ont des activités inhibitrices vis à vis de la contraction musculaire utérine induite par l'acétylcholine d'une manière semblable à la papavérine ^[67].



(90)

II.4 Biosynthèse des iridoïdes

La biosynthèse des iridoïdes ^[68] a attiré l'attention de plusieurs équipes de recherche pour deux raisons majeures :

- ❖ Les bons résultats obtenus par l'incorporation du précurseur acide mévalonique marqué.
- ❖ La relation biogénétique entre les iridoïdes à 10 ou 9 atomes de carbone et le squelette de plusieurs alcaloïdes à noyau indole et isoquinoléine.

Les iridoïdes sont des monoterpènes en C-10 issus du couplage de deux unités isopréniques, en C-5 sous forme d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et de diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) ^[69].

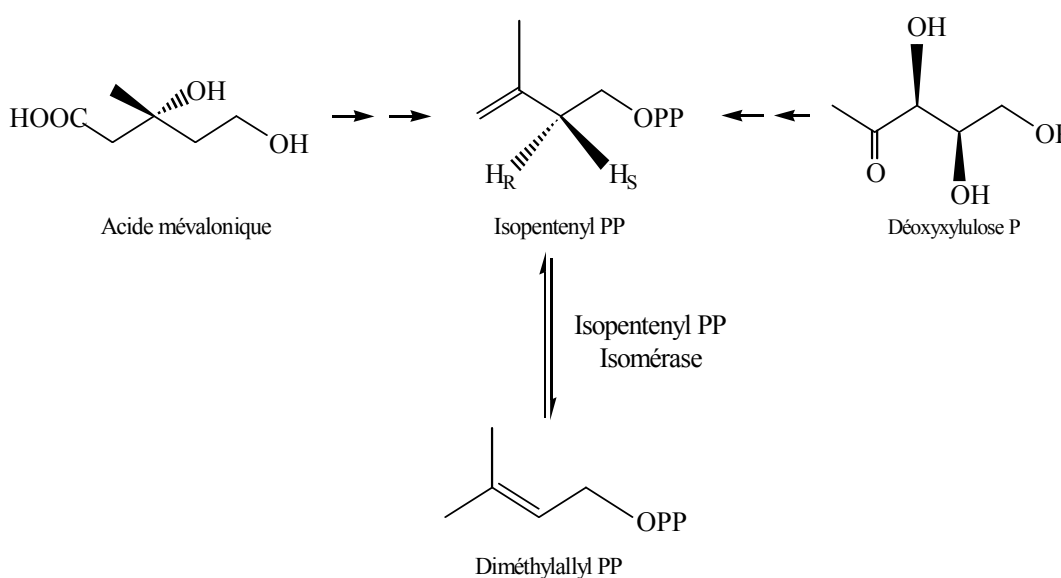


Schéma II.1 : Biosynthèse du diméthylallyl pyrophosphate DMAPP

Une catalyse par l'enzyme prényl transférase, suivie d'une addition tête à queue du DMAPP à l'IPP conduit à la formation du géranyl pyrophosphate (GPP). Cette réaction qui passe par l'ionisation du DMAPP donnant le carbocation allylique correspondant, est illustrée par le schéma IV.6 ci-dessous ^[69].

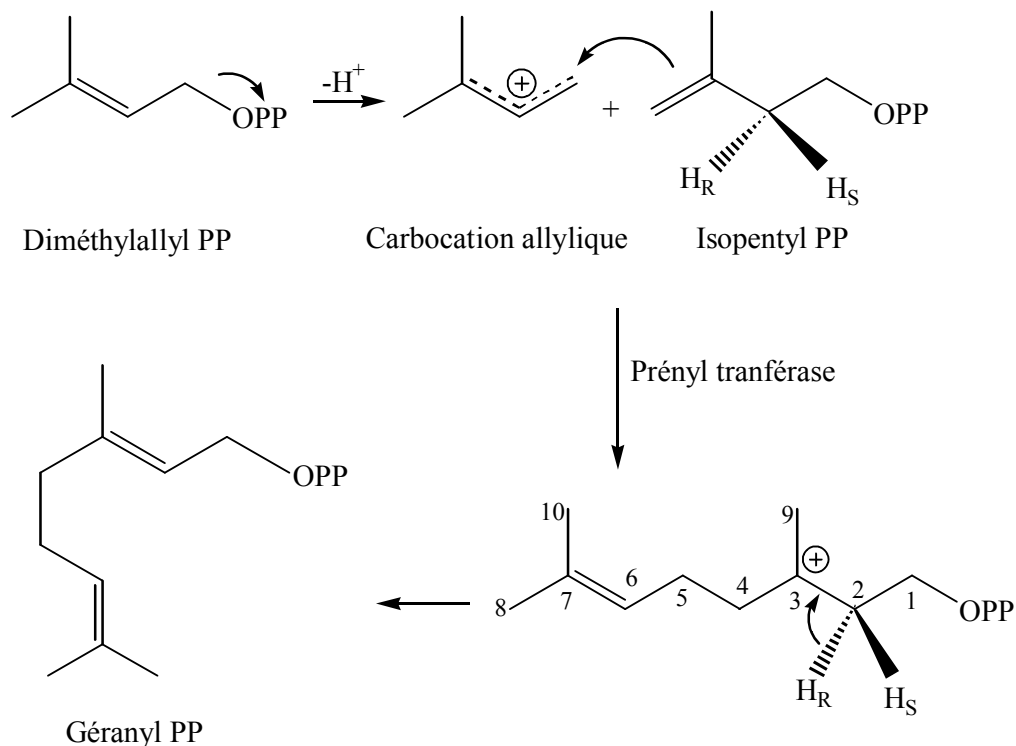


Schéma II.2 : Formation du géranyl pyrophosphate (GPP)

Le géranylpyrophosphate (GPP) est ensuite oxydé en 10-hydroxygéraniol. L'isomérisation de ce dernier conduit au 10-hydroxynérol. Le trialdéhyde qui en dérive subit une double addition de Michael aboutissant au précurseur iridodial, lui-même subissant par la suite une cyclisation qui conduit au lactol. L'oxydation de la fonction aldéhyde et la glucosylation de ce dernier fournit l'acide 6-déoxyloganique dont l'oxydation en C-6 permet d'obtenir l'acide loganique. L'oxydation du méthyle en C-8 de ce dernier conduit à l'hydroxyloganine. La rupture de sa liaison C7-C8 produit la sécologanine via une réaction de type rétro-Prins ^[68].

La loganine occupe une position importante dans la biosynthèse des iridoïdes dans la mesure où il est le précurseur de la sécologanine, et par conséquent des sécoiridoïdes ^[41].

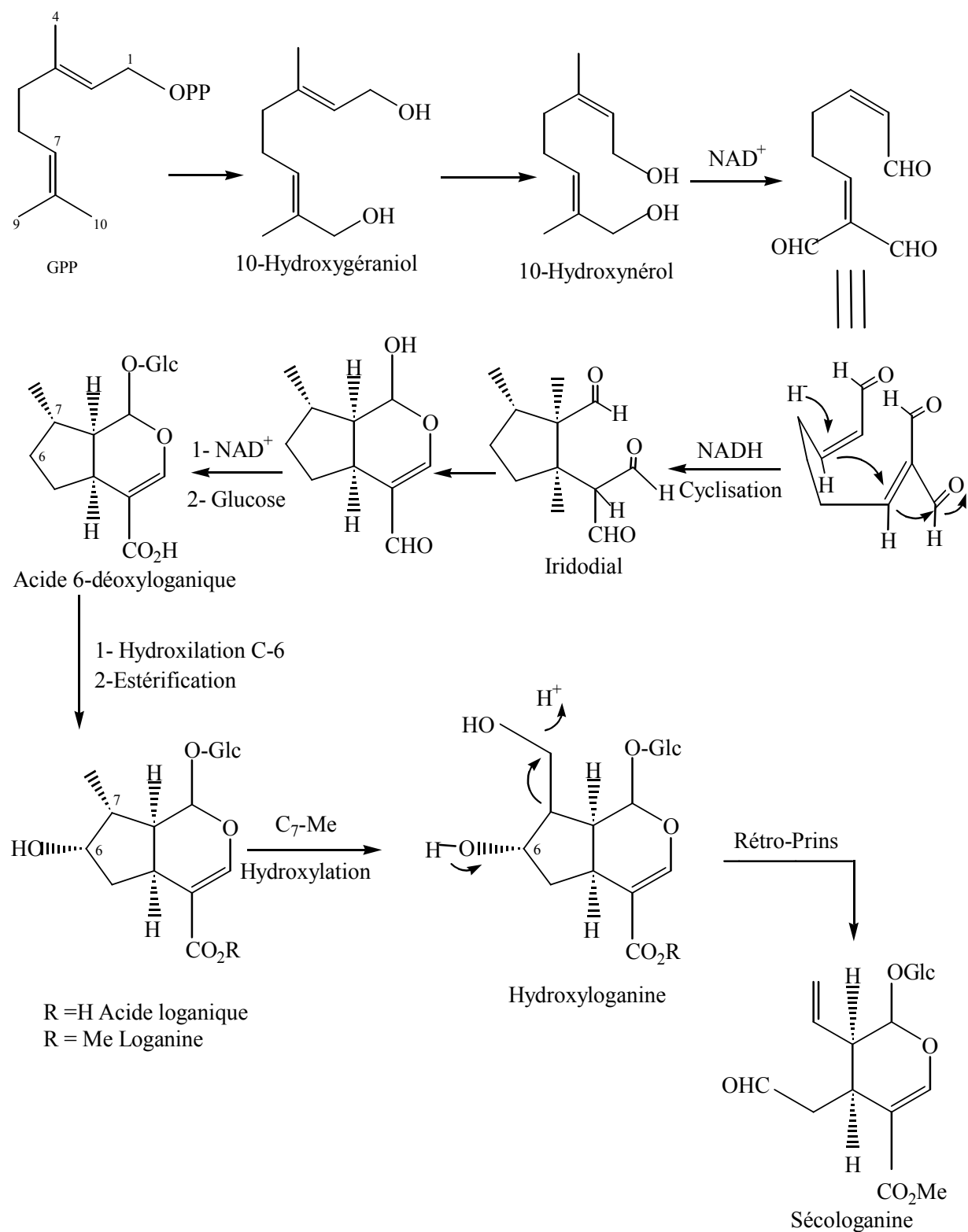


Schéma II.3 : Biosynthèse du loganine à partir du géraniol

CHAPITRE 3

Résultats

Et Discussion



Comme il a été signalé précédemment, l'intérêt porté à l'étude de *Linaria aegyptiaca* est lié au fait qu'elle n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique antérieure. Cette étude fait suite à un travail entamé au laboratoire depuis maintenant cinq ans et consacré à la connaissance des composés chimiques des plantes endémiques sahariennes appartenant à la famille Scrophulariaceae. Cette étude consacrée aux plantes : *Verbascum ballii*, *Verbascum dentifolium* et *Scrophularia saharae*, a permis d'identifier des saponines triterpéniques de grande complexité et des iridoïdes à divers squelettes: catalpol, harpagide, angéloside. Ils sont considérés d'ailleurs comme les constituants dominants des Scrophulariaceae en général et par voie de conséquence, des marqueurs chimiotaxonomiques. L'investigation chimique de *Linaria aegyptiaca* rentre dans ce contexte et vise à compléter nos connaissances quant à la composition chimique des plantes Scrophulariaceae.

Le travail qui m'a été confié consiste en l'isolement et la détermination de structures des métabolites secondaires de la plante en question. Pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction, au fractionnement et à la purification de plusieurs molécules naturelles, en utilisant les différentes techniques de chromatographie (CC, CCM, CPP,...). L'utilisation des techniques de spectrométrie de masse (MS), de spectroscopie (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC et NOESY) et RX, a permis l'élucidation structurale des différents phytoconstituants de la plante.

III.1 EXTRACTION

III.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal (1 kg) constitué des parties aériennes de *Linaria aegyptiaca*, préalablement séché et pulvérisé, est soumis à une extraction consistant en une macération successive par 3 solvants à polarité croissante que sont: le cyclohexane, l'acétate d'éthyle et enfin le méthanol. La durée de la macération est de 48 h à chaque fois. Après filtration et évaporation à sec du solvant, trois extraits ont donc été obtenus: cyclohexanique (2,24 g), acétate d'éthyle (5,4 g) et méthanolique (38,8 g). Notre travail s'est porté sur l'étude de l'extrait méthanolique en raison d'une plus grande richesse en métabolites secondaires, constatée au moyen d'un examen C.C.M.

Le schéma (III.1) ci-après reproduit les différentes étapes d'extraction.

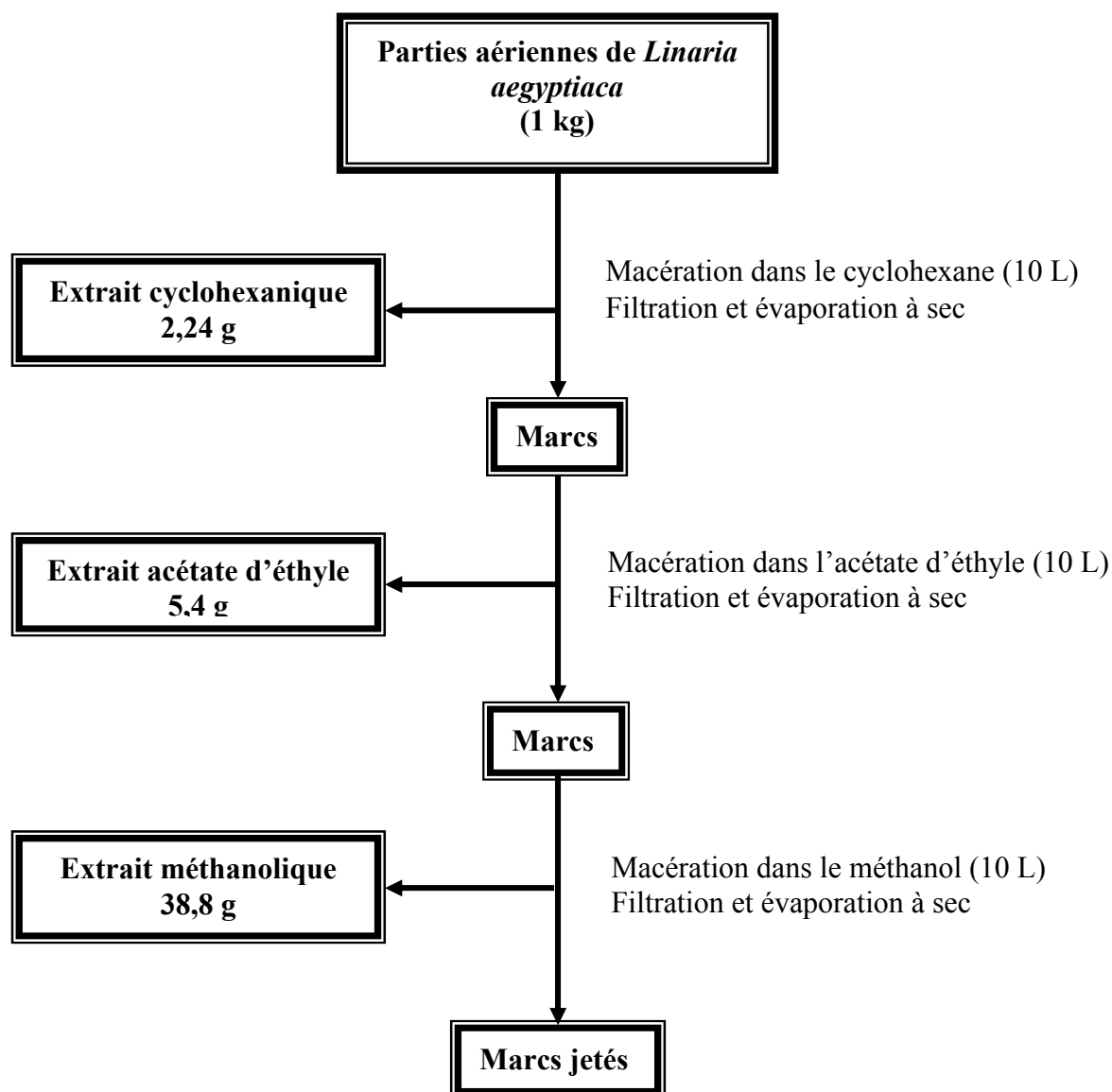


Schéma III.1 : Extraction des parties aériennes de *Linaria aegyptiaca*

III.1.2 Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes

10 g de l'extrait méthanolique ont été chromatographiés sur une colonne de polyamide, en utilisant un gradient de solvants eau /méthanol (10/0 à 0/10). 79 fractions de 50 ml ont été collectées.

L'examen en chromatographie sur couche mince (CCM) aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm puis révélation à la vanilline sulfurique et chauffage, a permis de rassembler des fractions présentant des similitudes. Cet examen s'est soldé par l'obtention de 13 fractions (F1 à F13).

Les fractions F2, F3 et F4 montrant les mêmes taches au vu de l'analyse CCM et de masse égale à 2,26 g, ont été rassemblées puis soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution réalisée par un mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau à différents gradients, a permis d'obtenir 39 fractions (F'1 à F'39).

La fraction F'38 de l'ordre 125 mg, traitée sur plaque préparative de silice greffée C₁₈ en utilisant comme éluant : eau/méthanol : (60:40), a permis l'isolement du composé **4** à l'état pur (4 mg).

Les fractions F'32 et F'33 réunies montrent en CCM une tache visible à l'UV se colorant en marron après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage. Leurs purification par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le système de solvants chloroforme/méthanol/eau à différents gradients, a permis de récupérer 11 fractions (F''1 à F''11). Une recristallisation dans le méthanol de la fraction F''6 a permis d'obtenir le composé **1** à l'état pur (30 mg).

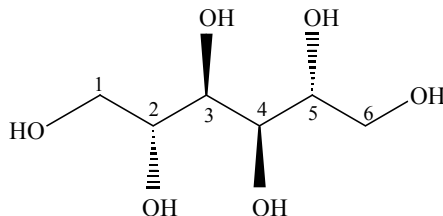
Les fractions F'17 à F'22 jugées intéressantes sont de nouveau mises à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase et pression normales. L'élution a été réalisée dans un premier temps par le chloroforme pur puis un mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau, permettant d'obtenir 9 fractions (F''1 à F''9). Une chromatographie sur colonne RP18, réalisée sur la fraction F''6 a permis d'avoir 4 sous-fractions (SF1 à SF4). La SF1 soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice RP18 (éluant : H₂O/ MeOH 70 : 30) a donné le composé **2** à l'état pur (11 mg).

La fraction F1 d'une masse 534,7 mg est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en utilisant comme éluant CHCl₃/MeOH/H₂O à différents gradients, 31 fractions sont ainsi récupérées (F'1 à F'31). L'analyse sur CCM de la fraction F'10, après révélation à la vanilline sulfurique, montre une tache de couleur marron, a été à son tour fractionné sur une colonne de gel de silice, donnant ainsi 12 fractions (F''1 à F''12). Une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 de la fraction F''9 a permis d'obtenir le produit **3** à l'état pur (5 mg).

A partir de la fraction F8, qui montre deux taches visible à l'UV dans une traînée, a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale, en utilisant comme éluant le chloroforme, puis le mélange chloroforme/méthanol/eau : (95 :5 :0,5) à (90 :10 :1) a abouti à 13 fractions (F'1 à F'13). La fraction F'7 montre une tache jaune après révélation à la vanilline sulfurique. La recristallisation dans le méthanol de cette fraction a permis d'isoler le composé **5** (20 mg) à l'état pur.

III.2 Détermination de structure des composés isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes

III.2.1 Elucidation structurale du composé 1



Le composé **1**, invisible en UV, se présente sous forme de cristaux blancs. Les spectres de masse ESI enregistrés en modes positif (Figure III.1) et négatif (Figure III.2), présentent respectivement des pics pseudo moléculaires à $m/z = 205$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 217$ $[M+Cl]^-$, soit une masse moléculaire égale à 182 uma correspondant à une formule brute en $C_6H_{14}O_6$.

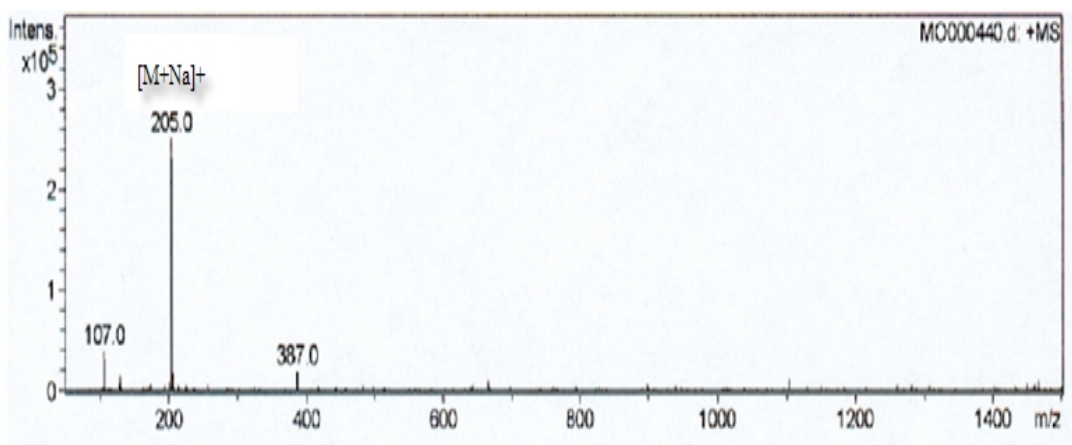


Figure III.1 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé 1

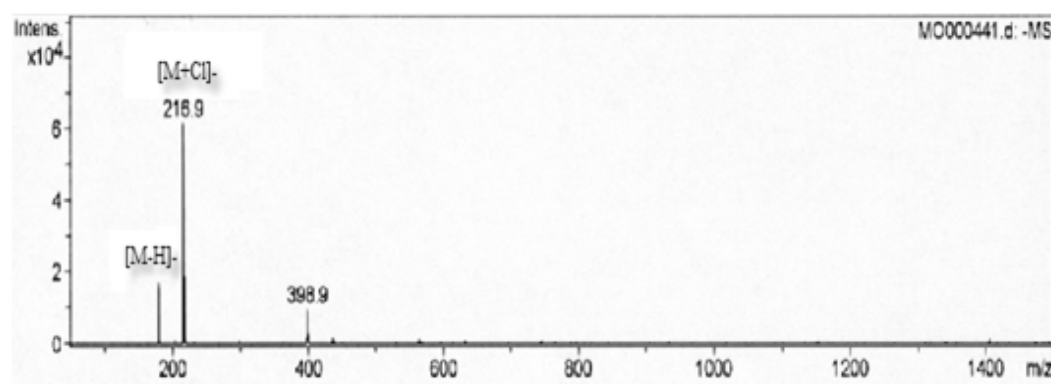


Figure III.2: Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé 1

L'observation du spectre RMN¹H du composé **1** enregistré à 500 MHz dans le DMSO-*d*₆ (Figure III.3), montrant plusieurs signaux allant de 3,37 à 3,60 ppm, renseigne sur le caractère hydroxylé de la molécule. En effet, il est observé:

- deux signaux doublets résonant à 4,14 et 4,41 ppm attestant de la présence de groupements CHOH.
- un triplet résonant à $\delta_H = 4,32$ correspondant à une fonction OH d'un groupement CH₂OH.

Le spectre RMN¹H laisse observer également les signaux de protons situés sur des carbones porteurs des groupements hydroxyles :

- un signal multiplet à $\delta_H = 3,37$.
- un signal doublet de doublet de doublet à $\delta_H = 3,60$ ($J = 3,4$; $5,6$; $10,5$ Hz).
- un autre signal sous forme de triplet à $\delta_H = 3,54$ ($J = 7,7$ Hz).
- un signal à $\delta_H = 3,44$ sous forme d'un multiplet.

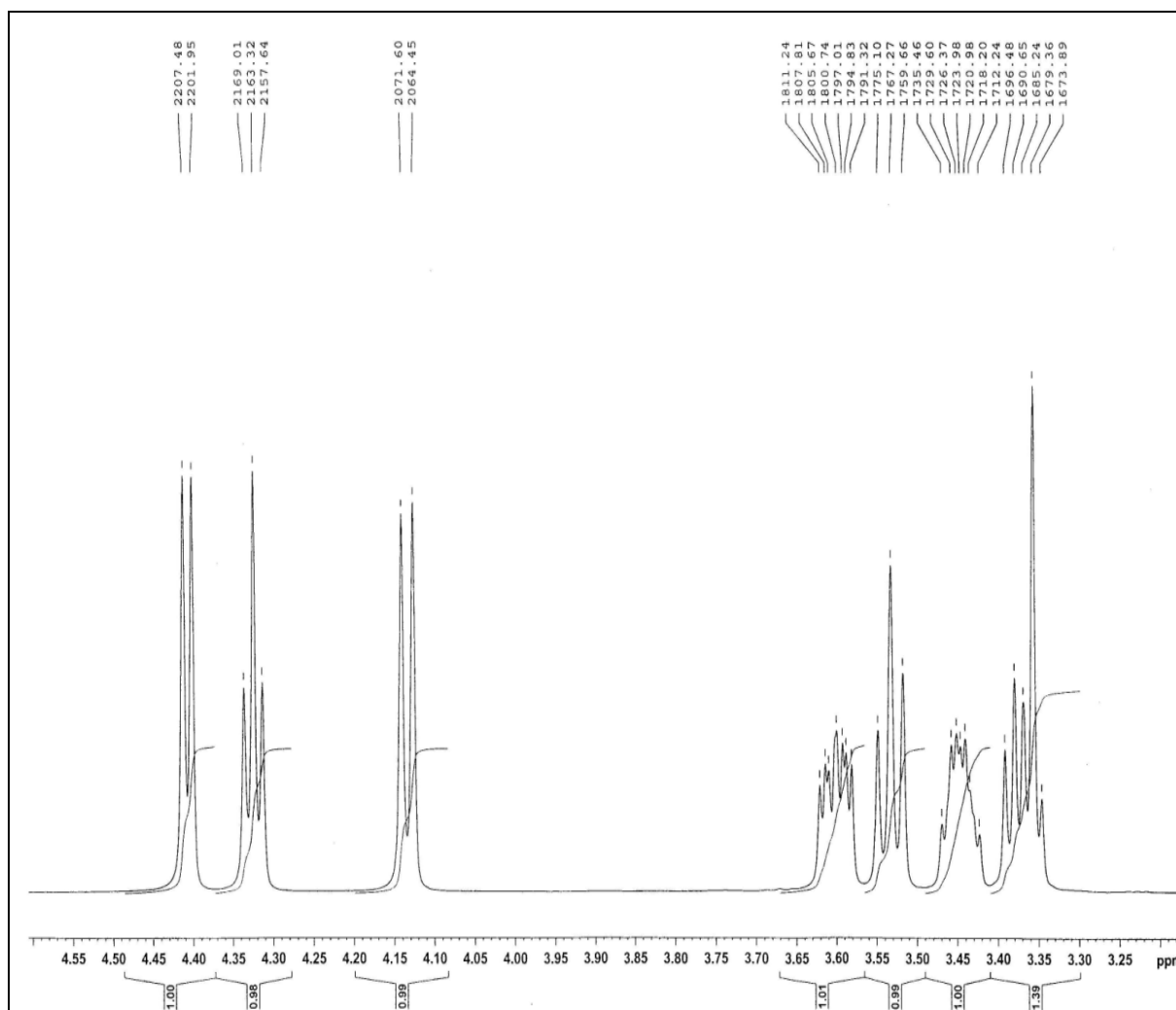


Figure III.3 : Spectre RMN¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) du composé **1**

Cette analyse donnant 7 protons et celle du spectre de masse qui plaide plutôt pour une présence de 14 protons, permet de suggérer que tous les signaux sont d'intégration 2H et dénote par voie de conséquence du caractère symétrique de la molécule. La simplicité du spectre RMN ^{13}C en *J*-modulé (Figure III.4) qui présente 3 signaux en apporte la confirmation. Il apparaît indiscutablement que tous les signaux des protons et carbones sont dédoublés. On déduit ainsi, à partir du spectre carbone, la présence de 2 méthylènes CH_2OH résonnant à $\delta_{\text{C}} = 63,9$ (C-1 et C-6), quatre signaux de carbones méthines CHOH dont deux résonnent à $\delta_{\text{C}} = 71,3$ (C-2 et C-5) et deux repérés à $\delta_{\text{C}} = 69,7$ (C-3 et C-4).

