



HAL
open science

Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques

Nampoina Andriamisaina Andriamasinoro

► **To cite this version:**

Nampoina Andriamisaina Andriamasinoro. Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT: 2018UBFCE014 . tel-02134104

HAL Id: tel-02134104

<https://theses.hal.science/tel-02134104>

Submitted on 20 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE AU LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE PEPITE EA 4267

Ecole doctorale
Environnements - Santé

Doctorat de pharmacie, spécialité pharmacognosie

Par

Nampoina ANDRIAMISAINA ANDRIAMASINORO

**Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes
de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs
activités biologiques**

Thèse présentée et soutenue à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon salle R01, le 9 novembre 2018

Composition du Jury :

Pr. Anne TESSIER
Pr. Laurent POUYSEGU
Dr. Xavier CACHET
Dr. Denis DEFFIEUX
Pr. Anne-Claire MITAINE-OFFER
Pr. Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS

UBFC
Université de Bordeaux
Université Paris Descartes
Université de Bordeaux
UBFC
UBFC

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse

Titre : Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques.

Mots clés : saponines ; triterpènes ; stéroïdes ; RMN ; cytotoxicité ; poisson-zèbre

Résumé : Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire de Pharmacognosie (PEPITE EA 4267) de l'UFR Pharmacie, au sein de l'Université de Bourgogne Franche-Comté. Elle vise essentiellement la recherche de molécules d'origine végétale issues de la biodiversité tropicale dont principalement des saponines. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leur large éventail d'applications pharmacologiques. Dans ce contexte l'étude de trois espèces végétales appartenant à deux familles, à savoir *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker, *Ornithogalum dubium* Houtt. (Asparagaceae) et *Weigela* × « *kosteriana variegata* » (Caprifoliaceae), a conduit à l'isolement de 16 glycosides naturels par les techniques chromatographiques (chromatographie liquide sous vide, chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie liquide moyenne

pression). Les structures de ces derniers ont été élucidées principalement par les techniques spectroscopiques de RMN 1D et 2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit de 4 glycosides phénoliques de structure connue, 8 saponines stéroïdiques parmi lesquelles 6 sont de structure nouvelle, ainsi que 4 saponines triterpéniques dont une nouvelle. 5 saponines stéroïdiques ont été testées en vue d'évaluer leur activité cytotoxique sur deux lignées cellulaires cancéreuses (A549 et HL 60). Les résultats ont montré une faible sensibilité de ces deux lignées cellulaires à ces saponines. Les effets toxiques et tératogènes des 3 saponines triterpéniques ont été également déterminés à l'aide d'un test *in vivo* de poisson-zèbre (*zebrafish*). Les résultats ont montré un effet léthal à de faibles concentrations des 3 saponines. Des relations structure/activité ont été ainsi proposées.

Title : Purification and characterization of secondary metabolites extracted from plants of the Asparagaceae and Caprifoliaceae families, and evaluation of their biological activities.

Keywords : saponins ; triterpenes ; steroids ; NMR; cytotoxicity ; zebrafish-based assay

Abstract : This thesis was carried out in the Laboratory of Pharmacognosy (PEPITE EA 4267), in health department of Université Bourgogne Franche-Comté. The principal theme of this Laboratory is the research of natural compounds from tropical biodiversity, mainly saponins. These molecules were known for their various pharmacological activities. The study of 3 species belonging to 2 different families: *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker, *Ornithogalum dubium* Houtt. (Asparagaceae) and *Weigela* × « *kosteriana variegata* » (Caprifoliaceae), led to the isolation and characterization of 16 natural glycosides by column chromatography, medium pressure liquid chromatography, and vacuum

liquid was achieved using mainly 1D and 2D NMR, and mass spectrometry. Among them, 4 were phenolic glucosides, 8 were steroidal saponins with 6 new structures and 4 were triterpenic saponins with one new structure. The cytotoxic activities of 5 isolated steroidal saponins were evaluated on 2 strains of cancer cells (A549 and HL 60). The results showed a low sensitivity of these two cell lines to these saponins. The toxic and teratogenic effects of 3 triterpenic saponins were also determined by using an *in vivo* zebrafish assay. The results showed a lethal effect at low concentrations of these 3 saponins. Structure / activity relationships have been proposed.

Remerciements

Si l'on m'avait dit ce qui allait m'attendre durant ces trois années de ma vie que j'ai sciemment consacré à la recherche, avec toutes les difficultés que cela incomberait, peut-être ne me serais-je jamais engagée dans cette voie. Non pas parce qu'entreprendre un travail de doctorat est par essence difficile – et il convient de les surmonter – mais surtout parce que je suis consciente que dans un tel projet, il faut être à la hauteur de ses ambitions.

Toutefois, j'ai su montrer de la hardiesse et ai enfin réussi à achever cette thèse. Cela n'aura pas été possible sans le soutien indéfectible des personnes suivantes :

Mes premiers mots de remerciement vont à l'endroit de Madame le Professeur Anne-Claire Mitaine-Offer (Directrice de thèse), qui n'a pas seulement voulu diriger ma thèse, mais grâce à qui j'ai pu intégrer un Master puis entreprendre une thèse à l'Université de Bourgogne. Professeur, je vous serai infiniment reconnaissante de cette confiance que vous m'avez accordée. Vos conseils mais aussi votre bienveillance et votre sympathie m'ont été fort utiles. Je n'oublierai jamais votre soutien moral qui m'a souvent aidé à remonter la pente dans les moments difficiles.

Merci également à Madame le Professeur Marie-Aleth Lacaille-Dubois (Directrice du Laboratoire de Pharmacognosie et co-directrice de thèse), qui m'a non seulement accueilli au sein de son laboratoire mais également m'a prodigué de précieux conseils pour ma thèse et dont l'incalculable expertise a permis de rendre sa qualité à cette thèse.

Je remercie également Monsieur le Professeur Sébastien Bertout et Madame le Professeur Odile Chambin, qui m'ont honoré d'avoir accepté d'être membres du comité de suivi tout au long de ma thèse.

A Madame le Professeur Anne Tessier, Monsieur le Professeur Laurent Pouységou, Monsieur le Docteur Xavier Cachet, Monsieur le Docteur Denis Deffieux qui ont aimablement accepté d'être directeur, rapporteurs, examinateur et membres de jury de cette thèse. Recevez ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs du Laboratoire de Pharmacognosie : Monsieur le Docteur Tomofumi Miyamoto, Madame le Docteur Chiaki Tanaka (Fukuka, Japan) et Monsieur le Docteur Thomas Paululat (Siegen, Allemagne) pour l'acquisition des spectres RMN et MS des composés étudiés.

Merci également à Madame le Professeur Johanna Chluba, à Monsieur le Docteur Benoist Pruvot et à Monsieur le Docteur Frédéric Lirussi de l'UMR INSERM 1231 Lipides, Nutrition, Cancer pour les essais biologiques.

Je voudrais remercier tous mes collègues du laboratoire pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Je garderai surtout un bon souvenir des discussions que j'ai eues avec Stéphanie Masselot, dont les conversations n'étaient pas uniquement d'ordre professionnel, mais aussi personnel ce qui nous a permis de passer d'agréables moments ensemble, ainsi que le soutien moral dans certains moments. De même, une pensée amicale pour David Pertuit dont je garderai surtout les échanges enrichissants.

Je tenais également à mentionner ici le soutien indéfectible de mon mari Mamy Andriamasinoro, qui n'a eu de cesse à m'encourager à réussir dans le mode de vie que j'ai choisi toute seule. Son soutien m'a permis de rester debout et de continuer dans la voie que j'ai choisie. Je tiens sincèrement à le remercier particulièrement de tout cœur car il est toujours resté près de moi dans les moments où j'ai été à bout et malgré les tumultes de la vie et des « mésaventures administratives » que nous avons pu connaître ensemble mais que nous avons su surmonter ensemble, à un seuil de la vie où l'on ne voulait plus qu'une chose autant lui que moi : tout laisser tomber. Merci de m'avoir fait partager cette joie de vivre, pour ton écoute, ton aide, et ton amour.

Mes remerciements vont également à l'endroit de mes parents, qui m'ont toujours soutenu malgré les quelques dix mille kilomètres qui nous séparent et qui ont su me donner toutes les chances pour que je réussisse mes études en France. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Puissent-ils trouver dans ce travail de thèse l'aboutissement de leur investissement et de leurs efforts.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma sœur et mon frère. Malgré mon éloignement, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours.

Enfin, merci à toutes celles et ceux qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse, ma grande famille et tous mes amis.

Par-dessus tout, je loue DIEU tout puissant qui m'a donné la force, la santé, et la persévérance durant la réalisation de ce travail de thèse.

Acronymes et Abréviations

µg : microgramme

¹³C : Isotope du carbone avec un masse de 13 amu (atomic mass unit)

1D : Monodimensionnel

¹H : Proton

2D : Bidimensionnel

AcOH : Acide acétique

APG : Angiosperm Phylogeny Group

Ara : Arabinose

CC : Column Chromatography

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CE10 : concentration efficace à 10% : concentration à laquelle 10 % de l'effet max est observé

CE50 : concentration efficace à 50% : concentration à laquelle 50 % de l'effet max est observé

CI₅₀ : Concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé

CL10 : Concentration Létale 10%: concentration qui va entraîner la mort de 10% des organismes exposés

CL50 : Concentration Létale 50%: concentration qui va entraîner la mort de 50% des organismes exposés

cm : centimètre

COSY : COrelated SpectroscopY

d : doublet

dd : doublet doublet

DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarization Transfert

ESI : ElectroSpray Ionization

EtOH : Ethanol

FID : Flame Ionization Detector

g : gramme

GC : Gas Chromatography

Glc : Glucose

H₂O : Eau

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPTLC : High Performance Thin Layer Chromatography

HRESI : High Resolution- ElectroSpray Ionization

HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy

Hz : Herzt

J : Constante de couplage mesurée en Hz

m : multiplet

m/z : Rapport masse / charge élémentaire de l'ion

MeOH : Méthanol

mg : milligramme

mL : millilitre

mM : millimole

MPLC : Medium Pressure Liquid Chromatography

MS : Mass Spectrometry

MTT : bromure de 2H-tétrazolium,2-(4,5-diméthyl-2-thiazolyle)-3,5-diphényle

nm : nanomètre

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OH : hydroxyle

ppm : parts per million

Rha : Rhamnose

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP : Reversed Phase

s : singulet

Si : Silice

TLC : Thin Layer Chromatography

TOCSY : Total COrrrelation SpectroscopY

UV : Ultraviolet

VLC : Vacuum Liquid Chromatography

XTT : 2H-tétrazolium,2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophényle)-5[(phénylamino) carbonyle]-,inner salt

Xyl : Xylose

δ : Déplacement chimique mesuré en ppm

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Phylogénie des familles des Asparagales | 5 |
| Figure 2: <i>Chlorophytum blepharophyllum</i> Schweinf. ex Baker | 7 |
| Figure 3: <i>Chlorophytum blepharophyllum</i> Schweinf. ex Baker | 7 |
| Figure 4: <i>Ornithogalum dubium</i> Houtt..... | 9 |
| Figure 5: Phylogénie des familles des Dipsacales | 10 |
| Figure 6: <i>Weigela</i> × « <i>kosteriana variegata</i> »..... | 12 |
| Figure 7: Les fragments osidiques les plus communs trouvés dans les saponines | 14 |
| Figure 8: Squelettes et configuration des génines stéroïdiques : spirostane, furostane, néosapogénine 25 <i>S</i> -spirostane, isosapogénine 25 <i>R</i> -spirostane | 15 |
| Figure 9: Les différents squelettes triterpéniques: Oleanane (A), dammarane (B), ursane (C) et lupane (D)..... | 16 |
| Figure 10: Exemples de génines triterpéniques : Acide oléanolique, hédéragénine | 17 |
| Figure 11 : Les saponines isolées de <i>Chlorophytum borivilianum</i> | 19 |
| Figure 12: Les saponines isolées de <i>C. orchidastrum</i> et de <i>C. malayense</i> | 20 |
| Figure 13: Les saponines isolées de <i>C. comosum</i> | 21 |
| Figure 14: Saponine isolée de <i>C. arundinaceum</i> | 21 |
| Figure 15: Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 22 |
| Figure 16: Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 23 |
| Figure 17: Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 24 |
| Figure 18: Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 25 |
| Figure 19: Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 26 |
| Figure 20: Saponine isolée d' <i>O. saundersiae</i> | 27 |
| Figure 21: Les saponines isolées d' <i>O. thyrsoides</i> | 27 |
| Figure 22: Les saponines isolées du genre <i>Weigela</i> | 29 |
| Figure 23: Mécanisme de l'ionisation par <i>electrospray</i> | 39 |
| Figure 24: Les corrélations observées à l'aide de différentes expériences (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC, HSQC)..... | 43 |
| Figure 25: Schéma d'extraction des composés issus de <i>Chlorophytum blepharophyllum</i> | 46 |
| Figure 26: Etapes de purification à partir de 1 g d'extrait brut de Cbr..... | 47 |
| Figure 27: Etapes de purification à partir de 4,32 g d'extrait brut de Cbr..... | 48 |
| Figure 28: CCM de rassemblement par zone des composés isolés de <i>C. blepharophyllum</i> | 49 |

| | |
|--|----|
| Figure 29: HPTLC des composés isolés | 50 |
| Figure 30: Etapes de purification des fractions réparties par zone jusqu'à obtention des composés 1-4 | 51 |
| Figure 31: Spectre de masse du composé 1 | 52 |
| Figure 32: Spectre de RMN ¹³ C du composé 1 | 53 |
| Figure 33: Spectre HSQC du composé 1 | 54 |
| Figure 34: Spectre de COSY du composé 1 | 55 |
| Figure 35: Spectre HMBC du composé 1 | 55 |
| Figure 36: Structures des composés 1-4 | 59 |
| Figure 37: Schéma d'extraction des saponines de <i>Weigela</i> × « <i>kosteriana variegata</i> »..... | 60 |
| Figure 38: Schéma de purification des composés 5-8 | 61 |
| Figure 39: HTPLC des composés 5-8 | 62 |
| Figure 40: Spectre de masse du composé 5 | 63 |
| Figure 41: Spectre HSQC du composé 5 | 64 |
| Figure 42: Spectre HSQC du composé 5 montrant les méthyles angulaires..... | 65 |
| Figure 43: Spectre HSQC du composé 5 montrant les signaux des anomères..... | 66 |
| Figure 44: Spectre NOESY du composé 5 montrant le point de liaison des sucres avec la génine | 68 |
| Figure 45: Structure du composé 5 avec les différentes corrélations HMBC et NOESY observées | 68 |
| Figure 46: Structures des composés 5-8 | 71 |
| Figure 47: Etapes d'extraction des saponines des bulbes et racines d' <i>O. dubium</i> | 73 |
| Figure 48: Etapes de purification à partir de 1,69 g d'extrait brut d'OD..... | 74 |
| Figure 49: Etapes de purification à partir de 9,36 g d'extrait brut d'OD..... | 75 |
| Figure 50: Etapes de purification des fractions réparties par zone d'OD | 76 |
| Figure 51: HPTLC des composés 9-13 | 77 |
| Figure 52: Spectre de masse du composé 9 | 79 |
| Figure 53: Les corrélations HMBC et ROESY observées dans les spectres RMN du composé 9 | 80 |
| Figure 54: Spectre HSQC du composé 9 montrant les signaux des deux anomères..... | 80 |
| Figure 55: Spectre HMBC du composé 9 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 81 |
| Figure 56: Spectre ROESY du composé 9 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 81 |

| | |
|--|-----|
| Figure 57: Structure du composé 9 | 83 |
| Figure 58: Spectre de masse du composé 10 | 85 |
| Figure 59: Les corrélations HMBC et ROESY observées dans les spectres RMN du composé 10 | 85 |
| Figure 60 : Spectre HSQC du composé 10 montrant les signaux des anomères | 86 |
| Figure 61: Spectre HMBC du composé 10 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 86 |
| Figure 62: Spectre ROESY du composé 10 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 87 |
| Figure 63: Structure du composé 10 | 89 |
| Figure 64: Spectre de masse du composé 11 | 90 |
| Figure 65: Spectre HSQC du composé 11 montrant les signaux des deux anomères..... | 91 |
| Figure 66: Spectre HMBC du composé 11 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 91 |
| Figure 67: Spectre HMBC du composé 11 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 92 |
| Figure 68: Spectre ROESY du composé 11 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 92 |
| Figure 69: Structure du composé 11 | 94 |
| Figure 70: Etapes d'extraction des saponines des tiges et feuilles d' <i>O. dubium</i> | 95 |
| Figure 71: Etapes de purification à partir de 8,41 g d'extrait brut de tiges et feuilles d'OD.... | 96 |
| Figure 72: Etapes de purification à partir de 14 g d'extrait brut de tiges et feuilles d'OD..... | 97 |
| Figure 73: Etapes de purification des fractions réparties par zone jusqu'à obtention des composés 14 et 15 | 98 |
| Figure 74: HPTLC des composés 14-15 | 99 |
| Figure 75: Spectre de masse du composé 14 | 100 |
| Figure 76: Spectre HSQC du composé 14 montrant les signaux des anomères des sucres ... | 101 |
| Figure 77: Spectre NOESY du composé 14 montrant le point qui relie les sucres et la génine | 101 |
| Figure 78: Structure du composé 14 | 102 |
| Figure 79: Les corrélations HMBC et NOESY observées dans les spectres RMN du composé 15 | 105 |
| Figure 80: Spectre HSQC du composé 15 | 106 |
| Figure 81: Structure du composé 15 | 108 |

| | |
|---|-----|
| Figure 82: Schéma d'extraction des saponines des fleurs d' <i>O. dubium</i> | 109 |
| Figure 83: Etapes de purification du composé 16 | 110 |
| Figure 84: HPTLC du composé 16 | 111 |
| Figure 85: Spectre de masse du composé 16 | 113 |
| Figure 86: Spectre HSQC du composé 16 | 114 |
| Figure 87: Spectre HMBC du composé 16 montrant les points de liaison des sucres avec la génine | 114 |
| Figure 88 : Spectre NOESY du composé 16 | 115 |
| Figure 89: Structure du composé 16 | 115 |
| Figure 90: Structure des composés 9-16 | 118 |
| Figure 91: Structure des composés 9, 10, 14, 15 et 16 | 122 |
| Figure 92: Réaction de réduction enzymatique du XTT | 123 |
| Figure 93: Structure de l'OSW-1 | 126 |
| Figure 94: Structure des composés 5-7 | 127 |
| Figure 95: Le poisson zèbre <i>Danio rerio</i> | 128 |
| Figure 96: Survie et tératogénicité des larves après exposition aux composés 5-7 et à la loroglossine | 131 |
| Figure 97: Structure de la loroglossine | 132 |
| Figure 98: Proportion des différents défauts morphologiques observés (% de larves morphologiquement altérées)..... | 134 |
| Figure 99: Défauts morphologiques observés | 134 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 1 | 56 |
| Tableau 2: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 5 | 69 |
| Tableau 3: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 9 | 82 |
| Tableau 4: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 10 | 88 |
| Tableau 5 : Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 11 | 93 |
| Tableau 6: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 14 | 103 |
| Tableau 7: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans le CD_3OD) du composé 15 | 107 |
| Tableau 8: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine d_5) du composé 16 | 116 |
| Tableau 9 : Valeurs calculées de CL50, CE50, CL10 et CE10 pour les composés testés. ... | 131 |
| Tableau 10: Concentrations toxicologiques des composés testés. | 133 |
| Tableau 11: Défauts morphologiques | 133 |

SOMMAIRE

Introduction générale

Partie I : Synthèse bibliographique

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Etude botanique | 4 |
| 1.1 | L'ordre des Asparagales | 4 |
| 1.1.1 | La famille des Asparagaceae | 6 |
| 1.1.2 | Le genre <i>Chlorophytum</i> Ker Gawl. (Asparagaceae) | 6 |
| 1.1.3 | L'espèce <i>Chlorophytum blepharophyllum</i> Schweinf. ex Baker..... | 7 |
| 1.1.4 | Le genre <i>Ornithogalum</i> L. (Asparagaceae)..... | 8 |
| 1.1.5 | L'espèce <i>Ornithogalum dubium</i> Houtt..... | 8 |
| 1.2 | L'ordre des Dipsacales | 9 |
| 1.2.1 | La famille des Caprifoliaceae | 10 |
| 1.2.2 | Le genre <i>Weigela</i> Thunb. (Caprifoliaceae) | 11 |
| 1.2.3 | L'espèce <i>Weigela</i> × « <i>kosteriana variegata</i> » | 12 |
| 2 | Travaux phytochimiques antérieurs | 13 |
| 2.1 | Généralités sur les saponines | 13 |
| 2.1.1 | Structure des saponines | 13 |
| 2.1.2 | Propriétés..... | 17 |
| 2.1.3 | Domaines d'utilisation | 18 |
| 2.2 | Les saponines isolées du genre <i>Chlorophytum</i> | 19 |
| 2.3 | Les saponines isolées du genre <i>Ornithogalum</i> | 21 |
| 2.4 | Les saponines isolées du genre <i>Weigela</i> | 28 |

Partie II: Etude chimique

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Matériels et méthodes appliqués à la phytochimie | 31 |
| 1.1 | Matériel végétal et extraction | 31 |
| 1.2 | Séparation et isolement..... | 32 |
| 1.2.1 | Chromatographie sur Couche Mince (CCM)..... | 32 |
| 1.2.2 | Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)..... | 33 |
| 1.2.3 | Chromatographie d'exclusion Sephadex LH-20 | 34 |
| 1.2.4 | Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) | 35 |
| 1.2.5 | Chromatographie liquide haute performance (HPLC)..... | 36 |
| 1.3 | Détermination structurale | 37 |
| 1.3.1 | Méthode physico-chimique | 37 |
| 1.3.2 | Méthodes spectrales | 38 |
| 2 | Investigations phytochimiques : | 45 |
| 2.1 | Etude phytochimique de <i>Chlorophytum blepharophyllum</i> | 45 |
| 2.1.1 | Extraction et isolement des composés 1-4 | 46 |
| 2.1.2 | Détermination structurale des composés 1-4 | 52 |
| 2.1.3 | Conclusion :..... | 58 |
| 2.2 | Etude phytochimique de <i>Weigela</i> × « <i>kosteriana variegata</i> » | 60 |
| 2.2.1 | Extraction et isolement des composés 5-8 | 60 |
| 2.2.2 | Détermination structurale du composé 5 | 63 |
| 2.2.3 | Conclusion..... | 69 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.3 | Etude phytochimique d' <i>Ornithogalum dubium</i> | 72 |
| 2.3.1 | Bulbes et racines..... | 72 |
| 2.3.2 | Tiges et feuilles | 95 |
| 2.3.3 | Fleurs | 108 |
| 2.3.4 | Conclusion..... | 117 |

Partie III: Etude biologique

| | | |
|-------|--|-----|
| 1 | Travaux biologiques sur les saponines isolées de l' <i>Ornithogalum dubium</i> Houtt..... | 121 |
| 1.1 | Etude de la viabilité cellulaire – test au XTT | 123 |
| 1.2 | Protocole expérimental | 124 |
| 1.2.1 | Réactifs :..... | 124 |
| 1.2.2 | Culture cellulaire. | 124 |
| 1.3 | Résultats et interprétation des tests de cytotoxicité | 125 |
| 2 | Travaux biologiques sur les saponines isolées de <i>Weigela</i> × « <i>kosteriana variegata</i> » .. | 126 |
| 2.1 | Protocole expérimental | 127 |
| 2.1.1 | Modèle expérimental..... | 127 |
| 2.1.2 | Maintenance du poisson-zèbre: | 128 |
| 2.1.3 | Déclaration d'éthique:..... | 129 |
| 2.1.4 | Traitements avec les composés: | 129 |
| 2.1.5 | Les analyses statistiques:..... | 130 |
| 2.2 | Résultats et interprétation | 130 |

Conclusion générale et perspectives

Introduction générale

Les plantes sont utilisées depuis toujours dans un but alimentaire ou pour se soigner, en raison de leur richesse en métabolites primaires et secondaires contenus dans celles-ci. Les métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement et participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV, ...). L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification de nouveaux principes actifs. Les saponines constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leur large éventail d'applications pharmacologiques.

Dans ce contexte, le Laboratoire de Pharmacognosie dirigé par le Pr. Marie-Aleth Lacaille-Dubois (PEPITE EA4267, Université de Bourgogne Franche-Comté) apporte sa contribution dans la recherche de saponines bioactives à partir de diverses familles végétales. Notre stratégie de recherche consiste en la sélection des familles de plantes connues pour leur richesse en saponines en se basant essentiellement sur des critères chimiotaxonomiques. Puis, après l'extraction, l'isolement et la caractérisation structurale, les molécules naturelles sont soumises à une évaluation biologique *in vitro* principalement dans le domaine de la cancérologie.

C'est dans ce cadre que, par une approche chimiotaxonomique, trois plantes ont retenu notre attention : deux espèces de la famille des Asparagaceae, *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker et *Ornithogalum dubium* Houtt., ainsi qu'une espèce riche en saponines de type triterpénique de la famille des Caprifoliaceae, *Weigela* × « *kosteriana variegata* », n'ayant pas encore été étudiées ni sur le plan chimique, ni sur le plan toxicologique. Selon des études antérieures, les genres botaniques auxquels elles appartiennent, connus pour leur richesse en saponines bioactives, présentent un intérêt potentiel dans le domaine pharmaceutique (Kaushik, 2005 ; Lacaille-Dubois, 2005 ; Mimaki et coll., 1996).

Le présent rapport portera donc sur l'extraction, la purification, l'analyse structurale et l'évaluation de l'activité biologique des métabolites issus des racines de *Chlorophytum blepharophyllum*, des bulbes, racines, tiges, feuilles et fleurs d'*Ornithogalum dubium* et des racines de *Weigela* × « *kosteriana variegata* ». Il sera constitué de trois grandes parties. La première partie concerne la synthèse bibliographique relative aux familles et aux genres des

espèces de plantes étudiées, à savoir l'étude botanique et les travaux phytochimiques antérieurs. L'étude chimique, incluant à la fois les matériels et méthodes utilisés ainsi que les résultats de l'étude phytochimique des espèces de plantes étudiées, constitue la seconde partie. Et enfin, la troisième partie portera sur l'étude biologique des composés sélectionnés, réalisée en collaboration avec le laboratoire de l'UMR INSERM 1231 Lipides, Nutrition, Cancer.

