UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

**UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE**
UFR DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

**Unité des Molécules d'Intérêt Biologique**
Laboratoire de PHARMACOGNOSIE

**ECOLE DOCTORALE E2S**
Santé-Environnement-STIC

N° d'ordre :

# *ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES SAPONOSIDES DE TROIS PLANTES DE LA FAMILLE DES ARALIACEAE ET DRACAENACEAE ET EVALUATION DE LEURS ACTIVITES CYTOTOXIQUES SUR CELLULES TUMORALES*

*Thèse en cotutelle pour l'obtention du grade de:*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE **/** DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

Présenté et soutenue publiquement par:

Guy Beddos KOUGAN NKWOKAP

**Discipline: Pharmacie**

**Spécialité: Pharmacognosie/Chimie des substances naturelles**

Le 20 septembre 2010

**JURY**

| | | |
|---|---|---|
| Pr. E. Seguin | Université de Rouen | Rapporteur |
| Dr.C. Girard | Université de Franche- Comté | Rapporteur |
| Pr. A.-C.Mitaine-Offer | Université de Bourgogne | Président |
| Pr. B.T. Ngadjui | Université de Yaoundé I | Membre |
| Dr. R. Yougnia | Université de Paris 7 | Membre |
| Dr. T. Tabopda | Université de Yaoundé I | Membre |
| Pr. B.L. Sondengam | Université de Yaoundé I | Co-directeur de Thèse |
| Pr. M.-A. Lacaille-Dubois | Université de Bourgogne | Directrice de Thèse |

***Année 2009 - 2010***

*En Hommage à mon Père, que ton âme repose en paix !*

*En Hommage à Maître Tepndue Emile*

*A ma mère et son courage*

*A mes frères, mes sœurs et ma nièce*

*A tous les membres de ma famille*

# Remerciements

*Cette thèse a été réalisée sous la direction de Madame le Professeur Marie-Aleth Lacaille-Dubois (Directrice de l'Unité de molécules d'Intérêt Biologique, UMIB, EA 3660 à l'Université de Bourgogne) et la codirection de monsieur le Professeur Beibam Lucas Sondemgam Professeur au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de L'Université de Yaoundé I, Cameroun.*

*À Madame Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS, Professeur de Pharmacognosie, ma directrice de thèse qui m'a acceuilli dans son Laboratoire, m'a confié ce travail et l'a dirigé avec compétence, rigueur, efficacité, une grande disponibilité et une patience extrême, je tiens à vous exprimer ma vive reconnaissance.*

*A Monsieur le Professeur Beibam Lucas SONDENGAM, Professeur de Chimie organique, Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé mon Co-directeur de thèse qui m'a accueilli dans son laboratoire, a initié ce travail et pour la confiance qu'il m'a témoigné au cours de sa réalisation, j'exprime mes vifs remerciements.*

*A Madame le Professeur Elisabeth SEGUIN, Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 6014-COBRA, IRCOF, UFR de Médecine-Pharmacie, Université de Rouen, qui a malgré ses occupations, accepté de juger ce travail en tant que rapporteur et membre du Jury, j'adresse mes sincères remerciements.*

*A Madame le docteur Corinne GIRARD, MCF-HDR, Laboratoire de Pharmacognosie, EA 4267 de l'Université de Franche-Comté à Besançon, pour avoir accepté d'être rapporteur et membre de jury de cette thèse, je vous exprime ma sincère gratitude.*

*A Madame le Professeur Anne-Claire MITAINE-OFFER, Professeur de Pharmacognosie, UMIB, EA 3660, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, qui n'a cessé de m'encourager et aimablement accepté d'examiner ce travail, je vous exprime ma profonde gratitude.*

*A Monsieur le Professeur Bonaventure TCHALEU NGADJUI, Professeur de Chimie organique, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé, qui a aimablement accepté de faire partir du Jury, je vous exprime ma profonde gratitude.*

*A Monsieur le Docteur Turibio TABOPDA, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, et Docteur Rodrigue YOUGNIA de l'Université de Paris 7, pour avoir accepté de faire partir du Jury de cette thèse et pour l'interêt qu'ils ont porté à mon travail.*

*J'adresse également de vifs remerciements à tous les collaborateurs de l'Unité qui ont contribué à la réalisation de cette thèse, notamment Dr. Tomofumi Miyamoto et Dr. Thomas Paululat pour l'acquisition des spectres des composés, Dr. Jean- François Mirjolet et Dr. Olivier Duchamp pour les tests de cytotoxicité.*

*Ma profonde reconnaissance va au Professeur Tan KINMY de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Bourgogne, et au Professeur Alain PUGIN, Directeur de L'école doctorale E2S de l'Université de Bourgogne pour les conseils et leurs soutiens matériels pendant la rédaction ma thèse.*

*Je remercie également tous mes collègues de l'UMIB: Gaoussou et Aymen pour les bons moments passés ensemble. Des mentions spéciales pour qui a su me motiver quand il le fallait, Sandrine et David, Benoît, Nathalie et Anna pour leur bonne humeur et leur disponibilité.*

*Je tiens à relever ici l'excellente collaboration dont j'ai bénéficié avec le Dr. Nicolas DESBOIS. Qu'il trouve ici toute l'expression de ma Gratitude.*

*J'exprime ma gratitude au Professeur Augustin Ephraïm NKENGFACK, Chef de Département de Chimie Organique de L'Université de Yaoundé I qui m'a toujours soutenu pendant les moments difficiles de ma vie académique.*

*Un grand merci à Madame le Dr. Victorine TAMZE et Monsieur David SIMO, de L'Institut Médicale et de Recherche sur les Plantes Médicinales (IMPM) de Yaoundé pour m'avoir fourni facilités les pour l'extraction des plantes étudiées dans cette thèse.*

*Je ne saurais oublier mes amis Iréné Domkam, Alain Nenkam, Nicolas Fokam, Vanessa Tsanang, Julie Mekoue, Dr. Olivier Noté et Dr. Aimé Landry Dongmo pour les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble et leurs précieux soutiens. Sans eux, mes années de thèse auraient eu une toute autre saveur.*

*A Aimée Simbe, ton amitié m'honore!*

*A Zachée Jouonang et Collince Dogmeni, dont le soutien quasi filial est permanent. Je manque de mots à votre endroit.*

*Finalement, je ne saurai oublier toute ma famille et particulièrement Maman Marthe, maman Justine, pour tout le sacrifice consenti pour mon éducation, mes frères Eric Duplex, Alex Merlin, Vincent et mes sœurs Evelyne, Sandrine, Tatiana et Vanessa, ma petite nièce Wendy qui m'ont toujours soutenu dans cette longue et pénible épreuve que représente la thèse.*

# Acronymes et abréviations

| | |
|---|---|
| $[\alpha]_D$ | Pouvoir rotatoire à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm) |
| $\delta$ | Déplacement chimique (*RMN*) |
| 1D | Monodimensionnel |
| 2D | Bidimensionnel |
| $^{13}C$ | Carbone 13 |
| $^{1}H$ | Proton |
| AcOEt | Acétate d'éthyle |
| APG | Angiosperm Phylogeny Group |
| **(1), (2), (3),…** | Désignation des composés naturels isolés dans le présent travail |
| ATCC | *American Type Culture Collection* (catalogue de microorganismes) |
| Ara | Arabinose |
| CC | Chromatographie sur Colonne ouverte (*Column Chromatography*) |
| CCM | Chromatographie sur Colonne Mince |
| COSY | *COrrelation SpectroscopY* (*RMN*) |
| *d* | Doublet (*RMN*) |
| *dd* | Double Doublet (*RMN*) |
| DEPT | *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer* (*RMN*) |
| DMSO-$d_6$ | DiMéthylSulfOxyde hexaDeutérié (*RMN*) |
| EI | Ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization, MS*) |
| ESI | Ionisation par électrospray (*ElectroSpray Ionization, MS*) |
| EtOH | Ethanol |
| Fuc | Fucose |
| Glc | Glucose |
| GlcA | Acide glucuronique |
| $H_2O$ | Eau |
| HMBC | *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (*RMN*) |
| HSQC | *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (*RMN*) |
| HR | Haute Résolution (*High Resolution, MS*) |
| Hz | Hertz |
| $IC_{50}$ | Concentration inhibitrice de 50 % (*Inhibitory Concentration of 50 %*) |
| *J* | Constante de couplage (*RMN*) |

| | |
|---|---|
| LC | Chromatographie liquide (*Liquid Chromatography*, terme générique) |
| *m* | Multiplet (*RMN*) |
| MeOH | Méthanol |
| MPLC | Chromatographie liquide à moyenne pression (*Medium Pressure Liquid Chromatography*) |
| MS | Spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*) |
| MTT | Bromure de 3-(4,5-diMéthyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphényl-2*H*-Tétrazolium |
| *m/z* | Rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions (*MS*) |
| n.d | Non déterminé |
| RMN | Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (*Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*) |
| NOE | Effet nucléaire Overhauser |
| NOESY | Spectroscopie NOE et d'échange (*Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY)* |
| ppm | Unité de δ (Parties Par Million, *Parts per Million* = $10^{-6}$, *RMN*) |
| Rha | Rhamnose |
| RP | Phase inverse (*Reversed Phase*, phases stationnaires en chromatographie) |
| *s* | Singulet (*RMN*) |
| s l | Singulet large |
| sp. | Espèce botanique non précisée |
| Si | Silice |
| *t* | Triplet (*RMN*) |
| TFA | Acide trifluoroacétique (*TriFluoroacetic Acid*) |
| TMS | TétraMéthylSilane (*RMN*, référence pour l'échelle des δ) |
| TOCSY | Spectroscopie de corrélation totale |
| VLC | Chromatographie liquide sous vide |
| Xyl | Xylose |

# RESUMÉ

L'intérêt des substances d'origine naturelle, potentiellement anti-tumorales nous a amené à nous intéresser aux saponines triterpéniques et stéroïdiques de plantes issues de la biodiversité africaine de la famille des *Araliaceae* et des *Dracaenaceae*. En effet, des études antérieures menées sur quelques plantes de ces deux familles ont conduit à l'obtention de molécules complexes et originales possédant d'excellentes propriétés cytotoxiques, immuno-modulatrices, anti-inflammatoires. Au vu de ces résultats nous avons entrepris des investigations pharmaco-chimiques sur *Cussonia arborea* (*Araliaceae*), *Dracaena deisteliana* et *Dracaena arborea* (*Dracaenaceae*), plantes médicinales couramment utilisées en pharmacopée traditionnelle africaine pour traiter différentes maladies. Les travaux menés ont conduit à l'isolement de 31 composés purs en utilisant les différentes techniques analytiques du laboratoire notamment les diverses techniques de chromatographie liquide successive à pression atmosphérique, moyenne pression et flash chromatographie sur silice en phase normale et en phase inverse. Les structures ont été déterminées par les méthodes de spectrométrie de masse en source FAB et de spectroscopie de RMN 1D et 2D (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC et HSQC). Parmi les 07 composés purs obtenus des écorces de *Cussonia arborea*, 5 sont des nouvelles saponines triterpéniques dont un dérivé de l'acide ursolique, un dérivé de l'hédéragénine et trois dérivés de l'acide oléanolique, tous disubstitués en position 3 et 28 par des chaînes oligosaccharidiques. 13 composés purs sont obtenus à partir des feuilles de *Cussonia arborea*, dont 7 nouvelles saponines triterpéniques dérivés de l'acide ursolique, de l'acide 23-hydroxyursolique, de l'hédéragénine et de l'acide oléanolique dont 04 d'entre elles sont obtenues sous forme de mélanges inséparables d'isomères acide oléanolique/acide ursolique et hédéragénine/acide 23-hydroxyursolique. A partir des écorces de *Dracaena arborea* et des tiges de *Dracaena deisteliana*, nous avons isolé et caractérisé 10 saponines stéroïdiques dont 4 nouvelles et une sapogénine. Les activités de certains de ces produits purs ont été évaluées sur deux lignées de cellules cancéreuses coliques humaines HCT 116 et HT-29.

**Mots clés**: *Araliaceae*, *Dracaenaceae*, *Cussonia arborea*, *Dracaena arborea*, *Dracaena deisteliana*, Saponines triterpéniques, Saponines stéroïdiques, Cytotoxicité.

## ABSTRACT

The interest of the substances from natural origin, potentially antitumor led us to interest in triterpenoid and steroidal saponins of plants from the African biodiversity belonging to the *Araliaceae* and *Dracaenaceae* families of plants. Indeed, of the former studies undertaken on some plants of these two families led to obtaining complex and original molecules having excellent cytotoxic, immuno-modulating, anti-inflammatory properties. Within sight of these results we undertook pharmaco-chemical investigations on *Cussonia arborea* (*Araliaceae*), *Dracaena deisteliana,* and *Dracaena arborea* (*Dracaenaceae*), medicinal plants usually used in african traditional pharmacopeia to treat various diseases. The work led to the isolation of 31 pure compounds by using the various analytical techniques in particular the various chromatography techniques (CC, MPLC, TLC, flash) on silica gel, normal and reversed phases. The structures were determined by the methods of mass spectrometry (FAB, ESI, IE) and 1D ($^{1}H$ and $^{13}C$) and 2D (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC and HSQC) NMR spectroscopy. Among the 07 pure compounds obtained of the barks of *Cussonia arborea,* 5 are new triterpenoid saponins derivatives of ursolic acid, hederagenin and three derived from the acid oleanolic, all disubstituted in position 3 and 28 by oligosaccharidic chains. 13 pure compounds were obtained from leaves of *Cussonia arborea*, seven of which are new triterpenoid saponins derivatives of oleanolic acid, ursolic acid, hederagenin and 23-hydroxyursolic acid of which four were obtained as mixtures of isomers oleanolic acid/ursolic acid and hederagenin/23-hydroxyursolic acid. From the bark of *Dracaena arborea* and stem of *Dracaena deisteliana*, we isolated and characterized ten steroidal saponins including 4 new and sapogenin. The activities of some of these pure products were evaluated on two cancerous lines human colic cells HCT 116 and HT-29.



**Key words:** *Araliaceae*, *Dracaenaceae*, *Cussonia arborea*, *Dracaena arborea, Dracaena deisteliana*, triterpenoid saponins, steroidal saponins, Cytotoxicity.

# TABLE DES MATIERES


Dédicace…… i

Remerciements…… ii

Acronymes et abbréviations…….. iii

Résumé…… vi

Abstract…… viii

***INTRODUCTION GENERALE***…… 1

***CHAPITRE I: ETUDES ANTERIEURES*** …… 4

**I.1 ASPECT BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE** …… 5

**I.1.1 LA FAMILLE DES *ARALIACEAE*** …… 5

**I.1.1.1** Description …… …… 5

**I.1.1.2** Classification systématique…… 5

**I.1.1.3** Répartition géographique……. …… 5

**I.1.1.4** Le genre *Cussonia* Thunb …… 6

**I.1.1.5** L'espèce *Cussonia arborea* Hochst.ex A.Rich…… 7

**I.1.1.6** Utilisations des *Cussonia*.…… 8

**I.1.2 LA FAMILLE DES *DRACAENACEAE***…….. 8

**I.1.2.1** Description …… 8

**I.1.2.2** Le genre *Dracaena*…… 9

**I.1.2.2.1** ***Description***…… 9

**I.1.2.2.2** ***Classification systématique***…… 10

**I.1.2.2.3** Répartition géographique …… 10

**I.1.2.3** L'espèce *Dracaena arborea Willd.*…… 11

**I.1.2.4** L'espèce *Dracaena deisteliana* Engl…… 12

**I.1.2.5** Utilisations des *Dracaena* …… 13

**I.1.2.5.1** Utilisations médicinales …… 13

**I.1.2.5.2** Utilisations non-médicinales…… 13

**I.2 *ÉTUDES CHIMIQUES ANTÉRIEURES***…… 15

**I.2.1** *Généralités*…… 15

**I.2.1.1** Les diterpènes …….. 15

**I.2.1.2** Les saponines …… 15

**I.2.2** Les glycosides diterpéniques isolés du genre *Cussonia* ……. 19
**I.2.3** Les saponines triterpéniques de *Cussonia*…….. 21
**I.2.4** Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Dracaena*…….. 24
**I.2.4.1** Les saponines stéroïdiques des *Dracaena*…… 24
**1.2.4.2** Les génines isolées du genre *Dracaena* ……..... 29
**1.2.5** Autres composés isolés du genre *Dracaena*…….. 30
**I.3 ETUDES PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURES**…… 30
**I.3.1** Activités cytotoxique et antitumorale …… 30
**I.3.2** Activités analgésique et anti-inflammatoire …….. 31
**I.3.3** Activités antimicrobienne et antivirale…….. 32
**I.3.4** Activités molluscicides…… 33
**I.4 METHODES D'ETUDES DES SAPONINES**…….. 33
**I.4.1** Extraction et de purification…… 33
**I.4.2** Les techniques physico-chimiques …… 34
**I.4.2.1** Les techniques chromatographiques …….. 34
**I.4.1.2** Détermination structurale…… 35
***CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS* ……** 42
**II.1. TRAVAUX CHIMIQUES** …… 43
**II.1.1** ***Cussonia arborea*** Hochst …… 43
**II.1.1.1** Extraction et isolement des saponines …… 43
**II.1.1.2** Elucidation structurale …….. 45
**II.1.1.3** Elucidation structurale composés (**<u>108</u>**-**<u>114</u>**) isolés des écorces……. 46
**II.1.1.3.1** Composé **108**…… 46
**II.1.1.3.2** Composé **109**…… 50
**II.1.1.3.3** Composé **110**…… 53
**II.1.1.3.4** Composé **111**…… 56
**II.1.1.3.5** Composé **112**…… 60
**II.1.1.3.6** Composé **113**…….. …… 63
**II.1.1.3.7** Composé **114** …… 66
**II.1.1.4** Elucidation structurale composés (**<u>115</u>**-**<u>126</u>**) isolés des feuilles……. 69
**II.1.1.4.1** Composé **115** …… 69
**II.1.1.4.2** Composé **116**…… 72
**II.1.1.4.3** Composé **117/118** …… 75
**II.1.1.4.4** Composé **119/120** …… . 82

**II.1.1.4.6** Composé **121** ……. 84
**II.1.1.4.8** Composé **122** ……. …. 87
**II.1.1.4.7** Composé **123**…… 89
**II.1.1.4.9** Composé **124**…….. 92
**II.1.1.4.10** Composé **125**……. 95
**II.1.1.4.11** Composé **126**……. 97
**II.1.2** ***Dracaena deisteliana*** engl. …… 100
**II.1.2.1** Isolement et purification…… 100
**II.1.2.2** Elucidation structurale des composés (**127** - **131**)…… 100
**II.1.2.2.1** Composé **127**…….. 101
**II.1.2.2.2** Composé **128**…… 105
**II.1.2.2.3** Composé **129**…… 109
**II.1.2.2.4** Composé **130**…….. 111
**II.1.2.2.5** Composé **131**……. 112
**II.1.3** ***Dracaena arborea*** (Willd.) ……. 113
**II.1.3.1** Extraction et isolement…… 115
**II.1.3.2** Elucidation structuraledes composés (**132 -137)**……. 116
**II.1.3.2.1** Composé **132**…… 116
**II.1.3.2.2** Composé **133**…… 120
**II.1.3.2.3** Composé **134**……. 124
**II.1.3.2.4** Composé **135**…… 126
**II.1.3.2.5** Composé **136** ……. 128
**II.1.3.2.6** Composé **137** …….. 130
**II.2 RESULTATS DES ETUDES PHARMACOLOGIQUES**……. 132
**II.2.1** Saponines comme agents anticancéreux potentiels…….. 132
**II.2.2** Mécanisme d'action des saponines sur les cellules tumorales…… 133
**II.2.3** Résultats …….. 134
**II.2.3.1** *Cussonia arborea* …….. 134
**II.2.3.2** *Dracaena arborea* ……. 135
**II.2.3.3** *Dracaena deisteliana*……. 136
**II.2.3.4** conclusion……. 137
***CHAPITRE III. PARTIE EXPERIMENTALE*……..** 138
**III.1** Matériel végétal et extraction …… 139
**III.2** Techniques chromatographiques ……. 139

**III.2.1** Chromatographie sous couche mince (CCM)…….. 139
**III.2.2** Réactifs de révélation…… 140
**III.2.3** Chromatographie sur colonne ouverte (CC)……. 140
**III.2.4** Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)…….. 140
**III.2.5** Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)…… 140
**III.2.6** Chromatographie Flash……. 141
**III.3 Méthodes physico-chimiques** …… 141
**III.3.1** Polarimétrie ($[\alpha]_D$)…… 141
**III.3.2** Spectrométrie de Masse (MS)…….. 141
**III.3.3** Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)…… 141
**III.4 Méthodes chimiques et biologiques**……. 142
**III.4.1** Hydrolyse acide …… 142
**III.4.2** Test d'évaluation de la cytotoxicité: méthode MTT…….. 142
**III.4.2.1** Méthode……. 142
**III.4.2.2** Protocole…… 142
**III.5 Données spectrales et constantes physiques des composés isolés**…… 143
**III.5.1** *Cussonia arborea*…… 143
**III.5.2** *Dracaena deisteliana*…….. 145
**III.5.3** *Dracaena arborea*……. 148
***CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*****……** 151
***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***…….. 155
***ANNEXES***…… 167
**Liste des tableaux**
**Liste des figures**
**Liste des schémas**
**Liste des photos**
**Liste des Publications**

# *INTRODUCTION GENERALE*

L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des pathologies remonte à plusieurs millénaires. La pharmacopée traditionnelle a ainsi toujours constitué pour les populations, vivant dans des régions dépourvues de centres de santé, la principale voie d'accès aux soins. Dans certains pays africains, plus de 80 pour cent de la population ont recours exclusivement aux plantes comme sources de traitement (OMS, 2002).

De nos jours, la phytothérapie est devenue l'une des principales voies d'accès aux soins. Les laboratoires de chimie, de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action. Trouver un traitement pour certaines maladies telle que les cancers, les maladies neuro-dégénératives, le VIH/SIDA constituent un challenge important pour les scientifiques.

Les substances naturelles d'origine végétale ou marine, restent un réservoir inépuisé de nouveaux métabolites secondaires aux activités peu ou pas explorées et qui peuvent constituer des têtes de séries originales pour le développement de nouveaux médicaments. Afin de rechercher de nouvelles molécules potentiellement anticancéreuses, le but de ce travail, entrepris dans le cadre de cette thèse est d'identifier de nouvelles saponines qui peuvent induire sélectivement l'apoptose des cellules tumorales en affectant une ou plusieurs voies pro-apoptiques à partir des extraits polaires des plantes de deux familles, largement répandues dans le monde: les *Araliaceae* et les *Dracaenaceae*. Il est intéressant de relever que de nombreux emplois traditionnels de plusieurs espèces appartenant à ces deux familles de plantes suscitées sont répandus à travers le monde pour traiter les maladies neurologiques, génitales, la tuberculose, la méningite, les malaises cardiaques et pour ses propriétés aphrodisiaques. Ces usages sont plus particulièrement répandus en Afrique et en Asie, deux parties du monde possédant des différences culturelles mais ayant en commun l'utilisation séculaire des plantes médicinales.

Les saponines ou saponosides sont des composés produits naturellement par certaines plantes, caractérisées par leurs propriétés tensioactives leurs conférant un pouvoir moussant. Différentes saponines isolées comportent des propriétés immunomodulatrice, cytotoxique, anti-tumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale, expectorante pour ne citer que les principales propriétés.

La famille des *Araliaceae* tout comme celle des *Dracaenaceae*, regroupent un grand nombre d'espèces riches en saponines dotées de diverses activités pharmacologiques. On peut

relever par exemple que les saponines issues de *Panax ginseng* C.A. Meyer, plante de la famille des *Araliaceae* et connu universellement, ont montré de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des effets anti-inflammatoire, antioxydant et anticancéreux. Les saponines de divers *Dracaena* sont connues pour leurs propriétés antitumorales et analgésiques.

Bien que de nombreuses études aient été entreprises ces dernières années, ces deux familles restent peu explorées sur le plan pharmacologique et chimique. C'est dans cet esprit que nous avons entrepris de faire une recherche orientée de cette classe de molécules chimiques douées d'activités biologiques, contenues dans les plantes médicinales utilisées dans la pharmacopée camerounaise pour traiter les maladies, ceci en associant les compétences des Laboratoires de Pharmacognosie (Unité de Molécules d'Intérêt Biologique, UMIB, UPRES EA 3660) de l'Université de Bourgogne en France dirigé par Mme le **Pr. Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS** et celle du laboratoire de la Chimie Substances Naturelles de l'Université de Yaoundé I au Cameroun dirigé par le **Pr. Lucas BEIBAM SONDENGAM** en se basant sur les données de l'ethnopharmacologie et des études chimiques antérieures effectuées sur ces familles de plantes.

Le présent travail a donc pour but d'adopter l'approche scientifique pour l'investigation chimique des fractions polaires de trois espèces de plantes : *Cussonia arborea* (*Araliaceae*), *Draceana arborea* et *Dracaena deisteliana* (*Dracaenaceae*). Cette étude chimique sera complétée par une évaluation pharmacologique des propriétés cytotoxiques de quelques saponines isolées.

Après une introduction, notre travail s'articulera en 3 parties:

- Chapitre I: Etudes antérieures.
  - Etude botanique
  - Etudes chimiques antérieures
  - Etudes pharmacologiques antérieures
  - Méthodes d'études des saponines
- Chapitre II: Travaux personnels
  - Travaux chimiques
  - Travaux pharmacologiques
- Chapitre III: Partie expérimentale
- Conclusions et perspectives.

# *CHAPITRE I: ETUDES ANTERIEURES*

## I.1 ASPECT BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE

### I.1.1 LA FAMILLE DES *ARALIACEAE*

**I.1.1.1** Description

Famille de Dicotylédones, de l'ordre des ombelliflorales (dialypétales caliciformes), les *Araliaceae* sont des plantes généralement ligneuses, à feuilles alternes. Leurs fleurs sont groupées le plus souvent en ombelles, actinomorphes, tetracycliques et pentamères. Les ombelles ne sont pas composées mais simples, en grappe (Lierre) ou proliférés (Hydrocotyle). Le nombre de carpelles n'est pas fixé mais varie entre 1 et 5. Le fruit est typiquement une drupe (Lierre, Ginseng) (Boullard, 1997; Dupont, 2007).

La famille des *Araliaceae* comprend environ 920 espèces, reparties en 84 genres, qui appartiennent pour la plus part aux régions tropicales qui, en dehors du Lierre, ne comprend que des espèces exotiques (Viguier, 1906). Cette famille est représentée par des arbustes subtropicaux ou tempérés arbustifs (*Aralia*), grimpantes (*Hedera*) ou herbacées (*Ginseng*). La flore africaine en comprend de nombreuses espèces, toutes endémiques, dont quelques unes ont été décrites. (Chazan, 1971).

**I.1.1.2** Classification systématique (Jussieu, 1789)

| | |
|---|---|
| **Règne** | *Plantae* |
| **Sous-règne** | *Tacheobionta* |
| **Division** | *Magnoliophyta* |
| **Classe** | *Magnoliopsida* |
| **Sous-classe** | *Rosidae* |
| **Ordre** | *Apiales* |
| **Famille** | ***Araliaceae*** |

**Schéma 1** : Classification classique des *Araliaceae*.

**I.1.1.3** Répartition géographique

La famille vit principalement dans les régions subtropicales et tropicales d'Asie et d'Amérique.

**I.1.1.4** Le genre *Cussonia* Thunb

Le genre *Cussonia*, représenté par près de 40 espèces, dont 25 environ sont réparties en Afrique tropicale, en Afrique du Sud, Madagascar et les îles Mascareignes (Tableau 1). Ce sont des arbres ou arbustes, généralement glabres, rarement tomenteux caractérisés par :

- des feuilles pétiolées, simples, palmées, ou lobées, digitalement composées. Elles sont souvent bondées, à la charge vers l'extrémité de la tige ou des branches principales.
- des stipules très souvent intrapétiolaires,
- les inflorescences de pointes sont des grappes, des ombelles ou des panicules de ombellules; bractées sous-tendant des fleurs (bractées florales).
- Les pédicelles sont non articulés sous la fleur.
- les fleurs verdâtres, 4-8 mm de diamètre, à calyx marge.
- Pétales (4 -) 5. Étamines (4 -) 5; anthères ovales. Disque plat, déprimé ou conique. Les ovaires biloculaires, très rarement avec 1-2 carpelles surnuméraires; possédant deux styles et très rarement 3 à 4.
- Le fruit ovoïde-globose, est souvent urcéolaire ou subconical en forme de coin (*C. spicata*); les exocarpes sont charnus ou submembranaceux.
- Les graines ovoïdes, globuleuses ou latéralement comprimées. (Tennant, 1968).

**Tableau 1** : Répartition géographique de quelques espèces de *Cussonia* d'Afrique.

| **Espèces** | **Lieu géographique** |
|---|---|
| *Cussonia angolensis* Seem. Hiern | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia arborea* Hoscht. ex A.Rich. | Afrique centrale, occidentale et orientale |
| *Cussonia barteri* Seemann | Afrique centrale et occidentale |
| *Cussonia bancoensis* Aubrev & Pellegr. | Afrique centrale et occidentale |
| *Cussonia corbisieri* De Wild. | Afrique occidentale, centrale et australe |
| *Cussonia paniculata* Eckl. & Zeyh | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia spicata* Thunb | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia holstii* Haerms ex Engl. | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia jatrophoides* Hutch. & E.A. Bruce | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia natalensis* Sond. in W.H.Harver | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia nicholsonii* Strey | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia arenicola* Strey | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia Zuluensis* Strey | Afrique orientale et australe |
| *Cussonia sphaerocephala* Strey | Afrique australe |

**I.1.1.5** L'éspèce *Cussonia arborea* Hochst.ex A.Rich

Il s'agit d'un arbre à tronc court (ne dépassent pas 7 à 10 m), ramifié, croissant dans la savane des montagnes. Ses jeunes pousses, velues - étoilées, supportent des feuilles caduques, digitées ou réellement lobées, groupées en verticilles vers le sommet des pousses. Les folioles (5 à 7) sont elliptiques à obovales, amincies vers leur base. A des longs racèmes (de l'ordre de 50 cm) de fleurs jaunes, sessiles, développés avant les feuilles, succèdent des infrutescences composées de fruits ovoïdes, charnues, blanchâtres, longs de 6 mm environ. (Boullard, 2001; Burkill, 1985)



**Photo 1**: *Cussonia arborea* (M.A Hyde and B. Wursten, 2005).



**Photo 2**: fleurs de *C. arborea* (www.metafro.be)

**I.1.1.6** Utilisations ethnopharmacologiques des *Cussonia*

*Cussonia* est généralement utilisé en médicine traditionnelle comme antidote contre les piqûres venimeuses et les morsures, comme émétiques, fébrifuges, stimulants / dépresseurs. Néanmoins, différentes parties de cette plante sont largement utilisées pour le traitement de diverses maladies. C'est ainsi :

- ✓ qu'au Mali, la macération des tiges de *C. arborea* est considérée comme un purgatif et appliquée comme une lotion. D'autre part, il possède un nombre non spécifié d'usages médicinaux et différentes parties sont utilisées pour traiter la décharge urétrale chez la femme et comme aphrodisiaque par les hommes. (Chevalier et *al.*, 1937).
- ✓ Il est également utilisé au Burkina-Faso et en Côte d'Ivoire (Kerharo et *al.,* 1950; Bouquet et *al.* 1974; Adjanohoun et *al.,* 1972) où les plaies des lépreux sont soignées avec l'écorce de la tige réduite en poudre, la décoction des feuilles, comme collyre pour la conjonctivite et les réduits de jeunes pousses sont consommées pour soigner la diarrhée.
- ✓ Les décoctions des racines et des souches sont données au Nigeria pour traiter les règles douloureuses, et une décoction de racines comme vomitif (Ainslie, 1937) d'une part et l'eau dans laquelle les feuilles ont été bouillies est purgative et est prise au Nigeria contre la constipation, et une décoction de feuilles est utilisée comme massage en cas d'épilepsie (Ainslie, 1937) d'autre part. Cette dernière application se retrouve également au Ghana pour le traitement des enfants épileptiques (Irvine, 1930).
- ✓ En Tanzanie, la racine est utilisée dans les bains de vapeur pour le traitement de la blennorragie (Bally, 1937).

## I.1.2 LA FAMILLE DES *DRACAENACEAE*

**I.1.2.1** Description

Les *Dracaenaceae* constituent une famille de plantes des Monocotylédones qui comprend 2 genres: *Dracaena* et *Sanseviera*. Classiquement, les *Dracaenaceae* pouvaient aussi former selon les différentes classifications, une sous-famille des *Liliaceae*, des *Asparagaceae*, ou des *Agavaceae*, voire ne pas constituer un clade distinct. La dernière révision de la classification phylogénétique intègre les *Dracaenaceae* dans la famille des *Ruscaceae.*

**I.1.2.2** Le genre *Dracaena*

Du mot grec "drakaina" qui signifie ‘’femelle du dragon'' (Stern, 1992), les *Dracaena* sont des plantes monocotylédones, comprenant environ 100 espèces selon Kubitzki (1998). Depuis le début du 19ème siècle, le genre a été à plusieurs reprises confondu avec d'autres tout

à fait sans rapport, comme l'Agave, le Yucca et particulièrement la Cordyline. Bien que variable, le genre forme dans l'ensemble un groupe homogène de généalogie considérable. Dans le passé, le genre *Dracaena* a été classifié dans les *Liliaceae* et les *Agavaceae*. Dahlgren a entrepris un reclassement majeur des monolits dans les années 1980, qui a impliqué une énorme division de la famille des *Liliaceae*. En conséquence, *Dracaena* est entré dans une famille séparée à part entière, avec d'autres genres comme *Calibanus, Cordyline, Dasylirion, Nolina* et *Sanseveria* (Mabberley, 1997). *Dracaena* est sur le point d'être réclassifié dans la famille *Convallariaceae* (*Angiosperm Phylogeny,* 1998).

**I.1.2.2.1** *Description*

Renommés pour leur beau feuillage très souvent panaché, la plupart des *Dracaena* adultes sont des arbustes érigés qui ne se ramifient pas. Leurs feuilles lancéolées et arquées naissent au sommet de hautes tiges nues et les font ressembler à des palmiers. Pouvant atteindre 3 m de haut, les branches en angle, sont glabres, sans épines. Les cladodes largement ovées à lancéolées, sont aigues au sommet, arrondies à la base, avec de nombreux (> 15) nervures latérales parallèles. Le pédicelle 5 - 32 mm de long, est articulé au sommet ou dans la moitié supérieure. Les tépales blanc-verdâtres, 5 - 6 mm de long, 6 étamines, ± 6 mm de long, est plus court que le périanthe; l'ovaire triloculaire possède 4 - 6 ovules dans chaque loge, les styles 1 - 3 mm de long, stigmatisation tri- branchées. Les petits fruits rouges sont globuleux, 6 - 10 mm de diamètre, jusqu'à 8 ensemencés (Sebsebe et *al.,* 2006). Les *Dracaena* fleurissent rarement en intérieur. Toutefois, dans de bonnes conditions, les plantes matures peuvent fleurir en été. Elles produisent habituellement une hampe florale portant de nombreuses fleurs crème en forme d'étoile.

***I.1.2.2.2*** *Classification systématique*

**Domaine:** *Eukaryota*
**Uni:** *Plantae*
**Sous-règne :** *Viridaeplantae*
**Phylum:** *Tracheophyta*
**Sous-embranchement:** *Euphyllophytina*
**Infraphylum:** *Radiatopses*
**Classe:** *Liliopsida*
**Sous-classe:** *Liliidae*
**Super-ordre:** *Lilianae*

**Commande:** *Asparagales*

**Sous-ordre:** *Asteliineae*

**Famille:** *Dracaenaceae*

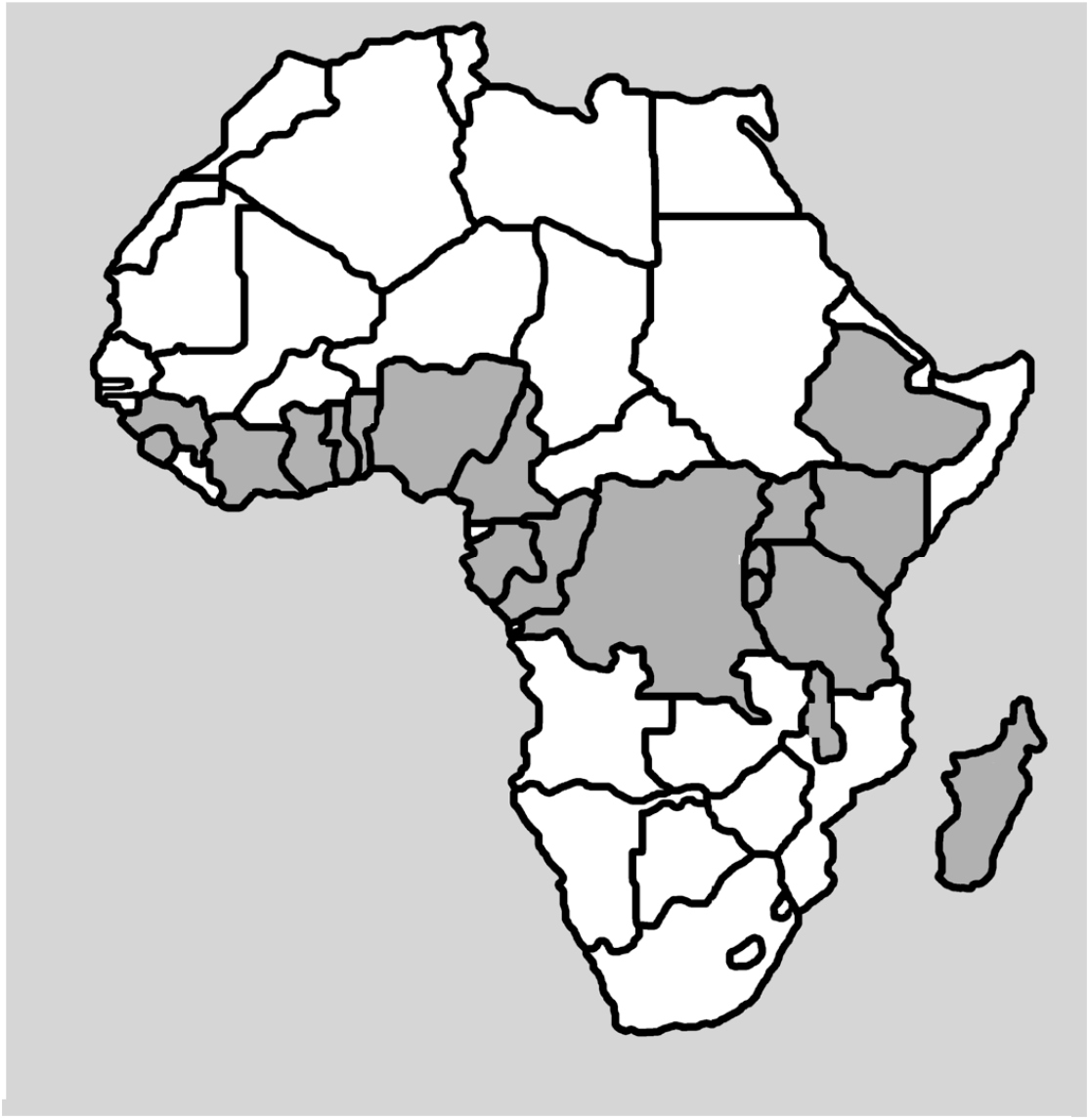
**Sous-famille:** *Ruschioideae*

**Genre:** ***Dracaena***

**Schéma 2:** Classification phylogénétique des *Dracaena* (Marrero et *al*., 1998; Miller, 2004)

#### **I.1.2.2.3** *Répartition géographique*

Le genre *Dracaena* est très répandu en Afrique tropicale, en Asie, avec extension aux régions chaudes d'Europe. Ces dernières années, il a été naturalisé en Australie.



**Carte 1 :** Répartition géographique des *Dracaena* en Afrique. (Sheridan, 2008).

**I.1.2.3** L'espèce *Dracaena arborea* Willd

Plante arborescente, arbustive ou sous forme d'arbrisseau de la forêt de montagne, semblable au palmier pouvant atteindre 20 m de hauteur. Avec un tronc de 20 à 30 cm de diamètre, *D. arborea* est taillé, possède des racines aériennes, avec une ramification distale en couronne d'étroites feuilles lancéolées de 50 à 120 cm de long poussant vers l'apex de tiges ou espacées le long de la partie. Les fleurs sont blanches crèmes, en inflorescences pendantes de 1 à 1 ¼ m de long (Burkill, 1985). Les feuilles en lame sont habituellement en forme d'épée, elliptiques à lancéolées. Les inflorescences sont ramifiées et rarement simples. Les fleurs sont bisexuelles, parfois solitaires avec le pédicelle articulé. Il possède 1 ou 2 ovules par loge, un style mince et un fruit globuleux de 1 à 3 graines.




**Photo 3:** *Dracaena arborea* (G. Kougan, 2010)

**I.1.2.4** L'espèce *Dracaena deisteliana* Engl

Cet arbuste, rarement ramifié, peut atteindre jusqu'à 5 m de hauteur. Les feuilles sont le long de la tige, avec des inflorescences terminales comportant des fleurs blanches parfois teintées de pourpre. Appelé ''arbre de paix'' au Cameroun, *D. deisteliana* est utilisé comme son nom l'indique pour attirer la paix vers les autres ou vers soi-même (Djongang, 2004), il sert de drapeau blanc pendant les conflits entres les chefferies voisines en pays Bamiléké (Ouest du Cameroun) ou avec les autorités administratives. Planté serré dans les haies, il a des vertus protectrices de la concession (Gautier, 1994).

*D. deisteliana* est répandu sur les montagnes et les hautes terres de l'Est du Nigéria et de l'ouest du Cameroun.



**Photo 4 :** *Dracaena deisteliana* (G. Kougan, 2010)

### I.1.2.5 Utilisations ethnopharmacologiques des *Dracaena*

#### **I.1.2.5.1** Utilisations médicinales

En Médicine traditionnelle africaine, la décoction des feuilles de *Dracaena arborea* prise par voie orale, est utilisée pour soigner les malaises cardiaques, les maladies génitales, les maladies sexuellement transmissibles, les maladies gastritiques, la variole, les convulsions tandis que cette même décoction prise sous forme de bain pour traiter la varicelle et la variole (Bouquet, 1969). D'autres études mentionnent son utilisation comme stimulant génital, contre la paralysie, l'épilepsie, les spasmes et les maladies des reins, comme diurétiques, pour la régulation du cycle menstruel, comme sédatifs.

Les tiges de *D. deisteliana* sont utilisées au Cameroun pour soigner les maux de dents (Jiofack et *al.* 2009). *D. draco* fut jadis utilisé dans les îles Madères, comme plante médicinale populaire. C'était le fameux « sang du dragon », dont la poudre (« résine » ou sève solidifiée) après avoir été séchée et moulue, était diluée dans de l'eau-de-vie : en usage interne et externe, pour ses propriétés astringentes, toniques, hémostatiques, en cas de contusions, hémoptysies, hémorragies internes, même en cas d'apoplexie. (Ballabio, 2004). *D. reflexa* est utilisé au Congo dans le traitement de l'infertilité féminine et d'autres pathologies (Nkounkou et *al.*,

2005), tandis que l'écorce de *D. steudneri* est utilisée pour le traitement de la méningite cryptococcale, de la tuberculose et de la candidose orale en Tanzanie (Kisangau et *al.*, 2007).

**I.1.2.5.2** Utilisations non-médicinales

Outre ces utilisations en médecine traditionnelle, les *Dracaena* sont utilisés en agro horticulture pour les haies (Sheridan, 2008), comme marqueurs, plantes d'ornement. Comme répulsifs des reptiles, comme poison pour les poissons, comme substitut de savon. Dans le Social pour des pratiques magico-religieuses. (Burkill, 1985)

## I.2 *ÉTUDES CHIMIQUES ANTÉRIEURES*

### **I.2.1** Généralités

#### **I.2.1.1** Les diterpènes

Les diterpènes forment un vaste ensemble de composés en $C_{20}$ issus du métabolisme du 2E, 6E, 10E-géranylgéranylpyrophosphate (GGPP) très répandus chez les végétaux. La structure des diterpènes est très variable, étroitement dépendante de leur biogenèse conduisant essentiellement à deux types de composés : les composés acycliques et les composés cycliques. La cyclisation conduit à deux séries énantiomères, différant par les configurations opposées des carbones C-5, C-9 et C-10. La série est dite « normale » lorsque la fusion des cycles A et B est identique à celle des stéroïdes et « *ent* » (énantio) lorsque c'est l'antipode (Bruneton, 2009). Cette classe de composés se compose de trois grands groupes: les labdanes, les clérodanes et les *ent*-kauranes (voir exemple, tableau 2, p. 20-21).

#### **I.2.1.2** Les saponines

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (Bruneton, 2009). Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins (Avilov et *al*., 1997; Yoshiki et *al*., 1998). Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine: les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009).

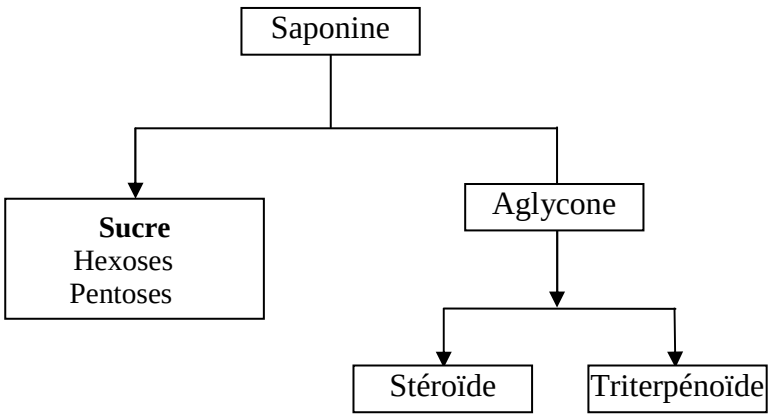



**Schéma 3** : composition des saponines

### *Les génines triterpéniques*

Les triterpènes, 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents sont des composés en $C_{30}$ issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène ou, plus rarement du squalène lui-même. Presque toujours hydroxylés en 3, les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures étant d'ordre configurationnel et liées à la conformation adoptée par l'époxy-squalène (ou le squalène) avant la cyclisation. Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles rationnalisant l'existence des différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe (Bruneton, 2009). Les sapogénines triterpéniques de loin les plus nombreuses sont donc des molécules pentacycliques, les oléananes et les ursanes étant les deux squelettes les plus communs. Les principes directeurs qui conduisent à l'élaboration des principaux squelettes triterpéniques sont rassemblés dans le schéma n° 4.

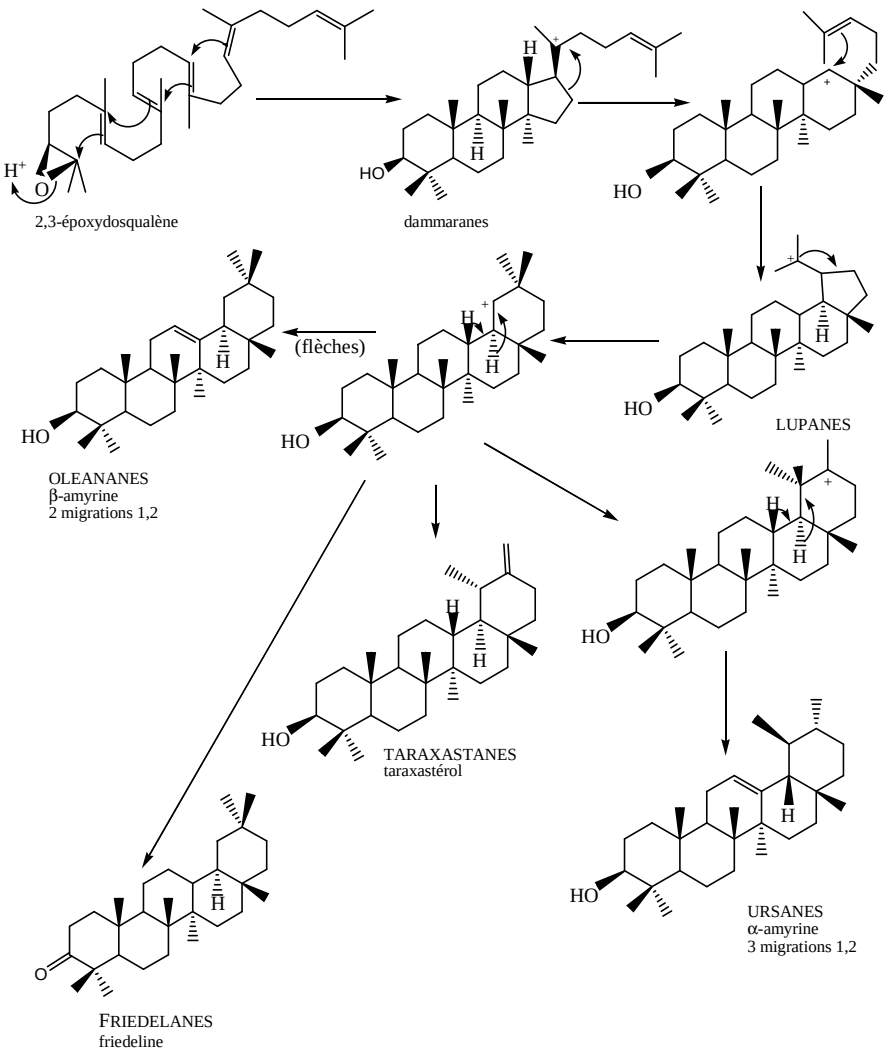
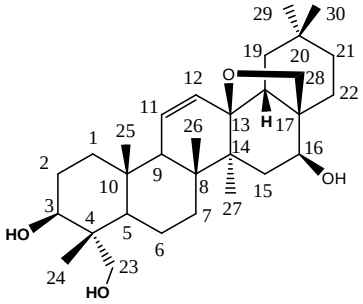
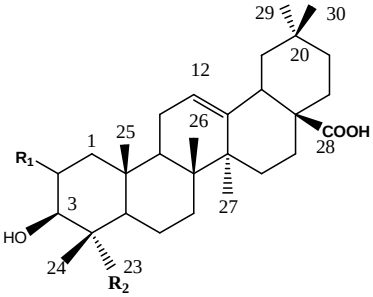



**Schéma 4**: Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes (Bruneton, 2009).

Les éléments structuraux qui caractérisent ces séries sont l'existence habituelle d'une insaturation en 12(13), la fonctionnalisation fréquente des méthyles, surtout ceux en 23 et 28 en hydrométhyle (saikogénine F), aldéhyde (gypsogénine) ou en carboxyle (acide médicagénique), l'oxydation d'un plus ou moins grand nombre de carbones cycliques: 2, 7, 11, 15, 16, 21, 22, l'oxylation de l'un de ces hydroxyles en cétones n'est pas rare et la polyfonctionnalisation peut entraîner, par éthérification interne ou lactonisation, la formation d'un cycle supplémentaire.



saikogénine F



**$R_1$**=H, **$R_2$**= CHO: gypsogénine

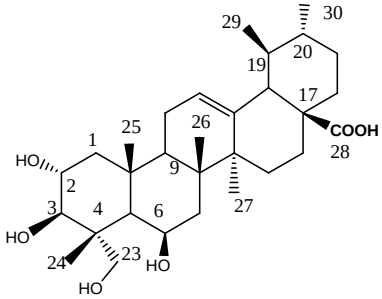
**$R_1$**= $\beta$OH, **$R_2$**=COOH: acide médicagénique

**$R_1$**=H, **$R_2$**=$CH_3$: acide oléanolique

**$R_1$**=H, **$R_2$**=$CH_2OH$: hédéragénine

**$R_1$**=$\beta$OH, **$R_2$**=$CH_2OH$, 16$\alpha$-OH: acide polygalacique

**$R_1$**= $\beta$OH, **$R_2$**=COOH, 27: présénégine



acide madécassique

- ***Les génines stéroïdiques***

Les génines stéroïdiques possèdent toutes un squelette à 27 atomes de carbone qui comportent habituellement six cycles.

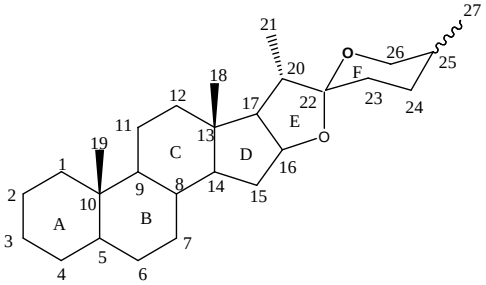


**Figure C**: Spirostane

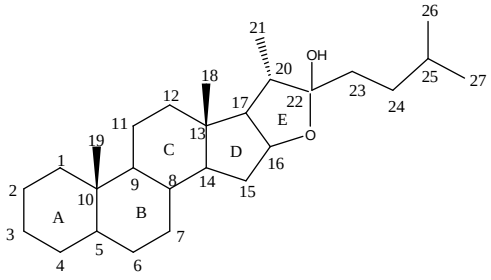
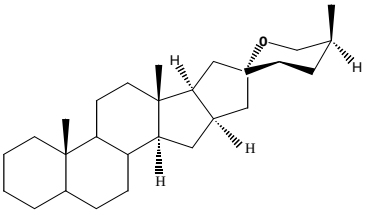


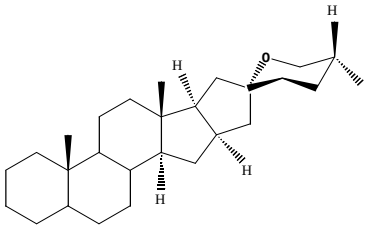
**Figure D**: Furostane

Les deux cycles E (furanique) et F (pyranique) sont formellement la conséquence d'une cétalisation intramoléculaire qui intervient après l'oxydation en 16, 22, et 26 d'un précurseur cholestanique. Les variations structurales sont limitées :

- si le squelette hexacyclique comprend de nombreux carbones asymétriques, seule la configuration du carbone 25 peut varier, ce qui détermine l'existence de deux séries : néosapogénines (*25-S*) et isosapogénine (*25-R*) (Bruneton, 2009, Hostettmann et *al.*, 1991 et 1995, Kamernitskii et *al.*, 1986).

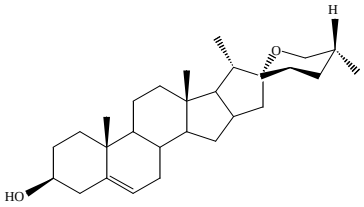


néosapogénine : 25*S*-spirostane

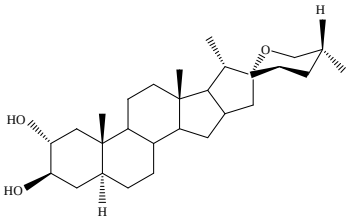


isosapogénine : 25*R*-spirostane

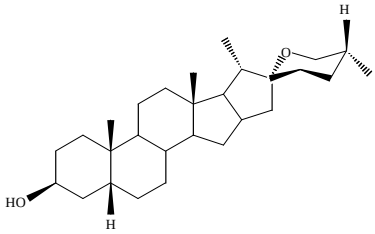
La double liaison en 5,6 peut être conservée exemple de la diosgénine ou réduite, ce qui induit l'existence de dérivés à cycles A/B fusionnés en trans (H-5α, ex. digitogénine) ou en cis (H-5β, ex.: smilagénine).



Diosgénine



Digitogénine



Smilagénine

Les Furostanols ont un anneau F ouvert et un sucre lié en C-26. Marker et Lopez postulèrent pour la première fois l'existence de glycosides à chaîne ouverte de ce type en 1947. L'hydrolyse enzymatique ou acide du sucre en position C-26 conduit à la fermeture spontanée du cycle, formant ainsi le dérivé spirostanol (Schéma 5). Le processus inverse, l'ouverture du cycle, a été observée dans des cultures cellulaires (Tschesche et Wulf, 1972; Marker et Lopez, 1947).

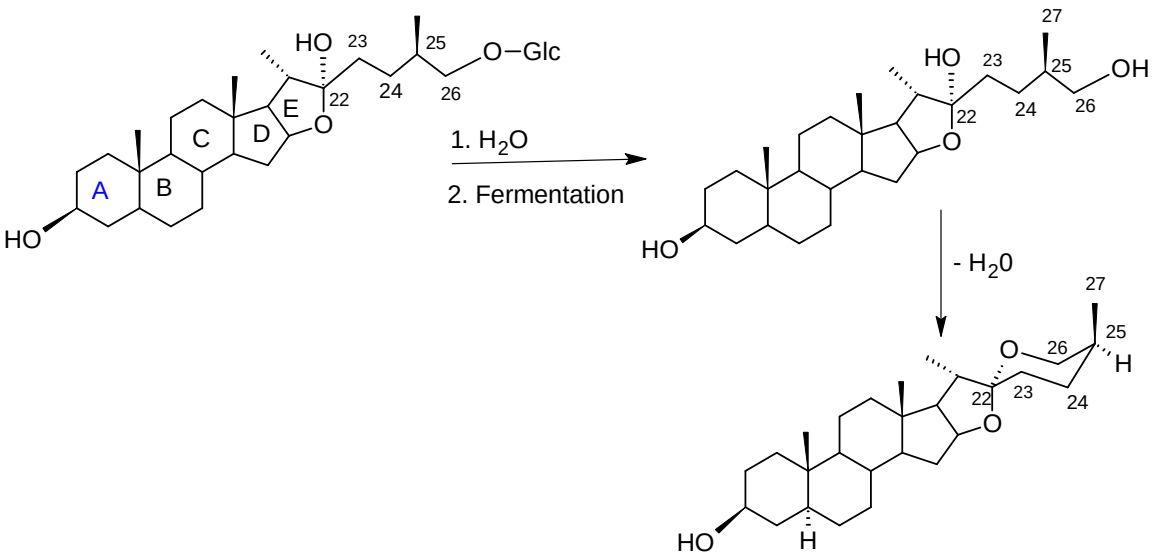



**Schéma 5:** Conversion d'un glycoside furostanol en un spirostanol par hydrolyse enzymatique du 26-glycoside (Tschesche et Wulf, 1972; Marker et Lopez, 1947).

- **Les hétérosides**

Les oses constitutifs des saponines les courants sont: D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique chez les saponines triterpéniques. Les chaînes oligosiques, linéaires ou ramifiées, comportent jusqu'à une dizaine d'oses qui constituent la partie sucrée de l'hétéroside. Elles peuvent être liées à la génine par une liaison de type O-hétéroside ou par une liaison de type ester. La formation de la liaison osidique implique classiquement la fonction réductrice de l'oligoside et l'hydroxyle secondaire qui est normalement présent en position 3, aussi bien chez les stéroïdes que chez les triterpénoïdes: on parle alors de monodesmoside. Assez fréquemment, la molécule comporte une seconde chaîne osidique liée à la génine par une liaison ester avec le carboxyle en 28 des génines triterpéniques: on parle alors de bidesmosides. Dans le cas des saponines à génine stéroïdique la deuxième chaîne osidique, quand elle existe, est liée à la fonction alcool primaire des furostanols.