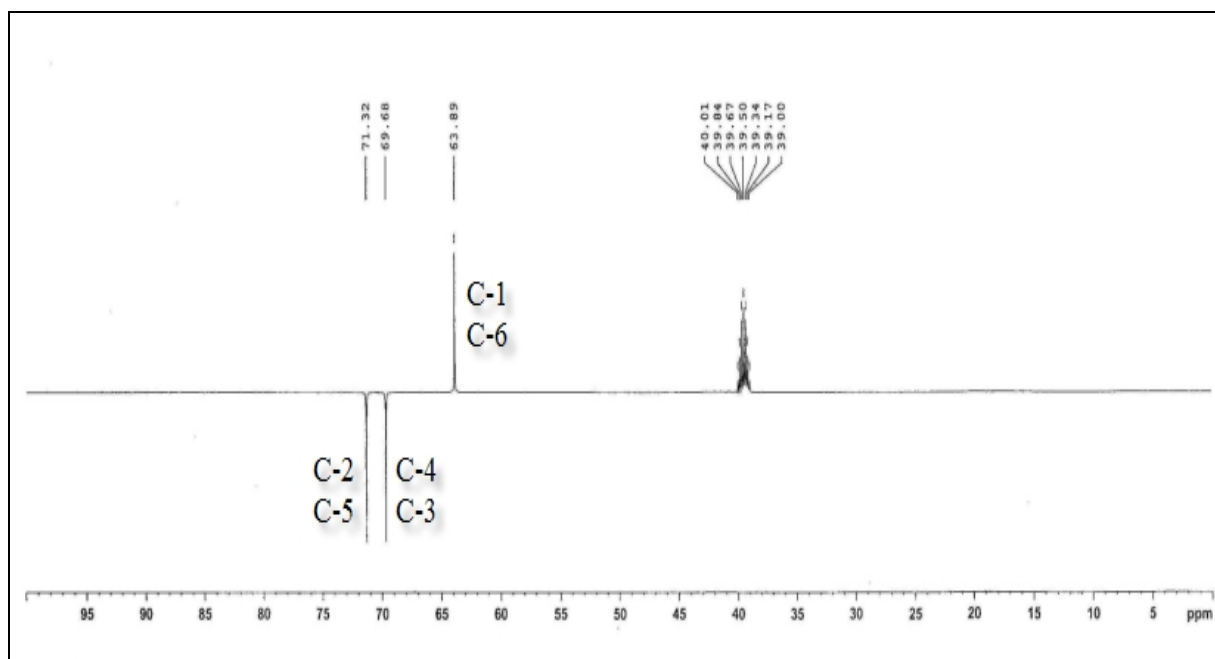
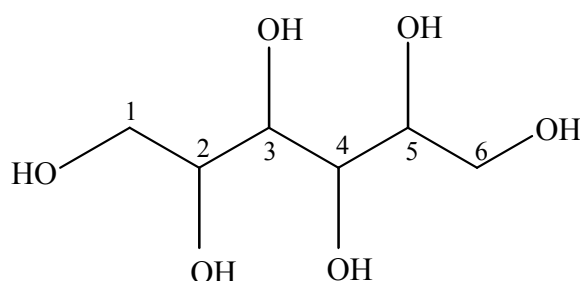


Figure III.4 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé 1

Ce raisonnement permet de suggérer l'enchaînement suivant:



Les signaux des protons, au niveau du spectre RMN ^1H (Figure III.5), se trouvent ainsi identifiés comme suit :

- le signal multiplet à $\delta_H = 3,37$ d'intégration 2H est attribué aux protons H-1b et H-6b.
- le signal doublet de doublet de doublet à $\delta_H = 3,60$ ($J = 3,4 ; 5,6 ; 10,5$ Hz) d'intégration 2H, correspondant aux protons H-1a et H-6a.
- un autre signal sous forme de triplet à $\delta_H = 3,54$ ($J = 7,7$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons H-3 et H-4.
- le signal à $\delta_H = 3,44$ résonant sous forme d'un multiplet et s'intégrant pour deux protons, sont logiquement attribués aux protons H-2 et H-5.
- le signal doublet résonant à $\delta_H = 4,14$ correspond aux protons des hydroxyles OH-3 et OH-4.
- le signal triplet résonnant à $\delta_H = 4,32$ est attribuable aux protons des hydroxyles OH-1 et OH-6.
- le dernier signal résonant sous forme de doublet à $\delta_H = 4,41$ correspond aux deux hydroxyles OH-2 et OH-5.

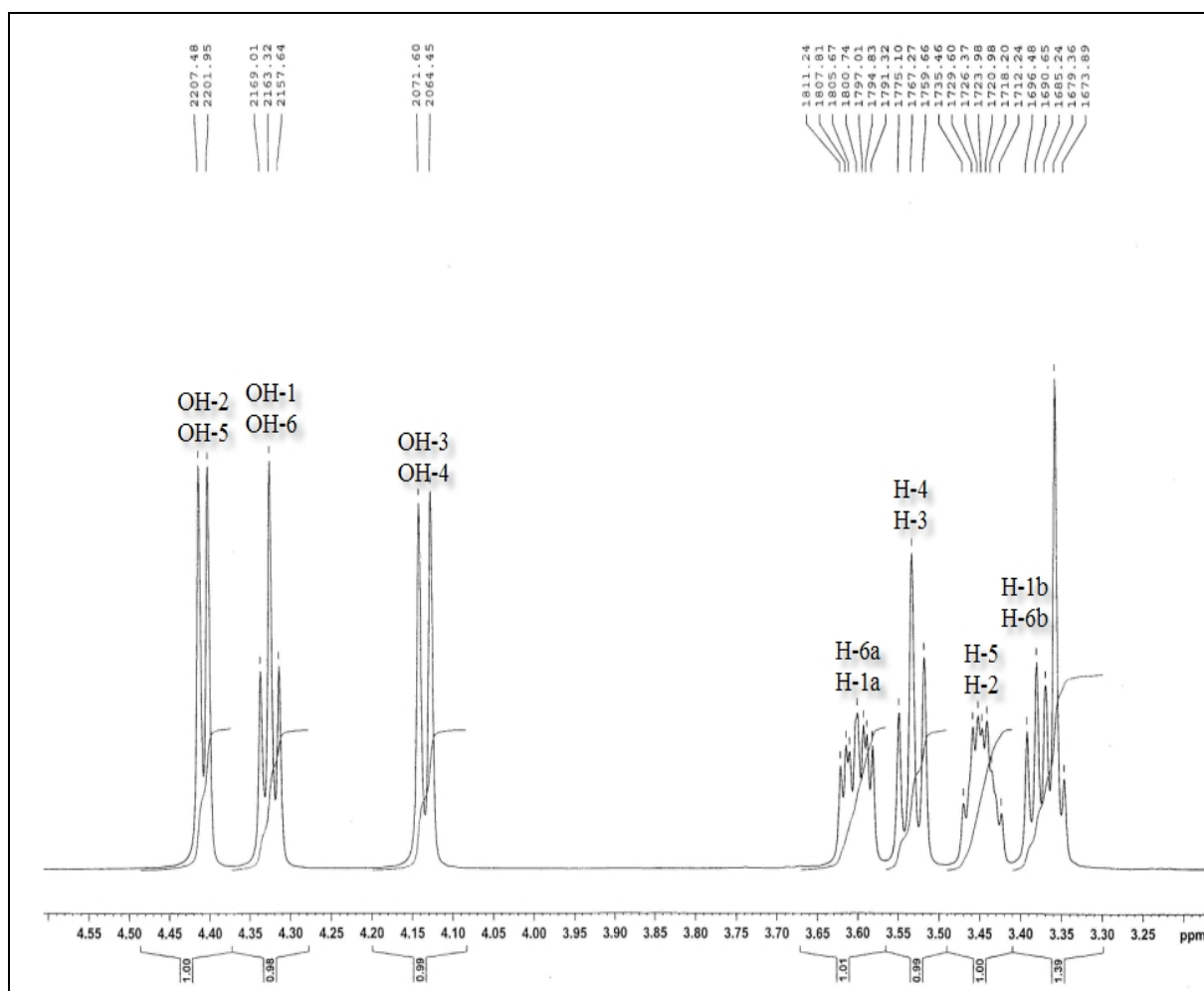
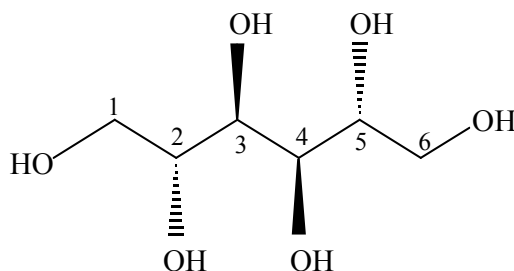


Figure III.5 : Spectre RMN¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) du composé 1

Toutes les données qui viennent d'être exposées, en plus de la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = + 33,3^\circ$, 0,06 g/100ml, MeOH), se sont avérées identiques à celles d'un sucre connu sous le nom de **mannitol**, caractéristique de la famille Plantaginaceae. Il a été isolé antérieurement de plusieurs espèces de cette famille, notamment du genre *Veronica*: *V. austriaca*, *V. axillare*, *V. ligustrifolia*, *V. salicifolia*, *V. andersonii*, *Veronicastrum sibiricum*, *Veronicastrum virginicum*, *Wulfenia baldaccii* et *Globularia vulgaris* ^[70]. Il apparaît que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Linaria*.



Mannitol

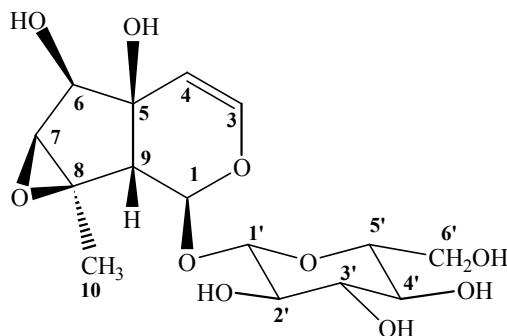
Le mannitol est utilisé comme médicament diurétique sous le nom de Osmitol, particulièrement administré pour éliminer les liquides excédentaires de la circulation sanguine en accroissant l'excrétion d'urine.

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce dernier (composé **1**) sont regroupées dans le tableau (III.1) suivant :

N°	δ_C	δ_H	J (Hz)
1(CH ₂)	63,9	3,60 <i>ddd</i> H-1a 3,37 <i>m</i> H-1b	3,4; 5,6; 10,5 -
2(CH)	71,3	3,44 <i>m</i>	-
3(CH)	69,7	3,54 <i>t</i>	7,7
4(CH)	69,7	3,54 <i>t</i>	7,7
5(CH)	71,3	3,44 <i>m</i> H-5	-
6(CH ₂)	63,9	3,60 <i>ddd</i> H-6a 3,37 <i>m</i> H-6b	3,4; 5,6; 10,5 -
OH-1, 6	-	4,32 <i>t</i>	5,6
OH-2, 5	-	4,41 <i>d</i>	5,5
OH-3, 4	-	4,14 <i>d</i>	7,1

Tableau III.1 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **1**

III.2.2 Elucidation structurale du composé 2



Le spectre de masse ESI du composé **2** obtenu sous forme d'une huile incolore, montre en mode négatif (Figure III.6) un ion pseudo-moléculaire $[M+Cl]^-$ à $m/z = 397$, suggérant une masse moléculaire de 362 uma, soit une formule brute $C_{15}H_{22}O_{10}$. Le spectre ESI⁺ (Figure III.7) en apporte la confirmation, par l'observation d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 385$.

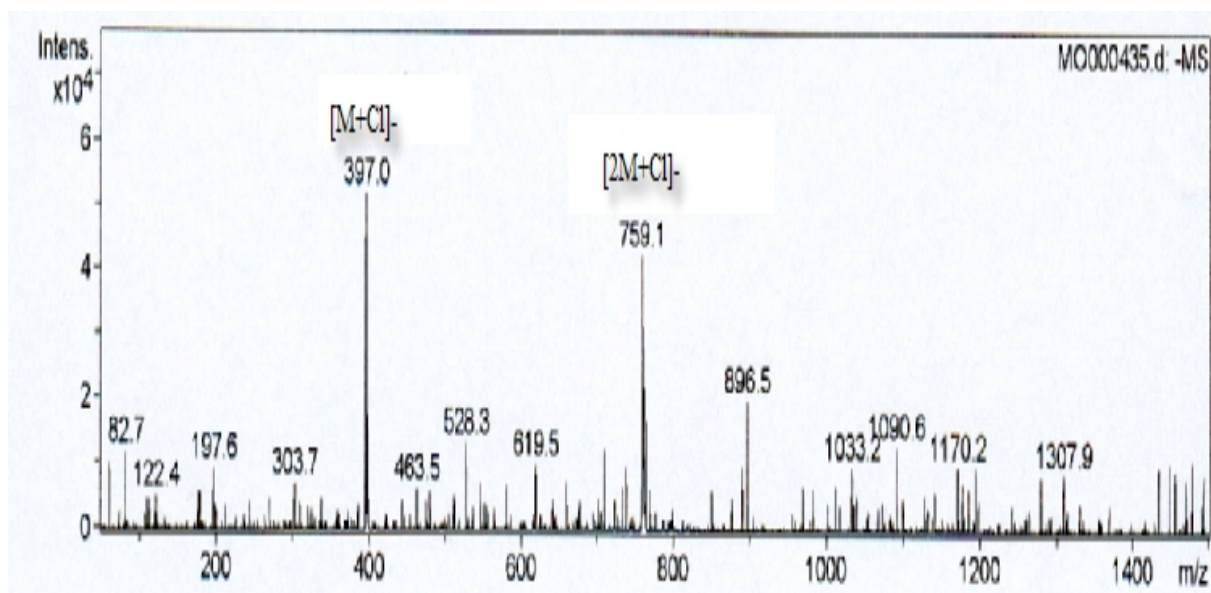


Figure III.6 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé 2

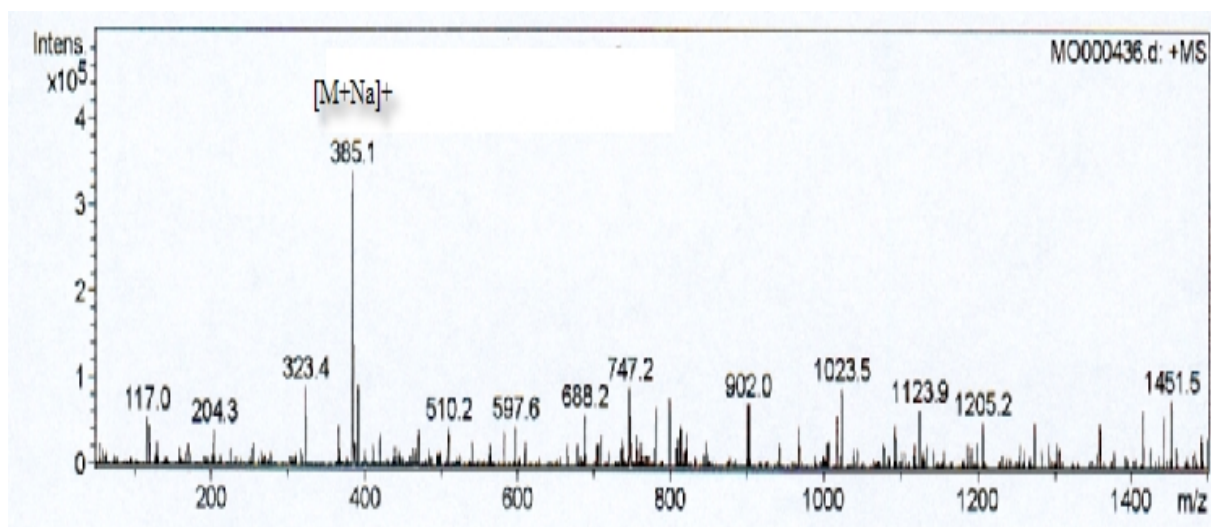


Figure III.7 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé 2

Le spectre infra-rouge (Figure III.8) présente une large bande d'absorption à 3300 cm^{-1} de groupements hydroxyles et une bande à 1655 cm^{-1} traduisant l'existence d'une ou plusieurs double liaisons.

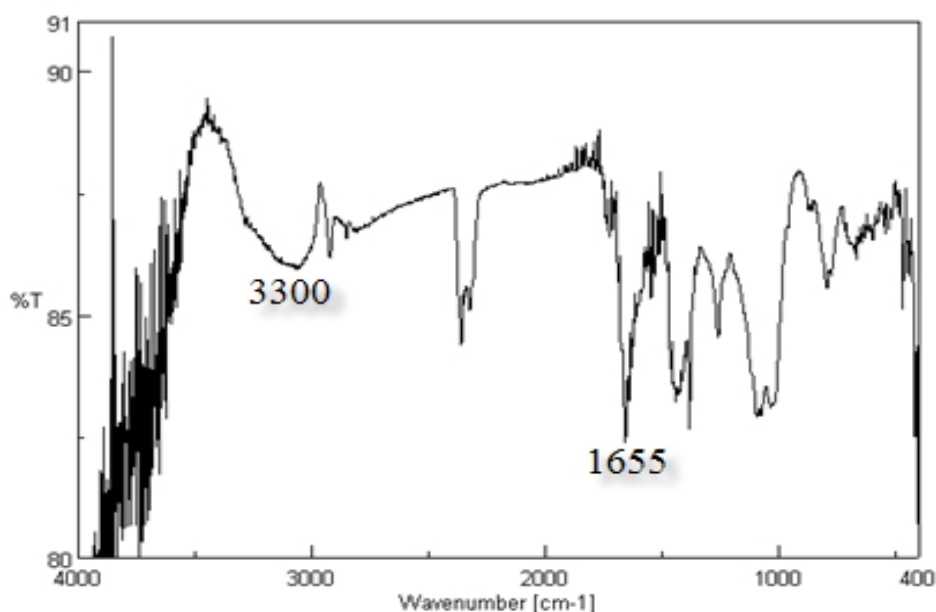
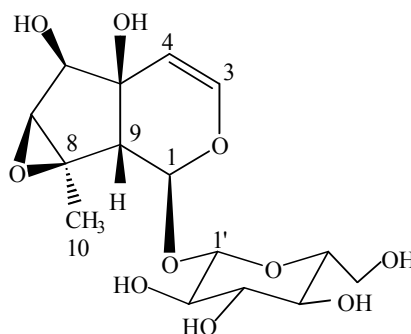


Figure III.8 : Spectre IR du composé 2

Le spectre RMN ^1H (Figure III.9) de ce composé, enregistré à 500 MHz dans le méthanol deutéré, présente certains signaux caractéristiques d'un iridoïde. En effet, il est observé deux signaux doublets à $\delta_{\text{H}} = 6,38$ ($J = 6,3$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 4,86$ ($J = 6,3$ Hz), correspondant respectivement aux protons éthyléniques H-3 et H-4. La multiplicité de ces deux signaux traduit une substitution en position C-5. On observe également deux signaux doublets à 5,42 ($J = 5,7$ Hz) et 2,43 ppm ($J = 5,7$ Hz) correspondant respectivement aux protons H-1 et H-9. En plus de ces signaux, le spectre RMN ^1H (Figure III.11) permet d'observer un signal doublet à 4,65 ppm (d , $J = 8$ Hz) caractéristique du proton anomère H-1' du sucre, à savoir le glucose. Par ailleurs, l'observation d'un singulet $\delta_{\text{H}} = 1,48$ d'intégration 3H, indique la présence d'un groupement méthyle (H-10) qui est pour ce genre de composés, le plus souvent localisé en position C-8 de la génine de l'iridoïde.



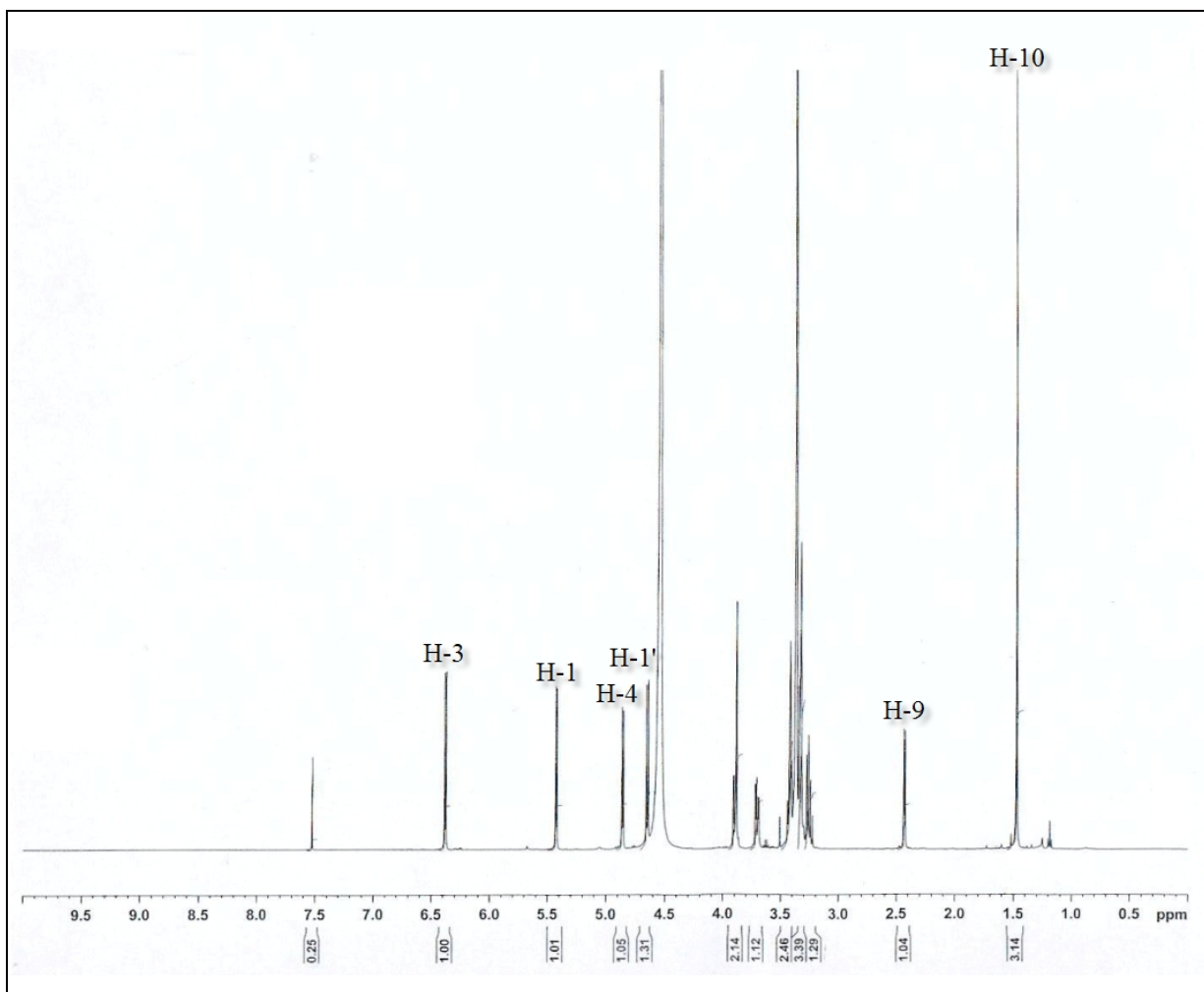


Figure III.9 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé 2

A partir de ces points de départ, le voisinage des atomes de carbone et d'hydrogène est étudié par expériences bidimensionnelles COSY H-H, HSQC et HMBC. Partant du proton anomère de sucre cité précédemment, l'expérience COSY ^1H - ^1H (Figure III.10), permet d'identifier un hexose et cela par l'observation des corrélations entre :

- le proton anomère H-1' et le proton H-2' résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,26$, sous forme de triplet ($J = 8$ Hz).
- le proton H-2' et le proton H-3' résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,42$ (*m*).
- le proton H-3' et le proton H-4' résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,32$ (*nd*).
- le proton H-5' ($\delta_{\text{H}} = 3,31$, *m*) et les protons H-6'a et H-6'b résonant respectivement à 3,90 ppm sous forme de doublet de doublet ($J = 1,8$; 11,9 Hz) et 3,70 ppm sous forme de doublet de doublet ($J = 5,1$; 11,9 Hz).
- les deux protons géminés H-6'a et H-6'b repéré respectivement à 3,90 ppm (*dd*, $J = 1,8$; 11,9 Hz) et 3,70 ppm (*dd*, $J = 5,1$; 11,9 Hz).

Les grandes tâches de corrélation impliquant de grandes valeurs de constantes de couplage, indiquent que tous les protons de l'hexose sont axiaux. On identifie ainsi un D-glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{1'-2'} = 8$ Hz.