Partie I : Synthèse bibliographique

1 Etude botanique

Trois espèces de plantes issues de deux familles, notamment les Asparagaceae et les Caprifoliaceae, feront l'objet du présent travail. Nous détaillerons dans un premier temps l'aspect botanique des différentes espèces étudiées : *Chlorophytum blepharophyllum*, puis *Ornithogalum dubium* appartenant à la famille des Asparagaceae, et enfin *Weigela* × « *kosteriana variegata* » appartenant à la famille des Caprifoliaceae.

1.1 L'ordre des Asparagales

Les Asparagales appartiennent à l'ordre le plus important des plantes monocotylédones introduit par la classification phylogénétique des Angiospermes (Chen et coll., 2013). L'ancien ordre des Liliales, qui a donné lieu à de nombreux travaux et débats, ressemble à la classification des Asparagales et au groupe morphologique de celui-ci. Parmi ceux qui se sont penchés sur le sujet, on retrouve Huber en 1977, que Dahlgren a repris en 1985. Avant leur étude, de nombreuses familles ont été affectées à l'ancien ordre des Liliales qui contenait presque tous les monocotylédones avec tépales colorés et dont leur endosperme ne contenait pas d'amidon.

Des analyses cladistiques sur la morphologie ainsi que sur des séquences *rbcL*, *atpB*, *matK* et *ndhF*, confirment le monophylétisme des Asparagales (Judd et coll., 2002 ; Chen et coll., 2013 ; Chase et coll., 2003). Il est difficile de définir l'ordre des Asparagales morphologiquement, étant donné que ses membres sont structurellement diversifiés. Ainsi, bien que la plupart des espèces de l'ordre sont herbacées, certaines sont grimpantes (certaines espèces d'*Asparagus*), d'autres sont des arbres comme les Agave, Cordyline, Yucca, Dracaena, dont certains peuvent dépasser 10 m de hauteur.

Toutefois, la présence de phytomélanine, qui est un pigment noir-charbon du tégument de la graine dans la plupart des familles de l'ordre des Asparagales, apparaît comme l'une des caractéristiques déterminantes de l'ordre (Judd et coll., 2002). En classification phylogénétique APG III, l'ordre des Asparagales comprend 14 familles principales dont celles des Asparagaceae (Fig. 1) au lieu de 26 chez les Liliales (APG III, 2009).



Figure 1: Phylogénie des familles des Asparagales

www.mobot.org

1.1.1 La famille des Asparagaceae

Selon la classification phylogénétique APG III, cette famille comprend plus de 115 genres dispersés dans les régions tempérées et tropicales. On retiendra notamment parmi ceux-ci, les plus importants : *Asparagus* (130-140 espèces) auquel la famille doit son nom, *Dracaena* (60 espèces), et *Polygonatum* (50 espèces) (APG III, 2009).

Ce sont des herbes vivaces, des lianes ou des plantes à port arborescent, avec une partie aérienne annuelle, parfois épineuse ou ligneuse, émergeant d'un rhizome sympodial. La tige se développe parfois en « *cladodes* », qui portent des fleurs ; les feuilles proprement dites sont alors réduites à des écailles (*Ruscus*). Les feuilles, sont insérées à la base, ou sur l'axe de façon alterne, opposée (*Maianthemum*), ou verticillée (*Polygonatum verticillatum* L.). Les fleurs sont en grappes, ou parfois solitaires (*Ruscus*), elles sont régulières, hypogynes, bisexuées, parfois unisexuées (espèce dioïque comme dans le genre *Ruscus*), Le périanthe est composé de trois pétales et trois sépales, indissociables. Les fleurs sont trimères, les six tépales sont soit pétaloïdes ou sépaloïdes, et l'androcée contient 6 étamines disposées sur deux verticilles (diplostémones). Le gynécée est formé de trois carpelles soudés. Les ovaires, triloculaires, sont supères. Chaque fleur n'a qu'un style mais avec deux à douze ovules par loge, qui ont une placentation axile. Le fruit est habituellement une baie rouge à maturité (sur un fond vert persistant) ou parfois bleu-noir, dont les graines sont plus ou moins globuleuses, non ailées, de couleur noire par la présence de phytomélanine. (Botineau, 2010)

1.1.2 Le genre *Chlorophytum* Ker Gawl. (Asparagaceae)

Le genre *Chlorophytum* comprend 215 espèces, principalement des plantes herbacées vivaces à rhizomes poussant dans les régions pantropicales (Li et coll., 1990). Elles sont surtout cultivées comme plantes ornementales comme par exemple *C. comosum* et *C. orchidastrum*. Il existe également des espèces utilisées pour leur intérêt alimentaire et médicinal comme *C. borivilianum* en Inde, appelée Safed Musli. Traditionnellement, ce sont les racines, riches en saponines, qui sont connues pour leurs diverses propriétés pharmacologiques comme antifongique, insecticide, cytotoxique, immunomodulatrice, ... (Kaushik, 2005 ; Lacaille-Dubois, 2005 ; Mimaki et coll., 1996).

1.1.3 L'espèce *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker

C. blepharophyllum est une espèce originaire de l'Afrique occidentale, centrale, orientale et de l'Afrique de Sud. D'environ 50 cm de haut, cette plante se cultive soit individuellement soit en touffes. Elle se distingue des autres espèces par des racines spongieuses avec des gonflements, des feuilles linéaires-lancéolées jusqu'à 60 cm de longueur, des inflorescences dressées non ramifiées, des petites fleurs de couleur brun jaunâtre à brun-vert et des capsules obovoïdes pour les graines (Fig. 2 et 3) (Du Plessis et coll., 1989).



Figure 2: *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker

<http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Chlorophytum>

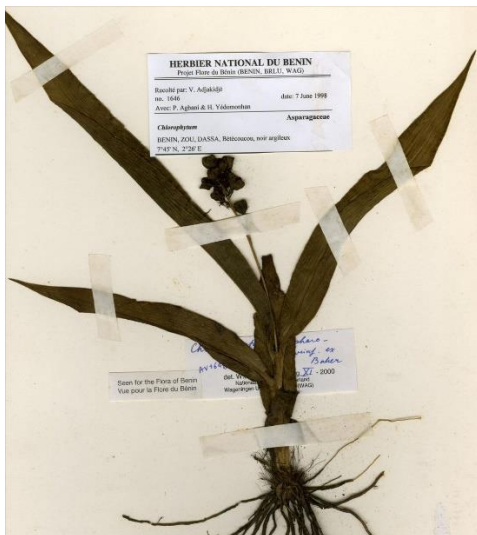


Figure 3: *Chlorophytum blepharophyllum* Schweinf. ex Baker

<http://publish.plantnet-project.org/project/herbierbenin/collection/Collection/Echantillons/module/Specimens/page11>

1.1.4 Le genre *Ornithogalum* L. (Asparagaceae)

Ornithogalum est un genre de plantes monocotylédones, les ornithogales, que Linné a été, en 1753, le premier à décrire. Il appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique, à la famille des Asparagaceae selon la classification phylogénétique APG III (APG III, 2009).

Le genre comprend environ 200 espèces dont 34 en Europe et 54 en Afrique du Sud (www.aquaportail.com). Ce sont des plantes géophytes vivaces par leur bulbe, à feuilles basales, dont l'inflorescence se présente sous forme de racème ou de corymbe. Les fleurs sont étoilées, blanches ou verdâtres, à six tépales identiques (trois pétales et trois sépales pétaloïdes) et à six étamines. Une espèce d'ornithogale remarquable est l'*O. arabicum* dont le nom vernaculaire d'Etoile de Bethléem est dû à ses branches au nombre de 6 dont la forme rappelle l'étoile apparue à la naissance du Messie dans le récit biblique. Elle peut être confondue à l'ornithogale en ombelle *O. umbellatum*. Le fruit est une capsule à six angles. Certaines espèces contiennent des alcaloïdes, dont la colchicine. Le genre contient des espèces toxiques et d'autres comestibles comme par exemple les ornithogales des Pyrénées, ou aspergettes, *O. pyrenaicum*. Les ornithogales ont des organes polliniques comme les tubes polliniques qui agissent comme des conduits pour transporter les cellules gamètes mâles du grain de pollen vers un sac pollinique (www.aquaportail.com).

1.1.5 L'espèce *Ornithogalum dubium* Houtt.

O. dubium a été décrite et nommée pour la 1^{ère} fois en 1780 par Maarten Houttuyn, un médecin botaniste. On l'utilise surtout comme plante ornementale dans les régions du Cap, en Afrique du Sud, d'où provient la plante.

O. dubium est une vivace bulbeuse qui peut atteindre les 60 cm de hauteur. Les bulbes sont ovoïdes. Les feuilles de 3 à 8 se développent en une rosette sphérique. Le limbe est rubané, linéaire à oblong-lancéolé avec des nervures parallèles. Les inflorescences sont des hampes florales plus longues que les feuilles. Les fleurs de 5 à 25 sont groupées dans des épis. La fleur hermaphrodite, actinomorphe est composée d'un périanthe de six tépales divisés en deux verticilles, les tépales peuvent être oranges, rouges, jaunes ou blancs, le centre de la fleur souvent avec un centre vert ou brun. L'androcée est composé de 6 étamines avec des filaments libres. Le fruit est constitué d'une capsule déhiscente anguleuse à trois valves contenant des

graines noir brillant. Les bulbes forment des bulbilles que l'on peut diviser (www.mi-aime-a-ou.com) (Fig. 4).



Figure 4: *Ornithogalum dubium* Houtt

<https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/1847/ornithogalum-d-ete>

1.2 L'ordre des Dipsacales

L'ordre des Dipsacales est un ordre de plantes à fleurs dicotylédones, qui comporte 46 genres et environ 1090 espèces largement distribuées, principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. Ce sont des plantes ligneuses ou des herbes à feuilles opposées, dont les fleurs assez petites sont regroupées en inflorescences compactes (capitules, ombelles, corymbes...). Ces fleurs sont gamopétales, épigynes, et avec un androcée pouvant être réduit. (Botineau, 2010 ; Judd et coll., 2002). L'ordre est surtout connu pour ses plantes ornementales, comme *Lonicera*, *Viburnum* et *Scabiosa*.

Selon la classification phylogénétique APG III, cet ordre ne comprend plus que deux familles ; Adoxaceae et Caprifoliaceae [incluant Diervillaceae Pyck, Dipsacaceae Juss., Linnaeaceae Backlund, Morinaceae Raf., Valerianaceae Batsch] (APG III, 2009) (Fig. 5).

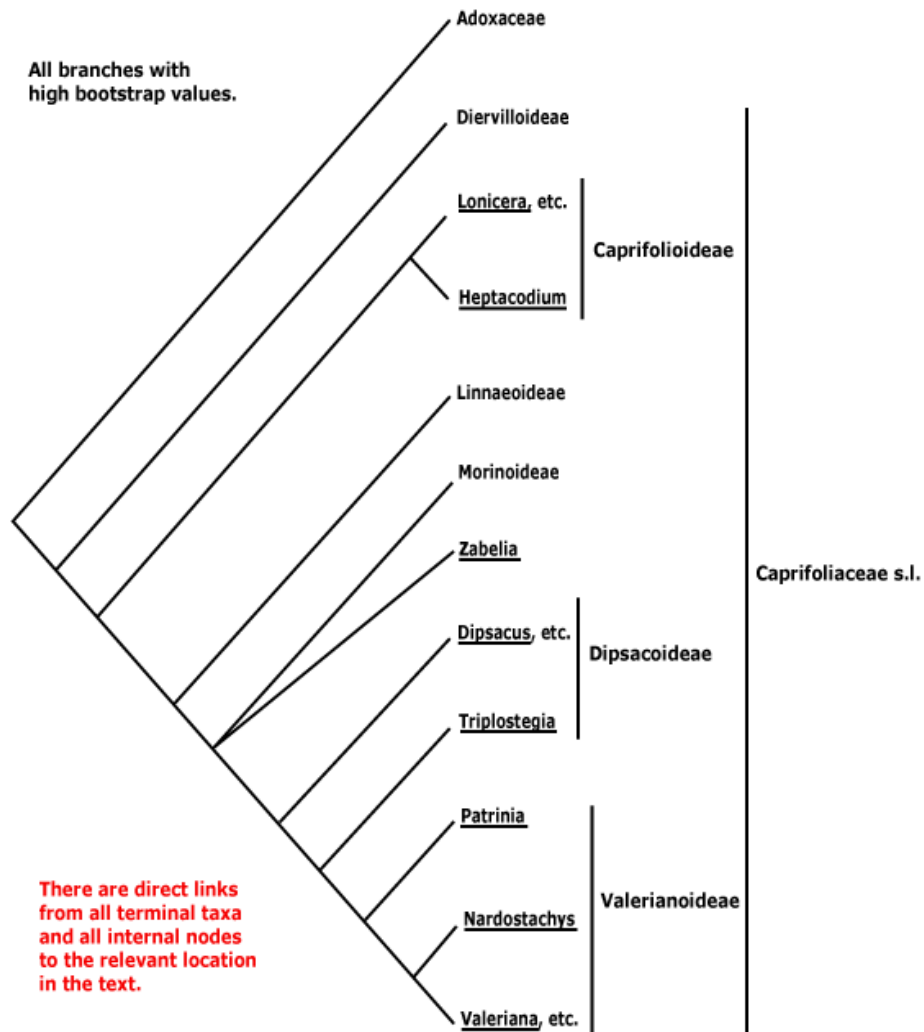


Figure 5: Phylogénie des familles de l'ordre des Dipsacales

www.mobot.org

1.2.1 La famille des Caprifoliaceae

Cette famille rassemble 36 genres et environ 800 espèces dispersées de manière assez large dans le monde, mais surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. La flore française comprend 16 genres et environs 70 espèces : *Valeriana* (les Valérianes), et *Valerianella* (les Valérianelles), avec 12 espèces chacun, *Knautia* (les Knauties) également avec 12 espèces, *Lonicera* (les Chèvrefeuilles) avec 9 espèces spontanées, *Scabiosa* (les Scabieuses) avec 7 espèces, *Dipsacus* (les Cardères) avec 5 espèces, *Centranthus* (les Centranthes) avec 5 espèces, *Cephalaria* avec 4 espèces, ainsi que les genres *Succisa*, *Succisella*, *Pycnocomon*, *Sixalix*, *Lomelosia*, *Linnaea*. (Botineau, 2010 ; Judd et coll., 2002).

Ce sont des herbes, vivaces (*Valeriana*) ou annuelles (*Valerianella*), mais aussi des lianes ou des arbustes. Les feuilles, sans stipules, sont opposées (parfois connées, chez *Dipsacus sp* ou *Lonicera caprifolium*), quelquefois de forme verticillée ou encore en rosette, le plus souvent simple (*Lonicera*). Les fleurs, rassemblées en cymes (*Lonicera*) ou en capitules (*Dipsacus*, *Succisa*), sont généralement zygomorphes, hermaphrodites. Le périanthe montre en général 5 sépales soudés, et 5 pétales soudés en une corolle plus ou moins allongée. L'androcée possède 5 (*Lonicera*) ou 4 étamines (*Succisa*, *Dipsacus*), mais parfois 3 (*Valeriana*) ou même une seule (*Centranthus*); cet androcée est didyname chez *Linnaea*. La pollinisation est entomophile et les grains de pollen sont gros et épineux. Des poils glanduleux, en tapis dense à la base du tube de la corolle, secrètent du nectar. Le gynécée est formé de 2 à 5 carpelles, soudés en un ovaire infère avec autant de loges. Le fruit est variable, peut être une capsule (*Diervilla*), une baie (*Lonicera*, *Symphoricarpos*), une drupe ou un akène (*Valeriana*, *Dipsacus*). L'akène est surmonté par un pappus provenant du calice, favorisant sa dissémination. Les graines sont albuminées (*Dipsacus*, *Succisa*) ou non (*Valeriana*) (Botineau, 2010 ; Judd et coll., 2002).

1.2.2 Le genre *Weigela* Thunb. (Caprifoliaceae)

Weigela ou *Weigelia* est un genre de plantes dicotylédones originaire d'Asie orientale, dont le nom fut donné par Christian Ehrenfried Weigel, chimiste et naturaliste allemand. Ce genre regroupe des espèces d'arbustes à rameaux opposés et à feuilles caduques qui peuvent atteindre 5 mètres de hauteur (Sheffield Botanical Gardens, 2012).

Le genre *Weigela* comprend seulement 12 espèces, mais il existe un très grand nombre d'hybrides et de cultivars horticoles (www.truffaut.com).

Chaque fleur de couleur rose, rouge, et plus rarement jaune, offre un calice profondément divisé en 5 découpures droites, égales et subulées. Cette plante est caractérisée par: une corolle monopétale en forme d'entonnoir dont le tube est de la longueur du calice, velu intérieurement ; un limbe campanulé divisé à ses bords en 5 lobes ovales, obtus, à demi ouverts ; 5 étamines ; un ovaire libre, supérieur, tétragone, glabre, tronqué, le style sortant de la base de l'ovaire filiforme un peu plus long que la corolle, terminé par un stigmate plane, en rondache ; et une capsule sèche contenant de nombreuses petites graines ailées. (De Lamarck, 1808).

1.2.3 L'espèce *Weigela* × « *kosteriana variegata* »

Weigela × « *kosteriana variegata* » est l'une des variétés hybrides du genre *Weigela*, appartenant à la sous-famille des Diervilloideae selon la classification APGIII (APG III, 2009). Cet arbuste, à la végétation compacte, atteint 1,50 m de hauteur pour une largeur de 1,50 m. Il est remarquable par son feuillage caduc, vert foncé, panaché de blanc ivoire, ses feuilles ovales et pointues, de 5 à 8 cm, et ses fleurs rose tendre. Il pousse dans un sol normal, plutôt frais, isolé en rocaille, ou en groupe avec d'autres espèces (www.truffaut.com) (Fig. 6).



Figure 6: *Weigela* × « *kosteriana variegata* »

<https://www.truffaut.com/produit/weigela-x-kosteriana-variegata-touffe-ctr-7-5-litres/13088/10583>

2 Travaux phytochimiques antérieurs

2.1 Généralités sur les saponines

Les saponines ou saponosides sont des métabolites secondaires hétérosidiques non-volatils, largement répandus dans le règne végétal. Elles sont composées d'une partie lipophile, la génine (ou aglycone) et d'une partie hydrophile osidique. Leur nom est tiré du latin *sapo* dont la signification est savon. Ayant des propriétés tensioactives, elles se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. Leur utilisation traditionnelle, comme savon et lessive, comme par exemple la saponaire (*Saponaria officinalis* L.), est d'ailleurs basée sur cette propriété tensioactive (Bruneton, 2016 ; Hostettmann et Marston, 1995 ; Augustin et coll., 2011).

2.1.1 Structure des saponines

Structurellement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit stéroïdique, soit triterpénique. Hostettman et Marston, en 1995, distinguent une troisième catégorie de saponines, celle des hétérosides d'amines stéroïdiques considérées comme des alcaloïdes.

Les saponines sont également classées sur la base du nombre de chaînes osidiques. Pour cette raison, nous pouvons distinguer :

- Les saponines monodesmosidiques : avec une seule chaîne oligosaccharidique généralement liée à la position C-3 de la génine.
- Les saponines bidesmosidiques : qui possèdent deux chaînes oligosaccharidiques liées principalement aux positions C-3 et C-28 de la génine pour les triterpènes, et aux C-3 et C-26 pour les stéroïdes.
- Les saponines tridesmosidiques : elles sont très inhabituelles et possèdent trois chaînes oligosaccharidiques liées à la génine.

Les fragments osidiques sont généralement des hexoses, pentoses, desoxy-hexoses, acides uroniques. Les plus communément trouvés dans les saponines sont présentés ci-dessous dans la figure 7.

Les différents hydroxyles, que ce soit au niveau de la génine ou de la partie osidique, peuvent être estérifiés par des acides organiques. (Augustin et coll., 2011)

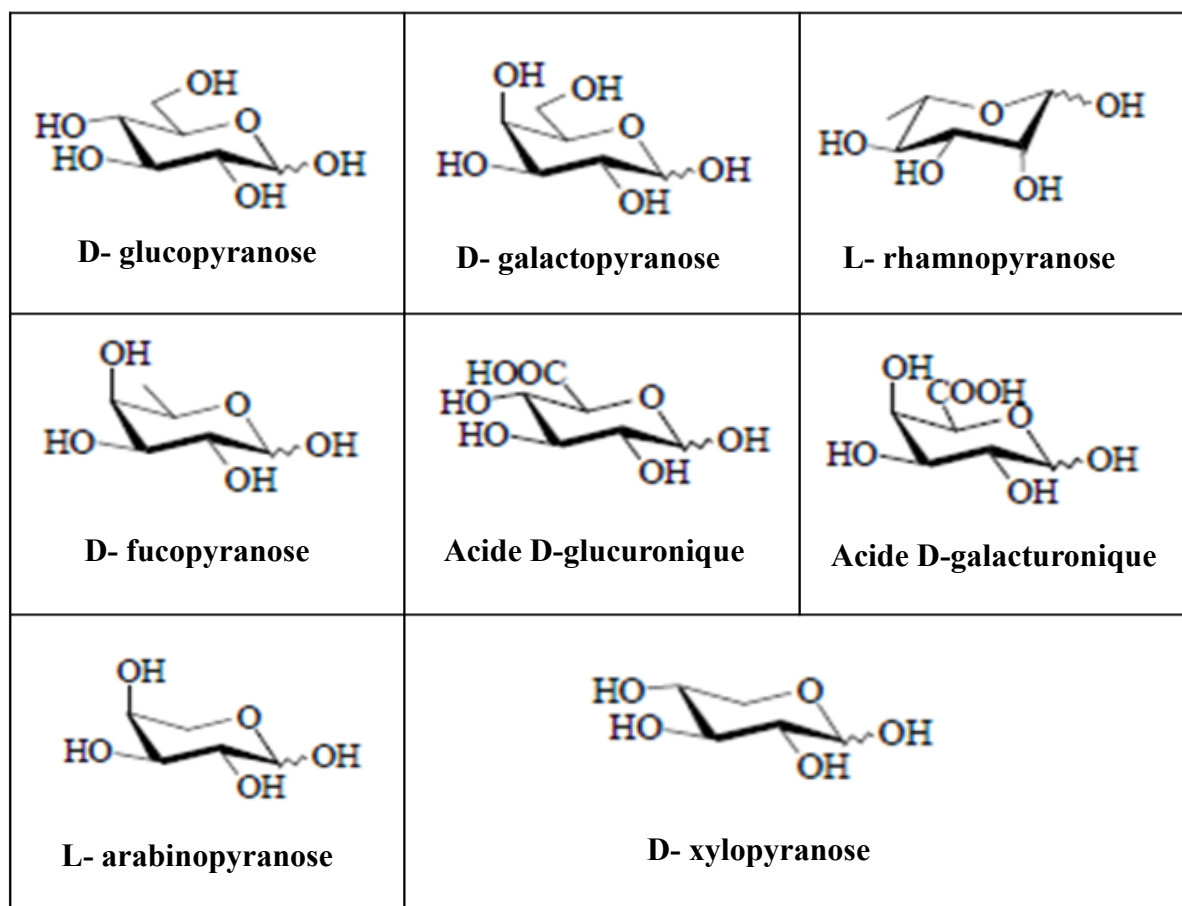


Figure 7: Les fragments osidiques les plus communs trouvés dans les saponines

2.1.1.1 Génines stéroïdiques

Les génines stéroïdiques sont constituées d'un squelette à 27 atomes de carbone qui comportent habituellement six cycles : les deux cycles E (furanique) et F (pyranique) qui résultent d'une cétylation intramoléculaire intervenant après l'oxydation en C-16, C-22 et C-26 d'un précurseur cholestanique. En se référant à la nature spiro du carbone C-22, on dénomme le

squelette hexacyclique par le terme de spirostane (Fig. 8). Dans certaines plantes, il est fréquent que l'hydroxyle en C-26 soit engagé dans une liaison avec le glucose par exemple, la structure pentacyclique est appelée furostane (Fig. 8).

Si le squelette hexacyclique possède de nombreux carbones asymétriques, seule la configuration du carbone C-25 peut varier, ce qui détermine l'existence de deux séries : néosapogénines (25*S*, le méthyle est axial) ou isosapogénines (25*R*, le méthyle est équatorial) (Fig. 8). La fusion des cycles B/C et C/D est toujours *trans*, celle des cycles D et E *cis* et la configuration des carbones C-20 et C-22, respectivement *S* et *R*, est également constante chez les aglycones naturels (Bruneton, 2016).

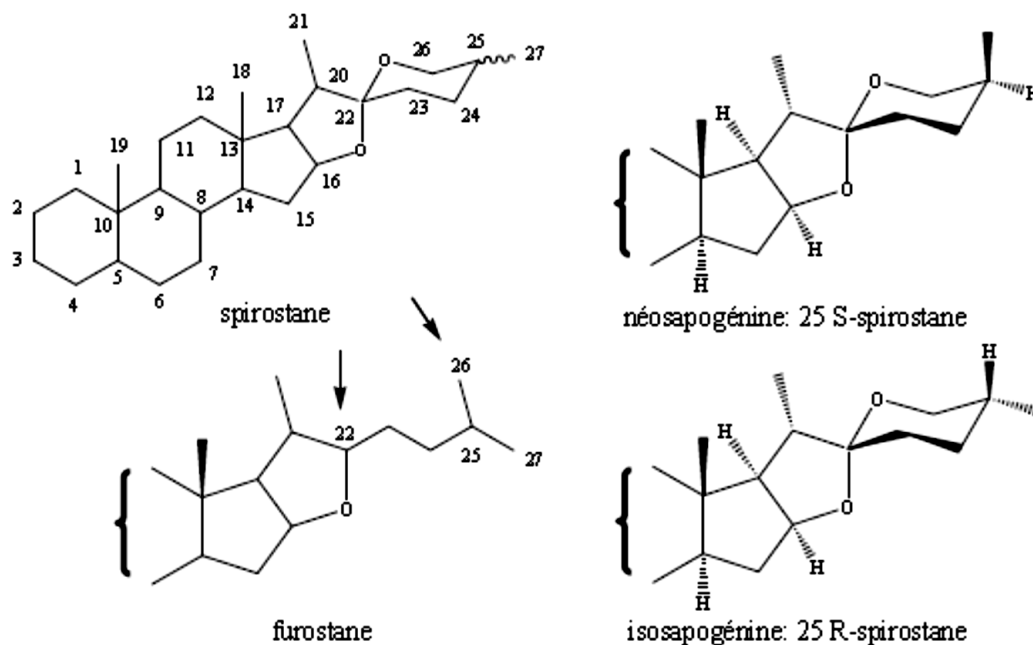


Figure 8: Squelettes et configuration des génines stéroïdiques : spirostane, furostane, néosapogénine 25*S*-spirostane, isosapogénine 25*R*-spirostane

(Bruneton., 2016)

2.1.1.2 Génines triterpéniques

Les génines triterpéniques sont issues de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène. Cette cyclisation conduit dans un premier temps aux dammaranes (Fig. 9), molécules tétracycliques qui existent à l'état d'hétérosides dans des plantes comme le Ginseng. Le dammarane évolue vers des squelettes pentacycliques : oléanane, ursane et lupane (Fig. 9), et qui peuvent eux-mêmes subir quelques réarrangements. De ce fait, la majorité des sapogénines

triterpéniques sont des molécules pentacycliques de squelette oléanane (dérivés de la β -amyrine), ursane (dérivés de la α -amyrine) et lupane.