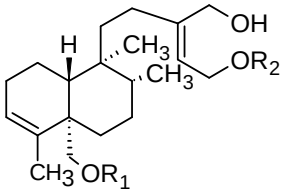
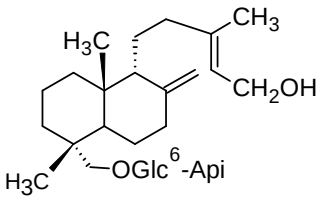
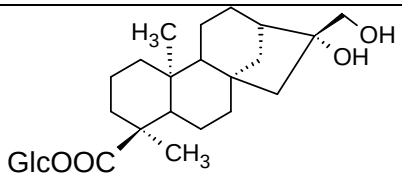
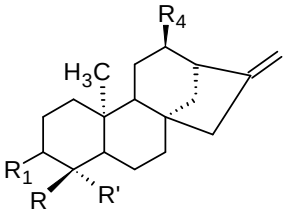
### I.2.2 *Principaux métabolites secondaires isolés du genre Cussonia*

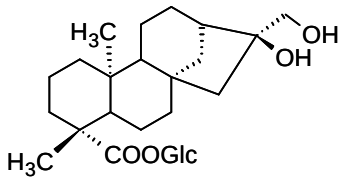
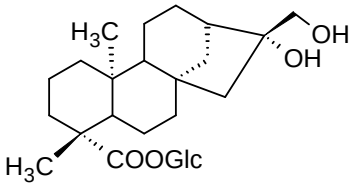
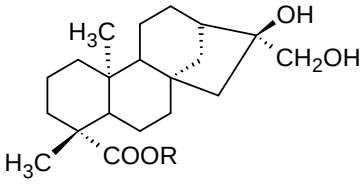
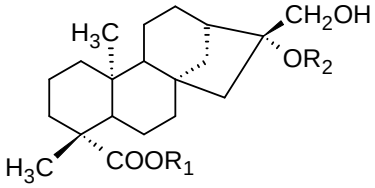
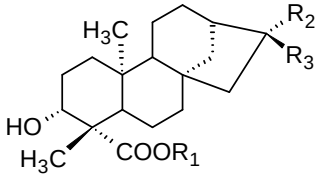
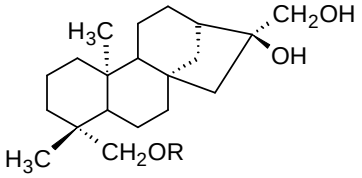
Ces dernières années, le genre *Cussonia* a fait l'objet de plusieurs travaux chimiques et pharmacologiques soulignant la présence de deux grands groupes de métabolites secondaires à savoir les glycosides diterpéniques et des glycosides triterpéniques.

**I.2.2.1** Les glycosides diterpéniques isolés du genre *Cussonia.*

Des travaux entrepris sur quelques espèces de *Cussonia* ont conduit à l'isolement et la caractérisation des glycosides ayant le clérodane, le labdane et l'*ent*-kaurane comme génines.

**Tableau 2**: Glycosides diterpéniques isolés du genre *Cussonia*

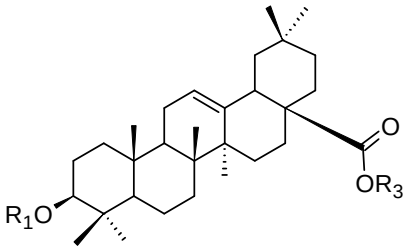
| Composé | Espèces | Références |
|---|---|---|
| <br>**1** cussoside A : $R_1$ = Glc $R_2$ = H<br>**2** cussoside B : $R_1$ = Glc $R_2$ = Glc<br>**3** cussoside C : $R_1$ = Glc $R_2$ = H<br>**4** cussoside D : $R_1$ = Glc-Api $R_2$ = Api<br><br>**5** cussoside E | *C. racemosa* | Harinanteniaina et *al.*, 2002a |
| <br>**6** cussoracoside A | *C. racemosa* | Harinanteniaina et *al.*, 2002b |
| <br>**7** cussoracoside B $R_1$ = H $R_2$ = $CH_3$ $R_3$ = $COOGlc^6$-Api, $R_4$ = OH<br>**8** cussoracoside C $R_1$ = H $R_2$ = $CH_3$ $R_3$ = COOGlc $R_4$ = OGlc<br>**9** cussoracoside D $R_1$ = H $R_2$ = $COOGlc^6$-Api $R_3$ = $CH_3$ $R_4$ = OH<br>**10** cussoracoside E $R_1$= αOH $R_2$ = $CH_3$ $R_3$ = COOGlc $R_4$ = OH<br>**11** cussoracoside F $R_1$= βOH $R_2$ = $CH_2OGlc^6$-Api<br>$R_3$ = $CH_3$ $R_4$=H | | |

| | | |
|---|---|---|
| <br>**12** *β*-D-glucopyranosyl *ent*-16*β*, 17-dihydroxykauran-19-oate | *C. racemosa* | Cheng et *al*., 1993<br>Harinanteniaina et *al*., 2002b |
| <br>**13** paniculoside IV | *C. bojeri*<br>*C. paniculata*<br>*C. racemosa* | Harinanteniaina et *al*., 2002b<br>Yamasaki et *al*., 1976<br>Kaneda et *al*., 1978 |
| <br>**14** R= H<br>**15** R= *β*-D-Glc<br><br>**16** $R_1$ = *β*-D-Glc $R_2$= *β*-D-Glc | *C. bojeri* | Harinantenaina et *al*., 2002c |
| <br>**17** cussovantoside A $R_1$ =Glc $R_2$= $CH_2OH$ $R_3$= OH<br>**18** cussovantoside B $R_1$= Glc $R_2$= OH $R_3$= $CH_2OH$<br><br>**19** cussovantoside C R= $Glc^6$-Api<br>**20** cussovantoside D R= $Glc^2$-Rha | *C. vantsilana* | Harinantenaina et *al*., 2002d |

**I.2.3** Les saponines triterpéniques de *Cussonia*

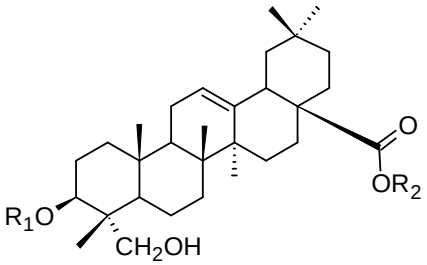
Il s'agit sans doute de la classe des composés la plus caractéristique des *Araliaceae*. Les saponines se retrouvent pour la plus part des plantes, dans les racines, le bois et les écorces. Ces dernières années, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux saponines triterpéniques contenues dans le genre *Cussonia*. Ainsi, on note plusieurs articles scientifiques décrivant l'isolement et la caractérisation de plusieurs saponines obtenues de plusieurs espèces africaines de ce genre. Un constat se dégage de ces divers travaux à savoir que ces saponines ont systématiquement cinq types de génines: l'acide oléanolique, l'hédéragénine, l'acide ursolique, l'acide 23-hydroxyursolique (Chazan, 1971) et l'acide bétulinique. Les différentes saponines isolées de quelques espèces étudiées sont consignées dans les tableaux n°3, 4, 5 et 6 ci-dessous.

**Tableau 3**: Saponines à acide oléanolique.



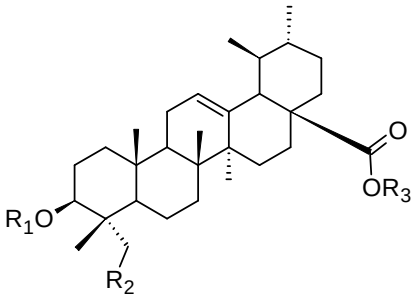

| Composés | $R_1$ | $R_3$ | espèces | Référence |
|---|---|---|---|---|
| **21** | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. barteri* | Dubois et *al*., 1986 |
| **22** | GlcA | H | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **23** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **24** | Glc-$^2$GlcA | Glc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **25** | Ara | H | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2005 |
| **26** | Glc-$^2$Ara | H | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2005 |
| **26** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2005 |
| **27** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | Griskovets et *al*. 2005 |
| **28** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | |
| **29** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | |
| **30** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | |

**Tableau 4**: Saponines à hédéragénine.



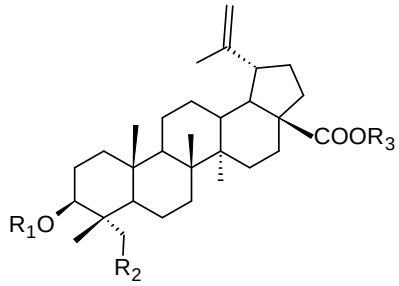

| Composé | $R_1$ | $R_2$ | espèce | Référence |
|---|---|---|---|---|
| **31** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **32** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **33** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **34** | GlcA | Glc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **35** | Glc-$^2$Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **36** | Ara | H | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2005 |
| **37** | H | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | Griskovets et *al*., 2005 |
| **38** | H | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | |
| **39** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^4$-OAc | *C. paniculata* | |
| **40** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | |
| **41** | Ara | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | |
| **42** | Arf-$^4$GlcA | - | *C. spicata* | Guzinger et *al*., 1986 |
| **43** | Arf-$^4$Gal-$^2$GlcA | - | *C. spicata* | |

**Tableau 5:** Saponines à acide ursolique / 23-hydroxyursolique.




| Composé | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | Espèce | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| **44** | Ara | H | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2006 |
| **45** | Ara | H | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | Dovgii et *al*. 2006 |
| **46** | $Ara^2$-Gal | H | Glc | *C. racemosa* | Harinantenaina et *al*., 2002e |
| **47** | $Ara^2$-Gal | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C .racemosa* | Harinantenaina et *al*., 2002e |
| **48** | H | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. barteri* | Dubois et *al*., 1986 |
| **49** | Ara | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. barteri*<br>*C .paniculata* | Dubois et *al*., 1986<br>Dovgii et *al*., 2006 |
| **50** | H | OH | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. paniculata* | Dovgii et *al*., 2005 |
| **51** | Ara | OH | H | *C. bancoensis* | Tapondjou et *al*., 2003a |
| **52** | Glc | OH | H | *C. bancoensis* | Tapondjou et *al*., 2003a |

**Tableau 6**: Saponines à acide bétulinique.



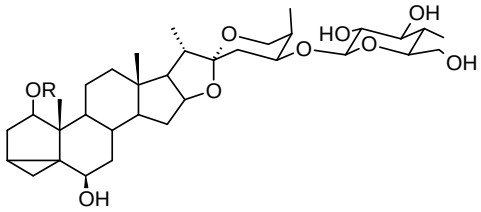
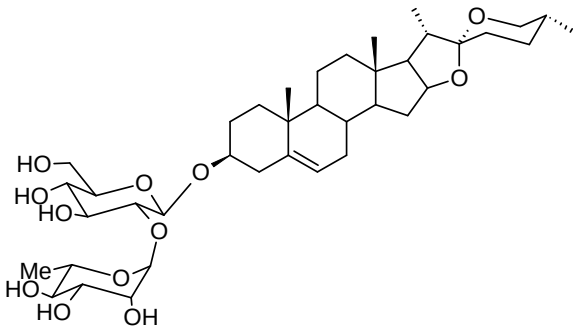
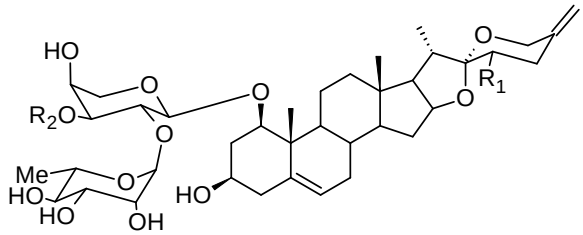
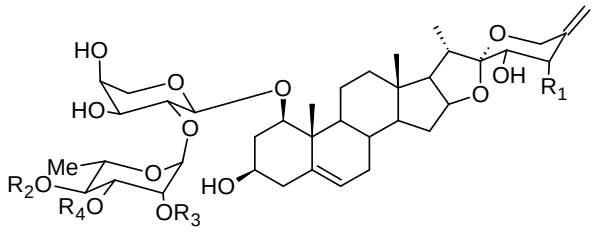

| Composé | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | espèce | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| **53** | Ara | OH | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^2$-OAc | *C. paniculata* | Griskovets et *al.*, 2005 |
| **54** | Ara | OH | $Glc^6$-$Glc^4$-$Rha^3$-OAc | *C. paniculata* | |
| **55** | Glc | H | $Glc^6$-Glc | *C .racemosa* | Harinantenaina et *al.*, 2002<br>Wang et al., 1996 |
| **56** | Glc | H | $Glc^6$-Ara | *C. racemosa* | Harinantenaina et *al.*, 2002e |
| **57** | $Ara^2$-Gal | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C .racemosa* | Harinantenaina et *al.*, 2002e |
| **58** | $Ara^2$-Rha | H | $Glc^6$-$Glc^4$-Rha | *C. racemosa* | Harinantenaina et *al.*, 2002e |

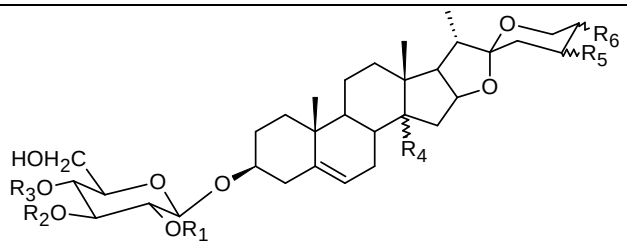
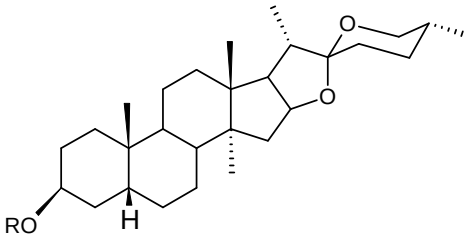
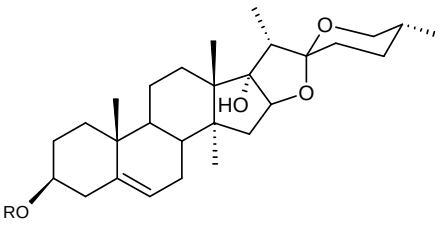
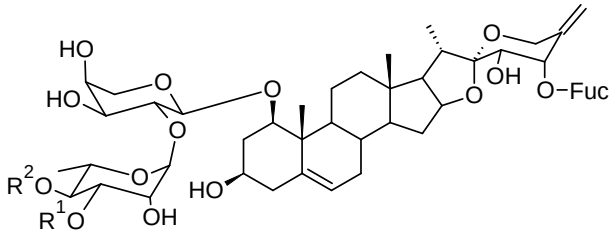
**I.2.4** Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Dracaena*

**I.2.4.1** Les saponines stéroïdiques des *Dracaena*

Les premières études chimiques sur le genre *Dracaena* remontent en 1883, lorsque deux professeurs de chimie de Glasgow, James Dobbie et G Henderson ont conduit une analyse chimique à la demande de Monsieur lsaac Bailey Balfour et ont comparé les échantillons de *Dracaena cinnabari* avec un certain nombre d'autres résines rouges connues comme le Sang de Dragon (Pearson, 2002). Les *Dracaena* font donc l'objet de nombreuses études phytochimiques depuis les années 1980, l'intérêt porté sur ce genre doit être motivé par la classe des molécules isolées, car le genre est caractérisé par une riche présence de saponines de type stéroïdique, consistant souvent en des glycosides de spirostanol et de furostanol et possédant des activités biologiques avérées. Les tableaux n° 7, 8 et 9 rassemblent les études phytochimiques significatives conduites sur différentes espèces de *Dracaena*.

**Tableau 7:** Saponines à génine spirostanique isolées des espèces de *Dracaena*

| Composés | Espèces | Références |
|---|---|---|
| <br>**R**<br>**59** β-D-Fuc<br>**60** β-D-Glc | *D. surculosa* | Yokosuka et *al.*, 2002 |
| <br>**61** | *D. draco* | Mimaki et *al.*, 1999 |
| <br>**R₁** **R₂**<br>**62** H H<br>**63** OH β-D-Xyl | | |
| <br>**R₁** **R₂** **R₃** **R₄**<br>**64** Fuc Ac Ac Ac<br>**65** OH H H H<br>**66** OH Ac H H<br>**67** H H H H<br>**68** H Ac H H | | |

| Composés | | | | | | | | Espèces | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|  | | | | | | | | *D. cochinchinensis* | Zheng et *al.*, 2004 |
| | | ***R1*** | ***R2*** | ***R3*** | ***R4*** | ***R5*** | ***R6*** | | |
| **69** | Dracaenoside E | H | H | H | OH | H | eq+ax Me | | |
| **70** | Dracaenoside F | Rha | H | H | OH | H | eq+ax Me | | |
| **71** | Dracaenoside G | Rha | H | H | OH | H | eq+ax Me | | |
| **72** | Dracaenoside H | Rha | Glc | Glc | OH | H | eq+ax Me | | |
| **73** | Dracaenoside I | Rha | Glc | Glc | H | H | $=CH_2$ | | |
| **74** | Dracaenoside J | H | Glc | Glc | OH | H | eq $CH_2OH$ | | |
| **75** | Dracaenoside K | Rha | H | H | OH | OH | ax Me | | |
| **76** | Dracaenoside L | Rha | Glc | Glc | OH | OH | ax Me | | |
| **77** | Collettinside III | Rha | H | H | H | H | eq+ax Me | | |
| **78** | Collettinside IV | Rha | Glc | Glc | H | H | eq+ax Me | | |
|  **R** **79** Gal-$^4$Gal-$^3$Glc- **80** Gal-$^4$Glc-$^3$Glc- | | | | | | | | *D. ombet* | Moharram et *al.*, 2007 |
|  **R** **81** manioside A Rha-$^3$Glc **82** floribundasaponine A Glc **83** spiroconazole A [Rha-$^3$]-Rha-$^2$Glc | | | | | | | | *D. mannii* | Tapondjou et *al.*, 2008 Okunji et *al*., 1991 |
|  **84** cambodraconoside A $R^1 = R^2 = Ac$ **85** namonine D $R^1$= H, $R^2$ = Ac **86** namonine C $R^1 = R^2 = H$ | | | | | | | | *D. cambodiana* | Xu et *al*., 2010 Tran et *al*., 2001 |

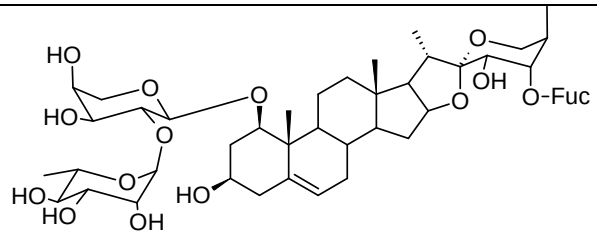
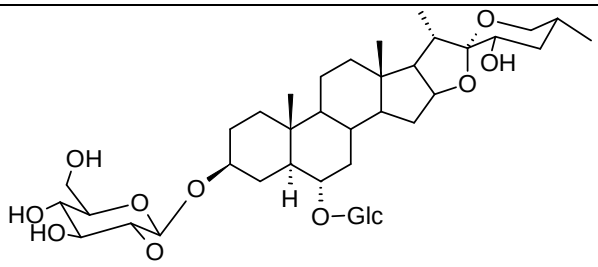
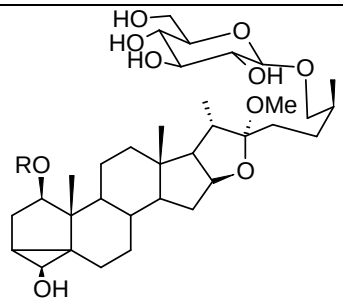
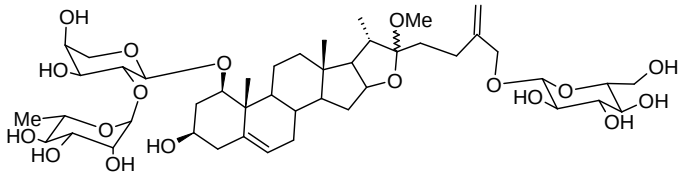
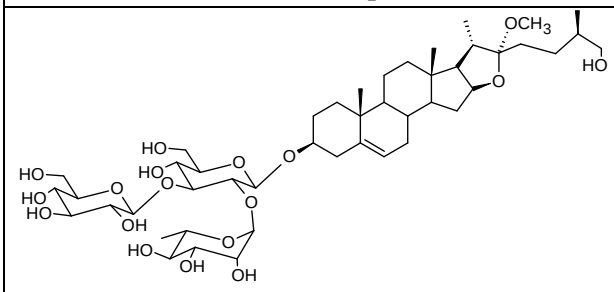
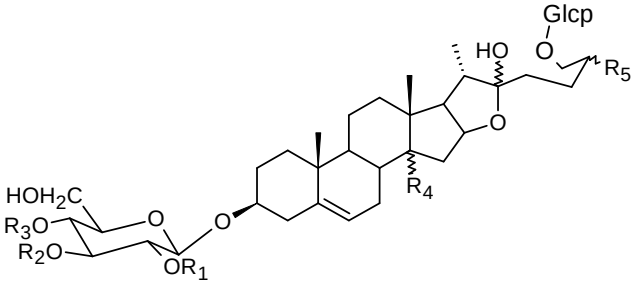
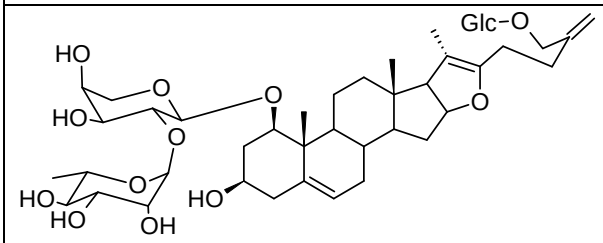
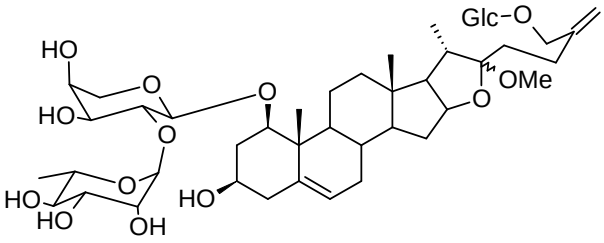
| Composés | Espèces | Références |
|---|---|---|
| <br>**87** Cambodraconoside B | *D. cambodiana* | Xu et *al*., 2010 |
| <br>**88** | | |

**Tableau** 8: Saponines à génine Furostanique isolées des espèces de *Dracaena*.

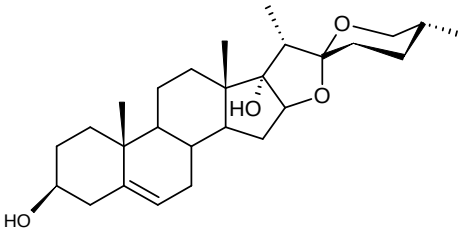
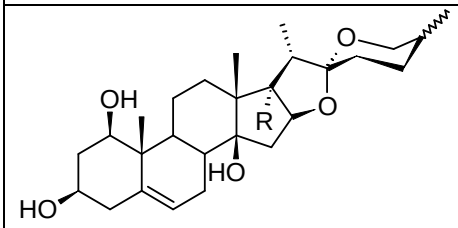
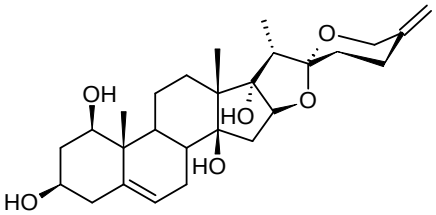
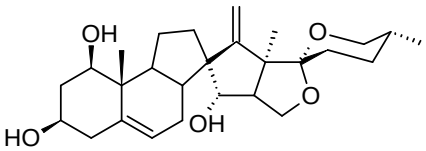
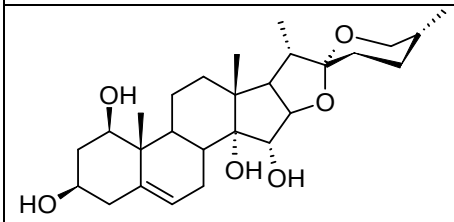
| Composés | Espèces | Références |
|---|---|---|
| <br>**R**<br>**89** β-D-Glc<br>**90** β-D-Fuc | *D. surculosa* | Yokosuka et *al.,* 2002 |
| <br>**91** | *D. draco* | Mimaki et *al*., 1999 |

| Composés | Espèces | Références |
|---|---|---|
| <br>**92** icogénine | *D. draco* | Hernandez et *al*., 2004 |
| <br>**93** R1=H R2=H R3=Rha R4=OH R5=eq+ax Me<br>**94** R1=Rha R2=H R3=H R4=OH R5=eq+ax Me<br>**95** R1=Rha R2=H R3=Rha R4=OH R5=eq+ax Me<br>**96** R1=Rha R2=Glc R3=H R4=OH R5=eq+ax Me<br>**97** R1=Rha R2=H R3=Rha R4=H R5=eq+ax Me<br>**98** R1=Rha R2=Glc R3=H R4=H R5=eq+ax Me | *D. cochinchinensis* | Zheng et *al.*, 2004 |
| <br>**99** | *D. cambodiana* | Xu et *al*., 2010 |
| <br>**100** | | |

**1.2.4.2** Les génines isolées du genre *Dracaena*

Plusieurs études menées sur le genre *Dracaena* ont permis l'isolement de quelques génines toutes de type stéroïdique.

**Tableau 9** : Les génines isolées du genre *Dracaena*

| **Composé** | **Espèces** | |
|---|---|---|
|  **101** pénnogénine | *D. mannii*<br>*D. cambodiana* | Tapondjou et *al*., 2008.<br>Yang et *al*., 1986.<br>Espeji et *al*., 1982 |
|  **102** namogénine A R = OH, 25R,S<br>**103** namogénine B R = H, 25S | *D. augustifolia* | Tran et *al*., 2004 |
|  **104** namogénine C | | |
|  **105** dracaenogénine A | *D. cochinchinensis* | Zheng et *al*., 2006 |
|  **106** dracogénine B | | |

**I.1.2.5** Autres composés isolés du genre *Dracaena*

Diverses autres classes de composés ont été caractérisées et quantifiées dans le genre *Dracaena* notamment des flavonoïdes (Masaoud et *al.*, 1995; Himmelreich et *al.*, 1995; Gonzàlez et *al.*, 2004) et un métacyclophane (Vesela et *al*., 2002). Une autre étude a permis l'identification des stérols et des triterpénoïdes de la résine de *Dracaena cinnabari* (Masaoud et *al.*, 1995).

## I.3 ETUDES PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURES

Des travaux des scientifiques sur les saponines, il ressort que cette classe de molécules possède des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses. On peut citer entre autre des activités molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 et 2000; Lacaille-Dubois, 2005; Hostettmann et Marston, 1995). Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités anti-apoptotiques sur différents types de cellules telles que: Jurkat (lymphocytes T humains leucémiques), teratocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques (Lee et *al*., 1996; Park et *al*., 1997; Yui et *al*., 2001; Gaidi et *al*., 2002).

**I.3.1** Activités cytotoxique et antitumorale

Les saponines triterpéniques isolées des espèces de la famille des *Araliaceae* ont également présenté des propriétés cytotoxiques sur les cellules cancéreuses. Une nouvelle saponine isolée des écorces des racines d'*Aralia dasyphylla* Miq (*Araliaceae*) par Xiao et *al* en 1999 a montré une activité cytotoxique significative sur les cellules KB et HeLa-$S_3$ avec des valeurs d'$IC_{50}$ de 1,2 μg/ml pour les cellules KB et de 0,002 μg/ml pour les cellules HeLa-$S_3$. Plusieurs travaux sur l'espèce *Panax ginseng* C.A.Meyer (*Araliaceae*) ont mis en évidence les propriétés préventives contre le cancer *in vitro* (Lee et *al*., 1999; Shibata et *al*., 2001; Yun et *al*., 2003). D'autre part, des saponines isolées de cette même plante ont montré des effets antiprolifératifs sur les souches de cellules cancéreuses de la prostate de l'homme (Liu et *al*., 2000). De l'extrait méthanolique de *Trevisia palmata* (*Araliaceae*) des saponines triterpéniques cytotoxiques ont été isolées et testées pour leurs activités antiprolifératives (De Tommasi et *al.*, 2000). Il ressort de ces travaux que toutes montrent une activité cytotoxique modérée de l'ordre de 2,3 à 7,8 $\mu$g/ml.

Les saponines isolées des différentes espèces de *Dracaena* ont présenté diverses activités pharmacologiques dont les plus avérées sont les activités cytotoxiques et

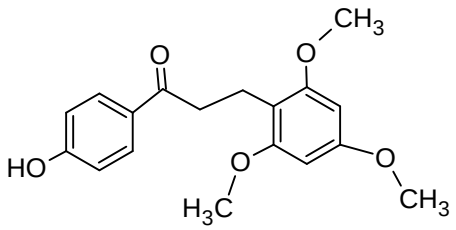
antitumorales. Darias et *al*. (1989), ont pour la première fois, mentionné l'utilisation de *D. draco* comme anticancérigène et reconnu être une riche source de saponines stéroïdiques cytotoxiques. Mimaki et *al.,* en 1999, isolent 09 saponines steroïdiques **61**-**68, 86** dont 05 nouvelles **64**-**68**, des parties aériennes de *D. draco*. L'évaluation de l'activité cytostatique de ces composés sur les cellules promyélocytiques leucémiques HL-60 humaines, a montré une relative activité cytostatique de **61**, **68** avec des valeurs d'$IC_{50}$ de 1,3 et 2,6 $\mu$g/ml respectivement, par rapport à l'étoposide (0,3 $\mu$g/ml) pris comme référence positive. Dans une autre étude, Gonzalez et *al*., (2004) isolent 20 autres saponines stéroïdiques de *D. draco* parmi lesquelles 3 nouvelles dénommées draconines A, B, et C. Plusieurs de ces composés ont montré une forte activité cytotoxique sur les souches de cellules leucémiques HL-60 ($IC_{50}$ de 2,0 à 9,7 $\mu$M). Toujours à partir de *D. draco*, une nouvelle autre saponine stéroïdique, nommé icogénine **92** fut obtenu par Hernandez et *al.* en 2004. Icogénine s'est révélé être un composé cytotoxique sur la ligne des cellules leucémiques HL-60 de la myéloïde avec une $IC_{50}$ 2,6±0,9$\mu$g/ml pendant 72 h, par induction de l'apoptose. Vachalkova et *al.* (1995) ont étudié la cancérogénicité de trois homoisoflavonoïdes et quatre flavonoïdes isolés de la résine de *D. cinnabari* tandis que Al-Fatimi et *al*. (2005) ont pour leur part, étudié la cytotoxicité de la résine de *D. cinnabari* du Yémen contre les cellules ECV-304 de l'homme. Tran et *al*. (2003) ont testé les activités antiprolifératives contre le carcinome des cellules murines 26-L5 du côlon, le fibrosarcome HT-1080 humain, les cellules du mélanome B-16 des saponines du type spirostanol et furostanol issues des racines et des rhizomes de *D. augustifolia*. Trois des composés testés ont montré une forte activité antiproliférative contre les cellules HT-1080 du fibrosarcome ($IC_{50}$ 2,0 à 0,6 $\mu$M).

**I.3.2** Activités analgésique et anti-inflammatoire

Deux saponines triterpéniques nommées cussonosides A et B **21** et **48**, isolées de *Cussonia barteri* possèdent des propriétés sédatives (Dubois et *al.,* 1986), tandis que ceux sur l'espèce *Cussonia bancoensis*, ont conduit à l'obtention de deux nouvelles saponines **51, 52**. Ces composés ont été testés pour leurs effets inhibiteurs de la production de NO sur les cellules stimulées par LPS (cellules Raw 264.7). L'activité antinociceptive *in vivo* et anti-inflammatoire de deux triterpènes, l'acide ursolique et l'acide 23-hydroxyursolique, obtenus ensemble avec les saponines de *C. bancoensis* ont été évaluées (Tapondjou et *al.,* 2003).

Deux nouvelles saponines **79**, **80** furent isolées par Moharram et *al.* (2007) à partir des feuilles de *D. ombet*. À une dose élevée de 30 mg/kg, la fraction riche en saponines de ces feuilles montra des activités analgésiques et anti-inflammatoires significatives tandis qu'à la

même dose aucune activité antiulcéreuse n'a été notée. Liu et *al*. (2004) ont observé que la résine de *D. cochinchinensis* et loureirin B pouvaient réduire les seuils de tension des courants tétrodotoxine sensible (TTX-S) sodiques selon la dose, ce qui expliquerait l'effet analgésique. Plus tard, Liu et *al*. (2005) ont étudié les effets de la résine de sang de dragon et sa composante, loureirin B (**107**) sur la TTX-S et la tétrodotoxine résistante (TTX-R) des courants de soduim dans le ganglion trijumeau (TG) des neurones en utilisant la technique du patch-clamp de la cellule entière et ont constaté que le sang-dragon et loureirin B supprimaient deux types de pics de courants de sodium en fonction de la dose.




**107** Loureirin B.

**I.3.3** Activités antimicrobienne et antivirale

Mothana et Lindequist (2005) ont signalé une activité antimicrobienne des extraits chloroformique et méthanolique de la résine de *Dracaena cinnabari* de l'île de Soqotra contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6059), *Micrococcus flavus* (SBUG 16) et *Escherichia coli* (ATCC 11229). Kumar et *al.* (2006) ont également signalé une activité antimicrobienne des exsudes de la résine rouge de *D. cinnabari* de l'Inde contre *Bacillus pumulis* (ATCC 14884), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617), *Luteus micrococus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Apidermidis aureus* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Streptococcus faecalis* (MTCC 8043), et *Niger Aspergillus* (MTCC 1344). Récemment, Mothana et *al.* (2006) ont également signalé une activité antivirale de l'extrait méthanolique de la résine de *D. cinnabari* contre le virus de l'herpès simplex et le virus de la grippe humaine. Ainsi, la résine de *Dracaena* paraît donc être une source riche d'agents antimicrobiens avec éventuellement de nouveaux mécanismes d'action. Il a été montré que la résine de *D. cochinchinensis* a été produite via l'infection par le *Fusarium* et *Cladosporium* ssp. (Wang et *al*., 1999), ce qui a été confirmé par une autre étude menée par Jiang et *al*., 2003. En effet, l'inoculation de champignons *Fusarium* 9568D dans la branche et le bois de *D. cochinchinensis* a abouti à l'émergence de la résine rouge au point d'inoculation après 4-5 mois

d'incubation. Case et *al.* (2007) ont isolé de *Dracaena augustifolia*, 3 composés caractérisés à l'acide linoléique, ergostérol–5,8-endoperoxide et le E-phytol, à forts potentiels antituberculeux.

**1.3.4** Activités molluscicides

En 1986, les travaux sur l'espèce *Cussonia spicata* ont conduit à l'isolement des saponines possédant des activités molluscicides et spermicides (Gunzinger et *al.*, 1986).

Les travaux de Tapondjou et *al*. (2008) sur l'espèce *D. mannii* ont conduit à l'obtention d'une nouvelle saponine stéroïdique, le manioside A **81** et la pénnogénine **94** isolés par Espeji et *al*.,1982, la floribundasaponine A **82** isolé de *Dioscorea floribunda* par Mahato et *al.*,1981, le spiroconazole A **83** obtenu des pulpes de fruits de *Dracaena mannii* par Okunji et *al*., 1991 et possédant des propriétés molluscicides.

## I.4 METHODES D'ETUDES DES SAPONINES

Le regain d'intérêt pour les plantes médicinales et produits alimentaires combiné à la spectaculaire évolution des outils d'analyse a débouché sur plusieurs publications concernant l'isolement et la caractérisation de nombreuses nouvelles saponines. Des méthodes modernes concernant la séparation et l'analyse des saponines ont été publiées (Marston et *al*., 2000; Muir et *al*., 2000; Schöpke, 2000).

**I.4.1** Extraction et purification

La première indication de la présence de saponines dans les extraits végétaux et/ou fractions brutes de saponines peut être obtenue à l'aide de la pulvérisation de réactifs. Les saponines de type stéroïdique donnent des taches jaunes sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) avec l'anisaldéhyde, vertes avec le réactif de Komarowski qui fait apparaitre en violet les taches liées aux saponines de type triterpénique. Le travail de purification de saponines commence naturellement par l'obtention d'un mélange de saponines brutes. Chaque protocole d'extraction des saponines est à adapter en fonction de la plante à étudier et de sa composition en saponines (stéroïdes ou triterpènes). En règle générale, tout commence par l'extraction de la matière végétale avec un solvant polaire, ou des solvants de polarités croissantes suivant le schéma global d' extraction résumé sur la **Figure 1.**

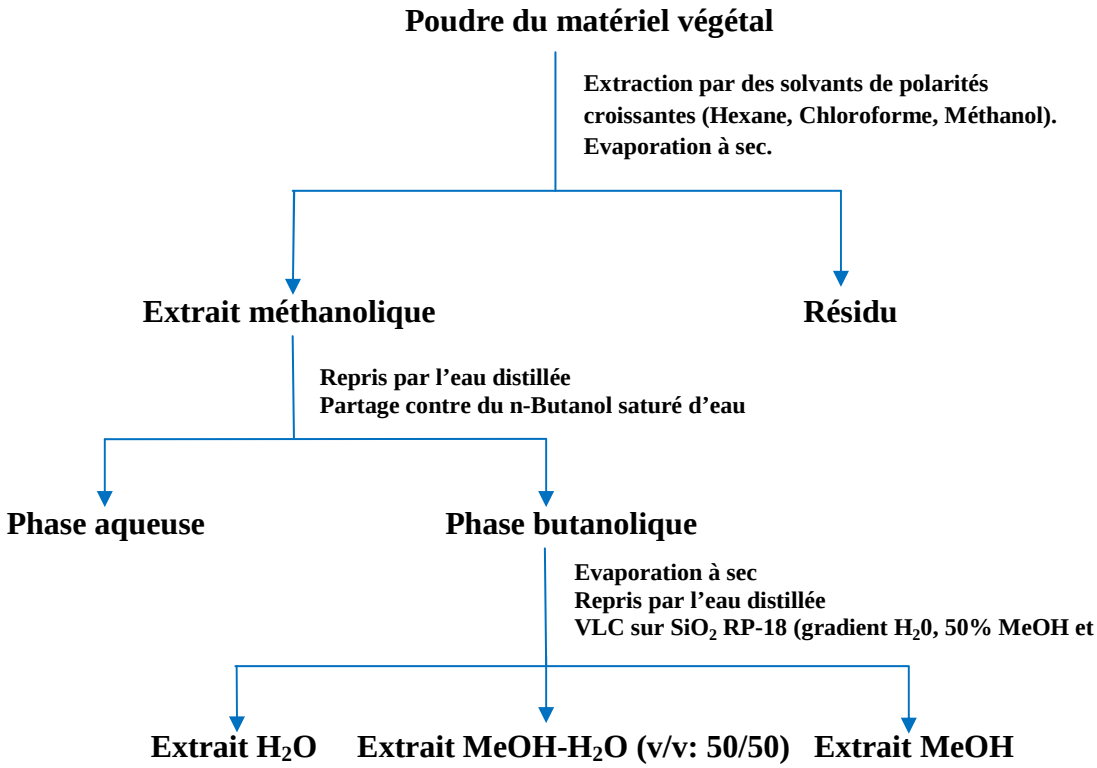



**Figure 1.** Schéma d'extraction des saponines à partir des racines d'une plante.

### I.4.2 Les techniques physico-chimiques

#### **I.4.2.1** Les techniques chromatographiques

La séparation d'un mélange de saponines en différents composants est une tâche difficile qui nécessite l'application combinée de plusieurs techniques chromatographiques. La chromatographie sur couche mince (TLC) et la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) sont souvent utilisées pour les analyses qualitatives de routine (Mangle and Jolly, 1998). La purification qui est ensuite réalisée, peut impliquer la chromatographie liquide à pression atmosphérique sur une colonne de gel de silice (CC), la chromatographie Flash, la chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) ou la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) qui est devenue la technique la plus puissante et la plus couramment employée. Dans la plupart des cas, certaines de ces étapes doivent être répétées avec un changement de support ou d'éluant afin d'atteindre un niveau de pureté élevé. Trois types de support sont souvent utilisés, notamment la silice en phase normale, la silice en phase inverse (RP-18) et le gel de Sephadex LH-20. Des solvants variés mettent en jeu la plupart du temps des mélanges de chloroforme-méthanol-eau sur silice normale, des mélanges méthanol-eau sur silice en phase inverse et des mélanges acétonitrile-eau en HPLC.

**I.4.1.2** Détermination structurale

La détermination structurale des saponines se déroule généralement en deux étapes : premièrement une analyse chimique préliminaire par l'intermédiaire d'hydrolyses acides et alcalines fortes et/ou douces, permettant d'obtenir des informations sur la nature de l'aglycone et des sucres. Puis des méthodes spectroscopiques (spectrométrie de masse et spectroscopie de RMN mono et bidimensionnelle) permettent d'attribuer la structure complète du composé.

- **Méthodes spectroscopiques**

Différentes méthodes physico-chimiques et instrumentales parmi lesquelles les méthodes spectroscopiques et la spectrométrie de masse sont employées la procédure d'établissement de la structure de nouvelles sapogénines stéroïdiens et des saponines.

❖ **La spectrométrie de masse**

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place de choix grâce à ses caractéristiques: sensibilité, limite de détection ou variété des applications (analyses chimiques quantitatives et qualitatives, biomédecine, réactions ions-molécules, etc.). A l'origine la spectrométrie de masse servait à détecter et séparer les différents isotopes d'un élément. Elle est maintenant utilisée pour élucider la structure d'une substance. Elle peut être combinée à d'autres méthodes telles que la chromatographie gazeuse ou chromatographie liquide.

- ***Description d'un spectromètre de masse***

C'est un appareil dans lequel des ions sont produits à partir d'un échantillon, séparés selon leur rapport masse/charge, puis détectés par un détecteur et enfin exprimés en fonction de leur abondance relative. Le schéma 6 montre de façon schématique les principales parties d'un spectromètre de masse.

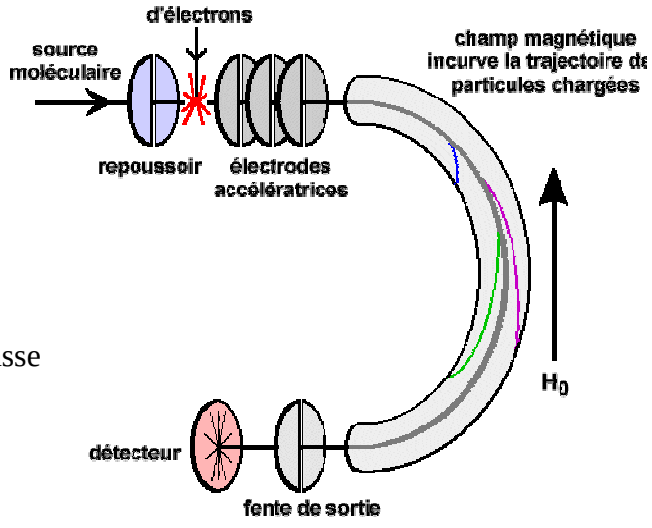



**Schéma 6 :** Structure d'un spectromètre de masse

- ***Techniques utilisées et étapes dans l'obtention d'un spectre de masse***

Préparation et introduction de l'échantillon

Le composé doit être à l'état de vapeur; ce qui est donc idéal pour les gaz et les liquides, dont la tension de vapeur est assez grande. Le gaz est introduit dans la chambre d'ionisation par un tube muni d'une "fuite". La pression dans le réservoir est **~$10^{-2}$** torr et à la source de **$10^{-6}$ à $10^{-8}$** torr. Si le composé est un liquide ou un solide volatil, l'injection est directe mais le composé doit est chauffé pour être vaporisé; le chauffage du composé doit être surveillé pour éviter la pyrolyse.

- ***Les différents modes d'ionisation***

Les principales méthodes d'ionisation sont l'impact électronique (IE), l'ionisation chimique et le *Fast Atom bombardment* (FAB) ou Bombardement par atomes rapides.

✓ **ESI-MS**

L'électrospray (électronébullation) est produit par application d'un fort champ électrique à pression atmosphérique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (couramment entre 1-10 $\mu$l/min). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 KV entre le capillaire et la contre-électrode, séparés de 0,3 à 2 cm. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, située à l'extrémité de capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées (De Hoffmann et *al*., 1994)

✓ **FAB-MS**

Dans cette méthode, un faisceau d'atomes neutres comme le Xénon ou l'Argon est dirigé sur un solide provoquant sa désorption et son ionisation. Ce type d'ionisation donne peu de fragments mais un ion moléculaire intense. Il est surtout utilisé pour l'analyse des molécules de poids moléculaire élevé. Dans cette technique, l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$, on parle alors de mode positif ($FAB^+$) ou l'ion correspondant au poids moléculaire moins un proton $[M–H]^-$, on parle alors de mode négatif ($FAB^-$). D'autres ions adduits peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient dans ce cas $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium (on obtient $[M+K]^+$).

❖ **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

L'application des techniques de RMN 1D ($^1H$ et $^{13}C$) et 2D (COSY, HSQC, TOCSY, HMBC, NOESY et/ou ROESY) permet de réaliser une élucidation structurale fiable des saponines et d'assigner complètement tous les carbones et protons de la molécule.

### ✓ Spectroscopie de RMN monodimensionnelle ($^{1}$H et $^{13}$C)

Généralement, les spectres RMN $^{1}$H montre clairement la présence les protons anomériques (4.3–6.9 ppm) dans la pyridine, ainsi que les doublets des méthyles des déoxy-6-hexoses (1,4–1,8 ppm). Les valeurs élevées des constantes de couplage ($J$ > 7,0 Hz) observé pour les protons anomère de D-glucose, D-galactose et D-xylose est caractéristique pour la configuration $\beta$ tandis que les petites valeurs ($J$ = 1–1,5 Hz) observées pour le L-rhamnose suggère la configuration $\alpha$. L'analyse du spectre RMN $^{13}$C rend les choses encore plus simples. Les carbones anomériques résonnent dans une région bien distincte du spectre (90–112 ppm). Cela permet d'avoir une estimation du nombre de sucre présents dans la molécule. La configuration de l'anomère du L-rhamnose pourrait être également confirmée à partir des déplacements chimiques des carbones C-3 et C-5. Pour le $\beta$-L-rhamnopyranoside ces charbons résonnent à 75,4 et 73,5 ppm, tandis que pour le $\alpha$-L-rhamnopyranoside, on les observe à 72,5 et 69,4 ppm, respectivement (Agrawal et *al*., 1985; Sang et *al*., 1999). L'absorption dans les champs faibles (170–176 ppm) révèle la présence d'un groupe carboxylique appartenant à l'acide glucuronique.

### ✓ RMN Bidimensionnelle Homonucléaire

#### - COSY (Correlated SpectroscopY)

Les spectres COSY mettent en évidence les couplages directs (géminal et vicinal) des protons d'un même système de spins. Ce sont des couplages scalaires $^{2}J_{H,\,H}$ et $^{3}J_{H,\,H}$ (**Figure 2**). Cette méthode peut permettre de retrouver l'enchaînement des protons dans un squelette de la molécule et donc sa nature. Cette expérience permet de connaître les déplacements chimiques des protons osidiques et l'ordre de grandeur des constantes de couplage interprotoné (Gunther, 1996; Massiot et *al*., 1995).

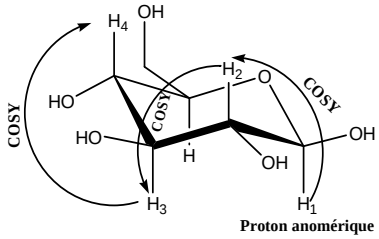



**Figure 2:** Corrélations COSY

#### - TOCSY (TOtal Corrélation SpectroscopY)

A partir d'un spectre TOCSY, un « Réseau-J » peut être établi, où un « Réseau-J » est défini comme un groupe de protons qui sont reliés en série par un couplage scalaire. Par exemple, tous les protons d'une seule unité de saccharide appartiennent à un même « Réseau-

J » (Agrawal, 1992). Un système de spin peut donc être identifié, s'il y a au moins une résonance dans le système de spin, comme le proton anomère qui est bien isolée et qui a un grand couplage avec ses spins voisins (**Figure 3**). De façon plus pratique, pour un sucre, il suffit d'observer une résonance pour identifier les autres protons de cette unité osidique. Pour les désoxy-6-hexoses, leurs méthyles caractéristiques servent souvent de point de départ.

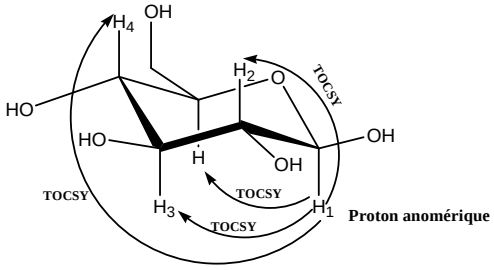



**Figure 3:** Corrélations TOCSY

- **NOESY** (**Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY**)

L'expérience NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) met en évidence la proximité des protons. Les signaux de corrélation sont observés dans un spectre NOESY entre les paires de protons qui sont proches dans l'espace. En général, on observe des corrélations 1,3-diaxiales et équatoriale-axiales entre les paires de protons distants de moins 4.5 Å (Figure 4).

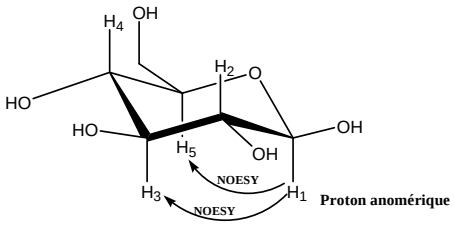



**Figure 4:** Corrélations NOESY

Si le NOESY intramoléculaire est un des outils importants dans l'attribution des signaux d'un résidu saccharidique, le NOESY intermoléculaire est essentiellement utilisé pour déterminer la séquence des sucres et leurs points de jonction. Lorsqu'on observe une corrélation NOESY entre le proton anomère d'un sucre et un proton appartenant à un autre sucre, ces deux protons définissent la liaison entre les deux sucres. Les corrélations NOE sont les plus souvent observées entre le proton anomère et le proton relié à l'atome de carbone de la liaison avec l'aglycone (**Figure 5**).

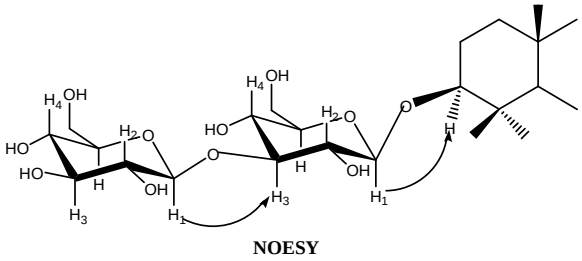



**Figure 5:** Corrélations NOESY entre le sucre et l'aglycone

✓ **RMN Bidimensionnelle Hétéronucléaire**

- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)**

Cette méthode permet d'observer des corrélations $^{3}J_{C,H}$ entre, soit le proton anomère d'un sucre et un carbone d'un autre, soit entre le proton anomère d'un sucre et un carbone de l'aglycone, et vis versa. Elle permet ainsi à identifier les liaisons entre les sucres, donc leur séquence et le point de fixation de cette séquence sur l'aglycone (**Figure 6**).

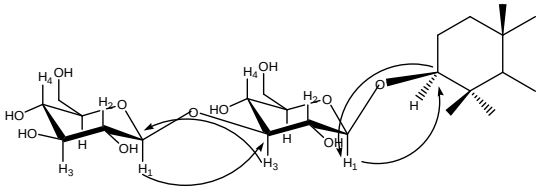


**Figure 6:** Corrélations HMBC

- **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)**

Les séquences de pulses permettent d'observer le couplage direct $^{1}J$ entre un proton $^{1}H$ et le carbone $^{13}C$ qui le porte. Les taches de corrélations apparaissent à l'intersection des déplacements chimiques des $^{13}C$ et des $^{1}H$ qui sont directement liés les uns aux autres. Cette expérience permet à partir du spectre proton, d'attribuer sans doute la majorité des carbones protonés de la saponine (Figure 7)

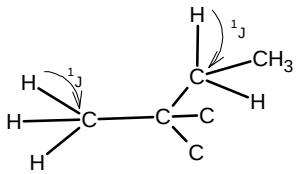


**Figure 7:** Corrélations $^{1}H$-$^{13}C$ ($^{1}J$)

- **Configuration absolue des sucres.**

La configuration absolue D ou L des sucres peut être déterminée par chromatographie en phase gazeuse de dérivés chiraux des sucres issus de l'hydrolysat acide par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux observés pour les dérivés d'échantillons témoins (Hara et *al*., 1987). Une méthode de détermination des configurations absolues des sucres consiste en la détermination du pouvoir rotatoire de ceux-ci après hydrolyse de la molécule et la séparation par CCM préparatives des sucres. Dans ce cas, il faut des quantités importantes de saponines. Cependant, généralement la configuration absolue L pour le rhamnose et arabinose, D pour le glucose, le xylose, le fucose et le quinovose est admise puisqu'il s'agit des sucres les plus fréquemment rencontrés dans la nature (Haddad et *al*., 2003).

- **Détermination de la position des substituants**

La position d'un substituant, par exemple un groupe acyle dans un glycoside ou sur un aglycone ne peut pas être déterminée par les méthodes COSY ou TOCSY. La présence de tel substituant modifie considérablement les déplacements chimiques des protons et carbone du résidu glycosidique auquel il est attaché.

- **Localisation de groupement acyle**

La présence d'un groupement acyle sur un sucre induit des variations des valeurs de déplacements chimiques du sucre en question. Les déplacements chimiques associés à une telle modification sont appelés Déplacements-Induits par Acylation (AIS, acylation-Induced Shifts) (Agrawal, 1992). Dans le spectre RMN $^{1}$H, le proton carbinyle (proton géminal au groupement acyloxy) apparait dans les champs très faibles (4,9–6,0 ppm) avec une multiplicité caractéristique dépendant du mode de couplage. Leur différenciation avec les protons anomère est souvent simple. Ils apparaissent généralement comme un triplet ou un triplet diffuse en fonction des constantes de couplage avec les protons vicinaux, alors que les protons anomère apparaissent comme des doublets ayant des constantes de couplage caractéristiques. Une exception à ce comportement se trouve sur les dérivés 6-*O*-acylé, dans lesquels les protons H-6, dans la plupart des cas, se chevauchent avec d'autres protons du sucre. L'acylation du groupe hydroxyle alcoolique (le carbone C-6 du sucre) provoque un déblindage de l'ordre de 0,6–3,5 ppm du carbone α (le carbone C-6 du sucre) et un blindage de l'ordre de 1,2–4,0 ppm de la résonance du carbone adjacent (le carbone β, le carbone C-5 du sucre) (Terui et *al*., 1976; Dorman et *al*., 1975; Agrawal and Pathak, 1996).

### ➢ Localisation du groupement sulfate

La position d'un groupement sulfate sur un glycoside sulfaté peut être déterminée puisque la présence du groupe sulfate influence les déplacements chimiques des carbones et protons. Le groupement sulfate provoque le déblindage des protons vicinaux et géminaux. Le déblindage de ces protons dépend de la nature du groupe hydroxyle mis en cause. Les protons méthylènes ($C\underline{H_2}OSO_3H$) voient leur résonance augmenter de 0,4–0,5 ppm, alors que le proton méthine ($C\underline{H}\ OSO_3H$) voit son déplacement augmenter considérablement de 0,7–0,9 ppm. Dans le spectre RMN $^{13}C$, la présence d'un groupe sulfate provoque un déblindage prononcé du carbone α de l'ordre de 6-11 ppm pendant que le carbone β se trouve plutôt blindé (Sung and Adam, 1991; Kostova et *al*., 2002; Sanchez-Contreras et *al.*, 1998; 2000; Sasmakov et *al*., 2003; Shaker et *al*., 2000).

Dans une démarche simple, basée sur les méthodes spectroscopiques décrites ci-dessus, il sera question dans la deuxième partie de cette thèse, d'expliquer la détermination des structures des composés obtenus au cours de ce travail.