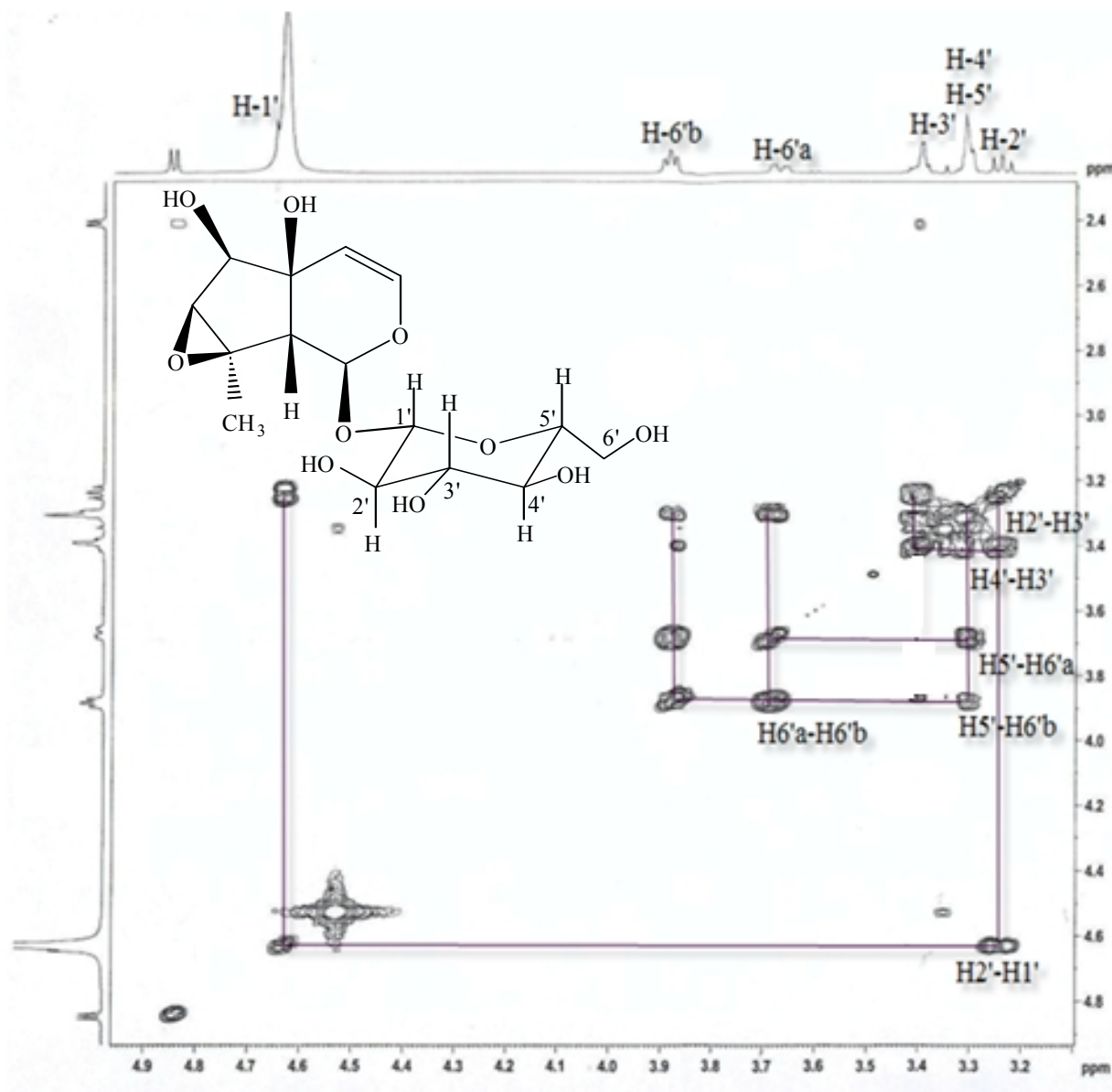


Figure III.10 : Spectre COSY H-H du glucose du composé 2

La correspondance des signaux de la partie osidique de l'iridoïde, observés au niveau des spectres RMN ^1H et ^{13}C , est établie par l'expérience de corrélation hétéronucléaire directe C-H ou HSQC (Figure III.11). Chaque proton montre un couplage direct avec le carbone qui le porte. Il en ressort que les carbones C1', C2', C3', C4', C5' et C6' du sucre ont respectivement les valeurs de déplacements chimiques suivantes : 98,8 ; 73,5 ; 76,7 ; 70,7 ; 77,1 et 62,2 ppm.

Le spectre HSQC (Fig III.11) illustre aussi les corrélations entre protons et carbones de la génine. En effet, on identifie les différents couplages entre:

- le proton H-1 et son carbone C-1 repéré à $\delta_C = 93,6$.
- le proton H-3 et son carbone C-3 repéré à $\delta_C = 142,8$.
- le proton H-4 et son carbone C-4 repéré à $\delta_C = 106,6$.
- le proton H-9 et son carbone C-9 repéré à $\delta_C = 51,9$.
- les protons H-10 et leur carbone C-10 repéré à $\delta_C = 17,1$.

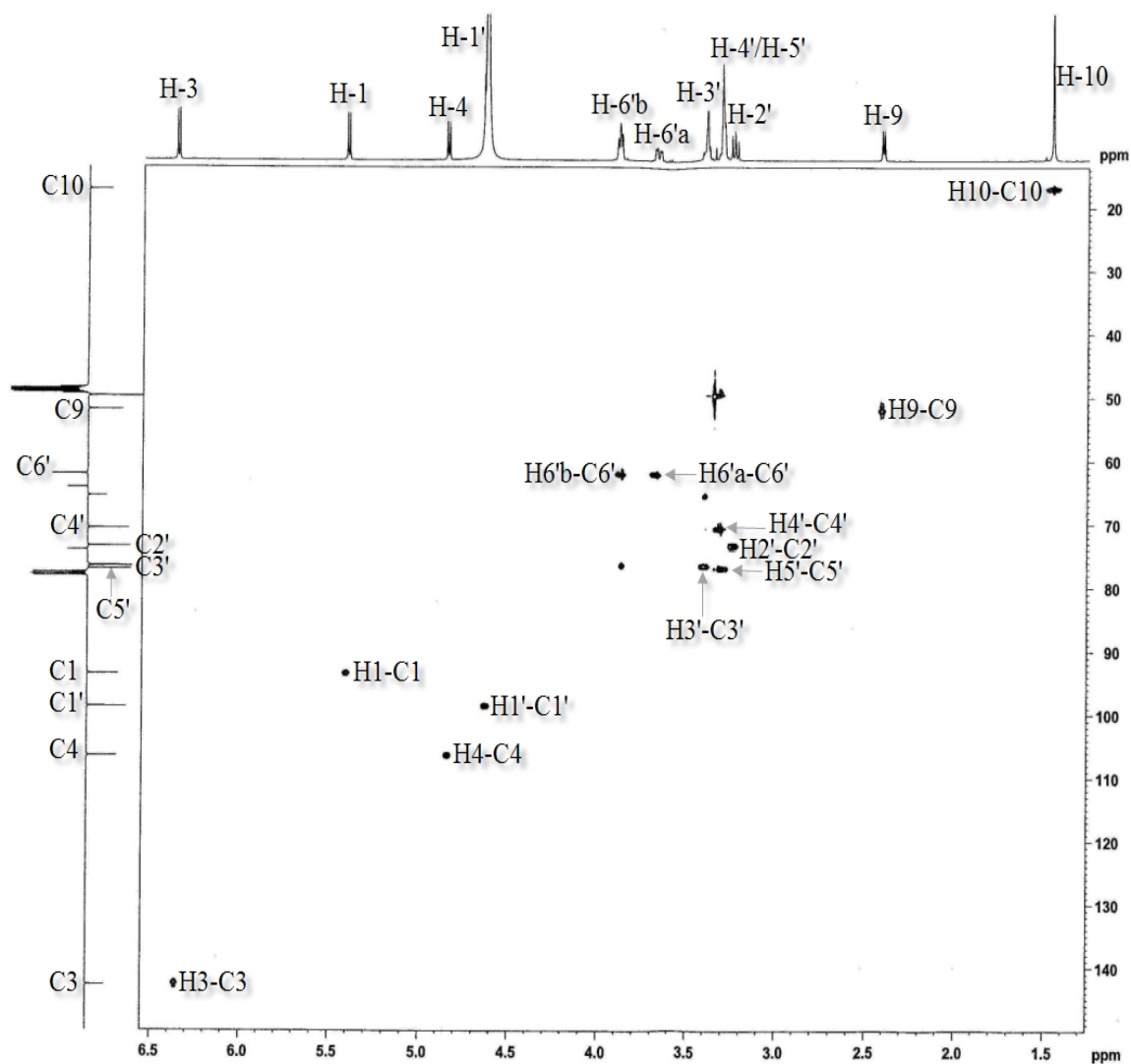


Figure III.11 : Spectre HSQC du composé 2

Toutes ces données montrent clairement que le composé en question est un iridoïde possédant un sucre, le β -D-glucose positionné en C-1 de la génine.

L'expérience de corrélation hétéronucléaire carbone-proton longue distance ou HMBC (Figure III.12) permet de confirmer la structure proposée, et cela par l'observation entre autres des corrélations suivantes entre :

La stéréochimie de la molécule est établie, ou plutôt confirmée au moyen d'une analyse NOESY comme le montre la figure (III.13). Le proton H-9 étant pris comme point de référence et il est pris en position β en vertu des considérations biogénétiques.



Figure III.13 : Spectre NOESY du composé 2

Cette analyse spectrale s'appuyant sur les techniques de RMN bidimensionnelle, permet d'attribuer sans équivoque les signaux de résonance des carbones du spectre RMN ^{13}C (J -modulé) du composé **2** (Figure III.14).

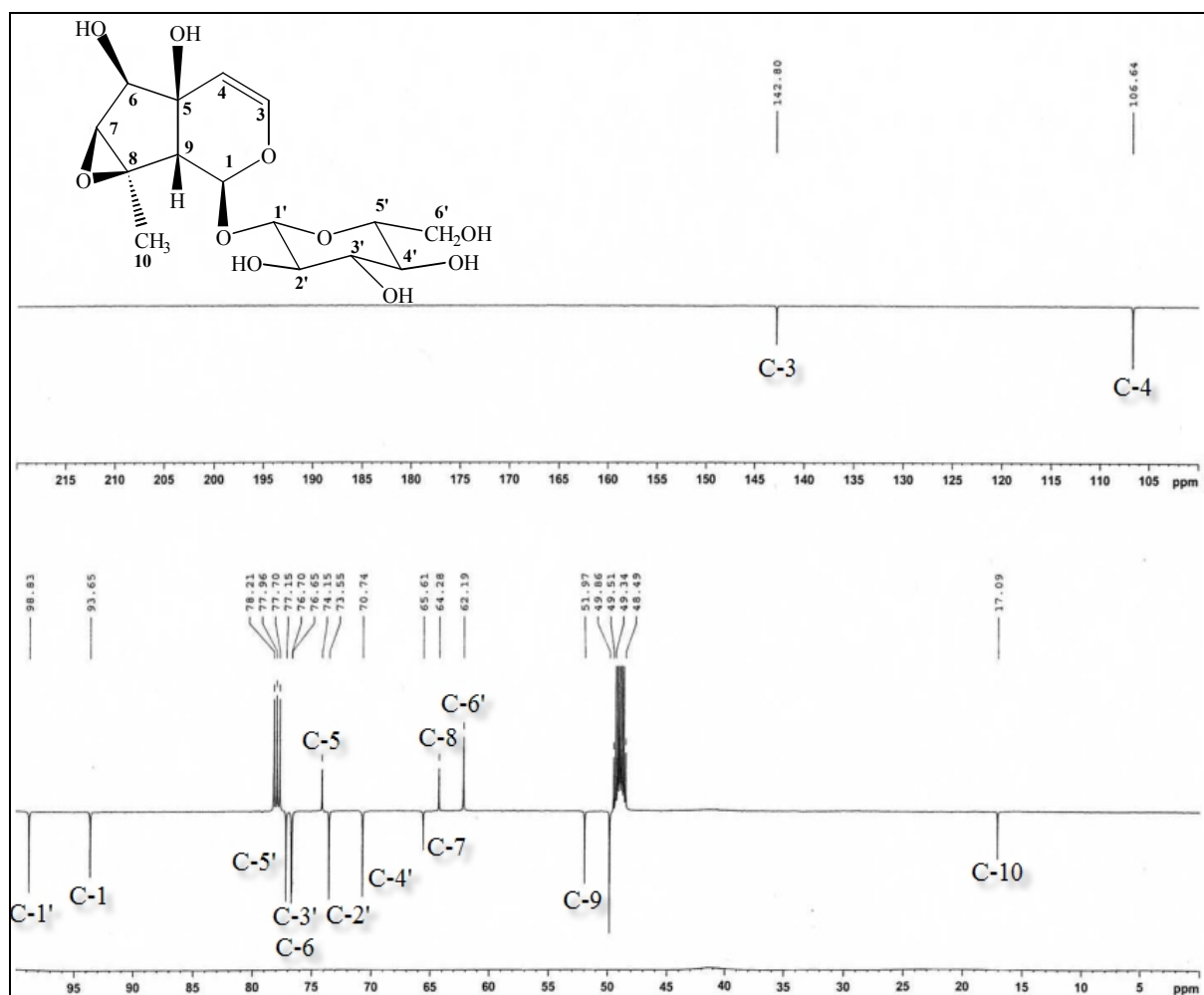
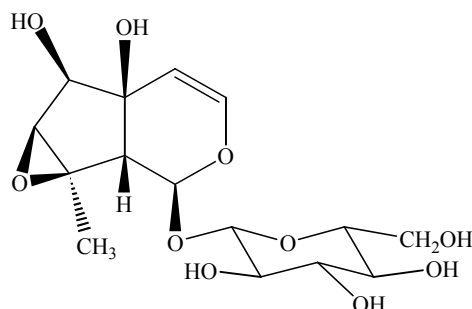


Figure III.14 : Spectre RMN ^{13}C du composé 2

Toutes ces données spectrales ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_{\text{D}} = -70,9^\circ$, 0,055g/100ml, Dioxane) conduisent sans ambiguïté à identifier ce composé à l'**antirrhinoside** ^[71], isolé initialement des feuilles de l'espèce *Antirrhinium majus* L. (Scrophulariaceae) ^[72]. Il a été également identifié dans bon nombre de plantes du genre *linaria* : *L. arcusangeli*, *L. flava* subsp. *sardoa* ^[34], *L. multicaulis* (L.) ^[35] et *L. japonica* ^[73]. Ce composé a montré une propriété laxative ^[73].



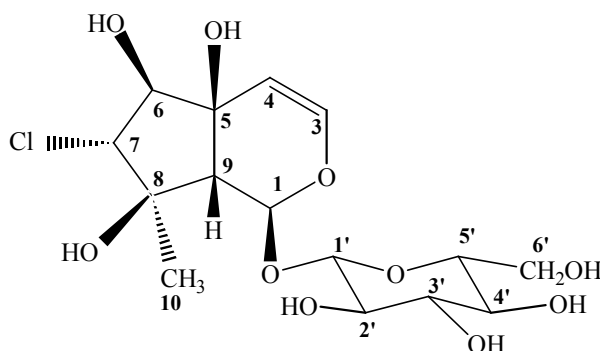
Antirrhinoside

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau (III.2) suivant :

N°	δ_C	δ_H	$J(\text{Hz})$
Aglycone			
1(CH)	93,6	5,42 <i>d</i>	5,7
3(CH)	142,8	6,38 <i>d</i>	6,3
4(CH)	106,6	4,86 <i>d</i>	6,3
5(C)	74,2	-	-
6(CH)	76,7	3,88 <i>nd</i>	-
7(CH)	65,6	3,42 <i>m</i>	-
8(C)	64,3	-	-
9(CH)	51,9	2,43 <i>d</i>	5,7
10(CH ₃)	17,1	1,48 <i>s</i>	-
Glucose			
1'(CH)	98,8	4,65 <i>d</i>	8
2'(CH)	73,5	3,26 <i>t</i>	8
3'(CH)	76,7	3,42 <i>m</i>	-
4'(CH)	70,7	3,33 <i>nd</i>	-
5'(CH)	77,1	3,31 <i>m</i>	-
6'(CH ₂)	62,2	3,90 <i>dd</i> (H6'a)	1,8 ; 11,9
		3,70 <i>dd</i> (H6'b)	5,1 ; 11,9

Tableau III.2 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 2

III.2.3 Elucidation structurale du composé 3



Le composé **3** se présente sous forme d'une huile incolore. L'enregistrement du spectre de masse ESI en mode positif (Figure III.15), montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 421$ $[M+Na]^+$. Par ailleurs, l'observation d'un pic à $m/z = 423$ $[M+2+Na]^+$ et d'une intensité égale à 1/3 du premier, laisse suggérer d'emblée la présence du chlore. Il est donc envisagé pour ce composé une masse moléculaire égale à 398,5 uma correspondant à une formule brute en $C_{15}H_{23}O_{10}Cl$.

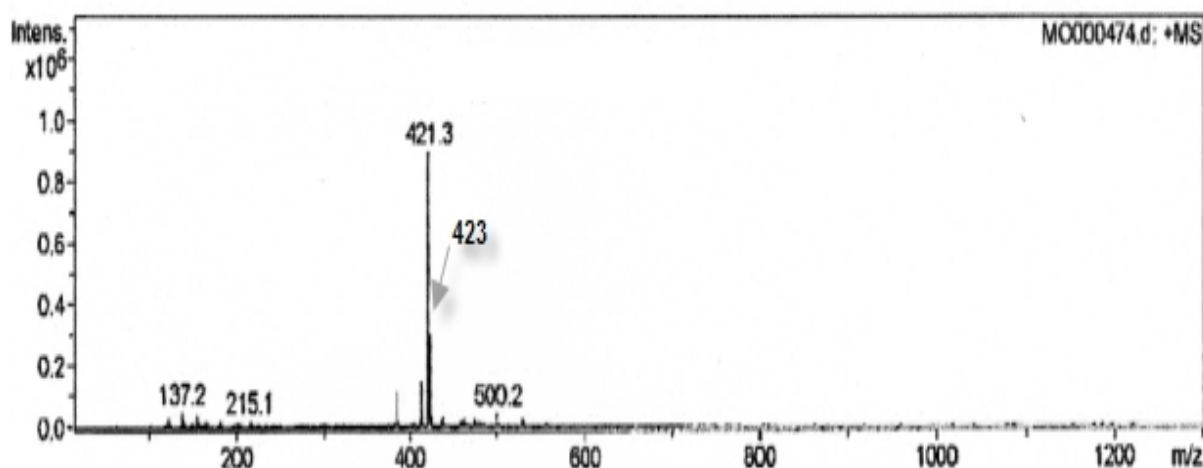


Figure III.15 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé 3

Le spectre IR (Figure III.16) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyles (3400 cm^{-1}). La bande observée à 775 cm^{-1} confirme la présence du chlore.

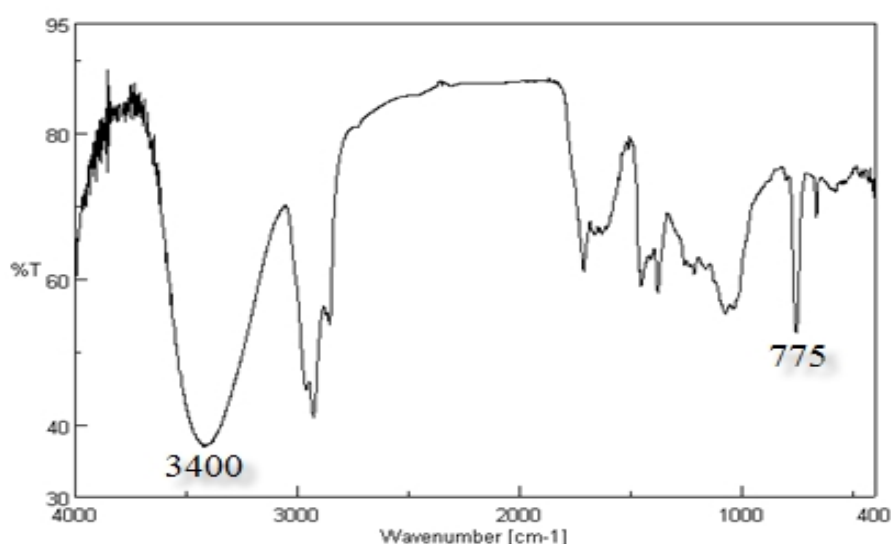


Figure III.16 : Spectre IR du composé 3

L'aspect marquant du spectre RMN ^1H du composé **3** (Figure III.17) est sa très forte ressemblance avec celui du composé **2** précédent, c'est à dire l'antirrhinoside. On reconnaît en effet les deux protons oléfiniques H-3 et H-4 repérés respectivement à 6,25 et 5,50 ppm ($J = 6,4\text{ Hz}$). On retrouve également les deux signaux résonants à 5,68 (*sl*) et 4,60 (*d*, $J = 8\text{ Hz}$), correspondant respectivement aux protons H-1 de la génine et H-1' du sucre. Le signal repéré à 2,48 ppm (*sl*) est attribuable au proton H-9. L'observation d'un singulet à $\delta_{\text{H}} = 1,19$ d'intégration 3H témoigne, comme pour le composé décrit précédemment, de la présence du groupement méthylique CH_3 -10.

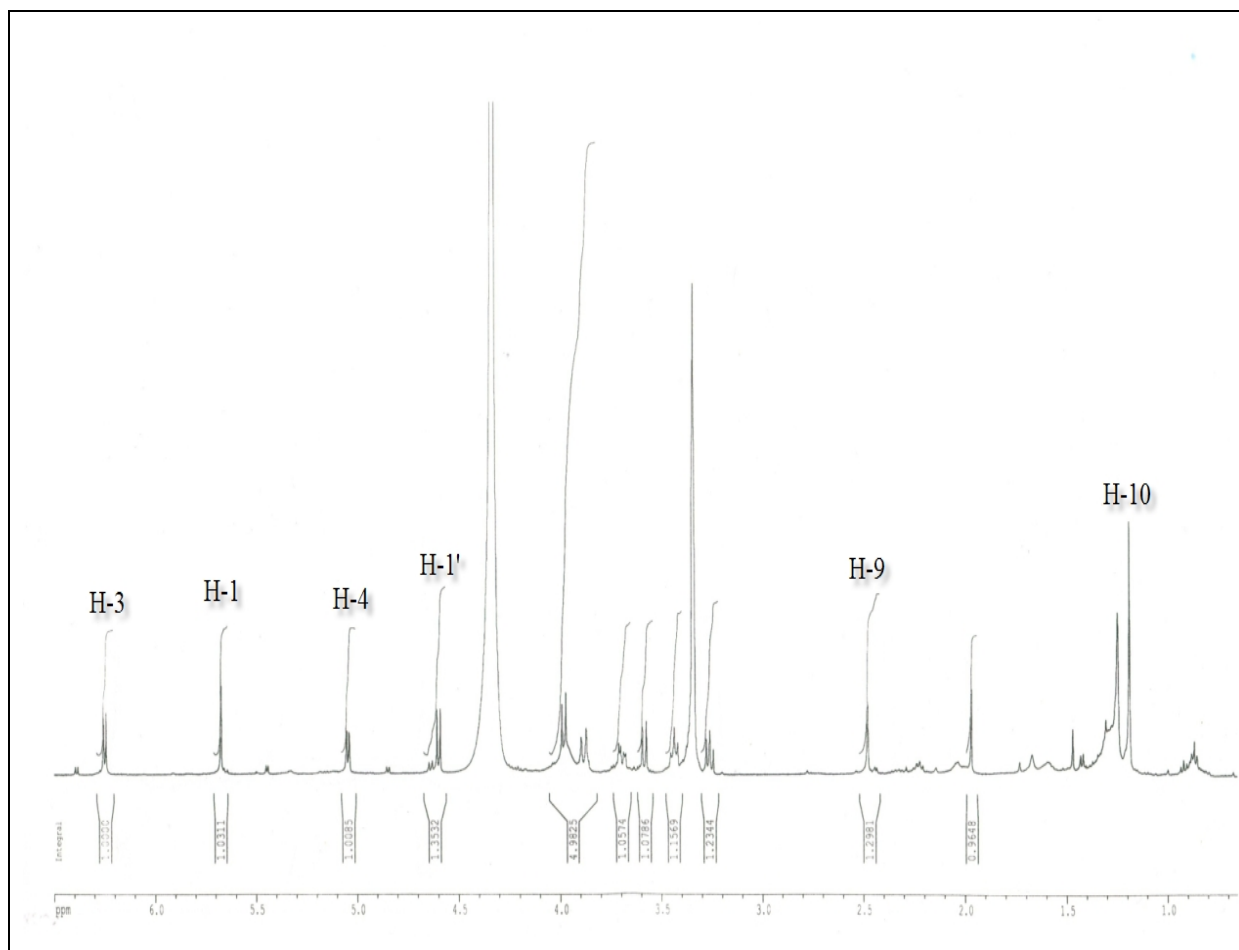
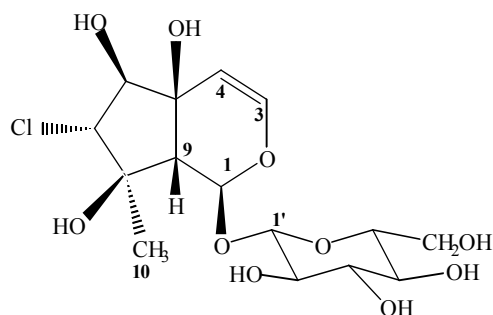


Figure III.17 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) du composé 3

Partant de ce premier constat, les autres protons ainsi que tous les carbones sont progressivement mis en évidence par expériences de corrélations bidimensionnelles COSY H-H, HSQC et HMBC. L'expérience COSY H-H (Figure III.18) montre clairement les corrélations caractéristiques entre les protons H3-H4, H4-H9, H1-H9 et H9-H10. A partir du proton anomère H-1', cette expérience (Figure III.20) permet d'identifier également un glucose de configuration β ($J_{1'-2} = 8 \text{ Hz}$).