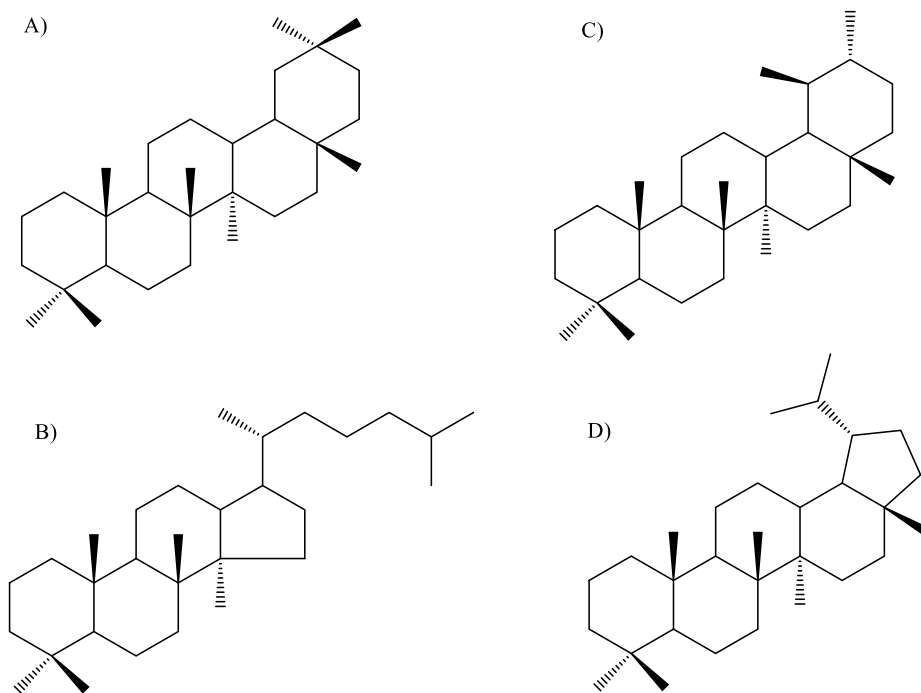


Figure 9: Les différents squelettes triterpéniques: Oleanane (A), dammarane (B), ursane (C) et lupane (D)

(Bruneton., 2016)

Plus de la moitié des sapogénines connues sont de type oléanane, dont principalement l'acide oléanolique et l'hédéragénine (Fig. 10). Les éléments structuraux peuvent être caractérisés par:

- une insaturation en C-12(13)
- une oxydation fréquente des carbones des méthyles en C-23, C-28, C-30 (hydroxyméthyle, aldéhyde ou carboxyle)
- une oxydation de carbones cycliques en C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21, C-22 (Bruneton, 2016).

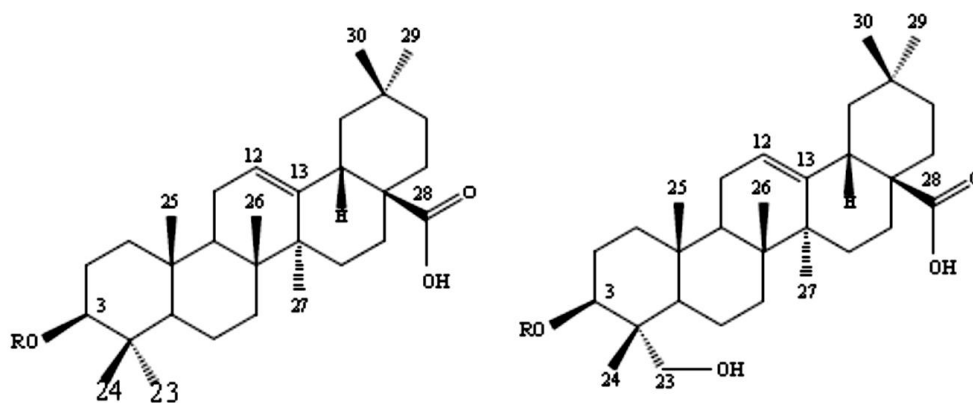


Figure 10: Exemples de génines triterpéniques : Acide oléanolique, hédéragénine

(Bruneton., 2016)

2.1.2 Propriétés

Le rôle biologique des saponines n'est pas complètement caractérisé. Dans les plantes, elles interviennent dans les systèmes de défense (Francis et coll., 2002 ; Sparg et coll., 2004). Les recherches de Hostettman et Marston en 1995 ainsi que d'Osborn en 1996 ont pu démontrer que les saponines sont également présentes dans des plantes sous une forme biologiquement active et participent à la phyto-protection anti-microbienne.

Ces métabolites secondaires sont également présents dans de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle comme par exemple la racine de Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer, Araliaceae) qui est l'un des plus importants médicaments orientaux traditionnels, utilisé dans le monde entier (Fukuda et coll., 2000). Il en est de même pour le genre *Bupleurum* des Pharmacopées chinoise et japonaise, utilisé en médecine traditionnelle asiatique pour le traitement de différentes affections. Les racines sèches de *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae), riches en saikosaponines, sont traditionnellement utilisées pour traiter les troubles associés à l'inflammation (Just et coll., 1998). Comme autre exemple, nous pouvons citer les plantes du genre *Allium* comme *A. chinense* G. Don et *A. macrostemon* Bunge (Amaryllidaceae) riches en saponines, utilisées comme traitement traditionnel chinois de diverses pathologies cardiaques (Baba et coll., 2000).

2.1.3 Domaines d'utilisation

2.1.3.1 En alimentaire

Les plantes contenant des saponines peuvent être utilisées comme aliments fonctionnels en raison de leurs avantages pour la santé de par leurs activités biologiques hypocholestémiantes, anti-oxydantes, immunostimulantes, etc ... (Guclu-Ustandag et Mazza, 2007). La glycyrrhizine par exemple, saponine isolée de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.), édulcorant peu calorique, possède un pouvoir sucrant jusqu'à 100 fois supérieur à celui du saccharose (Bruneton, 2016).

2.1.3.2 Dans l'industrie pharmaceutique

Certaines saponines retiennent l'attention comme matières premières destinées à l'hémisynthèse des molécules médicamenteuses comme par exemple les saponines à génines stéroïdiques pour l'obtention de stéroïdes. Plusieurs plantes riches en saponines sont également utilisées par l'industrie pharmaceutique en Phytothérapie comme par exemple le Ginseng (Bruneton, 2016).

D'un point de vue pharmacologique, les saponines ont montré *in vitro* et *in vivo* des propriétés hypocholestémiantes (Milgate et Roberts, 1995), anti-inflammatoires, chimioprotectrices, antidiabétiques, analgésiques, immunoadjuvantes, immunostimulantes, cytotoxiques, et anti-tumorales (Hostettman et Marston, 1995 ; Lacaille-Dubois, 1999 ; Lacaille-Dubois et Wagner, 2000).

2.1.3.3 En cosmétique

En raison de leurs propriétés chimiques et leur pouvoir moussant, des saponines ou des extraits de plantes les contenant, sont exploités par l'industrie comme additifs alimentaires ou en cosmétique, en tant qu'agents conservateurs, agents de sapidité, ou des agents d'élimination du cholestérol des produits laitiers (Guclu-Ustandag et coll., 2007; San Martín et coll., 1999).

Compte tenu de l'intérêt structural des saponines, et de leurs activités biologiques reconnues, trois espèces ont été sélectionnées sur des critères chimiotaxonomiques pour une étude phytochimique. Avant de débiter les extractions, une étude bibliographique sur les composés isolés lors de travaux antérieurs a été réalisée.

2.2 Les saponines isolées du genre *Chlorophytum*

A partir des racines de *C. borivilianum*, quatre nouvelles saponines de type furostane : borivilianoside A-1, B-2, C-3, et D-4 (Acharya et coll., 2008) et quatre autres de type spirostane : borivilianoside E-1, F-2, G-3 et H-4, ont été isolées et identifiées (Acharya et coll., 2009) (Fig. 11).

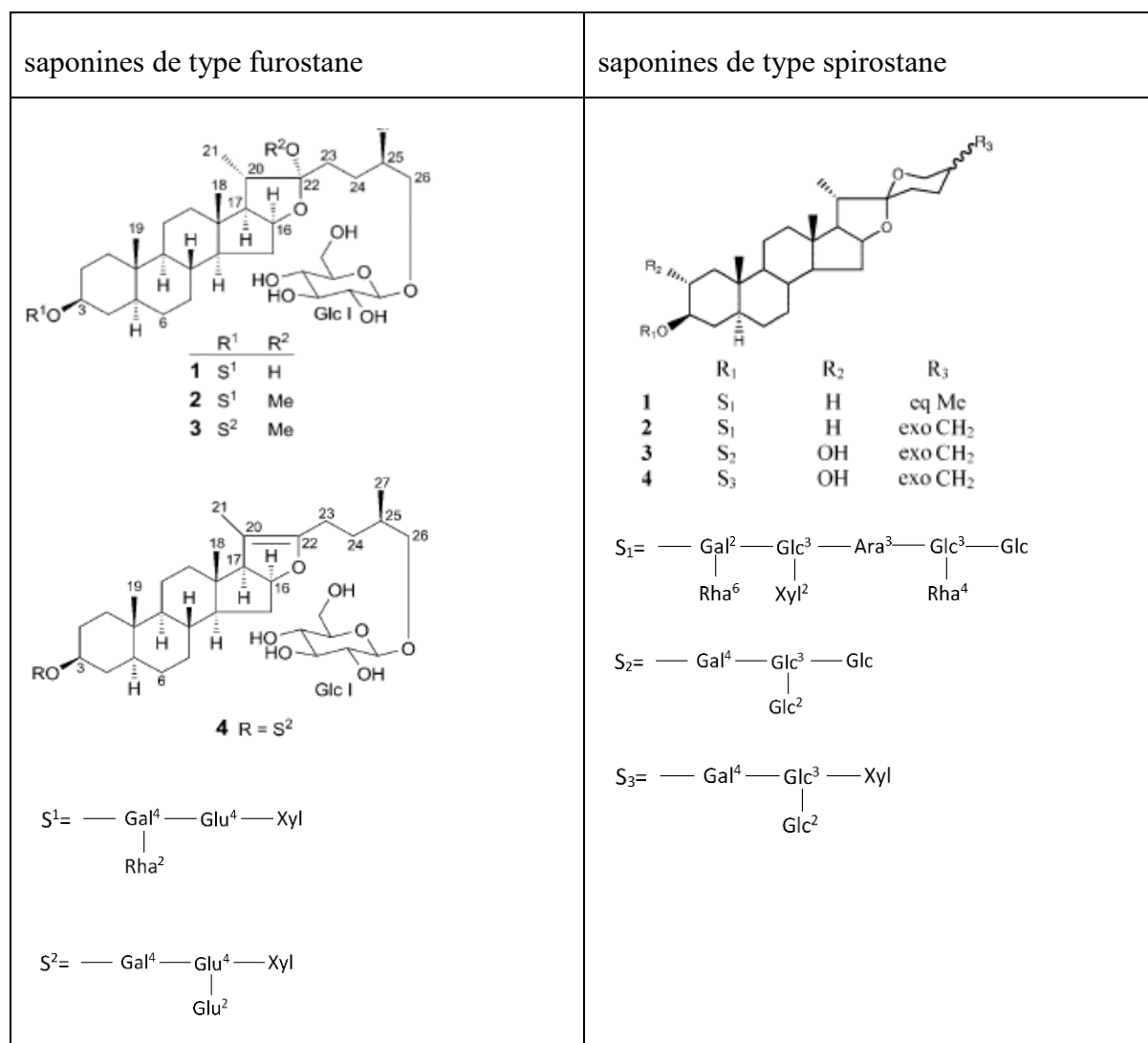


Figure 11 : Les saponines isolées de *Chlorophytum borivilianum*

A partir des racines de *C. orchidastrum* et de *C. malayense*, des saponines stéroïdiques ont été isolées et caractérisées, les orchidastrosides A-1, B-2, C-3, D-4, E-5 et F-6 dans le *C. orchidastrum* (Acharya et coll., 2010) et les chloromalosides A, B, C, D (Li et coll., 1990) et E (Yang Q-X et Yang C-R, 2000) dans *C. malayense* (Fig. 12).

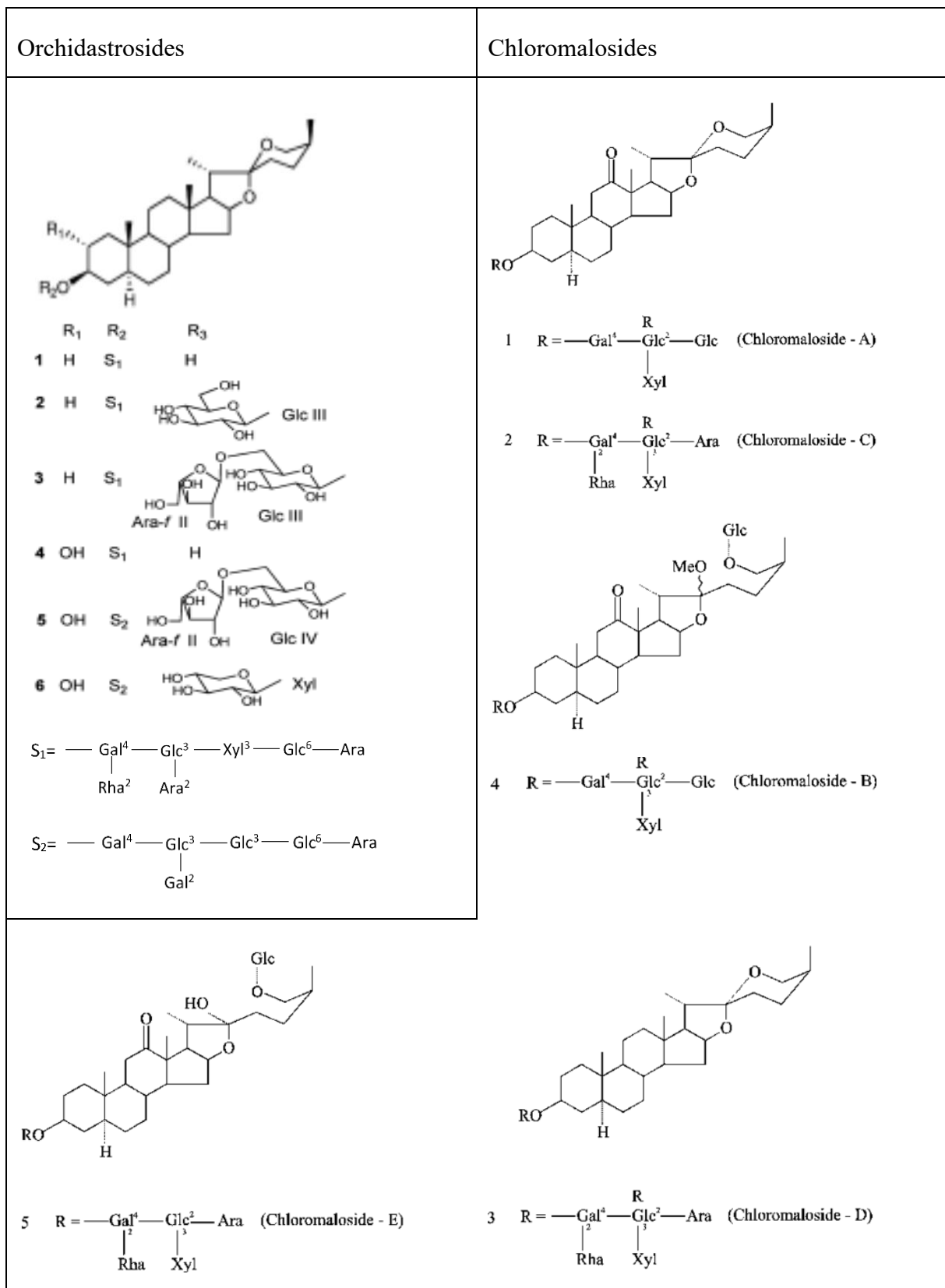


Figure 12: Les saponines isolées de *C. orchidastrum* et de *C. malayense*

A partir de *C. comosum*, sept saponines stéroïdiques (6-12) ont été isolées et caractérisées (Mimaki et coll., 1996) (Fig. 13).

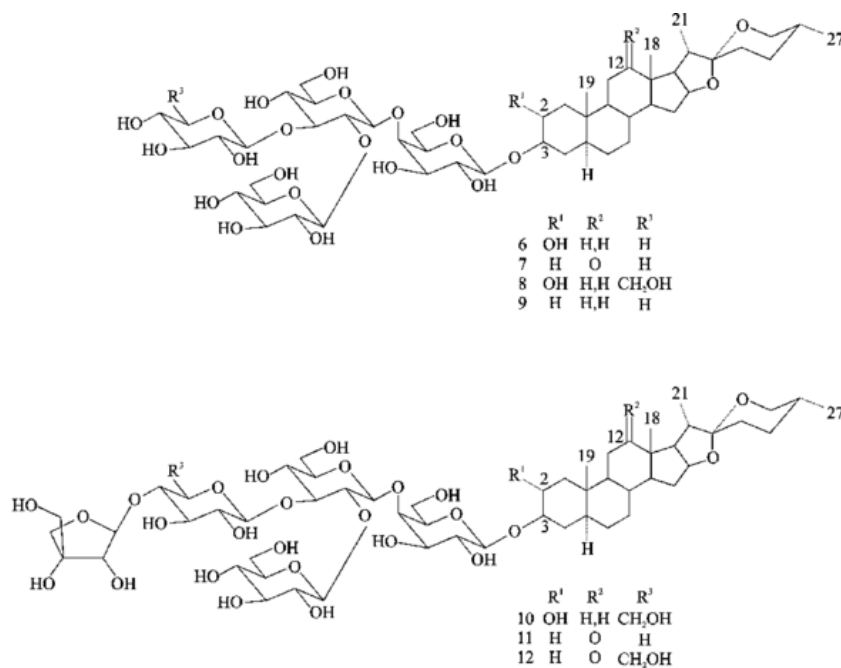


Figure 13: Les saponines isolées de *C. comosum*

Enfin, une nouvelle saponine de type spirostane, l'arundinoside A, a été isolée à partir de *C. arundinaceum* (Tandon et Shukla, 1997) (Fig. 14).

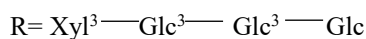
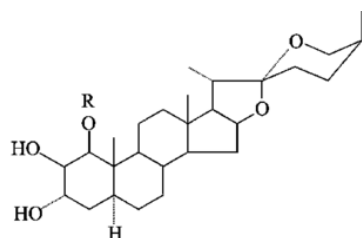


Figure 14: Saponine isolée de *C. arundinaceum*

2.3 Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*

Certaines plantes du genre *Ornithogalum* sont connues pour être toxiques et plusieurs glycosides de type cardénolide ont été isolés et identifiés (Ghannamy et coll., 1987). La plupart des saponines isolées de ce genre, particulièrement des espèces *O. thyrsoides* (Kuroda et coll., 2002, 2004, 2006 ; Cao et coll., 2012) et *O. saundersiae* (Kubo et coll., 1992 ; Kuroda et coll.,

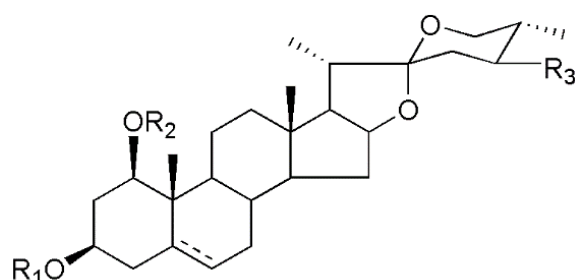
1995, 1999, 2001 ; Mimaki et coll., 1996, 1997 ; Iguchi et coll., 2017) possèdent des aglycones de type cholestane ou spirostane. Les figures suivantes (Fig. 15-21) présentent quelques exemples de saponines isolées du genre *Ornithogalum*.

Ac : Acétyl-

PMBz : *p*-méthoxybenzoyl-

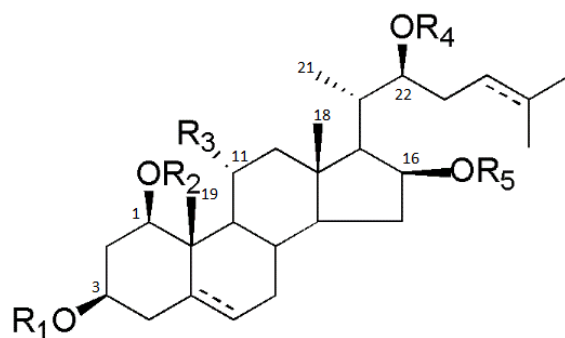
DMBz : 3,4-diméthoxybenzoyl-

TMBz : 3,4,5-triméthoxybenzoyl-



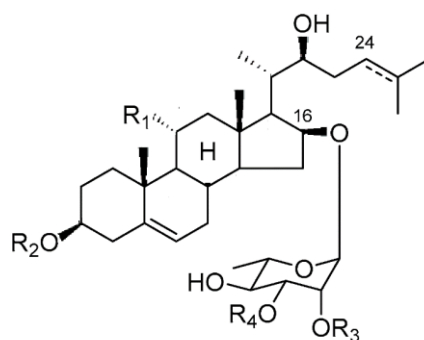
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|------------|
| <i>O. thyrsoides</i> | -H | Glc- | -H | |
| <i>(Kuroda et coll., 2004)</i> | -H | Rha-(1-3)-Ara- | -H | Δ^5 |
| | -H | Rha-(1-3)-[Xyl-(1-3)]-Ara- | -H | Δ^5 |
| | -H | Rha-(1-3)-Ara- | -OH | Δ^5 |
| | -H | Rha-(1-3)-[Xyl-(1-3)]-Ara- | -OH | Δ^5 |

Figure 15: Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*



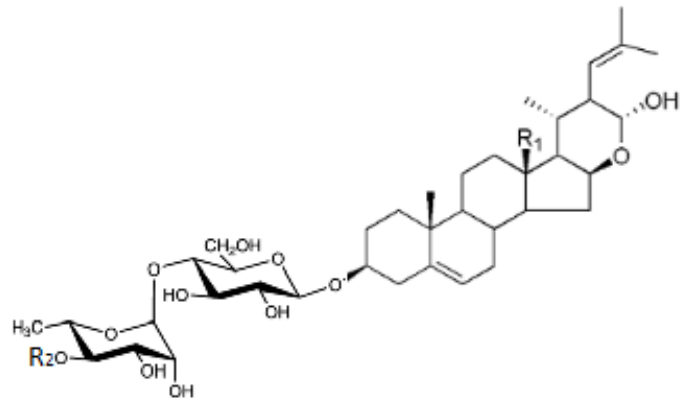
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>O. thyrsoides</i> | -H | Rha- | -H | -H | Glc- | 5 α |
| <i>(Kuroda et coll., 2004)</i> | -H | Rha- | -H | -H | 6-Ac-Glc- | 5 α |
| | -H | Rha- | -H | -H | Api-(1-4)-[(6-Ac)-Glc]- | 5 α |
| | -H | Glc- | -H | -H | Glc- | 5 α |
| | -H | 6-TMBz-Glc- | -H | -H | Glc- | 5 α |
| | -H | 6-TMBz-Glc- | -H | -H | Glc- | 5 α , Δ^{24} |
| | -H | Rha- | -H | -H | Rha- | Δ^5 |
| | -H | Rha- | -H | -H | Rha- | 5 α , Δ^{24} |
| | -H | Rha- | -H | -H | Rha- | Δ^5 , Δ^{24} |

Figure 16: Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*



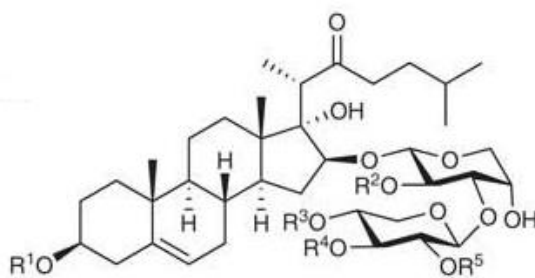
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| <i>O. saundersiae</i> (Iguchi et coll., 2017) | -OH | Glc- | -Ac | -H | |
| | -OH | Glc- | -H | -H | |
| | -OH | Glc- | -Ac | -Ac | |
| | -OH | Glc- | -Ac | -PMBz | |
| | -OH | Glc- | -Ac | -TMBz | |
| | -OH | -H | -Ac | -H | Δ^{24} |
| | -OH | Glc- | -Ac | -Ac | Δ^{24} |
| | -OH | Glc- | -H | -H | Δ^{24} |
| | -OH | Glc- | -Ac | -PMBz | Δ^{24} |
| | -OH | Glc- | -Ac | -TMBz | Δ^{24} |
| | -OH | Rha-(1-2)-Glc- | -Ac | -Ac | Δ^{24} |
| | -H | Glc- | -Ac | -Ac | |
| | -H | -H | -H | -H | Δ^{24} |
| | -H | Glc- | -Ac | -Ac | Δ^{24} |
| <i>O. saundersiae</i> (Kuroda et coll., 1999) | -OH | -H | -Ac | -Ac | |
| | -OH | -H | -Ac | -PMBz | |
| | -OH | -H | -Ac | -TMBz | |
| | -OH | -H | -Ac | -Ac | Δ^{24} |
| <i>O. saundersiae</i> (Kubo et coll., 1992) | -OH | -H | -Ac | -H | |
| | -OH | -H | -H | -H | |
| | -OH | -H | -H | -H | Δ^{24} |
| | -OH | -H | -H | -Ac | |
| | -OH | -H | -H | -Ac | Δ^{24} |