# *CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS*

## II.1. TRAVAUX CHIMIQUES

### II.1 *Cussonia arborea* Hochst. **(Publication N° 1)**

#### II.1.1 *Extraction et isolement des saponines*

- **A partir des écorces**

L'écorce séchée et finement pulvérisée de *C. arborea* (1,0 kg) a été macérée avec du MeOH (5 L) pendant 48 h. Après évaporation du solvant sous vide, un résidu noir de 140 g a été obtenu. Un échantillon de 13 g de cet extrait au MeOH a été soumis à un VLC sur RP-18 de gel de silice en utilisant $H_2O$ (3 x 100 ml), MeOH / $H_2O$ (1:1, 3 x 100 ml) et enfin le MeOH (200 mL). La partie soluble dans le MeOH est évaporée à sec pour donner une poudre jaunâtre (7,6 g). Une partie (2,5 g) est alors soumise au processus de purification qui est basé essentiellement sur la chromatographie flash, la MPLC et la chromatographie sur colonne classique à pression atmosphérique. Ce processus a abouti à l'obtention de sept composés (**108** − **114**) dont cinq nouveaux (**108**−**112**)

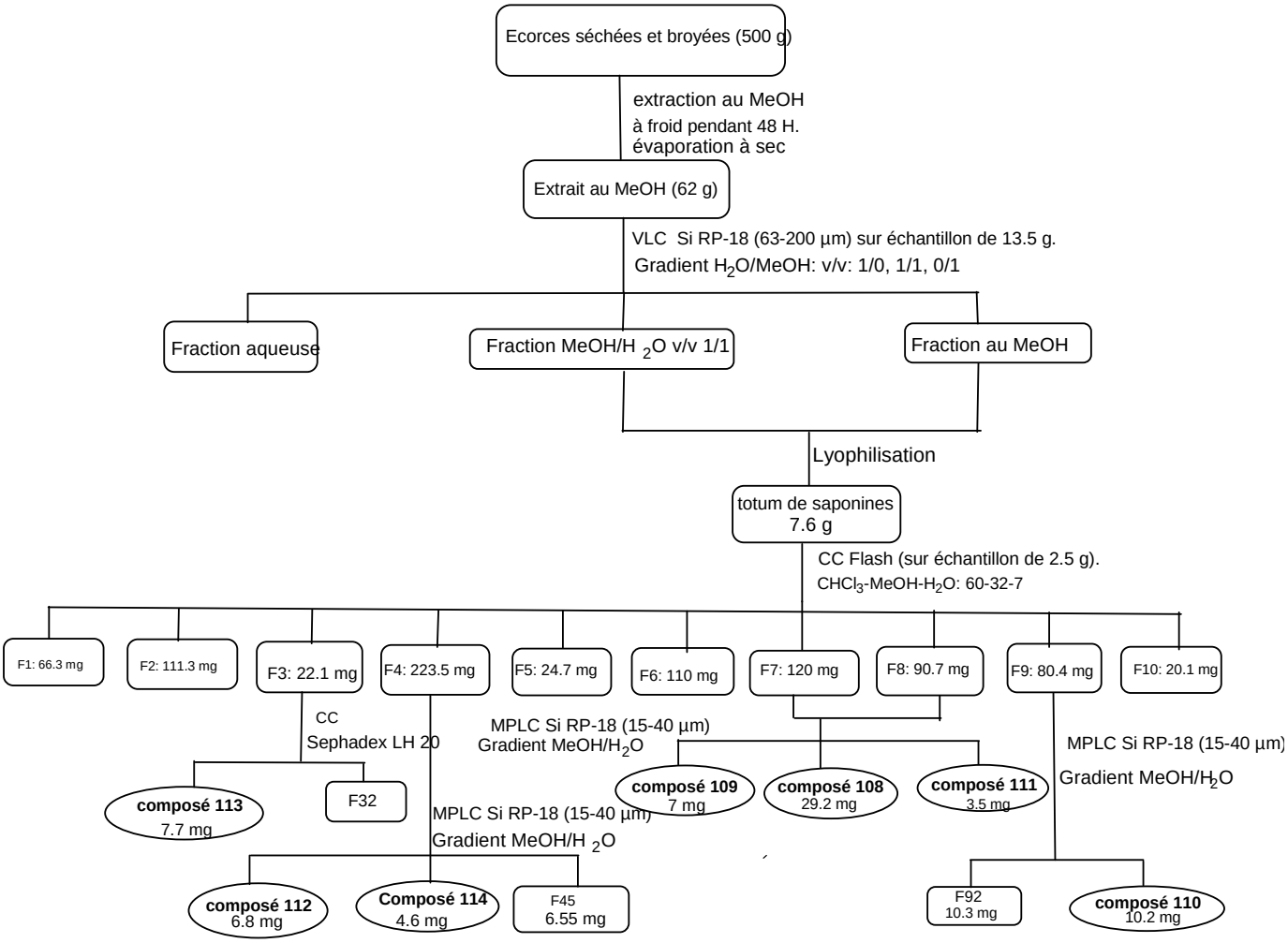



**Figure 8:** Schéma d'extraction et de purification d'extrait d'écorces de *C. arborea*

- **A partir des feuilles**

L'extrait éthanolique des feuilles de *Cussonia arborea*, récoltée au Cameroun, a été évaporé à sec et partitionné entre le *n*-BuOH et $H_2O$, fournissant ainsi un totum Brut de saponines. Un échantillon de 2,5 g de ce mélange, fractionné par chromatographie liquide sous vide (VLC), a fourni huit fractions. Les travaux de purification par chromatographie sur colonne moyenne pression sur silice en phase normale et en phase inversée RP-18 ont conduit à l'isolement de 10 saponines (**115**-**126**) dont sept sont nouvelles (**115**-**121**).

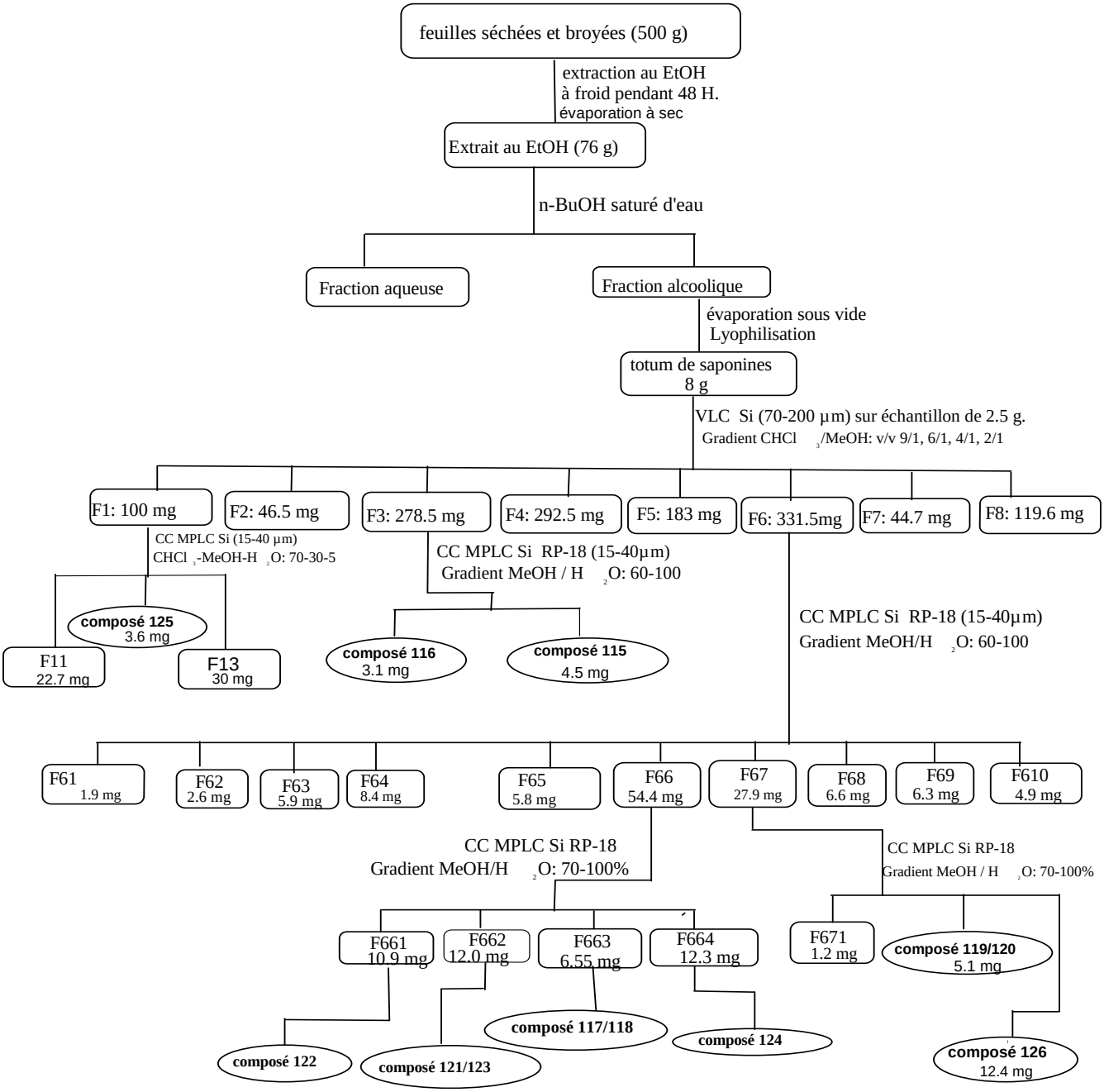



**Figure 9:** Schéma d'extraction et de purification d'extrait des feuilles de *C. arborea*

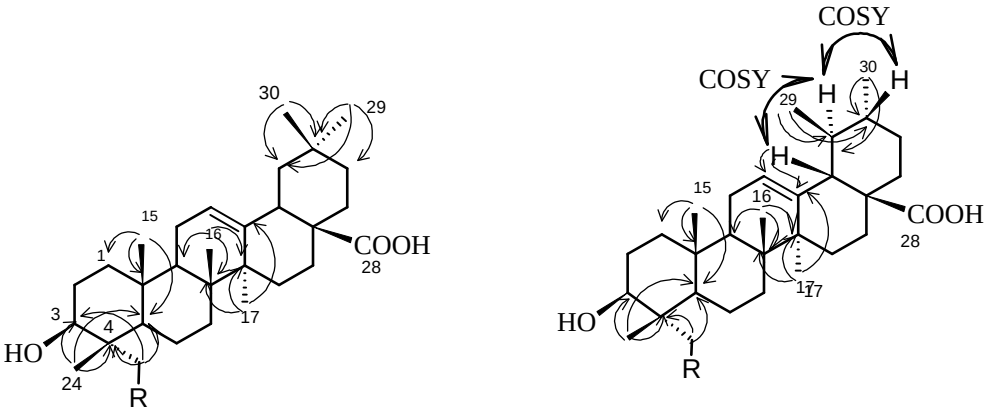
**II.1.2** Elucidation structurale

Celle-ci repose sur la caractérisation de la génine, des sucres et leur séquence à l'aide des méthodes de spectroscopie de RMN 1D et 2D et de spectrométrie de masse.

- Nature des génines des composés **108** – **126**.

L'analyse des spectres RMN-1D et 2D et $^{13}C$, en particulier l'étude des corrélations observées sur les spectres HSQC, HMBC et COSY comparée avec les données de la littérature a permis d'identifier les génines des composés (Tableau 10). Ces génines sont des triterpènes pentacycliques du type oléanane et ursane.

L'oléanane et l'ursane ont une structure moléculaire semblable mais différent par le positionnement des groupes méthyles sur le cycle E. si l'un des groupes méthyles en position 20 de l'oléanane migre en position 19, on obtient l'ursane. Les génines ont été identifiées à l'acide oléanolique, l'hédéragénine, qui diffère de l'acide oléanolique par la substitution de l'un des hydrogènes du méthyle en 23 par un hydroxyle et leurs isomères l'acide urs-12-èn-28-oïque et l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oïque, respectivement (Figure 10).




R = H: acide oléanolique
R = OH: hédéragénine

R = H: acide ursolique
R = OH: acide 23-hydroxyursolique

**Figure 10**: Structures et corrélations HMBC et COSY observées sur les spectres RMN 2D des génines.

| Génine | Composés | Références |
|---|---|---|
| Acide oléanolique | **110, 111, 112, 114,115, 119, 124, 125, 126**. | Abe et *al.*, 2002<br>Seebacher et *al*., 2003 |
| Acide urs-12-èn-28-oïque | **112** | Tapondjou et *al*., 2003<br>Grishkovets et *al*., 2005 |
| Hédéragénine | **108**, **116**, **117**, **122**, **123** | Jhoo et *al*., 2001 |
| Acide 23-hydroxy urs-12-èn-28-oïque | **109, 113, 118, 121** | Tapondjou et *al*., 2003<br>Grishkovets et *al*., 2005 |

**Tableau 10:** Nature des génines des composés **108** – **126**

- Nature des sucres

Les composés **108** – **126** ont été isolés sous de poudres amorphes blanches. L'analyse du spectre COSY $^{1}$H-$^{1}$H, complétée par celle du TOCSY, HMBC et NOESY à partir de chaque anomère permet d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques a permis de caractériser chaque composé. Les configurations absolues des sucres ont été déterminées à D pour le glucose, le xylose, le fucose et L pour arabinose, rhamnose par analyse CPG de dérivés chiraux des sucres dans l'hydrolysat de chaque composé (voir la section expérimentale). Dans les spectres RMN $^{1}$H des composés, les relatives grandes valeurs des constantes de couplage $^{3}J_{\text{H-1, H-2}}$ des protons anomériques (entre 7,0 et 8,3 Hz) ont indiqué une orientation β pour le glucose, le xylose, le fucose et une orientation α pour l'arabinose. Le singulet large du signal du proton anomérique du rhamnose a indiqué une orientation α.

**II.1.1.3** Elucidation structurale des composés (**108** – **114**) isolés des écorces.

**II.1.1.3.1** Composé **108**

➢ *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé B permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1103 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1104 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{88}O_{23}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 957 $[(M–H)–146]^-$, 633 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 471 $[(M–H)–146–162–162–162]^-$ correspondant à la perte d'un deoxyhexose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses, et d'un deoxyhexose et de trois hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'hédéragénine (voir tableau 10, p.45)

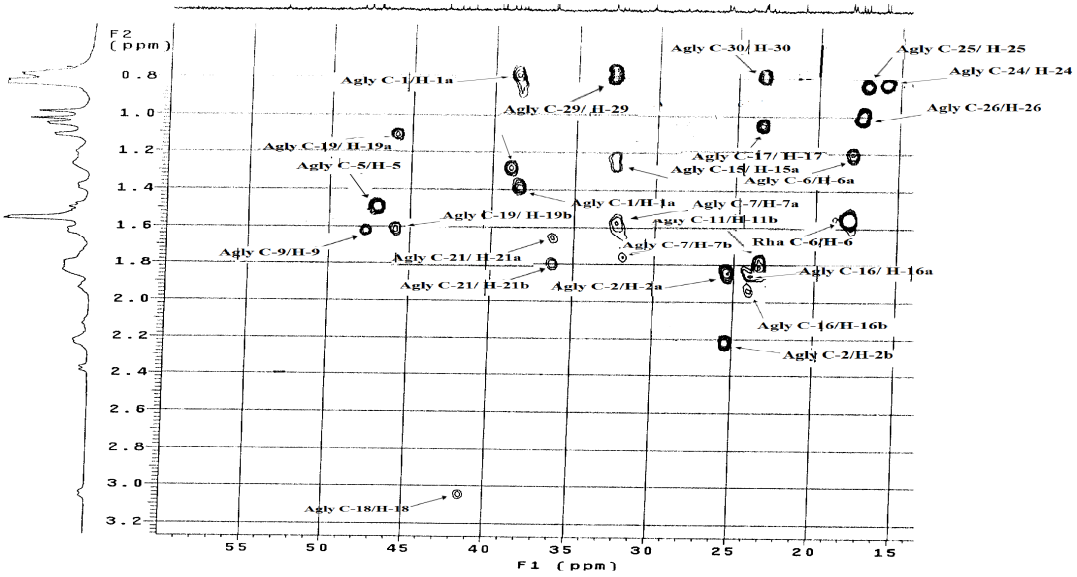



**Figure 11 :** Spectre HSQC de la partie aglycone du composé 108

➢ *Spectroscopie RMN*

- *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1$H permet de distinguer dans la zone des sucres quatres signaux attribuables aux protons anomériques dont trois résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz); 5,04 (d, $J$ = 8,3 Hz); 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,60 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec quatre carbones anomériques résonnant $\delta_C$ 104,0; 105,1; 95,0 et 102,1; respectivement.

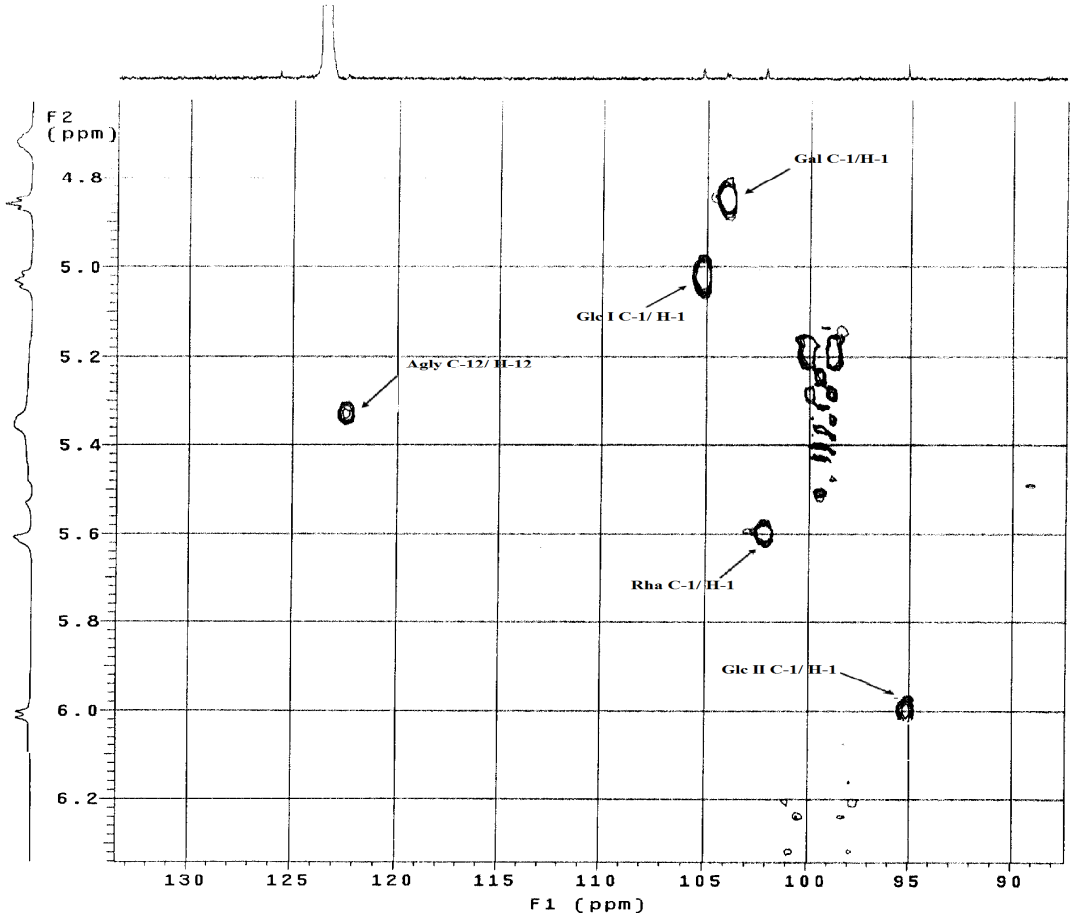



**Figure 12:** Spectre HSQC de la zone des anomères du composé **108**.

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D (TOCSY, COSY, HSQC, HMBC) a permis d'identifier la nature des sucres et de caractériser :

- Deux $\beta$-glucopyranosyl dont les protons anomériques résonnent à $\delta_H$ 5,04 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc I) et $\delta_H$ 6.00 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc II).
- Un $\beta$-galactopyranosyl (Gal) dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz).
- Un α-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique à $\delta_H$ 5,60 ppm (s l).

- *Séquençage osidique en C-3.*

Sur le spectre HMBC, on observe des taches de corrélations entre :

- le signal du proton anomérique à $\delta_H$ 5,60 (Rha H-1) et le carbone à $\delta_C$ 78,1 (Glc I C-4).
- Le proton anomérique à $\delta_H$ 5,04 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc I H-1) et le carbone $\delta_C$ 82,1 correspondant au C-3 de l'aglycone.

Ces données nous permettent de conclure que le Glc I est lié à l'aglycone en position 3, que le Rha est lié au Glc I par une liaison (1→4), d'où la séquence de la chaîne osidique en C-3, si l'on tient compte de la configuration D et L pour Glc et Rha: $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl.

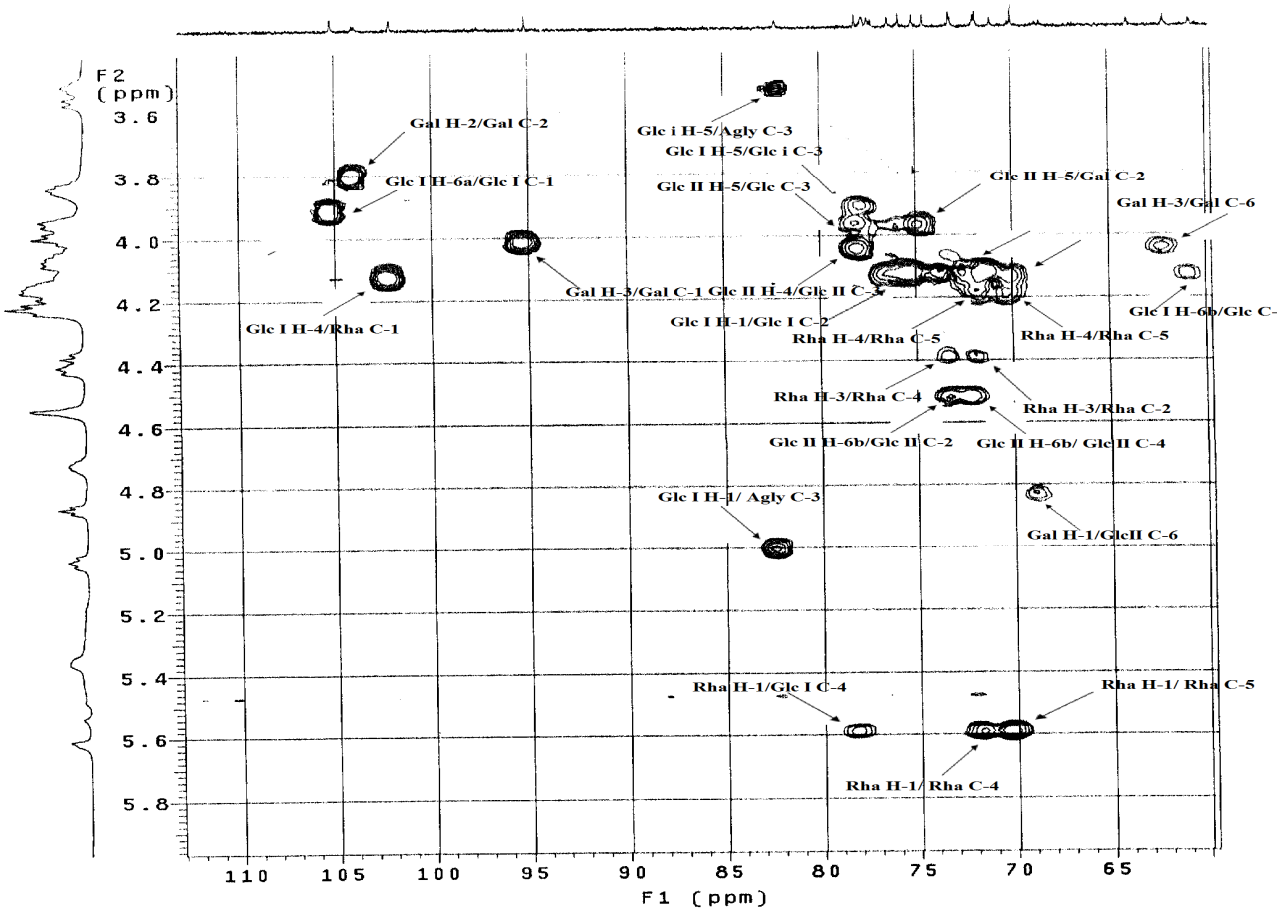



**Figure 13:** Spectre HMBC de la partie osidique du composé **108**

Cette information est confirmée par l'observation des taches de corrélation sur le spectre NOESY entre les signaux des protons à $\delta_H$ 5,60 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,16 (Glc I H-4), entre $\delta_H$ 5,04 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc I H-1) et $\delta_H$ 4,13 (Agly H-3).

- *Séquençage osidique en C-28*

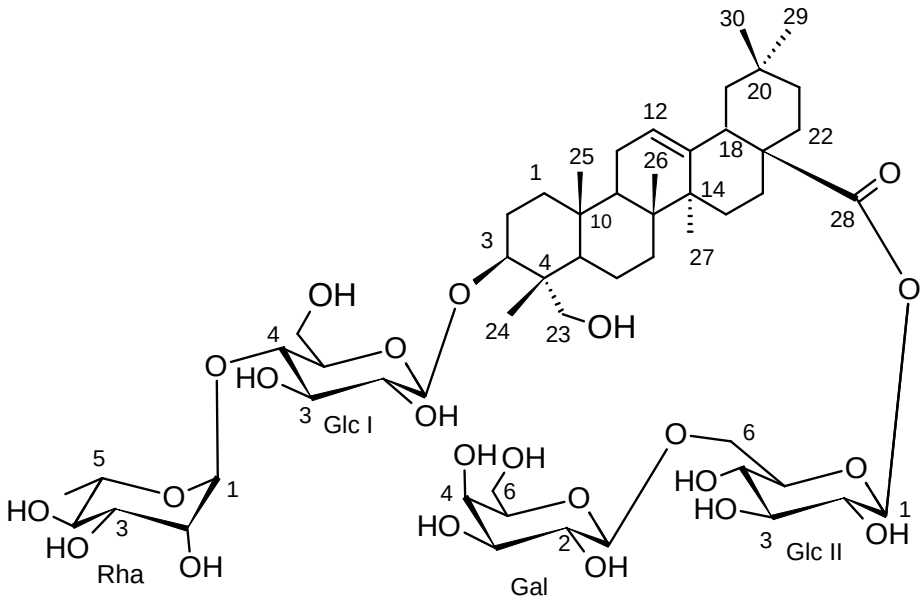
L'analyse du spectre HMBC a permis le séquençage des deux autres unités de sucres restants. C'est ainsi qu'on a observé d'autres taches de corrélations entre:

- Le proton anomérique à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz Gal H-1) et le carbone à $\delta_C$ 68,6 (Glc II C-6).

- Le proton anomérique à $\delta_H$ 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz Glc II H-1) et le carbone à $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28). Ceci montre que le Gal est lié au Glc II par une liaison (1→6), confirmé par la corrélation entre le proton à $\delta_H$ 4.84 (d, $J$ = 7,8 Hz Gal H-1) et le proton à 4,54 (Glc II H-6a) et que le Glc II est lié à l'aglycone en position 28 par une liaison ester. On peut donc conclure que la chaîne osidique en C-28 est le $\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl.

➢ ***Conclusion***

Au vu des données exposées précédemment, le composé **108** a été élucidé à 3-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosylhédéragénine-28-*O*-$\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl ester, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside A**.




**<u>108</u> : arboréaside A (Kougan et *al*., 2009)**

**Tableau 11**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **108**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38.3 | 0,84, 1,38 |
| 2 | 25,6 | 1,82, 2,22 |
| 3 | 82,1 | 4,13 m |
| 4 | 41,2 | - |
| 5 | 46,9 | 1,50 |
| 6 | 17,7 | 1,20, 1,55 |
| 7 | 32,1 | 1,66, 1,76 |
| 8 | 39,9 | - |
| 9 | 47,6 | 1,62 |
| 10 | 36,4 | - |
| 11 | 23,3 | 0,80, 1,82 |
| 12 | 122,6 | 5,35 s l |
| 13 | 143,8 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 32,4 | 1,22, 1,58 |
| 16 | 24,1 | 1,84, 1,94 |
| 17 | 48,0 | - |
| 18 | 41,7 | 3,05 Br, d (13,0) |
| 19 | 45,8 | 1,12, 1,62 |
| 20 | 30,2 | - |
| 21 | 36,2 | 1,63, 1,80 |
| 22 | 32,6 | 1,12, 1,56 |
| 23 | 63,5 | 3,56 d (11,2), 4,16 |
| 24 | 13,2 | 0,84 s |
| 25 | 15,7 | 0,83 s |
| 26 | 17,1 | 0,99 s |
| 27 | 25,6 | 1,12 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,6 | 0,82 s |
| 30 | 23,2 | 0,79 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 105,1 | 5,04 d (8,3) |
| 2 | 75,7 | 3,97 |
| 3 | 77,6 | 4,20 |
| 4 | 78,1 | 4,16 |
| 5 | 77,4 | 3,85 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,07 |
| Rha | | |
| 1 | 102,0 | 5,60 s l |
| 2 | 71,7 | 4,54 m |
| 3 | 71,8 | 4,42m |
| 4 | 73,1 | 4,21 |
| 5 | 69,8 | 4,72 |
| 6 | 17,9 | 1,56 d (5,9) |
| 28-O-Glc II | | |
| 1 | 95,0 | 6,00 d (8,0) |
| 2 | 73,1 | 4,03 |
| 3 | 77,6 | 4,16 |
| 4 | 70,9 | 4,07 |
| 5 | 77,4 | 3,98 |
| 6 | 68,6 | 4,21, 4,54 |
| Gal | | |
| 1 | 104,0 | 4,84 d (7,8) |
| 2 | 74,4 | 3,83 |
| 3 | 75,7 | 4,00 |
| 4 | 70,0 | 4,18 s |
| 5 | 76,5 | 3,50 m |
| 6 | 62,0 | 4,21, 4,35 |

### II.1.1.3.2 Composé 109

- *Spectrométrie de masse*

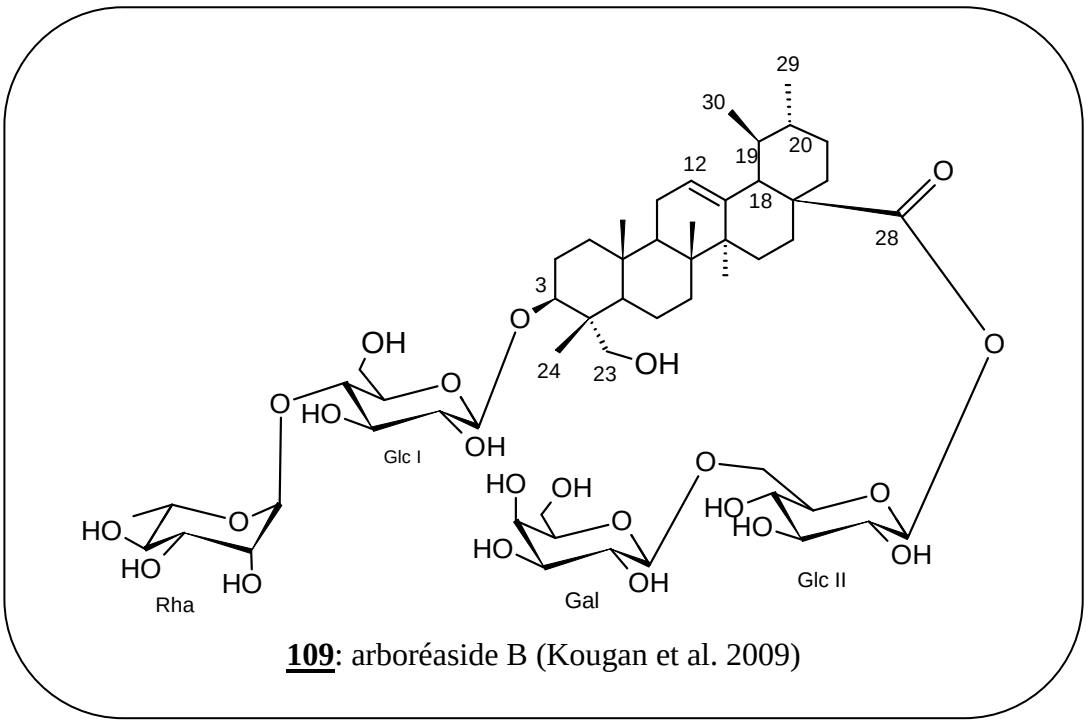
L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **109** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1103 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1104 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{88}O_{23}$. D'autres ions fragments ont été observés à *m/z* 957 $[(M–H)–146]^-$, 633 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 471 $[(M–H)–146–162–162–162]^-$ correspondant à la perte d'un deoxyhexose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses, et d'un deoxyhexose et de trois hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone.

- **Spectroscopie RMN**
  - Nature de la génine.

La comparaison des données de RMN 1D et 2D et $^{13}C$ du composé **109** avec celle du composé **108** a montré qu'ils diffèrent seulement par la partie aglycone. À savoir, une paire de signaux de carbones oléfiniques à $\delta_C$ 125,6 (C-12) et $\delta_C$ 138,0 (C-13), un signal de carbone tertiaire à $\delta_C$ 52,8 (C-18) a été observé dans **109** au lieu de 41,2. Des carbones à $\delta_C$ 122,6 (C-12), $\delta_C$ 143,8 (C-13) et $\delta_C$ 41,7 (C-18) dans les spectres $^{13}C$ et HSQC du composé **108**. En outre, on a observé deux signaux de carbones tertiaires sur le spectre RMN $^{13}C$ à $\delta_C$ 39,0 (C-19) et $\delta_C$ 38,7 (C-20), montrant des corrélations HSQC avec les signaux RMN à $\delta_H$ 1.29 (d, $J$ = 4,1 Hz, H-19) et $\delta_H$ 0.79 (l d, H-20), respectivement et une corrélation COSY entre ces deux protons sont en accord avec un squelette du type ursane. De plus, une corrélation à longue distance sur le spectre HMBC entre le signal à $\delta_H$ 2,38 (d, $J$ = 10,7 Hz, H-18) et les carbones à $\delta_C$ 125,6 (C-12); 138,0 (C-13); 48,0 (C-17); 39,0 (C-19) a confirmé le squelette proposé. Ainsi, la structure de l'aglycone du composé **109** a été identifiée comme étant l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique (Tapondjou et *al*., 2003; Grishkovets et *al.*, 2005).

- Conclusion

Le composé **109** a été élucidé au 3-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-*O*-$\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside B** (Kougan et *al*., 2009).




**109**: arboréaside B (Kougan et al. 2009)

**Tableau 12:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **109.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,4 | 0,84, 1,38 |
| 2 | 25,6 | 1,82, 2,22 |
| 3 | 82,1 | 4,13 m |
| 4 | 42,2 | - |
| 5 | 47,7 | 1,54 |
| 6 | 17,9 | 1,22, 1,52 |
| 7 | 32,1 | 1,66, 1,76 |
| 8 | 39,5 | - |
| 9 | 47,7 | 1,62 |
| 10 | 36,5 | - |
| 11 | 23,4 | 0,80, 1,82 |
| 12 | 125,7 | 5,34 s l |
| 13 | 138,1 | - |
| 14 | 42,2 | - |
| 15 | 32,4 | 1,22, 1,58 |
| 16 | 24,2 | 1,84, 1,94 |
| 17 | 48,1 | - |
| 18 | 52,9 | 2,38 d (10,7) |
| 19 | 39,0 | 1,29 m |
| 20 | 38,7 | 0,79 m |
| 21 | 36,4 | 1,66, 1,80 |
| 22 | 33,6 | [b] |
| 23 | 64,0 | 3,58 d (11,0), 4,18 |
| 24 | 13,2 | 0,88 s |
| 25 | 15,8 | 0,84 s |
| 26 | 17,2 | 1,01 s |
| 27 | 23,3 | 1,04 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 17,0 | 0,84 |
| 30 | 20,9 | 0,81 d (5,7) |

[b] : non déterminé

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 105,1 | 5,04 d (8,3) |
| 2 | 75,7 | 3,97 |
| 3 | 77,6 | 4,20 |
| 4 | 78,1 | 4,16 |
| 5 | 77,4 | 3,85 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,07 |
| Rha | | |
| 1 | 102,0 | 5,60 s l |
| 2 | 71,7 | 4,54 m |
| 3 | 71,8 | 4,42m |
| 4 | 73,1 | 4,21 |
| 5 | 69,8 | 4,72 |
| 6 | 17,9 | 1,56 d (5,9) |
| 3-O-Glc II | | |
| 1 | 95,0 | 6,00 d (8,0) |
| 2 | 73,1 | 4,03 |
| 3 | 77,6 | 4,16 |
| 4 | 70,9 | 4,07 |
| 5 | 77,4 | 3,98 |
| 6 | 68,6 | 4,21, 4,54 |
| Gal | | |
| 1 | 104,0 | 4,84 d (7,8) |
| 2 | 74,4 | 3,83 |
| 3 | 75,7 | 4,00 |
| 4 | 70,0 | 4,18 s |
| 5 | 76,5 | 3,50 m |
| 6 | 62,0 | 4,21 |
| | | 4,35 |

**II.1.1.3.3** Composé **110**

➢ *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **110** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1351 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1352 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{64}H_{104}O_{30}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 779 $[(M–H)–162–132–132–146)]^-$, 455 $[(M–H)–162–132–132–146–162–162]^-$ correspondant à la perte d'un deoxyhexose, d'un hexose et de deux pentoses et d'un deoxyhexose, de trois hexoses et de deux pentoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

➢ *Spectroscopie RMN*

• *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres six signaux attribuables aux protons anomériques dont cinq résonnent sous forme de doublets à $\delta_H$ 4,88 (d, $J$ = 7,6 Hz), $\delta_H$ 4,96 (d, $J$ = 4,2 Hz), $\delta_H$ 5,12 (d, $J$ = 7,1 Hz), $\delta_H$ 5,13 (d, $J$ = 7,1 Hz), $\delta_H$ 6,09 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,65 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec six carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,0; 103,8; 103,0, 106,2; 95,2 et 102,2 respectivement.

L'analyse détaillée des spectres COSY $^1H$-$^1H$, TOCSY, HMBC, et NOESY à partir de chaque proton anomère permet d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin ainsi que des déplacements ont permis de caractériser:

- Un α-glucopyranosyl (Glc I) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 4,96 (d, $J$ = 4,2 Hz, Glc I H-1)
- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc II et Glc III) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 5,12 (d, $J$ = 7,1 Hz, Glc II H-1) et à $\delta_H$ 6,09 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc III H-1).
- Un $\beta$-xylopyranosyl (Xyl) dont le proton résonne à $\delta_H$ 5,13 (d, $J$ = 7,1 Hz, Xyl H-1).
- Un α-rhamnopyranosyl (Rha) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,65 ppm.
- Un α-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,88 (d, $J$ = 7,6 Hz, Ara H-1).

• *Séquençage osidique en C-3*

L'ordre des chaînes oligosaccharidiques du composé **110** a été réalisé par des expériences de NOESY et HMBC. Les corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,12 (d, $J$ = 7,1 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 84,0 (Xyl C-3),
- $\delta_H$ 5,13 (d, $J$ = 7,1, Xyl H-1) et $\delta_C$ 79,2 (Glc I C-2),
- $\delta_H$ 4,96 (d, $J$ = 4,2; GlcI H-1) et $\delta_C$ 88,9 (Agly C-3)

a prouvé la séquence oligosaccharidique en C-3 comme étant $\beta$-D-glucopyranosyl-(1→3)-$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-D-glucopyranosyl. Cette séquence a été confirmée par des taches de corrélations sur le spectre NOESY entre les protons à $\delta_H$ 5,12 (Glc II H-1) et $\delta_H$ 3,99 (Xyl H-3) et entre $\delta_H$ 4,46 (Glc I, H-2) et $\delta_H$ 5,13 (Xyl H-1), $\delta_H$ 4,96 (Glc I H-1) et $\delta_H$ 3,11 (Agly H-3).

- *Séquençage osidique en C-28*

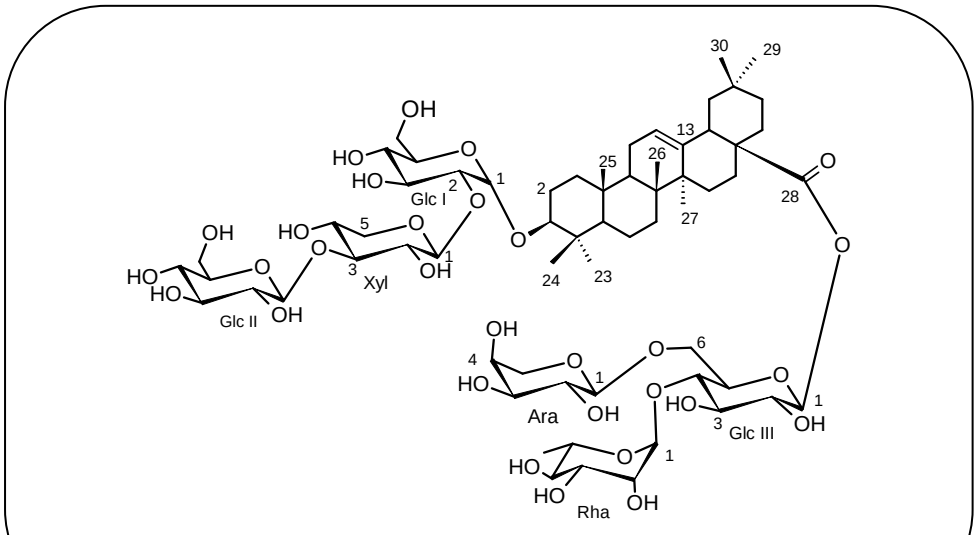
D'autres corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,65 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Glc III C-4)
- $\delta_H$ 4,88 (d, $J$ = 7,6 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 68,5 (Glc III C-6)
- $\delta_H$ 6,09 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc III H-1) et $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28),

ont permis de caractériser la séquence en C-28 d'être [$\alpha$-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-$\beta$-D-glucopyranosyl. Celle-ci a été confirmée par une corrélation inverse observée sur le spectre HMBC entre le proton à $\delta_H$ 4,23 (Glc III H-6b) et le carbone à $\delta_C$ 104,0 (Ara C-1) et par les corrélations sur le spectre NOESY entre $\delta_H$ 4,88 (Ara H-1) et $\delta_H$ 4,56 (Glc III H-6a) et entre $\delta_H$ 5,65 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,17 (Glc III, H-4).

- *Conclusion*

Au vue de ce qui précède la structure du composé **110** a été élucidée à 3-*O*-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→3)-$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-D-glucopyranosyl-acide oléanolique 28-*O*-[$\alpha$-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-$\beta$-D-glucopyranoside, nouveau composé naturel dénommé **arboréaside C** (Kougan et *al.*, 2009).




**<u>110</u>**: **arboréaside C** (Kougan et *al.*, 2009)

**Tableau 13:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **110**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,4 | 0,76, 1,38 |
| 2 | 25,9 | 1,74, 1,89 |
| 3 | 88,9 | 3,11[a] |
| 4 | 39,1 | - |
| 5 | 55,4 | 0,63 m |
| 6 | 18,2 | 1,15, 1,33 |
| 7 | 32,8 | 1,24, 1,36 |
| 8 | 39,5 | - |
| 9 | 47,6 | 1,49 m |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 23,3 | 1,09, 1,80 |
| 12 | 123,3 | 5,34 s l |
| 13 | 143,8 | - |
| 14 | 41.8 | - |
| 15 | 27,8 | 1,15, 2,19 |
| 16 | 23,0 | 1,94, 2,00 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,3 | 3,09 |
| 19 | 45,9 | 1,15, 1,66 |
| 20 | 30,3 | - |
| 21 | 33,6 | 1,01, 1,24 |
| 22 | 32,1 | 1,63, 1,80 |
| 23 | 27,8 | 1,09 s |
| 24 | 16,4 | 0,92 s |
| 25 | 15,2 | 0,76 s |
| 26 | 17,1 | 0,98 s |
| 27 | 25,7 | 1,15 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,8 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0,81 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 103,8 | 4,96 d (4,2) |
| 2 | 79,2 | 4,46 |
| 3 | 77,1 | 4,13 m |
| 4 | 70,0 | 4,24 |
| 5 | 77,8 | 3,85 |
| 6 | 62,0 | 4,27 , 4,42 |
| Xyl | | |
| 1 | 106,2 | 5,13 d (7,1) |
| 2 | 75,9 | 4,00 |
| 3 | 84,0 | 3,99 |
| 4 | 71,2 | 4,09 |
| 5 | 66,8 | 3,65 t (10,9), 4,36 |
| | | |
| Glc II | | |
| 1 | 103,0 | 5,12 d (7,1) |
| 2 | 75,3 | 3,97 m |
| 3 | 76,2 | 4,00 |
| 4 | 70,7 | 4,04 |
| 5 | 77,4 | 3,68 m |
| 6 | 60,7 | 3,97, 4,07 |
| 28-O-Glc III | | |
| 1 | 95,2 | 6,09 d (8,0) |
| 2 | 73,2 | 4,05 |
| 3 | 77,8 | 4,23 |
| 4 | 78,1 | 4,17 m |
| 5 | 77,4 | 3,98 |
| 6 | 68,5 | 4,23, 4,56 |
| Ara | | |
| 1 | 104,0 | 4,88 d (7,6) |
| 2 | 74,6 | 3,83 |
| 3 | 75,9 | 4,02 |
| 4 | 70,2 | 4,20 |
| 5 | 64,0 | 3,82 ld (8,3), 4,23[a] |
| Rha | | |
| 1 | 102,2 | 5,65 s l |
| 2 | 71,8 | 4,56 |
| 3 | 72,0 | 4,42 |
| 4 | 73,2 | 4,23 |
| 5 | 69,9 | 4,76 m |
| 6 | 17,9 | 1,58 d (6,1) |

### II.1.1.3.4 Composé 111

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **111** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1219 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1220 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{64}H_{104}O_{30}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 749 $[(M–H)–162–162–146]^-$, 455 $[(M–H)–162–162–146–132–162]^-$ correspondant à la perte d'un deoxyhexose et de deux hexoses et d'un deoxyhexose, de trois hexoses et d'un pentose respectivement. Le pic observé à *m/z* 455 correspond au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres cinq signaux attribuables aux protons anomériques dont quatre résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 6,4 Hz ), 4,90 (d, $J$ = 7,8 Hz), 5,10 (d, $J$ =7,6 Hz), 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,66 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec cinq carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,4; 104,0; 105,0; 95,2 et 102,2; respectivement. L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier des sucres. Ainsi, l'évaluation des constantes de couplages spin-spin et les déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Un $\beta$-galactopyranosyl (Gal) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 4,90 (d, $J$ = 7,8 Hz)
- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I et Glc II) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 5,10 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc I H-1) et à $\delta_H$ 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc II H-1).
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,66 ppm (s l).
- Un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,90 (d, $J$ = 7,8 Hz).

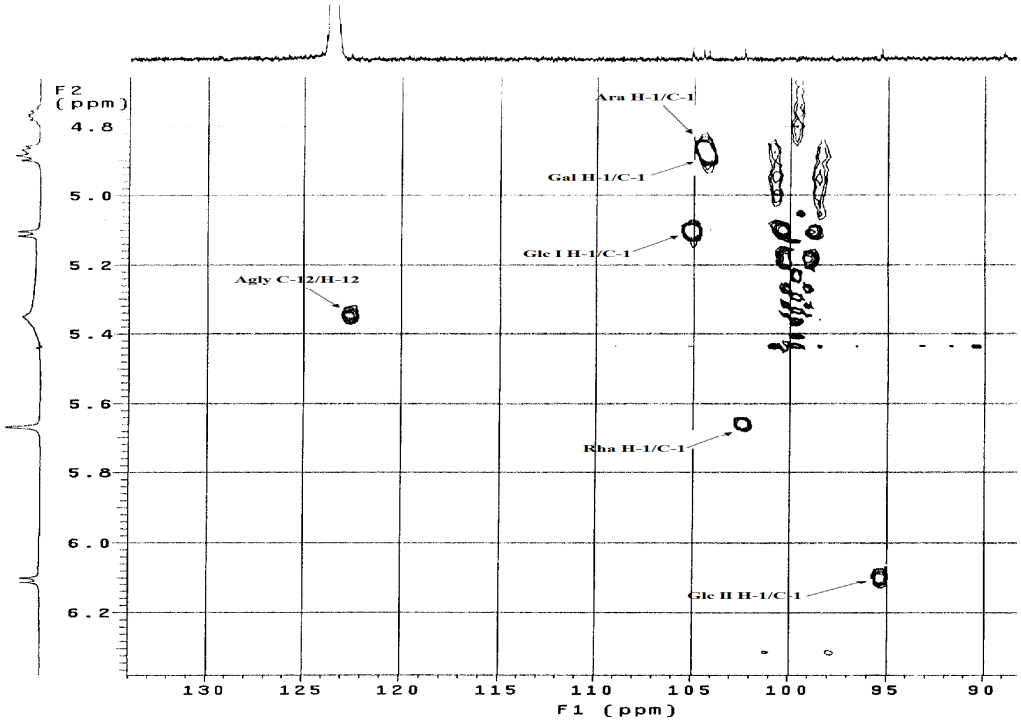



**Figure 14:** Spectre HSQC de la zone des anomère du composé **111**

- *Séquençage osidique en C-3*

Les corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,66 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Ara C-4),
- entre $\delta_H$ 5,10 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc I H-1) et $\delta_C$ 79,7 (Ara C-2),
- finalement entre $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 6,4 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 88,8 (Agly C-3),

ont suggéré la séquence en C-3 comme étant [$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-[$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)]-$\alpha$-L-arabinopyranosyl, confirmée par des corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,66 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,21 (Ara H-4), entre $\delta_H$ 5,10 (Glc I H-1) et $\delta_H$ 4,52 (Ara H-2) et entre $\delta_H$ 4,86 (Ara H-1) et $\delta_H$ 3,14 (Agly H-3).

- *Séquençage en C-28*

Les corrélations HMBC entre $\delta_H$ 4,90 (d, $J$ = 7,8 Hz, Gal H-1) et $\delta_C$ 68,6 (Glc II C-6), entre $\delta_H$ 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc II H-1) et $\delta_H$ 176,5 (Agly C-28) et les corrélations NOESY entre $\delta_H$ 4,90 (Gal H-1) et $\delta_H$ 4,24 (Glc II H-6a) ont permis d'établir la séquence des sucres en C-28 comme étant $\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl.

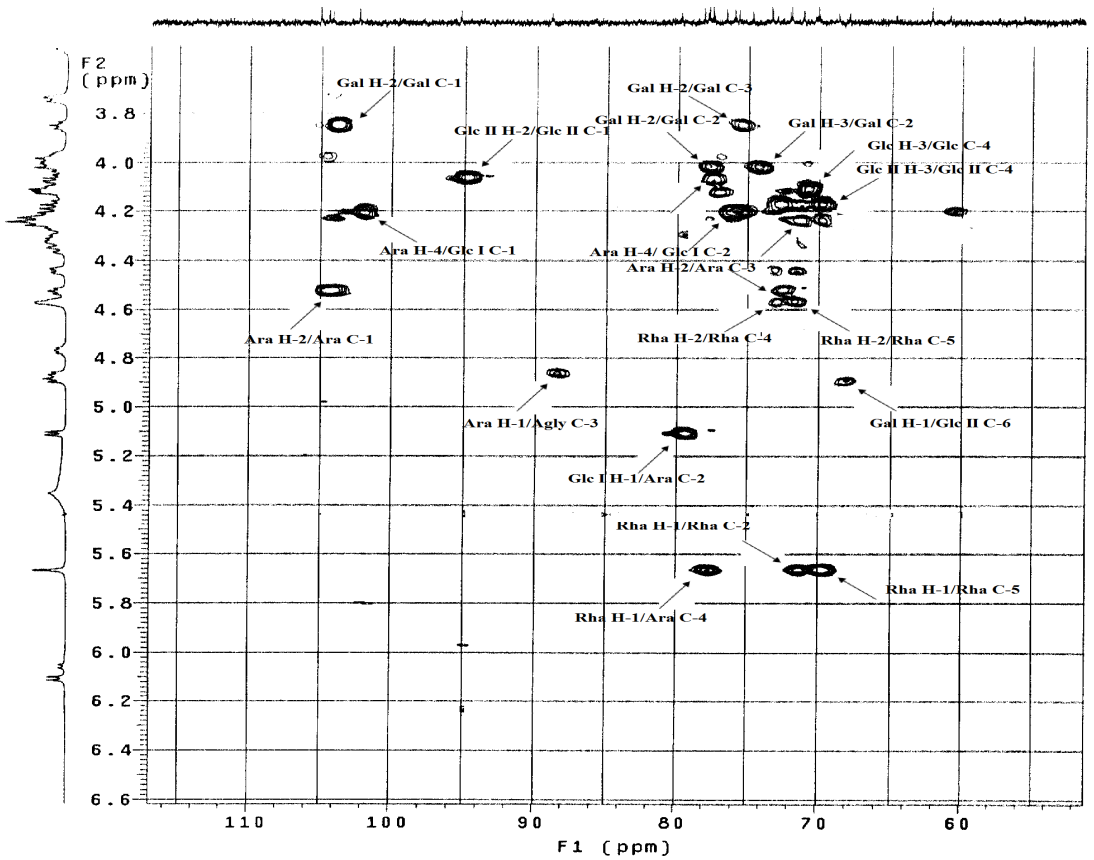
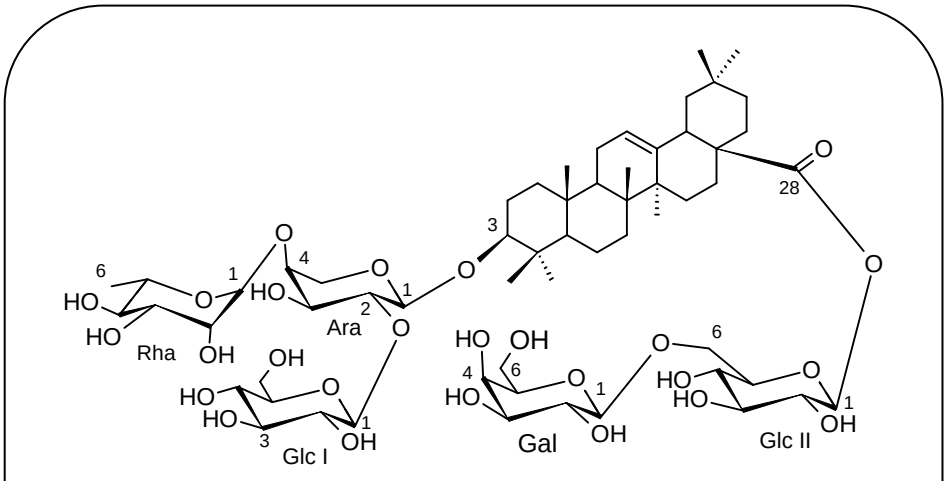



**Figure 15:** Spectre HMBC de la partie osidique du composé **111**

➢ *Conclusion*

Au vue de ce qui précède la structure du composé **111** a été élucidée au de 3-*O*-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-[$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)]-$\alpha$-L-arabinopyranosyl-acide oléanolique 28-*O*-$\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside D** (Kougan et *al*., 2009).




**<u>111</u>**: **arboréaside D** (Kougan et *al*., 2009).

**Tableau 14:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **111.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,4 | 0,82, 1,42 |
| 2 | 26,5 | 1,78, 1,98 |
| 3 | 88,8 | 3,14 m |
| 4 | 39,5 | - |
| 5 | 55,5 | 0,64 d (11,9) |
| 6 | 18,2 | 1,16, 1,34 |
| 8 | 39,5 | - |
| 9 | 47,7 | 1,52 m |
| 10 | 36,9 | - |
| 11 | 23,5 | 1,10, 1,82 |
| 12 | 123,1 | 5,35 s l |
| 13 | 143,8 | - |
| 14 | 42,0 | - |
| 15 | 27,9 | 1,14, 2,19 |
| 16 | 23,0 | [b], 1.82 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,8 | 3,09 |
| 19 | 45,9 | 1,16, 1,64 |
| 20 | 30,4 | - |
| 21 | 33,8 | 1,24, [b] |
| 22 | 32,1 | 1,66, 1,79 |
| 23 | 27,9 | 1,14 s |
| 24 | 16,4 | 0,96 s |
| 25 | 15,2 | 0,78 s |
| 26 | 17,1 | 1,00 s |
| 27 | 25,7 | 1,16 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,8 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0.81 s |

[b] : non determiné

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| Ara | | |
| 1 | 104,4 | 4,86 d (6,4) |
| 2 | 79,7 | 4,52 t (6,6) |
| 3 | 73,0 | 4,29 |
| 4 | 78,1 | 4,21 |
| 5 | 64,6 | 3,75 ld (9,7), 4,22 |
| Glc I | | |
| 1 | 105,0 | 5,10 d (7,6) |
| 2 | 75,6 | 3,98 m |
| 3 | 77,5 | 4,11 |
| 4 | 71,0 | 4,12 |
| 5 | 77,7 | 3,73 |
| 6 | 60,9 | 3,98, 4,10 |
| Rha | | |
| 1 | 102,2 | 5,66 s l |
| 2 | 71,9 | 4,56 m |
| 3 | 72,0 | 4,44 m |
| 4 | 73,8 | 4,24 |
| 5 | 70,0 | 4,76 m |
| 6 | 17,9 | 1,60 d (6,1) |
| Glc II | | |
| 1 | 95,2 | 6,10 d (8,0) |
| 2 | 73,3 | 4,06 t (8,0) |
| 3 | 77,5 | 4,19 |
| 4 | 70,5 | 4,24 |
| 5 | 77,5 | 4,00 |
| 6 | 68,6 | 4,24, 4,56 |
| Gal | | |
| 1 | 104,0 | 4,90 d (7,8) |
| 2 | 74,6 | 3,85 t (8,5) |
| 3 | 75,9 | 4,02 |
| 4 | 67,8 | 4,32 |
| 5 | 76,8 | 3,53 |
| 6 | 62,0 | 4,25, 4,34 |

### II.1.1.3.5 Composé 112

➢ *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **112** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1087 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1088 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{88}O_{22}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 925 $[(M–H)–162]^-$, 617 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 455 $[(M–H)–146–162–162–162)]^-$ correspondant à la perte d'un hexose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses, et d'un deoxyhexose et de trois hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique.

➢ *Spectroscopie RMN.*

- *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres quatre signaux attribuables aux protons anomériques dont trois résonnent sous forme de doublets à $\delta_H$ 4,82 (*d*, *J* = 8,0 Hz), 4,88 (d, *J* = 7,8 Hz), 6,09 (d, *J* = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5.64 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec quatre carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 106,1; 104,2; 95,1 et 102,2, respectivement.

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin ainsi que des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Un *β*-galactopyranosyl (Gal) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 6,09 (d, *J* = 8,0 Hz)
- Deux *β*-glucopyranosyl (Glc I et Glc II) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 4,82 (d, *J* = 8,0 Hz, Glc I) et à $\delta_H$ 4,88 (d, *J* = 7,8 Hz, Glc II).
- Un *α*-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique à $\delta_H$ 5,64 ppm (s l).

- *Séquençage osidique en C-3.*

La substitution d'Agly C-3 par le Glc terminal a été suggérée par des corrélations HMBC entre $\delta_H$ 4,82 (d, *J* = 8,0 Hz, Glc I H-1) et $\delta_C$ 88,8 (Agly C-3). Elle a été confirmée par l'observation d'une corrélation NOESY entre $\delta_H$ 4,82 (Glc I H-1) et $\delta_H$ 3,31 (Agly H-3).

- *Séquençage en C-28*

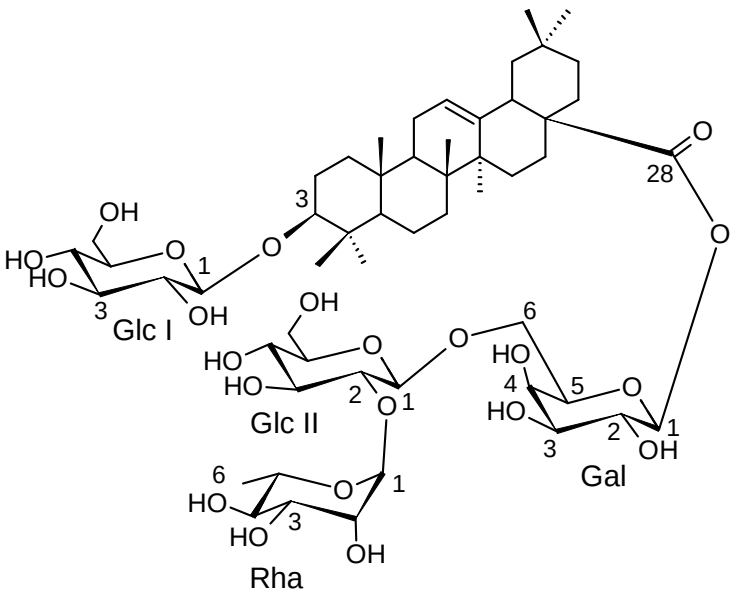
Les corrélations HMBC entre:

- $\delta_H$ 5,64 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Glc II C-2),
- $\delta_H$ 4,88 (d, *J* = 7,8 Hz, Glc I H-1) et $\delta_C$ 68,5 (Gal C-6), finalement entre $\delta_H$ 6,09 (d, *J* = 8,0 Hz, Gal H-1) et $\delta_C$ 176,1 (Agly C-28),

ont suggéré la séquence oligosaccharidique à C-28 comme étant *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-galactopyranosyl.