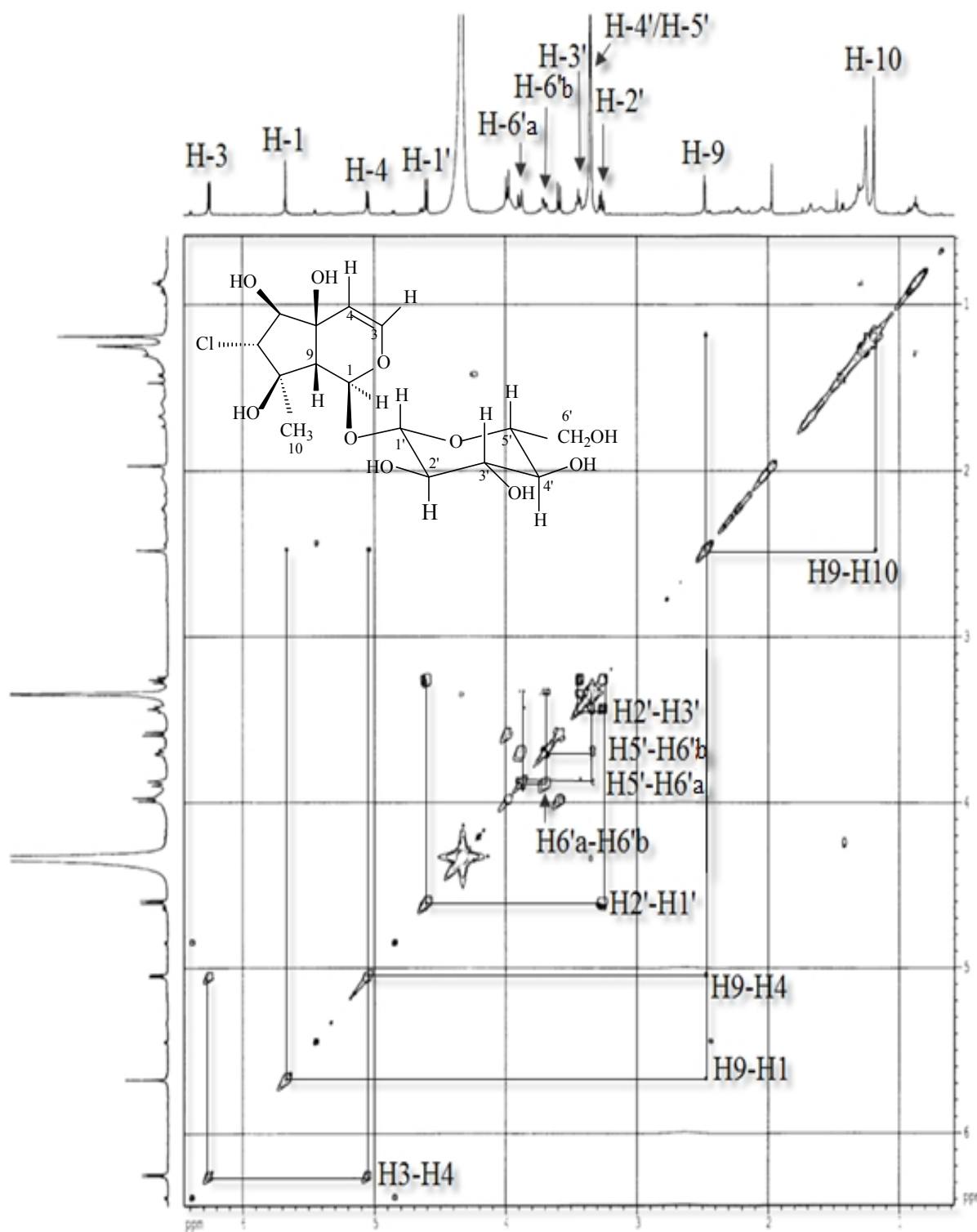


Figure III.18 : Spectre COSY H-H du composé 3

A partir des protons ainsi identifiés, l'expérience de corrélation directe C-H ou HSQC (Figure III.19) permet de caractériser tous les carbones qui les portent.

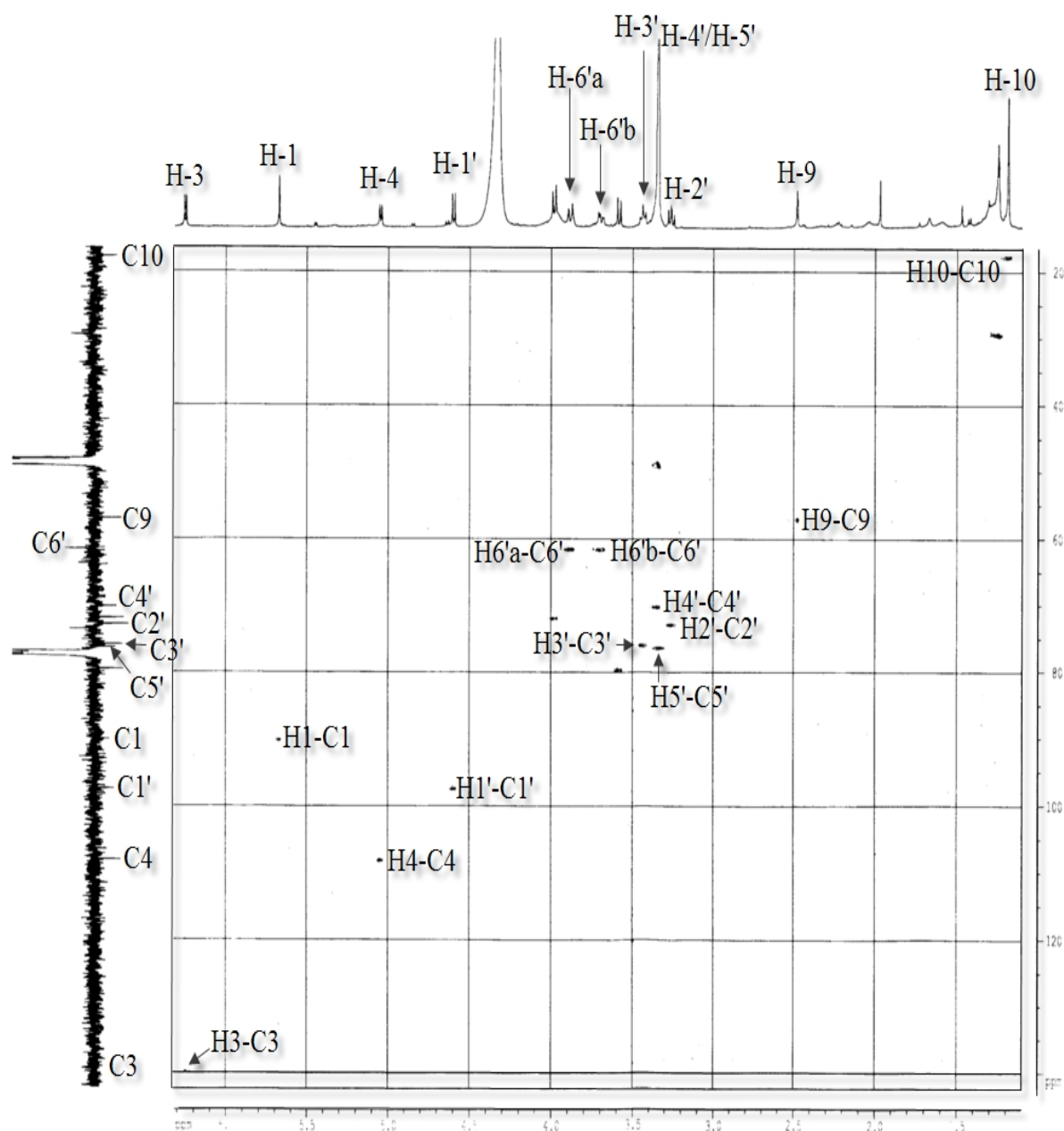


Figure III.19 : Spectre HSQC du composé 3

Le spectre HMBC (Figure III.20) permet de reconnaître les corrélations longue distance déjà observées pour le composé **2**. En effet, il est notamment observé les corrélations entre :

- le proton H-1 ($\delta_H = 5,68$) de la génine et le carbone C-1' ($\delta_C = 97,4$) du glucose caractérisé par HSQC. Ce couplage montre que le site de glucosylation est en position C-1.
- le carbone C-4 (108,1 ppm) de la génine et le proton éthylénique H-3 (6,25 ppm) ainsi qu'un proton sortant sous forme de doublet à 3,58 ppm ($J = 9,8$ Hz) attribué sans aucune ambiguïté au proton H-6 de l'iridoïde. La valeur du déplacement

chimique de ce dernier laisse suggérer que le carbone C-6 est porteur d'un groupement hydroxyle.

- les protons méthyliques H-10 et le carbone C-9 (56,9 ppm) ainsi qu'un carbone quaternaire repéré à 73,6 ppm ne pouvant être que le carbone C-8. Ils corréleront également avec un autre carbone méthyne repéré à 71,8 ppm attribuable au carbone C-7. Le spectre HSQC montre une corrélation avec un doublet observé à 3,98 ppm ($J = 9,8$ Hz) d'intégration 1H attribuable donc au proton H-7. La valeur du déplacement chimique du signal de ce dernier laisse suggérer que le carbone C-7 est substitué par le chlore. La valeur de la constante de couplage de l'ordre de 9,8 Hz indique que les protons H-6 et H-7 sont en position *trans*, préconisant ainsi que le proton H-7 est β orienté.

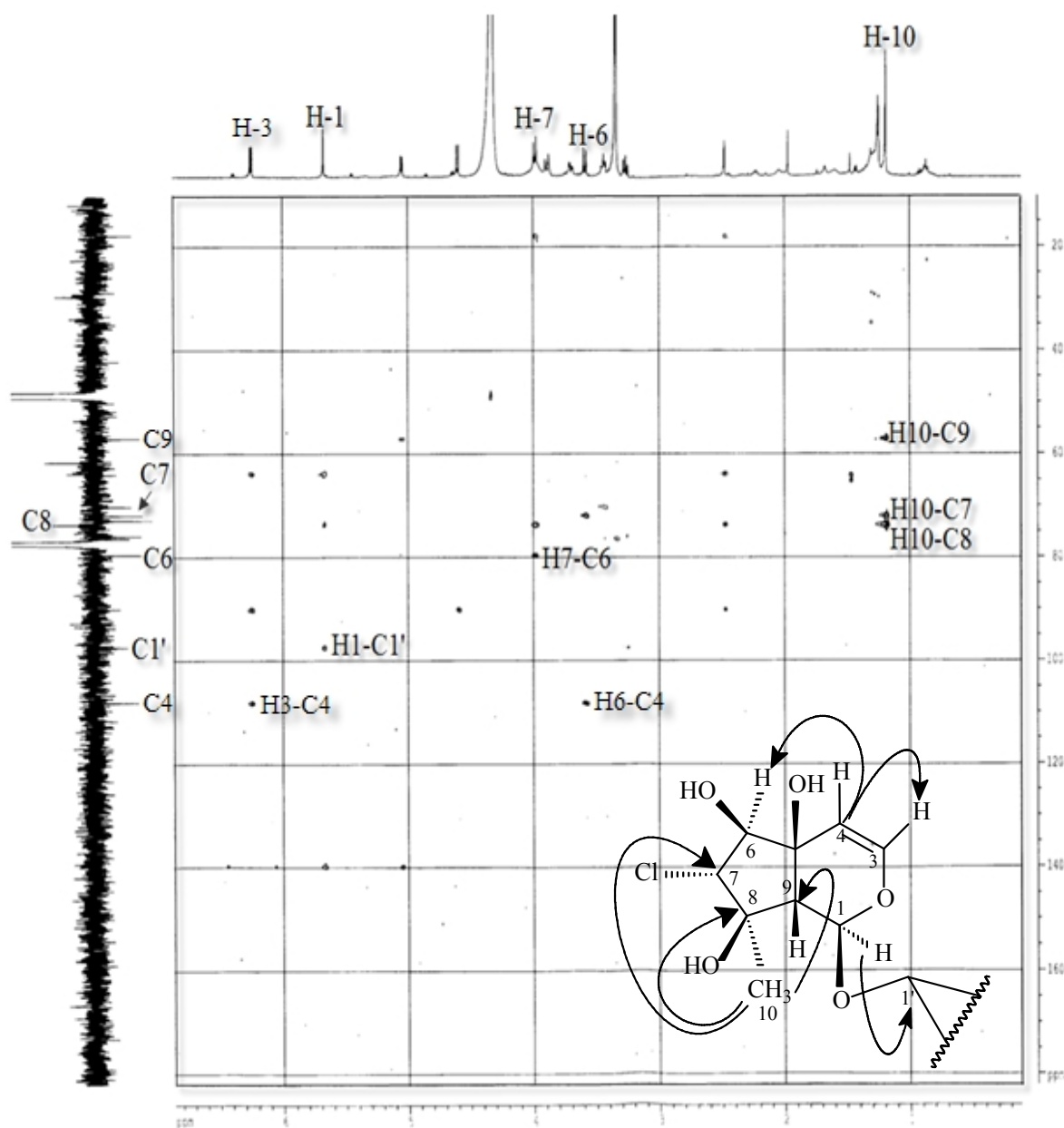


Figure III.20 : Spectre HMBC du composé 3

Les analyses HMBC et HSQC ont permis de caractériser sans ambiguïté tous les carbones constituant le composé **3**, comme le montre le spectre RMN ^{13}C (*J*-modulé) (Figure III.21).

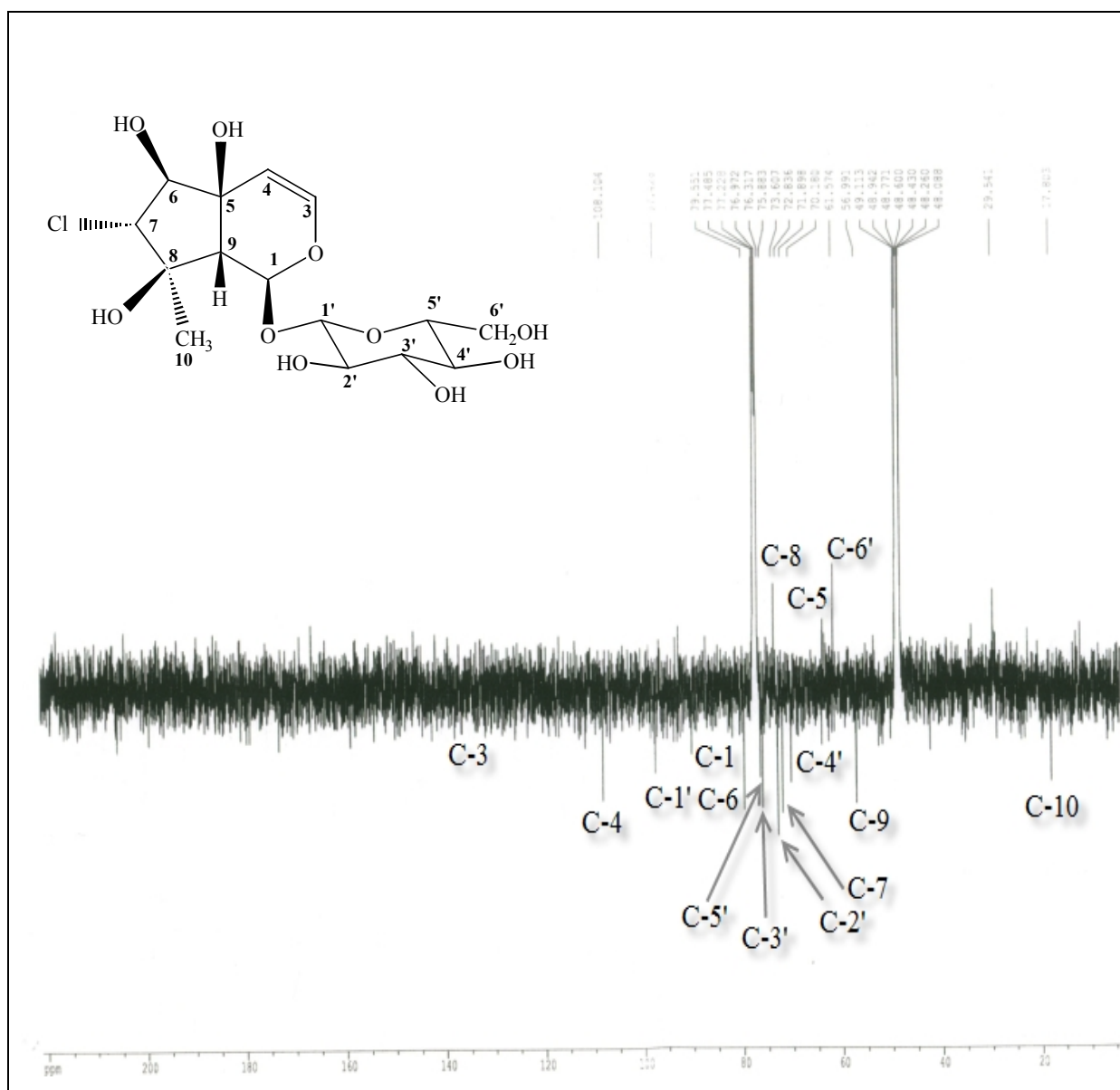


Figure III.21 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) du composé **3**

L'expérience NOESY (Figure III. 22) qui mesure les effets Overhauser entre protons a permis de confirmer, outre la stéréochimie des différents centres chiraux établis pour le composé **3**, la configuration au niveau du carbone C-7 porteur du chlore. L'effet NOE visualisé entre le proton H-9 d'orientation β et le proton H-7 prouve que ce dernier est également β orienté.

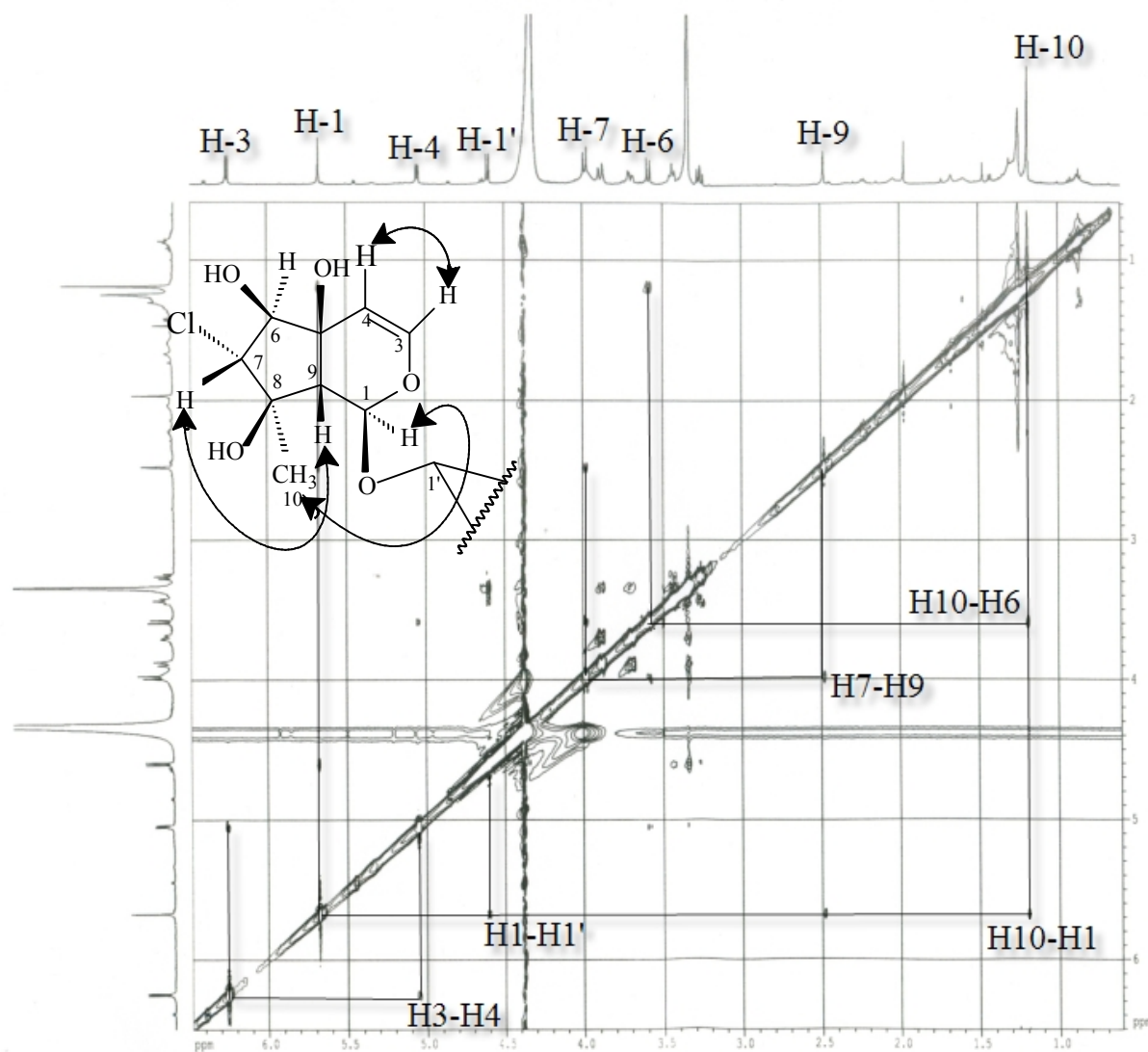
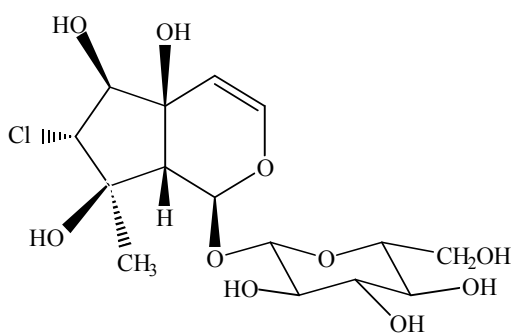


Figure III.22 : Spectre NOESY du composé 3

Ces valeurs de déplacements chimiques ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -130^\circ$, 0,025 g/100ml, Dioxane) s'avèrent identiques à celles d'un iridoïde isolé initialement des parties aériennes d'une plante du même genre *Linaria*, à savoir *L. japonica* [73]. Cet iridoïde nommé **linarioside** a été également isolé de l'espèce *Cymbalaria muralis* [71].



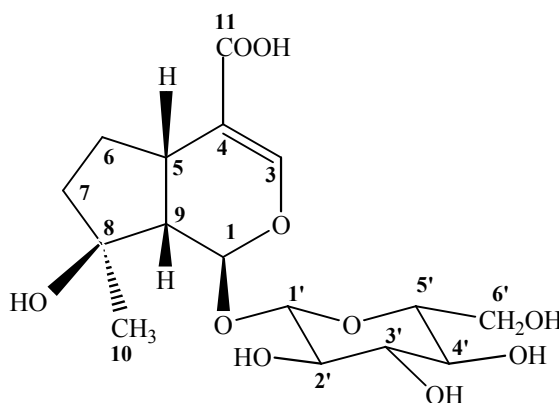
Linarioside

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau III.3.

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)
Aglycone			
1 (CH)	90,2	5,68 <i>sl</i>	-
3 (CH)	140	6,25 <i>d</i>	6,4
4 (CH)	108,1	5,50 <i>d</i>	6,4
5 (C)	64	-	-
6 (CH)	79,5	3,58 <i>d</i>	9,8
7 (CH)	71,8	3,98 <i>d</i>	9,8
8 (C)	73,6	-	-
9 (CH)	56,9	2,48 <i>sl</i>	-
10(CH ₃)	17,8	1,19 <i>s</i>	-
Glucose			
1' (CH)	97,4	4,60 <i>d</i>	8
2' (CH)	72,8	3,27 <i>dd</i>	8 ; 9
3' (CH)	75,8	3,44 <i>t</i>	9
4' (CH)	70,1	3,55 <i>nd</i>	-
5' (CH)	76,3	3,55 <i>m</i>	-
6' (CH ₂)	61,5	3,89 <i>dd</i> (H-6'a)	1,8 ; 12,1
		3,69 <i>dd</i> (H-6'b)	5,1 ; 12,1

Tableau III.3 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 3

III.2.4 Elucidation structurale du composé 4



Le spectre de masse du composé 4 (Figure III.23), obtenu aussi sous forme d'une huile incolore, montre les pics d'ions pseudo-moléculaires $[M-H]^-$ à $m/z = 375$ et $[M+Cl]^-$ à $m/z = 411$, suggérant une masse moléculaire de 376 uma et correspondant à une formule brute en C₁₆H₂₄O₁₀.

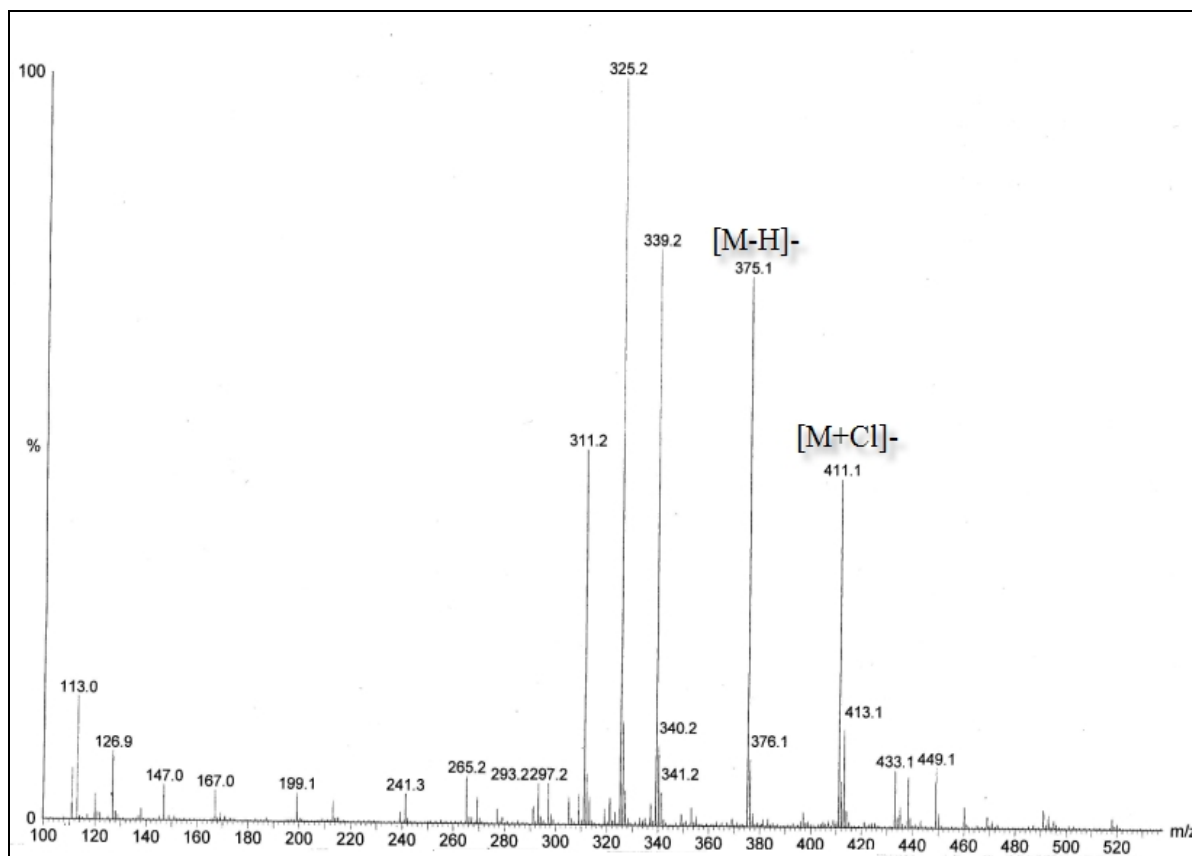


Figure III.23 : Spectre de masse du composé 4

Le spectre IR (Figure III.24) du composé 4 montre la présence d'une bande large à 3400 cm^{-1} (groupements hydroxyles) et une autre bande à 1731 cm^{-1} attribuable à une fonction carboxylique.