Figure 17: Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*



| | R ₁ | R ₂ |
|--|---------------------|---------------------------|
| <i>O. saundersiae</i> (Kuroda et coll., 1999) | -CHO | -H |
| | -CHO | <i>p</i> -hydroxybenzoyl- |
| | -CHO | -PMBz |
| | -CH ₂ OH | <i>p</i> -hydroxybenzoyl- |
| | -CH ₂ OH | -PMBz |

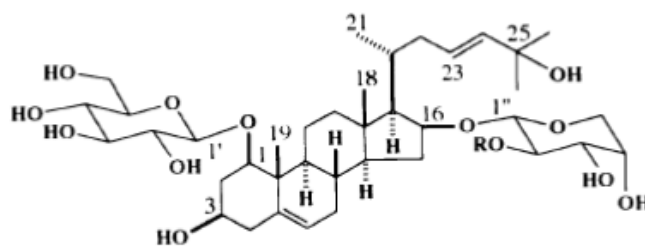
Figure 18: Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|---|------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>O. saundersiae</i> (Mimaki et coll., 1997) | -H | -Ac | -H | -H | (<i>E</i>)-cinnamoyl- |
| | Glc- | -Ac | -H | -H | -PMBz |
| | Glc- | -Ac | -H | -H | (<i>E</i>)-cinnamoyl- |
| <i>O. saundersiae</i> (Kubo et coll., 1992) | -H | -Ac | -H | -H | -PMBz |
| | -H | -Ac | -H | -H | -DMBz |
| | -H | -Ac | -H | -H | -H |
| <i>O. saundersiae</i> (Kuroda et coll., 2001) | -H | -Ac | Glc- | -H | -DMBz |
| | -H | -Ac | Glc- | -H | -TMBz |
| <i>O. thyrsoides</i> (Kuroda et coll., 2002) | Glc- | -Ac | -H | -H | -TMBz |
| | Glc-(1-6)-Glc- | -Ac | -H | -H | -H |
| | Glc-(1-6)-Glc- | -Ac | -H | -H | -DMBz |
| | Glc-(1-6)-Glc- | -Ac | -H | -H | -TMBz |
| | Glc-(1-4)-Glc-(1-6)- Glc- | -Ac | -H | -H | -H |
| | Glc-(1-4)-Glc-(1-6)- Glc- | -Ac | -H | -H | -DMBz |
| | Glc-(1-4)-Glc-(1-6)- Glc- | -Ac | -H | -H | -TMBz |
| | Glc-(1-4)-Glc-(1-6)- Glc- | -Ac | -H | -H | 4-hydroxy-3- methoxybenzoyl- |
| | Glc-(1-4)-Glc-(1-6)- Glc- | -Ac | -H | 3,4- dimethoxybenzoy l- | -H |

Figure 19: Les saponines isolées du genre *Ornithogalum*

O. saundersiae (Mimaki et coll., 1996)



R: -TMBz

Figure 20: Saponine isolée d'*O. saundersiae*

O. thyrsoïdes (Kuroda et coll., 2006)

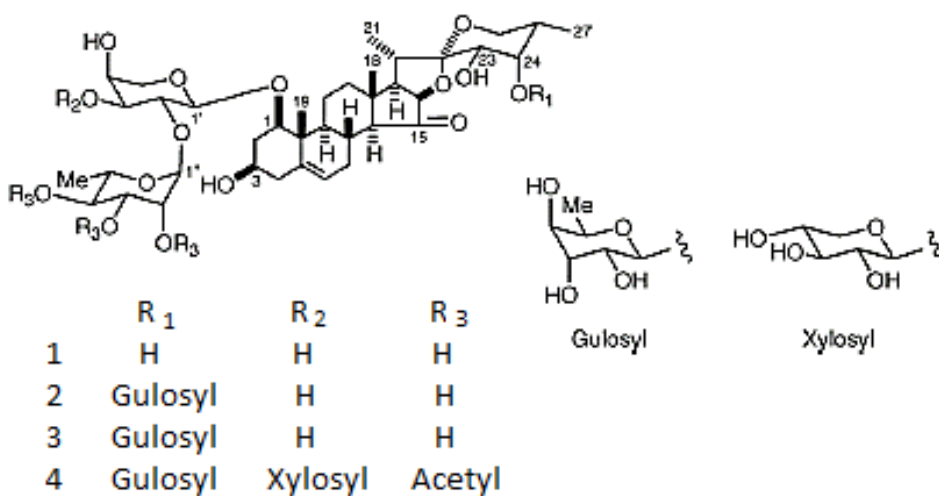
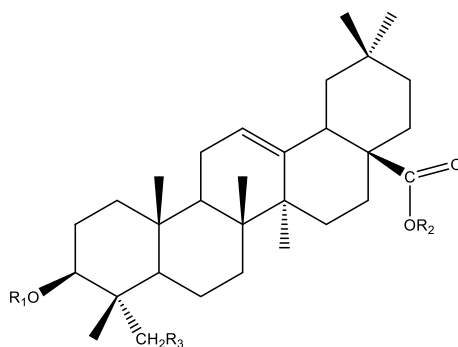


Figure 21: Les saponines isolées d'*O. thyrsoïdes*

2.4 Les saponines isolées du genre *Weigela*

Les saponines isolées des plantes du genre *Weigela*, à savoir *W. hortensis*, *W. stelzneri* et *W. florida* « rumba », sont entièrement composées de génines triterpéniques de type acide oléanolique et hédéragénine (Rezgui et coll., 2016 ; Murayama et coll., 2003 ; Champy et coll., 2018) (Fig. 22).



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|--|--|---------------------------|----------------|
| <i>W. hortensis</i> (Murayama et coll., 2003) | -Rha ² —Ara | -Glc ⁶ —Glc | -OH |
| | -Rha ² —Ara | -Glc ⁶ —3AcGlc | -OH |
| <i>W. stelzneri</i> (Rezgui et coll., 2016) | $\begin{array}{c} \text{-Ara} \\ \\ \text{Rha}^3 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl} \\ \\ \text{Glc} \end{array}$ | -H | -H |
| | $\begin{array}{c} \text{-Xyl} \\ \\ \text{Rha}^3 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl} \\ \\ \text{Glc} \end{array}$ | -H | -H |
| | $\begin{array}{c} \text{-Xyl} \\ \\ \text{Rha}^3 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Glc} \\ \\ \text{Glc} \end{array}$ | -H | -H |

| | | | |
|--|--|---|-----|
| | $\begin{array}{c} \text{-Ara} \\ \\ \text{Rha}^3 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl}^4 \text{---} \text{Xyl} \\ \\ \text{Glc} \end{array}$ | $\text{-Glc}^6 \text{---} \text{Glc}$ | -H |
| | $\text{-Ara}^2 \text{---} \text{Glc}$ | $\begin{array}{c} \text{-Glc}^6 \text{---} \text{Xyl} \\ \\ \text{Rha} \end{array}$ | -OH |
| | -Ara | $\begin{array}{c} \text{-Glc}^6 \text{---} \text{Xyl} \\ \\ \text{Rha} \end{array}$ | -OH |
| | -Ara | $\begin{array}{c} \text{-Glc}^6 \text{---} \text{Glc} \\ \\ \text{Rha} \end{array}$ | -OH |
| | -Ara | $\text{-Glc}^6 \text{---} \text{Glc}$ | -OH |
| <i>W. florida</i> "rumba" (Champy et coll., 2018) | $\text{--- Ara}^2 \text{ --- Rha}^3 \text{ --- Xyl}^4 \text{ --- Xyl}^4 \text{ --- Xyl} \\ \\ \text{Xyl}^2$ | -H | -H |
| | $\text{--- Ara}^2 \text{ --- Rha}^3 \text{ --- Xyl}^4 \text{ --- Xyl}^4 \text{ --- Glc} \\ \\ \text{Xyl}^2$ | -H | -H |
| | $\text{--- Ara}^2 \text{ --- Rha}^3 \text{ --- Xyl}$ | -H | -H |

Figure 22: Les saponines isolées du genre *Weigela*

Partie II : Etude chimique

1 Matériels et méthodes appliqués à la phytochimie

1.1 Matériel végétal et extraction

C. blepharophyllum Schweinf. ex Baker a été collecté à Bambui, dans le département de Mezam, dans le nord-ouest du Cameroun, en août 2009, et identifié par Dr. Pierre Nana, botaniste de l'Herbier National du Cameroun, à Yaoundé, où un spécimen de référence (N ° 19633 / SRF / CAM) a été déposé.

Weigela x « kosteriana variegata » a été fourni par Botanic ® (Dijon, France), en 2015. Un spécimen de référence (N ° 20111003) a été déposé dans l'herbier du Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

Ornithogalum dubium, quant à lui, a été fourni par Jardiland ® (Dijon, France), en 2015 et a été identifié par Pr. Marie-Aleth Lacaille-Dubois. Un spécimen de référence (N ° 20151009), est déposé dans l'herbier du Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

L'extraction est la première étape qui permet d'obtenir un extrait brut. La plante est broyée avec un broyeur électrique et la poudre ainsi obtenue est soumise à trois extractions successives pour une durée de 30 min chacune. La solution obtenue est filtrée puis évaporée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi®. Rotavapor-R).

Selon des critères bibliographiques et les protocoles classiquement utilisés au laboratoire, les extractions aux ultrasons et aux micro-ondes sont les méthodes les plus adaptées aux plantes à saponine. Elles permettent d'obtenir un meilleur rendement par rapport à des techniques classiques d'extraction à reflux. Les extractions aux ultrasons sont recommandées pour les substances thermolabiles.

➤ Extraction aux micro-ondes :

Elle consiste à créer une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière, donc le dégagement de chaleur aura lieu dans la masse. Ainsi le chauffage par microondes d'un produit résulte de la conversion en chaleur de l'énergie d'une onde

électromagnétique au sein de ce matériau. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, et les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique (Anizon, 2003).

➤ Extraction aux ultrasons :

Le principe de l'extraction aux ultrasons est le phénomène de cavitation qui crée des cisaillements très importants et répétitifs au niveau des cellules. La cavitation est en fait la formation de poches et de bulles de vapeur dans le milieu continu. Ces phénomènes vont entraîner une dislocation des parois cellulaires qui sont altérées par les microbulles gazeuses créées (Bonneau et Pomero, 2004).

1.2 Séparation et isolement

La séparation d'un extrait et l'obtention de saponines pures nécessitent l'utilisation combinée de plusieurs techniques chromatographiques, comme la chromatographie liquide sous vide (*Vaccum Liquid Chromatography*, VLC), la chromatographie d'exclusion Sephadex® LH-20, la chromatographie liquide moyenne pression (*Medium Pressure Liquid Chromatography*, MPLC) et la chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Ces diverses techniques doivent être le plus souvent utilisées successivement avec un changement de support ou d'éluant afin d'atteindre un niveau de séparation optimal.

Des contrôles réguliers à chaque étape de fractionnement sont réalisés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

1.2.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les CCM permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits élués.

Elles sont réalisées sur des plaques de silice (phase normale, silicycle Ultra pure silicagel, 10-12 µm), sur support en verre (Silica Plate TLC).

Le développement de ces plaques s'effectue dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant approprié, constitué généralement d'un mélange tertiaire ou quaternaire de solvants selon le

type de séparation souhaité. En effet, le solvant de migration doit être choisi en fonction de la polarité des molécules contenues dans l'échantillon. Les plaques sont ensuite observées sous lampe UV à 254 et à 366 nm afin de distinguer les molécules possédant un chromophore (par exemple les flavonoïdes). En général, les saponines ne contiennent quasiment pas de double-liaisons, donc de chromophores, et sont donc difficilement détectables sous UV. On utilise alors un révélateur comme la vanilline sulfurique, une solution composée de 1 g de vanilline, 2 mL d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95 % q.s.p. 100 mL.

Pour la vérification de la pureté des composés isolés, on utilise une CCM haute performance (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC), d'une granulométrie plus fine (Merck, type kieselgel 60 F254, 5-6 µm), permettant une meilleure séparation des composés.

Les fractions issues des différentes chromatographies sont donc contrôlées par CCM. Ainsi, les fractions semblables sont rassemblées, évaporées et lyophilisées afin d'obtenir des poudres, ce qui facilite leur manipulation et leur conservation.

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire

Plaques de silice phase normale (Ultra pure silicagel, 10-12 µm, Silicycle)

Plaque de silice haute performance commerciales HPTLC (type kieselgel 60 F254, 5-6 µm, Merck).

Phase mobile

Chloroforme (CHCl₃) : Méthanol (MeOH) : Eau (H₂O) : Acide Acétique (AcOH)

CHCl₃ : MeOH : H₂O, (80 :20 :2) (v/v)

CHCl₃ : MeOH : H₂O : AcOH, (70 :30 :5 :1) (v/v)

CHCl₃ : MeOH : H₂O : AcOH, (60 :32 :7 :1) (v/v)

1.2.2 Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)

La VLC est une technique de fractionnement préliminaire de l'extrait brut. Cette technique peut être considérée comme une CC (chromatographie sur colonne) préparative sous vide permettant un fractionnement grossier des constituants de l'extrait selon leur polarité. C'est une étape qui précède généralement les étapes de séparation les plus avancées telles que la MPLC, HPLC, etc. En pratique, elle permet principalement la séparation des composés lipophiles comme les

chlorophylles, des composés amphiphiles comme les saponines, et des composés polaires comme les sucres libres et les tanins.

Dans notre étude nous avons utilisé un filtre en verre fritté de porosité fixe dont la taille est choisie en fonction de la masse d'extrait à séparer. La phase stationnaire est du silicagel 60 en phase normale (Silicycle, 15-40 μm) relativement polaire ou Silicagel RP-18 en phase inverse (Silicycle, 75-200 μm), une silice apolaire greffée de groupements alkyls à 18 atomes de carbones. L'élution est réalisée comme suit :

-RP-18 : gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, qui permet d'éliminer les sucres avec l'eau et de recueillir les saponines dans les fractions 50:50 et 30:70.

-Silice 60 normale : gradient $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, qui permet d'éliminer les tanins très polaires qui restent le plus souvent adsorbés à la silice, et d'obtenir des fractions enrichies en saponines.

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire

Silice en phase normale (60 Å, 15-40 μm , Merck).

Silice en phase inverse, RP-18 Spherical C18 (300Å, 75-200 μm , Silicycle).

Phase mobile

- Silice en phase inverse, RP-18 :

$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0 :100) (v/v)

- Silice en phase normale :

$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (80:20:2, 70:30:5, 60:32:7) (v/v)

1.2.3 Chromatographie d'exclusion Sephadex LH-20

La chromatographie d'exclusion ou chromatographie sur gel est une méthode qui permet une séparation des constituants d'un mélange par taille moléculaire décroissante au travers d'un gel poreux (Beasse, 2009 ; Skoog, 2002).

Cette technique s'utilise comme suit : une colonne remplie d'une phase stationnaire constituée par des billes de polymère, poreuses et calibrées, imprégnées par la phase mobile. Le mélange de produits que l'on veut séparer est placé en tête de la colonne, puis la solution adéquate est éluée au travers. Toutes les molécules ayant une taille supérieure à celle des pores du support, et qui n'y peuvent donc pas pénétrer, sont entraînées au travers de la colonne à l'extérieur des

billes à la même vitesse que la phase mobile. Par contre, les autres molécules de petites tailles seront les seules à pouvoir pénétrer dans les pores du gel et donc plus ou moins retardées dans leur traversée de la colonne en fonction de leur taille. Les molécules de taille plus importante que la taille moyenne des pores du support, comme par exemple les tanins, sont donc éluées en premier. Les molécules qui sont nettement plus petites comme les sucres libres peuvent pénétrer dans leur « labyrinthe » et sont donc les dernières à être éluées. Les saponines et les flavonoïdes présentent une élution intermédiaire. (Hostettman et coll., 1997 ; Marouf et coll., 2013)

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire

Sephadex® LH-20 (Pharmacia) est un gel de dextrane (Polyoside d' α -glucose) ayant subi une alkylation contenant un réseau de chéneaux et de pores uniformes dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser.

Phase mobile

Elution isocratique, MeOH (100%) le plus souvent ou mélange binaire MeOH-H₂O (1:1) (v/v)

1.2.4 Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC)

C'est une technique plus fine de chromatographie sur colonne, supportant des pressions modérées, permettant ainsi d'accroître légèrement les débits. Cette technique permet le fractionnement et la purification en une ou plusieurs étapes des composants d'un mélange complexe. Elle est réalisée sur les fractions obtenues par VLC, éluées par des mélanges MeOH-H₂O (50:50) et/ou MeOH. La colonne utilisée est équilibrée pendant 5 mn avec le solvant d'élution en réalisant préalablement une migration sur plaque CCM de notre échantillon à séparer dans le but de situer sa polarité. L'échantillon dissout dans le solvant d'élution est déposé sur la colonne. Les systèmes de solvants utilisés pour l'élution sont généralement des mélanges dans des proportions variables en mode isocratique ou en gradient.

Conditions chromatographiques :

Matériel

Colonnes de séparation à silice Büchi® :

- Pré-colonne : 110 x 15 mm

- Colonne : 460 x 25 mm, 460 x 15 mm, 230 x 15 mm

Pompe pour l'appareillage MPLC en phase normale :

-HPLC pump 426 (Alltech).

Pompe pour l'appareillage MPLC en phase inverse, RP-18 :

-Büchi®. Pump manager C-605

- Büchi®. Pump module C-601

Collecteur : Büchi®. Fraction Collector C-660, 4 racks; 240 tubes.

Phase stationnaire

Silice en phase normale (60 Å, 15-40 µm, Merck).

Silice en phase inverse, RP-18 Spherical C18 (300 Å, 75-200 µm, Silicycle).

Phase mobile

- Silice en phase normale : CHCl₃-MeOH-H₂O (80:20:2, 70:30:5, 60:32:7) (v/v)

- Silice en phase inverse, C-18 : Plusieurs types de gradients d'éluion peuvent être utilisés, en gradient H₂O-MeOH pendant un temps déterminé, ou en gradient H₂O-MeOH par plateaux (50:50, 40:60, 30:70...) (v/v)

1.2.5 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

C'est une technique chromatographique très précise, dont les performances en termes de sélectivité et de résolution, sont liées à l'utilisation de support de granulométrie très fine et de l'application d'une pression élevée.

Les colonnes, constituées de la réunion de microparticules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 µm, conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable.

Le problème réside néanmoins dans le manque de chromophores dans les saponines, et l'utilisation d'un détecteur ultra-violet à 210 nm.

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire :

Colonne analytique : Colonne C-18 (250 mm × 4,6 mm id, 5 µm; Phenomenex LUNA)

Colonne semi-préparative : Colonne C-18 (250 mm x 10 mm id, 5 µm; Phenomenex LUNA)

Phase mobile : eau, acétonitrile et 0.01% (v/v) acide trifluoroacétique (en mode gradient)

Pompe : pompe quaternaire Büchi® avec un échantillonneur automatique et un détecteur UV à 210 nm.

Collecteur : Büchi® collecteur de fractions C-660

1.3 Détermination structurale

1.3.1 Méthode physico-chimique : Détermination de la configuration des oses par hydrolyse acide suivie d'une chromatographie phase gazeuse

Cette technique permet la libération de toutes les unités osidiques engagées dans des liaisons *O*-glycosidiques, ainsi leur identification sera possible par comparaison à des sucres standards. La démarche consiste à rompre les liaisons osidiques par une hydrolyse acide (2N de CF₃COOH, aqueuse) à ébullition et cela pendant 3 h. Après une extraction avec du CH₂Cl₂, la phase aqueuse acide est neutralisée par évaporations successives en utilisant du méthanol (MeOH), les sucres libérés sont par la suite identifiés par comparaison en CCM avec des sucres standards, le système de migration étant le suivant : CHCl₃-MeOH-H₂O (8 :5 :1) (v/v/v). (Haddad et coll., 2003 ; Acharya et coll., 2009 ; Schöpke, 2000 ; Hara et coll., 1987).

Les résidus de sucres sont par la suite dissous dans de la pyridine anhydre (100 µl). Après une agitation à 60 °C pendant 1 h, 150 µL d'hexaméthyl disilazane-triméthylchlorosilane, 3 :1 (HMDS-TMCS) sont ajoutés, et le mélange agité à nouveau à 60 °C pendant 30 min. Le précipité formé est par la suite centrifugé et le surnageant est concentré sous un flux de N₂. Le résidu obtenu est partagé entre le *n*-hexane et l'eau (0.1 mL chacun). L'extrait hexanique (1 µl) est par la suite analysé par CPG-FID. Ainsi, les profils des pics permettent de déterminer la configuration des sucres par comparaison de temps de rétention des dérivés thiazolidine par rapport à ceux des sucres préparés de manière similaire à partir de sucres standards (Sigma Aldrich) (Hara et coll., 1987).

Matériels et conditions de mesure

Chromatographe ThermoQuest (Thermo Instruments Systems Inc) avec :

- Colonne capillaire DB-1701 (30 m x 0,25 mm),
- Détecteur FID (T de détection à 250 °C),
- Gaz hélium (He),
- Température d'injection à 230 °C,
- Température initiale maintenue à 80 °C pendant 5 mn puis à 270 °C (15 °C / min)

1.3.2 Méthodes spectrales

Des méthodes spectrales permettent la détermination de la structure de la saponine isolée avec identification de la génine, des sucres ainsi que leur mode de liaison, à savoir la spectrométrie de masse ainsi que la résonance magnétique nucléaire.

1.3.2.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui permet d'obtenir la masse et la fragmentation d'une molécule. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Hu et Noll, 2005). L'ionisation d'une molécule peut être obtenue par différents procédés, mais celle utilisée préférentiellement pour la fragmentation des saponines est la technique d'ionisation par ESI-MS (*ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry*) (Liu et coll., 2004).

L'ionisation electrospray (ESI), longtemps considérée comme la technique la plus efficace dans la détermination structurale, fournit un outil sensible pour l'étude de molécules non volatiles et thermolabiles qui ne se prêtent pas à l'analyse par d'autres techniques classiques comme par exemple l'impact électronique.

L'electrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (1 à 10 $\mu\text{l} / \text{min}$). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel qui va de 3 à 6 kV entre le capillaire et la contre-électrode, ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. Ces gouttelettes vont se rétrécir après l'évaporation du solvant qu'elles contiennent, subissent par la suite une cascade de fissions donnant des gouttelettes encore plus petites jusqu'à la désorption des ions provoquée par le champ électrique (Fig. 23). Cette technique est applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, etc...ou en ions négatifs d'adduits chlorure ou d'acétate. (Ho et coll., 2003 ; De Hoffmann et coll., 1999)

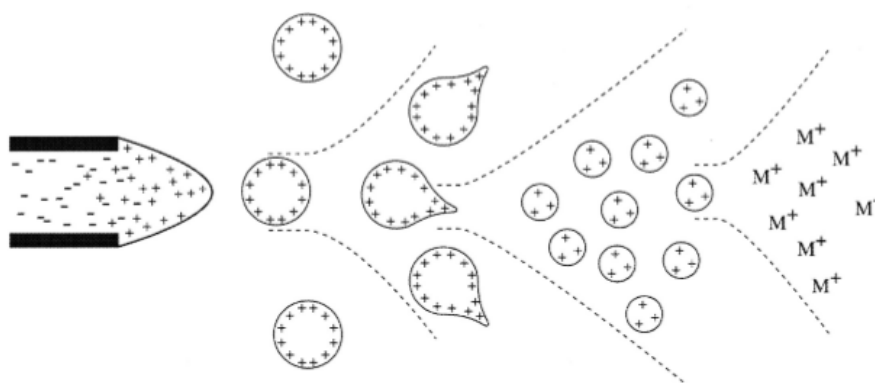


Figure 23: Mécanisme de l'ionisation par electrospray

[Ho et coll., 2003]

Matériels :

En mode haute résolution, HR-ESIMS, en mode ion positif, les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre de masse micrOTOF Bruker, et les spectres ESIMS en mode ion négatif, sur un LCQ Deca de Finnigan.

1.3.2.2 RMN : résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la méthode la plus efficace pour élucider la structure d'une saponine. Elle renseigne sur la nature de la génine, la conformation et la configuration des sucres de même que les liaisons interglycosidiques et les points de fixation des sucres sur l'aglycone.

Ces informations sont fournies par les spectres monodimensionnels RMN 1D (^1H et ^{13}C) et bidimensionnels RMN 2D (HMBC, HSQC, COSY, TOCSY, NOESY et/ou ROESY) (Rabasso, 2007; Balas, 1992; Willow, 2011).

1.3.2.2.1 Les spectres monodimensionnels

Ces spectres sont très complexes pour des molécules telles que les saponines. Néanmoins, quelques informations peuvent être déduites de leur analyse.

Pour les saponines, le spectre de RMN ^1H permet de distinguer trois zones de résonance (Massiot et Lavaud, 1995) :

- de 0,5 à 3 ppm : les protons de la génine
- de 3 à 4,5 ppm : les protons osidiques
- de 4,5 à 6 ppm : les protons osidiques anomériques, et les protons éthyléniques

Les spectres RMN ^1H montrent également la présence des doublets des méthyles des désoxy-6-hexoses (1,4-1,8 ppm). Les valeurs élevées des constantes de couplage ($J > 7.0$ Hz) indiquent une configuration β pour les protons anomériques des sucres sous forme pyranose, glucose, galactose, xylose, fucose, et α pour l'arabinose, alors qu'une faible valeur ($J = 1-1,8$ Hz) observée pour le rhamnose sous la forme pyranose suggère la configuration α . La configuration absolue des sucres D ou L est déterminée par la méthode précédemment décrite dans le paragraphe 1.3.1.

Le spectre de RMN ^{13}C fournit des informations sur la nature des carbones (Agrawal et coll., 1985 ; Massiot et Lavaud, 1995) :

- de 10 à 60 ppm : les carbones de la génine,
- de 60 à 90 ppm : les carbones des fonctions alcooliques secondaires et primaires des sucres et de la génine
- de 95 à 110 ppm : les carbones anomériques des sucres,
- de 120 à 150 ppm : les carbones éthyléniques et aromatiques
- Au-delà de 170 : les carbones des aldéhydes, des esters, des acides et des cétones

Le spectre RMN ^{13}C enregistré en mode DEPT permet de distinguer les différents carbones. Les signaux des groupes CH et CH₃ sont au-dessus de la ligne de base alors que les groupes CH₂ sont en dessous. Les carbones quaternaires n'apparaissent pas.

1.3.2.2.2 Les spectres bidimensionnels.

Les spectres bidimensionnels permettent d'élucider totalement la structure chimique des saponines par analyse des couplages interatomiques.