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **112** a été élucidé comme étant 3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-acide oléanolique 28-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-galactopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside E** (Kougan et *al.*, 2009).




**<u>112</u>** : **arboréaside E** (Kougan et al. 2009)

**Tableau 15:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **112**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,45 |
| 2 | 26,9 | [b], 1,82 |
| 3 | 88,8 | 3,31 |
| 4 | 39,5 | - |
| 5 | 55,5 | 0,68 |
| 6 | 18,2 | 1,26, 1,34 |
| 7 | 33,6 | 1,20, [b] |
| 8 | 39,5 | - |
| 9 | 48,1 | 1,62 m |
| 10 | 36,4 | - |
| 11 | 23,4 | 1,82, 1,84 |
| 12 | 122,5 | 5,35 brs |
| 13 | 143,5 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,9 | 1,20, 2,19 |
| 16 | 27,9 | 1,20, 2,19 |
| 17 | 23,0 | [b] |
| 18 | 46,7 | - |
| 19 | 41,3 | 3,08 br d (13,1) |
| 20 | 45,9 | 1,14, 1,62 |
| 21 | 30,3 | - |
| 22 | 32,4 | 1,26, 1,50 |
| 23 | 32,1 | 1,66, 1,79 |
| 24 | 27,9 | 1,22 s |
| 25 | 16,7 | 0,92 s |
| 26 | 15,7 | 0,88 s |
| 27 | 17,2 | 1,02 s |
| 28 | 25,7 | 1,16 s |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0,82 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-*β*-*D*-Glc I | | |
| 1 | 106,1 | 4,82 d (8,0) |
| 2 | 75,6 | 3,96 m |
| 3 | 77,6 | 4,21 |
| 4 | 70,2 | 4,21 |
| 5 | 77,5 | 3,99 |
| 6 | 60,8 | 3,95, 4,06 |
| 28-O- Gal | | |
| 1 | 95,1 | 6,09 d (8,0) |
| 2 | 72,9 | 4,06 m |
| 3 | 75,9 | 4,00 |
| 4 | 70,0 | 4,74 m |
| 5 | 76,6 | 3,42 |
| 6 | 68,5 | 4,22, 4,55 |
| Glc II | | |
| 1 | 104,2 | 4,88 d (7,8) |
| 2 | 78,1 | 4,18 |
| 3 | 77,6 | 4,20 |
| 4 | 72,0 | 4,42 s |
| 5 | 76,8 | 3,52 |
| 6 | 62,5 | 4,25 m, 4,46 m |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,64 s l |
| 2 | 72,0 | 4,55 m |
| 3 | 72,9 | 4,06 m |
| 4 | 73,2 | 4,04 m |
| 5 | 69,6 | 4,74 m |
| 6 | 18,0 | 1,58 d (5,9) |

### II.1.1.3.6 Composé 113

- *Spectrométrie de Masse*

Le spectre de masse du composé **113** en source FAB (mode négatif) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 941 $[M–H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 942 u.m.a en accord avec la formule $C_{48}H_{78}O_{18}$. D'autres pics des ion-fragments ont été observés à *m/z* 795 $[(M–H)–146]^-$, 633 $[(M–H)–146–162]^-$, 471 $[(M–H)–146–162–162]^-$ correspondant à la perte d'un deoxyhexose, d'un deoxyhexose et d'un hexose, et d'un deoxyhexose et de deux hexoses respectivement. L'ion à 471 correspond à l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN.*

  - *Nature des sucres*

Sur le spectre RMN $^1H$ du composé **113**, on observe la présence de trois protons anomériques résonnant à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7.8 Hz), 5,60 (s l), 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz). Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec trois carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,0; 102,0; 95,1; respectivement. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques a permis de caractériser :

- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I et Glc II) dont les protons anomériques résonnent à $\delta_H$ 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz) et $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz), respectivement.
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 5,60 ppm (s l).

Le signal du carbone à $\delta_C$ 73,0 (Agly C-3) qui montre une corrélation sur le spectre HSQC avec le proton à $\delta_H$ 4.01 ppm permet de conclure que qu'il n'ya pas de liaison osidique en C-3 et par conséquent prouve que le composé **113** est une saponine monodesmosidique avec une chaîne de sucres en position 28.

  - *Séquençage osidique en C-28*

L'analyse du spectre HMBC a permis le séquençage des trois unités de sucres. On a observé des taches de corrélation sur le spectre HMBC entre :

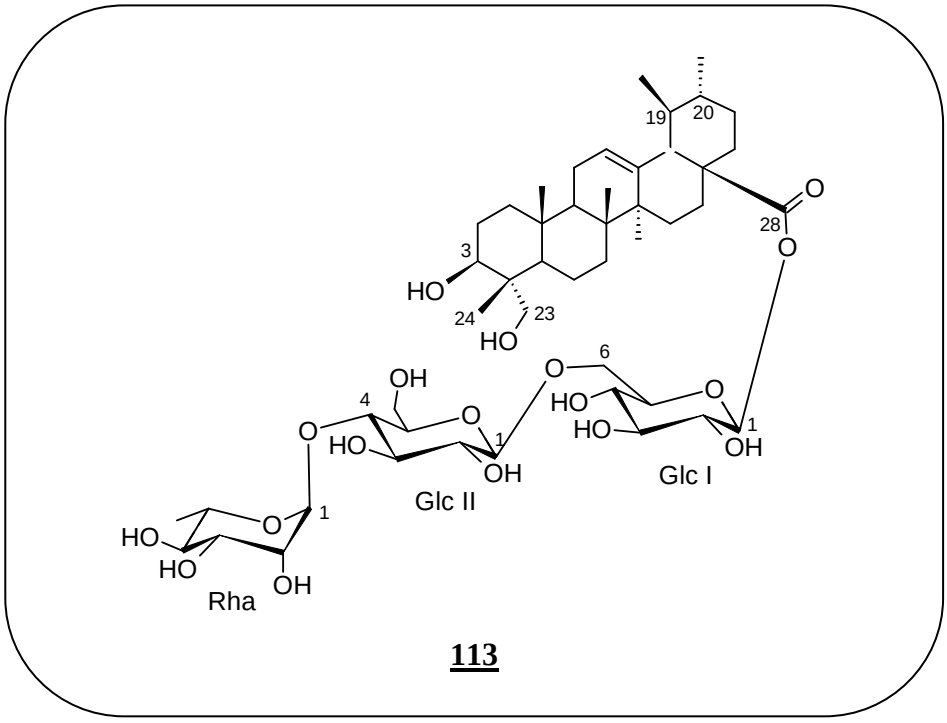
- Le proton à $\delta_H$ 5,60 (s l, Rha H-1) et le carbone à $\delta_C$ 78,0 (Glc II C-4).
- Le proton à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc II H-1) et le carbone à $\delta_C$ 68,6 (Glc I C-6).
- Entre le proton à $\delta_H$ 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc I H-1) et le carbone à $\delta_C$ 176,3 (Agly C-28).

Ceci montre que le Rha est lié au Glc II par une liaison (1→4), le Glc II est lié au Glc I par une liaison (1→6) et Glc I est lié à l'aglycone en position 28 par une liaison ester. Cette séquence est confirmée par la corrélation sur le spectre NOESY entre le proton à $\delta_H$ 5,60 (s l, Rha H-1) et le proton à 4,13 (Glc II H-4), entre le proton à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc II H-1) et le proton à $\delta_H$

4,54 (Glc I H-6a), On peut donc conclure que la chaîne osidique en C-28 est *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion*

Au vu de tous ce qui précède, le composé **113** a été identifié à l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranoside, précédemment isolé de *Cussonia paniculata* par Griskhovets et *al*., 2005.




**113**

**Tableau 16 :** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **113**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,5 | 0,86, 1,44 |
| 2 | 26,7 | 1,81, nd |
| 3 | 73,0 | 4,01 |
| 4 | 42,3 | - |
| 5 | 48,0 | 1,34 |
| 6 | 18,1 | 1,22, 1,46 |
| 7 | 32,7 | 1,22, 1,55 |
| 8 | 39,6 | - |
| 9 | 47,9 | 1,53 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 23,2 | 0,79, 1,82 |
| 12 | 125,6 | 5,35 |
| 13 | 138,1 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,06, 2.24 |
| 16 | 24.1 | 1.85, 1.92 |
| 17 | 46.7 | - |
| 18 | 52.8 | 2.37 |
| 19 | 38.9 | 1.27 |
| 20 | 38,6 | 0,86 |
| 21 | 30,2 | nd, nd |
| 22 | 36,3 | 1,64, 1,79 |
| 23 | 66,8 | 3,55, 3,99 |
| 24 | 12,6 | 0,96 s |
| 25 | 15,8 | 0,86 |
| 26 | 17,3 | 1,03 s |
| 27 | 23,3 | 1,03 s |
| 28 | 176,3 | - |
| 29 | 17,1 | 0,99 d (5,4) |
| 30 | 20,8 | 0,83 d (5,7) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 28-O-Glc I | | |
| 1 | 95,1 | 6,00 d (8,0) |
| 2 | 72,8 | 4,04 |
| 3 | 77,6 | 4,15 |
| 4 | 70,0 | 4,18 |
| 5 | 77,2 | 3,97 |
| 6 | 68,6 | 4,19, 4,54 |
| Glc II | | |
| 1 | 104,0 | 4,84 d (7,8) |
| 2 | 74,5 | 3,82 |
| 3 | 75,8 | 3,97 |
| 4 | 78,0 | 4,13 |
| 5 | 76,3 | 3,50 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,06 |
| Rha | | |
| 1 | 102.0 | 5.60 s l |
| 2 | 71.7 | 4.52 |
| 3 | 72.8 | 4.40 |
| 4 | 73,1 | 4,19 |
| 5 | 69,9 | 4,69 |
| 6 | 17,9 | 1,55 d (5,9) |

### II.1.1.3.7 Composé 114

➢ *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **114** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1057 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1058 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{58}H_{86}O_{21}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 925 $[(M–H)–132]^-$, 617 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 455 $[(M–H)–132–146–162–162)]^-$ correspondant à la perte d'un pentose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses, et d'un pentose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

➢ *Spectroscopie RMN*

- *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres quatre signaux attribuables aux protons anomériques dont trois résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,8 Hz ), 4,89 (d, $J$ = 7,6 Hz), 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,60 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec quatre carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,4; 104,0; 95,1 et 102,0; respectivement.

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D ont permis de caractériser :

- deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I, Glc II) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz) et $\delta_H$ 4,89 (d, $J$ = 8,0 Hz), respectivement.
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique à $\delta_H$ 5,60 ppm (s l).
- Un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,8 Hz).

- *Séquençage en C-3.*

Les corrélations HMBC entre $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 88,8 (Agly C-3), et NOESY entre $\delta_H$ 4,86 (Ara H-1) et $\delta_H$ 3,31 (Agly H-3) a permis d'établir la position de l'arabinopyranosyl en C-3 de l'acide oléanolique.

- *Séquençage osidique en C-28.*

L'observation des corrélations HMBC entre les protons à :

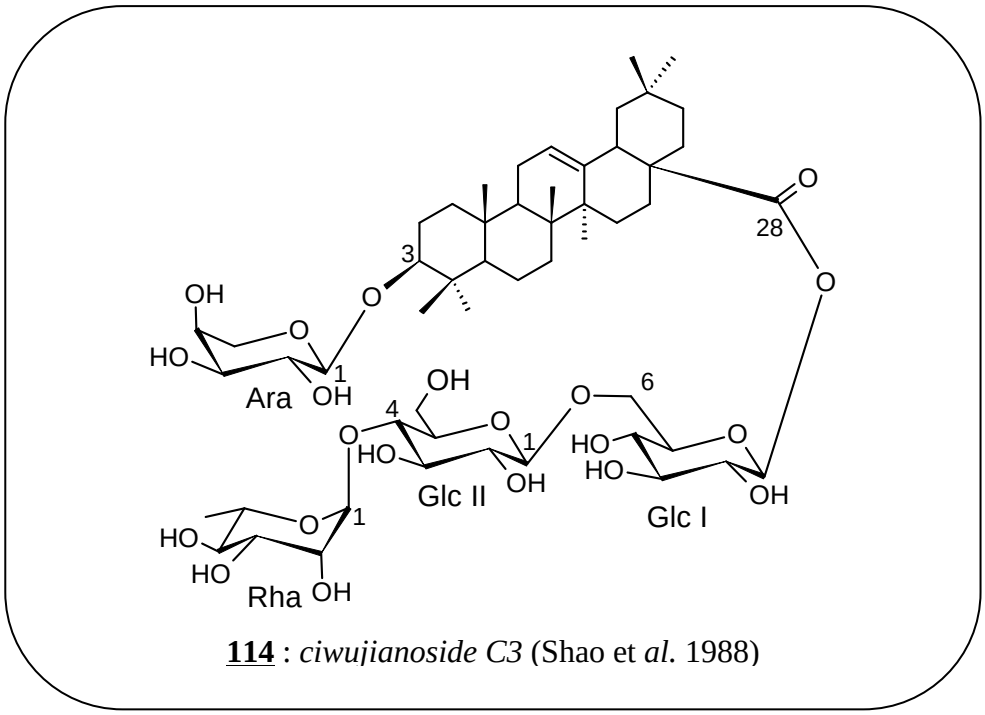
- $\delta_H$ 5,60 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,0 (Glc II C-4),
- $\delta_H$ 4,89 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 68,8 (Glc I C-6),

finalement entre $\delta_H$ 6,10 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc H-1) et $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28),

a suggéré la séquence oligosaccharidique en C-28 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl, confirmée par des corrélations NOESY entre le signal à $\delta_H$ 5,60 (s l, Rha H-1) et $\delta_H$ 4,13 (Glc II H-4), entre $\delta_H$ 4,89 (Glc II H-1) et $\delta_H$ 4,54 (Glc II H-6a).

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **114** a été identifié au 3-*O*-$\alpha$-L-arabinopyranosyl-acide oléanolique 28-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, un composé naturel dénommé *ciwujianoside C3*, isolé d'*Acanthopanax senticosus* par Shao et *al.*, 1988.




**<u>114</u>** : *ciwujianoside C3* (Shao et *al.* 1988)

**Tableau 17**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **114.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,45 |
| 2 | 26,9 | [b], 1,82 |
| 3 | 88,8 | 3,31 |
| 4 | 39,5 | - |
| 5 | 55,5 | 0,68 |
| 6 | 18,2 | 1,26, 1,34 |
| 7 | 33,6 | 1,20, [b] |
| 8 | 39,5 | - |
| 9 | 48,1 | 1,62 m |
| 10 | 36,4 | - |
| 11 | 23,4 | 1,82, 1,84 |
| 12 | 122,5 | 5,35 |
| 13 | 143,5 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27.8 | 1.16; 2.20 |
| 16 | 27,9 | 1,20, 2,19 |
| 17 | 23,0 | [b] |
| 18 | 46,7 | - |
| 19 | 41,3 | 3,08 d (13,1) |
| 20 | 45,9 | 1,14, 1,62 |
| 21 | 30,3 | 1,26, 1,50 |
| 22 | 32,4 | 1,66, 1,79 |
| 23 | 32,1 | 1,22 s |
| 24 | 27,9 | 0,92 s |
| 25 | 16,7 | 0,88 s |
| 26 | 15,7 | 1,02 s |
| 27 | 17,2 | 1,16 s |
| 28 | 176.5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0,81 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Ara | | |
| 1 | 104,4 | 4,86 d (7,8) |
| 2 | 79,7 | 4,52 t (6,6) |
| 3 | 73,0 | 4,29 |
| 4 | 78,1 | 4,21 |
| 5 | 64,6 | 3,75 ld (9,7), 4,22 |
| 28-O- Glc I | | |
| 1 | 95,1 | 6,10 d (8,0) |
| 2 | 72,8 | 4,04 |
| 3 | 77,6 | 4,15 |
| 4 | 70,0 | 4,18 |
| 5 | 77,2 | 3,97 |
| 6 | 68,6 | 4,19, 4,54 |
| Glc II | | |
| 1 | 104,0 | 4,89 d (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,82 |
| 3 | 75,8 | 3,97 |
| 4 | 78,0 | 4,13 |
| 5 | 76,3 | 3,50 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,06 |
| Rha | | |
| 1 | 102,0 | 5,60 s l |
| 2 | 71,7 | 4,52 |
| 3 | 72,8 | 4,40 |
| 4 | 73,1 | 4,19 |
| 5 | 69,9 | 4,69 |
| 6 | 17,9 | 1,55 |

**II.1.1.4.** Elucidation structurale des composés (**115** – **126**) isolés des feuilles. (Publication en cours)

**II.1.1.4.1** Composé **115**

- *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **115** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 795 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 796 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{42}H_{68}O_{14}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 647 $[(M–H)–146]^-$, 471 $[(M–H)–146–176]^-$, correspondant à la perte d'un deoxyhexose et d'un hexuronique successivement. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'hédéragénine (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN*

Le signal à $\delta_C$ 88.2 (d, *J* = 11.4 Hz, Agly C-3) et $\delta_C$ 180,0 (Agly C-28) permettent de conclure qu'il n'ya pas de liaison en C-28 et par conséquent prouve que le composé **115** est une saponine monodesmosidique avec une chaîne de sucres en position 3.

- *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres deux signaux attribuables aux protons anomériques dont l'un résonne à $\delta_H$ 4,95 (*d*, *J* = 8,1 Hz) et l'autre à $\delta_H$ 5,65 (s l). Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec deux carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 103,6 et 102,1; respectivement.

L'analyse des spectres 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser:

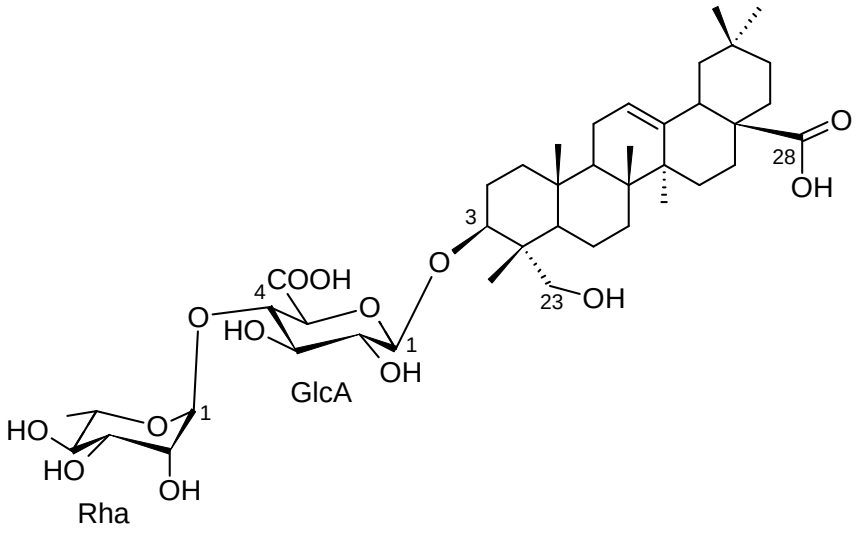
- Un *β*-glucuronopyranosyl (GlcA) dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 4,95 (d, *J* = 8,1 Hz) ;
- Un α-rhamnopyranosyl (Rha) dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 5,65 (s l)

- *Séquençage osidique en C-3*

Les corrélations observées dans le spectre HMBC entre le signal du proton anomérique à $\delta_H$ 5,65 (1H, s l, Rha H-1) et celui du carbone à $\delta_C$ 77,8 (GlcA C-4), entre le signal du proton anomérique à $\delta_H$ 4,95 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, GlcA H-1) et le signal du carbone à $\delta_C$ 88,2 (Agly C-3), ont suggéré la séquence de la chaîne oligosaccharidique en C-3 comme étant *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucuronopyranosyl, confirmée par des corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,65 (s l, Rha H-1) et $\delta_H$ 4,18 (GlcA H-4), entre $\delta_H$ 4,95 (d, *J* = 8,1 Hz, GlcA H-1) et $\delta_H$ 3,15 (Agly H-3).

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **115** a été élucidé à hédéragénine 3-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucuronopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside F** (Kougan et al., en cours).




**<u>115</u> : arboréaside F** (Kougan et al. en cours)

**Tableau 18** : Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **115.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,2 | 0,86, 1,37 |
| 2 | 26,9 | 1,05, 2.04 |
| 3 | 88.2 | 3,15 |
| 4 | 40.0 | - |
| 5 | 55,7 | 0,76 |
| 6 | 18,0 | 1,22, 1,53 |
| 7 | 32,1 | 1,20; 1,64 |
| 8 | 39,1 | - |
| 9 | 46,5 | 1,54 |
| 10 | 36,2 | - |
| 11 | 23,1 | 1,12, 1,79 |
| 12 | 121,5 | 5,38 |
| 13 | 143,5 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,12, 1.04 |
| 16 | 24,1 | 1,54, 1,78 |
| 17 | 48,1 | - |
| 18 | 41,3 | 3,20 d (12.8) |
| 19 | 46,5 | [b], 1,54 |
| 20 | 30,5 | - |
| 21 | 36,8 | 1,94, 1,98 |
| 22 | 32,1 | 1.80, 1.86 |
| 23 | 63,5 | 3,53, 4,12 |
| 24 | 13,1 | 0,81 s |
| 25 | 15,5 | 0.78 s |
| 26 | 17,2 | 0,86 s |
| 27 | 25,5 | 1,18 s |
| 28 | 180 | - |
| 29 | 33,1 | 0,83 s |
| 30 | 23,1 | 0,91 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O- GlcA | | |
| 1 | 103,6 | 4,95 d (8,1) |
| 2 | 73,0 | 3,96 d (7.8) |
| 3 | 77,0 | 4,09 |
| 4 | 77,8 | 4,18 d (8.8) |
| 5 | 76,8 | 3,99 t (8.8) |
| 6 | nd | - |
| Rha | | |
| 1 | 101,8 | 5,65 s l |
| 2 | 71,7 | 4,56 |
| 3 | 71,8 | 4,42 d (9.5) |
| 4 | 72,9 | 4,23 d (9.5) |
| 5 | 70,0 | 4,72 m |
| 6 | 18,0 | 1,58 d (5,4) |

### II.1.1.4.2 Composé 116

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source ESI (mode négatif) du composé **116** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 953 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 954 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{49}H_{78}O_{18}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 938 $[(M–H)–15]^-$, 645 $[(M–H)–146–162]^-$, correspondant à la perte d'un méthyl et d'un hexose et d'un deoxyhexose, respectivement.

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature de la génine*

Une analyse des spectres RMN 1D et 2D de **116** a permis de caractériser l'aglycone à l'acide oléanolique par comparaison avec les données de la littérature (Abe et *al*., 2002 Seebacher et *al*., 2003).

L'analyse du spectre RMN $^{13}C$ montre deux signaux carboxyliques dont l'un est blindé à $\delta_C$ 171.8 et l'autre résonne à $\delta_C$ 180.0 (Agly C-28), cette dernière valeur observée, permet de conclure que le carbonyle en C-28 est non estérifié.

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres trois signaux de protons anomériques à $\delta_H$ 4,96 (*d*, *J* = 8,0 Hz), 5,17 (*d*, *J* = 7,7 Hz) et $\delta_H$ 5,82 (s l) qui corrèlent sur le spectre HSQC avec trois carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104.8, 106.0 et 102.8. L'analyse des spectres 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Un $\beta$-glucuronopyranosyl (GlcA) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 4,96 (d, *J* = 8,0 Hz);
- Un α-rhamnopyranosyl (Rha) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 5,82 (s l);
- Un $\beta$-glucopyranosyl (Glc) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 5,17 (d, *J* = 7,7 Hz)

  - Séquençage osidique en C-3

Les corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,82 (s, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,1 (GlcA C-4),
- $\delta_H$ 5,17 (d, *J* = 7,7 Hz, Glc H-1) et $\delta_H$ 81,0 (GlcA C-2)
- $\delta_H$ 4,96 (d, *J* = 8,0 Hz, GlcA H-1) et $\delta_C$ 88,2 (Agly C-3),

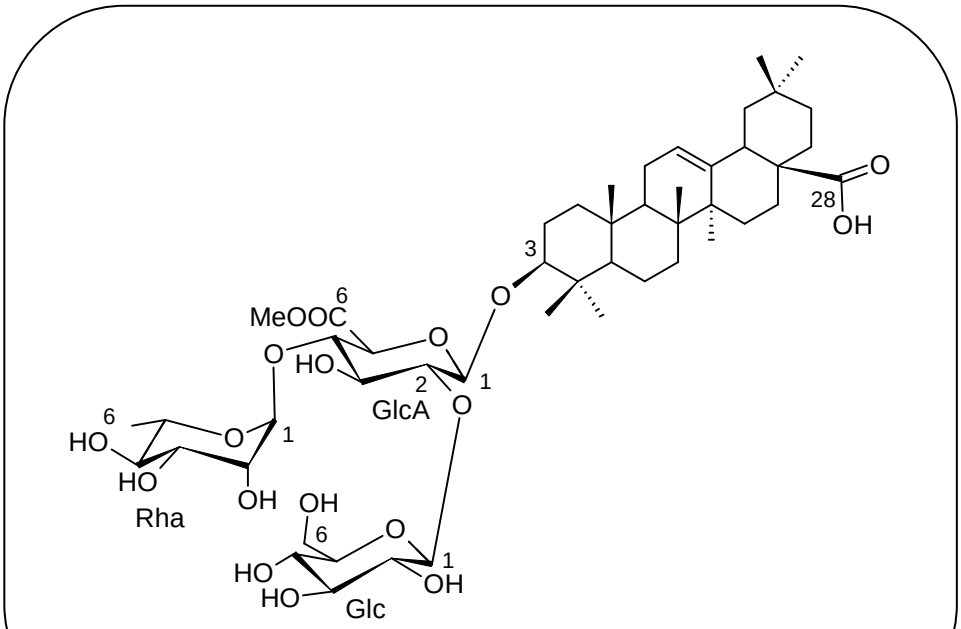
ont suggéré la sequence oligosaccharidique en C-3 comme étant $\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-$\beta$-D-glucuronopyranosyl, confirmée par des corrélations NOESY entre

$\delta_H$ 5,82 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,38 (GlcA H-4), entre $\delta_H$ 5,17 (Glc H-1) et $\delta_H$ 4,58 (GlcA H-2) et entre $\delta_H$ 4,96 (d, $J$ = 8,0 Hz, GlcA H-1) et $\delta_H$ 3,24 (Agly H-3).

L'analyse du spectre RMN $^{13}C$ montre deux signaux carboxyliques dont l'un à $\delta_C$ 180,0 (Agly C-28) et l'autre à $\delta_C$ 171,8 ne pouvant appartenir qu'à l'acide glucuronique. Cette valeur blindée, correspondant à un ester. La présence du signal d'un méthyle supplémentaire à $\delta_H$ 3,74 (s, 3H) qui corrèle avec le carbone à $\delta_C$ 51,5 dans le spectre HSQC, et l'observation d'une corrélation entre ce groupe proton à $\delta_H$ 3,74 et le carbone à $\delta_C$ 171,5 dans le spectre HMBC confirme cette hypothèse. Nous déduisons donc que le carbonyle de GlcA est méthylé, ceci est confirmé par l'observation d'un fragment à m/z 643 $[Agly+176+15]^-$ dans le spectre de masse de **116.**

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **116** a été élucidé à l'acide oléanolique 3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-(6-*O*-methyl)-*β*-D-glucuronopyranoside, un composé naturel dénommé **arboréaside G** (Kougan et *al.*, en cours).




**<u>116</u> : arboréaside G** (Kougan et al., en cours )

**Tableau 19** : Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **116**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,5 | 0,91, 1,52 |
| 2 | 26,8 | nd, nd |
| 3 | 88,2 | 3,24, dd (5.0, 13.0) |
| 4 | 39,6 | - |
| 5 | 55,9 | 0,75 |
| 6 | 18,1 | nd, 1,52 |
| 7 | 32,1 | nd, nd |
| 8 | 39,1 | - |
| 9 | 46,5 | 1,54 |
| 10 | 36,8 | - |
| 11 | 23,4 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 122,5 | 5,48, d (3.2) |
| 13 | 144,5 | - |
| 14 | 42,2 | - |
| 15 | 27,5 | 1,11, 2,18 |
| 16 | 23,4 | 1,90, 2,10 |
| 17 | 48,1 | - |
| 18 | 41,2 | 3,23, d (12.6) |
| 19 | 46,0 | 1,57, 1,64 |
| 20 | 30,0 | - |
| 21 | 33,3 | 1,93, 1,98 |
| 22 | 32,3 | nd, nd |
| 23 | 28.3 | 1,24 s |
| 24 | 16,8 | 1,04 s |
| 25 | 15,5 | 0,86 s |
| 26 | 17,4 | 1,00 s |
| 27 | 26,2 | 0,86 s |
| 28 | 180,0 | - |
| 29 | 32,6 | 0,97 s |
| 30 | 23,4 | 0,91 s |

| | | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|---|
| 3-O-GlcA | | | |
| | 1 | 104,8 | 4,96 d (8,0) |
| | 2 | 81,0 | 4,58, t (5,3) |
| | 3 | 77,5 | 4,37 |
| | 4 | 78,1 | 4,38 |
| | 5 | 76,8 | 3,95, t (8,1) |
| | 6 | 171,8 | - |
| COOMe | | 51,5 | 3,74, s |
| Glc | | | |
| | 1 | 106,0 | 5,17, d (7,7) |
| | 2 | 75,4 | 4,08, d (8,1) |
| | 3 | 77,5 | 4,19, d (8,9) |
| | 4 | 71,0 | 4,30 |
| | 5 | 76,6 | 3,83, |
| | 6 | 62,7 | 4,42, nd |
| Rha | | | |
| | 1 | 102,8 | 5,82 s l |
| | 2 | 71,7 | 4,56 |
| | 3 | 71,8 | 4,42 |
| | 4 | 72,9 | 4,23 |
| | 5 | 70,2 | 4,63 |
| | 6 | 18,1 | 1,58 d (6,09) |

### II.1.1.4.3 Composé 117/118

Les composés **117/118** ont été isolés sous forme d'un mélange inséparable donnant une seule tache sur la HPTLC.

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1085 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1086 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{86}O_{22}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 941 $[(M–H)–144]^-$, 795 $[(M–H)–144–146]^-$, 633 $[(M–H)–144–146–162]^-$, 471 $[(M–H)–144–146–162–162)]^-$ correspondant à la perte successive d'un groupement acyle, d'un deoxyhexose, d'un et de deux hexoses. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire des aglycones, notamment l'hédéragénine pour **117** et l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique pour **118**. (Tapondjou et al. 2003; Grishkovets et *al.*, 2005).

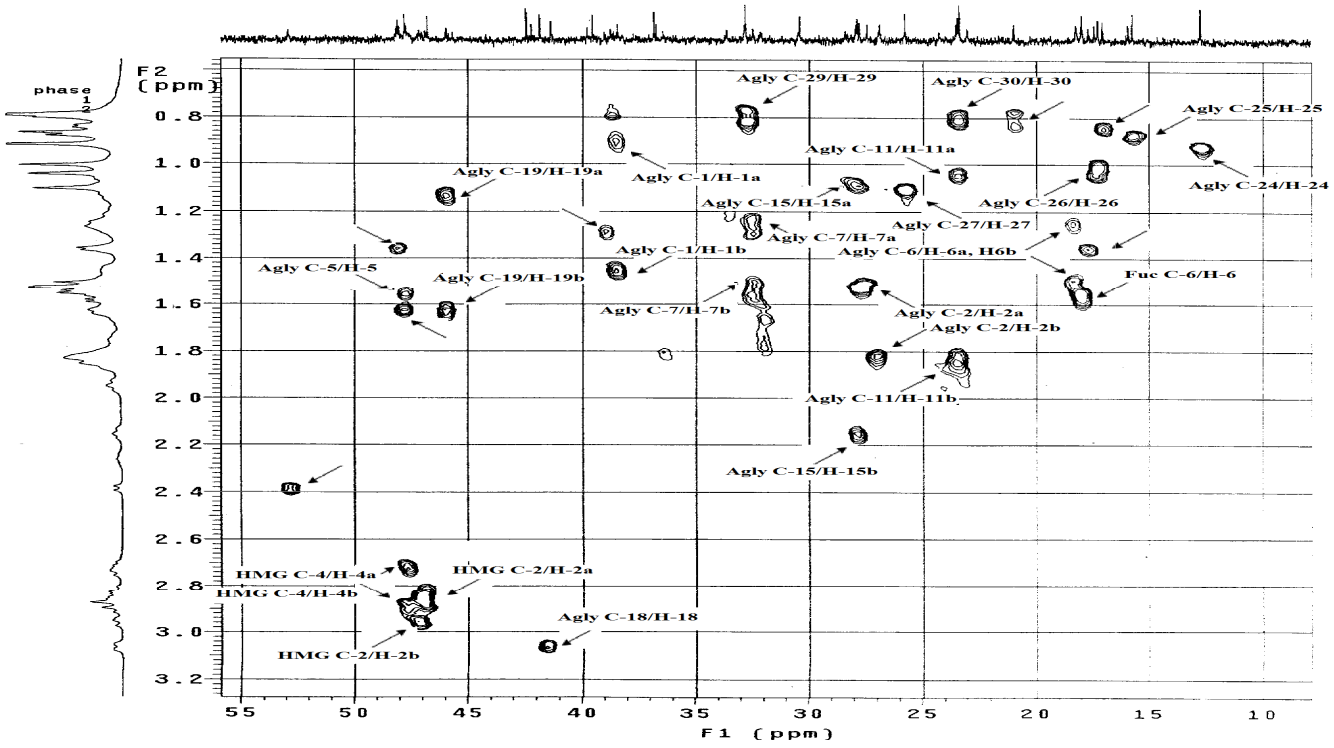



**Figure 16:** Spectres HSQC de la partie aglycone des composés **117/118**

- *Spectroscopie RMN*

Sur le spectre HSQC, le signal du carbone à $\delta_C$ 72,9 (Agly C-3) montrant une corrélation avec le proton à $\delta_H$ 4,06 ppm permet de conclure qu'il n'ya pas de liaison osidique en C-3. Par conséquent **117/118** est le mélange de saponines monodesmosidiques avec une chaîne de sucres en position 28.

- *Nature des sucres*

Sur le spectre HSQC du mélange **117/118** on observe la présence de trois protons anomériques résonnant à $\delta_H$ 4,82 (d, $J$ = 7,8 Hz); 5,62 (d, $J$ = 7,6 Hz); 6,07 (d, $J$ = 7,8 Hz). Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec trois carbones anomériques résonnant $\delta_C$ 104,1; 102,6; 95,1; respectivement.

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser:

- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I et Glc II) dont les protons anomériques résonnent à $\delta_H$ 6,07 (d, $J$ = 7,8 Hz) et $\delta_H$ 4,82 (d, $J$ = 7,8 Hz).
- Un $\beta$-fucopyranosyl (Fuc) terminal acylé dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 5,62 (d, $J$ = 7,6 Hz).

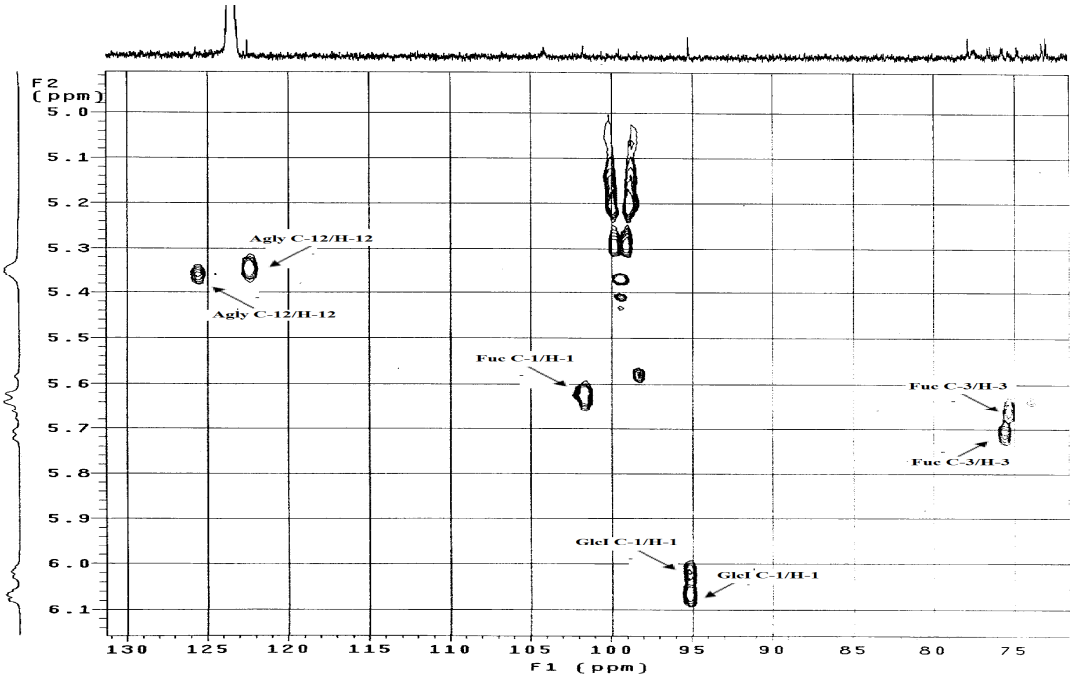



**Figure 17:** spectre HSQC des la zone des anomères des composés **117/118**

Le spectre TOCSY montre à partir du proton anomère à $\delta_H$ 5,62 (d, $J$ = 7,6 Hz, Fuc H-1) une tache de corrélation à $\delta_H$ 5,64 attribuée au proton H-3 déblindé et qui montre ainsi que cette position est acylée. En plus, l'existence des corrélations entre le proton à $\delta_H$ 5,64 (Fuc H-3) et les protons à $\delta_H$ 4,42 (Fuc H-2), $\delta_H$ 4,21 (Fuc H-4) respectivement confirme l'acylation du Fuc en position 3. La présence d'un groupement acyle (acide 3-hydroxy-3-méthyldiglutarique) est caractérisée par l'existence des signaux de deux carbonyles résonnant à $\delta_C$ 171,5 et $\delta_C$ 179,5 correspondant à un ester et un acide respectivement. Deux méthylènes à $\delta_C$ 47,0 et à $\delta_C$ 46,9 qui corrèlent dans le spectre HSQC respectivement avec les protons à $\delta_H$ 2,72 et 2,86 et $\delta_H$ 2,90 et $\delta_H$ 2,96 respectivement. Ces protons montrent des corrélations avec le carbonyle à $\delta_C$ 179,5 et le

carbonyle à $\delta_C$ 171,5 respectivement, dans le spectre HMBC. Une autre corrélation entre le proton du méthyle à $\delta_H$ 1.51 et le carbone quaternaire à $\delta_C$ 70.5 est observée dans le spectre HMBC.

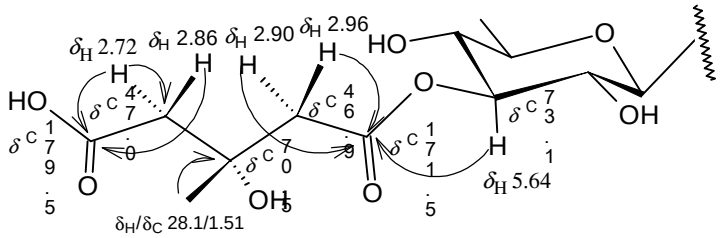



**Figure 17:** Corrélations HMBC observées dans le fragment HMG

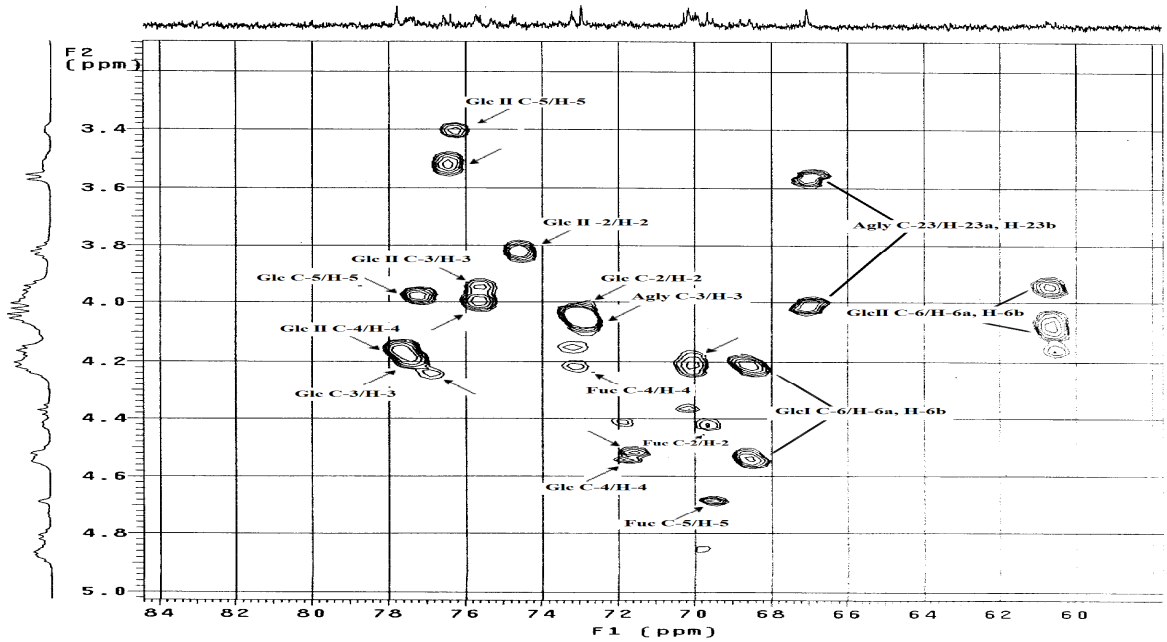



**Figure 18**: Spectres HSQC de la partie osidique des composés **117/118**

- *Séquençage osidique en C-28.*

L'analyse du spectre HMBC a permis d'établir le séquençage des trois unités de sucres. On a observé des taches de corrélations sur le spectre HMBC entre les protons anomériques à:

- $\delta_H$ 5,62 (d, *J* = 7,6 Hz, Fuc H-1) et le carbone à $\delta_C$ 77,4 (Glc II C-4).
- $\delta_H$ 4,82 (d, *J* = 7,8 Hz, Glc II H-1) et le carbone à $\delta_C$ 68,5 (Glc I C-6).
- $\delta_H$ 6,07 (d, *J* = 7,8 Hz, Glc I H-1) et le carbone à $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28).

Ceci montre que le Fuc acylé est lié au Glc II par une liaison (1→4), le Glc II est lié au Glc I par une liaison (1→6) et Glc I est lié à l'aglycone en position 28 par une liaison ester.

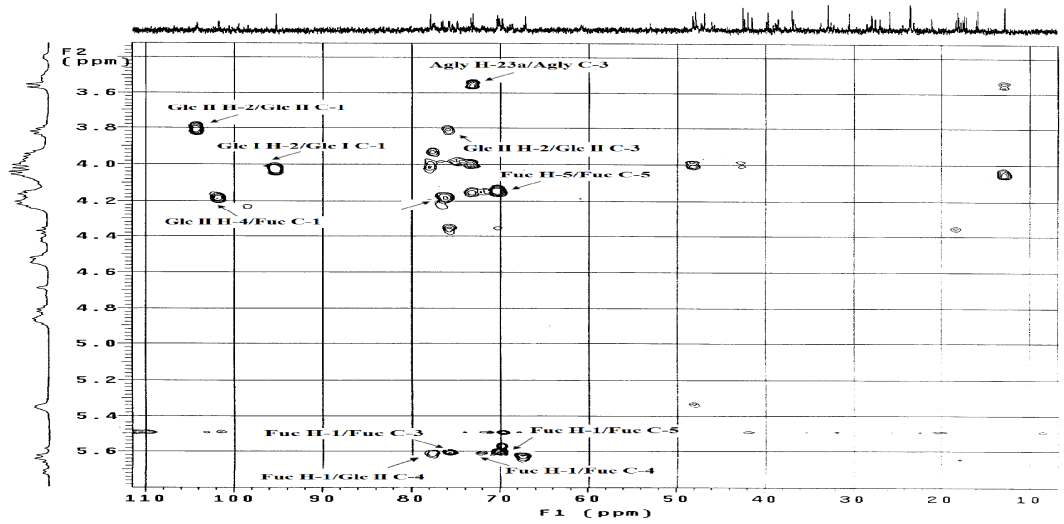



**Figure 19**: Spectres HMBC de la partie osidique des composés **117/118**

Cette séquence est confirmée par la corrélation sur le spectre NOESY entre le proton anomérique à $\delta_H$ 5,62 (d, $J$ = 7,6 Hz, Fuc H-1) et le proton à $\delta_H$ 4,15 (Glc II H-4), entre le proton anomérique à $\delta_H$ 4,82 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc II H-1) et le proton à $\delta_H$ 4,54 (Glc I H-6a). On peut donc conclure que la chaîne osidique en C-28 est $\beta$-D-fucopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion*

Au vu de tout ce qui précède, on conclut que la structure des composés **117/118** est l'hédéragénine 28-*O*-[3-*O*-{acide 3-hydroxy-3-méthyldiglutarique}-$\beta$-D-fucopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl ester (**117**) et l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-*O*-[3-*O*-{acide 3-hydroxy-3-méthyldiglutarique}-$\beta$-D-fucopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl ester (**118**), nouveaux composés naturels dénommés **arboréaside H/I**. (Kougan et *al.*, en cours)

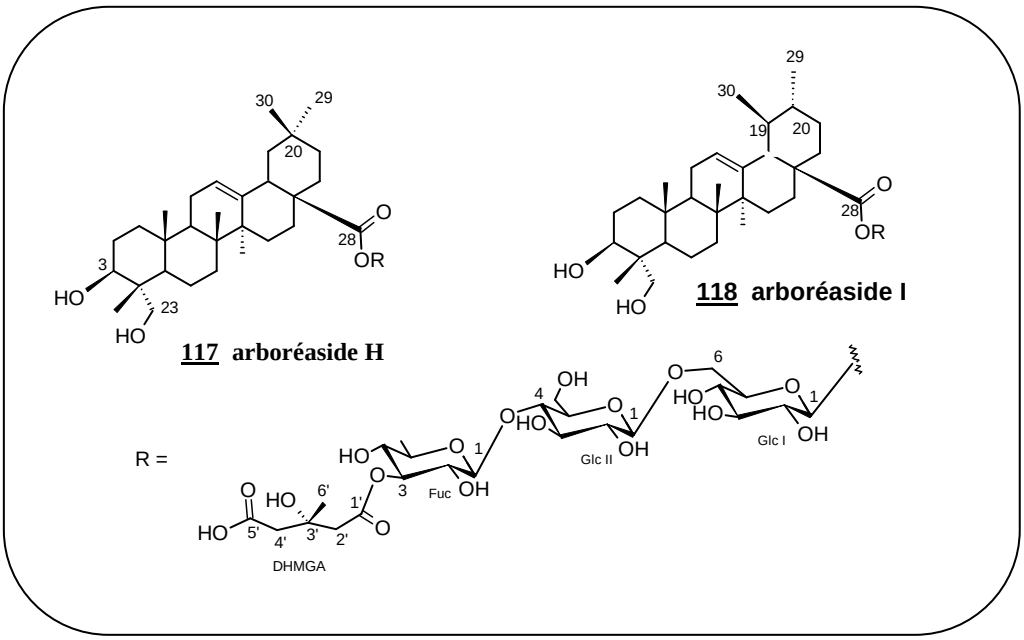


**Tableau 20**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres des composés **117/118.**

| | **Composé 117** | | **Composé 118** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\delta_C$ | $\delta_H$ | $\delta_C$ | $\delta_H$ | | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
| 1 | 38,3 | 0,92, 1,22 | 38,5 | 0,92, 1,22 | 28-O-Glc I | | |
| 2 | 26,8 | 1,82, nd | 26,8 | 1,82, nd | 1 | 95,1 | 6,07, d (7,8) |
| 3 | 72,9 | 4,06 | 72,9 | 4,06 | 2 | 73,1 | 4,04 |
| 4 | 42,3 | - | 42,3 | - | 3 | 77,4 | 4,15 |
| 5 | 48,0 | 1,36 | 48,0 | 1,36 | 4 | 71,8 | 4,54 |
| 6 | 18,1 | 1,25, 1,50 | 18,1 | 1,25, 1,50 | 5 | 77,2 | 3,98 |
| 7 | 32,7 | 1,25, 1,31 | 32,4 | 1,25, 1,31 | 6 | 68,5 | 4,21; 4,54 |
| 8 | 39,5 | - | 39,7 | - | Glc II | | |
| 9 | 47,7 | 1,56 | 47,7 | 1,56 | 1 | 104,1 | 4,82, d (7,8) |
| 10 | 36,7 | - | 36,6 | - | 2 | 74,7 | 3,80 |
| 11 | 23,4 | 0,79, 1,85 | 23,4 | 0,79, 1,85 | 3 | 75,2 | 3,94 |
| 12 | 122,4 | 5,35 | 125,6 | 5,36 | 4 | 77,4 | 4,18 |
| 13 | 143,1 | - | 138,1 | - | 5 | 76,3 | 3,41 |
| 14 | 42,1 | - | 42,1 | - | 6 | 60,7 | 3,93; 4,15 |
| 15 | 27,8 | 1,58, 2,16 | 27,8 | 1,58, 2,16 | Fuc | | |
| 16 | 24,2 | nd, nd | 24,2 | nd, nd | 1 | 102,6 | 5,62; d (7,6) |
| 17 | 47,6 | - | 46,7 | - | 2 | 69,8 | 4,42 |
| 18 | 41,3 | 3,06 | 52,8 | 2,39 | 3 | 75,2 | 5,64 |
| 19 | 45,9 | 1,14, 1,63 | 38,9 | 1,28 | 4 | 73,1 | 4,21 |
| 20 | 30,3 | - | 38,6 | 0,81 | 5 | 69,9 | 4,14 |
| 21 | 36,6 | nd, 1,82 | 30,5 | nd, nd | 6 | 17,9 | 1,56; d (6,4) |
| 22 | 32,0 | 1,64, 1,78 | 36,3 | 1,64, 1,78 | HMG | | |
| 23 | 67,0 | 3,56, 4,02 | 67,0 | 3,56, 4,02 | 1' | 171,5 | - |
| 24 | 12,6 | 0,92 s | 12,6 | 0,92 s | 2' | 46,9 | 2,90 d (14,1), 2,96 d (14,1) |
| 25 | 15,6 | 0,86 s | 15,8 | 0,86 s | 3' | 70,5 | - |
| 26 | 17,2 | 1,00 s | 17,3 | 1,00 s | 4' | 47,0 | 2,72 d (15,4), 2,86 d (15,4) |
| 27 | 25,7 | 1,10 s | 23,3 | 1,10 s | 5' | 179,5 | - |
| 28 | 176,5 | - | 176,5 | - | 6' | 28,1 | 1,51 s |
| 29 | 32,7 | 0,81 s | 17,0 | 0,85, d (5,4) | | | |
| 30 | 23,3 | 0,80 s | 20,9 | 0,80, d (6,7) | | | |

### II.1.1.4.4 Composé 119/120

Les composés **119/120** ont été isolés sous forme d'un mélange inséparable donnant une seule tache sur la HPTLC.

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1351 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1352 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{64}H_{104}O_{30}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 1219 $[(M–H)–132]^-$; 881 $[(M–H)–132–132–146]^-$, 749 $[(M–H)–132–132–146–162]^-$, 455 $[(M–H)–132–146–132–162–162–162]^-$, correspondant à la perte successive de deux pentoses, d'un deoxyhexose et de trois hexoses. Le pic observé à *m/z* 455 correspond au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique pour (**119**), l'acide ursolique pour (**120**) (voir paragraphe 2, p45).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres six signaux attribuables aux protons anomériques dont cinq résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 4,95 (d, *J* = 7,8 Hz); 5,12 (d, *J* = 8,3 Hz ), $\delta_H$ 5,12 (d, *J* = 7,8 Hz ); 6,08 (d, *J* = 7,3 Hz), 4.86 (d, *J* = 7,6 Hz) et le sixième sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l). Ces protons montrent des taches de corrélations sur le spectre HSQC avec six carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 103,9; 106,2; 103,0; 95,1; 103,9 et 102,1; respectivement, prouvant la présence de six sucres.

L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Trois $\beta$-glucopyranosyl (Glc I, Glc II, Glc III) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 6,08 (d, *J* = 7,3 Hz), $\delta_H$ 4,86 (d, *J* = 7,6 Hz) et $\delta_H$ 5,12 (d, *J* = 8,3 Hz), respectivement.
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l).
- Un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,95 (d, *J* = 7,8 Hz).
- Un $\beta$-xylopyranosyl (Xyl) avec le proton anomèrique à $\delta_H$ 5,12 (d, *J* = 7,8 Hz).

  - *Séquençage en C-3.*

Les corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,12 (d, *J* = 7,8 Hz, Xyl H-1) et $\delta_C$ 84,0 (Glc I C-2),
- $\delta_H$ 5,12 (d, *J* = 8,3 Hz, Glc I H-1) et $\delta_C$ 79,0 (Ara C-2),

- $\delta_H$ 4,95 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 88,8 (Agly C-3), et les corrélations observées sur le spectre NOESY entre :
- $\delta_H$ 4,95 (Ara H-1) et $\delta_H$ 3,15 (Agly H-3),
- $\delta_H$ 5,12 (Glc I H-1) et $\delta_H$ 4,44 (Ara H-2),
- $\delta_H$ 5,12 (Xyl H-1) et $\delta_H$ 3,98 (Glc I H-2) ont permis d'établir la séquence des sucres en C-3 comme étant $\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl.

• *Séquençage osidique en C-28.*

Les corrélations HMBC entre :

- $\delta_H$ 5,62 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 77,1 (Glc III C-4),
- $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc III H-1) et $\delta_C$ 68,7 (Glc II C-6),

finalement entre $\delta_H$ 6,08 (d, $J$ = 7,3 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28),

ont suggéré la séquence oligosaccharidique en C-28 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl, confirmée par l'observation des corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,62 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,17 (Glc III H-4), entre $\delta_H$ 4,86 (Glc III H-1) et $\delta_H$ 4,55 (Glc II H-6a).

➢ *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le mélange de composés isomères **119/120** a été élucidé à 3-*O*-$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl acide oléanolique 28-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl ester (**119**) et 3-*O*-$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)- $\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl acide urs-12-èn-oique 28-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl ester (**120**), nouveaux composés naturels dénommés **arboréaside J/K** (Kougan et al, en cours ).

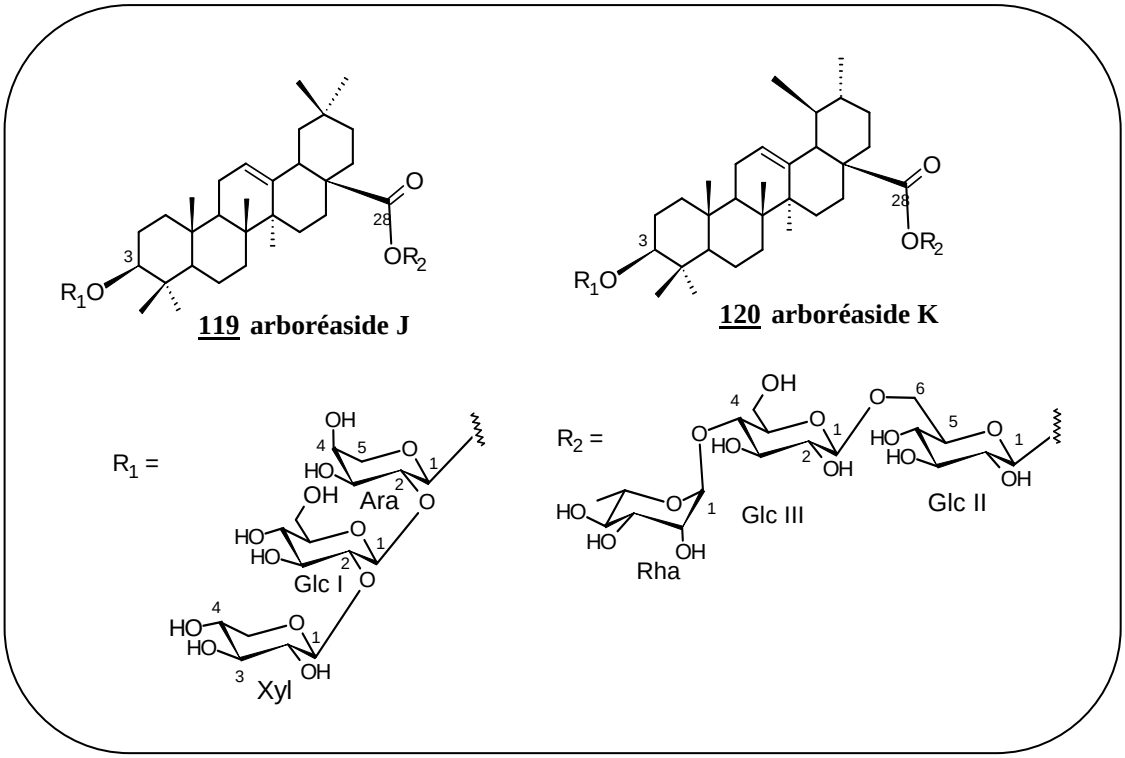



**Tableau 20** : Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres des composés **119/120.**

| | Composé 119 | | Composé 120 | |
|---|---|---|---|---|
| | $\delta_C$ | $\delta_H$ | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,41 | 38,6 | 0,78, 1,41 |
| 2 | 26,0 | 1,76, 1,96 | 26,0 | 1,76, 1,96 |
| 3 | 88,2 | 3,15 | 88,2 | 3,15 |
| 4 | 39,1 | - | 39,1 | - |
| 5 | 55,4 | 0,62 | 55,4 | 0,62 |
| 6 | 18,1 | 1,15, 1,34 | 18,1 | 1,15, 1,34 |
| 7 | 33,0 | nd, nd | 33,0 | nd, nd |
| 8 | 39,4 | - | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,44 | 47,6 | 1,44 |
| 10 | 36,5 | - | 36,5 | - |
| 11 | 23,3 | 0,99, 1,81 | 23,3 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 123,8 | 5,34 | 125,8 | 5,34 |
| 13 | 143,6 | - | 138,6 | - |
| 14 | 42,1 | - | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,11, 2,18 | 27,8 | 1,11, 2,18 |
| 16 | 24,1 | 1,90, 2,00 | 24,1 | 1,90, 2,00 |
| 17 | 46,4 | - | 46,4 | |
| 18 | 41,3 | 3,10 | 52,1 | 3,10 |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O- Ara | | |
| 1 | 103,9 | 4,95, d (7,8) |
| 2 | 79,0 | 4,44 |
| 3 | 75,2 | 3,96 |
| 4 | 67,0 | 4,40 |
| 5 | 64,0 | 3,82, 4,24 |
| | | |
| Glc I | | |
| 1 | 106,2 | 5,12, d (8,3) |
| 2 | 84,0 | 3,98 |
| 3 | 76,8 | 4,04 |
| 4 | 70,7 | 4,01 |
| 5 | 77,2 | 3,68 |
| 6 | 62,0 | 4,18, 4,32 |
| Xyl | | |
| 1 | 103,0 | 5,12, d (7,8) |
| 2 | 76,3 | 3,98 |
| 3 | 72,1 | 4,38 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 19 | 45,9 | 1,15, 1,66 | 39.1 | 0,81, d (4.0) |
| 20 | 30,5 | | 38,7 | 1.34, d (4.2) |
| 21 | 36,4 | 1,68, 1,82 | 36,4 | 1,68, 1,82 |
| 22 | 32,0 | 1,68, 1,78 | 32,0 | 1,68, 1,78 |
| 23 | 16,3 | 0,94 s | 16,3 | 0,94 s |
| 24 | 27,8 | 1,11 s | 27,8 | 1,11 s |
| 25 | 15,1 | 0,77 s | 15,1 | 0,77 s |
| 26 | 17,1 | 1,02 s | 17,1 | 1,02 s |
| 27 | 25,6 | 1,15 s | 25,6 | 1,15 s |
| 28 | 176,5 | - | 176,5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s | 17,0 | 0,84, d (5,4) |
| 30 | 23,3 | 0,77 s | 20,9 | 0,81, d (6,7) |

| | | |
|---|---|---|
| 5 | nd | nd |
| 5 | 66,8 | 3,64, nd |
| 28-O-Glc II | | |
| 1 | 95,1 | 6,08 d (7,3) |
| 2 | 72,9 | 4,05 |
| 3 | 77,7 | 4,18 |
| 4 | 70,1 | 4,22 |
| 5 | 77,2 | 3,99 |
| 6 | 68,7 | 4,22, 4,55 |
| Glc III | | |
| 1 | 103,9 | 4,86 d (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,83 |
| 3 | 75,8 | 4,00 |
| 4 | 77,1 | 4,17 |
| 5 | 76,5 | 3,51 |
| 6 | 60,7 | 3,93, 4,08 |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,62 s l |
| 2 | 71,7 | 4,55 |
| 3 | 71,8 | 4,41 |
| 4 | 73,1 | 4,22 |
| 5 | 69,9 | 4,73 |
| 6 | 17,9 | 1,57 d (5,7) |

### II.1.1.4.6 Composé 121

- *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **121** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1103 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1104 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{88}O_{23}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 941 $[(M–H)–162]^-$, 633 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 471 $[(M–H)–162–146–162–162)]^-$ correspondant à la perte d'un hexose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses et d'un deoxyhexose et de trois hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oïque (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ a permis de distinguer dans la zone des sucres, quatre signaux attribuables aux protons anomériques dont trois résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 5,03 (d, $J$ = 8,1 Hz), 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz), 6,08 (d, $J$ = 8,1 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l). Ces protons montrent des corrélations sur le spectre HSQC avec quatre carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 105,2; 104.0; 95,1 et 102,1; respectivement.