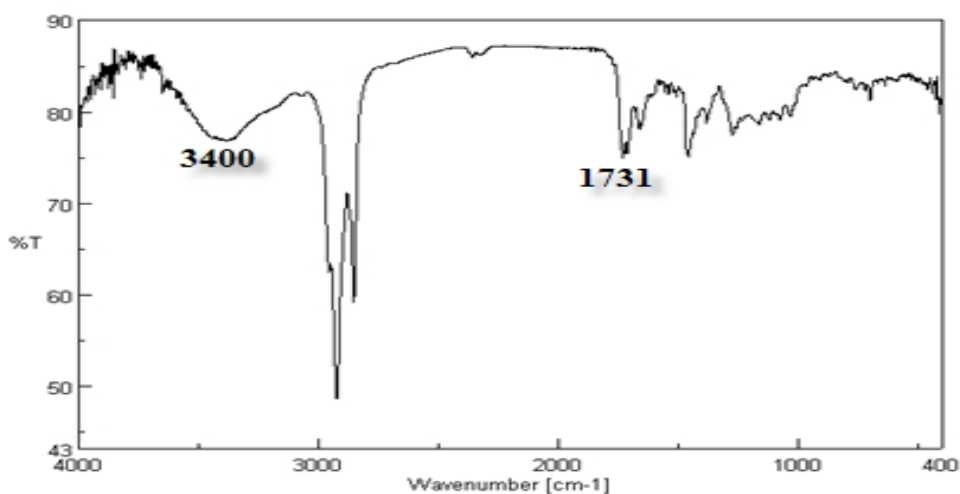


Figure III.24 : Spectre IR du composé 4

Le spectre RMN ^1H du composé 4 (Figure III.25) présente de nombreux points communs avec ceux de l'iridoïde décrit précédemment. On reconnaît notamment les signaux

doublets à 5,48 ($J = 3,8$ Hz) et 4,70 ppm ($J = 8$ Hz) correspondant respectivement aux protons H-1 et H-1', le signal singulet large à 7,38 ppm attribuable à priori au proton H-3. Sa multiplicité indique qu'il n'a aucun proton au voisinage, montrant ainsi que le carbone éthylénique C-4 est porteur d'un substituant déblindant au regard de la valeur de déplacement chimique du proton H-3. On reconnaît également le signal doublet de doublet résonant à $\delta_H = 2,27$ ($J = 3,8 ; 9,3$ Hz), attribuable au proton H-9 ainsi qu'un signal singulet à 1,32 ppm d'intégration 3H caractéristique du groupement méthyle CH₃-10. La différence notable concerne la disparition des signaux doublets à 5,50 ($J_{3-4} = 6,4$ Hz), 3,58 ($J_{6-7} = 9,8$ Hz) et 3,98 ppm ($J_{7-6} = 9,8$ Hz) correspondant respectivement aux protons H-4, H-6 et H-7. Il est par contre enregistré l'apparition de nouveaux signaux multiplets à 3,17 ppm (intégration 1H), 2,33 ppm (intégration 1H), 1,5 ppm (intégration 1H) et 1,73 ppm (intégration 2H).

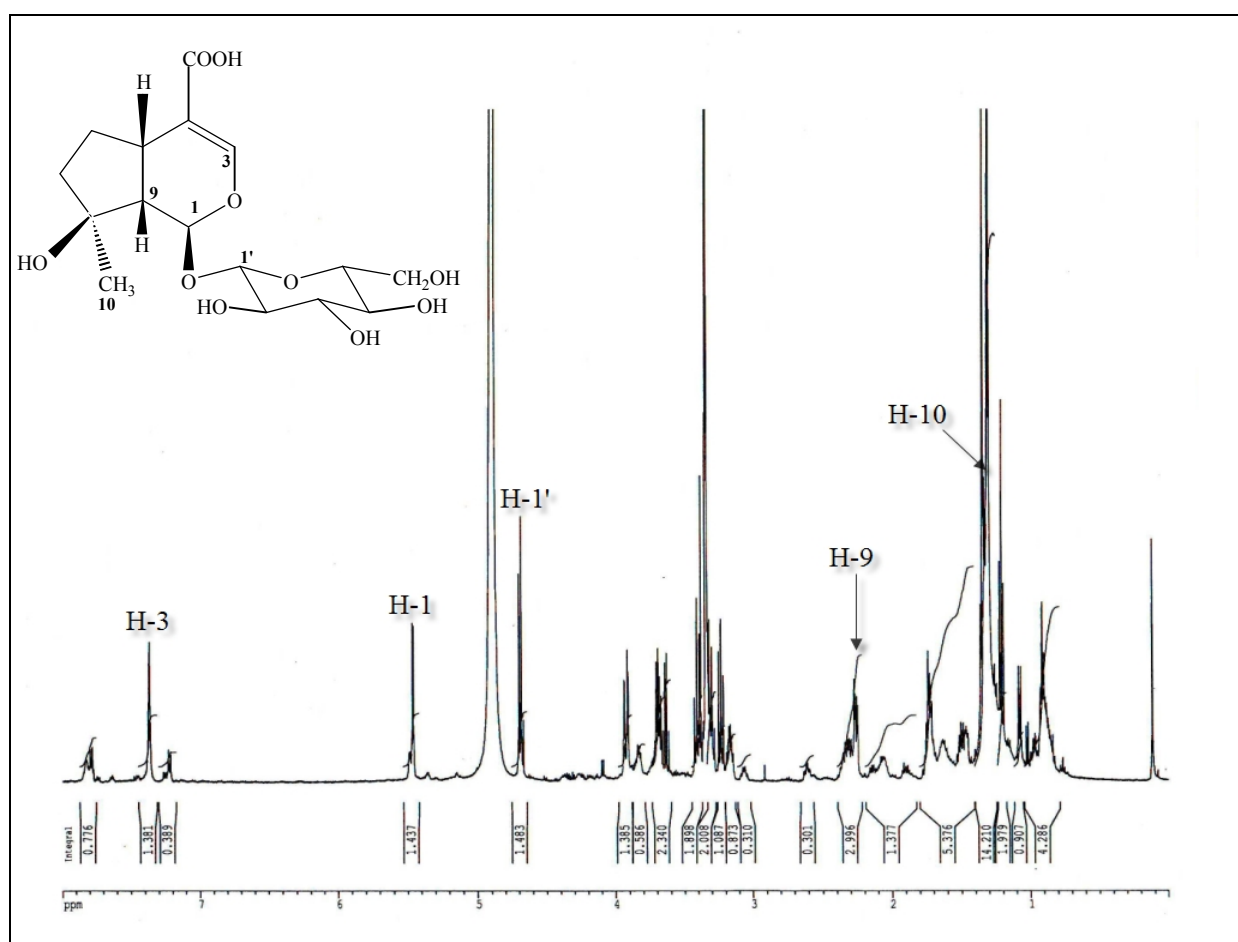


Figure III.25 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) du composé 4

L'analyse COSY H-H (Figure III.26) montre les couplages attendus entre les protons H-1 et H-9, le proton H-9 et un signal multiplet repéré à 3,17 ppm attribué au proton H-5. Ce

dernier montre un couplage avec un signal multiplet également observé à 1,5 ppm, correspondant à celui d'un proton en C-6 (H-6b). Ce dernier corrèle fortement, au regard des taches de corrélation, avec un proton repéré à 2,33 ppm et deux protons sortant à 1,73 ppm, correspondant respectivement à un second proton en C-6 (H-6a) et deux protons en C-7 (H-7).

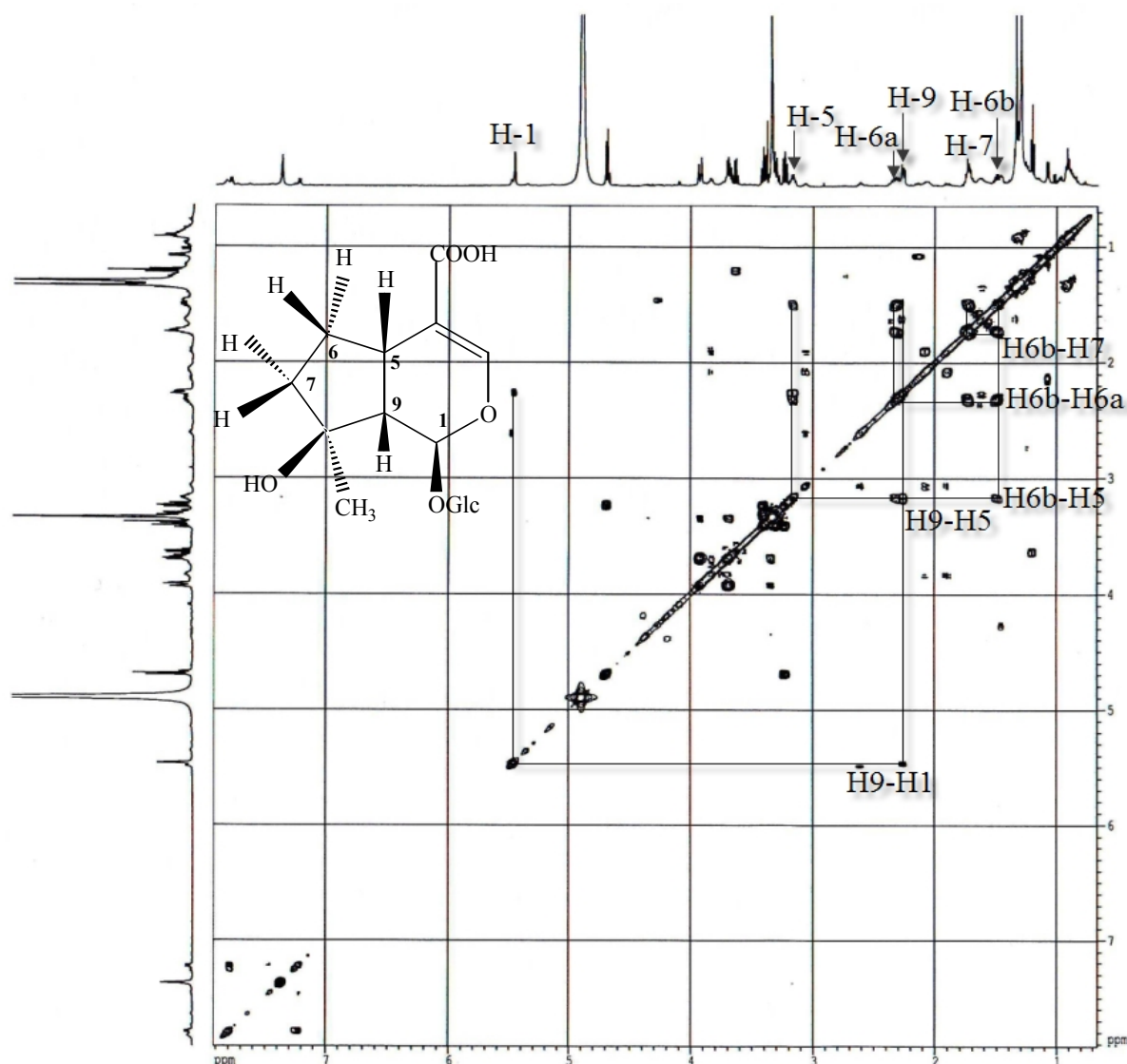


Figure III.26 : Spectre COSY du composé 4

Cette expérience permet aussi d'identifier, comme pour les produits décrits précédemment, un glucose de configuration β et cela partant du proton anomère H-1' (4,70 ppm).

La correspondance des protons et carbones de ce composé est ensuite établie par l'expérience HSQC (Figure III.27) qui montre les couplages directs entre :

- le proton H-1' et son carbone C-1' résonant à $\delta_C = 99,5$.
- le proton H-2' et son carbone C-2' résonant à $\delta_C = 74,4$.
- le proton H-3' et son carbone C-3' résonant à $\delta_C = 77,6$.
- le proton H-4' et son carbone C-4' résonant à $\delta_C = 71,4$.
- le proton H-5' et son carbone C-5' résonant à $\delta_C = 77,9$.
- les deux protons H-6' et leur carbone C-6' résonant à $\delta_C = 62,7$.
- le proton H-1 et son carbone résonant à $\delta_C = 94,9$.
- le proton H-5 et son carbone résonant à $\delta_C = 31,8$.
- les deux protons H-6a et H-6b et leur carbone résonant à $\delta_C = 30,5$.
- les deux protons H-7 et leur carbone résonant à $\delta_C = 40,7$.
- le proton H-8 et son carbone résonant à $\delta_C = 80,2$.
- le proton H-9 et son carbone résonant à $\delta_C = 52,1$.
- les protons méthyliques H-10 et leur carbone résonant à $\delta_C = 24,5$.

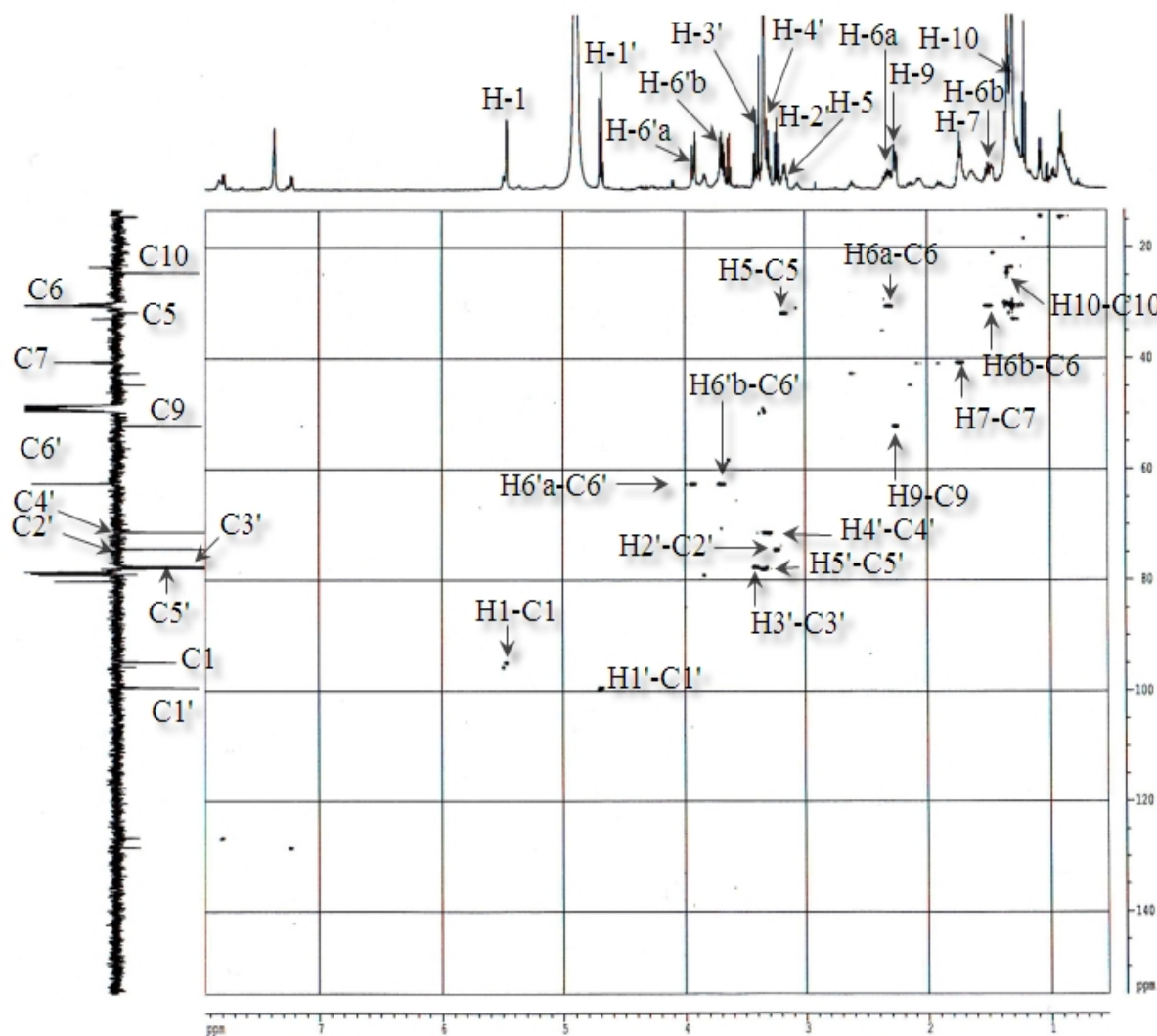


Figure III.27 : Spectre HSQC du composé 4

L'expérience HMBC (Figure III.28) confirme le site de glucosylation en C-1, par l'observation d'un couplage en $^3J_{C-H}$ entre le proton H-1 (5,48 ppm) de la génine et le carbone anomère C-1' (99,5 ppm) du glucose. D'autres couplages sont également observés entre les trois protons méthyliques repérés à 1,32 ppm et les carbones C-7 et C-8 repérés respectivement à 40,7 et 80,2 ppm.

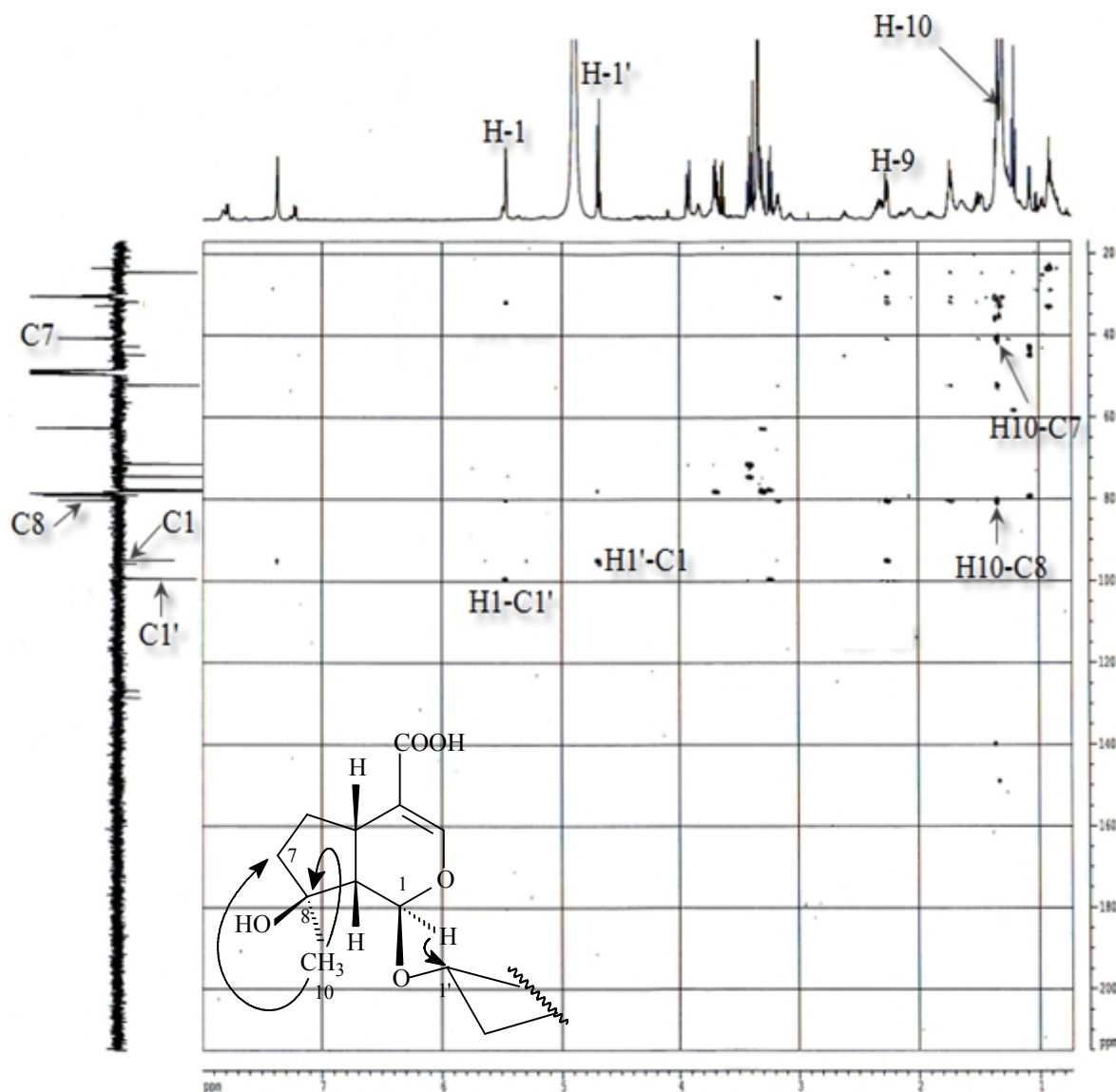


Figure III.28 : Spectre HMBC du composé 4

A l'issue de cette analyse et comparativement aux iridoïdes décrits précédemment, il en ressort que la différence notable réside en une absence totale de substituants au niveau des carbones C-5, C-6 et C-7 et l'existence d'un substituant en C-4. La nature de ce substituant, en l'occurrence un groupement acide carboxylique, a été déduite au moyen de la spectrométrie de mass et la spectroscopie infra-rouge. Le signal carbone quaternaire du groupement COOH n'a pas été détecté au niveau du spectre RMN ^{13}C , en raison certainement de la faible quantité de produit.

La stéréochimie de ce composé a été déterminée en analysant le spectre NOESY (Figure III.29). On observe les corrélations entre :

- le proton H-1 de la génine de configuration α et le proton anomère H-1' du glucose.
- le proton H-1 et les protons méthyliques H-10 qui substituent le carbone en C-8.
- le proton H-9 en position β et le proton H-5.

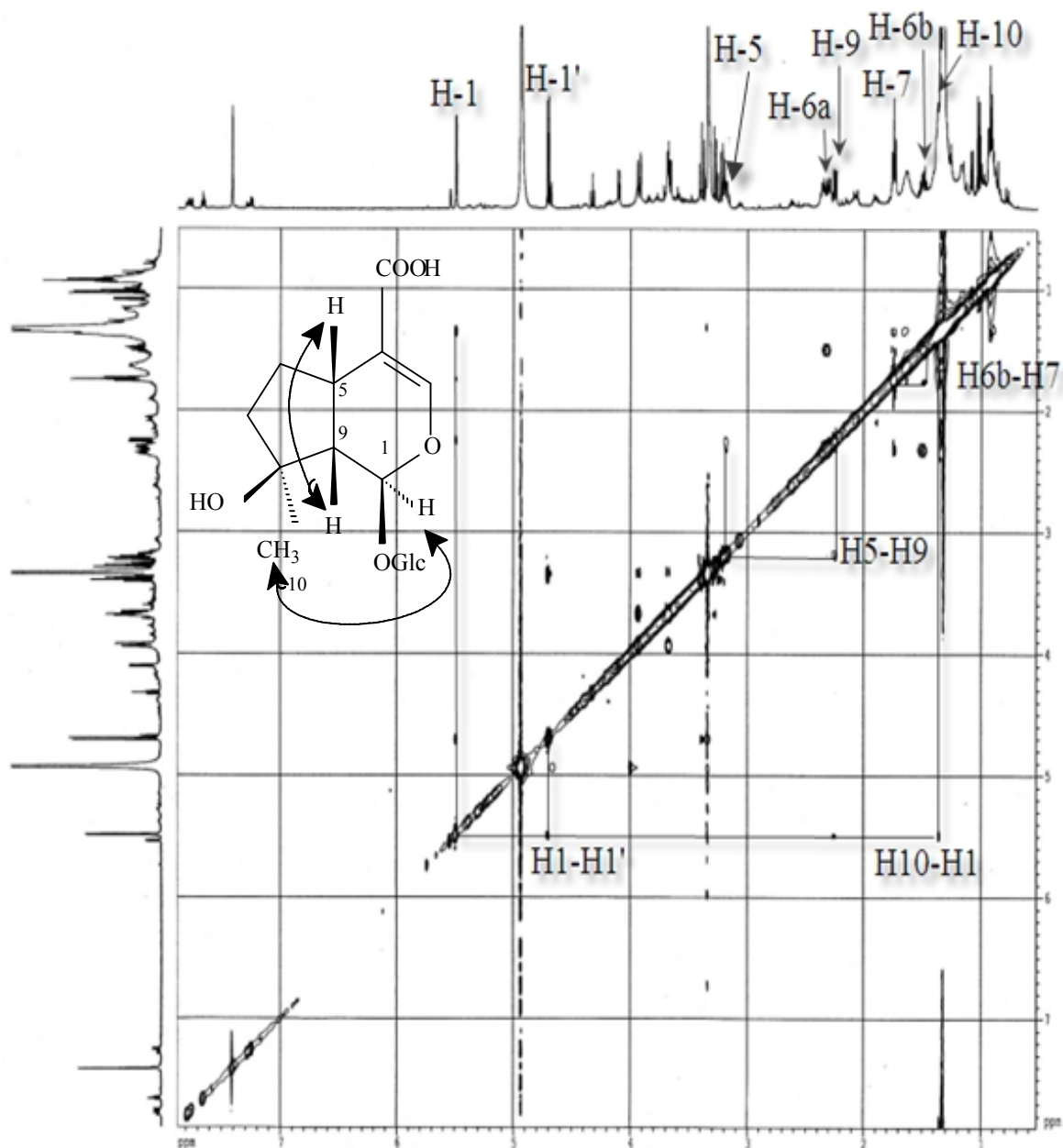


Figure III.29 : Spectre NOESY du composé 4

L'attribution complète des signaux observés en RMN ^{13}C J -modulé (Figure III.30) confirmant la structure proposée, est établie conjointement par les expériences de corrélation hétéronucléaire HSQC et HMBC.