➤ ***Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC).***

L'analyse des spectres HSQC met en évidence les couplages hétéronucléaires (H-C) directs $^1J_{H-C}$ (Fig. 24). La majorité des carbones protonés sont ainsi déterminés (Massiot et Lavaud, 1995).

➤ ***Heteronuclear Multiple-Bound Correlation (HMBC).***

Ce spectre met en évidence les couplages hétéronucléaires à longue distance avec les constantes de couplage $^2J_{H-C}$ ou $^3J_{H-C}$ (Fig. 24). L'analyse des spectres HMBC permet d'élucider la structure de l'aglycone et de déterminer les séquences osidiques, ainsi que la liaison osidique sur l'aglycone et des acides organiques (Massiot et Lavaud, 1995).

➤ ***Correlated Spectroscopy (COSY).***

Le spectre COSY met en évidence les protons avec les couplages géminaux $^2J_{H-H}$ et les couplages vicinaux $^3J_{H-H}$ (Fig. 24).

Il est surtout utilisé pour déterminer l'ordre des protons dans un squelette de sucres (Massiot et Lavaud, 1995 ; Günther, 1996).

➤ ***Total Correlation Spectroscopy (TOCSY).***

Le spectre TOCSY permet de voir les corrélations de tous les protons d'un même système de spin, comme pour l'expérience COSY mais sur des constantes de couplage plus importantes (Fig. 24). Il est surtout important pour l'analyse de la structure des sucres (Massiot et Lavaud, 1995 ; Günther, 1996). En effet, il s'agit d'une variante de la COSY multirelayée et permet donc de s'assurer des corrélations des protons, établies par la COSY. La corrélation à partir d'un seul proton résolu peut être utilisée pour tracer le réseau de couplage afin que tous les protons dans un système de spin puissent être identifiés. (Massiot et Lavaud, 1995 ; Willow, 2011)

➤ ***Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY)***

L'expérience NOESY montre les interactions dipolaires (à travers l'espace) de protons distants de moins de 4,5 Å. Les spectres NOESY permettent donc de trouver la proximité spatiale (connectivité à travers l'espace) de certaines parties de la molécule et par conséquent, d'en décrire les informations sur sa structure tridimensionnelle (Fig. 24). Les spectres NOESY peuvent être utilisés pour résoudre certains problèmes que l'expérience COSY est incapable de dénouer. Par exemple, lorsque l'angle dièdre du proton adjacent est proche de 90 °, la constante de couplage est presque égale à zéro, il est donc difficile d'obtenir les informations de couplage par la COSY. C'est également le cas où le couplage est bloqué par un atome de carbone quaternaire (Gunther, 1996; Willow, 2011).

➤ ***Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy (ROESY)***

Elle consiste à déterminer la configuration spatiale de certains groupements par la mise en évidence des effets *Overhauser* entre protons proches dans l'espace. Les corrélations intrasucres permettent de confirmer la structure des unités osidiques (protons axiaux ou équatoriaux) et d'établir leur conformation (Massiot et coll., 1995). Son avantage majeur par rapport à la NOESY est la quasi-positivité des effets observés, car indépendants du champ magnétique appliqué. La technique employée est proche de celle de la TOCSY sauf que l'animation transversale est maintenue sur un axe horizontal pendant un temps de mixage et que le transfert de magnétisation a lieu par couplage dipolaire (Gunther, 1996)

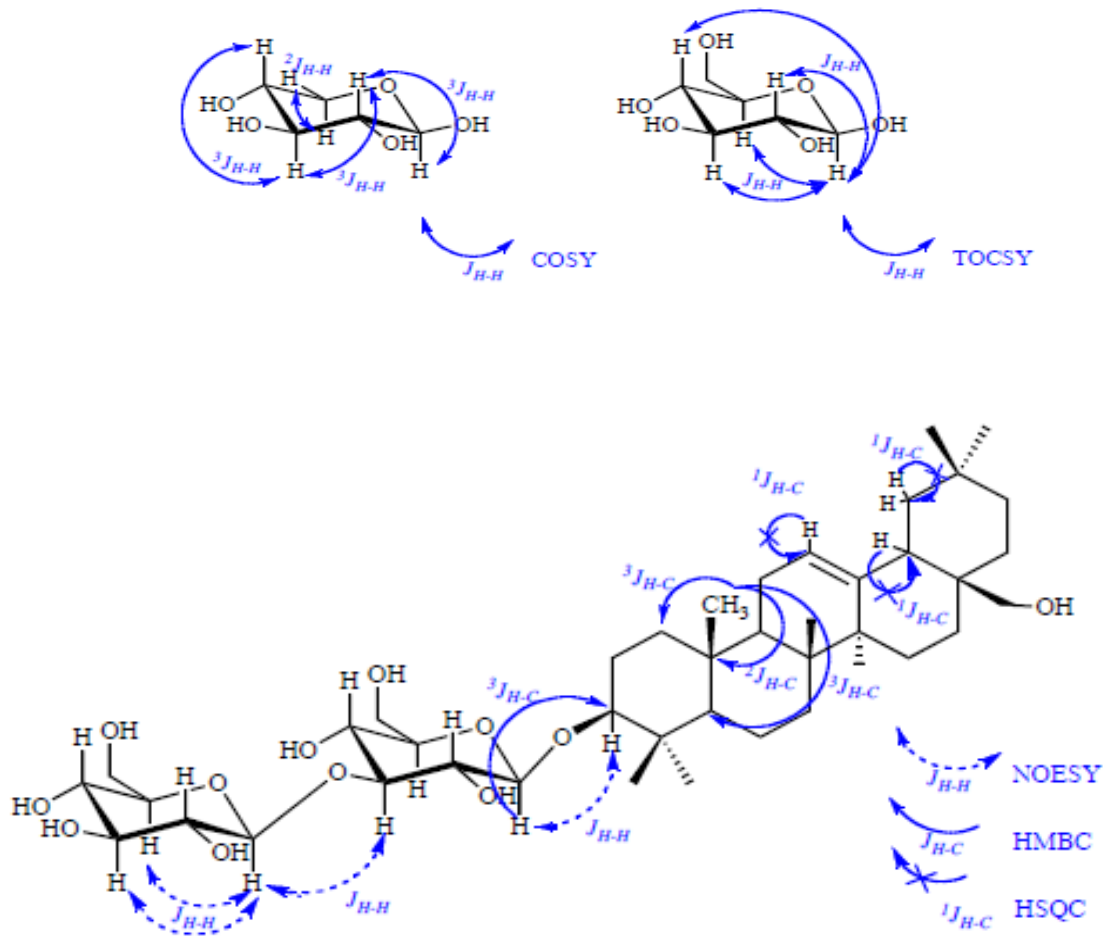


Figure 24: Les corrélations observées à l'aide de différentes expériences (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC, HSQC)

Matériels :

Les spectres RMN ont été réalisés en utilisant deux équipements différents :

- Appareil 1 : Varian INOVA 600 (Agilent Technologies) à la fréquence de fonctionnement de 600 MHz. Les conditions opératoires étaient les suivantes :

¹H : fréquence 600 MHz; largeur de balayage 8 kHz; point d'échantillonnage 66 k; largeur spectrale 7804 Hz, accumulation 32 impulsions; température 304 K.

^{13}C : fréquence 150 MHz; largeur de balayage 32 kHz; point d'échantillonnage 160 k; largeur spectrale 30000 Hz, accumulation 8000 impulsions; température 304 K.

Chaque échantillon a été dissous dans de la pyridine- d_5 (200 μL) en utilisant un tube de micro-échantillon de 5 mm (SHIGEMI Co., Ltd., Japon). Les déplacements chimiques ont été référencés par rapport au signal de solvant ($\delta_{\text{H}} = 7.22$, $\delta_{\text{C}} = 123.87$). Des séquences d'impulsions classiques ont été utilisées pour gMQF-COSY, TOCSY, NOESY, gHSQC et gHMBC. Le temps de mélange dans l'expérience NOESY a été fixé à 500 ms. Les spectres TOCSY ont été obtenus en utilisant la séquence de blocage de spin MLEV17 standard et en respectant un temps de mélange de 60 ms. Les spectres TOCSY, NOESY et HSQC ont été enregistrés en utilisant le mode sensible à la phase. La taille de la matrice de données d'acquisition était de 2048 x 256 mots dans f2 et f1, respectivement, et zéro remplissage jusqu'à 2k dans f1 a été faite avant la transformation de Fourier. Les fonctions de fenêtrage sinusoïdal ou sinusoïdal décalé, avec le décalage correspondant optimisé pour chaque spectre, ont été utilisées pour l'amélioration de la résolution et la correction de la ligne de base a été appliquée dans les deux dimensions.

- Appareil 2 : Varian VNMR-S 600 MHz : Équipé de sondes à triple résonance de 3 mm et de sondes à double bande large de 3 mm. Les spectres sont enregistrés dans la pyridine- d_5 . Les signaux de solvant ont été utilisés comme étalon interne (pyridine- d_5 : $\delta_{\text{H}} = 7.21$, $\delta_{\text{C}} = 123.5$ ppm), et tous les spectres ont été enregistrés à $T = 35^\circ \text{C}$. Le type de carbone (CH_3 , CH_2 , CH) a été déterminé par DEPT et les constantes de couplage (J) ont été mesurées en Hz.

2 Investigations phytochimiques :

Après la description des matériels et méthodes, l'étude phytochimique des trois plantes sélectionnées est présentée dans ce nouveau sous-chapitre.

Dans un premier temps, un screening phytochimique sur les différentes parties ou organe végétal des trois plantes a été effectué, afin de déterminer leur richesse en saponines. 10 g de chaque ont été extraits et leur composition évaluée par CCM. Suivant les profils chromatographiques obtenus, les racines de *Chlorophytum blepharophyllum* et *Weigela* × « *kosteriana variegata* », et que les racines, bulbes, tiges, feuilles et fleurs d'*Ornithogalum dubium* semblent intéressantes.

Ces différentes parties ont donc été sélectionnées. L'étude phytochimique des racines de *Chlorophytum blepharophyllum*, des racines de *Weigela* × « *kosteriana variegata* » ainsi que des racines, bulbes, tiges, feuilles et fleurs d'*Ornithogalum dubium* est donc présenté dans les paragraphes suivants.

2.1 Etude phytochimique de *Chlorophytum blepharophyllum*

L'étude phytochimique de *Chlorophytum blepharophyllum* a permis l'isolement de quatre composés, tous de structures connues, en utilisant diverses techniques chromatographiques. Les étapes d'extraction et de purification sont présentées synthétiquement dans les figures 25, 26, 27 et 30 et sont suivies de la détermination structurale.

2.1.1 Extraction et isolement des composés 1-4

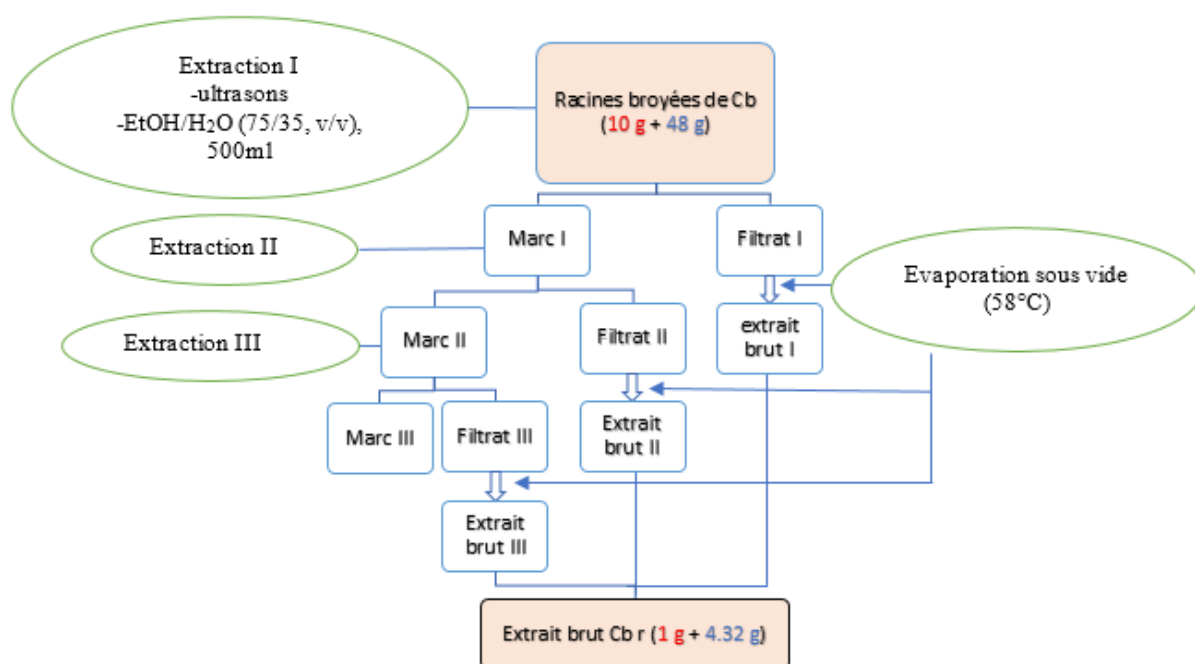


Figure 25: Schéma d'extraction des composés issus de *Chlorophytum blepharophyllum*

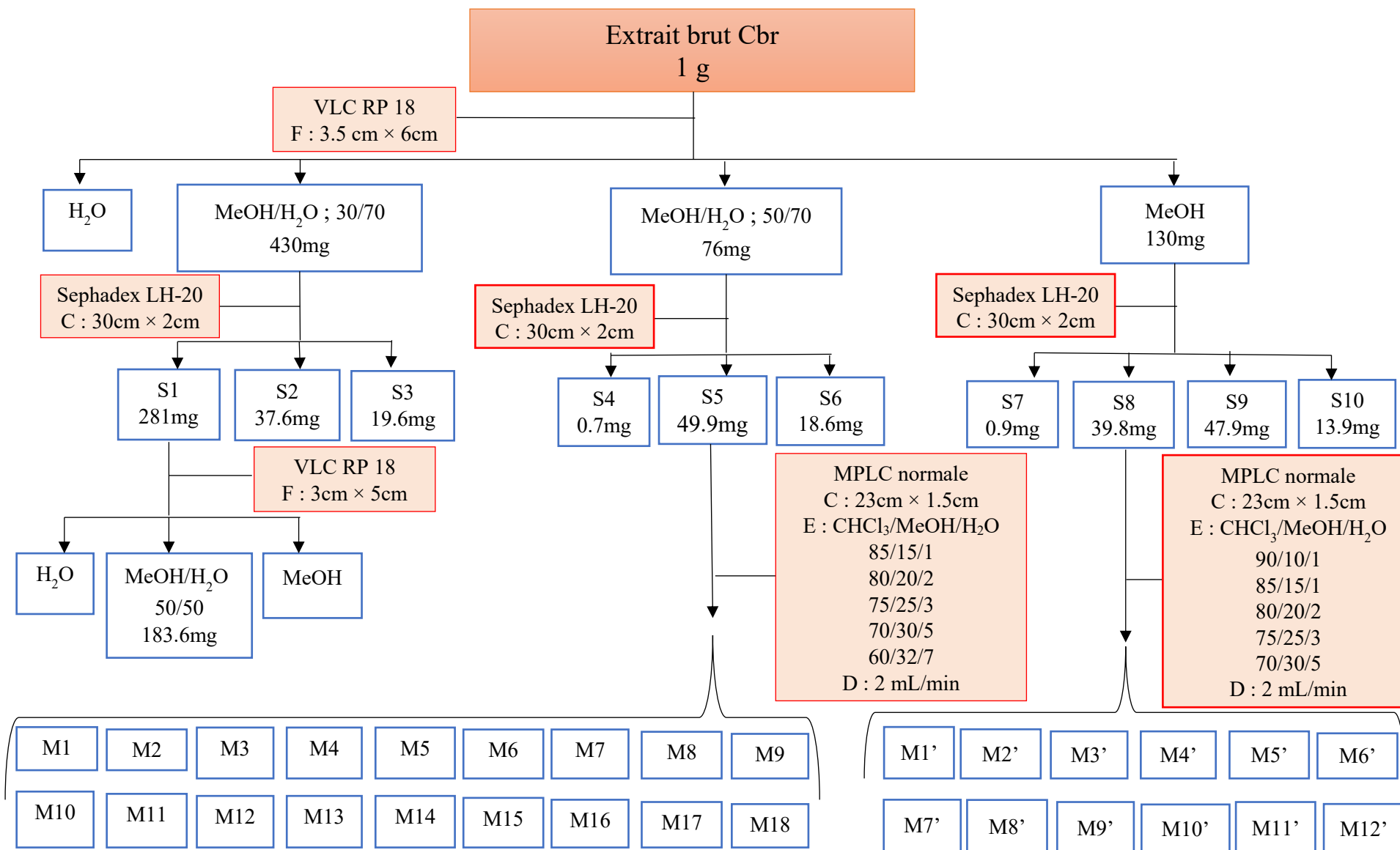


Figure 26: Etapes de purification à partir de 1g d'extrait brut de Cbr

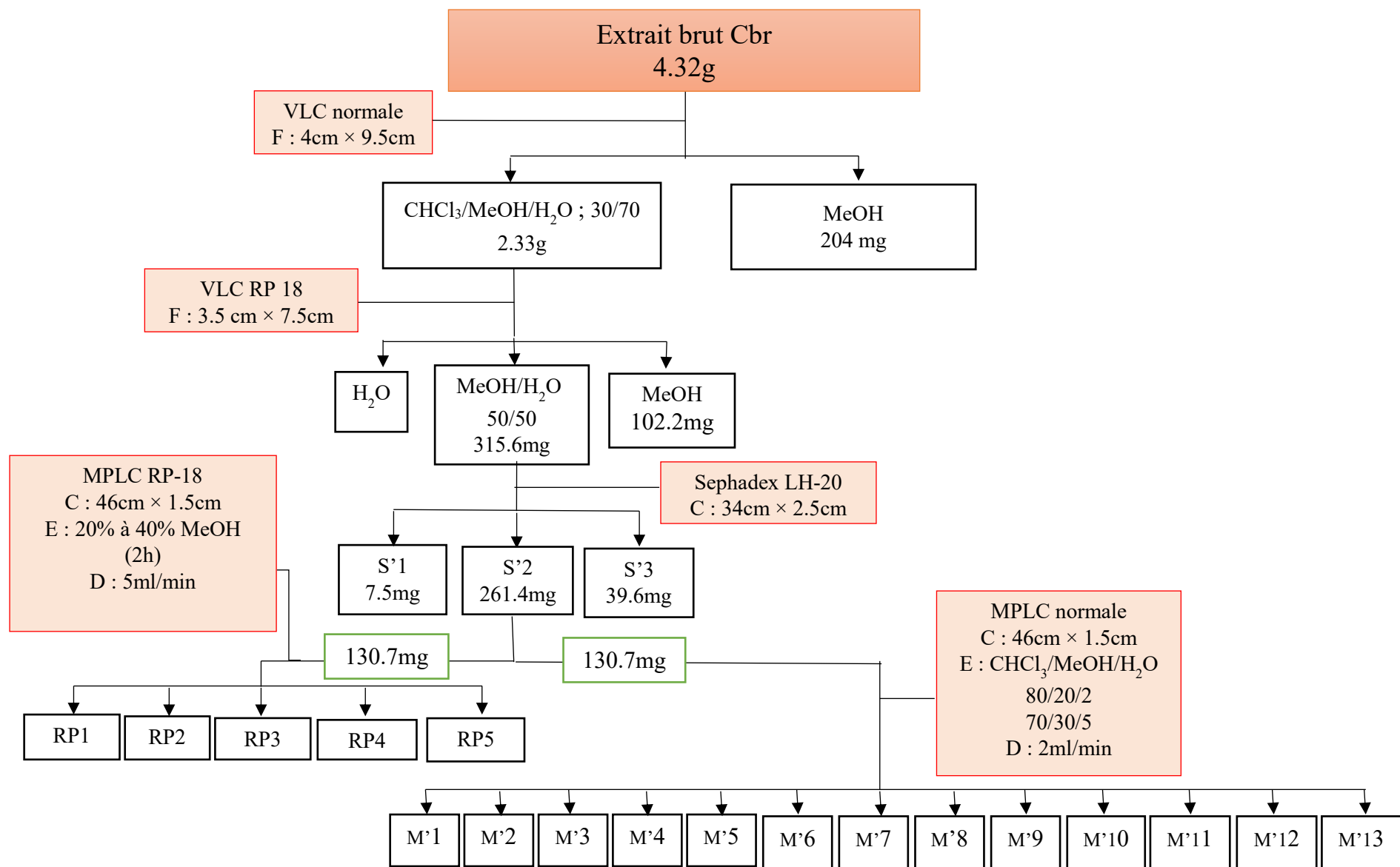


Figure 27: Etapes de purification à partir de 4,32 g d'extrait brut de Cbr

A la fin des manipulations précédentes, aucun composé pur n'a été obtenu. Il a été donc décidé de regrouper les fractions issues de ces diverses MPLC en fonction du profil chromatographique sur CCM. Ainsi, nous avons obtenu une répartition des molécules contenues dans ces regroupements selon quatre zones de polarité décroissante de a à d (Fig. 28).

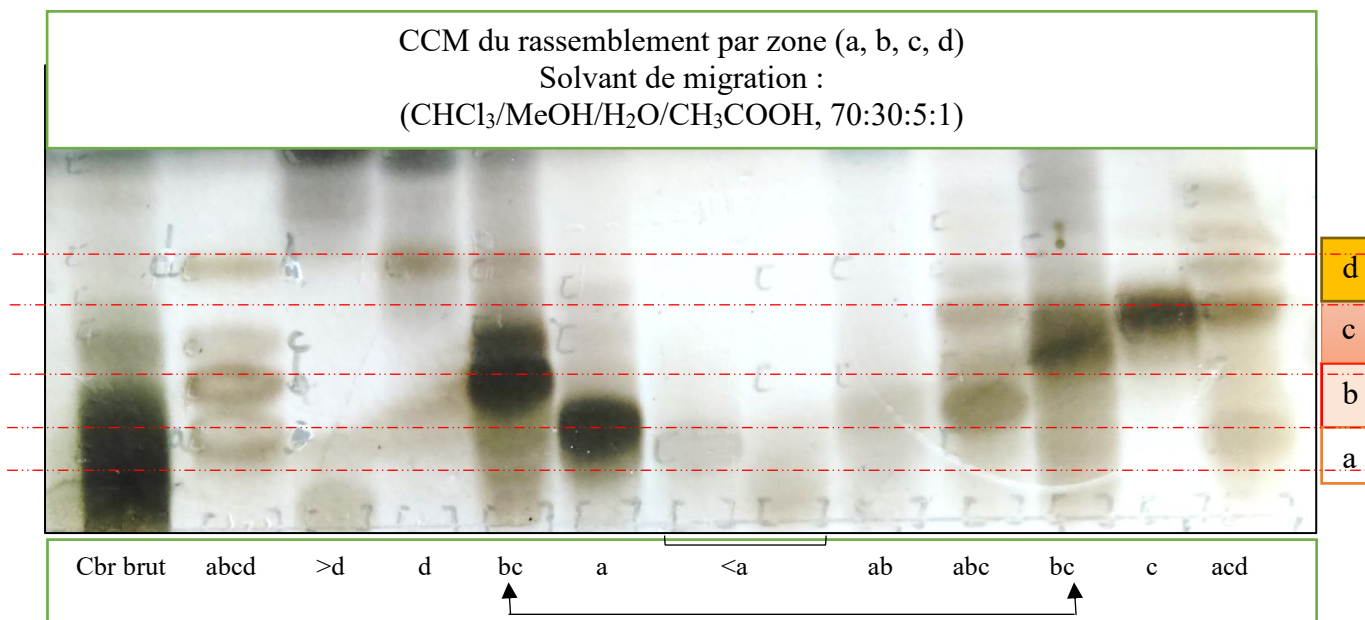


Figure 28: CCM de rassemblement par zone des composés isolés de *C. blepharophyllum*

Les étapes de purification à partir de ces fractions réparties en différentes zones sont présentées dans le diagramme de la figure 30.

Quatre composés ont ainsi été isolés. La pureté de ces derniers a été ensuite vérifiée par HPTLC (Fig. 29).