L'analyse détaillée des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres à :

- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I, Glc II) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 5,03 (d, $J$ = 8,1 Hz) et $\delta_H$ 6,08 (d, $J$ = 8,1 Hz), respectivement.
- Un $\beta$-galactopyranosyl dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz).
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l).

  - *Séquençage en C-3*

Les corrélations HMBC observées entre $\delta_H$ 5,03 (d, $J$ = 8,1 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 82,1 (Agly C-3), et NOESY entre $\delta_H$ 5,03 (Glc I H-1) et $\delta_H$ 4,12 (Agly H-3) ont permis d'établir la fixation de Glc I sur Agly C-3.

  - *Séquençage osidique en C-28*

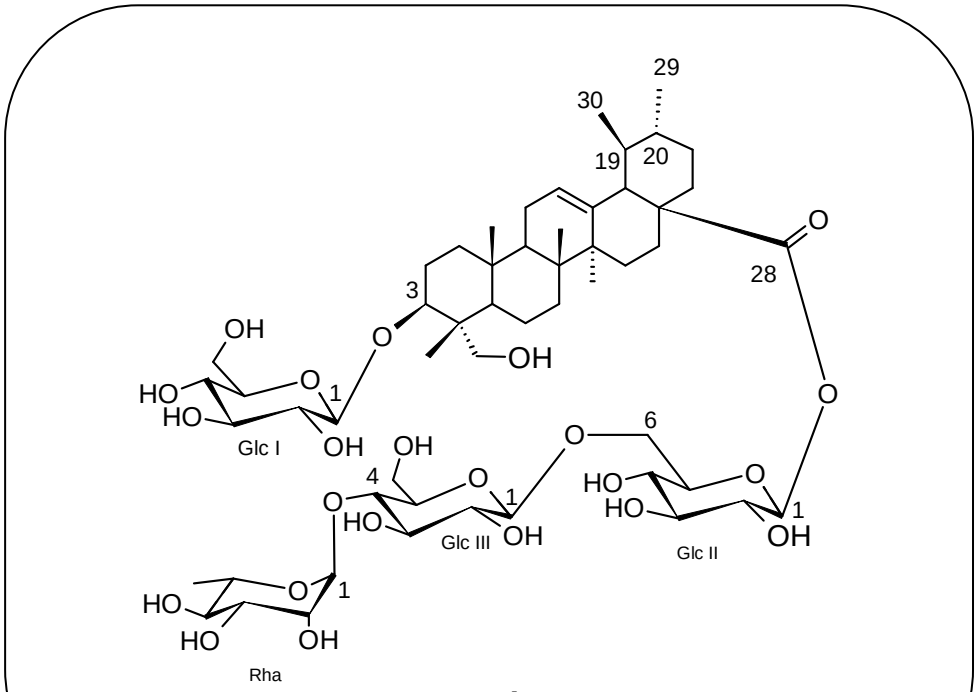
Les corrélations HMBC observées entre :

- $\delta_H$ 5,62 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Glc III C-4), $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc III H-1) et $\delta_C$ 68,7 (Glc II C-6), finalement entre $\delta_H$ 6,08 (d, $J$ = 8,1 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 176,3 (Agly C-28), permettent de proposer la séquence de la chaîne oligosaccharidique en C-28 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl, confirmée par des

corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,62 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,16 (Glc III H-4), puis entre $\delta_H$ 4,86 (Glc III H-1) et $\delta_H$ 4,54 (Glc II H-6a).

- *Conclusion*

Le composé **121** a été élucidé au 3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl acide 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **arboréaside L**. (Kougan et al. en cours)




**<u>121</u>** : **arboréaside L**.

**Tableau 22**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **121**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,2 | 0,84, nd |
| 2 | 25,5 | 1,84, 2,22 |
| 3 | 82,1 | 4,12 |
| 4 | 39.1 | - |
| 5 | 51,0 | 0,62 |
| 6 | 18,1 | 1,22, 1,67 |
| 7 | 33,0 | nd, nd |
| 8 | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,44 |
| 10 | 36,5 | - |
| 11 | 23,3 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 125,6 | 5,36, d (4.3) |
| 13 | 138,1 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,11, 2,16 |
| 16 | 24,1 | 1,90, 2.00 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 52,8 | 2,48, d (11.2) |
| 19 | 39,1 | nd |
| 20 | 38,9 | 1.34, d (4.2) |
| 21 | 30,3 | 1,68, 1,82 |
| 22 | 36,3 | 1,68, 1,79 |
| 23 | 27.8 | 1,11 s |
| 24 | 16,3 | 0,94 s |
| 25 | 15,1 | 0,77 s |
| 26 | 17,1 | 1,02 s |
| 27 | 23,3 | 1,09 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 17,2 | 0,82, d (5,2) |
| 30 | 20,9 | 0,81, d (5,0) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 105,2 | 5,03 d (8,1) |
| 2 | 75,1 | 3,93 |
| 3 | 77,4 | 4,14 |
| 4 | 71,0 | 4,07 |
| 5 | 77,4 | 3,84 |
| 6 | 62,1 | 4,23, 4,38 |
| 28-O-Glc II | | |
| 1 | 95,1 | 6,08, d (8,1) |
| 2 | 73,0 | 4,04 |
| 3 | 77,7 | 4,14 |
| 4 | 70,1 | 4,19 |
| 5 | 77,2 | 3,98 |
| 6 | 68,7 | 4,21, 4,54 |
| Glc III | | |
| 1 | 104,0 | 4,86 d (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,82 |
| 3 | 75,8 | 3,99 |
| 4 | 78,1 | 4,16 |
| 5 | 76,4 | 3,51 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,08 |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,62 s l |
| 2 | 71,8 | 4,54 |
| 3 | 71,9 | 4,41 |
| 4 | 73,1 | 4,21 |
| 5 | 69,9 | 4,72 |
| 6 | 17,9 | 1,55, d (5,8) |

### II.1.1.4.8 Composé 122

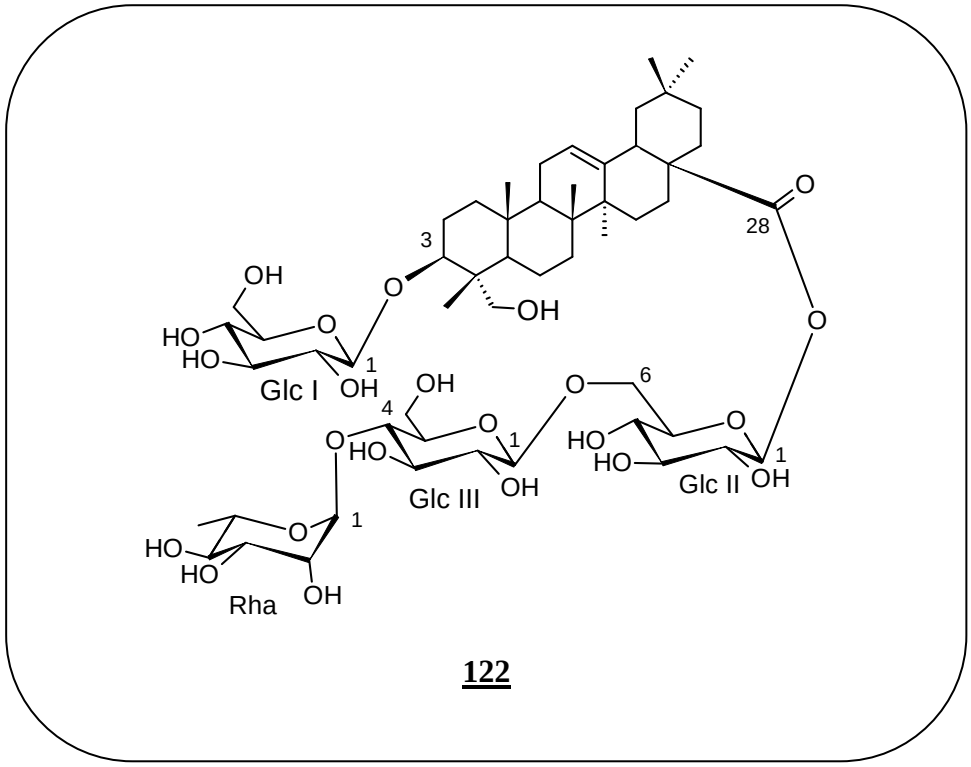
- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **122** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1103 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1104 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{54}H_{88}O_{23}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 941 $[(M–H)–162]^-$, 633 $[(M–H)–146–162–162)]^-$, 471 $[(M–H)–162–146–162–162)]^-$ correspondant à la perte d'un hexose, d'un deoxyhexose et de deux hexoses et d'un deoxyhexose et de trois hexoses respectivement. Le pic observé à *m/z* 471 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone.

L'analyse détaillée des spectres de RMN 1D et 2D montre que le composé **122** diffère du composé **121** que par la partie aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45)

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **122** a été identifié au 3-*O*-*β*-D-glucopyranosylhédéragénine 28-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranoside, précédemment isolé de *Acanthopanax brachypus* et de *Clematis tangutica* (Hu et *al.*, 2009; Zhong et *al*., 2001).




**122**

**Tableau 23:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **122**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,4 | 0,86, 1,44 |
| 2 | 25,5 | 1,81, 2,24 |
| 3 | 82.1 | 4,12 |
| 4 | 42,9 | - |
| 5 | 51,0 | 0.62 |
| 6 | 17,7 | 1,22, 1,67 |
| 7 | 32,7 | 1,22, 1,55 |
| 8 | 39,6 | - |
| 9 | 47,9 | 1,53 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 23,2 | 0,79, 1,82 |
| 12 | 125,6 | 5,35 |
| 13 | 138,1 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,06, 2,24 |
| 16 | 24,1 | 1,85, 1,92 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41.2 | 3.06 |
| 19 | 45.7 | 1,11, 1.62 |
| 20 | 30,3 | - |
| 21 | 36,2 | 1,66, 1.82 |
| 22 | 32,0 | nd, 1,78 |
| 23 | 63,9 | 3,57, 4,18 |
| 24 | 13,2 | 0,84 |
| 25 | 15,7 | 0,84 |
| 26 | 17,1 | 0,99 |
| 27 | 25,7 | 1,11 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0,77 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 105,2 | 5,03, d (8,1) |
| 2 | 75,1 | 3,93 |
| 3 | 77,4 | 4,14 |
| 4 | 71,0 | 4,07 |
| 5 | 77,4 | 3,84 |
| 6 | 62,1 | 4,23, 4,38 |
| 28-O-Glc II | | |
| 1 | 95,1 | 6,01, d (8,1) |
| 2 | 73,0 | 4,04 |
| 3 | 77,7 | 4,16 |
| 4 | 69,9 | 4,21 |
| 5 | 77,2 | 3,99 |
| 6 | 68,7 | 4,22, 4,55 |
| Glc III | | |
| 1 | 104,0 | 4,85, d (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,82 |
| 3 | 75,8 | 3,99 |
| 4 | 78,0 | 4,16 |
| 5 | 76,4 | 3,51 |
| 6 | 60,7 | 3,96, 4,09 |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,62, s l |
| 2 | 71,8 | 4,54 |
| 3 | 71,9 | 4,41 |
| 4 | 73,1 | 4,21 |
| 5 | 69,9 | 4,72 |
| 6 | 17,9 | 1,55, d (5,6) |

**II.1.1.4.7 Composé 123.**

- *Spectrométrie de Masse*

Le spectre de masse du composé **123** en source FAB (mode négatif) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 941 $[M–H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 942 u.m.a en accord avec la formule $C_{48}H_{78}O_{18}$. D'autres pics des ion-fragments ont été observés à *m/z* 795 $[(M–H)–146]^-$, 633 $[(M–H)–146–162]^-$, 471 $[(M–H)–146–162–162]^-$ correspondant à la perte successive d'un deoxyhexose, d'un et deux hexoses. L'ion à *m/z* 471 correspond à l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Nature des sucres*

Sur le spectre RMN $^1H$ du composé **123** on observe la présence de trois protons anomériques qui résonnent à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 8,3 Hz), 5,60 (s l), 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz). Ces protons montrent des taches de corrélations sur le spectre HSQC avec trois carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,0; 102,0 et 95.1, respectivement.

L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D, l'évaluation de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I et Glc II) dont les protons anomériques résonnent à $\delta_H$ 6,00 (d, $J$ = 8.0 Hz) et $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 8.3 Hz).
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 5,60 ppm (s l).

La valeur du carbone à $\delta_C$ 82,1 (Agly C-3) qui montre une corrélation avec le proton à $\delta_H$ 4,01 ppm sur le spectre HSQC permet de conclure qu'il n'ya pas de liaison osidique en C-3 et par conséquent prouve que le composé **123** est une saponine monodesmosidique avec une chaîne de sucres en position 28.

- *Séquençage osidique en C-28.*

L'analyse du spectre HMBC a permis le séquençage des trois unités de sucres. On a observé des taches de corrélations entre :

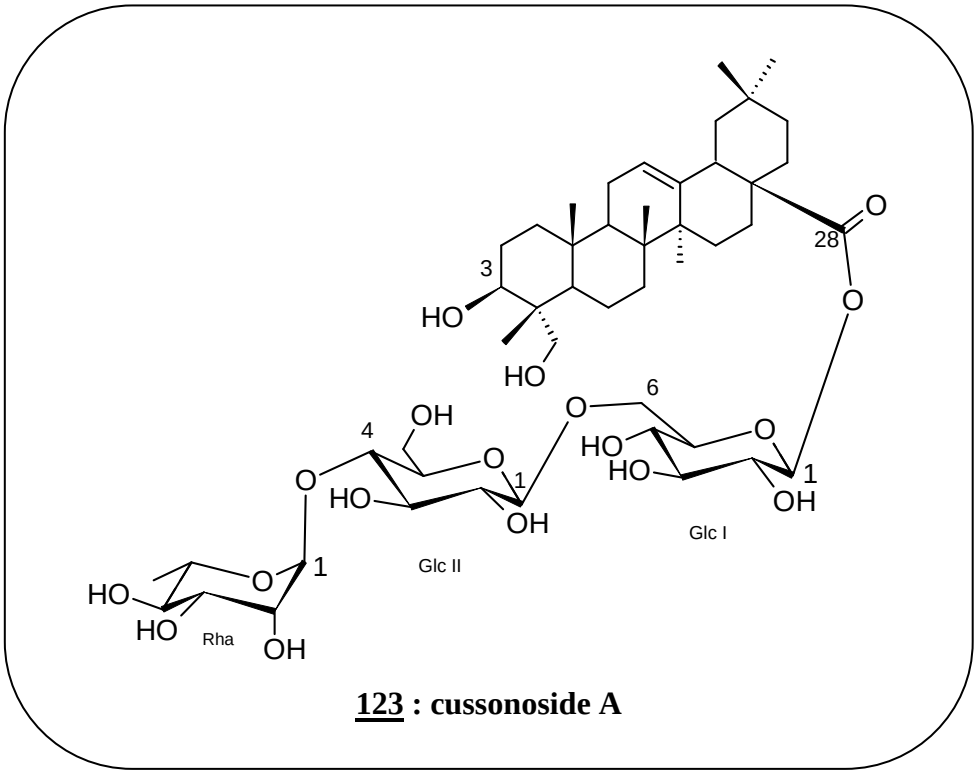
- Le proton anomère à $\delta_H$ 5,60 (s l, Rha H-1) et le carbone à $\delta_C$ 78,0 (Glc II C-4).
- Le proton anomère à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc II H-1) et le carbone à $\delta_C$ 68,6 (Glc I C-6).
- Le proton anomère à $\delta_H$ 6,00 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc I H-1) et le carbone à $\delta_C$ 176,3 (Agly C-28).

Ceci montre que le Rha est lié au Glc II par une liaison (1→4), le Glc II est lié au Glc I par une liaison (1→6) et Glc I est lié à l'aglycone en position 28 par une liaison ester. Cette séquence est confirmée par l'observation de corrélation sur le spectre NOESY entre le proton à $\delta_H$ 5,60 (s l Rha H-1) et le proton à 4,13 (Glc II H-4), entre le proton à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 8,3 Hz, Glc II H-1) et le

proton à $\delta_H$ 4,54 (Glc I H-6a). On peut donc conclure que la chaîne osidique en C-28 est le: *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion.*

Au vu de tous ce qui précède, le composé **123** est identifié à l'hédéragénine 28-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosyl ester dénommé cussonoside A **<u>21</u>**, précédemment isolé de *Cussonia barteri* par Dubois et al. (1986) et de *Cussonia paniculata* par Dovgii et *al*., 2005.




**<u>123</u> : cussonoside A**

**Tableau 24** : Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et des sucres du composé **123**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,4 | 0,84, nd |
| 2 | 25,5 | 1,84, 2,22 |
| 3 | 73,0 | 4,01 |
| 4 | 42,9 | - |
| 5 | 51,0 | 0.62 |
| 6 | 17,7 | 1,22, 1,67 |
| 7 | 32,7 | 1,22, 1,60 |
| 8 | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,55 |
| 10 | 36,3 | - |
| 11 | 23,4 | 1,05, 1,79 |
| 12 | 122,4 | 5,33 |
| 13 | 143,8 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 28,3 | 1,05, 2,24 |
| 16 | 24,1 | 1,74, 1,86 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,2 | 3,10 |
| 19 | 45,8 | 1,11, 1,62 |
| 20 | 30,3 | - |
| 21 | 36,3 | 1,66, 1,81 |
| 22 | 32,0 | nd, 1,78 |
| 23 | 63,9 | 3,57, 4,18 |
| 24 | 13,2 | 0,84, s |
| 25 | 15,7 | 0,84, s |
| 26 | 17,1 | 0,99, s |
| 27 | 25,7 | 1,11, s |
| 28 | 176,3 | - |
| 29 | 32,7 | 0,80, s |
| 30 | 23,3 | 0,79, s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 28-O- Glc I | | |
| 1 | 95,1 | 6,00 (d, *J* = 8,0 Hz) |
| 2 | 72,8 | 4,04 |
| 3 | 77,6 | 4,15 |
| 4 | 70,0 | 4,18 |
| 5 | 77,2 | 3,97 |
| 6 | 68,6 | 4,19, 4,54 |
| Glc II | | |
| 1 | 104,0 | 4,84 (d, *J* = 8,3 Hz) |
| 2 | 74,5 | 3,82 |
| 3 | 75,8 | 3,97 |
| 4 | 78,0 | 4,13 |
| 5 | 76,3 | 3,50 |
| 6 | 60,7 | 3,94, 4,06 |
| Rha | | |
| 1 | 102,0 | 5,60 (s l) |
| 2 | 71,7 | 4,52 |
| 3 | 72,8 | 4,40 |
| 4 | 73,1 | 4,19 |
| 5 | 69,9 | 4,69 |
| 6 | 17,9 | 1,55, d (5,1) |

### II.1.1.4.9 Composé 124

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **124** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1219 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1220 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{59}H_{96}O_{26}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 1057 $[(M–H) –162]^-$, 911 $[(M–H)–162–146]^-$, 749 $[(M–H) –162–146–162]^-$, 587 $[(M–H)–162–146–162–162]^-$, 455 $[(M–H)–162–146–162–162–132]^-$ correspondant à la perte successive d'un deoxyhexose, d'un, de deux et de trois hexoses et d'un pentose. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude des spectres de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres cinq signaux attribuables aux protons anomériques dont quatre résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 5,10 (d, $J$ = 7,8 Hz ), 4,84 (d, $J$ = 6,1 Hz), 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz), 6,08 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,62 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec cinq carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,7; 104,3; 103,9; 95,1 et 102,1; respectivement.

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin ainsi et des déplacements permettent de caractériser:

- deux $\beta$-glucopyranosyl (Glc I, Glc II) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 6,08 (d, $J$ = 8,0 Hz) et $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz), respectivement.
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l).
- Un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 6,1 Hz).
- Un $\beta$-galactopyranosyl (Gal) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,10 (d, $J$ = 7,8 Hz).

  - *Séquençage en C-3*

La corrélation HMBC entre :

- $\delta_H$ 4,84 (Ara H-1) et $\delta_C$ 88,2 (Agly C-3),
- $\delta_H$ 5,10 (Glc I H-1) et $\delta_C$ 79,4 (Ara C-3), et les corrélations observées sur le spectre NOESY entre :
- $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 6,1 Hz, Ara H-1) et $\delta_H$ 3,15 (Agly H-3),
- $\delta_H$ 5,10 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc I H-1) et $\delta_H$ 4,51 (Ara H-3)

ont permis d'établir la séquence des sucres en C-3 comme étant $\beta$-D-glucopyranosyl-(1→3)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl.

- *Séquençage osidique en C-28*

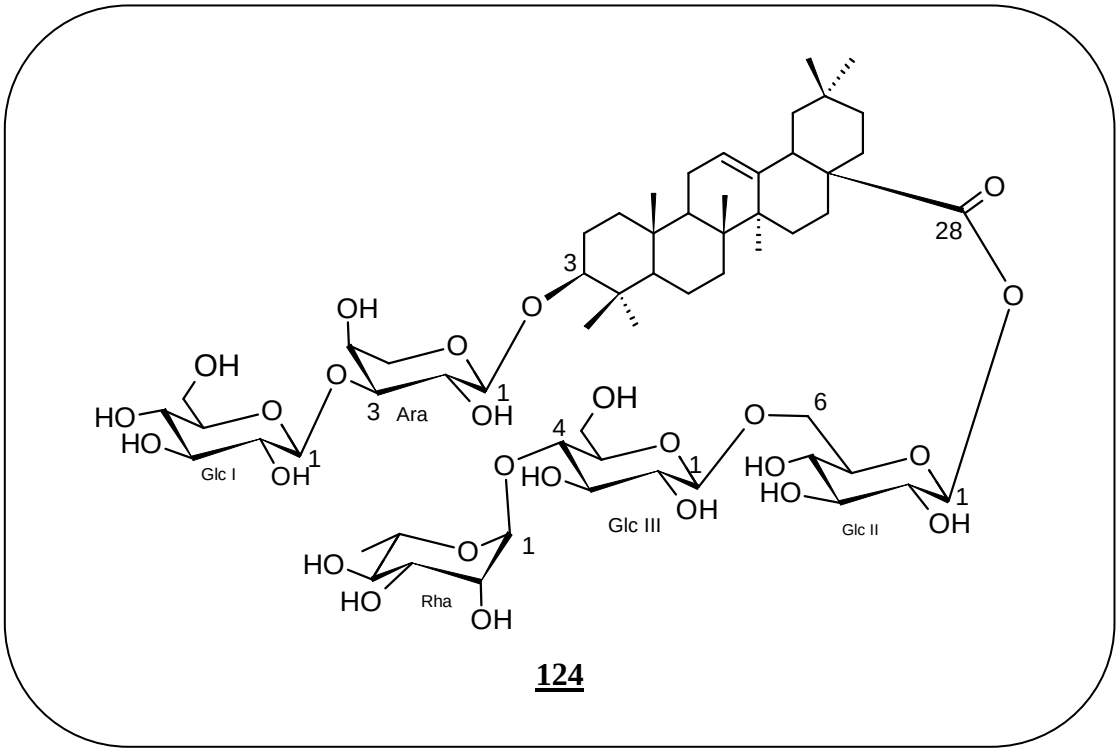
Les corrélations HMBC entre:

- $\delta_H$ 5,62 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,0 (Glc III C-4),
- $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc III H-1) et $\delta_C$ 68,7 (Glc II C-6),

finalement entre $\delta_H$ 6,08 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc II H-1) et $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28), permettent de suggérer la séquence oligosaccharidique en C-28 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl, confirmé par des corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,62 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,16 (Glc III H-4), entre $\delta_H$ 4,86 (Glc III H-1) et $\delta_H$ 4,55 (Glc II H-6a).

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **124** a été identifié au 3-*O*-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→3)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl acide oléanolique 28-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, précédemment isolé de *Meryta denhamii*. (Cioffi et *al.*, 2008; Mimaki et *al.*, 2007).




**124**

**Tableau 25:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **124**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,41 |
| 2 | 26,0 | 1,76, 1,96 |
| 3 | 88,2 | 3,15 |
| 4 | 39,1 | - |
| 5 | 55,4 | 0,62 |
| 6 | 18,1 | 1,15, 1,34 |
| 7 | 33,0 | nd, nd |
| 8 | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,44 |
| 10 | 36,5 | - |
| 11 | 23,3 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 123,8 | 5,34 |
| 13 | 143,6 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,11, 2,18 |
| 16 | 24,1 | 1,90, 2,00 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,3 | 3,10 |
| 19 | 45,9 | 1,15, 1,66 |
| 20 | 30,5 | - |
| 21 | 36,4 | 1,68, 1,82 |
| 22 | 32,0 | 1,68, 1,78 |
| 23 | 16,3 | 0,94 s |
| 24 | 27,8 | 1,11 s |
| 25 | 15,1 | 0,77 s |
| 26 | 17,1 | 1,02 s |
| 27 | 25,6 | 1,15 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,7 | 0,99 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O- Ara | | |
| 1 | 104,3 | 4,84 d (6,1) |
| 2 | 76,4 | 3,51 |
| 3 | 79,4 | 4,51 |
| 4 | 67,8 | 4,30 |
| 5 | 64,5 | 3,74, 4,22 |
| 6 | 104,3 | 4,84 |
| Glc I | | |
| 1 | 104,7 | 5,10 d (7,8) |
| 2 | 75,5 | 3,96 |
| 3 | 77,3 | 4,10 |
| 4 | 70,9 | 4,30 |
| 5 | 77,6 | 3,73 |
| 6 | 62,0 | 4,24, 4,33 |
| 28-O-Glc II | | |
| 1 | 95,1 | 6,08 d (8,0) |
| 2 | 73,1 | 4,04 |
| 3 | 77,7 | 4,16 |
| 4 | 69,9 | 4,21 |
| 5 | 77,3 | 3,99 |
| 6 | 68,7 | 4,22, 4,55 |
| Glc III | | |
| 1 | 103,9 | 4,86 d (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,83 |
| 3 | 75,8 | 4,00 |
| 4 | 78,0 | 4,16 |
| 5 | 76,4 | 3,51 |
| 6 | 60,7 | 3,96, 4,09 |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,62 s l |
| 2 | 71,8 | 4,55 |
| 3 | 71,9 | 4,42 |
| 4 | 73,1 | 4,22 |
| 5 | 69,9 | 4,73 |
| 6 | 17,9 | 1,57 d (6,1) |

### II.1.1.4.10 Composé 125.

- *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **125** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 671 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 672 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{36}H_{66}O_9$. Un autre pic d'un ion fragment a été observé à *m/z* 455 $[(M–H) –176]^-$, correspondant à la perte d'un acide hexosuronique. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN.*

  - *Nature des sucres.*

L'étude de spectre de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres un signal attribuable à un proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 4,83 (*d*, *J* = 8,0 Hz), Ce proton corrèle avec un carbone anomérique qui résonne à $\delta_C$ 106,5 sur le spectre HSQC.

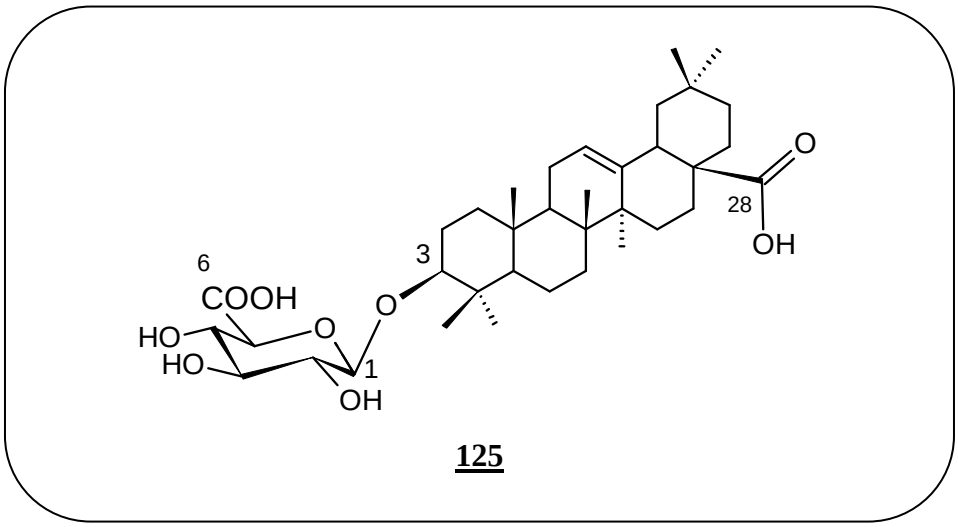
L'analyse des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier un $\beta$-glucuronopyranosyl (GlcA) dont le proton anomère résonne à $\delta_H$ 4,83 (d, *J* = 8,0 Hz).

  - *Séquençage osidique en C-3.*

La substitution d'Agly C-3 par le GlcA terminal a été suggérée par la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique à $\delta_H$ 4,83 (d, *J* = 8,0 Hz, GlcA H-1) et $\delta_C$ 88,2 (Agly C-3). Elle a été confirmée par une corrélation NOESY entre le proton anomérique à $\delta_H$ 4,83 (d, *J* = 8,0 Hz, GlcA H-1) et $\delta_H$ 3,15 (Agly H-3).

- ***Conclusion.***

Au vu de ce qui précède, le composé **125** a été identifié comme étant l'acide oléanolique 3-*O*-$\beta$-D-glucuronopyranoside, précédemment isolé de *Aralia armata* (Hu et al, 1995)




**125**

**Tableau 26**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **125.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,41 |
| 2 | 26,0 | 1,76, 1,96 |
| 3 | 88,2 | 3,15 |
| 4 | 39,1 | - |
| 5 | 55,4 | 0,62 |
| 6 | 18,1 | 1,15, 1,34 |
| 7 | 33,0 | nd, nd |
| 8 | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,44 |
| 10 | 36,5 | - |
| 11 | 23,3 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 123,8 | 5,34 |
| 13 | 143,6 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,11, 2,18 |
| 16 | 24,1 | 1,90, 2,00 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,3 | 3,10 |
| 19 | 45,9 | 1,15, 1,66 |
| 20 | 30,5 | - |
| 21 | 36,4 | 1,68, 1,82 |
| 22 | 32,0 | 1,68, 1,78 |
| 23 | 16,3 | 0,94 s |
| 24 | 27,8 | 1,11 s |
| 25 | 15,1 | 0,77 s |
| 26 | 17,1 | 1,02 s |
| 27 | 25,6 | 1,15 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,7 | 0,99 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-GlcA | | |
| 1 | 106,5 | 4,83 d (8,0) |
| 2 | 75,3 | 3,93 |
| 3 | 78,4 | 4,16 |
| 4 | 71,6 | 3,93 |
| 5 | 64,5 | 4,26 |
| 6 | 169,0 | - |

### II.1.1.4.11 Composé 126

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **126** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1249 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 1250 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{60}H_{98}O_{27}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 1087 $[(M–H) –162]^-$; 941 $[(M–H) –162–146]^-$, 779 $[(M–H) –162–146–162]^-$, 455 $[(M–H)–162–146–162–162–324]^-$, correspondant à la perte d'un hexose, d'un hexose et d'un deoxyhexose, de deux hexoses et d'un deoxyhexose, et de quatre hexoses et d'un deoxyhexose respectivement. Le pic observé à *m/z* 455 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide oléanolique (voir paragraphe 2, p 45).

- *Spectroscopie RMN*

  - Nature des sucres.

L'étude du spectre de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres cinq signaux attribuables aux protons anomériques dont quatre résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 5,30 (d, $J$ = 7,8 Hz ), $\delta_H$ 4,78 (d, $J$ = 7,8 Hz ), 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz), 6,01 (d, $J$ = 8,0 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,62 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec cinq carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 104,4; 104,5; 103,9; 95,2 et 102,1; respectivement.

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques a permis de caractériser :

- quatre $\beta$-glucopyranosyl (Glc I, Glc II, Glc III, Glc IV) dont les protons anomères résonnent à $\delta_H$ 4,78 (d, $J$ = 7,8 Hz), $\delta_H$ 5,30 (d, $J$ = 7,8 Hz), $\delta_H$ 6,01 (d, $J$ = 8,0 Hz) et $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz), respectivement.
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique à $\delta_H$ 5,62 ppm (s l).

  - *Séquençage en C-3*

- La corrélation HMBC entre :
- $\delta_H$ 5,30 (Glc II H-1) et $\delta_C$ 81,6 (Glc I C-2),
- $\delta_H$ 4,78 (Glc I H-1) et $\delta_C$ 89,2 (Agly C-3),

et les corrélations observées sur le spectre NOESY entre :

- $\delta_H$ 5,30 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc II H-1) et $\delta_H$ 4,20 (Glc I H-2)
- $\delta_H$ 4,78 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc I H-1) et $\delta_H$ 3,22 (Agly H-3),

ont permis d'établir la séquence des sucres en C-3 comme étant $\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)- $\beta$-D-glucopyranosyl.

- *Séquençage osidique en C-28*

Les corrélations HMBC entre :

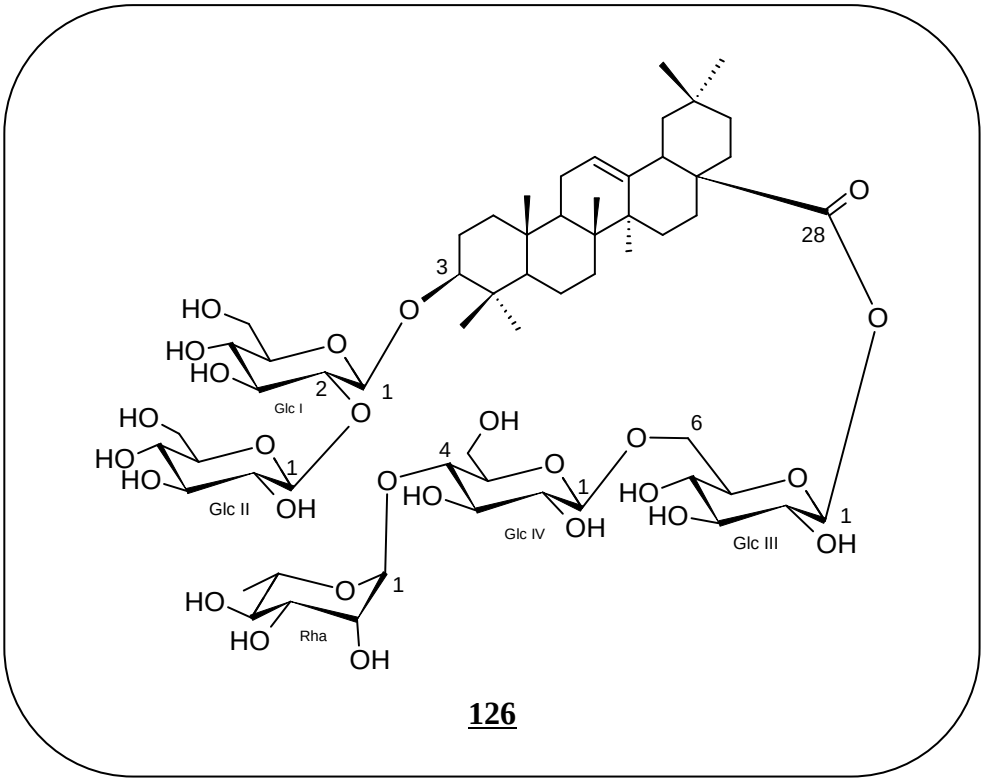
- $\delta_H$ 5,62 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 78,0 (Glc IV C-4),
- $\delta_H$ 4,86 (d, $J$ = 7,6 Hz, Glc IV H-1) et $\delta_C$ 68,7 (Glc III C-6),

finalement entre $\delta_H$ 6,01 (d, $J$ = 8,0 Hz, Glc III H-1) et $\delta_C$ 176,5 (Agly C-28),

ont suggéré la séquence oligosaccharidique en C-28 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranosyl, confirmé par l'observation des corrélations NOESY entre $\delta_H$ 5,62 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,16 (Glc IV H-4), entre $\delta_H$ 4,86 (Glc IV H-1) et $\delta_H$ 4,55 (Glc III H-6a).

- *Conclusion*

Au vu de ce qui précède le composé **126** a été identifié au 3-*O*-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→2)-$\beta$-D-glucopyranosylacide oléanolique 28-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, précédemment isolé de *Pulsatilla patens* par Ye et *al.* (1999).




**126**

**Tableau 27**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **126.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,6 | 0,78, 1,41 |
| 2 | 26,0 | 1,76, 1,96 |
| 3 | 89,2 | 3,22 |
| 4 | 39,1 | - |
| 5 | 55,4 | 0,62 |
| 6 | 18,1 | 1,15, 1,34 |
| 7 | 33,0 | nd, nd |
| 8 | 39,4 | - |
| 9 | 47,6 | 1,44 |
| 10 | 36,5 | - |
| 11 | 23,3 | 0,99, 1,81 |
| 12 | 123,8 | 5,34 |
| 13 | 143,6 | - |
| 14 | 42,1 | - |
| 15 | 27,8 | 1,11, 2,18 |
| 16 | 24,1 | 1,90, 2,00 |
| 17 | 46,7 | - |
| 18 | 41,3 | 3,10 |
| 19 | 45,9 | 1,15, 1,66 |
| 20 | 30,5 | - |
| 21 | 36,4 | 1,68, 1,82 |
| 22 | 32,0 | 1,68, 1,78 |
| 23 | 16,3 | 0,94 s |
| 24 | 27,8 | 1,11 s |
| 25 | 15,1 | 0,77 s |
| 26 | 17,1 | 1,02 s |
| 27 | 25,6 | 1,15 s |
| 28 | 176,5 | - |
| 29 | 32,7 | 0,82 s |
| 30 | 23,3 | 0,77 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc I | | |
| 1 | 104,4 | 4,78 d (7,8) |
| 2 | 81,6 | 4,20 |
| 3 | 77,2 | 4,14 |
| 4 | 70,1 | 4,07 |
| 5 | 76,2 | 3,51 |
| 6 | 62,2 | 4,24, 4,33 |
| Glc II | | |
| 1 | 104,5 | 5,30 d (7,8) |
| 2 | 75,2 | 3,99 |
| 3 | 77,2 | 4,15 |
| 4 | 70,9 | 4,09 |
| 5 | 77,3 | 3,84 |
| 6 | 62,2 | 4,24, 4,41 |
| 28-O-Glc III | | |
| 1 | 95,2 | 6,01 (8,0) |
| 2 | 73,1 | 4,04 |
| 3 | 77,7 | 4,16 |
| 4 | 69,9 | 4,21 |
| 5 | 77,3 | 3,99 |
| 6 | 68,7 | 4,22, 4,55 |
| Glc IV | | |
| 1 | 103,9 | 4,86 (7,6) |
| 2 | 74,5 | 3,83 |
| 3 | 75,8 | 4,00 |
| 4 | 78,0 | 4,16 |
| 5 | 76,4 | 3,51 |
| 6 | 60,7 | 3,96, 4,09 |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,62 s l |
| 2 | 71,8 | 4,55 |
| 3 | 71,9 | 4,42 |
| 4 | 73,1 | 4,22 |
| 5 | 69,9 | 4,73 |
| 6 | 17,9 | 1,57 d (5,8) |

**II.1.2** ***Dracaena deisteliana*** engl.

**II.1.2.1** isolement et purification

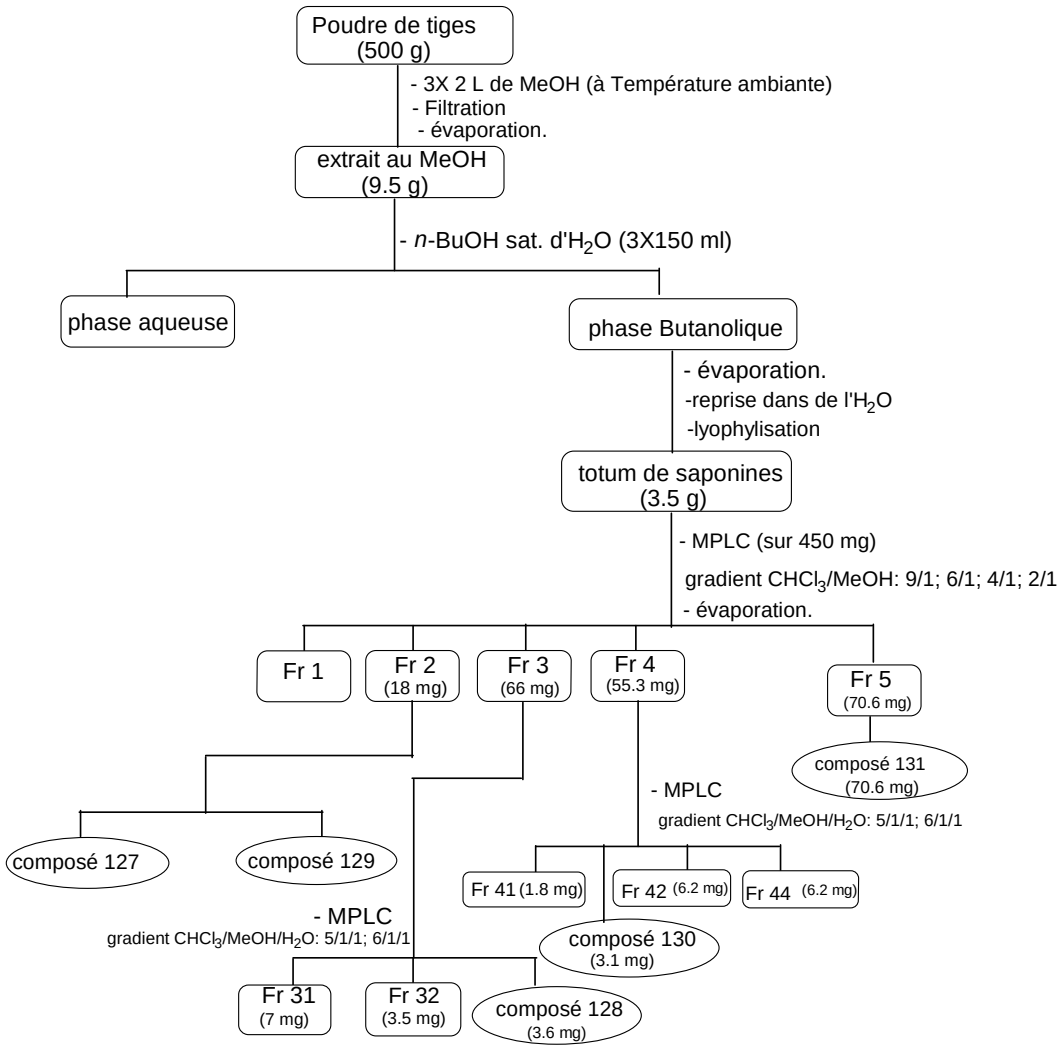



**Figure 19**: Schéma d'extraction et de purification des tiges de *D. deisteliana*

**II.1.2.2** Elucidation structurale des composés **(<u>127</u> – <u>131</u>)**

- *Nature des aglycones*

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D du composé **<u>127</u>**, en particulier l'étude des corrélations observées sur les spectres HSQC et HMBC, comparée avec les données de la littérature a permis d'identifier l'aglycone de ce composé comme étant la diosgénine (Nakano et al, 1989).

Les spectres RMN $^{13}C$ en mode DEPT des composés **<u>128</u>, <u>129</u>, <u>130</u> et <u>131</u>** montrent trois carbones primaires ($CH_3$), dix carbones secondaires ($CH_2$), neuf carbones tertiaires (CH) et cinq carbones quaternaires. L'examen des spectres RMN $^{1}H$ révèle la présence des signaux de trois méthyles, des signaux de carbones oléfiniques à $\delta_C$ 109,3 et dans la zone 123-153 ppm

caractéristiques d'un squelette $\Delta^{5,25(27)}$-spirostène. Tous les protons et carbones de la génine ont été attribués par l'analyse des spectres HSQC et HMBC. La comparaison de ces valeurs et de celles de la littérature nous a permis d'identifier les génines à la néoruscogénine (De Combarieu et *al*., 2002, Mimaki et *al*., 1996).

**II.1.2.2.1 Composé 127**

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **127** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 801 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 802 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{39}H_{62}O_{15}S$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 655 $[(M–H)–146]^-$, 97 $[OSO_3H]^-$, 80 $[SO_3]^-$.

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres deux signaux attribuables aux protons anomériques dont le premier résonne à $\delta_H$ 4,83 (d, $J$ = 7,8 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 5,72 (s l). Ces protons anomériques corrèlent sur le spectre HSQC avec deux carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 101,8 et 102,1 respectivement.

L'analyse détaillée des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser:

- un $\beta$-glucopyranosyl (Glc) avec le proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 4,83 (d, $J$ = 7,8 Hz).
- un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 5,72 ppm (s l).

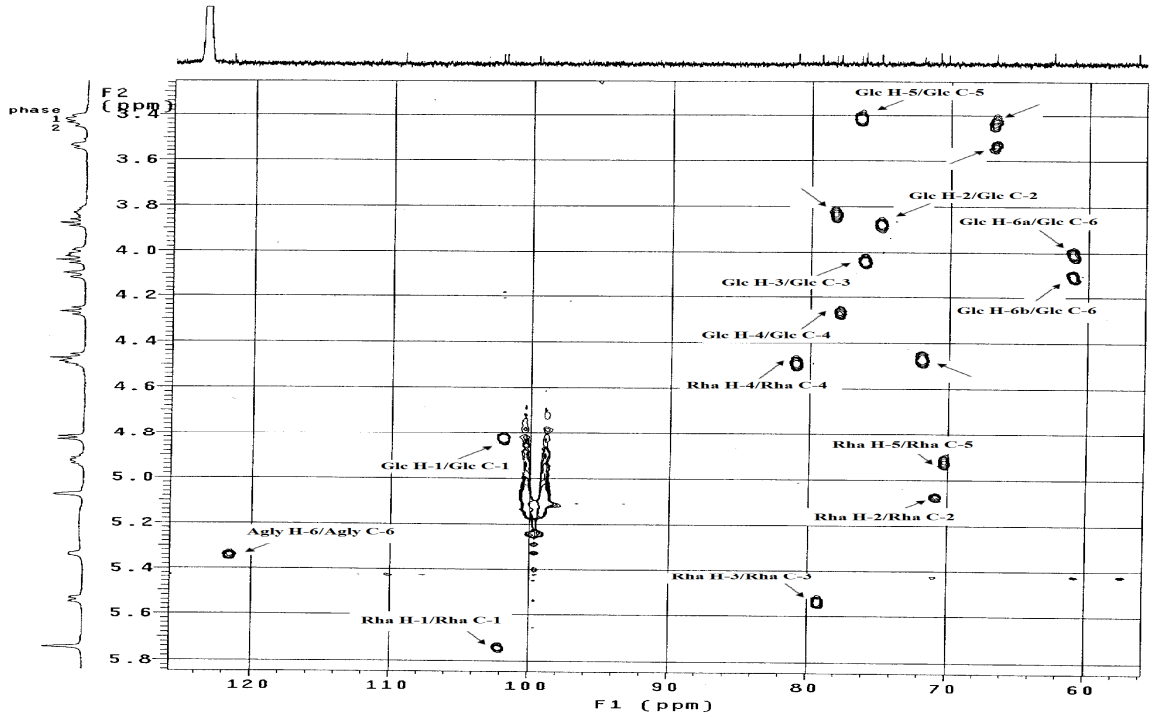



**Figure 20:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **127**

- *Séquençage en C-3*

L'observation des taches de corrélation dans le spectre HMBC entre les signaux à:

- $\delta_H$ 4,83 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Agly C-3),
- $\delta_H$ 5,72 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 77,8 (Glc C-4),

montre que le Rha est lié au Glc par une liaison (1→4) et le Glc est lié à l'aglycone en position C-3. Ceci est confirmé par l'observation des corrélations sur le spectre NOESY entre les signaux à:

- $\delta_H$ 4,83 (Glc H-1) et $\delta_H$ 3,83 (Agly H-3),
- $\delta_H$ 5,72 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,27 (Glc H-4).

L'expérience TOCSY montre à partir du proton anomère à $\delta_H$ 5,72 (s l, Rha H-1) deux taches de corrélation à $\delta_H$ 5,07 (Rha H-2) et $\delta_H$ 5,54 (Rha H-3). Ces protons déblindés montrent ainsi qu'il est acylé en position 3. Cette observation est confirmée par des taches de corrélations dans le spectre COSY entre le proton à $\delta_H$ 5,72 (Rha H-1) et $\delta_H$ 5,07 (Rha H-2), entre $\delta_H$ 5,07 (Rha H-2) et $\delta_H$ 5,54 (Rha H-3) et enfin entre $\delta_H$ 5,54 (Rha H-3) et 4,48 (Rha H-4).

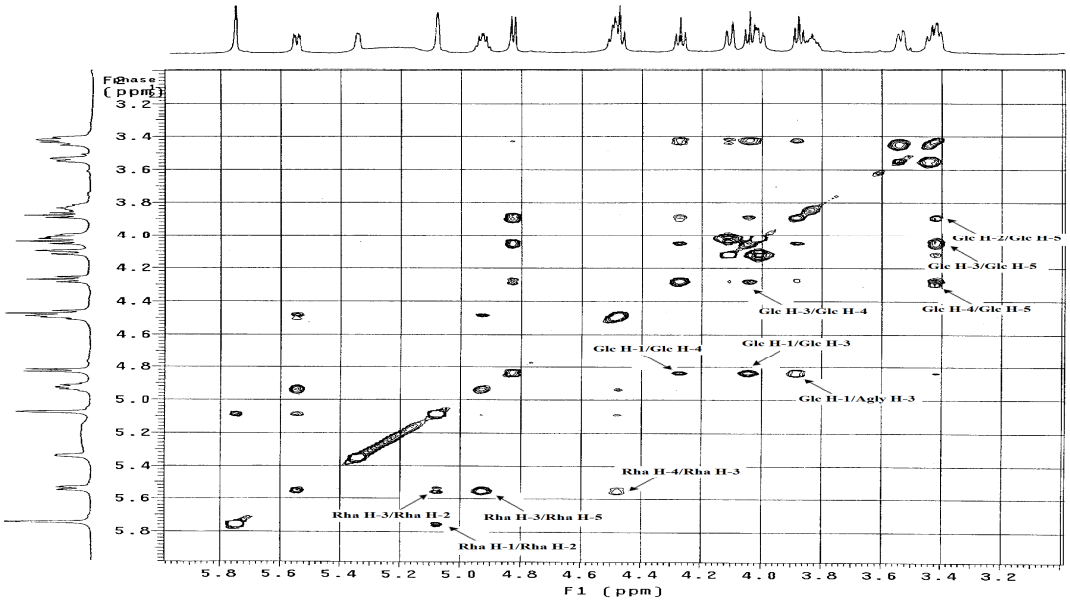
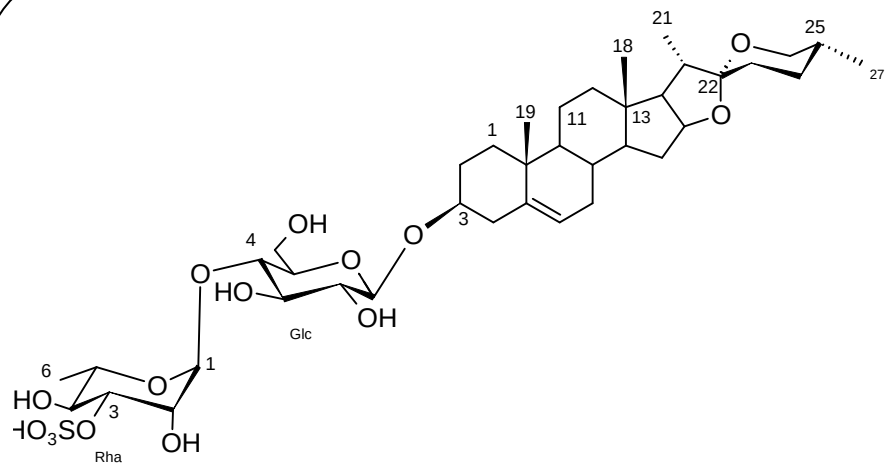



**Figure 21:** Spectre TOCSY de la partie osidique du composé **127**

L'absence des corrélations entre ces protons et un carbonyle dans le spectre HMBC permet d'affirmer que le substituant ne contient pas de carbone. L'observation de deux pics à m/z 97 $[OSO_3H]^-$, 80 $[SO_3]^-$ a permis d'identifier le substituant comme étant le sulfate. Ces données ont permis d'établir la séquence des sucres en C-3 comme étant [3-*O*-sulfate]-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données ci-dessus a permis d'élucider le composé **127** à la diosgénine 3-*O*-[3-*O*-sulfate]-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glucopyranoside, nouveau composé naturel dénommé **deistélianoside A** (Kougan et *al.*, 2010a).




**<u>127</u> deistélianoside A** (Kougan et al. 2010a)

**Tableau 28:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **127.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,1 | 09,2 t (10,7); 1,64 |
| 2 | 29,8 | 1,65; 2,03 d (11,6) |
| 3 | 78,1 | 3,83 m |
| 4 | 38,4 | 2,41 d (11,9); 2,70 d (13,3) |
| 5 | 140,6 | - |
| 6 | 121,5 | 5,34 s |
| 7 | 31,8 | 1,82 d (10,9) |
| | | 1,99 m |
| 8 | 31,3 | 1,44m |
| 9 | 49,9 | 0,82 |
| 10 | 36,7 | - |
| 11 | 20,3 | 1,35 ; nd |
| 12 | 39,5 | 1,04 d (4,0); 1,63 |
| 13 | 40,1 | - |
| 14 | 56,3 | 1,02 |
| 15 | 31,9 | 1,73; 1,96 m |
| 16 | 80,9 | 4,46 t (7,5) |
| 17 | 62,4 | 1,76 t (7,5) |
| 18 | 16,0 | 0,76 s |
| 19 | 19,1 | 0,84 s |
| 20 | 41,7 | 1,90 t (6,7) |
| 21 | 14,7 | 1,08 (d, 7,4) |
| 22 | 109,6 | - |
| 23 | 31,4 | 1,62 d (3,3); 1,64 |
| 24 | 28,9 | 1,52 m; nd |
| 25 | 30,2 | 1,25 m |
| 26 | 66,6 | 3,43 d (10,7) |
| | | 3,53 d (8,5) |
| 27 | 17,0 | 0,63 d (5,0) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O-Glc | | |
| 1 | 101,8 | 4,83 d (7,8) |
| 2 | 74,9 | 3,88 t (8,6) |
| 3 | 76,0 | 4,04 t (9,0) |
| 4 | 77,8 | 4,27 t (9,2) |
| 5 | 76,3 | 3,41 t (9,0) |
| 6 | 60,9 | 4,00 dd (3,5, 11,7) |
| | | 4,11 d (11,7) |
| Rha | | |
| 1 | 102,1 | 5,72 s l |
| 2 | 70,6 | 5,07 s |
| 3 | 79,2 | 5,54 dd (2,8, 9,3) |
| 4 | 71,8 | 4,48 d (4,7) |
| 5 | 70,0 | 4,92 d (3,1) |
| 6 | 18,1 | 1,58 (d, 5,9) |

### II.1.2.2.2 Composé 128

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source ESI (mode négatif) du composé **128** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 1015 $[M-H]^-$ suggérant une masse de 1016 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{49}H_{76}O_{22}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 883 $[(M-H)-132]^-$, *m/z* 737 $[(M-H)-132-146]^-$, *m/z* 591 $[(M-H)-132-146-146]^-$, *m/z* 461$[(M-H)-132-146-146-132]^-$ correspondant à la perte de deux pentose et de deux deoxyhexoses. Le pic à *m/z* 461 correspond au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone.

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature de la génine*

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D et $^{13}C$ du composé **128**, en particulier l'étude des corrélations observées sur les spectres HSQC et HMBC, comparait avec les données de la littérature permet d'identifier l'aglycone de ce composé comme étant la (23S, 24S)-spirosta-5, 25(27)-diene-1$\beta$, 3$\beta$, 23$\alpha$, 24$\alpha$-tetrol (Mimaki et al, 1996).