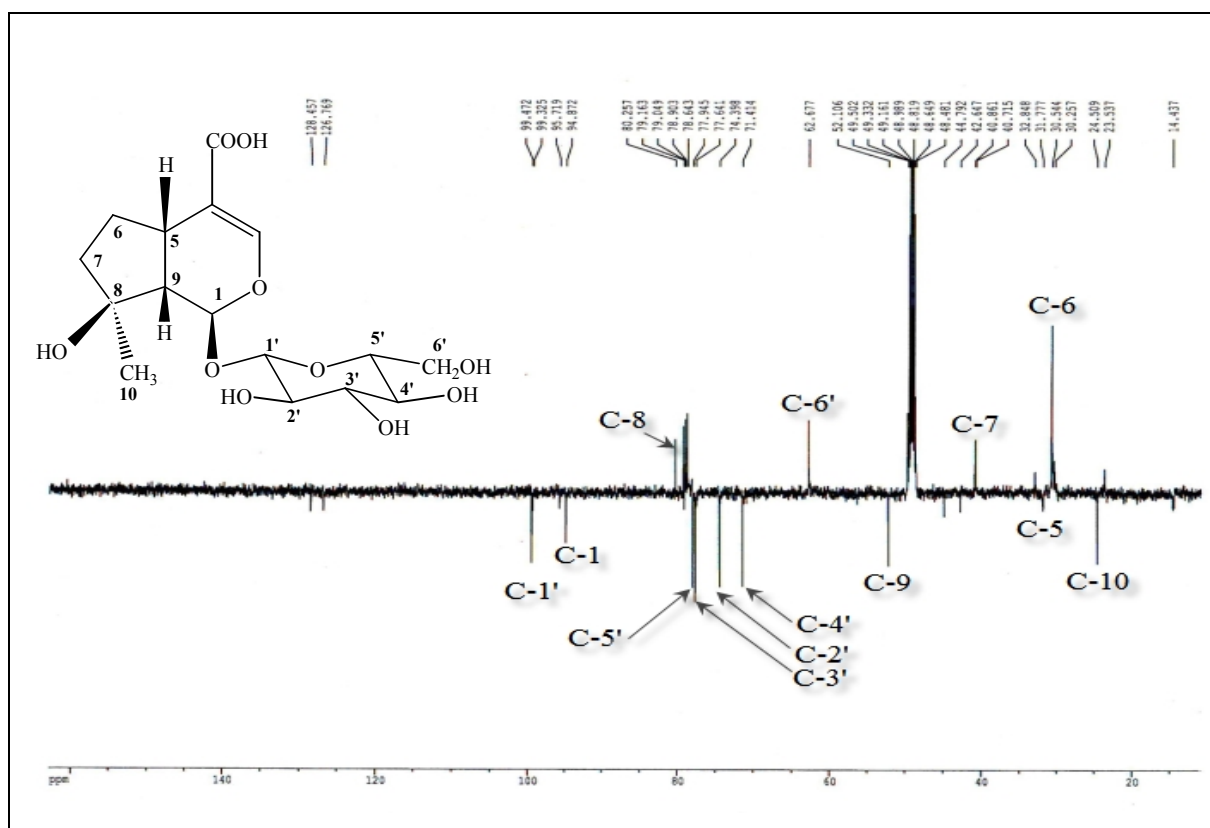
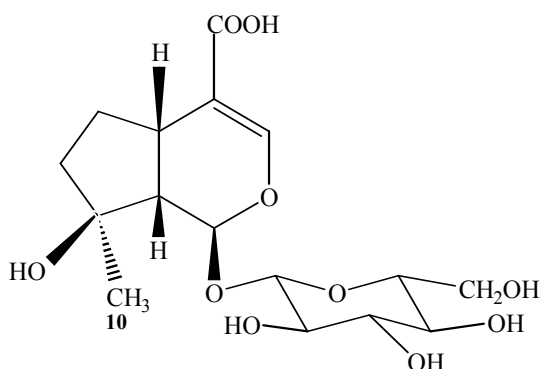


Figure III.30 : Spectre RMN ^{13}C (J -modulé) du composé 4

Toutes ces données spectrales ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_{\text{D}} = -110^\circ$, 0,02 g/100ml, MeOH) permettent d'identifier ce composé à un iridoïde nommé **acide mussaenosidique**, antérieurement isolé de *Globularia vulgaris* [70]. Il a été également identifié dans l'espèce *Melampyrum cristatum* [74]. Il apparaît que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Linaria*.



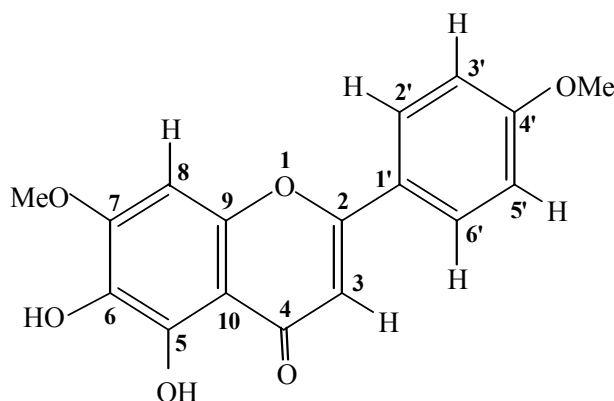
Acide mussaenosidique

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau (III.4) ci-après :

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)
Aglycone			
1 (CH)	94,9	5,48 <i>d</i>	3,8
3 (CH)	-	7,38 <i>sl</i>	-
4 (C)	-	-	-
5 (CH)	31,8	3,17 <i>m</i>	-
6 (CH ₂)	30,5	2,33 <i>m</i> (H-6 a) 1,50 <i>m</i> (H-6 b)	-
7 (CH ₂)	40,7	1,73 <i>m</i>	-
8 (C)	80,2	-	-
9 (CH)	52,1	2,27 <i>dd</i>	3,8 ; 9,3
10(CH ₃)	24,5	1,32 <i>s</i>	-
11 (C)	-	-	-
Glucose			
1' (CH)	99,5	4,70 <i>d</i>	8
2' (CH)	74,4	3,23 <i>dd</i>	8 ; 9
3' (CH)	77,6	3,41 <i>t</i>	9
4' (CH)	71,4	3,32 <i>t</i>	9
5' (CH)	77,9	3,34 <i>m</i>	-
6' (CH ₂)	62,7	3,92 <i>dd</i> (H-6'a) 3,69 <i>dd</i> (H-6'b)	2,2 ; 11,9 6 ; 11,9

Tableau III.4 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 4

III.2.5 Elucidation structurale du composé 5



Le composé **5** qui se présente sous forme de cristaux jaunes, montre par analyse CCM et sous lumière UV ($\lambda = 365$ nm), une fluorescence jaune laissant envisager pour ce produit une structure de type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV, enregistré dans le méthanol (Figure III.32), confirme cette hypothèse et cela par l'observation de deux bandes d'absorption caractéristiques, la bande I vers 332 nm correspondant au cycle B et la bande II vers 285 nm correspondant au cycle A d'un flavonoïde. L'addition du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) qui provoque un déplacement bathochromique de 18 nm pour la bande II et de 30 nm pour la bande I, traduisant ainsi la formation d'un complexe de trichlorure

d'aluminium, indique que le carbone en C-5 du cycle A est porteur d'un groupement hydroxyle. La valeur de la longueur d'onde de la bande I (332 nm) oriente vers une structure flavonique. Cette dernière inférieure à 435 nm, indique également l'absence de groupement hydroxyle en C-8.

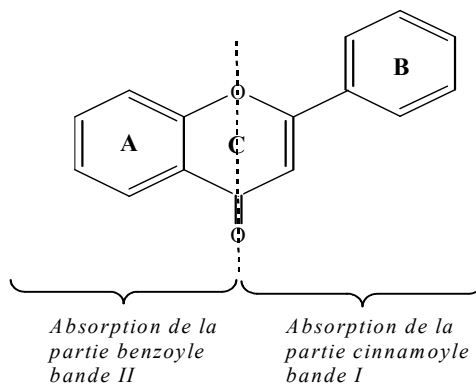


Figure III.31 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

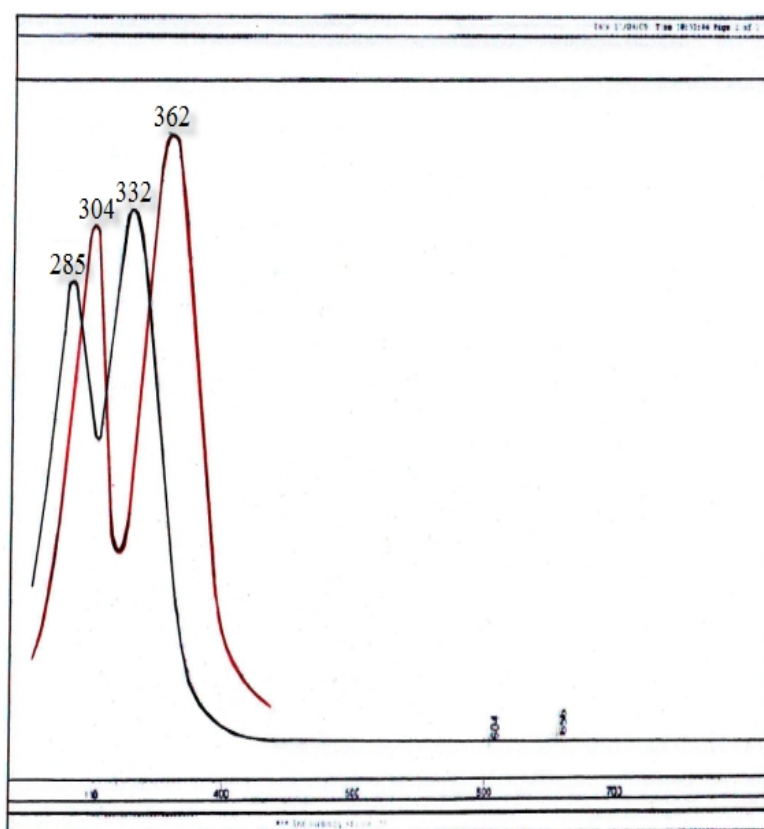


Figure III.32 : Spectre UV du composé 5

Le spectre de masse ESI de ce composé, enregistré en mode positif (Figure III.33), révèle deux ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ à $m/z = 315$ et $[M+Na]^+$ à $m/z = 337$, soit une masse moléculaire de 314 uma correspondant à une formule brute en $C_{17}H_{14}O_6$.

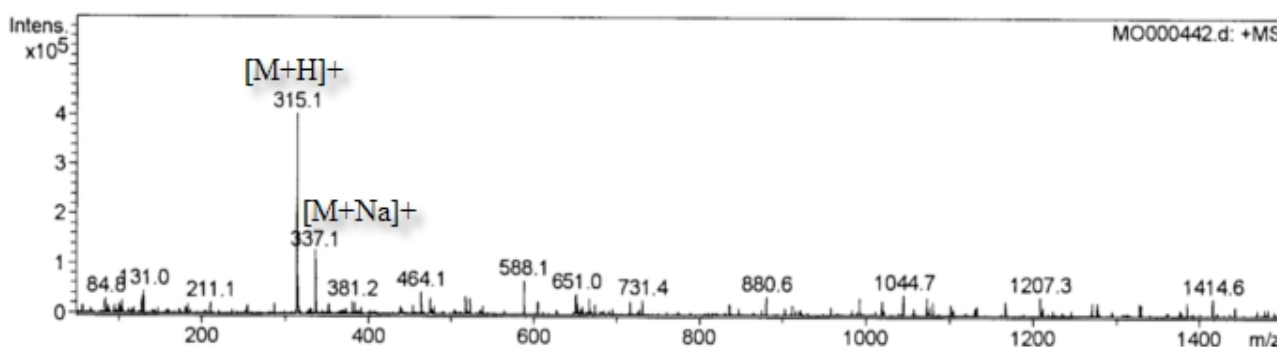


Figure III.33 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé 5

Le spectre RMN ^1H du composé **5** (Figure III.34) enregistré à 500 MHz et dans un mélange chloroforme-méthanol, montre qu'on est effectivement en présence d'une molécule à squelette flavonoïdique. Il présente :

- un signal singulet repéré à 6,58 ppm, caractéristique du proton oléfinique H-3 d'une flavone.
- un signal singulet d'intégration 1H à 6,68 ppm attribuable au proton H-8.
- deux signaux doublets d'intégration 2H chacun repérés à 7,03 ppm ($J = 8,9$ Hz) et 7,88 ppm ($J = 8,9$ Hz), caractéristiques de protons aromatiques symétriques.
- deux signaux singulets s'intégrant chacun pour 3 protons à 3,88 et 3,98 ppm, suggérant la présence de deux groupements méthoxyles.

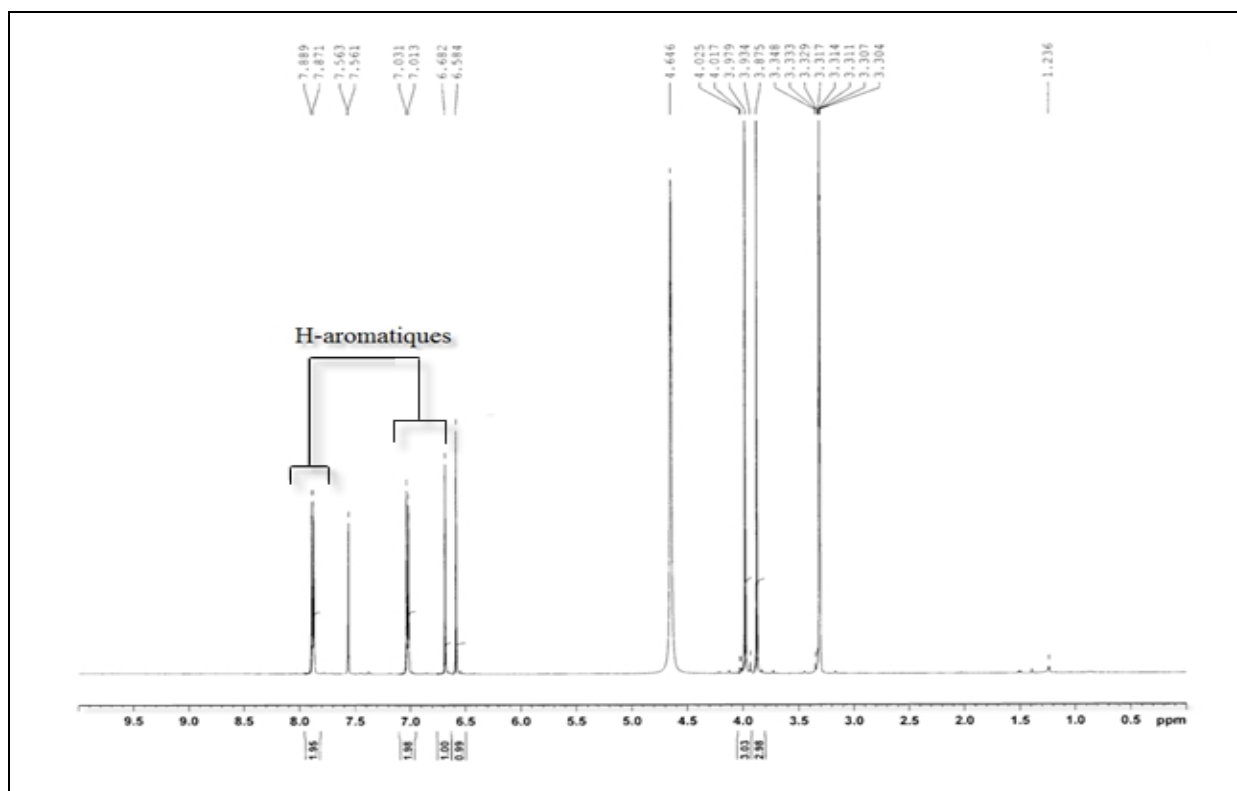


Figure III.34 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/ \text{CDCl}_3$) du composé 5

Toute cette analyse spectrale conjuguée à la spectrométrie de masse mènent à un composé flavonique trisubstitué sur le cycle A et monosubstitué en para sur le cycle B. Les quatre substituants sont constitués par deux groupements méthoxyles cités précédemment et deux groupements hydroxyles dont l'un est porté par le carbone en C-5. Le seul problème quant à l'établissement définitif de la structure est lié à la position exacte des trois substituants restants, deux méthoxyles et un hydroxyle. L'obtention de ce composé sous forme de cristaux nous a donné l'opportunité de le soumettre à une analyse RX et le moyen d'assigner sans ambiguïté la position de ces trois substituants sur le squelette flavonique.

En effet, l'analyse radio-cristallographique de ces cristaux jaunes a donné la structure ci-dessous (Figure III.35). Structure qui montre clairement que les deux groupements méthoxyles sont positionnés en C-7 et C-4' et les deux hydroxyles en C-5 et C-6 du flavonoïde.

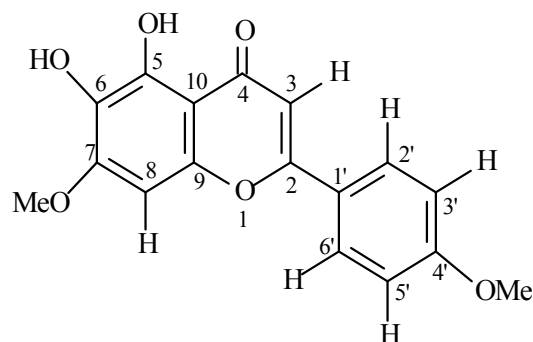
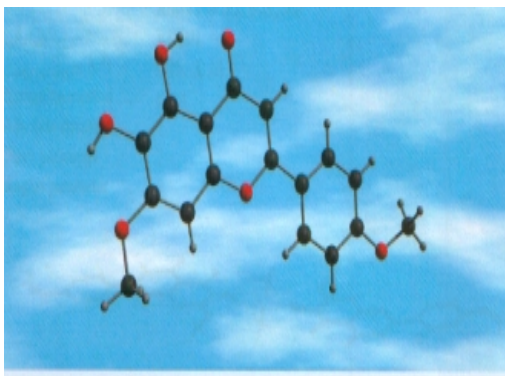


Figure III.35 : Structure par analyse radio-cridtallographique (RX)

Au niveau du spectre RMN ^1H (Figure III.36), les signaux des protons se trouvent ainsi identifiés comme suit :

- le signal singulet repéré à 6,58 ppm est attribuable au proton oléfinique H-3.
- le signal singulet à 6,68 ppm correspond au proton aromatique H-8.
- les deux signaux doublets d'intégration 2H à 7,03 ppm ($J = 8,9$ Hz) sont attribuables aux protons H-3' et H-5'.
- les deux signaux doublets d'intégration 2H à 7,88 ppm ($J = 8,9$ Hz) correspondent aux protons H-2' et H-6', indiquant ainsi une substitution en position 4'. La constante de couplage égale à 8,9 Hz confirme qu'ils sont situés en position ortho.
- deux signaux singulets s'intégrant chacun pour 3 protons, observés à 3,88 et 3,98 ppm, correspondent aux deux groupements méthoxyles situés en positions 7 et 4'.

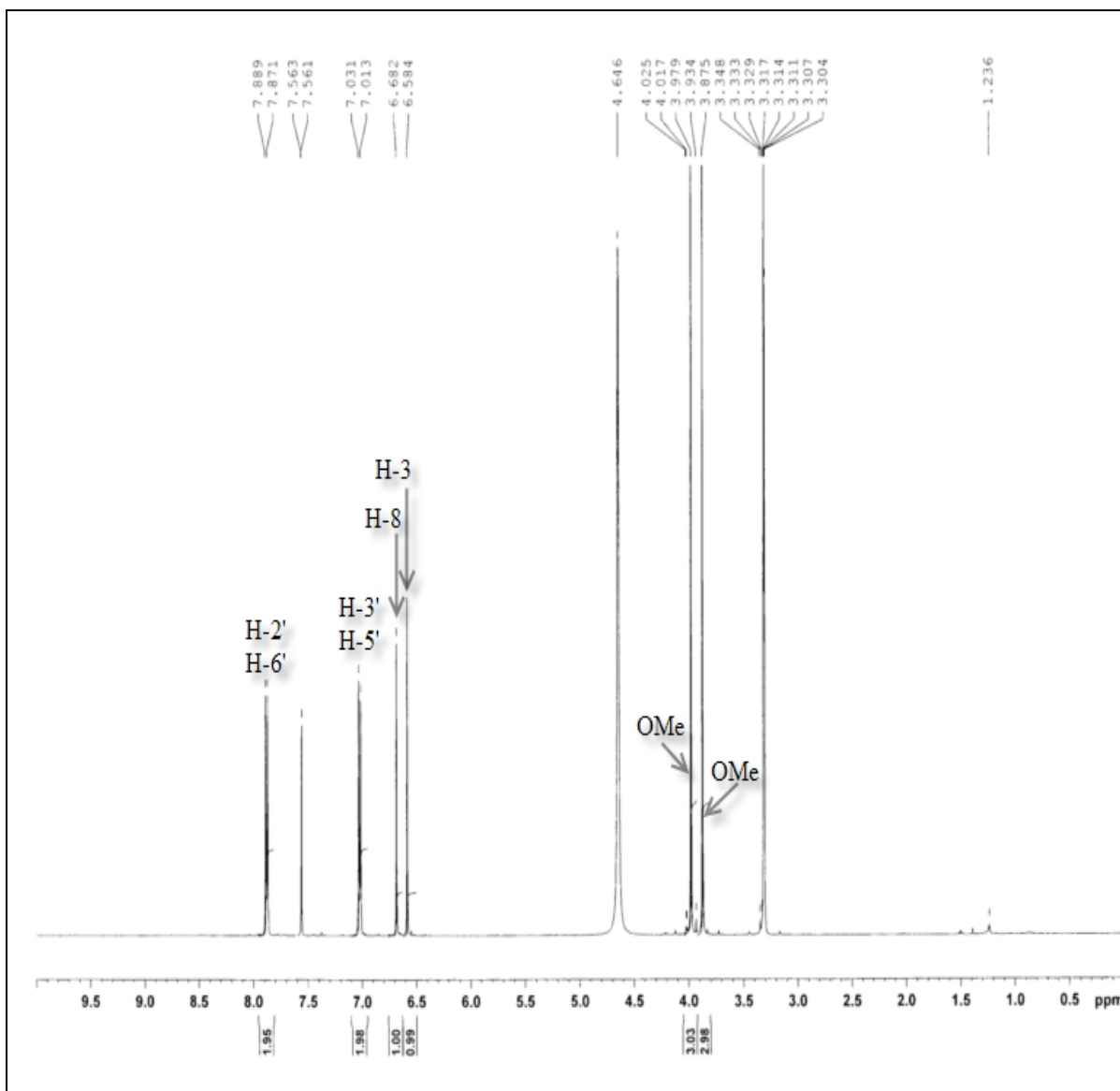


Figure III.36 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) du composé 5

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (Figure III.37) a permis de caractériser tous les carbones de la molécule. Ces derniers, au nombre de 17, sont identifiés comme suit :

- les deux carbones éthyléniques C-3 (103,8 ppm) et C-2 (165,3 ppm).
- les carbones méthines aromatiques C-8 (91,3 ppm), C-3' et C-5' (115,1 ppm), C-2' et C-6' (128,7 ppm).
- les deux carbones méthoxyliques à 55,8 et 56,7 ppm, positionnés en C-7 et C-4' respectivement.
- sept carbones aromatiques quaternaires : C-10, C-1', C-6, C-9, C-5, C-7, C-4' résonant respectivement à 106,2 ; 124,1 ; 130,8 ; 146,4 ; 151,3 ; 154,9 et 163,5 ppm.
- le carbone C-4 porteur d'un carbonyle (183,6 ppm).

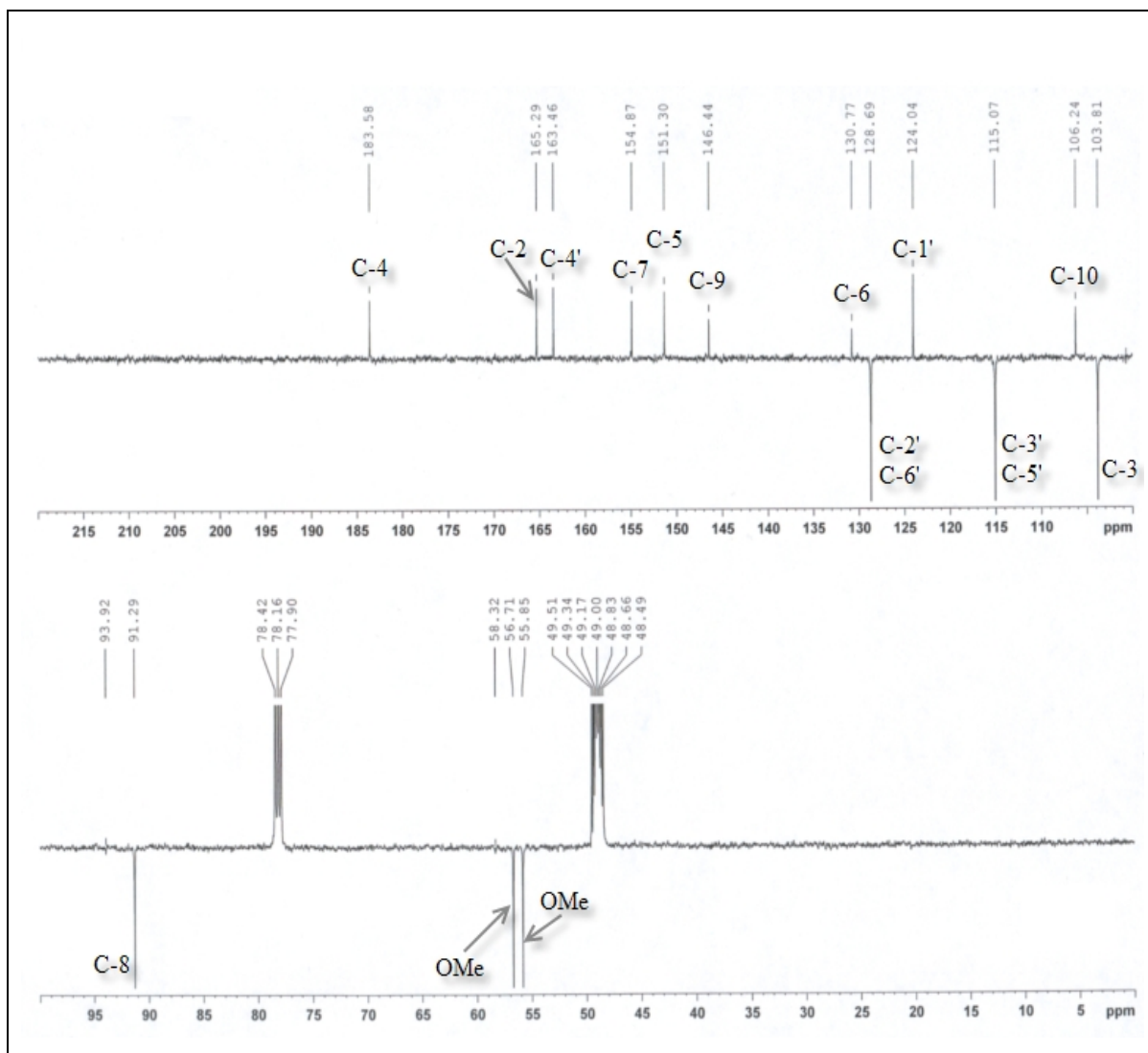
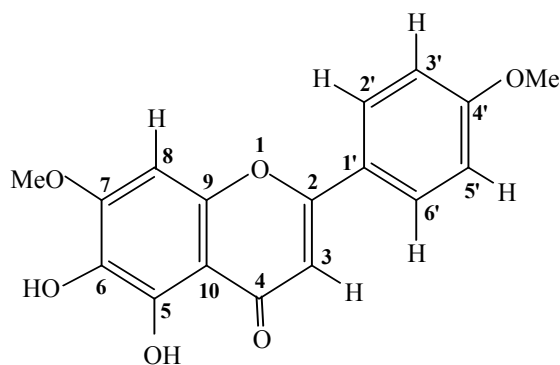


Figure III.37 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) du composé **5**

On en déduit ainsi que le composé **5** a pour structure : 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone ^[75]. Ce composé connu sous le nom de **ladaneine** a été antérieurement isolé de *Colebrookea oppositifolia* ^[76]. Il apparaît que ce flavonoïde a été isolé pour la première fois dans le genre *linaria*.