HPTLC des composés isolés
Solvant de migration :
(CHCl₃/MeOH/H₂O/CH₃COOH, 70:30:5:1)

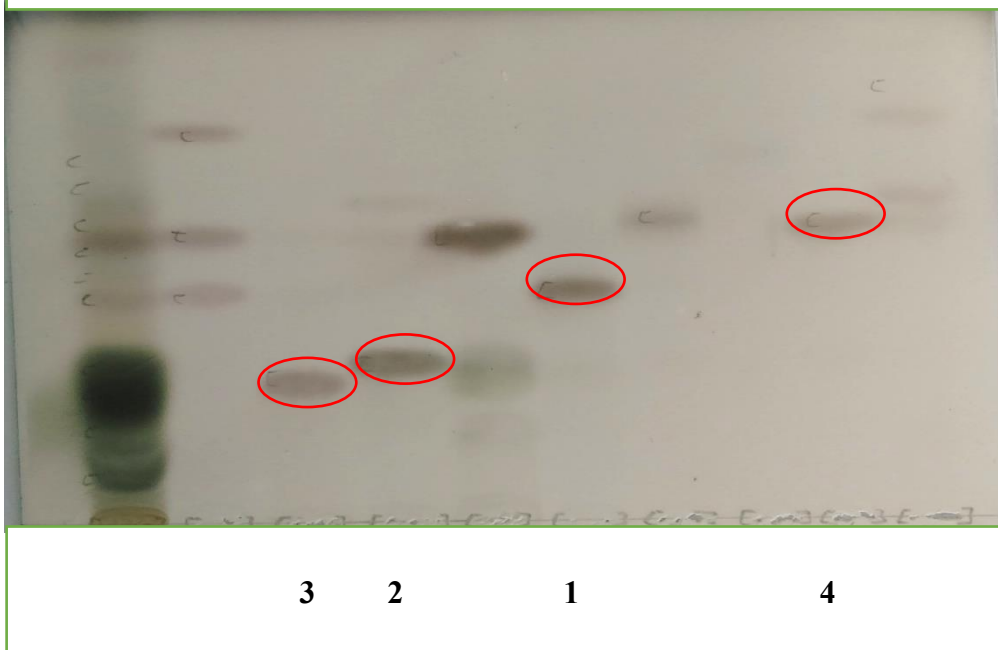


Figure 29: HPTLC des composés isolés

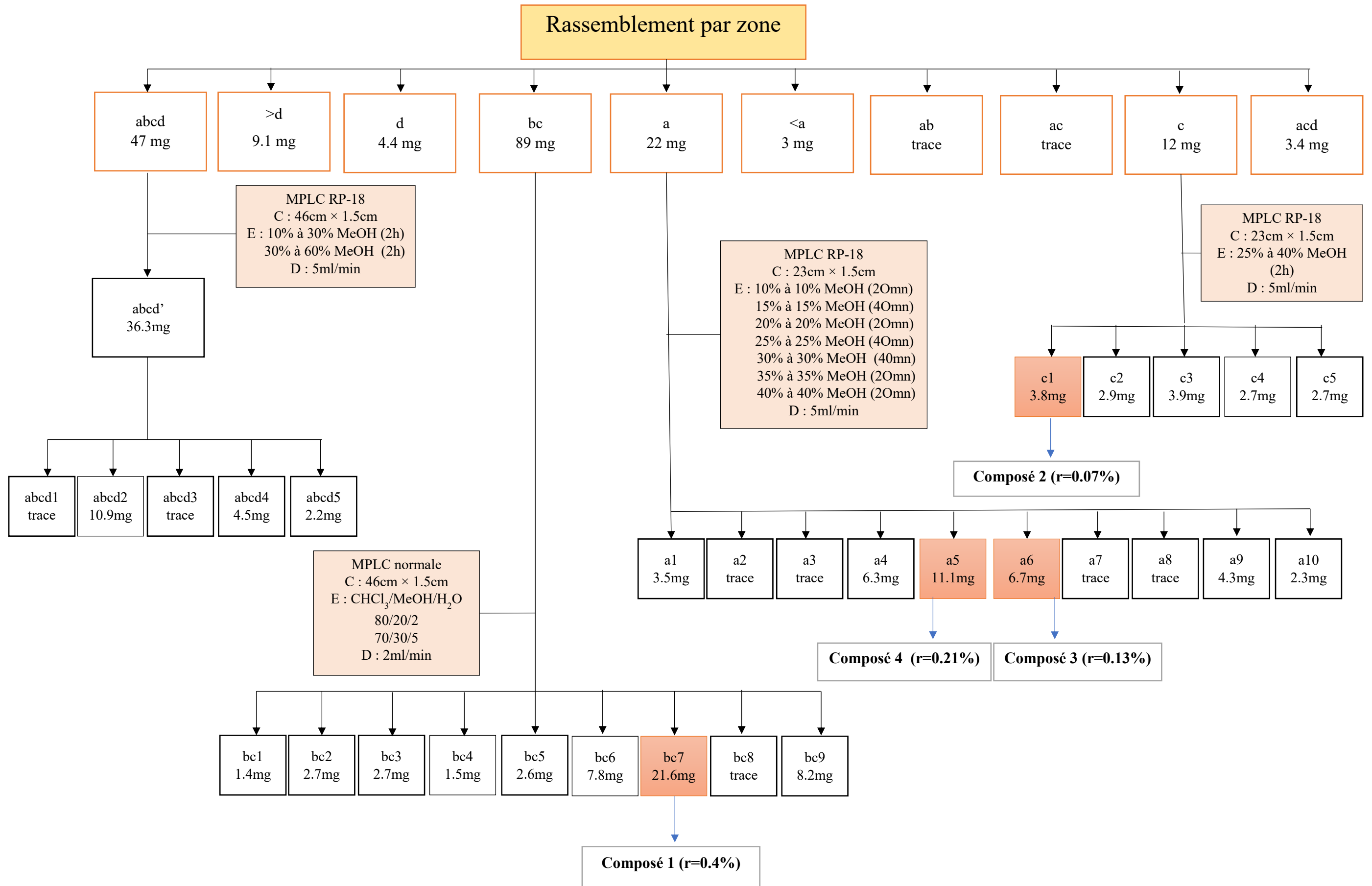


Figure 30: Etapes de purification des fractions réparties par zone jusqu'à obtention des composés 1-4

2.1.2 Détermination structurale des composés 1-4

2.1.2.1 Détermination structurale du composé 1

2.1.2.1.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **1** par électrospray en mode négatif (ESI^-) et positif (ESI^+), montre, respectivement, un pic quasi-moléculaire à m/z 741 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ et m/z 765 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Fig. 31). Ceci suggère un poids moléculaire de 742 en accord avec la formule brute $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_{18}$.

Deux ion-fragments sont observés à m/z 487 (ESI^-) et m/z 511 (ESI^+), suggérant l'élimination d'un hexose et d'un noyau aromatique correspondant à un benzène (Fig. 31).

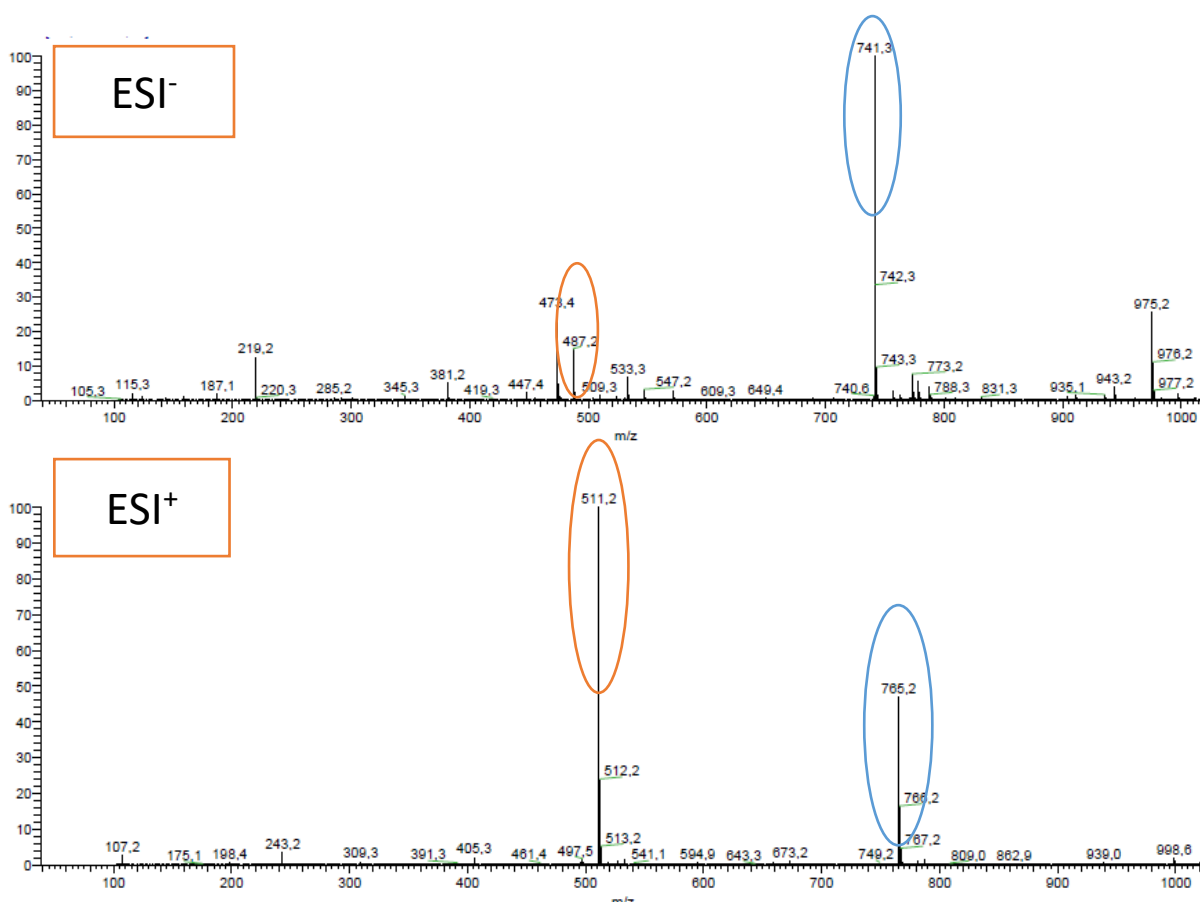


Figure 31: Spectre de masse du composé 1

2.1.2.1.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

A première vue, les spectres du RMN ^{13}C montrent majoritairement 4 zones distinctes au niveau des déplacements chimiques correspondantes aux fonctions ester, aux aromatiques, aux sucres avec leurs anomères, et aux méthyles (Fig. 32).

A partir de ces observations, on peut déjà affirmer qu'il ne s'agit pas d'une saponine, étant donné qu'à l'exception des carbones des groupements méthyle, le spectre ne présente pratiquement aucun signal entre 0 et 60 ppm qui pourrait évoquer les CH_2 et CH de la génine stéroïdique.

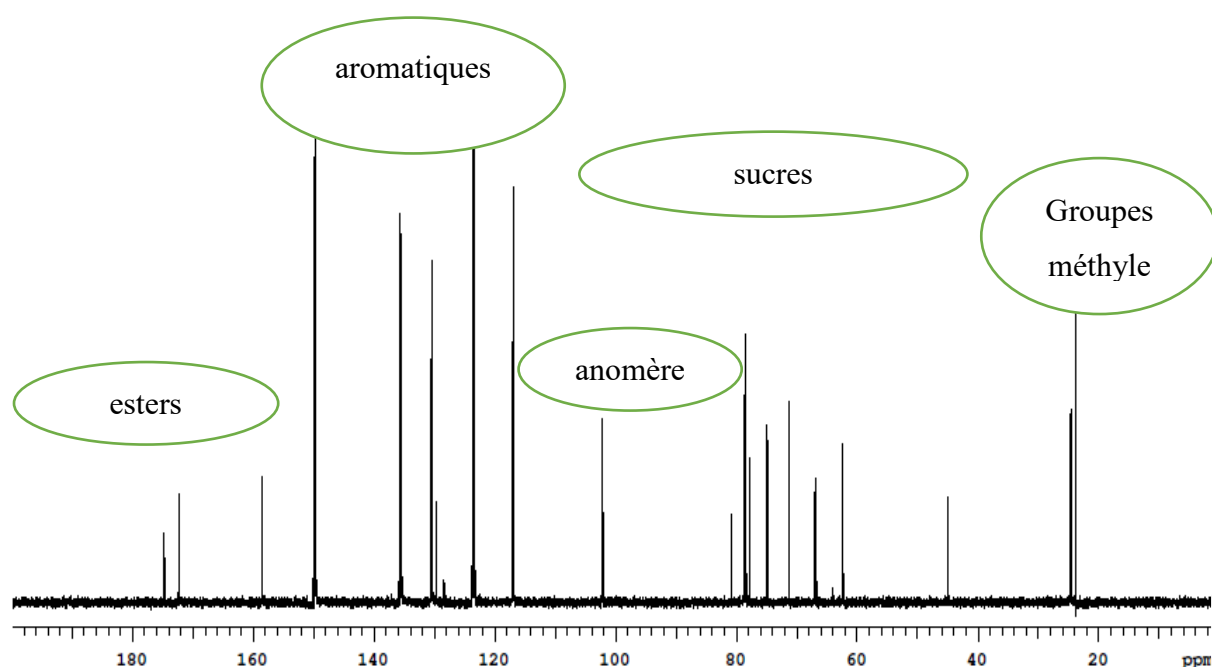


Figure 32: Spectre de RMN ^{13}C du composé 1

L'analyse des spectres de RMN ^{13}C enregistrés en mode DEPT suggère que la molécule possède deux groupements méthyle CH_3 ($\delta_{\text{C}} 23.7$, $\delta_{\text{C}} 24.5$), cinq méthylènes CH_2 ($\delta_{\text{C}} 44.8$, $\delta_{\text{C}} 62.3$ (x2), $\delta_{\text{C}} 66.7$, $\delta_{\text{C}} 67.0$) et deux esters ($\delta_{\text{C}} 174.6$, $\delta_{\text{C}} 172.3$). Quant aux carbones tertiaires, nous avons observé deux CH ($\delta_{\text{C}} 77.7$, $\delta_{\text{C}} 24.5$), deux ensembles de quatre méthines aromatiques ($\delta_{\text{C}} 130.5$ et $\delta_{\text{C}} 116.9$; $\delta_{\text{C}} 130.4$ et $\delta_{\text{C}} 117.0$) et les méthines des sucres donc deux anomères à $\delta_{\text{C}} 102.1$.

Si on regarde plus précisément le spectre HSQC, on remarque que les signaux des H et C sont dédoublés dans une zone de déplacement chimique correspondant à un sucre, et à un cycle aromatique substitué en para (Fig. 33). Ce dédoublement se rencontre très souvent dans des

molécules symétriques. L'attribution complète de chaque proton glycosidique des deux sucres symétriques a été réalisée grâce aux spectres COSY, TOCSY et NOESY en commençant par les protons anomériques, à δ_H 5.56 et 5.59, qui d'après le spectre HSQC corrélient avec deux carbones à δ_C 102.11 et 102.12. En comparant les déplacements chimiques des protons et carbones avec les valeurs de la littérature, les sucres ont été identifiés comme étant deux β -D-glucopyranosyles. D'après le spectre HMBC qui montre les corrélations à δ_H 5.59 / δ_C 158.6 et à δ_H 5.56 / δ_C 158,5, nous pouvons conclure qu'ils sont reliés chacun à un carbone quaternaire aromatique par leurs anomères. Deux unités symétriques de *p*-O- β -D-glucopyranosylbenzyl forment donc cette molécule.

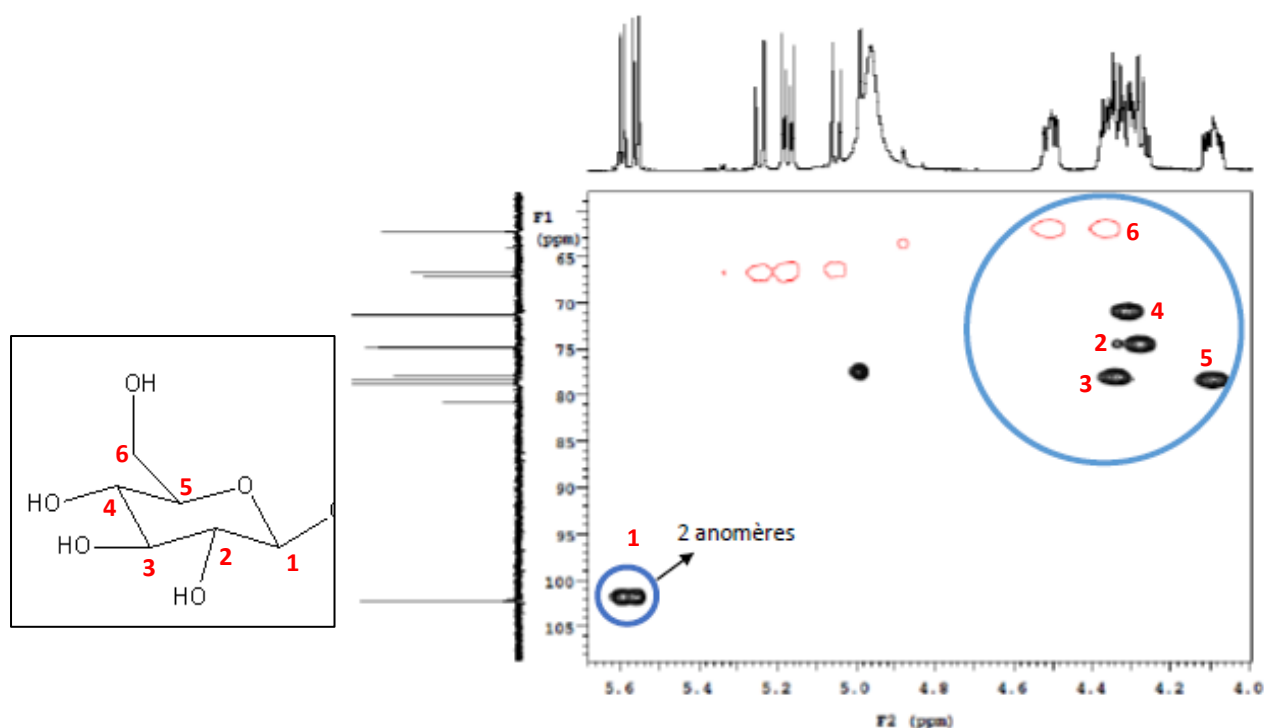


Figure 33: Spectre HSQC du composé **1**

Les données du spectre COSY ont également montré que les deux groupements méthyle (δ_H 1.04 et δ_H 0.93) couplent avec un méthine à δ_H 2.08 et un méthylène à δ_H 2.12/2.47 qui est également en corrélation avec ce même méthine. Nous sommes donc en présence d'un groupement isobutyle (Fig. 34).

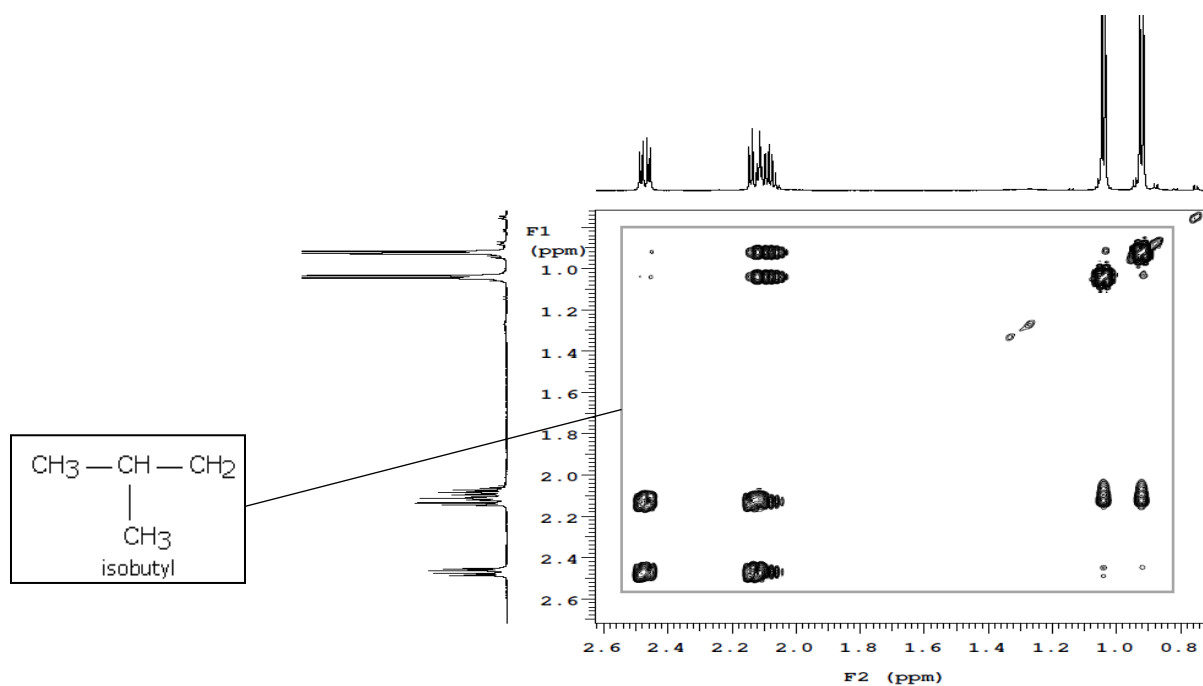


Figure 34: Spectre de COSY du composé **1**

En HMBC, les deux méthylènes à δ_H 5.18/ 5.24 et δ_H 5.05/ 5.17 corrélient avec les deux fonctions esters à δ_C 174.7 et δ_C 172.4, respectivement, et avec deux carbones des deux noyaux aromatiques en position 10 et 15 à δ_C 129.6 et δ_C 129.64 (Fig. 35).

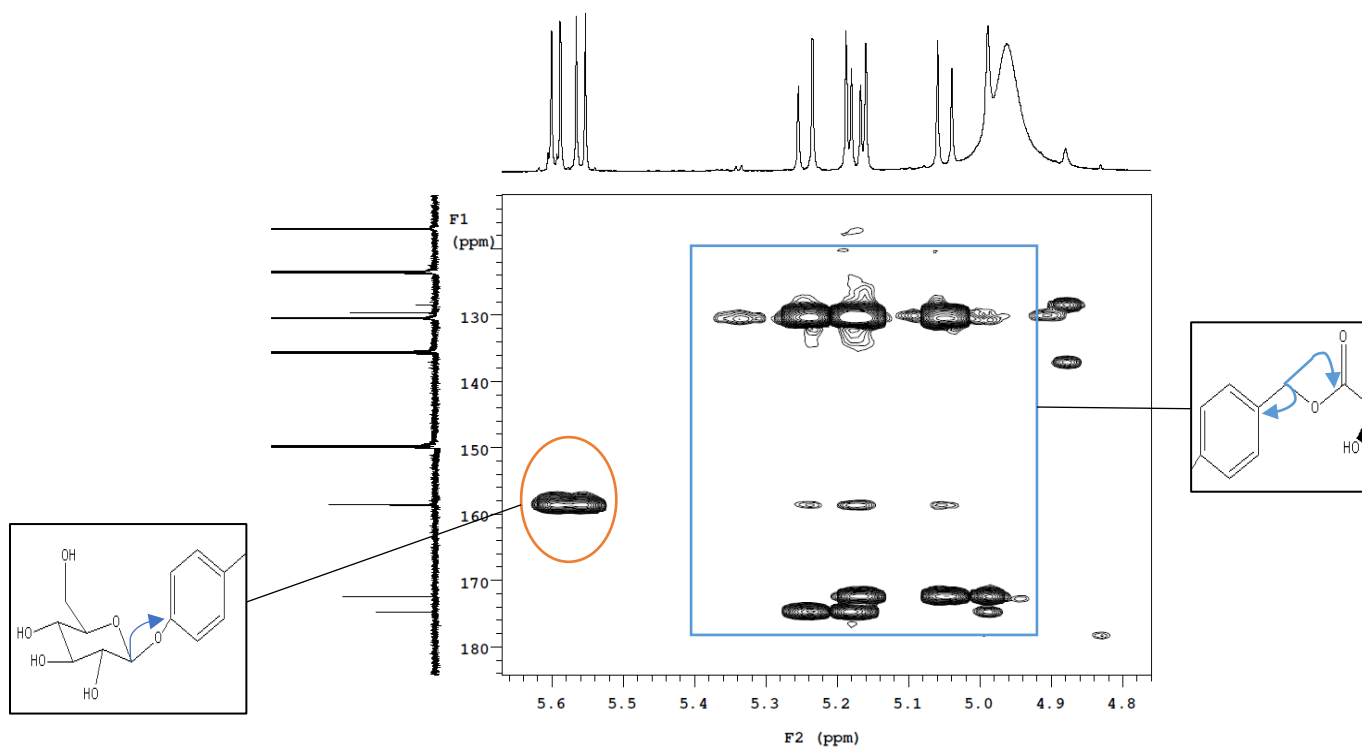


Figure 35: Spectre HMBC du composé **1**

En analysant toutes les corrélations observées, nous pouvons donc conclure que la structure de **1** est élucidée comme étant le (2*R*,3*S*)-1-[*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl]-4-[*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl]-2-isobutyltartrate, composé connu sous le nom de loroglossine (Fig. 36, Tab. 1).

Tableau 1: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ¹H et ¹³C dans la pyridine-*d*₅) du composé **1**

| | δC (ppm) | δH (ppm), J (Hz) | | δC (ppm) | δH (ppm), J (Hz) |
|--------|----------|--|---------|----------|------------------------------|
| 1 | 174.6 | - | Glc-1' | 102.1 | 5.59 <i>d</i> (7.5) |
| 2 | 80.8 | - | 2' | 74.8 | 4.28 <i>m</i> |
| 3 | 77.7 | 4.99 <i>s</i> | 3' | 78.3 | 4.34 <i>m</i> |
| 4 | 172.3 | - | 4' | 71.2 | 4.30 <i>m</i> |
| 5 | 44.8 | 2.12 <i>dd</i> (14.5,7)/2.47 <i>dd</i> (14.5,5) | 5' | 78.7 | 4.10 <i>m</i> |
| 6 | 24.5 | 2.08 <i>m</i> | 6' | 62.3 | 4.36 <i>m</i> /4.51 <i>m</i> |
| 7 | 23.7 | 0.93 <i>d</i> (6.5) | Glc-1'' | 102.1 | 5.56 <i>d</i> (7.5) |
| 8 | 24.5 | 1.04 <i>d</i> (6.5) | 2'' | 74.8 | 4.27 <i>m</i> |
| 9 | 67.0 | 5.18 <i>d</i> (12)/5.24 <i>d</i> (12) | 3'' | 78.3 | 4.34 <i>m</i> |
| 10 | 129.6 | - | 4'' | 71.2 | 4.28 <i>m</i> |
| 11,11' | 130.5 | 7.33 <i>d</i> (9) | 5'' | 78.7 | 4.08 <i>m</i> |
| 12,12' | 116.8 | 7.30 <i>d</i> (9) | 6'' | 62.3 | 4.36 <i>m</i> /4.49 <i>m</i> |
| 13 | 158.6 | - | | | |
| 14 | 66.7 | 5.06 <i>d</i> (12)/5.17 <i>d</i> (12) | | | |
| 15 | 129.6 | - | | | |
| 16,16' | 130.4 | 7.39 <i>d</i> (8.5) | | | |
| 17,17' | 117.0 | 7.36 <i>d</i> (8.5) | | | |
| 18 | 158.5 | - | | | |

2.1.2.2 Détermination structurale des composés 2-4

2.1.2.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **2** par electrospray en mode négatif (ESI⁻) et positif (ESI⁺), montre, respectivement, un pic quasi-moléculaire à m/z 887 [M - H]⁻ et m/z 911 [M + Na]⁺. Ceci suggère un poids moléculaire de 888 en accord avec la formule brute C₄₀H₅₆O₂₂.

Quant au composé **3**, son spectre de masse montre respectivement en mode négatif et positif un pic quasi-moléculaire à m/z 903 [M - H]⁻ et m/z 927 [M + Na]⁺, indiquant une masse moléculaire de 904 en accord avec la formule brute C₄₀H₅₆O₂₃.

Pour le composé **4**, les ions quasi-moléculaires obtenus en ESIMS mode négatif et positif sont observés respectivement à m/z 285 [M - H]⁻ et m/z 309 [M + Na]⁺, ce qui indique une masse moléculaire de 286 en accord avec la formule brute C₁₃H₁₈O₇.

2.1.2.2.2 Résonance Magnétique Nucléaire

Les données RMN ¹H et ¹³C du composé **2** sont presque superposables à celles de **1** à l'exception d'un glucose en plus en position 2 et un hydroxyle de moins en 3.