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre de RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres quatre signaux attribuables aux protons anomériques résonnant à $\delta_H$ 4,69 (d, $J$ = 7,3 Hz), $\delta_H$ 4,95 (d, $J$ = 7,3 Hz), $\delta_H$ 6,26 (s l), $\delta_H$ 5,11 (d, $J$ = 8,1 Hz) et corrèlent dans le spectre HSQC des carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 100,5; 106,4; 101,7 et 106,3 respectivement.

L'analyse des spectres de RMN 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin ainsi que des déplacements chimique permet de caractériser :

- un $\beta$-xylopyranosyl (Xyl) dont le proton anomèrique résonne à $\delta_H$ 4,95 (d, $J$ = 7,3 Hz).
- un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 6,26 (s l).
- un $\beta$-fucopyranosyl (Fuc) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,69 (d, $J$ = 7,3 Hz).
- un $\alpha$-Arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 5,11 (d, $J$ = 8,1 Hz).

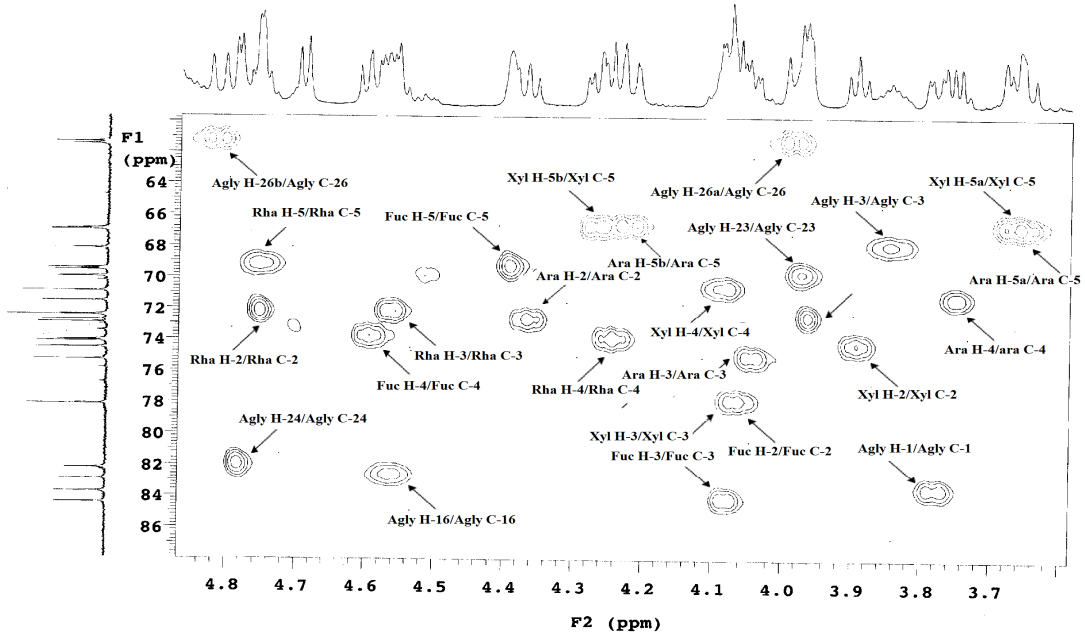



**Figure 22:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **128**

- *Séquençage en C-1*

L'observation des corrélations entre les signaux à:

- $\delta_H$ 4,69 (d, $J$ = 7,3 Hz, Fuc H-1) et $\delta_C$ 83,8 (Agly C-1),
- $\delta_H$ 6,26 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 84,4 (Fuc C-3),
- $\delta_H$ 4,95 (d, $J$ = 7,3 Hz, Xyl H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Fuc C-2)

montre que le Rha est lié au Fuc par une liaison (1→4), puis le Xyl au Fuc par liaison (1→2) et enfin le Fuc à l'aglycone en C-1.

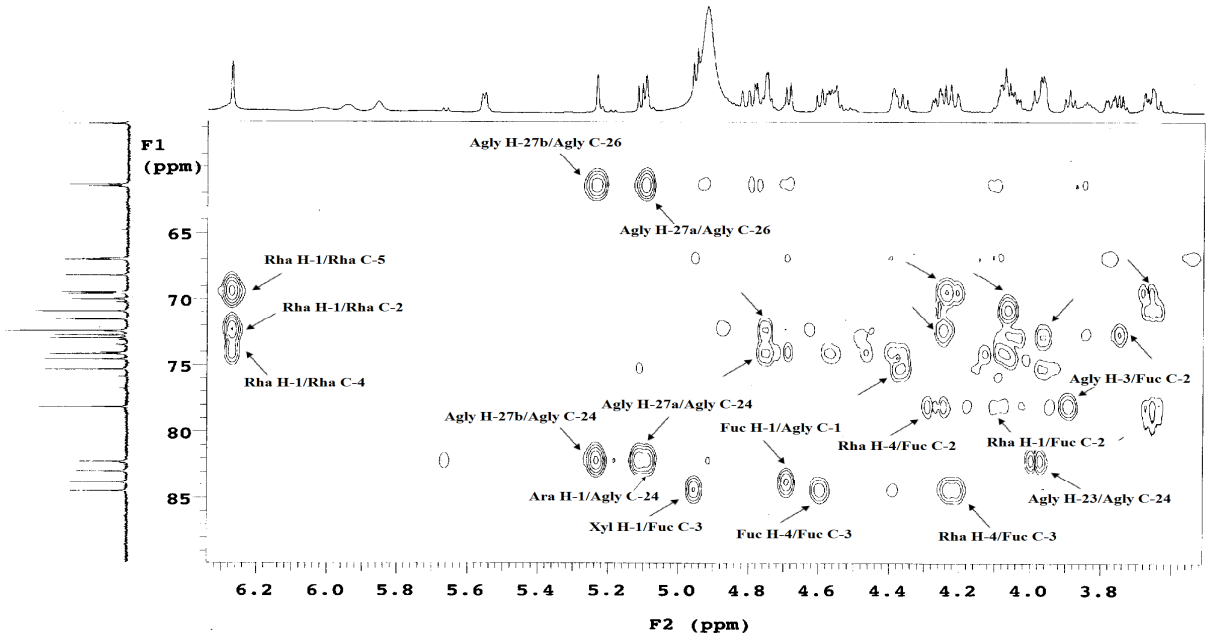



**Figure 23:** Spectres HMBC de la partie osidique du composé **128**

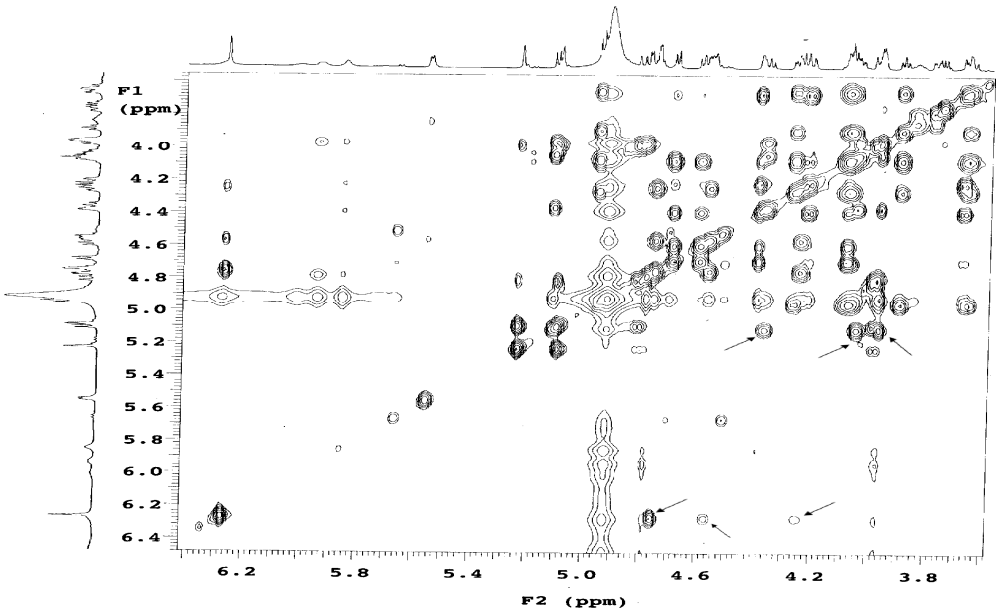



**Figure 24:** Spectre TOCSY de la partie osidique du composé **128**

Celle-ci est confirmée par l'observation des corrélations sur le spectre NOESY entre les signaux des protons à:

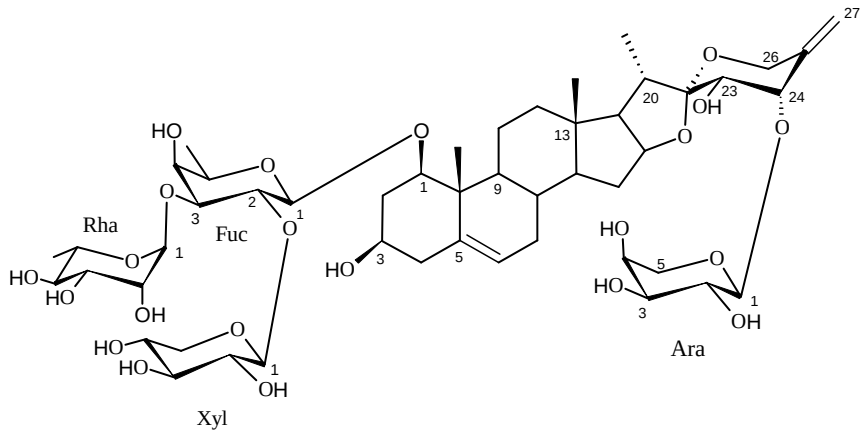
- $\delta_H$ 4,69 (d, *J* = 7,8 Hz, Fuc H-1) et $\delta_H$ 3,77 (Agly H-3),
- $\delta_H$ 6,26 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,07 (Fuc H-3),
- $\delta_H$ 4,95 (Xyl H-1) et $\delta_H$ 4,05 (Fuc H-2) qui ont permis d'établir la séquence des sucres en C-1 comme étant $\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-$\beta$-D-fucopyranosyl.

➢ *Séquençage en C-24*

La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal du proton anomérique à $\delta_H$ 5,11 (d, *J* = 8,1 Hz, Ara H-1) et le signal du carbone à $\delta_C$ 82,2 (Agly C-24) d'une part, et la corrélation dans le spectre ROESY entre ce proton anomérique à $\delta_H$ 5,11 (Ara H-1) et 4,78 (Agly H-24) d'autre part, ont permis de lier l'Ara en position 24 de l'aglycone.

➢ *Conclusion*

L'ensemble des données ci-dessus a permis d'élucider le composé **128** comme étant 1-*O*-$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→2)-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-$\beta$-D-fucopyranosyl (23S, 24S)-spirosta-5,25(27)-diene-1$\beta$, 3$\beta$, 23$\alpha$, 24$\alpha$-tetrol 24-*O*-$\alpha$-L-arabinopyranoside, un nouveau composé naturel dénommé **deistélianoside B** (Kougan et *al.,* 2010a).




**<u>128</u> deistélianoside B** (Kougan et al. 2010a)

**<u>Tableau 29</u>**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **128**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 83,8 | 3,77 dd (4,0, 12,1) |
| 2 | 37,4 | 2,33 q (11,8) |
| | | 2,70 m |
| 3 | 68,3 | 3,84 m |
| 4 | 43,8 | 2,54 dd (4,0, 12,1) |
| | | 2,66 brd (11,7) |
| 5 | 139,6 | - |
| 6 | 124,6 | 5,55 s |
| 7 | 31,8 | 1,46 |
| | | 1,74 m |
| 8 | 32,9 | 1,48 |
| 9 | 50,3 | 1,51 d (2,0) |
| 10 | 42,8 | - |
| 11 | 23,9 | 1,54 d (5,3) |
| | | 2,88 brd (12,6) |
| 12 | 40,6 | 1,27 m, 1,57 |
| 13 | 40,4 | - |
| 14 | 56,7 | 1,09 m |
| 15 | 32,3 | 1,23 m, 1,56 |
| 16 | 82,9 | 4,57 |
| 17 | 61,3 | 1,70 d (7,3) |
| 18 | 15,0 | 1,37 s |
| 19 | 16,7 | 0,92 s |
| 20 | 37,4 | 2,83 t (6,9) |
| 21 | 14,6 | 1,05 d (6,9) |
| 22 | 111,7 | - |
| 23 | 70,0 | 3,97 d (4,4) |
| 24 | 82,2 | 4,78 d (4,0) |
| 25 | 143,5 | - |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1-O- Fuc | | |
| 1 | 100,5 | 4,69, (d, 7,3 Hz) |
| 2 | 78,1 | 4,05 d (3,6) |
| 3 | 84,4 | 4,07 |
| 4 | 73,4 | 4,59 t (8,9) |
| 5 | 69,4 | 4,39 t (8,5) |
| 6 | 17,1 | 1,46 d (6,5) |
| Xyl | | |
| 1 | 106,4 | 4,95 d (7,3) |
| 2 | 74,0 | 3,89 t (7,9) |
| 3 | 78,1 | 4,07 |
| 4 | 69,5 | 4,39 |
| 5 | 67,0 | 3,67 d (4,8) |
| | | 4,25 m |
| Rha | | |
| 1 | 101,7 | 6,26 s l |
| 2 | 72,4 | 4,75 |
| 3 | 72,4 | 4,57 m |
| 4 | 73,4 | 4,24 d (9,3) |
| 5 | 69,4 | 4,75 m |
| 6 | 19,0 | 1,68 d (6,1) |
| 24-O-Ara | | |
| 1 | 106,3 | 5,11 d (8,1) |
| 2 | 72,7 | 4,37 t (8,5) |
| 3 | 74,5 | 4,04 d (3,2) |
| 4 | 71,5 | 3,74 d (6,5) |
| 5 | 66,9 | 3,62 |
| | | 4,21 |

| | | |
|---|---|---|
| 26 | 61,4 | 3,99,<br>4,81 d (11,7) |
| 27 | 113,8 | 5,09, s l<br>5,23, s l |

### II.1.2.2.3 Composé 129

- *Spectrométrie de masse.*

L'analyse du spectre de masse du composé **129** montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 559 $[M–H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 560 u.m.a. Cette masse moléculaire est en accord avec la formule brute $C_{32}H_{48}O_8$. Le pic à *m/z* 427 correspond au pic de l'aglycone, notamment la néoruscogénine (voir paragraphe 2, p 100).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Identification du sucre*

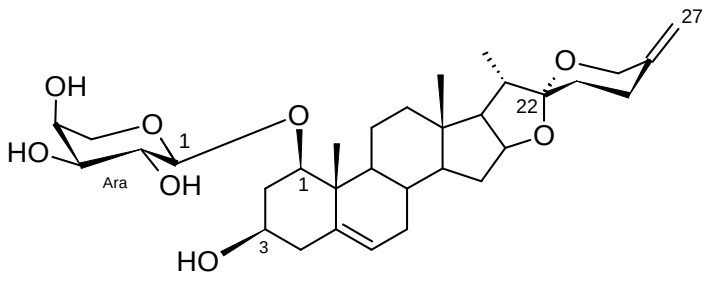
Sur le spectre RMN $^1H$, on observe le signal d'un proton anomérique à $\delta_H$ 4,68 (d, $J$ = 7,4 Hz) qui corrèle avec un carbone anomérique à $\delta_C$ 101,5. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier un résidu *α*-L-arabinopyranosyl (Ara).

  - *Séquençage en position 1*

Dans le spectre HMBC, on observe une tache de corrélation entre le signal du proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 4,68 (d, $J$ = 7,4 Hz, Ara H-1) et le carbone qui résonne à $\delta_C$ 82,7 (Agly C-1) suggérant la liaison osidique. Cette information est confirmée par l'observation de la corrélation entre $\delta_H$ 4,68 (d, $J$ = 7,4 Hz, Ara H-1) et $\delta_H$ 3,74 (dd, $J$ = 3,5; 11,6 Hz, Agly H-1) dans le spectre NOESY. Ces observations nous ont permis d'établir la séquence de la chaîne monosacharidique en position 1 de la génine comme étant 1-*O*-*α*-L-arabinopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes a permis d'identifier le composé **129** à la néoruscogénine 1-*O*-*α*-L-arabinopyranoside, précédemment isolé de *Ruccus aculeatus* par De Combarieu et al (2002).




**129** De Combarieu et al (2002)

**Tableau 30**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **129.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 82,7 | 3,74 (dd, 3,5, 11,6) |
| 2 | 36,6 | 2,07 (dd, 4,0, 14,5) |
| | | 2,76 (t, 14,5) |
| 3 | 67,8 | 3,81 (t, 7,5) |
| 4 | 42,9 | 2,55 (d, 11,5) |
| | | 2,59 (d, 11,9) |
| 5 | 139,4 | - |
| 6 | 123,6 | 5,28 (s) |
| 7 | 31,9 | 1,82 |
| | | 1,95 |
| 8 | 31,9 | 1,42 |
| 9 | 49,9 | 1,34 |
| 10 | 42,5 | - |
| 11 | 23,4 | 1,40, 2,78 |
| 12 | 39,8 | 1,17, 1,49 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 56,3 | 1,00 |
| 15 | 31,7 | 1,42, 1,45 |
| 16 | 81,2 | 4,45 |
| 17 | 62,4 | 1,67 |
| 18 | 16,2 | 0,74 s |
| 19 | 14,3 | 1,12 s |
| 20 | 41,5 | 1,86 (d, 7,3) |
| 21 | 14,3 | 0,95 (d, 7,4) |
| 22 | 109,3 | - |
| 23 | 32,6 | 1,67, 1,70 |
| 24 | 28,5 | 1,23, 2,21 |
| 25 | 152,8 | - |
| 26 | 64,6 | 3,97 (dd, 11,1, 11,6) |
| | | 4,38 (dd, 4,5, 11,1) |
| 27 | 109,9 | 4,72, s |
| | | 4,76, s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1-O- Ara | | |
| 1 | 101,5 | 4,68 (d, 7,4) |
| 2 | 72,0 | 4,30 |
| 3 | 74,0 | 4,08 (t, 9,0) |
| 4 | 69,0 | 4,22 |
| 5 | 67,0 | 3,62 |
| | | 4,21 |

### II.2.2.4 Composé 130

- *Spectrométrie de masse*

Le spectre de masse FAB (en mode négatif) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 705 $[M–H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 706 u.m.a et conforme à la formule moléculaire $C_{38}H_{58}O_{12}$. D'autres importants pics de fragments d'ions ont été observés à *m/z* 559 $[(M–H)–146]^-$, 427 $[(M–H)–132–146]^-$ correspondant à la perte successive d'un deoxyhexose et d'un pentose, respectivement. Le pic à *m/z* 427 correspond au pic de l'aglycone, notamment la néoruscogénine (voir paragraphe 2, p 100).

- *Nature des sucres*

L'étude du spectre RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres deux signaux attribuables aux protons anomériques dont un résonne à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 6,18 ppm. Ces protons corrèlent avec deux carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 100,3 et 101,2; respectivement.

L'analyse du spectre RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques permettent de caractériser :

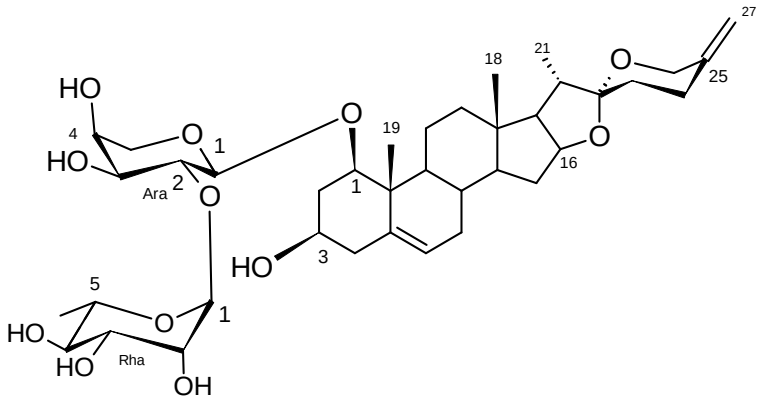
- Un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton à $\delta_H$ 6,18 ppm (s l).
- Un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz).

- *Séquençage en C-1*

Les corrélations HMBC entre les signaux à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 83,8 (Agly C-1), à $\delta_H$ 6,18 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 74,8 (Ara C-2), ainsi que les corrélations observées entre les signaux à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_H$ 3,68 (Agly H-1), 6,18 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,44 (Ara H-2) sur le spectre NOESY ont permis d'établir la séquence des sucres en C-1 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl (1→2)-$\alpha$-L-arabinopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes a permis d'identifier le composé **130** au néoruscogénine 1-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-$\alpha$-L-arabinopyranoside, précédemment isolé de S*anseviera trifasciata* par Mimaki et *al.* (1996).




**130** Mimaki et al. (1996)

**Tableau 31:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **130.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 83,8 | 3,68 |
| 2 | 36,8 | 2,29; 2,69 |
| 3 | 67,7 | 3,78 |
| 4 | 43,5 | 2,33; 2,64 |
| 5 | 139,0 | - |
| 6 | 124,5 | 5,49 |
| 7 | 31,9 | 1,94 1,98 |
| 8 | 32,7 | 1,44 |
| 9 | 50,0 | 1,39 |
| 10 | 42,5 | - |
| 11 | 23,6 | 1,50 ; 2,86 |
| 12 | 39,8 | 1,22 ; 1,47 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 56,4 | 1,04 |
| 15 | 32,8 | 1,70 ; 1,73 |
| 16 | 81,2 | 4,46 |
| 17 | 62,5 | 1,67 |
| 18 | 16,3 | 0,76 s |
| 19 | 14,7 | 1,34 s |
| 20 | 41,5 | 1,86 |
| 21 | 14,6 | 0,95 (d, 7,4) |
| 22 | 109,3 | - |
| 23 | 32,6 | 1,86, nd |
| 24 | 28,5 | 2,19, 2,64 |
| 25 | 143,9 | - |
| 26 | 64,7 | 3,97 ; 4,38 |
| 27 | 108,6 | 4,72 s |
| | | 4,76 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1-*O*- Ara | | |
| 1 | 100,3 | 4,55 d (7,8) |
| 2 | 74,8 | 4,44 |
| 3 | 75,4 | 4,05 t (9,0) |
| 4 | 69,0 | 4,14 |
| 5 | 67,0 | 3,61 |
| | | 4,18 |
| Rha | | |
| 1 | 101,2 | 6,18 s l |
| 2 | 71,9 | 4,66 |
| 3 | 72,8 | 4,54 |
| 4 | 73,6 | 4, 24 |
| 5 | 69,6 | 4,74 |
| 6 | 18,6 | 1,64 d (5,9) |

### II.1.2.2.5 Composé 131

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **131** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 837 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 838 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{43}H_{66}O_{16}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à *m/z* 705 $[(M–H)–132]^-$, 559 $[(M–H)–132–146]^-$, 427 $[(M–H)–132–146–132]^-$ correspondant à la perte d'un pentose, d'un pentose et d'un deoxyhexose, et de deux pentoses et d'un deoxyhexose, respectivement. Le pic observé à *m/z* 427 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone.

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre de RMN $^1$H permet de distinguer dans la zone des sucres trois signaux attribuables aux protons anomériques dont deux résonnent sous formes de doublets à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz ), $\delta_H$ 4,97 (d, $J$ = 7,8 Hz ) et le dernier sous forme d'un singulet large à $\delta_H$ 6,18 ppm. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec trois carbones anomériques résonnant à $\delta_C$ 100,3; 106,4 et 101,2 respectivement.

L'analyse détaillé des spectres RMN 1D et 2D, l'évaluation des constantes de couplages spin-spin ainsi que des déplacements chimiques permettent de caractériser :

-un $\alpha$-rhamnopyranosyl (Rha) avec un proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 6,18 (s l).

-un $\alpha$-arabinopyranosyl (Ara) avec le proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz).

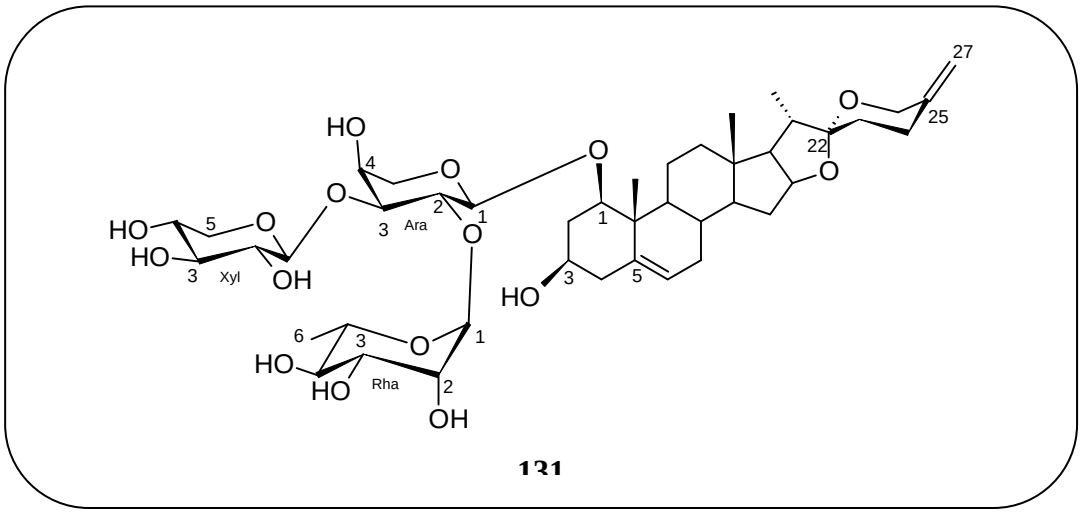
-un xylopyranosyl (Xyl) avec le proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 4,97 (d, $J$ = 7,8 Hz).

  - *Séquençage en C-1*

La corrélation HMBC entre les signaux à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_C$ 83,8 (Agly C-1), $\delta_H$ 6,18 (s l, Rha H-1) et $\delta_C$ 74,8 (Ara C-2), $\delta_H$ 4,97 (Xyl H-1) et $\delta_C$ 84,4 (Ara C-3), d'une part, et les corrélations observées sur le spectre NOESY entre les signaux à $\delta_H$ 4,55 (d, $J$ = 7,8 Hz, Ara H-1) et $\delta_H$ 3,68 (Agly H-1), $\delta_H$ 6,18 (Rha H-1) et $\delta_H$ 4,44 (Ara H-2), $\delta_H$ 4,97 (Xyl H-1) et $\delta_H$ 4,11 (Ara H-3), ont permis d'établir la séquence des sucres en C-1 comme étant $\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→3)]-$\alpha$-L-arabinopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes a permis d'identifier le composé **131** au néoruscogénine 1-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→3)]-$\alpha$-L-arabinopyranoside, précédemment isolé de *Nolina recurvata* par Mimaki et *al.* (1996).




**131**

**Tableau 32:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **131.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 83,8 | 3,68 |
| 2 | 36,8 | 2,29; 2,69 |
| 3 | 67,7 | 3,78 |
| 4 | 43,5 | 2,33; 2,64 |
| 5 | 139,0 | - |
| 6 | 124,5 | 5,49 |
| 7 | 31,9 | 1,94, 1,98 |
| 8 | 32,7 | 1,44 |
| 9 | 50,0 | 1,39 |
| 10 | 42,5 | - |
| 11 | 23,6 | 1,50 ; 2,86 |
| 12 | 39,8 | 1,22 ; 1,47 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 56,4 | 1,04 |
| 15 | 32,8 | 1,70 ; 1,73 |
| 16 | 81,2 | 4,46 |
| 17 | 62,5 | 1,67 |
| 18 | 16,3 | 0,76 s |
| 19 | 14,7 | 1,34 s |
| 20 | 41,5 | 1,86 |
| 21 | 14,6 | 0,95 (d, 7,4) |
| 22 | 109,3 | - |
| 23 | 32,6 | 1,86, nd |
| 24 | 28,5 | 2,19, 2,64 |
| 25 | 143,9 | - |
| 26 | 64,7 | 3,97 |
| | | 4,38 |
| 27 | 108,6 | 4,72 s |
| | | 4,76 s |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1-O- Ara | | |
| 1 | 100,3 | 4,55 (d, 7,8) |
| 2 | 74,8 | 4,44 |
| 3 | 84,4 | 4,11 (t, 9,0) |
| 4 | 69.0 | 4.14 |
| 5 | 67,0 | 3,61 |
| | | 4,18 |
| Rha | | |
| 1 | 101,2 | 6,18 s l |
| 2 | 71,9 | 4,66 |
| 3 | 72,8 | 4,54 |
| 4 | 73,6 | 4, 24 |
| 5 | 69,6 | 4,74 |
| 6 | 18,6 | 1,64 (d, 5,9) |
| Xyl | | |
| 1 | 106,4 | 4,97 (d, 7,8) |
| 2 | 74,6 | 3,90 |
| 3 | 78,2 | 4,06 |
| 4 | 70,9 | 3,09 |
| 5 | 66,9 | 3,68 |
| | | 4,28 |

### II.1.3 *Dracaena arborea* (Willd.). (Publication 2)

#### II.1.3.1 Extraction et isolement

Les écorces de *D. arborea*, séchées et réduites en poudre fine ont été extraites à l'aide du méthanol, après évaporation à sec, le résidu obtenu a été dissoute dans l'eau puis partagé contre le n-butanol saturé d'eau. La phase butanolique obtenue, évaporée à sec, a été reprise dans de l'eau et lyophilisée donnant ainsi l'extrait brut de saponines. Une prise de 450 mg de cet extrait a été soumise à des MPLC successives sur silice normale et en phase inverse (gradient MeOH-$H_2O$) conduisant à l'isolement d'une sapogénine et de cinq saponines dont deux nouvelles.

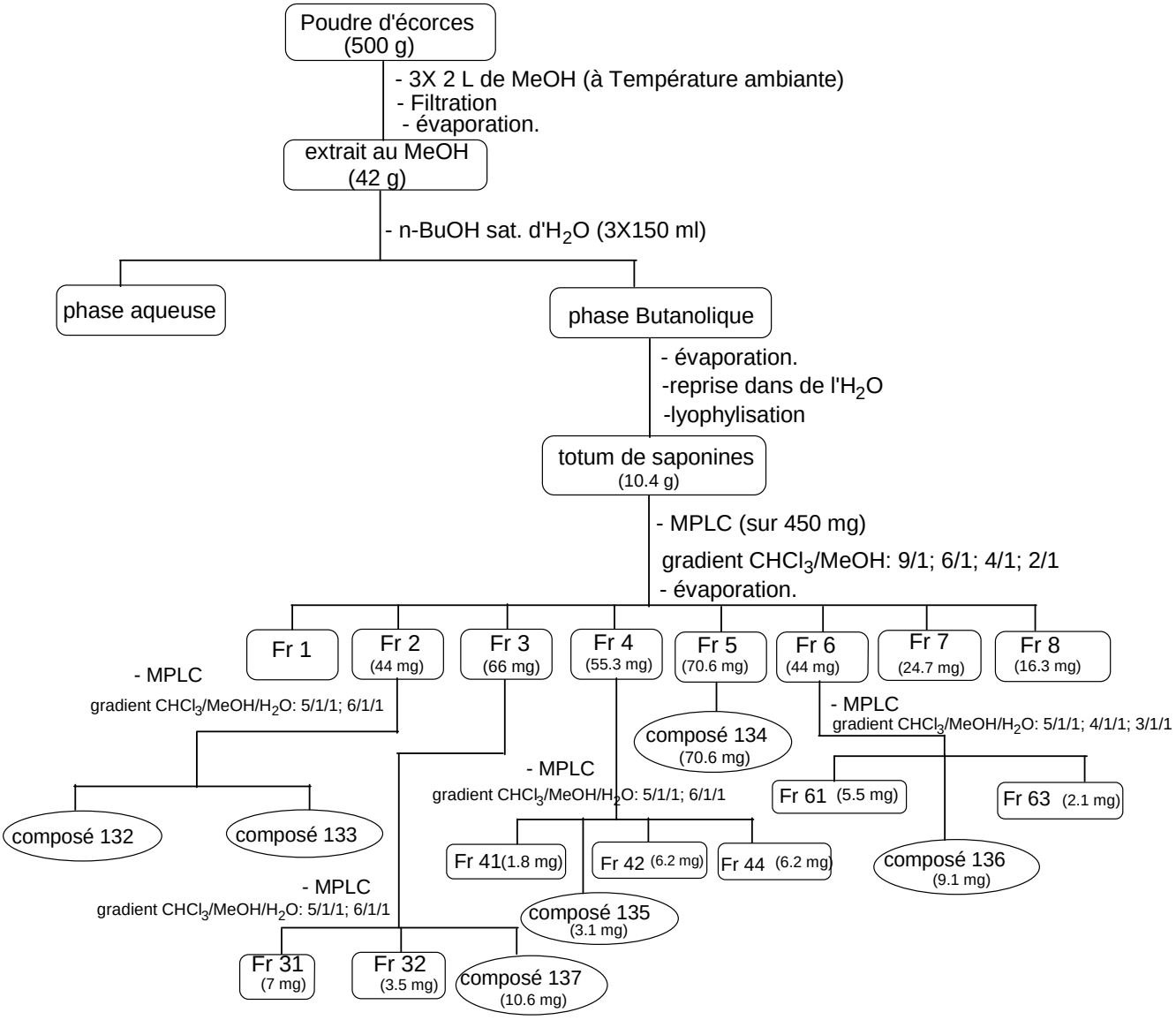



**Figure 25**: Protocole d'extraction et de purification des écorces de *D. arborea*

**II.1.3.2** Elucidation structurale des composés **(132 – 137)**

- ***Nature des aglycones***

L'analyse des spectres de RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ combinés avec les spectres DEPT et HSQC des composés isolés des écorces de *D. arborea*, permet de mettre en évidence la présence de quatre méthyles caractéristiques à $\delta_H$ 0,61 (d, $J$ = 5,2 Hz), 1.18 (d, $J$ = 7,6 Hz), 0,84 s, 0,88 s. Du spectre RMN $^{13}C$, on observe un carbone quaternaire résonnant à $\delta_C$ 109,8 (C-22) et deux carbones oléfiniques à $\delta_C$ 121,5 (C-6) et 140,5 (C-5), indiquant la présence d'un squelette stéroïdique de type spirostanol (Agrawal et *al.*, 1985). D'autre part, on observe deux signaux superposables de carbones à $\delta$c 89,8 (C-16) et 89,9 (C-17). Le signal du proton à $\delta_H$ 4.41 assigné à H-16 montre une corrélation avec le signal du carbone quaternaire à $\delta_C$ 89,9 et une autre avec le carbone tertiaire à $\delta_C$ 44.5 (C-20) dans le spectre HMBC, confirmant ainsi la présence du groupement hydroxyle en C-17. Par comparaison des valeurs de déplacements chimiques attribués avec celle de la littérature, l'aglycone a été identifié à la pénnogénine. (Deng et *al.*, 2008; Woo et *al*., 1998).

**II.1.3.2.1 Composé 132**

- *Spectrométrie de masse*

Le spectre de masse FAB (en mode négatif) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 925 $[M–H]^-$, conforme à la formule moléculaire $C_{47}H_{74}O_{18,}$ indiquant un poids moléculaire de 926 u.m.a. D'autres importants pics de fragments d'ions ont été observés à m/z 883 $[(M–H)– 42]^-$, 737$[(M–H) – 42–146]^-$, 429 $[(M–H) – 42–146–146–162]^-$ correspondant à la perte successive d'un acétyle, d'un deoxyhexose, d'un deoxyhexose et d'un hexose. Le pic à m/z 429 correspond au pic de l'aglycone, notamment la pénnogénine.

- *Spectroscopie RMN*

L'étude du spectre RMN $^{1}H$ du composé **132** permet de distinguer dans la zone des sucres, trois signaux de protons anomériques qui résonnent à $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,8 Hz), 5,70 (s l) et 5,63 (s l). Ces protons corrèlent avec trois carbones anomériques à 99,7, $\delta_C$ 103.3 et 102.1 respectivement sur le spectre HSQC.

L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D, l'évaluation des constantes de couplage spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

- Un β-glucopyranosyl dont le proton anomérique résonne à $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,8 Hz).
- Deux α-rhamnopyranosyl dont les protons anomériques résonnent à $\delta_H$ 5,70 (s l) et $\delta_H$ 5,63 (s l), respectivement.

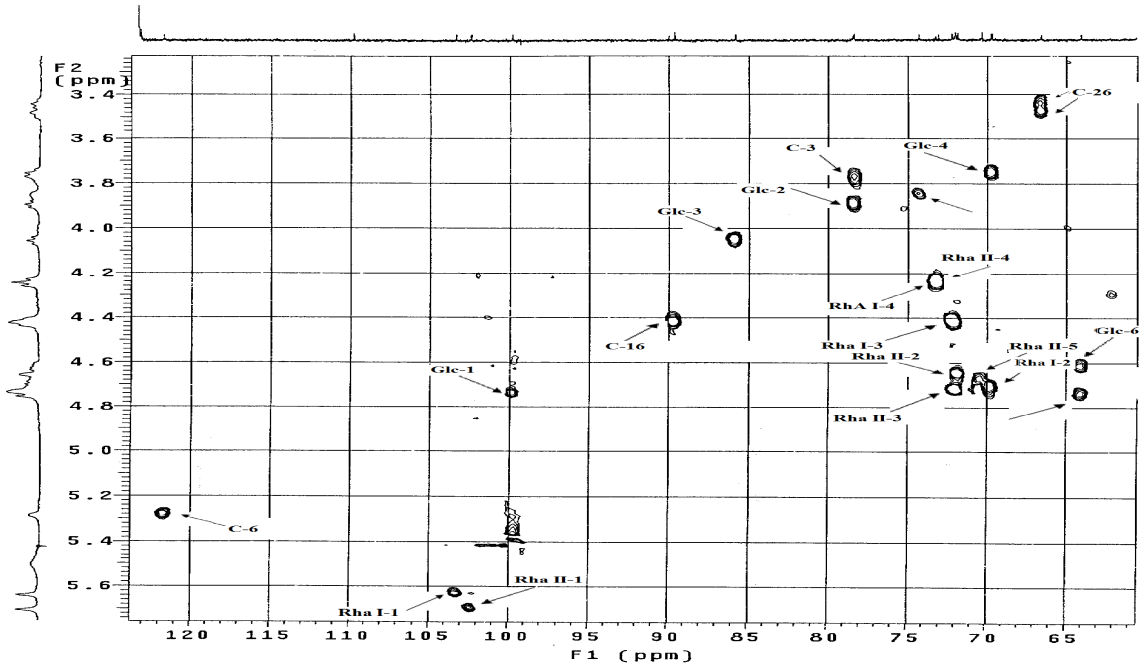



**Figure 26:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **132**

Des corrélations $^{1}H$-$^{13}C$ observées sur le spectre HMBC entre le signal du proton anomérique à $\delta_H$ 5,70 (s l, Rha I H-1) et le signal de carbone à $\delta_C$ 78,3 (Glc C-2), puis entre $\delta_H$ 5,63 (s l, Rha II H-1) et $\delta_C$ 85.7 (Glc C-3) et enfin entre $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Agly C-3).

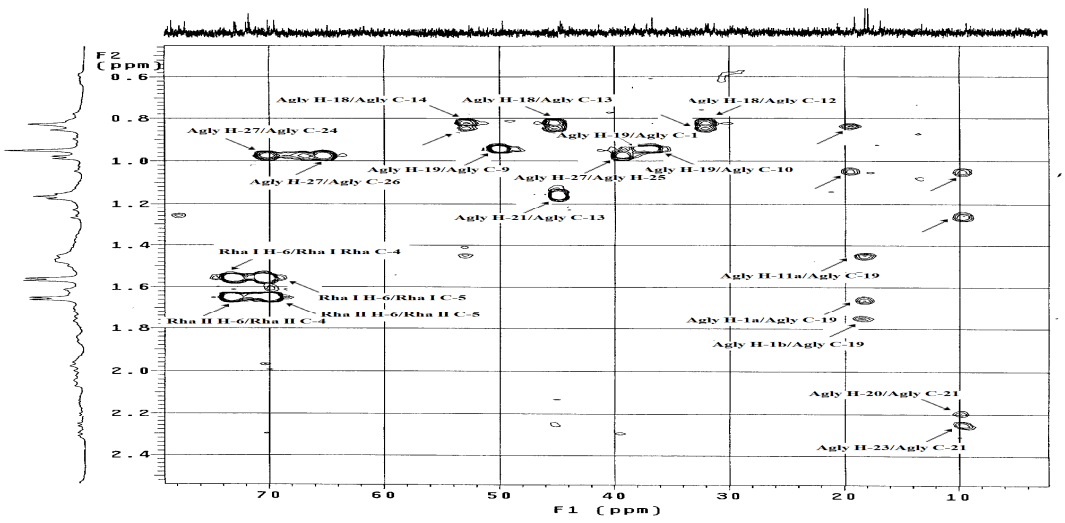


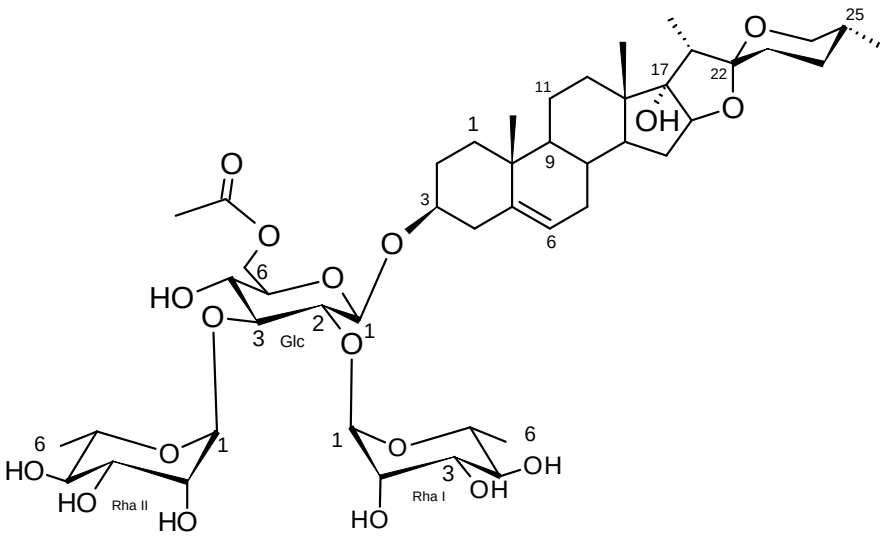

**Figure 27:** Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **132**

Les signaux déblindés des protons résonnant à $\delta_H$ 4,62 (Glc H-6a) et 4,73 (Glc H-6b), respectivement, suggère que l'acylation de la fonction alcool primaire en C-6 de Glc. Ceci est confirmé d'une part, par la valeur du signal de Glc C-6 déblindé à $\delta_C$ 63,9 et d'autre part par l'observation de corrélations sur le spectre HMBC entre les signaux RMN des protons H-6a et H-6b ($\delta_H$ 4,62 et 4,73) et le carbone du carbonyle du groupe acétyle à $\delta_C$ 170,9. Ces informations

suggèrent la séquence de la chaîne du sucre en C-3 comme étant *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-*β*-D-glucopyranosyl. Cette séquence est confirmée par l'observation des corrélations sur le spectre NOESY entre les signaux de RMN $^{1}$H entre le proton anomérique résonnant à $\delta_H$ 5,70 (s l, Rha I H-1) et $\delta_H$ 3.90 (Glc H-2), entre $\delta_H$ 5,64 (s l, Rha II H-1) et $\delta_H$ 4.05 (Glc H-3) et entre $\delta_H$ 4,73 (Glc H-1) et $\delta_H$ 3,77 (Agly H-3).

- ***Conclusion***

En conséquence, le composé **132** a été élucidée à la pénnogénine-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-[6-*O*-acétyl]-*β*-D-glucopyranoside, nouveau produit naturel dénommé **arboréasaponine A** (Kougan et *al.*, 2010a).




**<u>132</u>** arboréasaponine A (Kougan et al. 2010a).

**Tableau 33** : Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **132**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,2 | 0,92, 1,60 |
| 2 | 29,7 | 1,62, 2,04 |
| 3 | 78,1 | 3,77 |
| 4 | 38,8 | 2,34, 2,58 |
| 5 | 140,5 | - |
| 6 | 121,5 | 5,23 |
| 7 | 31,8 | 1,54, 1,94 |
| 8 | 31,9 | 1,48 |
| 9 | 49,8 | 0,84 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 20,6 | 1,44, 1,46 |
| 12 | 32,0 | 1,86, 2,16 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 52,8 | 1,98 |
| 15 | 31,4 | 1,43, 2,14 |
| 16 | 89,8 | 4,41 |
| 17 | 89,9 | - |
| 18 | 16,8 | 0,88 s |
| 19 | 19,7 | 0,84 s |
| 20 | 44,5 | 2,21 |
| 21 | 09,4 | 1,18 d (7,6) |
| 22 | 109,8 | - |
| 23 | 31,7 | 2,16, 1,64 |
| 24 | 28,4 | nd, 1,58 |
| 25 | 30,4 | 1,52 |
| 26 | 66,4 | 3,43, 3,48 |
| 27 | 16,9 | 0,61 d (5,7) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| Glc | | |
| 1 | 99,7 | 4,73 d (7,8) |
| 2 | 78,3 | 3,90 |
| 3 | 85,7 | 4,05 t (9,0) |
| 4 | 69,6 | 3,76 |
| 5 | 78,3 | 3,90 |
| 6 | 63,9 | 4,62 d (5,2), 4,73 |
| $\underline{CH_3}$-CO | 20,4 | 1,94 (s l) |
| $CH_3$-$\underline{C}O$ | 170,9 | - |
| Rha I | | |
| 1 | 103,3 | 5,70 s l |
| 2 | 71,9 | 4,75 |
| 3 | 72,1 | 4,41 |
| 4 | 72,9 | 4, 24 |
| 5 | 70,2 | 4,65 |
| 6 | 18,0 | 1,58 d (5,9) |
| Rha II | | |
| 1 | 102,1 | 5,63 s l |
| 2 | 71,7 | 4,64 |
| 3 | 71,9 | 4,72 |
| 4 | 72,9 | 4,24 t (9,2) |
| 5 | 69,4 | 4,70 m |
| 6 | 18,1 | 1,66 d (5,9) |

### II.1.3.2.2 Composé 133

- *Spectrométrie de masse.*

Le spectre de masse FAB (en mode négatif) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 899[M – H]$^-$, conforme à la formule moléculaire $C_{45}H_{72}O_{18,}$ indiquant un poids moléculaire de 900 u.m.a. D'autres importants pics de fragments d'ions ont été observés à *m/z* 753 [(M–H)–146]$^-$, 445 [(M–H)–146–146–162]$^-$ correspondant à la perte successive deux deoxyhexoses et un hexose, respectivement. Le pic à *m/z* 445 correspond au pic de l'aglycone.

- *Spectroscopie RMN*

Une comparaison des déplacements chimiques de **132** et **133** obtenus à partir de données RMN 1D et 2D a montré que la plupart des signaux de ces deux composés sont superposables, sauf ceux du cycle F de la partie aglycone de **133.** Des différences significatives de déplacements chimiques à $\delta_C$ 112,1; 41,2; 70,0; 39,0; 64,8 et 13,0 indiquant la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire. Son emplacement et sa configuration a été attribué par l'analyse spectrale. En effet, sur le spectre HMBC, on observe des corrélations entre le groupe de protons résonnant à $\delta_H$ 0,98 (d, *J* = 6,4 Hz, Me-27) et les carbones à $\delta_C$ 70,0 (C-24), 39,0 (C-25), 64,8 (C-26), respectivement.

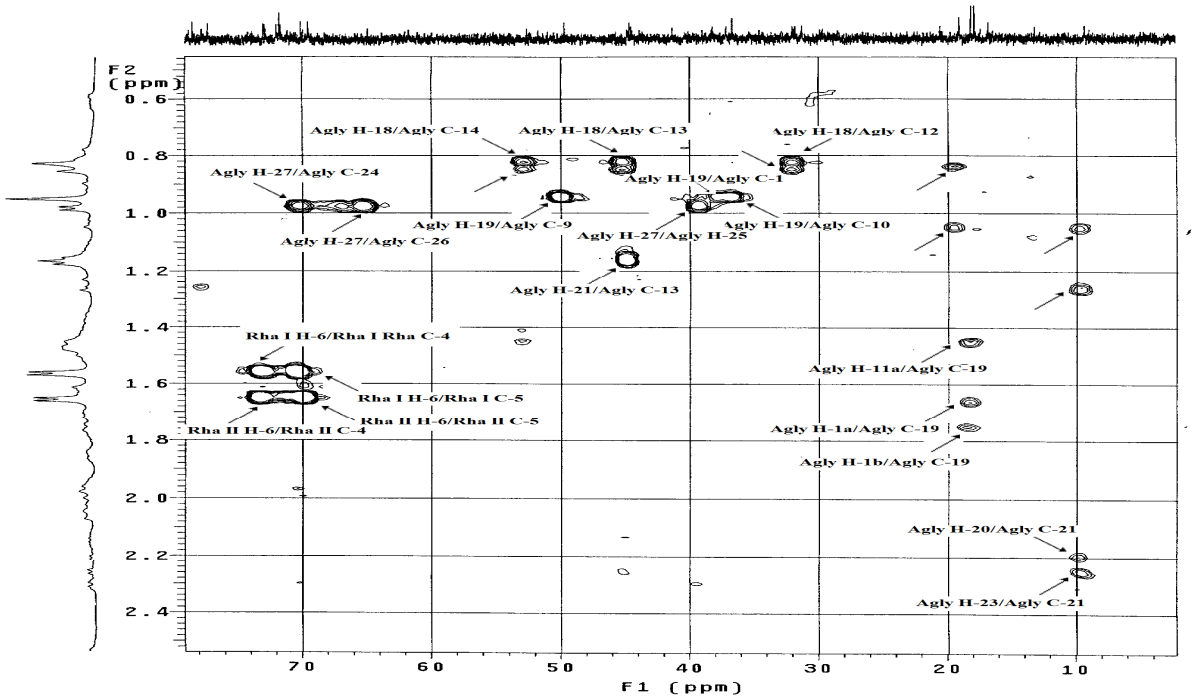



**Figure 28:** Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **133**

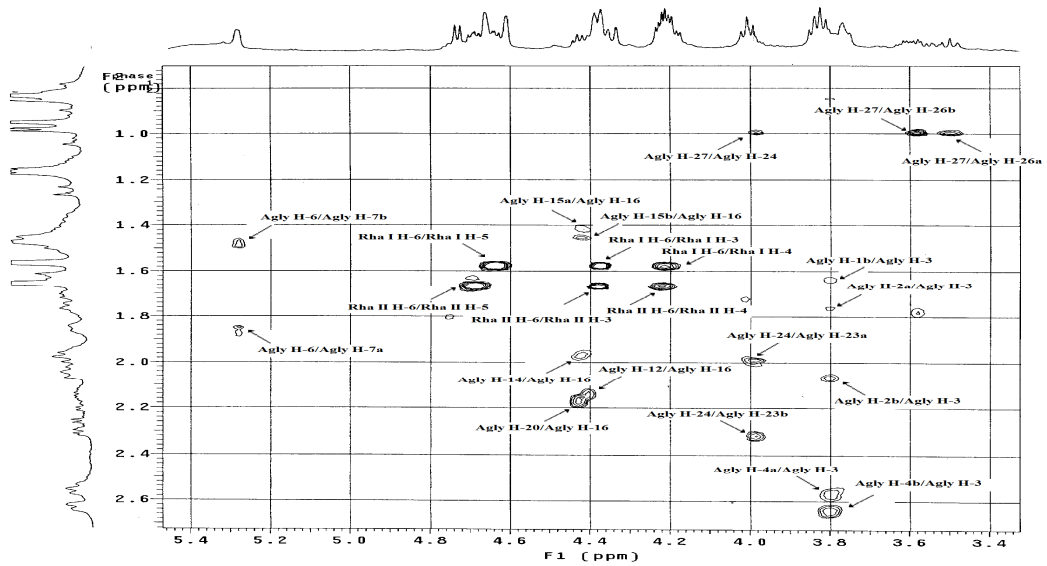



**Figure 29:** Spectre TOCSY de la partie aglycone du composé **133**

Sur le spectre COSY, les protons du Me-27 exhibent une corrélation avec le signal en large multiplet à $\delta_H$ 1,78 (H-25), une autre avec la paire de protons résonnant à $\delta_H$ 3,50 (H-26ax, dd, *J* = 11,1; 11,6 Hz) et $\delta_H$ 3,58 (H-26eq, dd, *J* = 4,5 et 11,1 Hz), et enfin avec un proton d'oxymethine à $\delta_H$ 3,98 (H-24, dd, *J* = 5,5; 5,5 Hz). Le proton d'oxyméthine, à son tour, exhibe des corrélations avec les protons du méthylène à $\delta_H$ 1,98 (H-23ax) et $\delta_H$ 2,31 (H-23eq). Ces corrélations conduisent à la suggestion d'un hydroxyle lié en C-24 du cycle F. Ceci a été confirmé par le signal déblindé du carbone du groupement méthyle en C-27 à $\delta_C$ 13,0 au lieu de 16-17 ppm dans le cas de $CH_2$-24 (Agrawal et *al.*, 1985).

Les deux doublets dédoublés à 3,50 (dd, *J* = 11,1; 11,6 Hz) et $\delta_H$ 3,58 (dd, *J* = 4,5 et 11,1 Hz) sont assignables aux protons vicinaux $H_2$-26, et la constante de couplage du proton à $\delta_H$ 3,98 (H-24, dd, *J* = 5,5; 5,5 Hz) est possible que si le proton d'oxyméthine se trouve dans la configuration β-équatoriale en C-24, et est vicinal au proton H-25 en β-axial et aux protons du méthylène en C-23. Ces données permettent de conclure à une orientation α-axiale de l'hydroxyle en C-24. Ceci a été confirmé par l'absence de corrélation NOESY entre le proton résonnant à $\delta_H$ 3,50 (H-26ax, dd, *J* = 11,1; 11,6 Hz) et $\delta_H$ 3,98 (H-24, dd, *J* = 5,5; 5,5 Hz).

L'aglycone de **133** a été par conséquent identifié à la 24*α*-hydroxypénnogénine, signalé comme aglycone dans une seule espèce végétale à savoir *Paris axialis* (Changxiang et *al.*, 1987).

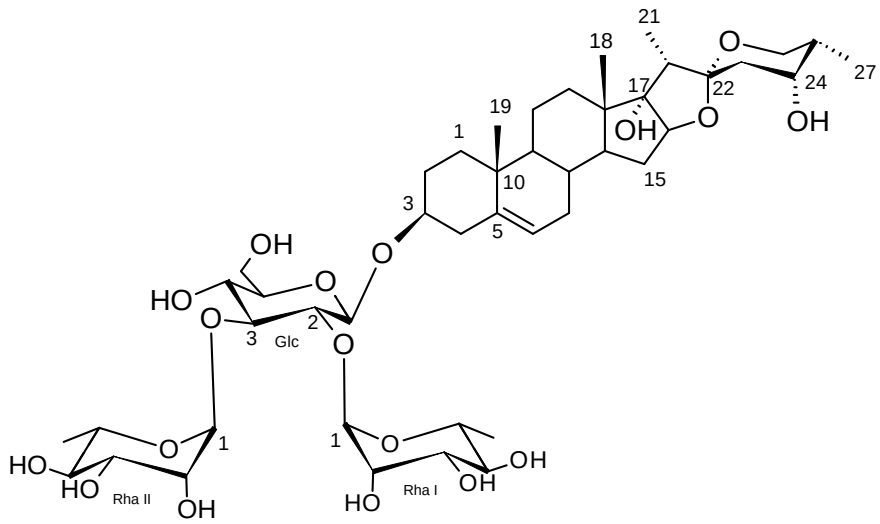
- *Nature des sucres*

L'étude détaillée des données de la RMN 2D (COSY, NOESY, HMBC) du composé **133** a montré que celui-ci comporte la même séquence des sucres que **132** et ne diffère que par l'absence du groupement acétyle attaché en C-6 du Glc. Ceci est confirmé par la disparition du signal de méthyle résonnant à $\delta_C$ 20,4 et celui du carbonyle à $\delta_C$ 170,9 du spectre RMN $^{13}C$ du composé

**133** et la présence d'une valeur appropriée du Glc en position C-6 à $\delta_C$ 61,6, avec des signaux RMN des protons H-6a et H-6b, respectivement, à $\delta_H$ 4.18 (d, $J$ = 5,2 Hz) et $\delta_H$ 4,35 (dd, $J$ = 5,2; 11,4 Hz).

- *Conclusion*

Ainsi, la structure du composé **133** a été élucidée au 24$\alpha$-hydroxypénnogénine 3-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-$\beta$-D-glucopyranoside, nouveau composé naturel dénommé **arboréasaponine B.** (Kougan et *al.*, 2010a)




**133** arboréasaponine B (Kougan et al. 2010a)

**Tableau 34**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **133.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,0 | 0,83, 1,63 |
| 2 | 31,2 | 1,72 dd (4,0, 14,5); 2,07 t (14,5) |
| 3 | 77,8 | 3,81 t (7,5) |
| 4 | 38,1 | 2,56 d (11,5); 2,64 d (11,9) |
| 5 | 140,3 | - |
| 6 | 121,5 | 5,28 (s) |
| 7 | 31,9 | 1,47 |
| | | 1,86 |
| 8 | 32,1 | 1,49 |
| 9 | 49,7 | 0,83 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 20,4 | nd, 1,46 |
| 12 | 31,7 | 1,86, 2,16 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 52,8 | 1,96 |
| 15 | 31,7 | 1,42, 1,45 |
| 16 | 89,6 | 4,42 t (7,4) |
| 17 | 89,9 | - |
| 18 | 16,7 | 0,85 s |
| 19 | 19,0 | 0,95 s |
| 20 | 44,6 | 2,26 d (7,3) |
| 21 | 09,2 | 1,16 d (7,4) |
| 22 | 112,1 | - |
| 23 | 41,2 | 1,98, 2,31, dd (12,4; 4,7) |
| 24 | 70,0 | 3,98 dd (5,5, 5,5) |
| 25 | 39,0 | 1,78 m |
| 26 | 64,8 | 3,50 dd (11,1, 11,6) |
| | | 3,58 dd (4,5, 11,1) |
| 27 | 13,0 | 0,98 d (6,4) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-*O*- Glc | | |
| 1 | 99,7 | 4,73 d (7,8) |
| 2 | 78,3 | 3,90 |
| 3 | 85,7 | 4,05 t (9,0) |
| 4 | 69,6 | 3,76 |
| 5 | 78,3 | 3,90 |
| 6 | 61,6 | 4,18 d (5,2), |
| | | 4,35 dd (5,2, 11,4) |
| Rha I | | |
| 1 | 103,3 | 5,70 s l |
| 2 | 71,9 | 4,75 |
| 3 | 72,1 | 4,41 |
| 4 | 72,9 | 4, 24 |
| 5 | 70,2 | 4,65 |
| 6 | 18,0 | 1,58 d (5,9) |
| Rha II | | |
| 1 | 102,1 | 5,63 s |
| 2 | 71,7 | 4,64 |
| 3 | 71,9 | 4,72 |
| 4 | 72,9 | 4,24 (t, 9,2) |
| 5 | 69,4 | 4,70 m |
| 6 | 18,1 | 1,66 d (5,9) |

### II.1.3.2.3 Composé 134

- *Spectrométrie de masse*

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **134** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à *m/z* 591 $[M–H]^-$ suggérant une masse de 592 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{33}H_{52}O_9$. Le pic de l'ion fragment observé à *m/z* 429 $[(M–H)–162]^-$, correspond à la perte d'un hexose. Le pic observé à *m/z* 429 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment la pénnogénine (voir paragraphe 2, p 116).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre RMN $^1H$ permet de distinguer dans la zone des sucres un signal attribuable au proton anomérique qui résonne à $\delta_H$ 5,01 (d, $J$ = 7,8 Hz). Ce proton anomérique corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone anomérique résonnant à $\delta_C$ 102,6.