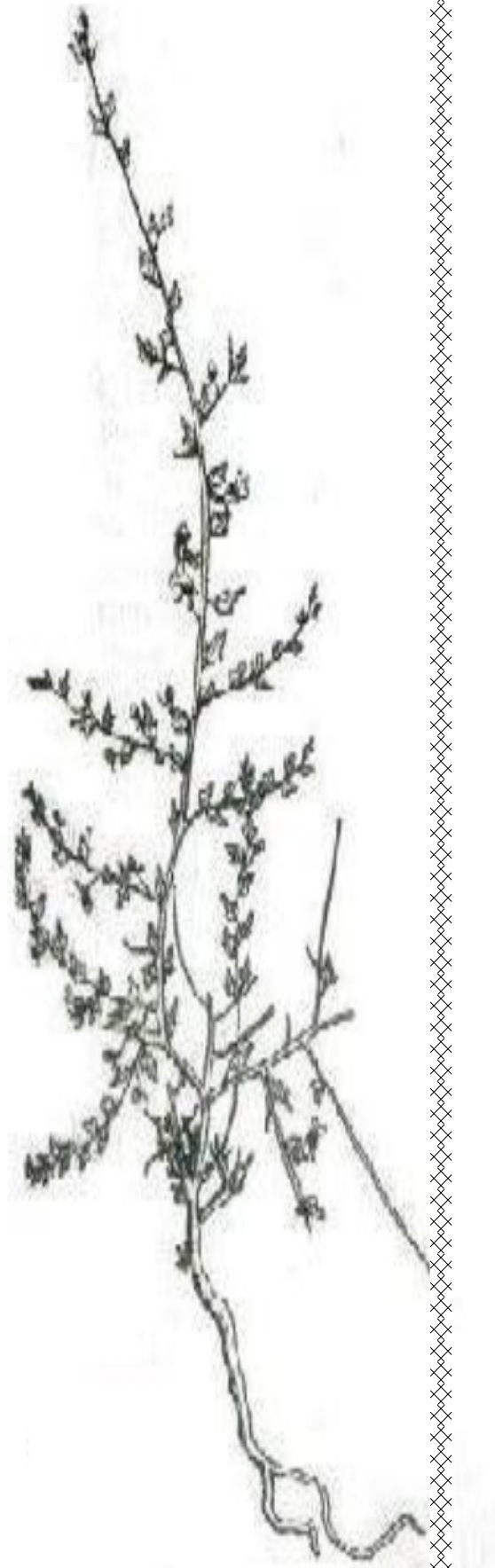
Ladaneine

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau III.5 suivant :

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)
2 (C)	165,3	-	-
3 (CH)	103,8	6,58 <i>s</i>	-
4 (C)	183,6	-	-
5(C)	151,3	-	-
6 (C)	130,8	-	-
7 (C)	154,9	-	-
8 (CH)	91,3	6,68 <i>s</i>	-
9 (C)	146,4	-	-
10 (C)	106,2	-	-
1' (C)	124,1	-	-
2'(CH)	128,7	7,88 <i>d</i>	8,9
3' (CH)	115,1	7,03 <i>d</i>	8,9
4' (C)	163,5	-	-
5' (CH)	115,1	7,03 <i>d</i>	8,9
6' (CH)	128,7	7,88 <i>d</i>	8,9
OMe	55,8	3,88 <i>s</i>	-
OMe	56,7	3,98 <i>s</i>	-

Tableau III.5 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 5

CONCLUSION



CONCLUSION

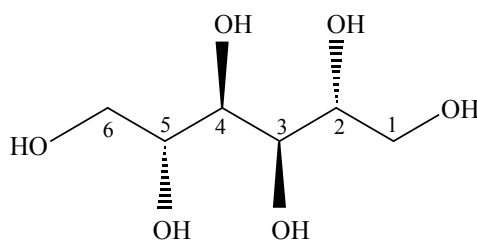
Le présent travail rapporte une investigation phytochimique réalisée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes d'une plante algérienne *Linaria aegyptiaca*, appartenant à la famille des Scrophulariaceae. Au cours de cette étude qui a été attribuée incontestablement à compléter la connaissance des composés chimiques des Scrophulariaceae en général, et le genre *Linaria* en particulier, cinq métabolites secondaires ont été isolés. Ces derniers se répartissent en : un sucre **Mannitol (1)**, trois iridoïdes : l'**Antirrhinoside (2)**, **Linarioside (3)** et l'**Acide mussaenosidique (4)**, et un flavonoïde **Ladaneine (5)**.

Les produits isolés ont été obtenus à l'état pur grâce à l'utilisation combinée des différentes techniques chromatographiques employées au laboratoire (CC et CPP).

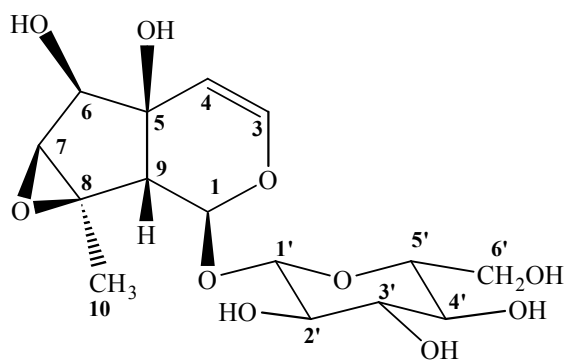
Les structures des produits isolés ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D ^1H et ^{13}C *J*-modulé, RMN 2D COSY, HSQC (*J*-modulé), HMBC et NOESY, spectrométrie de masse (ESI) et spectroscopie IR et UV et par radio-cristallographie (RX), et par comparaison avec les données de la littérature.

Cette étude a montré encore une fois que les iridoïdes glycosilés et les flavonoïdes restent les constituants dominants des Scrophulariaceae. L'iridoïde (**4**) et le flavonoïde isolés pour la première fois dans le genre *Linaria*, par contre les deux iridoïdes (**1**) et (**2**) ont été isolés et identifiés de plusieurs espèces de *Linaria*.

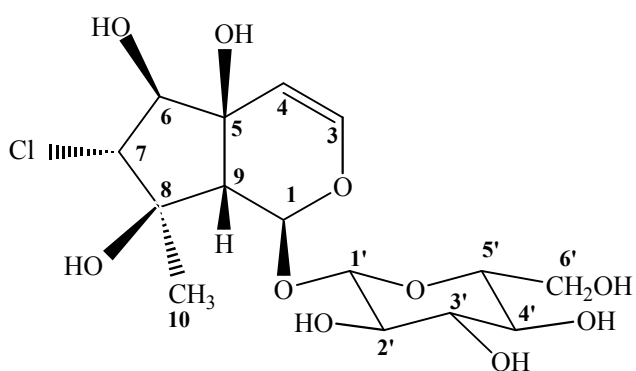
En conclusion, notre travail a permis d'isoler et de déterminer les structures des composés isolés **1**, **2**, **3**, **4** et **5** correspondant aux formules suivantes :



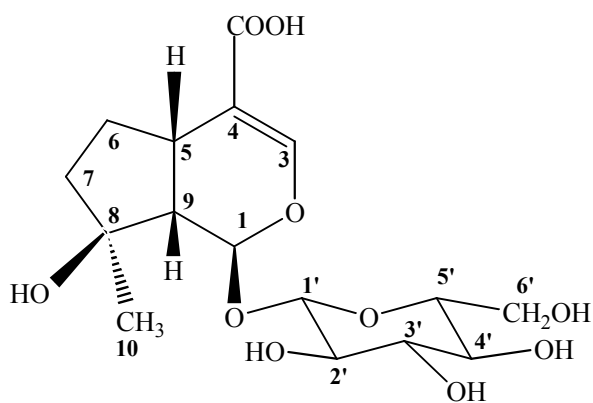
Composé 1 : Mannitol



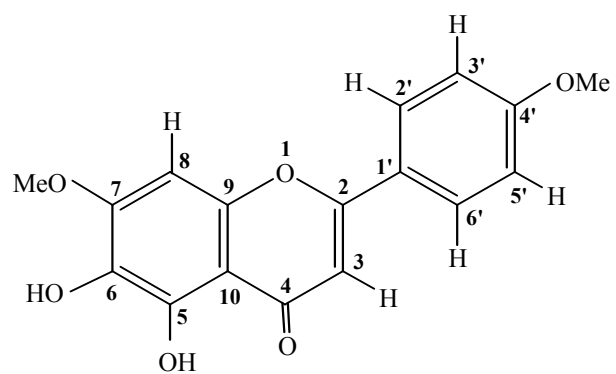
Composé 2 : Antirrhinoside



Composé 3 : Linarioside



Composé 4 : Acide mussaenosidique



Composé 5 : Ladaneine

BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie

- [1] Ismael Elias, S.; Castro Souza, V.; Appezato-da-Glória, B., *Brazilian archives of biology and technology*, **2001**, 44 (3), 303-311.
- [2] Valdés, B.; Talavera, S.; Fernandez-Galiano E., Flora vascular de Andalucía Occidental (Scrophulariaceae), 1987, 2. Barcelona : Ketres. 486-547.
- [3] Viano, J., *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*, **1978**, 35, 261-277.
- [4] Quezel, P.; Santa, S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. **1963**, vol. 1 et 2. CNRS, Paris.
- [5] Ozenda, P., Flore et végétation du Sahara, **1991**, CNRS, Paris.
- [6] Stojanov, N.; Stefanov, B.; kitanov, B., *Flora Bulgarica*, **1967**, part II, Nauka i iskustvo, Sofia, 959.
- [7] Stojanov, N., *Our Medicinal Plants*, **1973**, part II, Nauka i iskustvo, Sofia, 99.
- [8] Jiangsu College of New Medicine, "A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines", 1977, People's Hygiene Publisher, Beijing.
- [9] Otsuka, H., *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57, 357-362.
- [10] Kitagawa, I.; Tani, T.; Akita, K.; Yosioka, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, 21.
- [11] Boukef, M.K., Médecine traditionnelle et pharmacopée, **1986**, ISBN.
- [12] Handjieva, N.V.; Ilieva, E.I.; Spassov. S.L.; Popov, S.S., *Tetrahedron*, **1993**, 49 (41), 9261-9266.
- [13] Ercil, D.; Sakar, M.K.; Del Olmo, E.; San Feliciano, A., *Turk. J. Chem.*, **2004**, 28, 133.
- [14] Cragg, G.M.; Newman, D.J., *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **2000**, 9, 2783.
- [15] Tundis, R.; Deguin, B.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M. ; Statti, G.A. ; Tillequi, F.; Menichini, F., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**, 15, 4757-4760.
- [16] Gordaliza, M.; Miguel Del Corral, J.M.; de la Puente, L.M.; Garcia-Grávalos, M.D.; San Feliciano, A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1997**, 7 (13), 1649-1654.

- [17] Benrrezouk, R.; Terencio, M.C.; Ferrándiz, M.L.; San Feliciano, A.; Gordaliza, M.; Miguel del Corral, J.M.; de la Puente, M.L.; Alcaraz, M.J., *Pharmacology Letters*, **1999**, *64*, 205-211.
- [18] Ilieva, E.; khandzeva, N.; Popov, N.S., *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 1040.
- [19] Soren, D.; Soren, R.J.; Bentjuhl, J.N., *Phytochemistry*, **1981**, *42*, 2717.
- [20] Bahar, A.; Al-Rehaily, A.J.; Al-Howiriny, T.A.; El-Sayed, K.A.; Shamim Ahmed, M., *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, *26* (4), 462-467.
- [21] Hua, H.; Cheng, M.; Li, X.; Pei, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50* (10), 1393-1394.
- [22] Sticher, O., *Phytochemistry*, **1971**, *10*, 1974-1975.
- [23] Ilieva, E.I., Handjieva, N.V.; Popov, S.S., *Phytochemistry*, **1992**, *31* (3), 1040-1041.
- [24] Otsuka, H., *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1252-1255.
- [25] Otsuka, H., *Phytochemistry*, **1993**, *33* (3), 617-622.
- [26] Otsuka, H., *Phytochemistry*, **1995**, *39* (5), 1111-1114.
- [27] Kitagawa, I.; Yoshihara, M.; Tani, T.; Yosioka, I., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *1*, 23-26.
- [28] Kitagawa, I.; Yoshihara, M.; Kamigauchi, T., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *14*, 1221-1224.
- [29] Otsuka, H., *Phytochemistry*, **1993**, *32* (4), 979-981.
- [30] Otsuka, H., *Phytochemistry*, **1994**, *37* (2), 461-465.
- [31] Gordaliza, M.; Miguel Del Corral, J.M.; Mahique, M.M.; Castro, M.A.; San Feliciano, A., *Phytochemisrty*, **1995**, *40* (4), 1307-1309.
- [32] Uddin Ahmed, V.; Kousar, F.; Zubair, M.; Khan, A.; Ali, M.S.; Choudhary, I.; Sener, B., *Fitoterapia*, **2006**, *77*, 12-14.
- [33] Bianco, A.; Guiso, M.; Martino, M., *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 366-367.
- [34] Bianco, A.; Guiso, M.; Martino, M.; Nicoletti, M.; Serafini, M.; Tomassini, L. ; Mossa, L. ; Poli, F. *Phytochemistry*, **1996**, *42* (1), 89-91.

- [35] Tundis, R.; Deguin, B.; Dodaro, D.; Statti, G.A.; Tillequi, F.; Menichini, F., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2008**, 36, 142-145.
- [36] Marco, J.L., *Phytochemistry*, **1985**, 24 (7), 1609-1610.
- [37] Hegnauer, R., *Chemotaxonomie der Pflanzen*, **1973**, 6, 352-361.
- [38] Jensen, S.R.; Schripsema, J., *Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae*, **2002**, L & Albert V. Eds. Cambridge University Press, 573-584.
- [39] Bruneton, J., *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales*, **1999**, 3.Ed. Tec & Doc, Paris.
- [40] Sakan, T.; Murai, F.; Isoe, S.; BeHyeon, S.; Hayashi, Y., *J. Chem. Soc. Jpn., Pure Chem. Sect.*, **1969**, 90, 507.
- [41] Nangia, A.; Prasuna, G.; Bheema Rao, P., *Tetrahedron*, **1997**, 53 (43), 14507-14545.
- [42] (a) Naruto, M.; Ohno, K.; Naruse, N.; Takeuchi, H., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 251.
(b) Shimano, K.; Ge, Y.; Sakaguchi, K.; Isoe, S., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2253.
- [43] Bianco, A., "The Chemistry of Iridoids" in "*Studies in Natural Products Chemistry*", **1990**, Atta-ur-Rahman Ed., vol.7 p.329, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [44] Cogne, A.-L., these de doctorat "Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae)", **2002**, Université de Lausanne.
- [45] Brown, R.T.; Chapple, C.L., *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 17, 787-790.
- [46] Damtoft, S.; Franzyk, H.; Jensen, S.R., *Phytochemistry*, **1997**, 45 (4), 743-750.
- [47] Nangia, A.; Prasuna, G., *Tetrahedron*, **1996**, 52, 3435.
- [48] (a) Pavan, M., *Ric. Sci.*, **1949**, 19, 1011.
(b) Pavan, M., *Chim. e Industr.*, **1955**, 37, 625-714.
- [49] (a) Fusco, R.; Trave, R.; Vercellone, A., *Chim. e Industr.*, **1955**, 37, 251-958.
(b) CaviU, G.W.K.; Ford, D.L.; Locksley, H.D., *Aust. J. Chem.*, **1956**, 9, 288.
- [50] Sakan, T.; Isoe, S.; Hyeon, S.B.; Katsumura, R.; Maeda, T.; Wolinsky, J.; Dickerson, D.; Slabaugh, M.; Nelson, D., *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 4097.

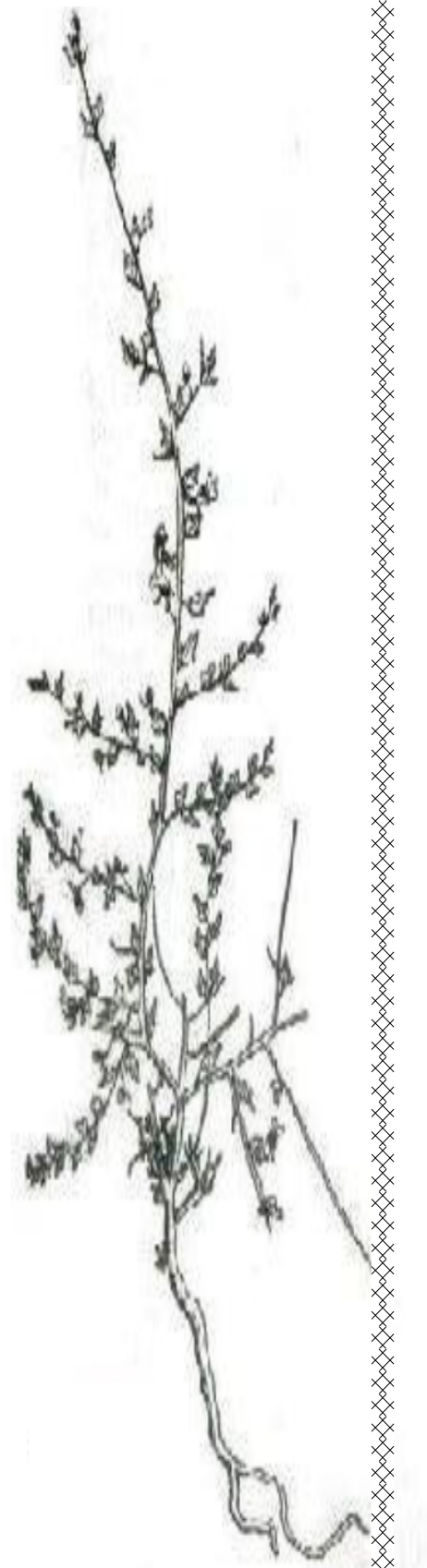
- [51] Pagnoni, U.M.; Pinetti, A.; Trave, R.; Garanti, L., *Aust. J. Chem.*, **1976**, 29, 1375.
- [52] Sakan, T.; Murai, F.; Hayashi, Y.; Honda, Y.; Shono, T.; Nakajima, M.; Kato, M., *Tetrahedron*, **1967**, 23, 4635.
- [53] Sakai, T.; Nakajima, K.; Sakan, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 53, 3683.
- [54] Bates, R.B.; Eisenbraun, E.J.; McElvain, S.M.J., *Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 3420.
- [55] Hennebelle, T., Thèse de doctorat "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiacées productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées)", **2006**, Université de Lille1.
- [56] Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S., *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2375.
- [57] Ueda, S.; Iwahashi, Y.J., *Nat. Prod.*, **1991**, 54, 1677.
- [58] Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S., *Yakugaku Zasshi*, **1982**, 102, 753.
- [59] Suzuki, Y.; Haj me, F.; Ikko, Y., *Folia pharmacol Japan*, **1968**, 64, 93.
- [60] Inoue, H.; Takeda, K.; Uobe, K.; Yamauchi, K.; Yabuuchi, N.; Kuwano, S., *Planta Med*, **1974**, 25, 285.
- [61] Takeda, S.; Yuasa, K.; Endo, T.; Aburada, M., *J. Pharmacobio-Dya*, **1980**, 3, 485.
- [62] Toda, S.; Miyase, T.; Arichi, H.; Tanizawa, H.; Takino, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 1270.
- [63] Cameron, D.W.; Feutnill, G.J.; Perlmutter, P.; Sasse, J.M., *Phytochemistry*, **1984**, 23, 533.
- [64] Bonini, C.; Iavarone, C.; Trogolo, C.; DiFabio, R.J., *Org. Chem.*, **1985**, 50, 958.
- [65] Weinges, K.; Iatridou, H.; Stammli, H.G.; Weiss, J., *Angew Chem Int Ed Engl*, **1989**, 28, 447.
- [66] Konoshima, T.; Takasaki, M.; Tokuda, J.; Nishino, H., *Cancer Lett.*, **2000**, 157, 87-92.
- [67] De Urbina, A.V.O.; Martin, M.L.; Fernandez, B.; Sanroman, L.; Cubillo, L., *Planta Medica*, **1994**, 60, 512-515.
- [68] (a) Hanson, J.R., in *Biosynthesis: Specialist Periodical Report*, **1972**, Vol. 1, Chemical Society, London, Chapitre 2.
(b) Manitto, P., *Biosynthesis of Natural Products*, **1981**, John Wiley, New York, Chapitre 5.
- [69] Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, **2002**, 2nd Ed, John Wiley and Sons.

- [70] Taskova, R.M.; Gotfredsen, C.H.; Jensen, S.R., *Phytochemistry*, **2006**, 67, 286-301.
- [71] Kapoor, S.K.; Reisch, J., *Phytochemistry*, **1974**, 33, 1018-1019.
- [72] Beninger, C.W.; Cloutier, R.R.; Monteiro, M.A.; Grodzinski, B., *J. Chem. Ecol.*, **2007**, 33, 731-747.
- [73] Kitagawa, I.; Tani, T.; Akita, K.; Yosioka, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, 21(9), 1978-1987.
- [74] Damtoft, S.; Hansen, S.B.; Jacobsen, B.; Jensen, S.R.; Nielsen, B.J., *Phytochemistry*, **1984**, 23(10), 2387-2389.
- [75] Grayer, R. J.; Bryan, S.E.; Veitch, N.C.; Goldstone, F.J.; Paton, A.; Wollenweber, E., *Phytochemistry*, **1996**, 43 (5), 1041-1047.
- [76] Yang, F.; Li, X.C.; Wang, H.Q.; Yang, C.R., *Phytochemistry*, **1996**, 42 (3), 867-869.

CHAPITRE 4

Partie

Expérimentale



IV.1 Matériels et appareillage

IV.1.1 Récolte de la plante *linaria aegyptiaca*

La plante *Linaria aegyptiaca* a été récoltée dans la région de Biskra aux mois Avril/Mai 2004. Elle a été identifiée par le Professeur Bachir Houdjehih du département d'agronomie faculté des sciences université de Batna. En premier temps, le matériel végétal a été séché à l'abri de la lumière, puis la drogue a été broyée pour présenter une grande surface de contact avec les solvants extracteurs.

IV.1.2 Chimie extractive

IV.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couche mince (CCM) ont été effectuées :

- en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck).
- en phase inverse, RP18 F_{254S} (Merck).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm après révélation à la vanilline sulfurique.

IV.1.2.2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les phases stationnaires utilisées au cours des différentes opérations de séparation et de purification sont :

- en phase normale : une silice Kieselgel Merck (230-400 Mesh).
- polyamide SC6 : utilisé dans la première étape de fractionnement de l'extrait méthanolique.
- en phase inverse : RP18 une silice greffée C₁₈.

La quantité de la silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité déposée pour la silice normale et 10 fois pour le polyamide.

IV.1.2.3 Chromatographie sur plaque préparative (CPP)

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse ont été effectuées sur des plaques de silice greffée RP18.

IV.1.3 Chimie structurale

IV.1.3.1 Spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonnance magnétique nucléaire RMN ^1H et RMN ^{13}C (RMN 1D et 2D) sont enregistrés sur un appareil Bruker à 500 MHz et 125 MHz respectivement, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS- Pierre Fabre 2597-Toulouse (France) et du Laboratoire de Pharmacognosie CNRS-UMR 6013 Reims (France).

IV.1.3.2 Spectroscopie de masse (SM)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en ESI (Electro Spray Ionisation), sur un spectromètre de masse de type Bruker LC-MS/MS type esquire-LC, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS- Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

IV.1.3.3 Spectrométrie UV

Le spectre UV du composé **5** est enregistré dans le $\text{MeOH} + \text{AlCl}_3$ sur un appareil de type Bekman Du-600, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS- Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

IV.1.3.4 Spectrométrie infrarouge (IR)

Les spectres IR sont enregistrés sur pastilles de KBr au moyen d'un appareil de type JASCO FT/IR-4100, du Département de Chimie de l'Université de Batna.

IV.1.3.5 Radio-cristallographie

Les rayons X du composé **5** sont réalisés au moyen d'un diffractomètre de type KappaCCD.

IV.1.3.6 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique

Perkin-Elmer 241 du Département de Pharmacie de l'Université de Batna. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm). La cuve employée est d'une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

IV.2 Etude de l'espèce *Linaria aegyptiaca*

1000 g des parties aériennes de la plante sous forme de poudre sont mis à macérer dans le cyclohexane (10 litres) pendant 2 jours à la température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, 2,24 g de l'extrait cyclohexanique ont été obtenus. Le résidu de la filtration subit une extraction solide-liquide par l'acétate d'éthyle (10 litres) durant 2 jours à la température ambiante. La filtration et l'évaporation à sec de la solution conduisent à l'extrait acétate d'éthyle (5,4 g). Enfin, la macération des marcs récupérés dans le méthanol pendant deux jours, suivie de la filtration et l'évaporation à sec du solvant, ont permis d'obtenir 38,8 g de l'extrait méthanolique.

IV.2.1 Fractionnement et purification

Après la comparaison des CCM des différents extraits, on a constaté que l'extrait méthanolique contient plusieurs taches intéressantes par rapport aux extraits hexanique et acétate d'éthyle. L'analyse des CCM est effectuée sur ces extraits dans un mélange de solvants chloroforme/méthanol: 20%, 30%, 40% et révélation par la vanilline sulfurique et chauffage. Le profil CCM des différents extraits est illustré dans la figure suivante (Figure IV.1).