En effet, la fonction alcoolique en position en 3 à δ_H 4.99 / δ_C 77.7 dans **1** est remplacée par un signal méthylénique à δ_H 3.27, 3.46 / δ_C 42.8 dans **2**. L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D ainsi que la valeur de la constante de couplage de l'anomère du composé **2** ont permis l'identification de trois β -D-glucopyranosyles. L'analyse des spectres HMBC et NOESY a montré que cette troisième unité de glucose est reliée à la molécule en position 2.

Les données RMN ¹H et ¹³C du composés **3** sont presque superposables à celles de **2** à l'exception d'un hydroxyle de moins en position 3 où le signal méthylénique à δ_H 3.27, 3.46 / δ_C 42.8 dans **2** est remplacé par une fonction alcoolique à δ_H 5.01 / δ_C 76.0 dans **3**.

Quant à l'analyse des spectres RMN du composé **4**, des signaux communs aux composés **1-3** ont été observés et cette molécule a été identifiée comme étant le 4-(hydroxyméthyl)-phényl-1-O- β -D-glucopyranoside.

Les structures des composés **2-4** ont donc été identifiées comme étant : (2*R*)-1-(*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl)-2-*O*-β-D-glucopyranosyl-4-[*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl]-2-isobutylmalate connu sous le nom de dactylorhine A (**2**), (2*R*,3*S*)-1-(*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl)-2-*O*-β-D-glucopyranosyl-4-[*p*-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl]-2-isobutyltartrate ou dactylorhine B (**3**) et (4-(hydroxyméthyl)-phényl-1-*O*-β-D-glucopyranoside ou gastrodine (**4**) (Fig. 36).

2.1.3 Conclusion :

D'un point de vue chimiotaxonomique, les espèces de *Chlorophytum* sont principalement riches en saponines stéroïdiques. Des études antérieures ont permis d'isoler des saponines de type furostane et spirostane comme les borivilianosides A-H de *C. borivilianum* (Acharya et coll., 2008, 2009), orchidastrosides A-F de *C. orchidastrum* (Acharya et coll., 2010), ou chlorodeistélianosides A-D de *C. deistelianum* (Tabopda et coll., 2016). Mais cette fois-ci, ce type de saponines stéroïdiques n'ont pas été trouvées dans les racines de *C. blepharophyllum*, mais par contre, des glycosides phénoliques ont été isolés et identifiés comme la loroglossine (Huang et coll., 2002, 2004; Han et coll., 2015), la dactylorhin A (Huang et coll., 2002, 2004; Han et coll., 2015), la dactylorhin B (Huang et coll., 2002, 2004) et la gastrodine (Huang et coll., 2002, 2004; Han et coll. 2015). Ces molécules, et d'autres glycosides phénoliques proches, ont déjà été décrites dans des études phytochimiques de plantes de la famille des Orchidaceae telles que *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* (Huang et coll., 2002, 2004), *Pleione bulbocodioides* (Han et coll., 2015) et *Gymnadenia conopsea* (Zi et coll., 2008). Chez une espèce du genre *Habenaria*, *H. petalodes*, une voie biogénétique de ces molécules a été proposée, basée sur la gastrodine et l'habenariol (Cota et coll., 2008), un précurseur déjà isolé de *H. repens* (Wilson et coll., 1999). Le fait que la famille des Asparagaceae appartienne au même ordre que les Orchidaceae, les Asparagales, selon la classification phylogénétique APG III (APG III), pourrait expliquer la présence de ces métabolites dans cette espèce de *Chlorophytum*.

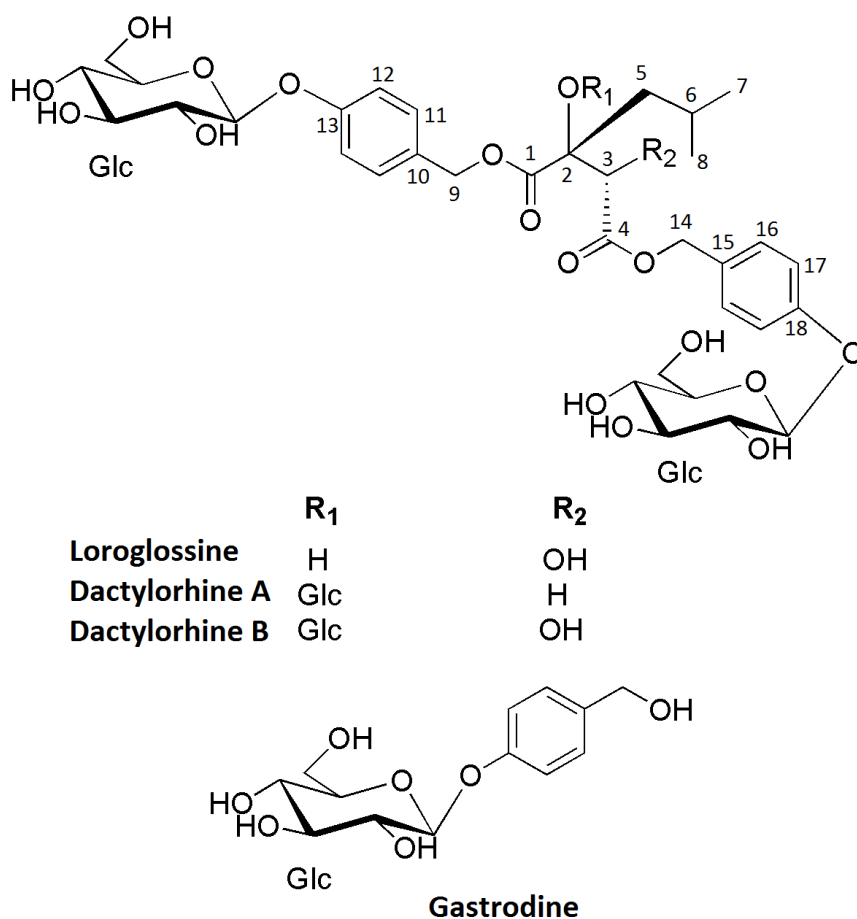


Figure 36: Structures des composés 1-4

Après avoir détaillé dans ce sous-chapitre les étapes de purification et de détermination structurale des métabolites secondaires extraits du *Chlorophytum blepharophyllum*, nous allons présenter dans le sous-chapitre suivant l'étude phytochimique de *Weigela* × « *kosteriana variegata* ».

2.2 Etude phytochimique de *Weigela* × « *kosteriana variegata* »

L'étude phytochimique de *Weigela* × « *kosteriana variegata* » a permis l'isolement par diverses techniques chromatographiques de quatre composés (**5-8**), dont un de structure nouvelle (**5**) et trois autres de structures connues (**6-8**). Les étapes d'extraction et de purification sont présentées dans les figures 37 et 38 et sont suivies de la détermination structurale du composé nouveau.

2.2.1 Extraction et isolement des composés 5-8

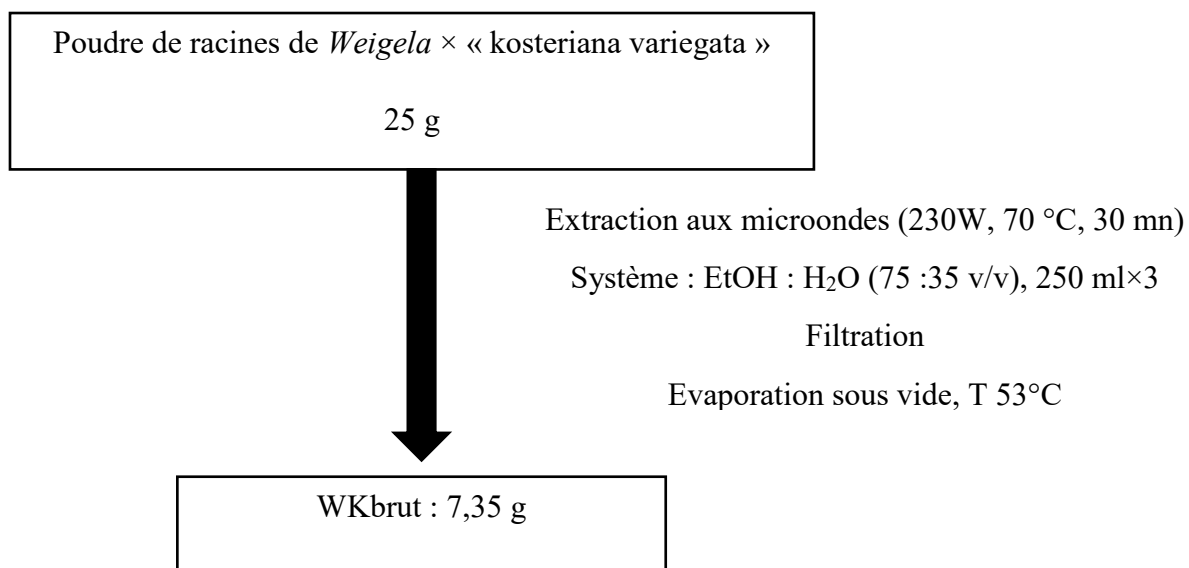


Figure 37: Schéma d'extraction des saponines de *Weigela* × « *kosteriana variegata* »

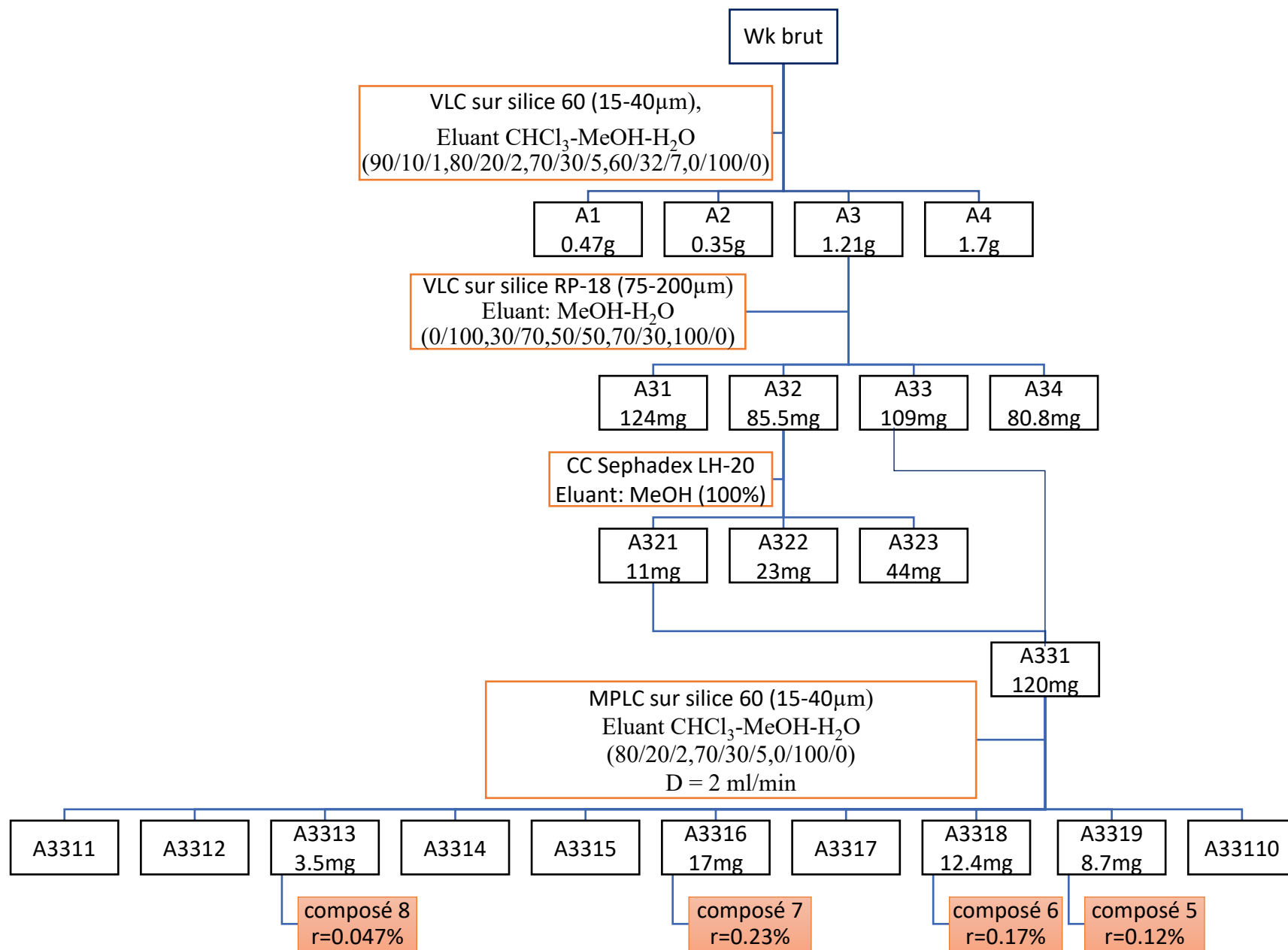


Figure 38: Schéma de purification des composés 5-8

Quatre composés ont été ainsi isolés. La pureté de ces derniers a été ensuite vérifiée par HPTLC (Fig. 39).

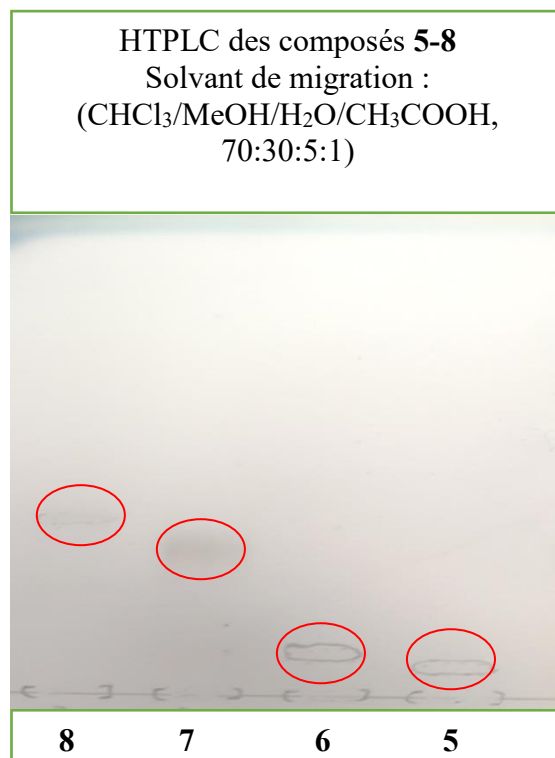


Figure 39: HTPLC des composés **5-8**

2.2.2 Détermination structurale du composé 5

2.2.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse HRESIMS en mode positif du composé 5 a permis d'établir sa formule moléculaire $C_{62}H_{100}O_{28}Na$. Le spectre ESIMS en mode négatif (ESI⁻) montre un pic quasi-moléculaire à m/z 1291 $[M - H]^-$ (Fig. 40), suggérant un poids moléculaire de 1292.

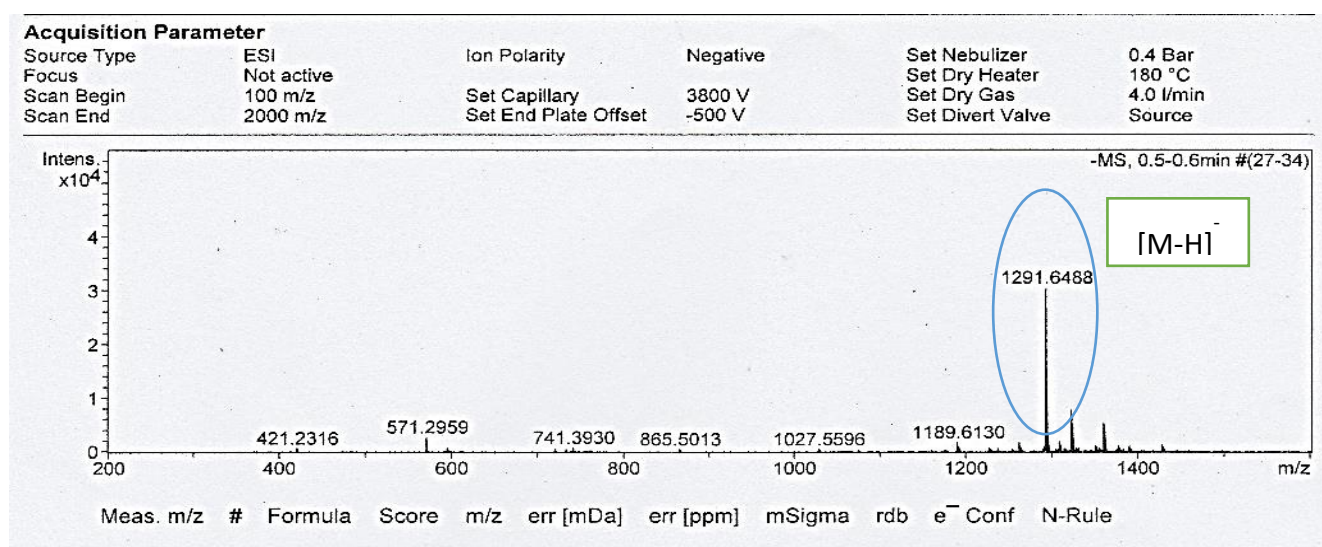


Figure 40: Spectre de masse du composé 5

2.2.2.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

D'un point de vue général, le spectre HSQC du composé 5 montre 3 zones distinctes au niveau des déplacements chimiques, qui correspondent aux signaux de l'aglycone, des sucres et de leurs anomères (Fig. 41).

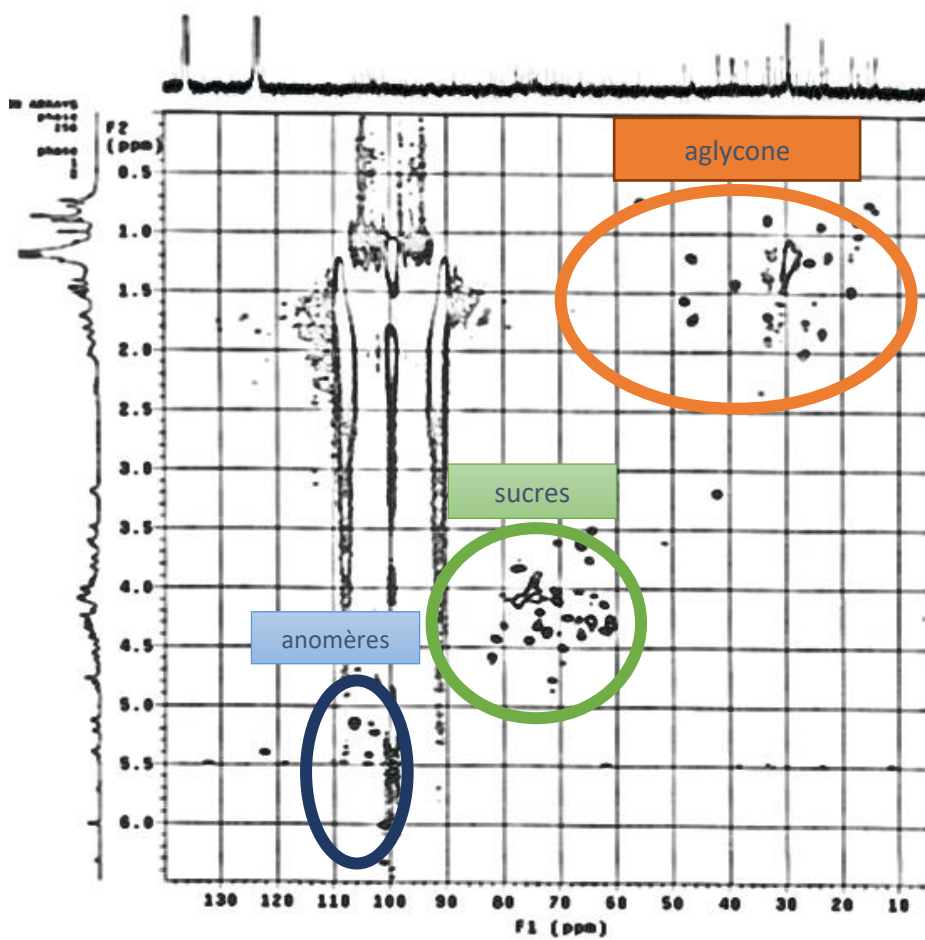


Figure 41: Spectre HSQC du composé 5

2.2.2.2.1 Nature de l'aglycone

L'identification de l'aglycone du composé 5 a été réalisée grâce aux informations fournies par l'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C , couplées aux corrélations observées dans les spectres HSQC et HMBC (Tab. 2).

L'analyse du spectre RMN ^1H montre la présence de :

- 7 méthyles angulaires à δ_{H} 0.75, 0.86, 0.87, 0.92, 1.02, 1.22 et 1.24 ppm (3H chacun, sous forme de singulet) caractéristiques d'une structure triterpénique (Fig. 42).
- 1 proton oléfinique résonnant à δ_{H} 5.39 ppm correspondant au proton H-12.

Le spectre RMN ^{13}C enregistré en mode DEPT, nous a permis de distinguer :

- 5 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH_2), 7 groupements méthyles (CH_3), et par déduction 8 carbones quaternaires (C).

- 2 signaux à δ_C 122.1 et 144.5 ppm correspondant aux carbones de la double liaison Δ^{12}

Le spectre HMBC a permis de visualiser les couplages $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ à partir des protons des méthyles de l'aglycone (CH_3 23, 24, 25, 26, 27, 29 et 30) afin d'attribuer les déplacements chimiques des carbones et protons de cet aglycone. En comparant les données obtenues avec celles de la littérature, celui-ci a été identifié comme étant l'acide oléanolique (Rezgui et coll., 2016).

Le déblindage du carbone C-28 à δ_C 179.8 ppm suggère la présence d'une fonction carbonyle d'un acide carboxylique. Le signal du carbone C-3 déblindé à δ_C 88.5 ppm par rapport au signal de la génine libre (≈ 75 ppm) est caractéristique d'une liaison *O*-hétérosidique. Le composé **5** est donc une saponine monodesmosidique.

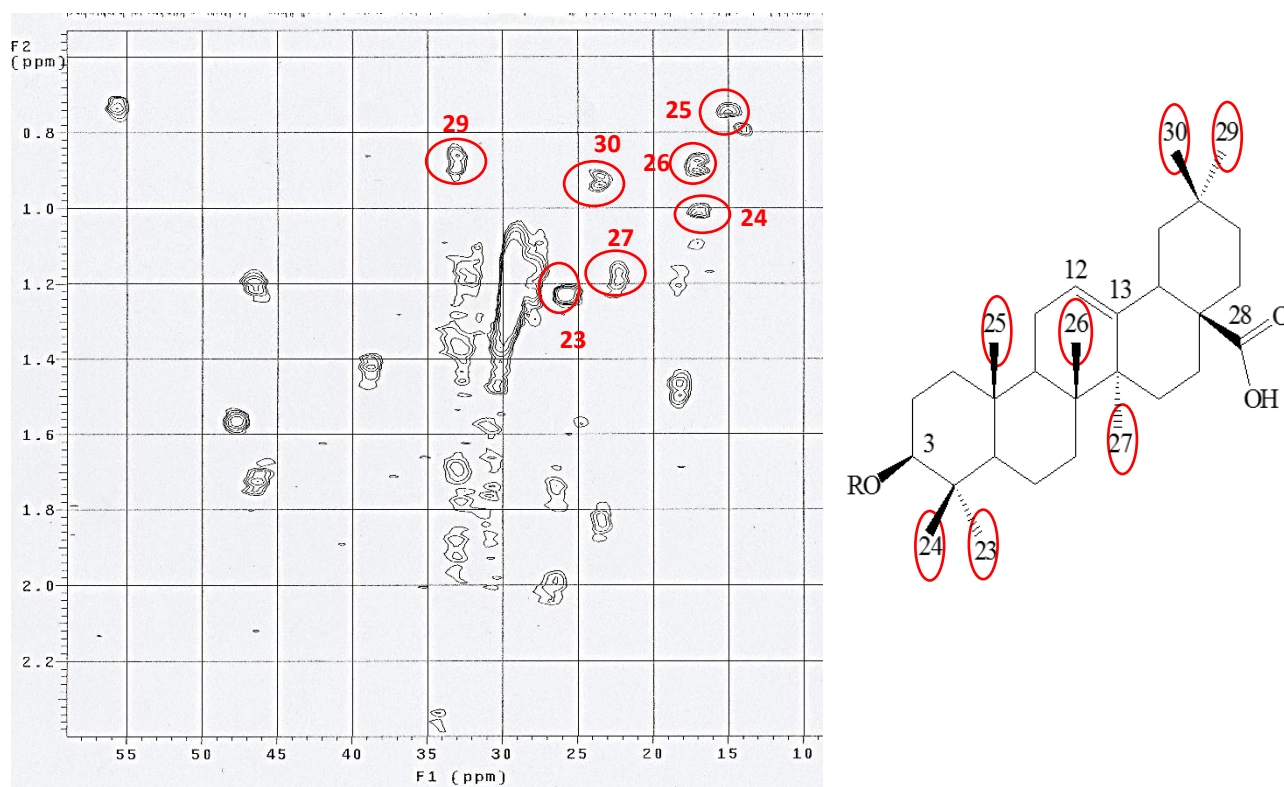


Figure 43: Spectre HSQC du composé **5** montrant les méthyles angulaires

2.2.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et la liaison avec l'aglycone

Le spectre RMN ^1H montre les signaux de 6 protons anomériques à δ_{H} 4.77 (d, $J = 6.0$ Hz), 4.81 (d, $J = 7.9$ Hz), 5.13 (d, $J = 7.4$ Hz), 5.22 (d, $J = 6.7$ Hz), 5.41 (d, $J = 8.2$ Hz), 6.01 (br s), qui corrélient sur le spectre HSQC avec 6 carbones à δ_{C} 104.6, 102.4, 106.1, 102.9, 103.7 et 101.0 ppm, respectivement.