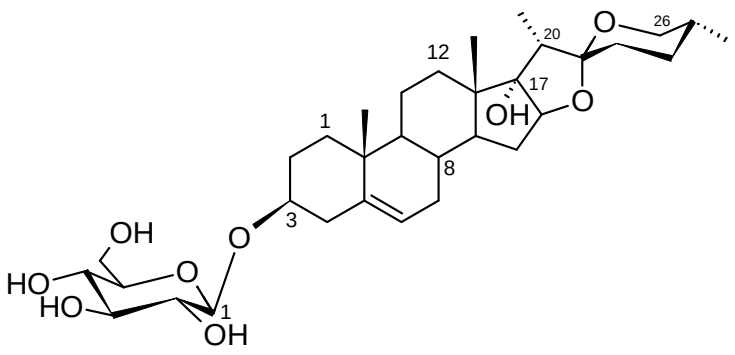
L'analyse des spectres RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature du sucre. L'évaluation de la constante de couplage spin-spin a permis de caractériser un $\beta$-glucopyranosyl.

  - *Séquençage en C-3*

La corrélation HMBC entre le proton anomérique résonnant à $\delta_H$ 5,01 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_C$ 78,2 (Agly C-3), et la corrélation observée sur le spectre NOESY entre $\delta_H$ 5,01 (Glc H-1) et $\delta_H$ 3,90 (Agly H-3), ont permis de lier le Glc en C-3.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **134** comme étant la pénnogénine 3-*O*-$\beta$-D-glucopyranoside (floribundasaponine), précédemment isolé de *Dioscorea floribunda* (Shashi et *al.*, 1981).




**134** floribundasaponine (Shashi et al. 1981)

**Tableau 35**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **134.**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 38,5 | 0,95, 1,72 |
| 2 | 30,2 | 1,74, 1,12 |
| 3 | 78,2 | 3,90 |
| 4 | 39,3 | 2,45, 2,70 |
| 5 | 140,9 | - |
| 6 | 121,7 | 5,30 |
| 7 | 32,3 | 1,54, 1,94 |
| 8 | 32,1 | 1,54 |
| 9 | 50,2 | 0,95 |
| 10 | 37,0 | |
| 11 | 20,9 | 1,50, 1.58 |
| 12 | 31,7 | 2,16, 2,20 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 53,0 | - |
| 15 | 31,7 | 1,50, 2,22 |
| 16 | 90,2 | 4,44 |
| 17 | 90,1 | - |
| 18 | 17,1 | 0,96 s |
| 19 | 19,4 | 0,95 s |
| 20 | 45,1 | 2,26 |
| 21 | 09,6 | 1,22 d (7,6) |
| 22 | 109,8 | - |
| 23 | 31,7 | 2,16, 1,64 |
| 24 | 28,8 | 1,58, 1,60 |
| 25 | 30,4 | 1,60 |
| 26 | 66,4 | 3,51, nd |
| 27 | 17,2 | 0,62 d (5,6) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O- Glc | | |
| 1 | 102,6 | 5,01 d (7,8) |
| 2 | 75,6 | 4,04 |
| 3 | 78,6 | 4,27 |
| 4 | 71,7 | 4,26 |
| 5 | 78,4 | 3,96 |
| 6 | 62,9 | 4,38, 4,55 |

### II.1.3.2.4 Composé 135

- *Spectrométrie de masse.*

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **135** montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 737 $[M–H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 738 u.m.a, en accord avec la formule $C_{39}H_{62}O_{13}$. D'autres pics d'ions fragments observables à *m/z* 575 $[(M–H)–162]^-$, *m/z* 429 $[(M–H)–146–162]^-$ correspondent à la perte successive d'un hexose et d'un deoxyhexose. Le pic à *m/z* 429 correspond au pic de l'aglycone, notamment la pénnogénine (voir paragraphe 2, p 116).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres*

L'étude du spectre de RMN $^1$H permet de distinguer dans la zone des sucres deux signaux attribuables aux protons anomériques qui résonnent à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz) et l'autre à $\delta_H$ 6,16 (s l). Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les deux carbones anomériques résonnant respectivement à $\delta_C$ 101,8 et 102,3 ppm.

L'analyse détaillée des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation de la constante de couplage spin-spin a permis de caractériser un *β*-glucopyranosyl et un *α*-rhamnopyranosyl.

  - *Séquençage en C-3*

Les corrélations HMBC entre le proton anomérique à $\delta_H$ 6,16 (Rha H-1) et $\delta_C$ 83,2 (Glc C-3) d'une part et le proton anomérique à $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_C$ 78,1 (Agly C-3) d'autre part, permettent d'affirmer que le Rha est lié au Glc par une liaison (1→3), le Glc est lié à l'aglycone en position 3 par une liaison éther. Cette séquence est confirmée par l'observation des corrélations sur le spectre NOESY entre le proton à $\delta_H$ 6,16 (s, Rha H-1) et $\delta_H$ 4,31 (t, $J$ = 9,4 Hz, Glc H-3) et entre $\delta_H$ 4,84 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_H$ 3,77 (Agly H-3). La séquence de la chaîne des sucres en C-3 a été établie à *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **135** à la pénnogénine 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucopyranoside (manioside A), précédemment isolé de *Dracaena mannii* (Tapondjou et *al.*, 2008).

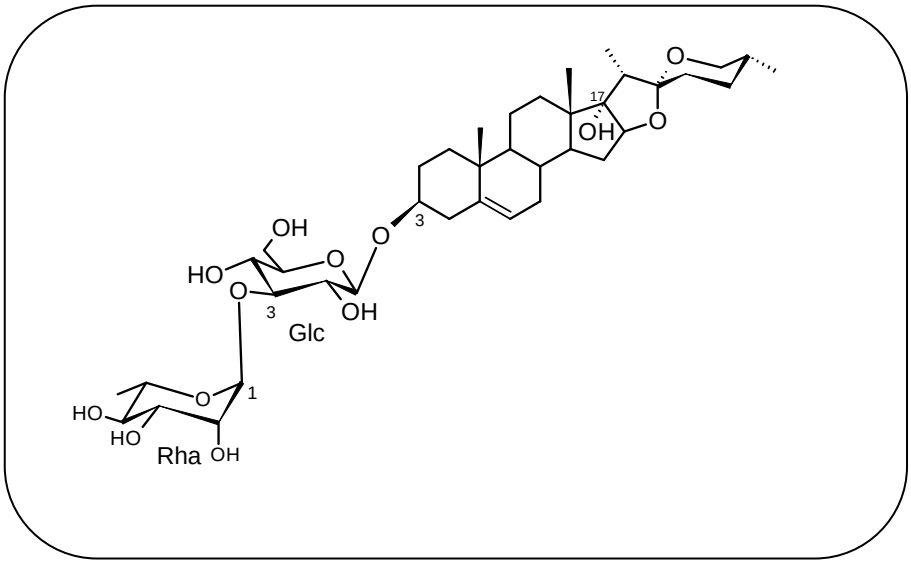



**Tableau 36:** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **135**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,1 | 0,82, 1,60 |
| 2 | 29,7 | 1,62, 2,04 |
| 3 | 78,1 | 3,77 |
| 4 | 38,8 | 2,34, 2,58 |
| 5 | 140,5 | - |
| 6 | 121,5 | 5,23 |
| 7 | 31,8 | 1,54, 1,94 |
| 8 | 31,9 | 1,48 |
| 9 | 49,8 | 0,84 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 20,6 | 1,44, 1,46 |
| 12 | 32,0 | 1,86, 2,16 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 52,8 | 1,98 |
| 15 | 31,4 | 1,43, 2,14 |
| 16 | 89,8 | 4,41 |
| 17 | 89,9 | - |
| 18 | 16,8 | 0,88 s |
| 19 | 19,7 | 0,84 s |
| 20 | 44,5 | 2,21 |
| 21 | 09,4 | 1,18 d (7,6) |
| 22 | 109,8 | - |
| 23 | 31,7 | 2,16, 1,64 |
| 24 | 28,4 | nd, 1,58 |
| 25 | 30,4 | 1,52 |
| 26 | 66,4 | 3,43, 3,48 |
| 27 | 16,9 | 0,61 d (5,7) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-*O*- Glc | | |
| 1 | 101,8 | 4,84 (d, 7,8) |
| 2 | 75,1 | 3,90 (t, 8,3) |
| 3 | 83,2 | 4,31 (t, 9,04) |
| 4 | 69,3 | 4,05 (t, 9,5) |
| 5 | 77,7 | 3,85 |
| 6 | 62,0 | 4,28, 4,40 |
| Rha | | |
| 1 | 102,3 | 6,16 (s l) |
| 2 | 71,9 | 4,71 |
| 3 | 72,0 | 4,52 |
| 4 | 73,5 | 4,26 |
| 5 | 69,5 | 4,88 |
| 6 | 18,2 | 1,62 (d, 6,1) |

### II.1.3.2.5 Composé 136

- *Spectrométrie de masse.*

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé **136** montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 883 $[M–H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 884 u.m.a, en accord avec la formule $C_{45}H_{72}O_{17}$. D'autres pics d'ions fragments observables à *m/z* 737 $[(M–H)–146]^-$, *m/z* 429 $[(M–H)–146–146–162]^-$, correspondent à la perte d'un deoxyhexose et de deux deoxyhexoses et d'un hexose respectivement. Le pic à *m/z* 429 correspond au pic de l'aglycone, notamment la pénnogénine (voir paragraphe 2, p 116).

- *Spectroscopie RMN*

  - *Nature des sucres.*

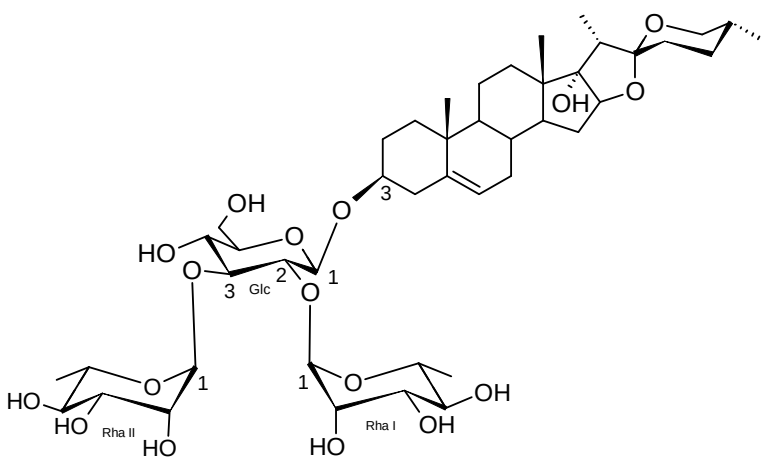
L'étude du spectre RMN $^1$H permet de distinguer dans la zone des sucres trois signaux attribuables aux protons anomériques dont deux résonnent de singulet à $\delta_H$ 5,64 (Rha I H-1) et $\delta_H$ 5,58 (Rha II H-1) et un sous forme de doublet à $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,8 Hz). Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones anomériques résonnant respectivement à $\delta_C$ 102,1; 103,1 et 99,4 ppm.

  - *Séquençage en C-3*

Les corrélations HMBC entre le proton anomérique résonnant à $\delta_H$ 5,64 (s, Rha I H-1) et $\delta_C$ 78,4 (Glc C-2) d'une part, puis entre le proton anomérique résonnant à $\delta_H$ 5,58 (s l, Rha II H-1) et $\delta_C$ 86,1 (Glc H-3) d'autre part, enfin entre le proton anomérique résonnant à $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,8 Hz, Glc H-1) et $\delta_H$ 3,77 (Agly H-3) permettent d'affirmer que le Rha I est lié au Glc par une liaison (1→2), le Rha II lié au Glc par une liaison (1→3) et enfin le Glc est lié à l'aglycone en position 3 par une liaison éther. Cette séquence est confirmée par l'observation des corrélations sur le spectre NOESY entre le proton à $\delta_H$ 5,64 (s l, Rha H-1) et $\delta_H$ 3,84 (t, $J$ = 9,04 Hz, Glc H-2) et entre $\delta_H$ 5,58 (s, Rha II H-1) et $\delta_H$ 4,01 (Glc H-3), et entre à $\delta_H$ 4,73 (d, $J$ = 7,6 Hz) et $\delta_H$ 3,77 (Agly H-3). La séquence de la chaîne des sucres en C-3 a été établie à *α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-*β*-D-glucopyranosyl.

- *Conclusion*

L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **136** comme étant la pénnogénine 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-*β*-D-glucopyranoside (spiroconazole A), précédemment isolé de *Dracaena mannii* (Okunji et *al.*, 1991).




**<u>136</u> spiroconazole A** (Okunji et al. 1991)

**<u>Tableau 37</u>**: Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **136**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 37,1 | 0,82, 1,60 |
| 2 | 29,7 | 1,62, 2,04 |
| 3 | 78,1 | 3,77 |
| 4 | 38,8 | 2,34, 2,58 |
| 5 | 140,5 | - |
| 6 | 121,5 | 5,23 |
| 7 | 31,8 | 1,54, 1,94 |
| 8 | 31,9 | 1,48 |
| 9 | 49,8 | 0,84 |
| 10 | 36,6 | - |
| 11 | 20,6 | 1,44, 1,46 |
| 12 | 32,0 | 1,86, 2,16 |
| 13 | 44,8 | - |
| 14 | 52,8 | 1,98 |
| 15 | 31,4 | 1,43, 2,14 |
| 16 | 89,8 | 4,41 |
| 17 | 89,9 | - |
| 18 | 16,8 | 0,88 s |
| 19 | 19,7 | 0,84 s |
| 20 | 44,5 | 2,21 |
| 21 | 09,4 | 1,18 d (7,6) |
| 22 | 109,8 | - |
| 23 | 31,7 | 2,16, 1,64 |
| 24 | 28,4 | nd, 1,58 |
| 25 | 30,4 | 1,52 |
| 26 | 66,4 | 3,43, 3,48 |
| 27 | 16,9 | 0,61 d (5,7) |

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 3-O- Glc | | |
| 1 | 99,4 | 4,73 d (7,8) |
| 2 | 78,4 | 3,84t (8,3) |
| 3 | 86,1 | 4,01 t (9,04) |
| 4 | 69,4 | 3,77 t, (9,5) |
| 5 | 77,3 | 3,76 |
| 6 | 61,9 | 4,28, 4,40 |
| Rha I | | |
| 1 | 102,1 | 5,64 s l |
| 2 | 71,6 | 4,61 |
| 3 | 72,0 | 4,61 |
| 4 | 73,0 | 4,18 |
| 5 | 69,5 | 3,88 |
| 6 | 18,2 | 1,65 d (6,1) |
| Rha II | | |
| 1 | 103,1 | 5,58 (s l) |
| 2 | 69,4 | 4,67 |
| 3 | 71,7 | 4,66 |
| 4 | 72,9 | 4,22 |
| 5 | 70,0 | 4,13 |
| 6 | 17,8 | 1,56 d (6,2) |

### II.1.3.2.6 Composé 137

- *Spectrométrie de masse.*

Sur le spectre de masse en source FAB (mode négatif), nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 461 $[M–H]^-$, suggérant une masse atomique de 462 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{27}H_{42}O_6$.

- *Spectroscopie RMN.*

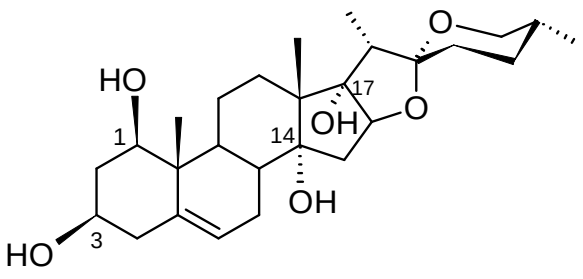
Le spectre RMN $^1H$ de **137** a montré des signaux imputable à deux méthyles tertiaires ($\delta_H$ 1,23; 0,68 ppm) et deux méthyles quaternaires ($\delta_H$ 1,43; 1,21 ppm).

L'analyse des spectres RMN $^{13}C$ et DEPT de **137** a montré 27 signaux, dont une paire de carbones oléfiniques à $\delta_C$ 139,8 et 124,9 ppm correspondant aux signaux des carbones de la double liaison $\Delta^{5,6}$, 8 carbones tertiaires (CH), 9 carbones secondaires ($CH_2$), 4 groupements méthyles ($CH_3$) et enfin 6 carbones quaternaires (C). Ces observations suggèrent un stéroïde de type spirostène.

L'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC permet d'attribuer les signaux du composé **137** en comparaison avec ceux décrits dans la littérature. On note sur le spectre HSQC, la disparition de deux signaux des protons et l'apparition de deux carbones quaternaires supplémentaires à $\delta_C$ 88,2 et 91,2, respectivement sur le spectre RMN du $^{13}C$. Les taches de corrélations observées sur le spectre HMBC entre le signal du groupe de protons qui résonnent à $\delta_H$ 1,21 ($H_3$-18) et les signaux des carbones à $\delta_C$ 88,2 et 91,2 d'une part, puis entre le signal de groupe de protons résonnant à $\delta_H$ 1,23 ($H_3$-21) et le signal à $\delta_C$ 91,2 de l'autre part, permet d'affirmer que les groupements hydroxyles sont fixés sur les carbones 14 et 17.

- *Conclusion*

Ces données permettent d'identifier la structure du composé **137** à celle de la (25*R*)-namogénine A (Tran, 2004).




**137** namogénine A (Tran, 2004)

**Tableau 38 :** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone **137**

| | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 78,2 | 3,85 |
| 2 | 43,6 | 2,25, 2,57 |
| 3 | 68,2 | 3,93 |
| 4 | 43,8 | 2,65, 2,72 |
| 5 | 139,8 | - |
| 6 | 124,9 | 5,70 |
| 7 | 26,4 | 1,98, 2,00 |
| 8 | 32,0 | 1,78 |
| 9 | 44,4 | 2,34 |
| 10 | 43,9 | - |
| 11 | 23.2 | 1.98, 2.06 |
| 12 | 27.2 | 1.39, 2.68 |
| 13 | 48.1 | - |
| 14 | 88.2 | - |
| 15 | 40.6 | 1.90, 2.60 |
| 16 | 90.4 | 4.82 |
| 17 | 91.2 | - |
| 18 | 21.0 | 1.21 s |
| 19 | 13.8 | 1.43 s |
| 20 | 45,2 | 2,42 |
| 21 | 09,7 | 1,23 d (7,3) |
| 22 | 109,6 | - |
| 23 | 32,1 | 1,68, 1,78 |
| 24 | 28,9 | 1,60, nd |
| 25 | 30,4 | 1,60 |
| 26 | 66,8 | 3,50, 3,52 |
| 27 | 17,2 | 0,68 d (5,6) |

## II.2 *RESULTATS DES ETUDES PHARMACOLOGIQUES*

**II.2.1** Saponines comme agents anticancéreux potentiels

Les saponines possèdent de nombreux effets sur les cellules tumorales. Différentes propriétés cytotoxiques ont été décrites pour un nombre de saponines, promouvant ainsi leur potentiel en tant que médicaments ou adjuvants anticancéreux. Les saponines triterpéniques ou stéroïdiques ont montré des activités inhibitrices de la croissance ou des activités cytotoxiques sur des lignées cellulaires de cancers.

Une des premières études des saponines pour le traitement du cancer a été décrite par Ebbesen et *al*., en 1976. La saponine Quil A avait prolongé la survie des souris, ayant développé de manière spontanée la leucémie. Bien que de nombreux groupes de saponines aient été utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires dans le cadre des études microscopiques, un intérêt accru pour les saponines en tant que médicaments potentiels pour le traitement du cancer a eu lieu dans les années 1990 (Okita et *al*., 1993; Yu et *al*., 1992) .

Une étude menée sur l'effet inhibiteur de la croissance de deux saikosaponines et deux ginsénosides, saponines de Panax ginseng (*Araliaceae*), a montré que la saikosaponine-A inhibait la prolifération cellulaire des cellules d'hépatomes humains tandis que la saikosaponine-C et les ginsénosides Rb1 et Rg1 n'avaient aucun effet (Okita et *al*., 1993). Yu et *al.* ont identifiés une saponine triterpénique, tubéimoside 1, de l'ampoule de *Bolbostemma paniculatum (Cucurbitaceae)* (Yu et *al.*, 1992). Cette saponine a montré un puissant effet anti-tumorigène chez la souris sur un modèle de tumeur de la peau.

Parmi les composés prometteurs donnant un potentiel d'activité *in vivo*, kalopanaxsaponine A (référencé comme α-hédérine) de *Kalopanax pictus* (7,5; 15 mg/kg), semblait avoir augmenté la durée de vie des souris porteuses du cancer du côlon 26 (115, 169 % T/C) et 3 LL carcinome pulmonaire de Lewis (175, 205 % T/C), ainsi que le cisplatine (3 mg/kg) (Park et *al*., 2001).

Mimaki et *al.* en 2001 ont mené un examen systématique des activités cytotoxiques des saponines stéroïdiques principalement celles isolées des plantes de la famille des *Liliaceae* contre les cellules leucémiques promyélocytaires HL-60 et ont trouvé plusieurs relations entre les structures et les activités. Certaines saponines stéroïdiques évaluées dans le système de dosage ont montré beaucoup d'activités cytotoxiques, qui étaient presque aussi puissantes que celle de l'étoposide utilisé comme contrôle positif. Les activités ont été trouvées être sensibles aux nombres de monosaccharides constituants les chaînes de sucre et de leurs séquences, ainsi que les structures des aglycones.

**II.2.2** Mécanisme d'action des saponines sur les cellules tumorales**.**

Les saponines peuvent agir par voie extracellulaire sur les cellules tumorales ou par des voies d'influence de signalisation intracellulaire. Les effets extracellulaires de saponines sont la perméabilisation de la membrane plasmique et l'inhibition de l'efflux de drogues par inhibition directe de protéines membranaires. Les effets de la perméabilisation se produisent à des concentrations élevées de saponines (Habituellement >100 µg/ml avec des variations différentes pour les saponines) tandis que les effets intracellulaires peut aussi avoir lieu à des concentrations plus faibles. Les divers effets cellulaires des saponines décrites ci-dessus sont résumés dans une représentation schématique Figure 30.

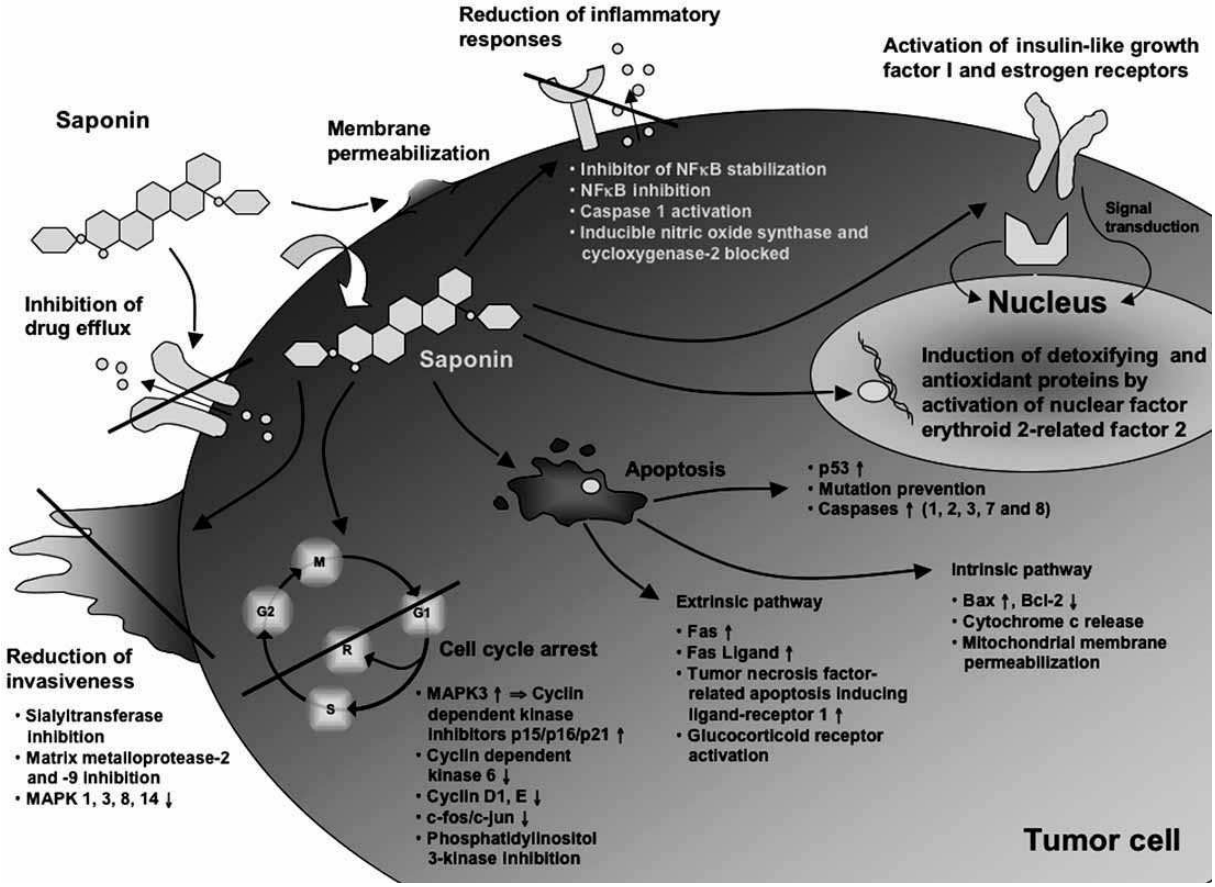



**Figure 30.** Les effets cellulaires des saponines (Bachran et *al.,* 2008).

L'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose sont les meilleurs événements étudiés. Autres effets intracellulaires tels que l'inhibition de l'envahissement des cellules métastasées, la réduction des réactions inflammatoires, l'activation du facteur de croissance insulinique I et des récepteurs d'œstrogène, ansi que l'induction de détoxifiant et antioxydant protéiques n'ont été observées que dans quelques cas et la pertinence pour la thérapie anti-tumorale reste à éclaircir. Les saponines les plus efficaces sont les avicines, qui inhibent la croissance des cellules tumorales à environ 1 $\mu$g/ml. En raison de leur fort impact sur la tumeur

des cellules, leurs effets intracellulaires ont été étudiés en détail, en particulier les mécanismes conduisant à l'induction de l'apoptose. Toutefois, il est à noter que tous les effets décrits des saponines sur les cellules tumorales sont dépendantes du type de tumeur et la saponine. Certaines voies spécifiques activées ont été observées pour les saponines telles que la stimulation des récepteurs du facteur de croissance insulinique I et décrites seulement pour le ginsenoside Rg1, tandis que l'induction de l'apoptose est une caractéristique commune de presque toutes les saponines.

Des études plus détaillées pour les diverses saponines permettront sûrement de découvrir un degré plus élevé de mécanismes analogiques pour les saponines structurellement liées. Néanmoins, l'objet des futures recherches sur les saponines pour la thérapie tumorale restera la découverte de saponines à partir de diverses plantes et les analyses des relations structure-activité pour permettre l'identification d'importants éléments de structure pour le développement optimisé de saponines synthétiques.

### II.2.3 Résultats

Les tests biologiques réalisés concernent la recherche d'effets cytotoxiques des saponines que nous avons isolés à partir des espèces de plantes étudiées. Ces travaux ont été faits en collaboration avec MM. Jean-François MIRJOLET et Olivier DUCHAMP de ONCODESIGN, Dijon.

L'activité cytotoxique des saponines **108**, **109**, **110**, **111**, **113**, **114** isolées des écorces de *Cussonia arborea*; **128**, **131** isolées des tiges de *D. deisteliana*; **132**, **133**, **135, 136** isolées des écorces de *D. arborea* ont été évaluées sur deux lignées de cellules de cancer du côlon humain (HT-29 et HCT 116) grâce à la méthode de test de cytotoxicité MTT qui détermine la capacité de cellules viables à convertir le sel tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) – bromure de 2,5-diphenyltetrazolium] (MTT) soluble en précipité de formazan insoluble (Carmichael et al, 1987). En effet, l'anneau de tetrazolium qu'il contient est réduit par le succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Le Paclitaxel est utilisé comme contrôle positif.

Les tableaux ci-dessous montrent les résultats obtenus en présence de concentrations croissantes des saponines testées.

**II.2.3.1** Test sur les saponines isolées de *Cussonia arborea*

D'après les résultats obtenus (Table 39), les saponines triterpéniques isolées des écorces de *Cussonia arborea* n'ont pas montré d'activités cytotoxiques sur ces deux lignées de cellules ($IC_{50}$ >100). Ceci corroborent les résultats de la littérature (Chaturvedula et *al*., 2003) où tous

les saponines du type oléananes isolés de *Polyscias amplifolia (Araliaceae)* ont montré une cytotoxicité faible contre la ligne de cellules cancéreuses de l'ovaire A2780 de l'homme avec des valeurs $IC_{50}$ de l'ordre de 6,7 à 10,8 mg / mL.

**Tableau 39** : Activités cytotoxiques des saponines isolées de *C. arborea*.

| | cellules ($IC_{50}$, $\mu$M) | |
|---|---|---|
| saponine | HT-29 | HCT 116 |
| arboréaside A (**108**) | > 100 | > 100 |
| arboréaside B (**109**) | > 100 | > 100 |
| arboréaside C (**110**) | > 100 | > 100 |
| arboréaside D (**111**) | nd | > 100 |
| 23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-*O*-Rha-(1→4)-Glc-(1→6)-Glc (**113**) | > 100 | > 100 |
| ciwujianoside C3 (**114**) | > 100 | > 100 |
| Paclitaxel (référence) | $1,4x10^{-3}$ | $3,21x10^{-3}$ |

**II.2.3.2** Test sur les saponines isolées de *Dracaena arborea*

Les activités cytotoxiques de quatre saponines des écorces de *Dracaena arborea* ont été évaluées. Les résultats sont consignés dans le tableau 40.

Le composé le plus actif, parmi ces saponines sur les deux lignées de cellules a été le spiroconazole A (**136**) (pénnogénine-3-*O*-α-L-rhamnopyrannosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyrannosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside) avec une valeur d'$IC_{50}$ de 1,67 et 2,04 $\mu$M sur les cellules HT-29 et HCT 116, respectivement, tandis que arboréasaponine A (**132**), manioside A (**135**) ont montré une cytotoxicité modérée. Arboréasaponine B (**133**) a été considéré comme inactif avec une valeur d'$IC_{50}$ > 100 $\mu$M.

Ces composés possèdent tous le même aglycone (la pénnogénine) excepté le composé **133** qui comporte un hydroxyle supplémentaire fixé en position 24. Ce dernier s'est avéré inactif contrairement aux trois autres. On peut conclure que la présence d'un hydroxyle sur le cycle F de la pénnogénine inhibe la cytotoxicité du composé.

La comparaison des valeurs d'$IC_{50}$ de spiroconazole A (**136**) avec son dérivé acétylé (arboréasaponine A), suggère que le groupe acétyle à Glc C-6 dans la structure de arboréasaponine A (**132**) pourrait expliquer la diminution considérable de la cytotoxicité contre les cellules HT-29 et ainsi que l'inactivité de ce dernier contre les cellules HCT116. Ces résultats montrent que le composé **135** est moins cytotoxique que le composé **136** qui comporte plus de sucres, ceci renforce l'hypothèse que la cytotoxicité augmenterait avec le nombre de sucres.

Enfin les résultats ont montré que l'aglycone spirostanol et le $\alpha$-L-rhamnopyrannosyl terminal lié en 1→2 de la chaîne de sucre en C-3 sont essentiels pour leur cytotoxicité élevée, tandis que la substitution du groupe hydroxy en C-12 ou C-17 de l'aglycone provoque une diminution de leur activité.

**Tableau 40** : Activités cytotoxiques des saponines isolées de *D. arborea*

| | cellules ($IC_{50}$, $\mu$M) | |
|---|---|---|
| saponine | HT-29 | HCT 116 |
| arboréasaponine A (**132**) | 8,54 | 7,60 |
| arboréasaponine B (**133**) | > 100 | > 100 |
| manioside A (**135**) | 56,23 | 42,95 |
| spiroconazole A (**136**) | 1,67 | 2,04 |
| Paclitaxel (référence) | $1,4x10^{-3}$ | $3,21x10^{-3}$ |

**II.2.3.3** Test sur les saponines isolées de *Dracaena deisteliana*

Deux saponines isolées des tiges de *D. deisteliana* ont été testées sur les deux lignées de cellules cancéreuses suscitées.

On constate que le deistelianoside B (**128**) et neoruscogenin 1-*O*-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[$\beta$-D-xylopyranosyl-(1→3)]-$\alpha$-L-arabinopyranoside (**131**) ont présenté une cytotoxicité modérée sur les deux lignées de cellules. Les cellules HCT-116 sont plus sensibles au deistélianoside B que celles de HT-29 avec une activité plus élevée sur HCT 116 par rapport au HT-29 dans le cas du deistélianoside B.

**Tableau 41** : Activités cytotoxiques des saponines isolées de *D. deisteliana*

| | cellules ($IC_{50}$, $\mu$M) | |
|---|---|---|
| saponine | HT-29 | HCT 116 |
| deistélianoside B (**128**) | 70,73 | 21,25 |
| neoruscogénine 1-*O*-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Ara (**131**) | 29,51 | 29,03 |
| Paclitaxel (référence) | $1,4x10^{-3}$ | $3,21x10^{-3}$ |

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Mimaki et *al.*, 2001, 2003; Yokosuka et *al*., 2002b) qui montrent que les saponines glycosylées en C-1 n'ont pas d'activités cytotoxiques excepté celles qui comportent des groupes acétyles liés sur des sucres. D'autre part, les saponines dérivées de la (25S)-spirost-5-ène-1$\beta$, 3β-diol, dont la chaîne saccharidique est composée de deux deoxypyranoses, c'est-à-dire la D-fucose et L-rhamnose, ont montrées des activités cytotoxiques. Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle, la présence de ces deux sucres dans la structure des deux saponines obtenues de *D. deisteliana* expliquerait d'une part l'activité et d'autre part, la présence de la double liaison en position 25-

27, ainsi que la présence de l'hydroxyle substitué en position 24 seraient responsables de la faible cytotoxicité comparée à celle obtenue pour la (25S)-spirost-5-ène-1*β*,3β-diol-1-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*β*-D-fucopyranoside (Mimaki et *al.*, 2001).

**Conclusion**

Parmi les molécules testées, les arboréasides A–D, ainsi que deux autres saponines connues isolées des écorces de *Cussonia arborea* n'ont pas montré d'activités cytotoxiques sur les deux lignées de cellules du cancer du côlon. Quant aux saponines stéroïdiques isolées des deux espèces de *Dracaena,* des effets cytotoxiques modérés et faibles sur les deux lignées ont été observés pour ces saponines. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature notamment pour les saponines glycosylées dérivées de la néoruscogénine. L'absence de la cytotoxicité ou l'activité modérée avec ces saponines sur les deux lignées de cellules cancéreuses HT-29 et HCT 116 suggèrent des études pharmacologiques complémentaires sur d'autres souches afin de comparer les résultats et de tirer une conclusion.

# *CHAPITRE III. PARTIE EXPERIMENTALE*

**III.1** Matériel Végétal et extraction

Les plantes utilisées dans cette étude, appartiennent aux familles des *Araliaceae* et des *Dracaenaceae*, toutes originaires d'Afrique Centrale et récoltées en avril 2007 au Cameroun. L'identification des différentes plantes a été faite en collaboration avec un botaniste de l'herbier National du Cameroun d'où les échantillons sont répertoriés.

**Tableau 42** : plantes étudiées et lieux de récolte

| plante | famille | Partie récoltée | Lieu de récolte | Poids/partie |
|---|---|---|---|---|
| *Cussonia arborea* | *Araliaceae* | écorces<br>feuilles<br>racines<br>bois | Bangoua | 1 kg |
| *Dracaena arborea* | *Dracaenaceae* | écorces<br>feuilles | Bangoua | 1 kg |
| *Dracaena deisteliana* | | tiges | Yaoundé | 1 kg |

Après récolte, le matériel végétal est séché par terre à l'air libre, ensuite écrasé en poudre afin qu'il présente une grande surface de contact avec le solvant extracteur, permettant ainsi d'augmenter le rendement lors de l'extraction. La méthode d'extraction employée est la macération à froid dans du méthanol. La drogue broyée est mis en contact avec le méthanol à raison de 3L pour 500 g de drogue dans un percolateur à température ambiante. Après 48 h, l'extrait est recueilli et le résidu est à nouveau extrait jusqu'à épuisement. Les filtrats sont ensuite réunis, le solvant évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi rotavapor, max. 50°C). On obtient l'extrait brut méthanolique qui est pesé et conservé dans des bocaux.

**III.2 Techniques chromatographiques**

**III.2.1 Chromatographie sous couche mince (CCM).**

Pour les analyses qualitatives et quantitatives des extraits, nous utilisons dans notre Laboratoires des plaques de gel de silice (silicagel F254) prêtes l'emploi à support en verre. Celles-ci sont développées dans des cuves de chromatographie en verre. Les systèmes de solvants couramment utilisés pour la CCM sont les suivants :

- $CHCl_3$-MeOH-$H_2O$-AcOH: 80-20-2-0,5
  70-30-5-0,5
  62-32-5-0,5

**III.2.2** Réactifs de révélation

Les réactifs de révélations utilisés lors des expériences sont le réactif de Komarowsky (mélange de V/V: 5/1 de *p*-hydroxybenzaldehyde à 2% dans le MeOH et $H_2SO_4$ à 50% dans l'EtOH) et la vanilline sulfurique (50 ml de solution de vanilline à 1% + 1 ml d'acide sulfurique) pour les saponines.

**III.2.3** Chromatographie sur colonne ouverte **(CC).**

Utilisée pour les fractionnements des extraits bruts et des purifications. Les phases stationnaires utilisées dans notre Laboratoire pour la CC sont le gel de silice et le sephadex LH-20. Les phases mobiles sont des mélanges binaires ou tertiaires à base du chloroforme, du méthanol et de l'eau dans le cas du gel de silice, et le méthanol dans le cas du Sephadex LH-20. La composition de l'éluant du départ est déterminée par la CCM. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaitée. Les fractions sont recueillies dans des tubes à essai disposés dans un collecteur de fractions (PHARMACIA, BUCHI) et sont analysées par CCM, regroupées et le solvant évaporé à l'aide d'évaporateur rotatif (Buchii).

**III.2.4** Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC).

Cette technique permet de fractionner et de purifier plusieurs grammes de mélanges. Dans notre laboratoire, nous disposons des installations de MPLC constituées des colonnes Buchi (460x25 mm; 460x 15 mm) remplies de gel de silice 60 (15-40 $\mu$M, Merck) ou de gel de silice RP-18 (15-40 $\mu$M). Elles sont reliées à des pompes (Gilson M303, Buchi) les systèmes de solvants utilisés sont les suivants :

- $CHCl_3$-MeOH-$H_2O$ : 80-20-2
  70-30-5
  62-32-5

**III.2.5** Chromatographie Liquide sous Vide (VLC).

Il s'agit d'une technique de fractionnement « grossière » préliminaire. Elle permet d'éliminer les sucres et les tanins contenus dans l'échantillon. L'appareillage est constitué d'un verre fritté relié à une pompe à vide. Le verre fritté est une petite colonne (de diamètre et de hauteur variant suivant la quantité de produit déposé) qui contient la phase stationnaire (silice à phase inverse et silice normale). Avant de faire le dépôt de l'échantillon, on conditionne la phase stationnaire par lavage avec du méthanol. Une fois la silice imbibée de méthanol, l'échantillon sous forme de poudre très fine est déposé à la surface du support. L'élution est réalisée dans l'ordre avec les mélanges suivants : MeOH / $H_2O$, 0 /100 (V/V), MeOH / $H_2O$

50:50 (V/V) et MeOH/ $H_2O$: 100/0 (V/V). On récupère ainsi trois fractions (la fraction aqueuse qui contient essentiellement les sucres, la fraction Méthanol/Eau et Méthanol qui contient nos composés d'intérêt).

**III.2.6** Chromatographie Flash.

Flash chromatographie est une forme rapide de chromatographie préparative à moyenne pression sur colonne optimisée pour des séparations au cours desquelles le solvant est pompé à un débit élevé accélérant la séparation. L'appareil utilsé dans notre Laboratoire est de marque **Combi*Flash*® RETRIEVE** à un système mono-colonne. Il possède un collecteur de fractions acceptant des tubes de diamètre de 12 à 18 mm et utilise des colonnes de gel de silice préemballés de marque RediSep® de granulométrie Variable, pour les séparations en phase normale ou inversée. Le volume de la fraction est de 3 à 27 ml par incrément de 1ml. Cet appareil possède la fonction équilibration d'une colonne et séparation. Débit: 9 à 99 ml/min. Système isocratique.

### III.3 Méthodes physico-chimiques

**III.3.1** Polarimétrie ($[\alpha]_D$).

Les pouvoirs rotatoires ont été enregistrés sur un polarimètre *AA-OR automatic* équipé d'une lampe à sodium. Le produit préalablement dissout dans du méthanol est introduite dans une cellule de 10 cm de long et traversé par un faisceau lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (598,3 mm).

**III.3.2** Spectrométrie de Masse (MS).

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse en mode FAB ($FAB^-$, FAB+) (JEOL SX 102) ou ESI-TOF (Q-TOF-1-Micromass spectrometer).

**III.3.3** Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN $^1H$ et $^{13}C$) ont été respectivement enregistrés à 600 et 125 MHz dans la pyridine deutériée ($C_5D_5N$) ou dans le dimethylsulfoxide deuterié (DMSO-$d_6$). Les expériences de RMN multidimensionnelles (DEPT, HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY et ROESY) sont effectuées sur un appareil Varian INOVA 600 équipé d'un système SUN 4 L-X computer. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

**III.4 Méthodes chimiques et biologiques**.

**III.4.1** hydrolyse acide

2 mg de saponines sont hydrolysés par 3 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 2N dans un tube en verre scellé pendant 2 heures à l'étuve à 120°C. L'aglycone libéré est extrait à 3 reprises par 10 ml de dichlorométhane. Ce dernier est comparé avec un échantillon authentique par CCM sur silice. La phase aqueuse contenant les sucres est évaporée à plusieurs reprises dans du méthanol afin d'éliminer l'acidité puis analysée par CCM sur silice dans le solvant en comparaison avec des échantillons témoins.

**III.4.2** Test d'évaluation de la cytotoxicité: méthode MTT

**III.4.2.1** Méthode

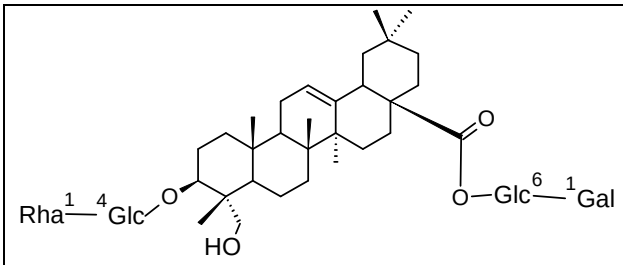
L'essai colorimétrique MTT détermine la capacité de cellules viables à convertir le sel tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) – bromure de 2,5-diphenyltetrazolium] (MTT) soluble en précipité de formazan insoluble (Carmichael et al, 1987). En effet, l'anneau de tetrazolium qu'il contient est réduit par le succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe du jaune au bleu-violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique. Le formazan est alors solubilisé et la concentration déterminée par la densité optique à 570 nm. Le résultat est un essai sensible avec un signal colorimétrique proportionnel au nombre de cellules. Grâce à ces nombreux avantages, cette méthode est considérée comme étant une avancé sur les techniques traditionnelles, car rapide, fortement reproductible avec une variation intratest en datapoint (±15 % SD).

**III.4.3.2** Protocole

Dans une culture cellulaire de densité de 5000 à 10000 cellules par puits, on ajoute la saponine approprié avec le volume du moyen de culture tissulaire dans chaque puits de 0.1 ml et pouvant contenir jusqu'à 10% de sérum fœtal bovin. Une fiole de MTT est dégelé et ajouté aux 96 puits à une température de 37°C pendant 4 heures tout en remuant doucement jusqu'à obtention d'une solution claire. On ajoute 10$\mu$L de solution de MTT dans chacun en mélangeant doucement sur le côté ou en secouant brièvement avec un *shaker*. S'en suit une incubation à 37°C et l'enlèvement du moyen de culture, suivi de l'ajout de 200 $\mu$L de DMSO dans chaque puit pour dissoudre le formazan par pipetage en haut et en bas plusieurs fois. A terme, on mesure l'absorbance avec un lecteur de plaque à la longueur d'onde de test de 570 nm et une longueur de référence de 630 nm pour obtenir le signal de type (OD570-OD630).

## III.5 Données spectrales et constantes physiques des composés isolés.

### III.5.1 *Cussonia arborea*

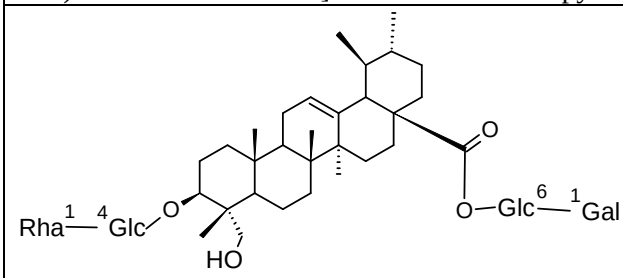



**108** ***arboréaside A***

***3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosylhédéragénine-28-O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside***

$C_{54}H_{88}O_{23,}$ M = 1104

**FAB-MS** *m/z* 1103 $[M–H]^-$, 957 $[(M–H) –146]^-$, 633 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 471 $[(M – H) –146–162–162–162]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 11)

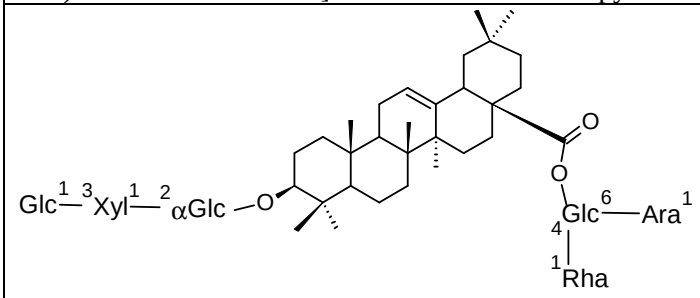



**109** ***arboréaside B.***

***3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-acide 23-hydroxyurs-12-èn-oique 28-O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{54}H_{88}O_{23,}$ M = 1104

**FAB-MS** *m/z* 1103 $[M–H]^-$, 957 $[(M–H) –146]^-$, 633 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 471 $[(M – H) –146–162–162–162]^-$. **RMN $^1$H et $^{13}$C**: pyridine-$d_5$, 600 MHz et 125 MHz ((voir table 12)

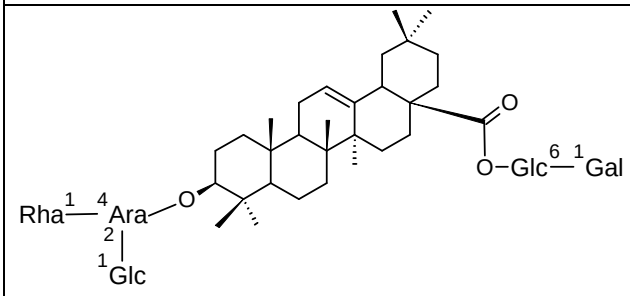



**110** ***arboréaside C***

***3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-acide oléanolique 28-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-β-D-glucopyranoside.***

$C_{64}H_{104}O_{30,}$ M = 1352

**FAB-MS** *m/z* 1351 $[M–H]^-$, *m/z* 779 $[(M– H) –162–132–132–146)]^-$, 455 $[(M–H) –162–132–132–146–162–162]^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 13)

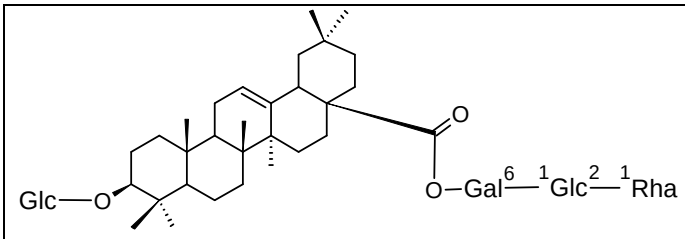



**111** ***arboréaside D***

***3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-α-L-arabinopyranosyl-acide oléanolique 28-O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{64}H_{104}O_{30,}$ M =

**FAB-MS** *m/z* 1219 $[M–H]^-$, 749 $[(M – H) –162–162–146]^-$, 455 $[(M – H) –162–162–146–132–162]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz ((voir table 14)

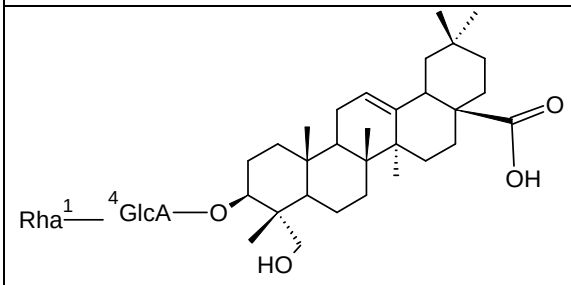



**<u>112</u>** ***arboréaside E***

***3-O-β-D-glucopyranosyl-acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranoside***

$C_{54}H_{88}O_{22,}$ M = 1088

**FAB-MS** *m/z* 1087 $[M–H]^-$, 925 $[(M–H) –162]^-$, 617 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 455 $[(M–H) –146–162–162–162)]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 15)

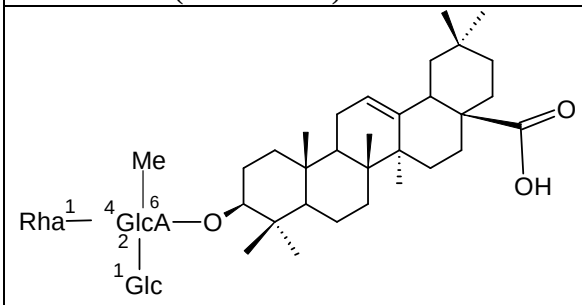



**<u>115</u>** ***arboréaside F***

***acide oléanolique 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D- Glucuronopyranoside.***

$C_{42}H_{68}O_{14}$, M = 796

**FAB-MS** *m/z* 795 $[M–H]^-$, 647 $[(M–H) –146]^-$, 471 $[(M–H)-146-176]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 18)

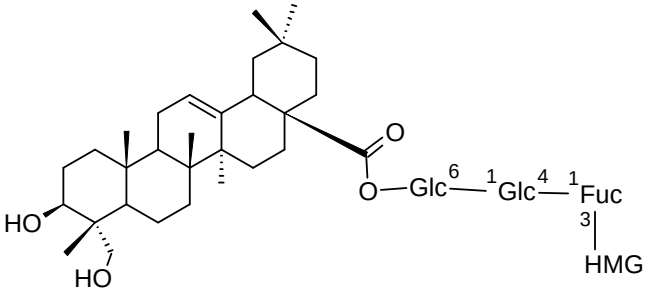



**<u>116</u>** ***arboréaside G***

***Acide oléanolique 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-(6-O-methyl)-β-D-glucuronopyranoside.***

$C_{49}H_{78}O_{18}$, **M** = 954

**FAB-MS** *m/z* 953 $[M–H]^-$, 807 $[(M–H)–146]^-$, 645 $[(M–H) –146–162]^-$, 470 $[(M–H) –146–176–15]$ **RMN-$^1$H** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 19)

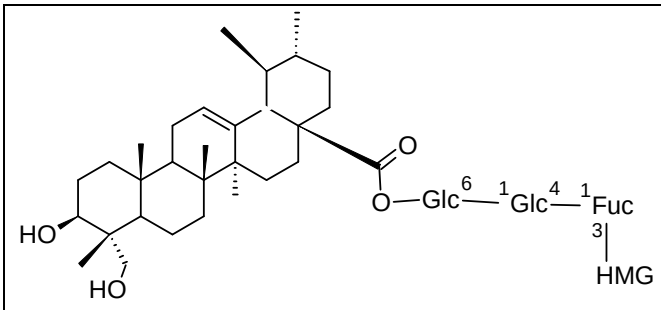



**<u>117</u>** ***arboréaside H***

***hédéragénine 28-O-[3-O-{acide 3-hydroxy-3-méthyldiglutarique}-β-D-fucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester.***

$C_{54}H_{86}O_{22,}$ M = 1086

**FAB-MS** *m/z* 1085 $[M–H]^-$, 941 $[(M–H) –144]^-$, 795 $[(M– H) –144–146]^-$, 633 $[(M – H) –144–146–162]$, 471 $[(M – H) –144–146–162–162)]^-$**, RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 20)

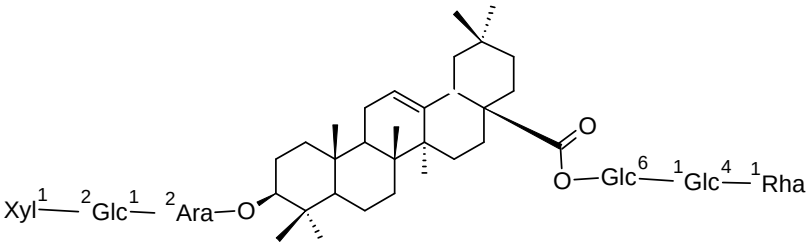



**118** ***arboréaside I***

***23-hydroxyurs-12-èn-oique 28-O-[3-O-{acide 3-hydroxy-3-méthyldiglutarique}-β-D-fucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester.***

$C_{54}H_{86}O_{22,}$ M = 1086

**FAB-MS** *m/z* 1085 $[M–H]^-$, 941 $[(M–H) –144]^-$, 795 $[(M– H) –144–146]^-$, 633 [(M – H) –144–146–162], 471 $[(M – H) –144–146–162–162)]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 20)

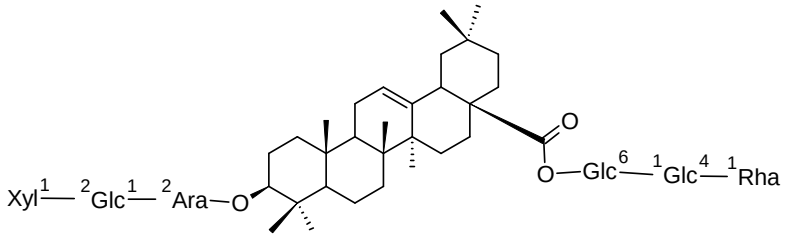



**119** ***arboréaside J***

***3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{64}H_{104}O_{30,}$ M = 1352

**FAB-MS** *m/z* 1351 $[M–H]^-$, 1219 $[(M–H) –132]^-$, 941 $[(M– H) –132–146–132]^-$, 779 $[(M– H) –132–146–132–162]^-$, 455 $[(M– H) –132–146–132–162–162–162]^-$
**RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 21)

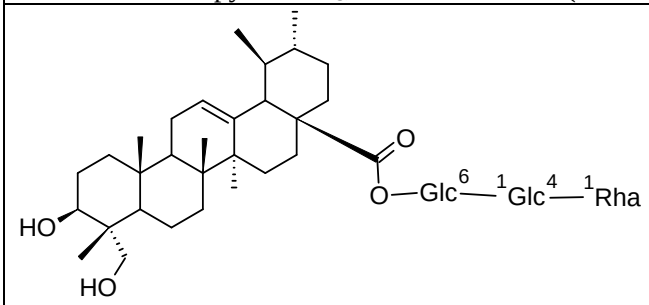



**120** ***arboréaside K***

***3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)- β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl acide urs-12-èn-oique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside***

$C_{64}H_{104}O_{30,}$ M = 1352

**FAB-MS** *m/z* 1351 $[M–H]^-$, 1219 $[(M–H) –132]^-$, 941 $[(M– H) –132–146–132]^-$, 779 $[(M– H) –132–146–132–162]^-$, 455 $[(M– H) –132–146–132–162–162–162]^-$
**RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 20)

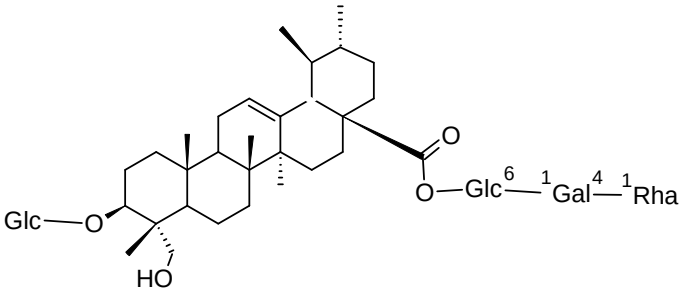



**113**

***23-hydroxyurs-12-èn-28-oique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside***

$C_{48}H_{78}O_{18,}$ M = 942

**FAB-MS** mode ion négative: *m/z* 941 $[M–H]^-$, 795 $[(M–H) –146]^-$, 633 $[(M–H) –146–162]^-$, 471 $[(M–H) –146–162–162]^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 21)

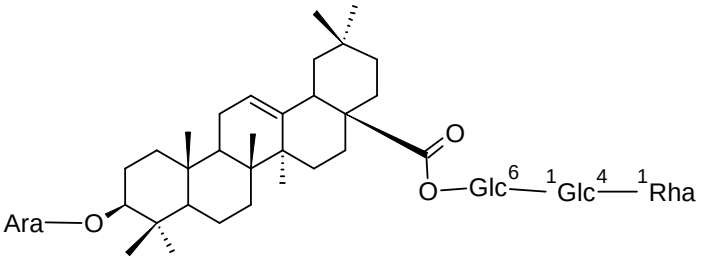



**<u>121</u>** ***arboréaside L.***

***3-O-β-D-glucopyranosyl acide 23-hydroxyurs-12-èn-oique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-galatcopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{54}H_{88}O_{23,}$ M = 1104