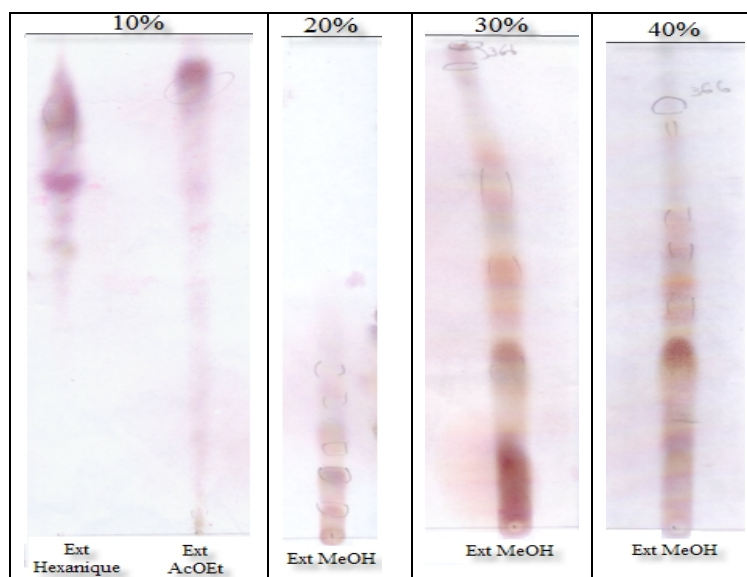


Figure IV.1 : L'analyse CCM des extraits bruts de la plante.

10 g de l'extrait méthanolique des parties aériennes de cette plante ont été soumis à une chromatographie sur une colonne de polyamide. L'élution est réalisée initialement par l'eau dont on diminue la polarité par l'addition du méthanol (100-0 à 10-90). A l'issue de ce fractionnement 75 fractions de 50 ml ont été recueillies. L'examen CCM à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et révélation à la vanilline sulfurique et chauffage permettent de regrouper les fractions ayant la même constitution, fournissant ainsi 13 fractions (Tableau IV.1).

Fractions	Sous fractions	Eluant (colonne) Eau/Méthanol	Poids (mg)	Observations
F1	1-2	100% eau	534	tache + traînée
F2	3-4	"	184	trois taches+traînée
F3	5-6	"	242	trois taches+traînée
F4	7-12	80/20	185	trois taches+traînée
F5	13-20	"	414	Traînée
F6	21-25	50/50	128	mélange complexe +traînée
F7	26-28	"	347	trois taches+traînée
F8	29-38	"	408	deux taches+traînée
F9	39-50	20/80	245	plusieurs taches+traînée
F10	51-58	"	66	mélange complexe
F11	59-64	10/90	98	Traînée
F12	65-66	100% méthanol	15	Traînée
F13	67-75	"	4	Néant

Tableau IV.1 : Fractionnement et rassemblement des fractions de l'extrait méthanolique.

a - Etude des fractions F2, F3 et F4

Les fractions 2 ,3 et 4 ont été rassemblées (2,26 g) et soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution est réalisée par un mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau : (95:5:0,5) à (80:20:1,5). Ce fractionnement a permis d'obtenir 364 fractions. Les fractions recueillies ont été regroupées selon leur profil en CCM en phase normale pour donner 39 fractions (F'1 à F'39) (Tableau IV.2).

Fractions	Sous fractions	Eluant (colonne) Chloroforme/Méthanol/Eau	Poids (mg)	Observations
F'1	1-4	95:5:0,5	8	Néant
F'2	5-11	"	20	traînée
F'3	12-14	"	2	"
F'4	15-20	"	3	"
F'5	21-33	"	2	"
F'6	34-40	"	6	"
F'7	41-46	"	3	"
F'8	47-54	"	5	"
F'9	55-66		12	tache+traînée
F'10	67-68		2	traînée
F'11	69-78	93:7:0,5	11	"
F'12	79-87	"	6	"
F'13	88-101	"	10	"
F'14	102-110	90:10:1	16	"
F'15	111-118	"	26	tache + traînée
F'16	119-132	"	32	"
F'17	133-144	"	76	"
F'18	145-156	"	65	"
F'19	157-170	"	68	"
F'20	171-182	"	43	"
F'21	183-191	"	56	"
F'22	192-202	"	14	"
F'23	203-216	85:15:1,5	31	traînée
F'24	217-230	"	41	"
F'25	231-246	"	39	"
F'26	247-256	"	98	"
F'27	257-270	"	80	"
F'28	271-280	"	52	"
F'29	281-285	"	24	"
F'30	286-295	"	128	"
F'31	296-302	"	67	"
F'32	303-306	80:20:1,5	76	tache + traînée

F'33	307-314	"	96	"
F'34	315-324	"	60	traînée
F'35	325-338	"	66	"
F'36	339-340	"	3	"
F'37	341-343	50:50	55	"
F'38	344-352	"	125	"
F'39	353-357	"	42	"

Tableau IV.2 : Rassemblement des fractions de F2, F3 et F4 de l'extrait méthanolique

1-a Etude des fractions F'32 et F'33

Les fractions F'32 et F'33 réunies (179 mg), et montrant une tache marron avec une traînée après révélation à la vanilline sulfurique, ont été fractionnées à nouveau sur colonne de gel de silice en phase et pression normales, avec l'éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ à différents gradients. Ce fractionnement a conduit à 11 fractions (F''1 à F''11).

Parmi les 11 fractions précédentes, la fraction F''6 est obtenue sous forme de cristaux blancs, après une recristallisation dans le méthanol. En chromatographie sur couche mince, elle montre une seule tache correspondant au composé **1** (30 mg).

2-a Etude des fractions de F'17 à F'22

Les fractions F'17 à F'22 regroupées (324 mg), et contenant un produit majoritaire de tache marron après révélation à la vanilline sulfurique, sont soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale et éluées avec un mélange de solvants en commençant par le chloroforme, après chloroforme/méthanol/eau : (95:5:0,5), (93:7:0,5). Les fractions sont recueillies et regroupées selon leur profil en CCM en phase normale, pour fournir 9 fractions (F''1 à F''9).

La fraction F''6 est purifiée dans un premier temps sur colonne de silice greffée C_{18} , au moyen d'un mélange eau/méthanol : (90:10, 80:20, et 70:30), pour obtenir 4 sous-fractions (SF1 à SF4).

La première fraction SF1 subit une purification sur plaque préparative RP-18 (éluant : $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: 70/30), conduisant au composé **2** à l'état pur (11 mg).

3-a Etude de la fraction F'38

Cette fraction de 125 mg, purifiée sur plaque préparative de silice greffée C₁₈ en utilisant comme éluant : eau/méthanol : (60 :40), a permis l'isolement du composé **4** à l'état pur (4 mg).

b- Etude de la fraction F1

La fraction F1 (534 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice. L'élution est effectuée par un mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau : (90:10:0,5) à (60:40:2) puis le méthanol pur. Elle a donnée 31 fractions (Tableau IV.3).

Fractions	Sous fractions	Eluant (colonne) Chloroforme/Méthanol/Eau	Poids (mg)	Observations
F'1	1-17	90:10:1	1	traînée
F'2	18-23	"	2	"
F'3	24-30	"	6	"
F'4	31-33	"	2	"
F'5	34-42	"	0,5	"
F'6	43-51	"	3	tache+ traînée
F'7	52-65	"	2	"
F'8	66-71	"	11	"
F'9	71-78	80:20:1	2	"
F'10	79-84	"	19	traînée+tache
F'11	85-88	"	3	traînée
F'12	89-94	"	11	tache+ traînée
F'13	95-98	80:20:2	7	traînée
F'14	99-101	"	4	Néant
F'15	102-106	"	3	"
F'16	107-109	"	1	"
F'17	110-118	"	5	Traînée
F'18	120-134	"	10	mélange complexe
F'19	135-148	"	32	"
F'20	149-156	"	18	"

F'21	157-164	"	15	"
F'22	165-166	70:30:2	19	traînée
F'23	167-168	"	3	Néant
F'24	169-178	"	9	trois taches+ traînée
F'25	179-196	"	7	traînée
F'26	197-198	60:40:2	17	"
F'27	199-210	"	28	mélange complexe
F'28	211-223	"	6	"
F'29	224-228	100% Méthanol	9	traînée
F'30	229-236	"	6	néant
F'31	237-250	"	12	néant

Tableau IV.3 : Rassemblement de la fraction F1 de l'extrait méthanolique.

La fraction F'10 (19 mg) jugée intéressante est de nouveau mise à chromatographier sur colonne de gel de silice en phase et pression normales. En commençant l'élution par le chloroforme pur, puis un mélange de solvants : chloroforme/méthanol (5%, 10%), 12 fractions ont été récupérées (F''1 à F''12).

La fraction F''9 montre deux taches, se colorant en marron et gris par la vanilline sulfurique. La tache marron correspond au composé **2** déjà isolé. La purification de cette fraction par chromatographie préparative sur plaque de silice RP18 au moyen d'un mélange eau/méthanol : 70/30, a permis d'avoir le composé **3** (5 mg) à l'état pur.

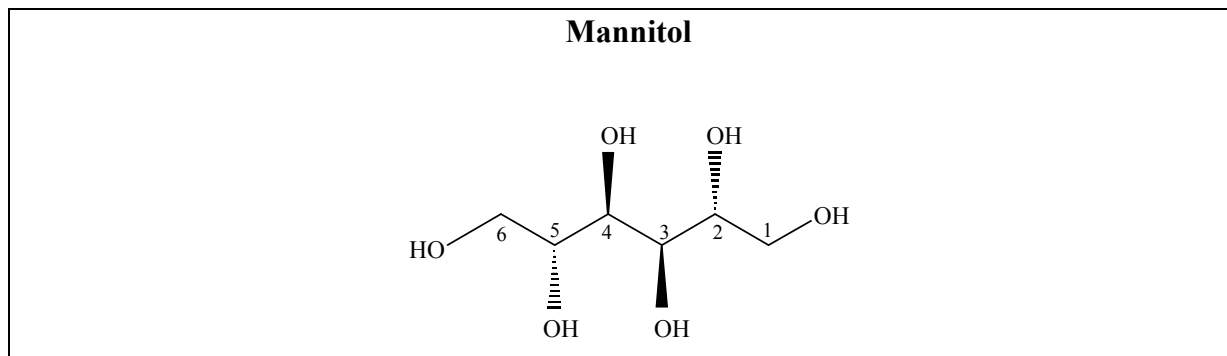
c - Etude de la fraction F8

La fraction F8 montrant deux taches avec une traînée après révélation à la vanilline sulfurique, a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale en utilisant comme éluant le chloroforme dans un premier temps, puis le mélange chloroforme/méthanol/eau : (95:5:0,5) à (90:10:1). Ce fractionnement a abouti à 13 fractions (F'1 à F'13).

La fraction F'7 montre une tache jaune après révélation à la vanilline sulfurique et jugée intéressante. Après une recristallisation dans le méthanol (20 mg) du composé **5** ont été obtenus.

IV.3 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

IV.3.1 Composé 1



Formule brute : $C_6H_{14}O_6$

Poids moléculaire : 182 g.mol^{-1}

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D + 33,3^\circ$ (c 0,06, MeOH)

Quantité du produit : 30 mg

Aspect : cristaux blancs

ESI-MS : mode positif 205 $[M+Na]^+$

mode négatif 217 $[M+Cl]^-$

RMN 1H : (500 MHz, DMSO- d_6 -TMS)

3,60 (*ddd*, $J = 3,4 ; 5,6 ; 10,5 \text{ Hz}$, 2H) = H-1a, H-6a

3,44 (*m*, 1H) = H-2

3,54 (*t*, $J = 7,7 \text{ Hz}$, 1H) = H-3

3,54 (*t*, $J = 7,7 \text{ Hz}$, 1H) = H-4

3,44 (*m*, 1H) = H-5

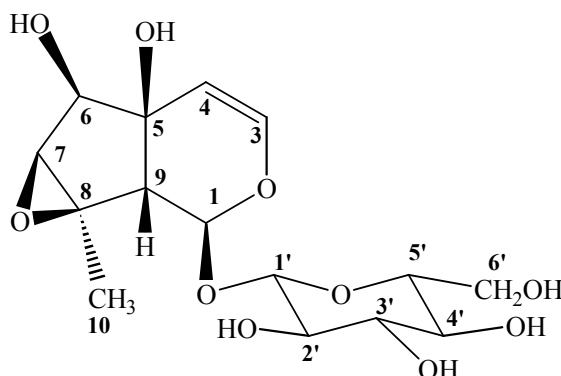
3,37 (*m*, 2H) = H-1b, H-6b

RMN ^{13}C : (125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

63,9 (CH_2 -1), 71,3 (CH -2), 69,7 (CH -3), 69,7 (CH -4), 71,3 (CH -5), 63,9 (CH_2 -6).

IV.3.2 Composé 2

Antirrhinoside



Formule brute : $C_{15}H_{22}O_{10}$

Poids moléculaire : 362 g.mol^{-1}

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D - 70,9^\circ$ (c 0,05, Dioxane)

Quantité du produit : 11 mg

Aspect : une huile incolore

IR : KBr $\nu_{\max}$ 3300 (OH), 1655 (C=C) cm^{-1}

ESI-MS : mode positif 385 $[M+Na]^+$

mode négatif 397 $[M+Cl]^-$

RMN ^1H : (500 MHz, CD_3OD , TMS)

5,42 (d, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H) = H-1

6,38 (d, $J = 6,3 \text{ Hz}$, 1H) = H-3

4,86 (d, $J = 6,3 \text{ Hz}$, 1H) = H-4

3,88 (nd) = H-6

3,42 (m, 1H) = H-7

2,43 (d, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H) = H-9

1,48 (s, 3H) = H-10

4,65 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H) = H-1'

3,26 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H) = H-2'

3,42 (m, 1H) = H-3'

3,32 (nd, 1H) = H-4'

3,31 (m, 1H) = H-5'

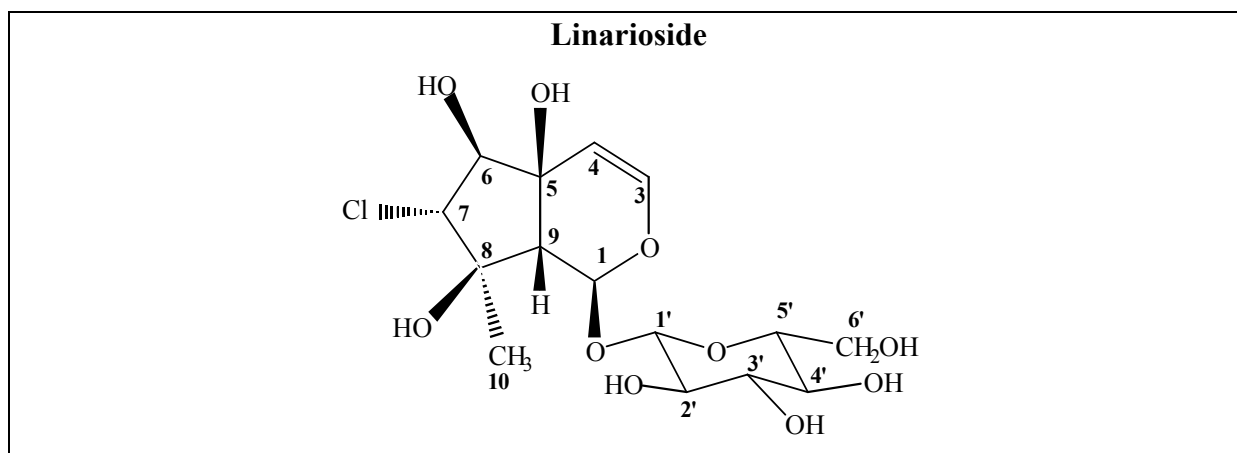
3,90 (dd, $J = 1,8$ et $11,9 \text{ Hz}$, 1H) = H-6'a

3,70 (dd, $J = 5,1$ et $11,9 \text{ Hz}$, 1H) = H-6'b

RMN ^{13}C : (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, TMS)

93,6 (CH-1), 142,8 (CH-3), 106,6 (CH-4), 74,2 (C-5), 76,7 (CH-6), 65,6 (CH-7), 64,3 (C-8), 51,9 (CH-9), 17,1 (CH_3 -10), 98,8 (CH-1'), 73,5 (CH-2'), 76,7 (CH-3'), 70,7 (CH-4'), 77,1 (CH-5'), 62,2 (CH_2 -6').

IV.3.3 Composé 3



Formule brute : $C_{15}H_{23}O_{10}Cl$

Poids moléculaire : $398,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D - 148^\circ$ (c 0,02, Dioxane)

Quantité du produit : 5 mg

Aspect : une huile incolore

IR : KBr $\nu_{\max}$ 3400 (OH), 755 (C-Cl) cm^{-1}

ESI-MS : mode positif 423 $[M+2+Na]^+$, 421 $[M+Na]^+$

RMN 1H : (500 MHz, $CD_3OD/CDCl_3$, TMS)

5,68 (*sl*, 1H) = H-1

6,25 (*d*, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 1H) = H-3

5,50 (*d*, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 1H) = H-4

3,58 (*d*, $J = 9,8 \text{ Hz}$, 1H) = H-6

3,98 (*d*, $J = 9,8 \text{ Hz}$, 1H) = H-7

2,48 (*sl*, 1H) = H-9

1,19 (*s*, 3H) = H-10

4,60 (*d*, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H) = H-1'

3,27 (*t*, $J = 8 \text{ et } 9 \text{ Hz}$, 1H) = H-2'

3,44 (*t*, $J = 9 \text{ Hz}$, 1H) = H-3'

3,55 (*nd*, 1H) = H-4'

3,55 (*m*, 1H) = H-5'

3,89 (*dd*, $J = 1,8 \text{ et } 12,1 \text{ Hz}$, 1H) = H-6'a

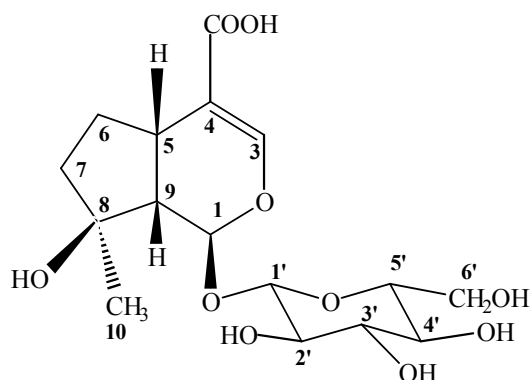
3,69 (*dd*, $J = 5,1 \text{ et } 12,1 \text{ Hz}$, 1H) = H-6'b

RMN ^{13}C : (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, TMS)

90,2 (CH-1), 140 (CH-3), 108,1 (CH-4), 64 (C-5), 79,5 (CH-6), 71,8 (CH-7), 73,6 (C-8), 56,9 (CH-9), 17,8 (CH_3 -10), 97,4 (CH-1'), 72,8 (CH-2'), 75,8 (CH-3'), 70,1 (CH-4'), 76,3 (CH-5'), 61,5 (CH_2 -6').

IV.3.4 Composé 4

Acide mussaenosidique



Formule brute : $C_{16}H_{24}O_{10}$.

Poids moléculaire : 376 g.mol⁻¹

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D -110^\circ$ (c 0,02, MeOH)

Quantité du produit : 4 mg

Aspect : une huile incolore

IR : KBr $\nu_{\max}$ 3400 (OH), 1751 (COOH) cm⁻¹

ESI-MS : mode négatif 411 $[M+Cl]^-$, 375 $[M-H]^-$

RMN ¹H : (500 MHz, CD₃OD/CDCl₃, TMS)

5,48 (*d*, $J = 3,8$ Hz, 1H) = H-1

7,38 (*sl*, 1H) = H-3

3,17 (*m*, 1H) = H-5

2,33 (*m*, 1H) = H-6a

1,50 (*m*, 1H) = H-6b

1,73 (*m*, 2H) = H-7

2,27 (*dd*, $J = 3,8$ et 9,3 Hz, 1H) = H-9

1,32 (*s*, 3H) = H-10

4,70 (*d*, $J = 8$ Hz, 1H) = H-1'

3,23 (*dd*, $J = 8$ et 9 Hz, 1H) = H-2'

3,41 (*t*, $J = 9$ Hz, 1H) = H-3'

3,32 (*t*, $J = 9$ Hz, 1H) = H-4'

3,34 (*m*, 1H) = H-5'

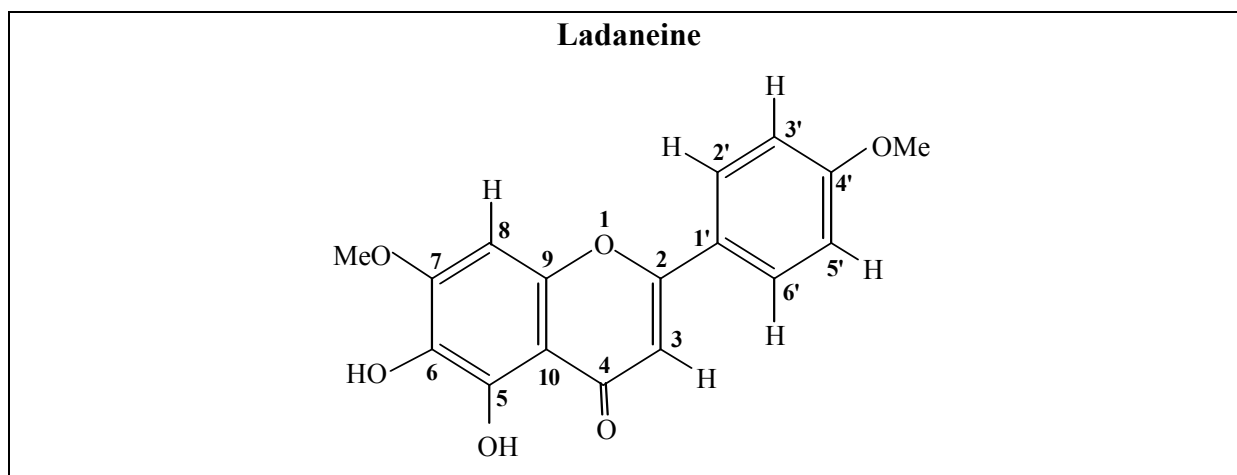
3,92 (*dd*, $J = 2,2$ et 11,9 Hz, 1H) = H-6'a

3,69 (*dd*, $J = 6$ et 11,9 Hz, 1H) = H-6'b

RMN ^{13}C : (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, TMS)

94,9 (CH-1), 31,8 (CH-5), 30,5 (CH_2 -6), 40,7 (CH_2 -7), 80,2 (C-8), 52,1 (CH-9), 24,5 (CH_3 -10), 99,5 (CH-1'), 74,4 (CH-2'), 77,6 (CH-3'), 71,4 (CH-4'), 77,9 (CH-5'), 62,7 (CH_2 -6').

IV.3.5 Composé 5



Formule brute : $C_{17}H_{14}O_6$

Poids moléculaire : 314 g.mol^{-1}

Quantité du produit : 20 mg

Aspect : cristaux jaunes

MS : 337 $[M+Na]^+$, 315 $[M+H]^+$

UV : λ_{max} (MeOH+AlCl₃) 362 et 332 ; 304 et 285

RMN ¹H : (500 MHz, CD₃OD/CDCl₃, TMS)

6,58 (s, 1H) = H-3

6,68 (s, 1H) = H-8

7,88 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, 2H) = H-2', H-6'

7,03 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, 2H) = H-3', H-5'

3,88 (s, 3H) = OCH₃

3,98 (s, 3H) = OCH₃

RMN ¹³C : (125 MHz, CD₃OD/CDCl₃, TMS)

165,3 (C-2), 103,8 (CH-3), 183,6 (C-4), 151,3 (C-5), 130,8 (C-6), 154,9 (C-7), 91,3 (CH-8), 146,4 (C-9), 106,2 (C-10), 124,1 (C-1'), 128,7 (CH-2'), 115,1 (CH-3'), 163,5 (C-4'), 115,1 (CH-5'), 128,7 (CH-6'), 55,8 (OCH₃), 56,7 (OCH₃).

Rayons X:

Le système cristallin	Triclinique
Température (K)	173 (2)
a, b, c (Å)	6,9070 (6), 7,7250 (10), 15,8320 (17)
α, β, γ (°)	83,236 (10), 84,447 (10), 85,128 (4)

$V (\text{\AA}^3)$	832,61 (16)
Z	2
$D_x (\text{Mg.m}^{-3})$	1,395
Type de radiation	Mo K

RESUME



Résumé

Le présent travail est consacré à l'investigation phytochimique de l'espèce *Linaria aegyptiaca*, plante saharienne appartenant à la famille Scrophulariaceae. Il a porté sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de cette dernière.

Ainsi cinq métabolites secondaires se répartissant en un sucre, trois iridoïdes glycosilés et un flavonoïde, ont été isolés et purifiés par les méthodes chromatographiques dont la chromatographie en phase inverse. Leurs structures moléculaires ont été élucidées au moyen des différentes méthodes spectroscopiques que sont : RMN ^1H et RMN ^{13}C , RMN 2D COSY, HSQC, HMBC, NOESY, spectrométrie de masse (ESI), spectroscopie IR, UV et par radio-cristallographie (RX).

D'un point de vue chimiotaxonomique, la composition chimique de cette espèce s'est avérée conforme à celle des plantes Scrophulariaceae où prédominent les iridoïdes glycosilés qui sont utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

Mots clés : Phytochimie, Scrophulariaceae, *Linaria aegyptiaca*, Iridoïdes, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse.

Abstract

This work is about the phytochemical investigation of the methanolic extract of the aerial parts of the species *Linaria aegyptiaca*, a saharan plant belonging to the Scrophulariaceae family.

Five secondary metabolites divided into: one sugar, three iridoïds glycosides and one flavonoid were isolated and purified by chromatographic methods including reversed phase chromatography. Their molecular structures were elucidated by means of the various spectroscopic methods: ^1H NMR and ^{13}C NMR, NMR 2D COSY, HSQC, HMBC, NOESY, mass spectrometry (ESI), IR spectroscopy, UV and X-ray crystallography.

From a chemotaxonomic point of view, the chemical composition of this species proved to be in conformity with the ones of Scrophulariaceae plants, in which iridoïds glycosides predominate and are used as chemotaxonomic markers.

Key-words: Phytochemistry, Scrophulariaceae, *Linaria aegyptiaca*, Iridoïds, Flavonoid, NMR 1D and 2D, mass spectroscopy.

11

11

II

11

11

102

Année Universitaire : 2009-2010