**FAB-MS** *m/z* 1103 $[M–H]^-$, 941 $[(M–H) –162]^-$, 617 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 471 $[(M – H) –162–146–162–162)]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 22)

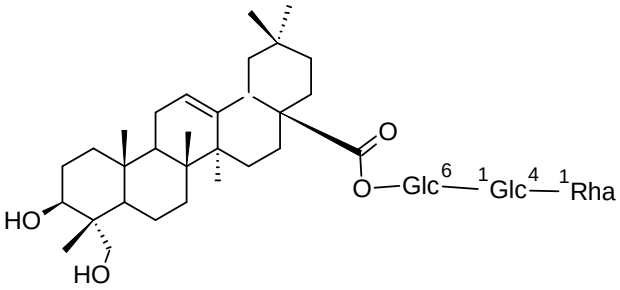



**<u>114</u>**

***3-O-α-L-arabinopyranosyl-acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{58}H_{86}O_{21}$, M = 1058

**FAB-MS** *m/z* 1057 $[M–H]^-$, 925 $[(M–H) –132]^-$, 617 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 455 $[(M – H) –132–146–162–162)]^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 17)

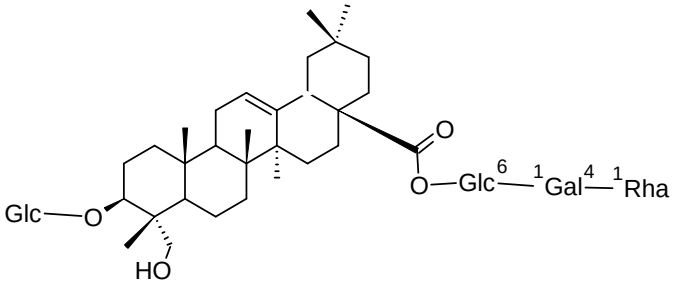



**<u>123</u>**

***Acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{48}H_{78}O_{18,}$ M = 942

**FAB-MS** *m/z* 941 $[M–H]^-$, 795 $[(M–H) –146]^-$, 633 $[(M–H) –146–162]^-$, 471 $[(M–H) –146–162–162]^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir table 24)

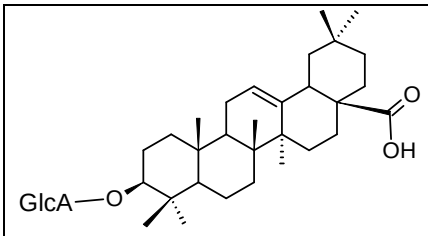



**<u>122</u>**

***3-O-β-D-glucopyranosylhédéragénine 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{54}H_{88}O_{23,}$ M = 1104

**FAB-MS** *m/z* 1103 $[M–H]^-$, 941 $[(M–H) –162]^-$, 617 $[(M– H) –146–162–162)]^-$, 471 $[(M – H) –162–146–162–162)]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C,** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 23)

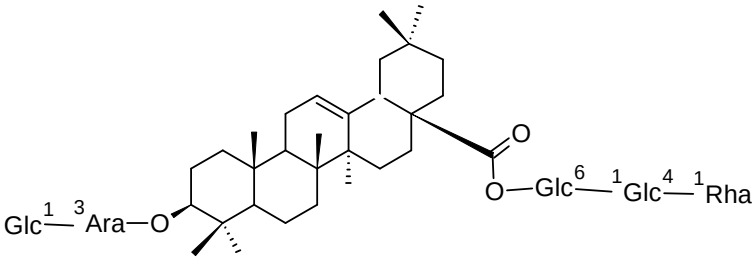



**124**

***acide oléanolique 3-O-β-D-glucuronopyranoside.***

$C_{36}H_{66}O_{9,}$ M = 672

**FAB-MS** *m/z* 671 [M–H]$^-$, 455 [(M-H)-176]$^-$, **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 25)

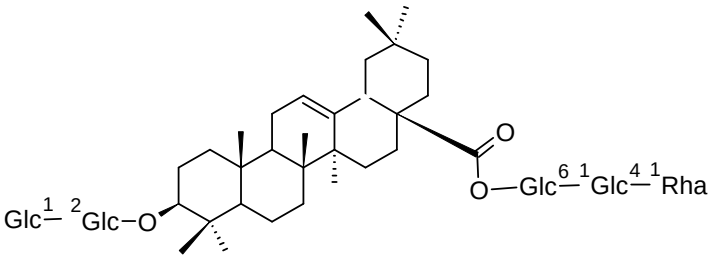



**125**

***3-O-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

$C_{59}H_{96}O_{26}$, M = 1220

**FAB-MS** *m/z* 1219 [M–H]$^-$, 1057 [(M–H) –162]$^-$, 911 [(M– H) –162–146]$^-$, 749 [(M– H) –162–146–162]$^-$, 587 [(M– H) –162–146–162–162]$^-$, 455 [(M – H) –162–146–162–162–132]$^-$
**RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 26)



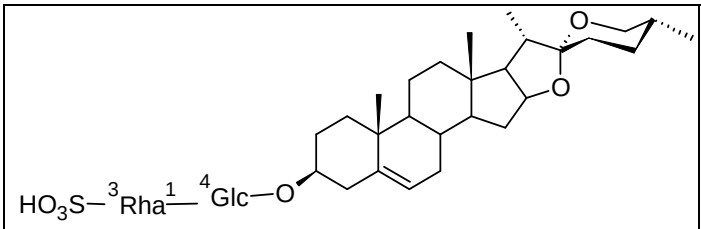
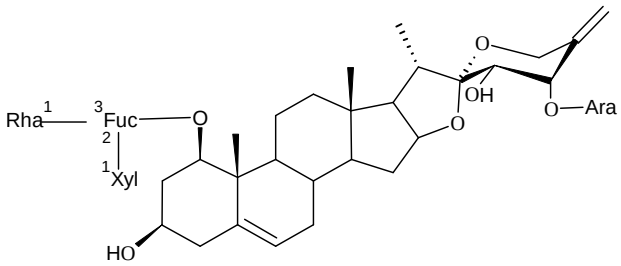
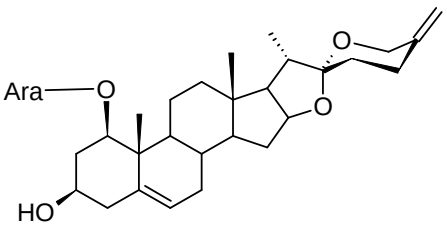
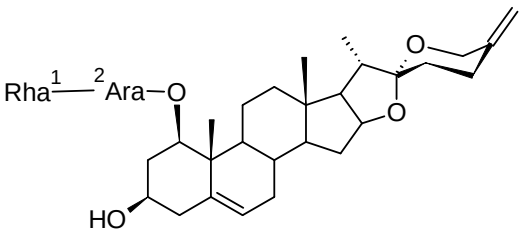
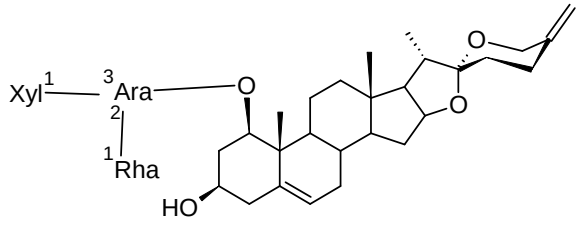

**126**

***3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2) acide oléanolique 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.***

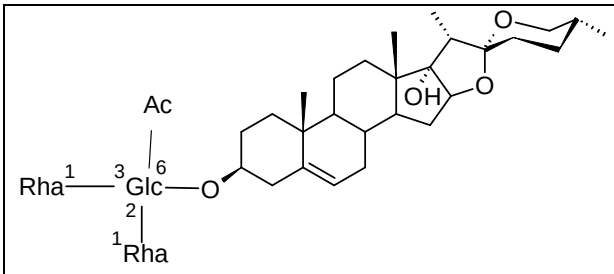
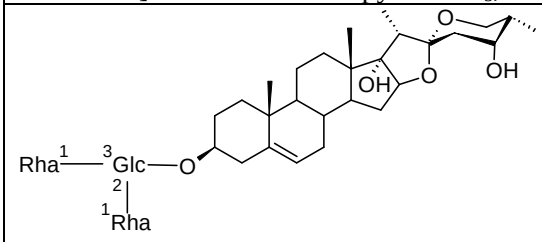
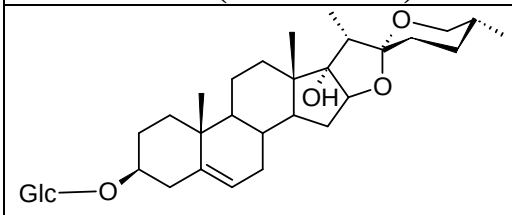
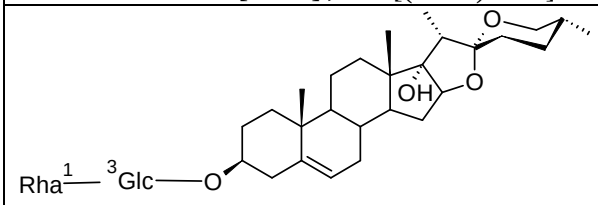
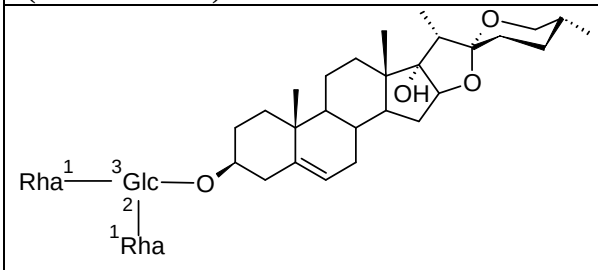
$C_{60}H_{98}O_{27,}$ M = 1250

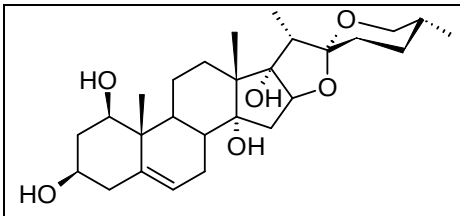
**FAB-MS** *m/z* 1249 [M–H]$^-$, 1087 [(M–H) –162]$^-$; 941 [(M–H) –162–146]$^-$, 779 [(M–H) –162–146–162]$^-$, 455 [(M– H) –162–146–162–162–324]$^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 27)

**III.5.2** *Dracaena deisteliana*

| | |
|---|---|
| <br>**127** ***deistelianoside A*** | ***diosgénine 3-O-[3-O-sulfate-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside***<br><br>$C_{39}H_{62}O_{15}S$, M = 802 |
| **FAB-MS** *m/z* 801 $[M–H]^-$, 655 $[(M– H) –146]^-$, 97 $[OSO_3H]^-$, 80 $[SO3]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 28) | |
| <br>**128** ***deistelianoside A*** | ***1-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-fucopyranosyl (23S, 24S)-spirosta-5, 25 (27)-diene-1β, 3β, 23α, 24α-tetrol 24-O-α-L-arabinopyranoside.***<br><br>$C_{49}H_{76}O_{22,}$ M = 1016 |
| **FAB-MS** *m/z* 1015 $[M–H]^-$, 883 $[(M– H) –132]^-$, 737 $[(M– H) –132–146]^-$, 591 $[(M– H) –132–146–146]^-$, 461$[(M– H) –132–146–146–132]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 29) | |
| <br>**129** | ***néoruscogénine 1-O-α-L-arabinopyranoside***<br><br>$C_{32}H_{48}O_{8,}$ M = 560 |
| **FAB-MS** *m/z* 559 $[M–H]^-$**RMN-$^1$H** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 30) | |
| <br>**130** | ***néoruscogénine 1-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside***<br><br>$C_{38}H_{58}O_{12,}$ M = 706 |
| *m/z* 705$[M – H]^-$, 559 $[(M–H)–132–146]^-$, 427 $[(M–H) –132–146]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 31) | |
| <br>**131** | ***néoruscogénine 1-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-α-L-arabinopyranoside.***<br><br>$C_{43}H_{66}O_{16,}$ M = 838 |
| **FAB-MS** *m/z* 837 $[M–H]^-$, 706 $[(M– H) –132]^-$, 564 $[(M– H) –132–146]^-$, 447 $[(M– H) –132–146–132]^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 32) | |

**III.5.3** *Dracaena arborea*.

| | |
|---|---|
| <br>**132** ***arboréasaponine A*** | ***pénnogénine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2) - [α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)] - [6-O-acétyl]-β-D-glucopyranoside.***<br><br>$C_{47}H_{74}O_{18,}$ M = 926 |
| **FAB-MS** *m/z* 925 [M –H]$^-$, 883 [(M–H)–42]$^-$, 737 [(M –H) – 42 – 146]$^-$, 429 [(M –H) – 42 –146 –162–162]$^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 33) | |
| <br>**133** ***arboréasaponine B*** | ***24α-hydroxypénnogénine 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside.***<br><br>$C_{45}H_{72}O_{18,}$ M = 900 |
| **FAB-MS** *m/z* 899[M–H]$^-$, 753 [(M–H) –146]$^-$, 445 [(M–H) –146–146–162]$^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 34) | |
| <br>**134** | ***pénnogénine 3-O-β-D-glucopyranoside.***<br><br>$C_{33}H_{52}O_{9,}$ M = 592 |
| **FAB-MS** *m/z* 591 [M–H]$^-$, 429 [(M–H)–162]$^-$ **RMN-$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 35) | |
| <br>**135** | ***pénnogénine 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside (manioside A).***<br><br>$C_{39}H_{62}O_{13}$, **M** = 738 |
| **FAB-MS** *m/z* 737 [(M–H) –146]$^-$, 429 [(M–H) –146 –162]$^-$ **RMN-$^1$H** et **$^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 36) | |
| <br>**136** | ***pénnogénine 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside (spiroconazole A)***<br><br>$C_{45}H_{72}O_{17,}$ M = 884 |
| **FAB-MS** *m/z* 883[M–H]$^-$, 737 [(M–H) –146]$^-$, 429 [(M–H) –146 –146 –162]$^-$ **RMN-$^1$H et $^{13}$C** pyridine-$d_5$, 600 et 125 MHz (voir tableau 37) | |

| | |
|---|---|
| <br>**137** | ***Namogénine A***<br>$C_{27}H_{42}O_{6,}$ M = 462 |

# *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*

Ce travail présente une étude chimique, complétée par une étude biologique réalisée séparément sur les extraits polaires des écorces et feuilles de *Cussonia arborea* (*Araliceae*), suivi de celle sur les écorces de *Dracaena deisteliana* (*Dracenaceae*) et enfin sur les tiges de *Dracaena arborea* (*Dracaenaceae*), trois plantes médicinales endémiques de l'Afrique subsaharienne. Au cours de ces investigations qui ont contribué à compléter les connaissances des constituants chimiques des plantes des familles *Araliaceae* et *Dracenaceae*, 19 saponines triterpéniques et 11saponines steroïdiques ont été isolées dont 12 dérivés triterpéniques nouveaux et 04 dérivés stéroïdiques nouveaux.

L'extrait méthanolique des écorces de *C. arborea* a fourni sept saponines triterpéniques parmi lesquelles cinq nouvelles saponines dénommées arboréasides **A-E (108 - 112)**, dont un dérivé de l'hédéragénine, un dérivé de l'acide 23-hydroxyursolique et cinq de l'acide oléanolique, tandis que l'extrait méthanolique des feuilles, a fourni 14 saponines triterpéniques dont 7 nouvelles sont dénommées arboréasides **F-L (113–119)**. Certains de ces composés ont été obtenus sous forme de mélanges inséparables des isomères: hédéragénine/acide 23-hydroxyursolique; acide oléanolique/acide ursolique. Le tableau 43 regroupe les nouvelles saponines triterpéniques obtenues de *C. arborea.*

L'extrait éthanolique des tiges de *D. deisteliana* a fourni cinq saponines steroïdiques composés d'un dérivé de la diosgénine, quatre dérivés de la néoruscogénine parmi lesquelles deux nouvelles dénommées deistélianosides **A**–**B** (**127**–**128**). L'extrait méthanolique des écorces de *D. arborea* a donné cinq saponines stéroïdiques dérivés de la pénnogénine dont deux nouvelles dénommées arboréasaponines **A**–**B** (**132**–**133**). Les nouvelles saponines stéroïdiques sont regroupées dans le tableau 44.

L'élucidation des structures de ces composés a été réalisée au moyen des méthodes modernes d'analyse spectroscopique, particulièrement la RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, ROESY ou NOESY) et la spectrométrie de masse.

Cette étude chimique qui complète celle déjà réalisée sur certaines espèces de ces deux familles de plantes a montré une fois de plus que les saponines triterpéniques, notamment les dérivés de l'acide oléanolique et son isomère l'acide ursolique, de l'héderagénine et son isomère l'acide 23-hydroxyursolique demeurent les constituants dominants de la famille des *Araliaceae* et du genre *Cussonia* en particulier. Il est à noter qu'aucune saponine dérivée de l'acide bétulinique n'a été isolée ou identifiée à partir de l'espèce *C. arborea* lors de ce travail contrairement au *C. paniculata* et *C. mannii*. D'après les élucidations structurales de plusieurs composés isolés dans le genre *Cussonia*, il s'avère que plusieurs d'entre eux possèdent une caractéristique commune, la même séquence osidique en position 28 de l'aglycone à savoir 28-

*O*-*α*-L-Rha-(1→4)-*β*-D-Glc-(1→6)-*β*-D-Glc sur motif triterpène. Il serait donc intéressant d'entreprendre des études sur d'autres espèces de ce genre afin d'évaluer le rôle de cette séquence sur la signification chimiotaxonomique et les activités pharmacologiques de ces molécules.

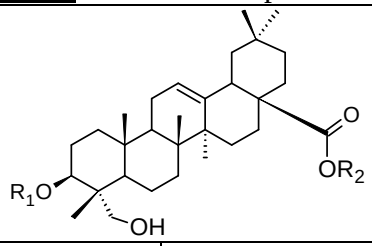
Certaines saponines steroïdiques isolées des deux espèces de *Dracaena* étudiées lors de ce travail ont montré des propriétés cytotoxiques modérées sur les deux souches de cellules cancéreuses coliques humaines (HCT 116 et HT-29) à l'aide du test au MTT et du paclitaxel comme témoin positif. Ceci permet de conforter les résultats de la littérature sur le potentiel cytotoxique des saponines isolées de ce genre.

En revanche, les saponines triterpéniques obtenues à partir des écorces de *C. arborea* n'ont pas montré d'activité cytotoxique sur les deux souches de cellules cancéreuses du côlon humain ce qui est en accord avec les données de la littérature. Il serait donc intéressant de déterminer si ces molécules ne seraient pas responsables d'autres activités attribuées à cette plante, notamment les activités antiparasitaires et antimicrobiennes.

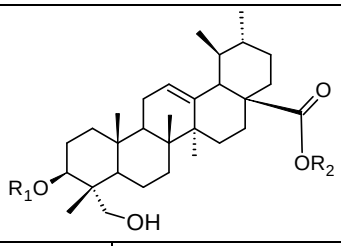
Les résultats présentés dans ce travail et les données de la littérature montrent que les saponines triterpéniques à l'hédéragénine ou acide oléanolique (et leurs isomères: acide 23-hydroxyursolique et acide ursolique, respectivement), sont une classe de métabolites très répandus dans le genre *Cussonia*, d'une part, celles à génines stéroïdiques dans le genre *Draceana*, d'autre part. Ainsi afin d'enrichir les informations sur ces deux familles, notamment celles concernant leur chimiotaxonomie, des études chimiques sur les autres espèces appartenant à ces genres devraient être nécessaires.

En conclusion, cette étude à permis d'isoler et d'évaluer le potentiel cytotoxique des quelques saponines isolées de trois espèces de plantes, et de mieux connaître la chimie des plantes médicinales africaines, Elle a en outre démontré leur intérêt comme source potentielle de nouveaux produits naturels biologiquement actifs. Nous envisageons d'étendre ces études sur d'autres espèces car vu la richesse de la flore Africaine en plantes médicinales, et le faible nombre d'espèces étudiées, celle-ci demeurent une source potentielle de métabolites secondaires biologiquement actifs.

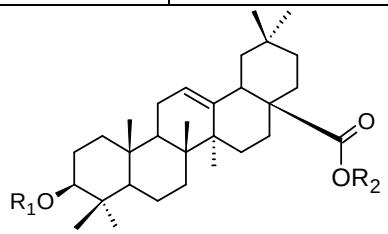
**Tableau 43** : Nouvelles saponines triterpéniques de *Cussonia arborea*.



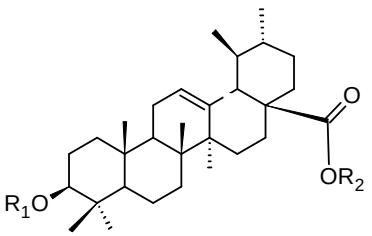
| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| **108** | Rha(1→2)Glc | Gal(6→1)Glc– |
| **113** | Rha(1→4)GlcA | H |
| **115** | H | HMG(1'→3)Fuc(1→4)Glc(1→6)Glc– |



| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| **109** | Rha(1→2)Glc | Gal(6→1)Glc– |
| **116** | H | HMG(1'→3)Fuc(1→4)Glc(1→6)Glc– |

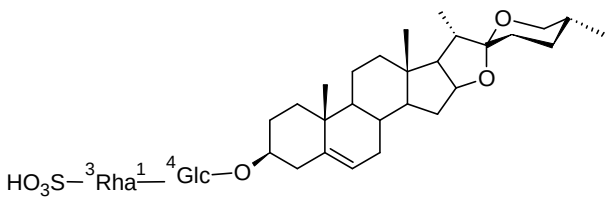


| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| **110** | Glc(1→3)Xyl(1→2)αGlc- | –Glc(6→Ara(1)<br>4<br>1<br>Rha |
| **111** | Rha(1→4)Ara–<br>2<br>1<br>Glc | – Glc(6→1)Gal |
| **112** | Glc | –Gal(6→1)Glc(2→1)Rha |
| **114** | Me<br>6<br>Rha(1→4)GlcA–<br>2<br>1<br>Glc | H |
| **117** | Xyl(1→2)Glc(1→2)Ara– | Glc(6→1)Glc(4→1)Rha– |

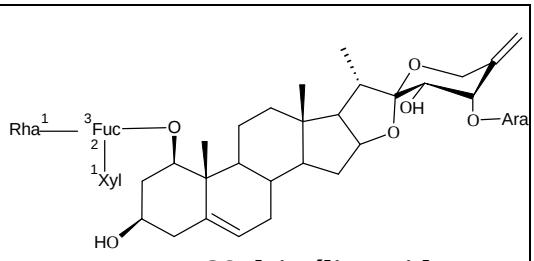


| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| **118** | Xyl(1→2)Glc(1→2)Ara– | Glc(6→1)Glc(4→1)Rha– |
| **119** | Glc | Glc(6→1)Glc(4→1)Rha– |

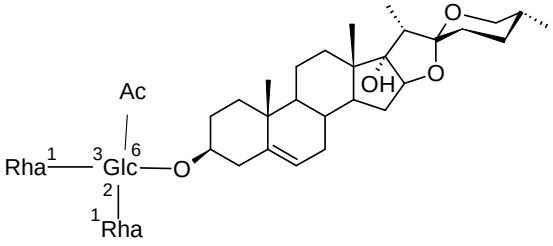
**Tableau 44** : Nouvelles saponines stéroïdiques de *D. deisteliana* et *D. arborea.*



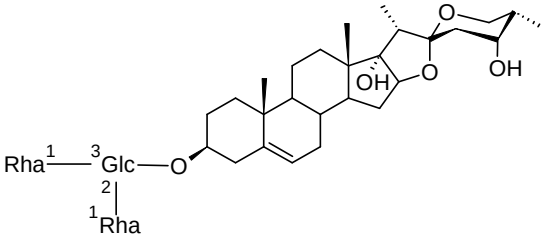
**127 deistélianoside A**



**128 deistélianoside B**



**132 arboréasaponine A**



**133 arboréasaponine B**

# *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

Abe, F., Yamauchi, T., Kinjo, J., Okabe, H., Higo, H., Akahane, H. (2002). Ursolic acid and trypanocidal constituents in rosemary. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1485–1487.

Adjanohoun, E.J., Aké Assi (1972). The useful plants of west tropical Africa 4. Royal Botanical Gardens kew.

Agrawal, P.K., Jain, D.C., Gupta, R. K., Thakur, R.S. (1985). Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* 24, 2479–2496.

Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307–3330.

Agrawal, P. K. & Pathak, A. K. (1996). Nuclear magnetic resonance spectroscopic approaches for the determination of interglycosidic linkage and sequence in oligosaccharides. *Phytochem. Anal.,* 7, 113–130.

Ainslie, J.R. (1937). A list of plants used in native medicine in Nigeria. *Imperial Forestry Institute* Paper No.7.

Angiosperm Phylogeny Group (1998). "An ordinal classification for the families of flowering plants". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85, 531–553.

Al-Fatimi, M., Friederich, U., Jenett-Siems, K. (2005). Cytotoxicity of plant used in traditional medicine in Yemen. *Fitoterapia* 76, 355–358.

Avilov, S.A., Kalinovsky, A.I., Stonik, V.A., Riguera, R., Jiménez, C. (1997). Koreaside A, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *cucumaria koraiensis*. *J. Nat. Prod.* 60, 808–810.

Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D., Fuchs, H. (2008). Saponins in Tumor Therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* 8, 575–584.

Ballabio, R. (2004). Plantes médicinales endémiques de l'île de Madère, *Phytothérapie* 2, 41–46.

Bally, P.R.O. (1937). Native Poisonous & Medicinal Plants of East Africa. *Kew Bulletin*: 10.

Boullard, B. (1997). Plantes et champignons, éd. ESTEM.

Boullard, B. (2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde, réalités et croyances, éd ESTEM.

Bouquet, A. (1969). Féticheurs et médecine traditionnelle du Congo (Brazzaville). *Mémoire ORSTOM*, 36, 128p.

Bouquet, A., Debray, M. (1974). Plantes médicinales de la cote d'Ivoire. Travaux et Documents de l´O.R.S.T.O.M. No. 32.

Burkill, H.M. (1985). The useful plants of west tropical Africa, Vol 1. Families A-D, Royal Botanic Gardens, Kew.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. Tec & Doc

Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensibility. *Cancer Res.*, 47, 936–942.

Case, R. J. Wang Y., Franzblau, S.G., Soejarto D. D., Matainaho, L., Piskaut, P. Pauli, G.F. (2007). Advanced applications of counter-current chromatography in the isolation of anti-tuberculosis constituents from *Dracaena augustifolia*, *J. Chromatogr. A*, 1151, 169–174.

Chaturvedula, V.S., Schilling, J.K., Miller, J.S., Andriantsiferana, R., Rasamisson, V.E, Kingston, D.G.I. (2003). New cytotoxic oleanane saponins from the infructescences of *Polyscias amplifolia* from the Madagascar rainforest. *Planta Med*., 69, 440–444.

Changxiang, C.; Zhou, J. (1987). The steroidal saponins of *Paris axialis*. *Acta Metall. Sinica* 9, 1–3.

Chazan, J. B. (1971). Répartition des sapogénines triterpéniques dans quelques genres d'Araliacées de Madagascar, *Phytochemistry* 10, 2111–2116.

Cheng, D.L., Cao, X.P., Wei, H.X., He, L., (1993) Kaurane diterpenoids from *Aster ageratoides*. *Phytochemistry* 33, 1181–1183.

Chevalier, A (1937). Les plantes magiques cultivées par les Noirs d'Afrique et leur origine. *Journal de la société des Africanistes*, 7, 93-105.

Cioffi, G., Piaz, F.D., Vassallo, A., Venturella, F., Caprariis, P.D., Simone, F.D., Tommasi, N.D. (2008). Antiproliferative oleanane from *Meryta denhamii*. *J. Nat. Prod. 71*, 1000–1004.

Darias, V., BraVo, L., Rabanal, R., Sanchez Mateo, C., Gonzalez Luis, R.M., Hernandez Perez, A.M. (1989). New contribution to thr ethnopharmacological study of the Canary Islands. *J. EthnoPharm. 25*, 77–92.

De Combarieu, E., Falzoni, M., Fuzzati, N., Gattesco, F., Giori, A., Lovati, M., Pace, R. (2002**).** Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. *Fitoterapia* 73, 583–596.

De Hoffmann, E., Charette, J., Stroobant, V. (1994). Spectrométrie de masse. Paris: Masson.

De Tommasi, N. D., Autore, G., Bellino, A., Pinto, A., Pizza, C., Sorrentino, R., Venturella, P. (2000). Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmata*. *J. Nat. Prod.*, 68, 308–314.

Deng, D., Lauren, D.R., Cooney, J.M., Jensen, D.J., Wurms, K.V., Upritchard, J.E., Cannon, R.D., Wang, M.Z., Li, M.Z. (2008). Antifungal saponins from *Paris polyphylla* Smith. *Planta Med.* 74, 1397–1402.

Djongang, O. (2004). Fonctions séculaires de l'arbre et dynamiques actuelles en Afrique subsaharienne le cas du pays Bamiléké dans l'Ouest Camerounais, Actes du Séminaire, Etapes de Recherches en Paysage, n° 6, Ecole Nationale Supérieure du Paysage, Versailles.

Dorman, D. E., Bauer, D. & Roberts, J. D. (1975). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 chemical and Carbon-13 proton couplings in some esters and ethers. *J. Org. Chem.*, 40, 3729–3735.

Dubois, M.-A., Ilyas, M., Wagner, H. (1986). Cussonosides A and B, triterpene saponins from *Cussonia barteri*. *Planta Med.* 52, 80–83.

Dupont, F., Guignard, J-.L. (2007). Botanique: systématique moléculaire. Ed. Elsevier Masson.

Dovgii, I.I, Grishkovets, V.I., Kachala, V.V and Shashkov, A.S. (2005). Triterpene glycosides from *Cussonia paniculata*. Isolation and structure determination of glycosides A, $B_1$, C, D, $G_2$, $H_1$ and $H_2$, from leaves of *Cussonia paniculata*. *Chem. Nat. Compd.*, 41, 2, 200–204.

Dovgii I.I., Grishkovets, V.I., Kachala, V.V and Shashkov, A.S. (2006). Triterpene glycosides from *Cussonia paniculata*. Structure of glycosides $I_1$, $I_2$, $J_1A$, $J_1B$, $J_2$, K, $L_1$, and $L_2$ from *Cussonia paniculata* leaves. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 2, 182–185.

Ebbesen, P., Dalsgaard, K., Madsen, M. (1976). Prolonged survival of AKR mice treated with the saponin adjuvant Quil A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand A*, 84, 358–360.

Espeji, O., Llavot, J.C., Jung, H., Giral. F. *(*1982). Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea composita* tubers. *Phytochemistry* 21,413–416.

Gaidi, G., Correira, M., Chauffert, B., Beltramo, J.-L., Wagner, M., Lacaille-Dubois, M.-A. (2002). Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. *Planta Med.*, 68, 70–72.

Gautier, D. (1994). Valeurs d'usage des arbres en pays Bamiléké. *Bois et forêts des Tropiques* 241, 39–51.

González, A. G., León, F., Hernández J. C., Padrón, J.I., Sánchez-Pinto, L., Barrera. J. B. (2004). Flavans of drogon's blood from *Dracaena draco* and *Dracaena tamaranae*. *Bioch. Syst. Ecol.*, 32, 179–184.

Grishkovets, V.; Dovgii, I.; Kachala, V.; ShashkoV, A. (2005). Triterpene Glycosides from *Cussonia paniculata*. II. Acetylated Glycosides from Leaves. *Chem. Nat. Compd*, 41, 4, 436–441.

Günther, H. (1996). La spectroscopie de RMN: principe de base, concepts et application de la spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en Chimie. Paris: *Ed*. *Masson*.

Gunzinger J., Msonthi J.D. & Hostettmann K. (1986). Molluscicidal Saponins from *Cussonia spicata*. *Phytochemistry* 25, 2501–2503.

Haddad, M., Miyamoto, T., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizzia adianthifolia*. *J. Nat. Prod.* 66, 372–377.

Hara, S., Okabe, H., Mihashi, K. (1987). Gas-liquid chromatography separation of aldose enantiomers as trimethylilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(R)-carbohydrates. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 501–506.

Harinantenaina, L., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002a). Clerodane and Labdane diterpene glycosides from a Malagasy endemic plant, *Cussonia racemosa*. *Phytochemistry* 60, 339–343.

Harinantenaina, L., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002b). *Ent*-kaurane diterpenoid glycosides from the leaves of *Cussonia racemosa*, a Malagasy endemic plant. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 268–271.

Harinantenaina, L., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002c). *Ent*-kaurane diterpenoid glycosides from the leaves of *Cussonia bojeri*, a Malagasy endemic plant. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 1122–1123.

Harinantenaina, L., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002d). *Ent*-kaurane diterpenoid glycosides from the leaves of *Cussonia vantsilana*, a Malagasy endemic plant. *Phytochemistry* 61, 367–372.

Harinantenaina, L., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002e). Cussosaponins A-E, triterpene saponins from the leaves of *Cussonia racemosa*, a Malagasy endemic plant. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 1290–1293.

Henrick, C.A., Jefferies, P.R. (1964). The Chemistry of *euphorbiaceae*. The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus Diels*. *Aust. J. Chem.* 17, 915–933.

Hernandez, J.C., León, F., Quintana, J., Estevez, F.A, Bermejo, J. (2004) Icogenin, a new cytotoxic steroidal saponin isolated from *Dracaena draco*. *Biorg. Med. Chem.* 12, 4423–4429.

Himmelreich, U., Masaoud, M., Adam G. & Ripperger. H. (1995). Damalachawin, a triflavonoid of a new structural type from dragon's blood of *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry* 39, 4, 949–951.

Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. (1991). Saponins. *Methods in plants Biochemistry 7*, 435–471.

Hostettmann, K., Marston, A. (1995). *Saponins*. Chemistry and Pharmacology of Natural products: saponins. Cambridge University Press.

Hu, H.-B., Zheng, X.-D., Cao, H., Guo, X.-Q., Hu, H.-S. (2009). Triterpenoid saponins from the stem bark of *Acanthopanax brachypus Harms*. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 1000–1003.

Hu, M., Ogawa, K., Shashida, Y., Pei-Gen, X. (1995). Triterpenoid glucoronide saponins from roots of *Aralia armata*. *Phytochemistry* 39, 179–184.

Hyde, M.A. and Wursten, B. (2010). *Flora of Mozambique: Genus page: Cussonia.*

Irvine, F.R. (1930). Plants of the Gold Coast. Oxford University Press.

Jayasinghe, L., Shimada, H., Hara, L., Fujimoto, Y. (1995). Hederagenin glycosides from *Pometia exima*. *Phytochemistry* 40, 891–897.

Jhoo, J-W., Sang, S., He, K., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R.E., Zheng, Q.Y., Rosen, R.T., Ho, C-T. (2001). Characterization of the triterpene saponins of the roots and rhizomes of blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides*). *J. Agric. Food. Chem.* 49, 5969–5974.

Jiang, D.F, Ma, P., Yang, J., Wang, X., Xu, K., Huang, Y., Chen, S. (2003). Formation of blood resin in abiotic *Dracaena Cochinchinensis* inoculated with Fusarium 9568D. *J. Appl. Ecol.* 14, 477–478.

Jiofack, T., Ayissi, L., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V. (2009). Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong Valley forest in Cameroon, *Afr. J. Pharm. and Pharmacol.* 3(4), 144–150.

Jussieu, A. L. (1789). *Genera Plantarum* secundum *ordines naturales disposita: juxta methodum in horto regio Parisiensi exaratam, anno* M.DCC.LXXIV.

Kamernitskii, A.V., Abubakirov, N.K., Gorovits, M.B., Vollerner, Y.E., Voishvillo, N.E., Reschetova, I.G., Paseshnichenko, V.A. (1986). *Chemistry of Spirostanols*; Nauka: Moscow, USSR.

Kaneda, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Tanaka, O., Nishi, K. (1978). Paniculosides-VI, diterpene-glycosides from *Stevia ovata* Lag. *Chem. Pharm. Bull*, *26*, 2266–2267.

Kerharo, J., Bouquet, A. (1950). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire et Haute-Volta, Vigot, Paris, 197 p.

Kisangau, D. P., Lyaruu, H.V.M, Hosea, K. M., Joseph, C.C. (2007). Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district. *J Ethnobiol Ethnomed*., 3, 29.

Kougan, G.B., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., Lacaille-Dubois, M.A. (2009). Arboreasides A-E, triterpene saponins from the bark of *Cussonia arborea*. *J. Nat. Prod.* 72, 1081–1086.

Kougan, G.B., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., (2010). Steroidal saponins from two species of *Dracaena*. *J. Nat. Prod*. 73, 1266–1270

Kougan, G.B., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., Lacaille-Dubois, M.A. (2010). Arboreasides F-L, triterpene saponins from the leaves of *Cussonia arborea*. (*publication to be submitted).*

Kostova, I, Dinchev., D., Rentsch, G. H., Dimitrov, V., Ivanov, A. (2002). Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Z Naturforsch C.* 57, 33–38.

Kubitzki, K. (1998). The Families and Genera of Vascular Plants Volume 3. *Flowering Monocotyledons.* Springer Publishers, London.

Kumar, V.P., Chauchan, N.S., Padh, H., Rajani, M. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol. 107*, 182–188.

Lacaille-Dubois, M.-A., Wagner, H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 2, 363–386.

Lacaille-Dubois, M.-A., Wagner, H., (2000). In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry Vol. 21, Elsevier: Amsterdam, 633–687.

Lacaille-Dubois, M.-A (2005). Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-ur-Rahman (Ed.). *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32, 209–246

Lee, S.-J., Sung, J.-H., Lee, S.-J., Moon, C.-K., Lee, B.-H. (1999) antitumor activity of noVel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett.* 144, 39–43.

Lee, Y. N., Lee, H. Y., Kim, S. I., Lee, S, K., Park, B. C., Kim, K. W. (1996). *In vitro* introduction of differenciation by gensenosides in F9 Teratocarcinoma cells. *Eur. J. Cancer.* 32A, 1420–1428.

Liu, W.K., Xu, S.X., Che, C.T. (2000). Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* 67, 1297–1306.

Liu, X., Su, C., Shijin, Y., Zhinan, M. (2004). Effects of Dragon's blood resin and its component loureirin B on tetrodotoxin-sensitive Voltage-gated sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. Science in China, series C, *Life Sci.* 47, 304–348.

Liu, X, Yin, S., Chen, S., Ma, Q. (2005). Loureirin B: an effective component in Dragon's Blood modulating sodium currents in TG neurons, in: Conference proceedings: *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference 5*, 4962–4965.

Mabberley, D.J. (1997). The Plant Book. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Mahato, S.B., Sahu, N.P., and Ganguly, A. N. (1981). Steroidal saponins from *dioscorea floribunda*: structures of floribundasaponins A and B. *Phytochemistry* 20, 1943–1946.

Mangle, M.S, Jolly, C.I. (1998). HPTLC studies on *Tribulis terrestris*. *Indian drugs* 35, 189–194.

Marrero, A., Almeida, R.S., Gonzàles-Martín, M. (1998). A new species of the wild dragon tree. *Dracaena (Dracaenaceae)* from Gram Canaria and its taxonomic and biogeographic implication. *Bot. J. Linn. Soc.* 128, 291–314.

Marker, R. E., Lopez, J. (1947). Steroid sapogenins. N163. The biogenesis of steroidal sapogenins in plants. *J.Am. Chem. Soc.* 69, 2383–2385.

Marston, A., Wolfender, J. L. & Hostettmann, K. (2000)**.** Analysis and isolation of saponins from plant material. In Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants, Annual Proceedings of the Phytochemical Society, pp. 1–12 (Oleszek, W and Marston, A, editors). Oxford and London: Clarendon Press.

Masaoud, M., Ripperger, H., Himmelreich, U & Adam, G. (1995a). Cinnabarone, a biflavonoid from dragon's blood of *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry* 38, 751–753.

Masaoud, M., Schmidt J., Adam, G. (1995b). Sterols and triterpenoids from *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry* 38, 795–796.

Massiot, G., Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponin. In: Attar-ur-Rahman (Ed.). Structure and chemistry (part C). *Stud. Nat. Prod. Chem*. 15, 187–224.

Miller, A. (2004). *Dracaena cinnabari*. In IUCN 2010. IUCN red list of threatened species. Version 2010.1

Mimaki, Y., Kanmoto, T., Kuroda, M., Shashida, Y., Satomi, Y., Nishino, A., Nishino, H. (1996a). Steroidal saponins from the underground parts of *Chlorophytum comosum* and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry* 41, 1405–1410.

Mimaki, Y., Kanmoto, T., Kuroda, M., Shashida, Y., Satomi, Y., Nishino, A., Nishino., H. (1996b). Steroidal saponins from *Hosta longipes* and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry* 42, 1065–1070.

Mimaki, Y., Inoue, T., Shashida, Y. (1996c). Steroidal saponins from *Sanseviera trifasciata*. *Phytochemistry* 43, 1325–1331.

Mimaki, Y. Kuroda, M., Ide, A., Kameyama, A., Yokosuka, A., Shashida, Y. (1999). Steroidal saponins from the aerial parts of *Dracaena draco* and their cytostatic activity on HL-60 cells *Phytochemistry* 50, 805–813.

Mimaki, Y., Yokosuka, A., Kuroda, M., and Sashida, Y. (2001). Cytotoxic activities and structure cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1286–1289.

Mimaki, Y., Watanabe, K., Sakuma, C., Sakagami, H., Shashida, Y. (2003). Novel Polyoxygenated Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis. Helv. Chim. Acta 86*, 398–407.

Mimaki, Y., Doi, S., Kuroda, M., Yokosuka, A. (2007). Triterpene glycosides from the stem of *Akebia quinata*. *Chem. Pharm. Bull*. 55, 1319–1324.

Moharram, F.A., El-shenawy, S. M. (2007). Antinoceiptive and anti-inflammatory Steroidal Saponins from *Dracaena ombet*, *Planta Med.* 73, 1101–1106.

Mothana, R.A.A., Lindequist, U. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants of island Soqotra. *J. Ethnopharmacol. 96*, 177–181.

Mothana, R.A.A., Mentel, R., Reiss, C., Lindequist, U. (2006). Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from island Soqotra, *Phytotherapy Research 20*, 298–302.

Muir, A. D.; Ballantyne, K. D. & Hall, T. W. (2000). LC-MS and LC-MS/MS analysis of saponins and sapogenins – comparison of ionization techniques and their usefulness in compound identification. In Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants, Annual Proceedings of the Phytochemical Society, pp. 35–42 (Oleszek, W and Marston, A, editors). Oxford and London: Clarendon Press.

Nakano, K.; Murakami, K.; Takaishi, Y.; Tomimatsu, T.; Nohara, T. (1989**).** Studies on the Constituents of *Heloniopsis orientalis* (THUNB). *Chem. Pharm. Bull. 37*, 116–118.

Nkounkou-Loumpangou, C., Binimbi-Massengo, A., Nzonzi, J., Ouamba, J.-M., Abena, A.-A., Diatewa, M. (2005) Inventaire des plantes médicinales utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine à Brazzaville, *Phytothérapie* 6, 252–259.

Okita, K., Li, Q., Murakamio, T., Takahashi, M. (1993**).** Anti-growth effects components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cells. *Eur. J. Cancer Prev., 2*, 169–175.

Okunji, C.O., Iwu, M.M., Hostettman, K. (1991). Molluscicidal saponins from pulp of *Dracaena mannii*. *Int. J. Pharm*. *29*, 66–70.

OMS (2002). Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005. Genève, 78 p.

Park, J. A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K. W., Lee, S. K. (1997). Activation of capase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of gensenosides Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121, 73–81.

Park, H.-J., Kwon, S.H., Lee, J.H., Lee, K.-H., Miyamoto, K.-I., Lee, K.-T. (2001). Kalopanaxsaponin A is a Basic Saponin Structure for the Anti-Tumor Activity of Hederagenin Monodesmosides. *Planta Med.* 67, 118–121.

Pearson, J. (2001). *Dracaena*, A Source of Dragons Blood Resin: The history, botany and analysis of the dragon's blood collection at the Royal Botanic Gardens, Kew. (Unpublished Kew Diploma in Horticulture dissertation).

Perrot E. (1929). Sur les productions végétales indigènes ou cultivées de l'Afrique occidentale française, Lons-le-Saunier, Declume L., 468 p.

Pousset J.L. (1989). Plantes médicinales africaines: Utilisation pratique, 156 p. *Ed*. Ellipses - ACCT

Pousset, J.L. (2004). Plantes médicinales d'Afrique : comment les reconnaître et les utiliser?, *Ed*. Edisud.

Sanchez-Contreras, Diaz-Lanza, A.M., Bernabe. M, Ollivier, Balansard, Faure (1998). Sulfated saponins from *Bupleurum rigidum*, *J. Nat. Prod*. 61, 1383–1385.

Sanchez-Contreras, Diaz-Lanza, A.M., Bernabe, M. (2000). Four new triterpenoid saponins from roots of *Bupleurum rigidum*, *J. Nat. Prod*. 64, 1479–1482.

Sang, S., Lao, A.; Wang, H. & Chen, Z. (1999). Two new spirostanol saponins from *Allium tuberosum*. *J. Nat. Prod.*, 62: 1028−1029.

Sasmakov, S. A., Putieva, J. M., Saatov, Z., Lindequist, U. (2003). A new triterpene glycoside from *Zygophyllum eichwaldii*. *Pharmazie* 58, 602–603.

Schöpke, T. (2000). Non-NMR methods for structure elucidation of saponins, feedstuffs and medicinal plants. Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher, 95–106.

Sebsebe, D. (2006). Flora of Somalia, Vol.4. Royal. Botanic Gardens, Kew.

Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. (2003). Complete assignments of $^{1}H$ and $^{13}C$ resonances of oleanolic acid, 18α-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Res. Chem.* 41, 636–638.

Shao, C.-J., Kasai, R., Xu, J.-D., Tanaka, O. (1988). Saponins from leaVes of *Acanthopanax senticosus* Harms, Ciwujia: structures of ciwujianosides B, C1, C2, C3, C4, D1, D2 and E. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 601–608.

Shaker, K. H., Bernhardt, M., Elgamal, M. H. A. & Seifert, K. (2000). Sulfonated triterpenoid saponins from *Fagonia indica*. Z. *Natursforsch*, 55c, 520–523.

Shashi, B., Mahato, S. B., Sahu, N. P., Ganguly, A. N. Steroidal saponins from *Dioscorea floribunda*: structures of floribundasaponins A and B. *Phytochemistry* 1981**,** *20*, 1943–1946.

Sheridan, M. (2008). Tanzanian Ritual Perimetrics and African Landscapes: The Case of *Dracaena, Int. J. Afri. Hist. Stud.* 41, 491–521.

Shibata, S. (2001). Chemistry and cancer preventing activities of *ginseng* saponins and some related triterpenoid compounds. *J. Korean Med. Sci.* 16, 28–37.

Stern, W. T. (1992). Dictionary of Plant Names for Gardeners. Cassell Publishers Ltd, London.

Sung, T. V., Adam, G. (1991). Sulphated triterpenoid saponins from *Schefflera Octaphylla. Phytochemistry* 30, 2717–2720.

Tapondjou, L. A., Lontsi, D., Sondengam, B. L., Shaheen, F., Choudhary, M. I., Ur-Rahman, A., Van-Heerden, F. R., Park, H.-I., Lee, K.-T. (2003a). Saponins from *Cussonia bancoensis* and their inhibitory effect on nitric oxide production. *J. Nat. Prod*., 66, 1266–1269.

Tapondjou, L. A., Lontsi, D., Sondengam, B. L., Choi, J., Jung, H.-J., Lee, K.-T, Park, H.-I (2003b). In vivo antinociceptive and anti-inflammatory effects of two triterpenes: ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid from *Cussonia bancoensis*. *Arch. Pharm. Res*., 26, 143–146.

Tapondjou, L.A., Kenvoufo, B. P., Teponno, R. B., Mbiantcha, M., Djoukeng, J. D., Nguelefack, T. B., Watcho, P., Cadenas, A. G., Park, H-J. (2008). In vivo Anti-inflammatory Effect of a new steroidal Saponin, Manioside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii. Arch. Pharm. Res.*, 31, 653–658.

Tennant J. R. (1968). Flora of tropical East Africa. *Araliaceae*, Crown agents for overseas Governments and administrations, Millbank, London.

Terui, Y., Tori, K. & Tsuji, N. (1976). Esterification shifts in carbon-13 NMR spectra of alcohols. *Tetrahedron Lett.* 17: 621–622.

Tschesche, R., Wulf, G. (1972). *Chemie und biologie der saponine*. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW, editors. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Wien-New York. Springer-Verlag. pp 461–606.

Tran, L.Q., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Tran, Q, K., Saiki, I and Kadota, S. (2001). New Spirostanol Steroids and Steroidal Saponins from Roots and Rhizomes of *Dracaena angustifolia* and Their Antiproliferative Activity. *J. Nat. Prod. , 64*, 1127–1132.

Tran, L.Q., Qui, T. K., Kadota, S. (2004). Study of *Dracaena angustifolia:* I - new spirostanol sapogenins from roots and rhizomes. *J. Chem.* 42, P. 122–124.

Vachalkova, A., Novotny, L., Nejedlikova, M., Suchý, V. (1995). Potential carcinogenicity of homoisoflavonoids and flavonoids from *Resina sanguinis draconis* (*Dracaena cinnabari* Balf). *Neoplasma* 42, 313–316.

Vaselá, D., Marek, R., Ubik, K., Lunerová, K., Sklenár, V., Suchý, V. (2002). Dracophane, a metacyclophane derivative from the resin of *Dracaena cinnabari* Balf. *Phytochemistry*, 61, 967–970.

Viguier, R. «Recherches anatomiques sur la classification des Araliacées». Paris: Masson et Cie, 1906. In-8, (3) -210 - (1) pp. Thèse pour l'obtention du grade de docteur ès sciences naturelles, soutenue en juin 1906.

Wang, J., Ruan, D., Cheng, Z., Zhou, L. (1999). Phytoalexins in *Dracaena cochinchinensis* resin. *Chin. J. Appl. Ecol.* 10, 255–256.

Woo. E.R., Kim, J. R., Yoon, S. H., Park, H. (1998) A cytotoxic pennogenin glycoside from *Majanthemum dilatatum*. *Planta Med*. 64, 466–468.

Xiao, K., Yi, K.-H., Wang, Z.-Z., Tang, H.-F., Li, Y.-Q., Lin, H.-W. (1999). A cytotoxic triterpene saponin from roots of *Aralia dasyphylla*. *J. Nat. Prod.,* 62, 1030–1032.

Xu, M., Yang, C.-R., Zhang, Y.-Z. (2010). New $C_{27}$ steroidal bidesmosides from the fresh stems of *Dracaena cambodiana*. *Helv. Chim. Acta* 93, 302–308.

Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R., Tanaka, O. (1976). Structures of *Stevia* diterpenes-glucosides: application of $^{13}C$ NMR. *Tetrahedron Lett*. 13, 1005–1008.

Yang, C. R, Wang, Z. (1986). Steroidal saponins from fresh fruits of *Dracaena cambodiana*. *Acta Bot. Yunnanica* 8, 355–358.

Ye, W., Pan, G., Zhang, Q., Che, C.-T, Wu, H., Zhao, S. (1999). Five new triterpene saponins from *Pulsatilla patens Var. multifida*. *J. Nat. Prod.* 62, 233–237.

Yokosuka, A., Mimaki, Y., Shashida, Y. (2002). Four new 3, 5-cyclosteroidal saponins from *Dracaena surculosa*. *Chem. Pharm. Bull*. 50, 992–995.

Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 62, 2291–2299.

Yui, S., Ubukata, K., Hodono, K., Kitahara, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., Yamasaki, M. (2001). Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *Int Immunopharmacol*. 1, 1989–2000.

Yamasaki, K., Kolda, H., Kobayashi, T., Kaneda, N., Kasai, R., Tanaka, O., Nishi, K. (1977). Application of 13C NMR spectroscopy to chemistry of glycosides: structures of paniculosides I, II, III, IV and V, diterpene glycosides of *stevia paniculata* Lac. *Chem. Pharm. Bull*., 25, 2895–2899.

Yu, L.J.; Ma, R.D., Wang, Y.Q., Nishino, H., Takayasu, J., He, W.Z., Chang, M., Zhen, J., Liu, W.S., Fan, S.X. (1992). Potent anti-tumorigenic effect of tubeimoside 1 isolated from the bulb of *Bolbostemma paniculatum* (maxim) franquet. *Int. J. Cancer,* 50, 635–638.

Yun, T.-K (2003). Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523/524, 63–74

Zheng, Q. A, Li, H-Z., Zhang, Y-J., Yang, C-R. (2006). Dracaenogenins A and B, new spirostanols from the red resin of *Dracaena cochinchinensis. Steroids* 71, 160–164.

Zheng, Q. A., Zhang, Y-J., Li, H-Z., Yang, C-R. (2004). Steroidal saponins from fresh stem of *Dracaena cochinchinensis*. *Steroids* 69, 111–119.

Zhong, H.M., Chen, C.X., Tian, X., Chui, Y.X., Chen, Y.Z. (2001). Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica*. *Planta Med*. 67, 484–488.

# *ANNEXES*

# Liste des tableaux

**Tableau 1** Répartition géographique de quelques espèces de *Cussonia* d'Afrique
**Tableau 2** Glycosides diterpéniques isolés du genre *Cussonia*
**Tableau 3** Saponines à acide oléanolique
**Tableau 4** Saponines à hédéragénine
**Tableau 5** Saponines à acide ursolique /23-hydroxyursolique
**Tableau 6** Saponines à acide bétulinique
**Tableau 7** Saponines à génine spirostanique isolées des espèces de *Dracaena*
**Tableau 8** Saponines à génine Furostanique isolées des especes de *Dracaena*
**Tableau 9** Les génines isolées du genre *Dracaena*
**Tableau 11** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **108**
**Tableau 12** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **109**
**Tableau 13** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **110**
**Tableau 14** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **111**
**Tableau 15** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **112**
**Tableau 16** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **113**
**Tableau 17** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **114**
**Tableau 18** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **115**
**Tableau 19** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **116.**
**Tableau 20** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **117/118**
**Tableau 21** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **119/120**
**Tableau 22** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **121**
**Tableau 23** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **122**
**Tableau 24** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et des sucres du composé **123.**
**Tableau 25** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **124**
**Tableau 26** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **125.**
**Tableau 27** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **126.**

**Tableau 28** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **127.**
**Tableau 29** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **128.**
**Tableau 30** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **129.**
**Tableau 31** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **130.**
**Tableau 32** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **131**
**Tableau 33** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **132**
**Tableau 34** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **133**
**Tableau 35** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **134**
**Tableau 36** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **135**
**Tableau 37** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone et sucres du composé **136**
**Tableau 38** Déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ($C_5D_5N$) de l'aglycone **137**
**Tableau 39** Activités cytotoxiques des saponines isolées de *C. arborea*.
**Tableau 40** Activités cytotoxiques des saponines isolées de *D. arborea*
**Tableau 41** Activités cytotoxiques des saponines isolées de *D. deisteliana*
**Tableau 42** Plantes étudiées et lieux de récolte
**Tableau 43** Nouvelles saponines triterpéniques de *C. arborea*
**Tableau 44** Nouvelles saponines stéroïdiques de *D. deisteliana* et *D. arborea.*

## Liste des figures

**Figure 1.** Schéma d'extraction des saponines à partir des racines d'une plante
**Figure 2:** Corrélations COSY
**Figure 3:** Corrélations TOCSY
**Figure 4:** Corrélations NOESY
**Figure 5:** Corrélations NOESY entre le sucre et l'aglycone
**Figure 6:** Corrélations HMBC
**Figure 7:** Corrélations $^{1}H$-$^{13}C$ ($^{1}J$)
**Figure 8:** Schéma d'extraction et de purification d'extrait d'écorces de *C. arborea*
**Figure 9:** Schéma d'extraction et de purification d'extrait des feuilles de *C. arborea*
**Figure 10**: Structures et corrélations HMBC et COSY observées sur les spectres RMN 2D des génines.
**Figure 11:** Spectre HSQC de la partie aglycone du composé 108
**Figure 12:** Spectre HSQC de la zone des anomères du composé **108**
**Figure 13:** Spectre HMBC de la partie osidique du composé **108**

**Figure 14:** Spectre HSQC de la zone des anomère du composé **111**
**Figure 15:** Spectre HMBC de la partie osidique du composé **111**
**Figure 16:** Spectres HSQC de la partie aglycone des composés **117/118**
**Figure 17:** Spectre HSQC des la zone des anomères des composés **117/118**
**Figure 18**: Spectres HSQC de la partie osidique des composés **117/118**
**Figure 19**: Spectres HSQC de la partie osidique des composés **117/118**
**Figure 20:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **127**
**Figure 21:** Spectre TOCSY de la partie osidique du composé **127**
**Figure 22:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **128**
**Figure 23:** Spectres HMBC de la partie osidique du composé **128**
**Figure 24:** Spectre TOCSY de la partie osidique du composé **128**
**Figure 25:** Protocole d'extraction et de purification des écorces de *D. arborea*
**Figure 26:** Spectre HSQC de la partie osidique du composé **132**
**Figure 27:** Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **132**
**Figure 28:** Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **133**
**Figure 29:** Spectre TOCSY de la partie aglycone du composé **133**
**Figure 30:** Les effets cellulaires des saponines

## Liste des schémas

**Schéma 1** Classification classique des *Araliaceae*.
**Schéma 2** Classification phylogénétique des *Dracaena*
**Schéma 3** Composition des saponines
**Schéma 4** Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes
**Schéma 5** Conversion d'un glycoside furostanol en un spirostanol par hydrolyse enzymatique du 26-glycoside
**Schéma 6** Structure d'un spectromètre de masse

### Liste des Photos

**Photo 1** *Cussonia arborea*
**Photo 2** Fleurs de *Cussonia arborea*
**Photo 3** *Dracaena arborea*
**Photo 4** *Dracaena deisteliana*

## Liste des publications issues de ce travail

1- Kougan, G.B., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., Lacaille-Dubois, M.A. (2009). Arboreasides A-E, triterpene saponins from the bark of *Cussonia arborea*. *J. Nat. Prod.* 72, 1081–1086.

2- Kougan, G.B., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., (2010). Steroidal saponins from two species of *Dracaena*. *J. Nat. Prod*. 73, 1266–1270.

3- Kougan, G.B., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B.L., Lacaille-Dubois, M.A. (2010). Arboreasides F-L, triterpene saponins from the leaves of *Cussonia arborea*. (*publication to be submitted).*