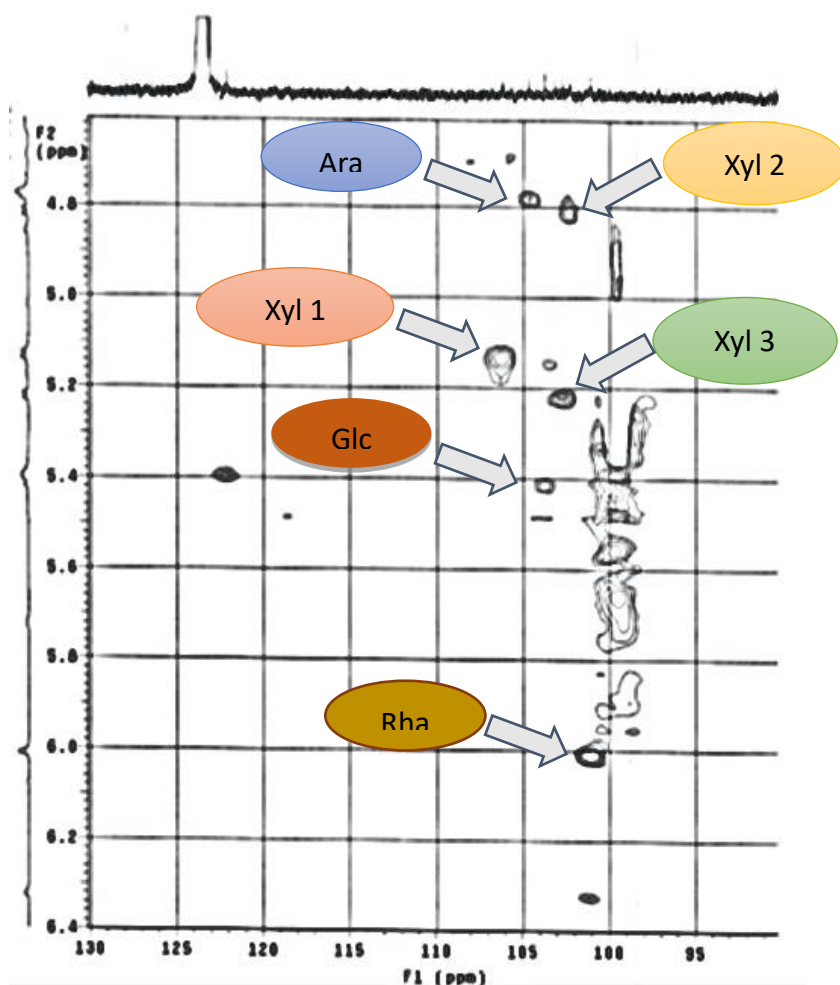


Figure 44: Spectre HSQC du composé 5 montrant les signaux des anomères

L'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D, principalement la TOCSY, la valeur de la constante de couplage de l'anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux des sucres, ont permis l'identification de 6 oses sous leur forme pyranosyle (Fig. 43):

- 1 α -L-arabinopyranosyle Ara-1 à δ_{H} 4.77 (d, $J = 6.0$ Hz),

- 3 β -D-xylopyranosyles Xyl I-1 à δ_H 5.13 (d, $J = 7.4$ Hz), Xyl II-1 à δ_H 4.81 (d, $J = 7.9$ Hz), Xyl III-1 à δ_H 5.22 (d, $J = 6.7$ Hz),
- 1 β -D-glucopyranosyle Glc-1 à δ_H 5.41 (d, $J = 8.2$ Hz)
- 1 α -L-rhamnopyranosyle Rha-1 à δ_H 6.01 (br s).

La séquence de l'oligosaccharide a été établie grâce à l'analyse des spectres HMBC et NOESY:

- La corrélation HMBC entre le proton à δ_H 4.77 (Ara-1) et le carbone à δ_C 88.5 (C-3) suggère que l'Ara est fixé en position 3 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 4.77 (Ara-1) et 3.21 (H-3) (Fig. 44).
- Les corrélations HMBC à δ_H 4.44 (Ara-2) / δ_C 101.0 (Rha-1) et NOESY à δ_H 4.44 (Ara-2) / δ_H 6.01 (Rha-1) prouvent que Rha est lié à Ara par une liaison (1 \rightarrow 2)
- Les corrélations HMBC à δ_H 5.13 (Xyl I-1) / δ_C 81.9 (Rha-3) et NOESY à δ_H 5.13 (Xyl I-1) / δ_H 4.57 (Rha-3) prouvent que Xyl I est lié au Rha par une liaison (1 \rightarrow 3).
- Les corrélations HMBC à δ_H 4.81 (Xyl II-1) / δ_C 77.4 (Xyl I-4) et NOESY à δ_H 4.81 (Xyl II-1) / δ_H 4.12 (Xyl I-4) suggèrent que Xyl II est lié au Xyl I par une liaison (1 \rightarrow 4).
- Les corrélations HMBC à δ_H 4.42 (Xyl II-3) / δ_C 103.7 (Glc-1) et NOESY à δ_H 5.22 (Xyl III-1) / δ_H 4.32 (Xyl II-4) prouvent que le Glc est lié au Xyl II par une liaison (1 \rightarrow 3) et le Xyl III est lié au Xyl II par une liaison (1 \rightarrow 4).

La séquence de l'hexasaccharide fixé sur la génine en C-3 est donc la suivante : β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl.

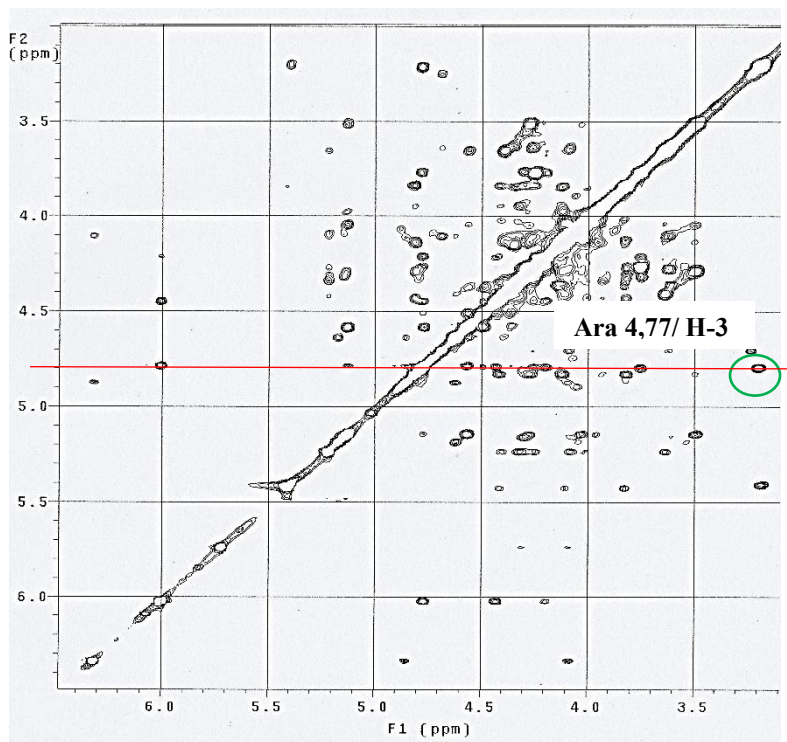


Figure 45: Spectre NOESY du composé **5** montrant le point de liaison des sucres avec la génine

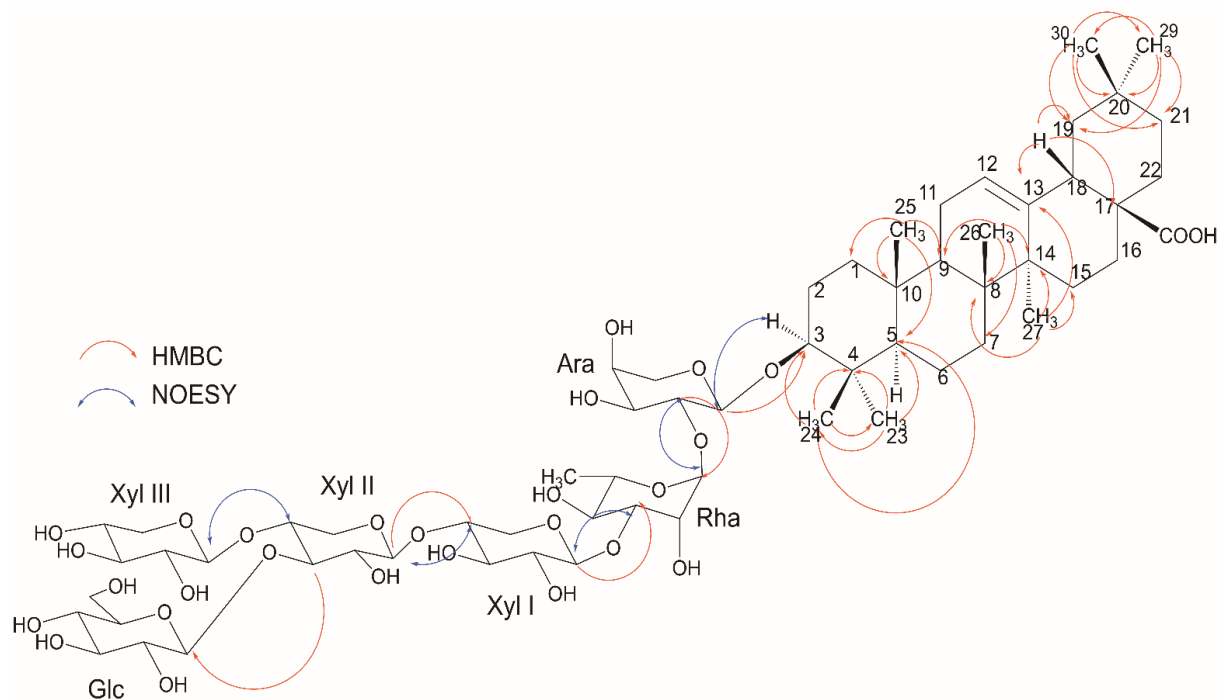


Figure 46: Structure du composé **5** avec les différentes corrélations HMBC et NOESY observées

Tableau 2: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ¹H et ¹³C dans la pyridine-*d*₅) du composé **5**

| Position | δ_C | δ_H (J en Hz) | Position | δ_C | δ_H (J en Hz) |
|----------|------------|----------------------------|-----------|------------|---------------------------|
| 1 | 38.6 | 0.86 m, 1.42 m | Ara-1 | 104.6 | 4.77 d (6.0) |
| 2 | 26.2 | 1.74 m, 1.99 m | 2 | 75.4 | 4.44 dd (6.4, 6.0) |
| 3 | 88.5 | 3.21 dd (11.6, 3.1) | 3 | 73.5 | 4.20 dd (6.4, 1.2) |
| 4 | 39.4 | - | 4 | 68.5 | 4.25 m |
| 5 | 55.6 | 0.74 | 5 | 64.6 | 3.76 dd (11.7, 1.9), 4.26 |
| 6 | 18.2 | 1.20, 1.48 m | Rha-1 | 101.0 | 6.01 br s |
| 7 | 32.5 | 1.18 m, 1.36 m | 2 | 71.1 | 4.78 br s |
| 8 | 39.2 | - | 3 | 81.9 | 4.57 dd (8.6, 2.0) |
| 9 | 47.7 | 1.56 dd (14.1, 7.8) | 4 | 72.1 | 4.38 |
| 10 | 36.7 | - | 5 | 69.2 | 4.49 dq (8.8, 6.0) |
| 11 | 23.4 | 1.81 m, 1.89 | 6 | 18.1 | 1.48 d (6.0) |
| 12 | 122.1 | 5.39 br t (3.0) | Xyl I-1 | 106.1 | 5.13 d (7.4) |
| 13 | 144.5 | - | 2 | 74.8 | 3.97 dd (7.8, 7.4) |
| 14 | 41.6 | - | 3 | 75.5 | 4.05 |
| 15 | 27.8 | 1.10 m, 2.10 m | 4 | 77.4 | 4.12 m |
| 16 | 23.4 | 1.89, 2.04 m | 5 | 64.1 | 3.49 t (11.1), 4.28 |
| 17 | 46.4 | - | Xyl II-1 | 102.4 | 4.81 d (7.9) |
| 18 | 41.8 | 3.19 | 2 | 74.3 | 3.94 dd (8.6, 7.9) |
| 19 | 46.2 | 1.20, 1.73 dd (14.2, 13.3) | 3 | 81.2 | 4.42 dd (9.1, 8.6) |
| 20 | 30.6 | - | 4 | 73.9 | 4.32 m |
| 21 | 33.8 | 1.12 m, 1.39 m | 5 | 66.2 | 3.65 t (11.0), 4.41 |
| 22 | 33.0 | 1.69 m, 1.89 | Xyl III-1 | 102.9 | 5.22 d (6.7) |
| 23 | 27.8 | 1.24 (s) | 2 | 74.5 | 4.03 |
| 24 | 16.7 | 1.02 (s) | 3 | 76.9 | 4.08 |
| 25 | 15.2 | 0.75 (s) | 4 | 70.5 | 4.09 |
| 26 | 17.1 | 0.87 (s) | 5 | 66.1 | 3.63 t (11.1), 4.35 |
| 27 | 25.8 | 1.22 (s) | Glc-1 | 103.7 | 5.41 d (8.2) |
| 28 | 179.8 | - | 2 | 75.2 | 4.02 |
| 29 | 32.9 | 0.86 (s) | 3 | 77.2 | 4.10 |
| 30 | 23.4 | 0.92 (s) | 4 | 70.2 | 4.11 |
| | | | 5 | 77.3 | 3.83 m |
| | | | 6 | 62.0 | 4.14, 4.37 |

2.2.3 Conclusion

En prenant en compte les résultats de l'analyse spectrale (Fig. 45, Tab. 2), la structure de la saponine **5** a été établie comme étant de l'acide oléanolique 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (Fig. 46).

Les saponines connues (**6-8**) ont été identifiées par comparaison de leurs données spectrales avec des valeurs de la littérature comme étant de l'acide oléanolique 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-

(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranoside (6) et l'acide oléanolique 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside (7), précédemment isolés d'une autre espèce de *Weigela*, *Weigela stelzneri* (Rezgui et coll., 2016). Quant au composé 8, l'acide oléanolique 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside, il a déjà été isolé de *Kalopanax septemlobum* var. *typicum* (Panov et coll., 2006) (Fig. 46).

D'un point de vue chimiotaxonomique, les espèces de *Weigela* sont principalement riches en saponines composées de génines triterpéniques de type acide oléanolique et hédéragénine, selon des études antérieures sur *W. hortensis*, *W. stelzneri* et *W. florida* « rumba » (Rezgui et coll., 2016 ; Murayama et coll., 2003 ; Champy et coll., 2018). Il n'est donc pas étonnant de trouver ces composés (5-8) dans l'espèce *Weigela* × « *kosteriana variegata* ».

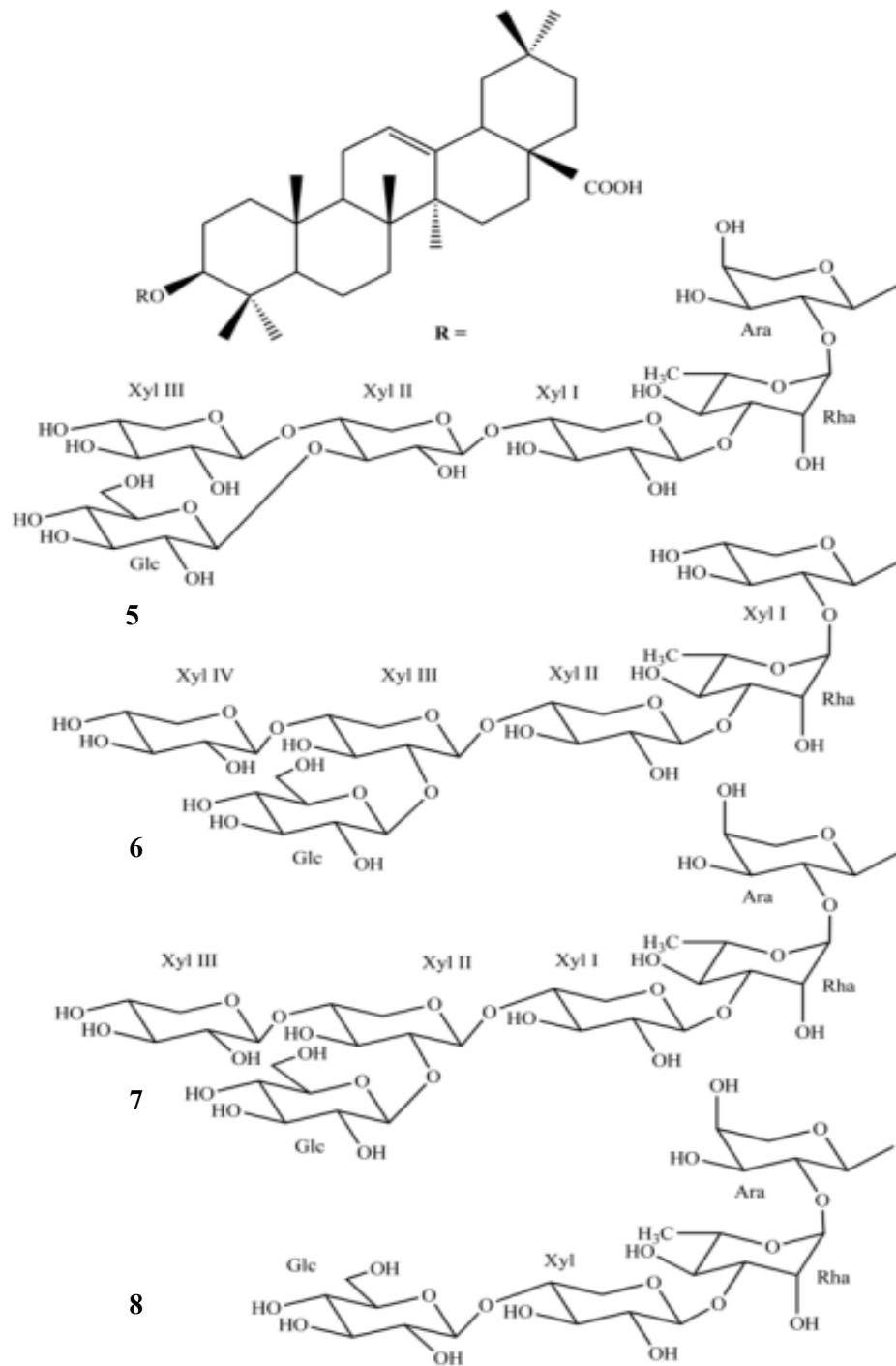


Figure 47: Structures des composés 5-8

Pour poursuivre l'étude phytochimique nous allons présenter dans le sous-chapitre suivant l'étude d'*Ornithogalum dubium*.

2.3 Etude phytochimique d'*Ornithogalum dubium*

2.3.1 Bulbes et racines

L'étude phytochimique des bulbes et racines d'*O. dubium* a permis l'isolement de cinq composés dont trois sont de structures nouvelles (**9-11**) et deux connues (**12,13**) en utilisant diverses techniques chromatographiques. Les étapes d'extraction et de purification sont présentées synthétiquement dans les figures 47-50 et sont suivies de la détermination structurale des composés nouveaux.

2.3.1.1 Extraction et isolement des composés 9-13

Selon les protocoles classiquement utilisés au laboratoire, le mélange éthanol-eau est souvent utilisé comme solvant d'extraction. Selon des critères bibliographiques, le méthanol semble être le solvant adapté pour l'extraction des saponines du genre *Ornithogalum*. (Kuroda et coll., 1999, 2001, 2002, 2004, 2006 ; Kubo et coll., 1992 ; Mimaki et coll., 1996, 1997 ; Iguchi et coll., 2017). Nous avons donc, dans un premier temps, utilisé le méthanol comme solvant d'extraction, mais étant donné que le rendement n'était pas optimal, nous avons opté par la suite pour des extractions avec le mélange éthanol-eau.

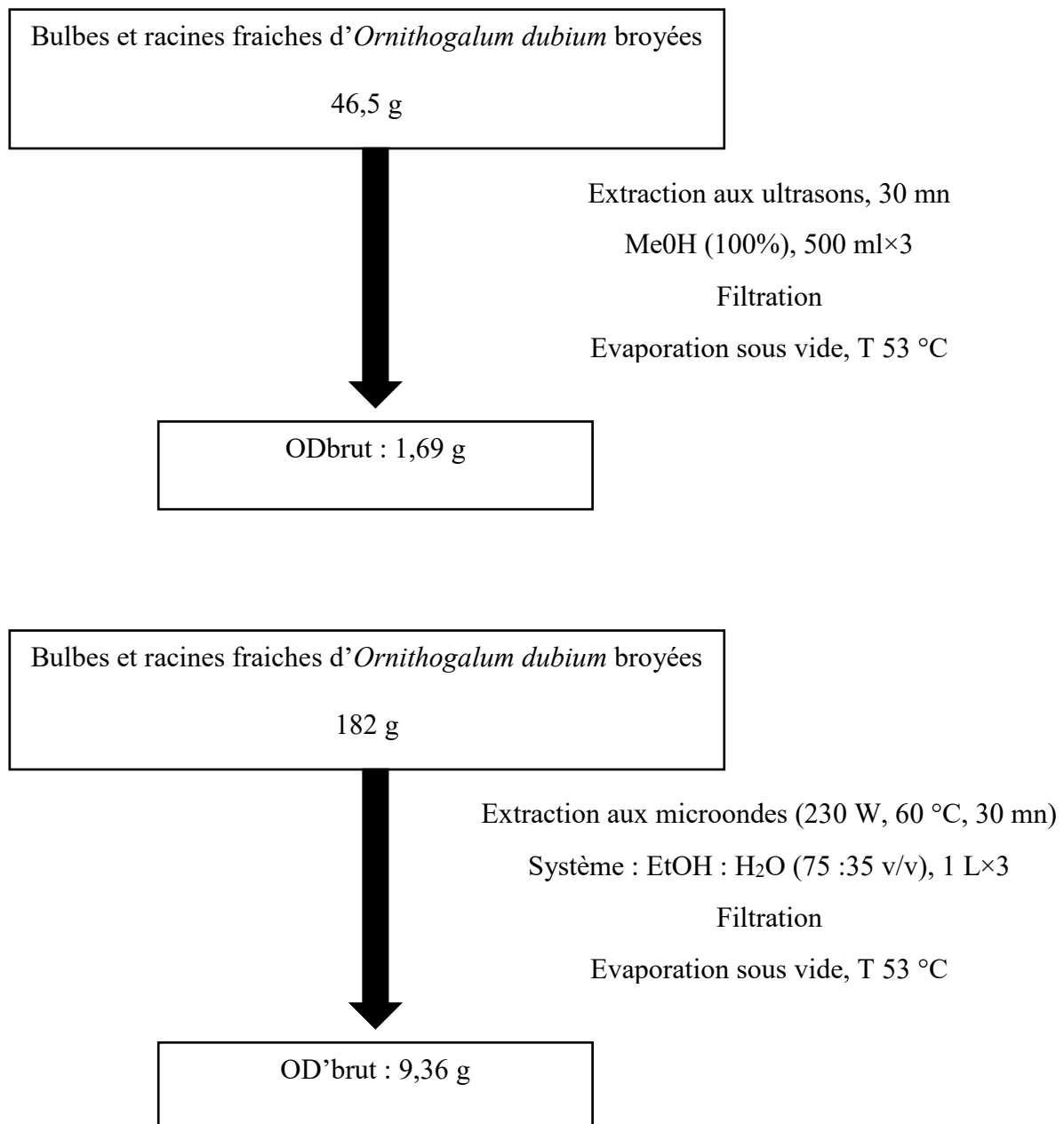


Figure 48: Etapes d'extraction des saponines des bulbes et racines d'*O. dubium*

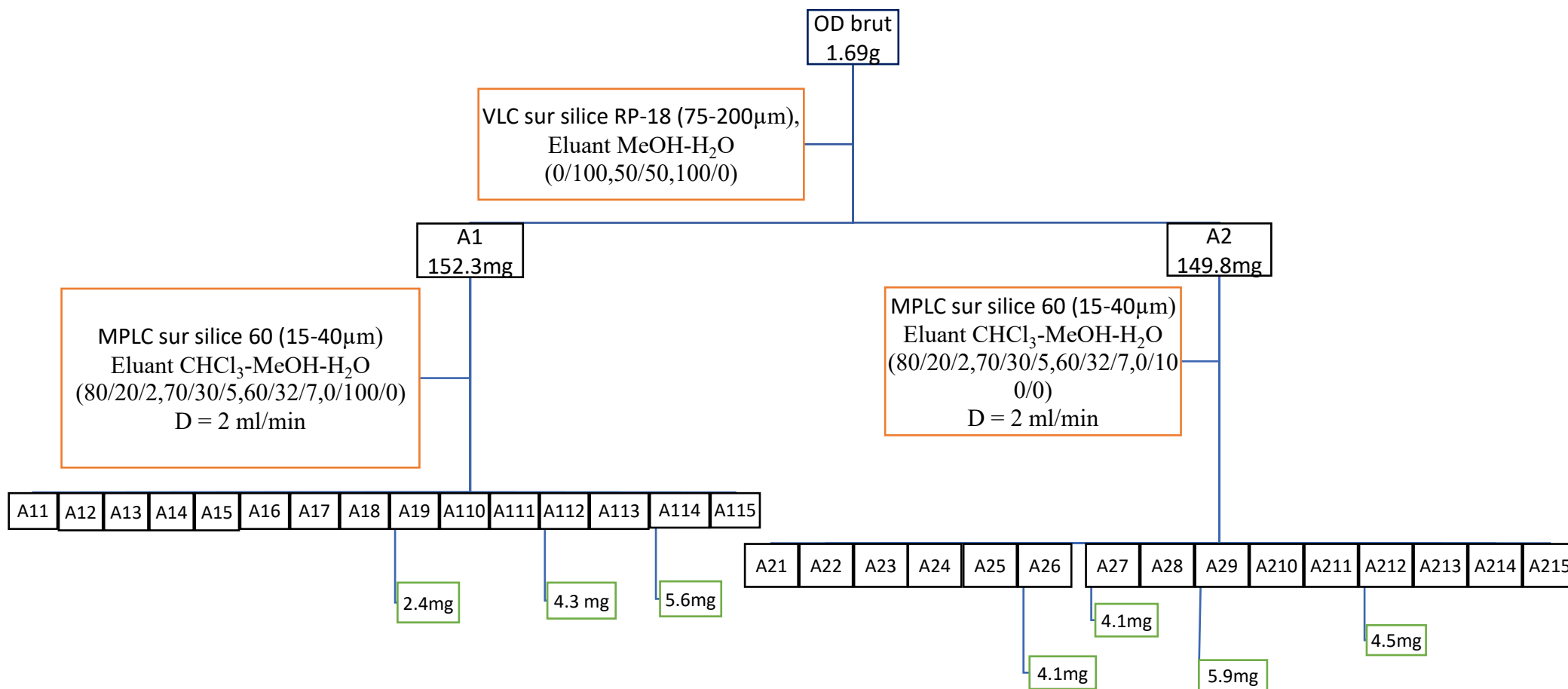


Figure 49: Etapes de purification à partir de 1,69 g d'extrait brut d'OD

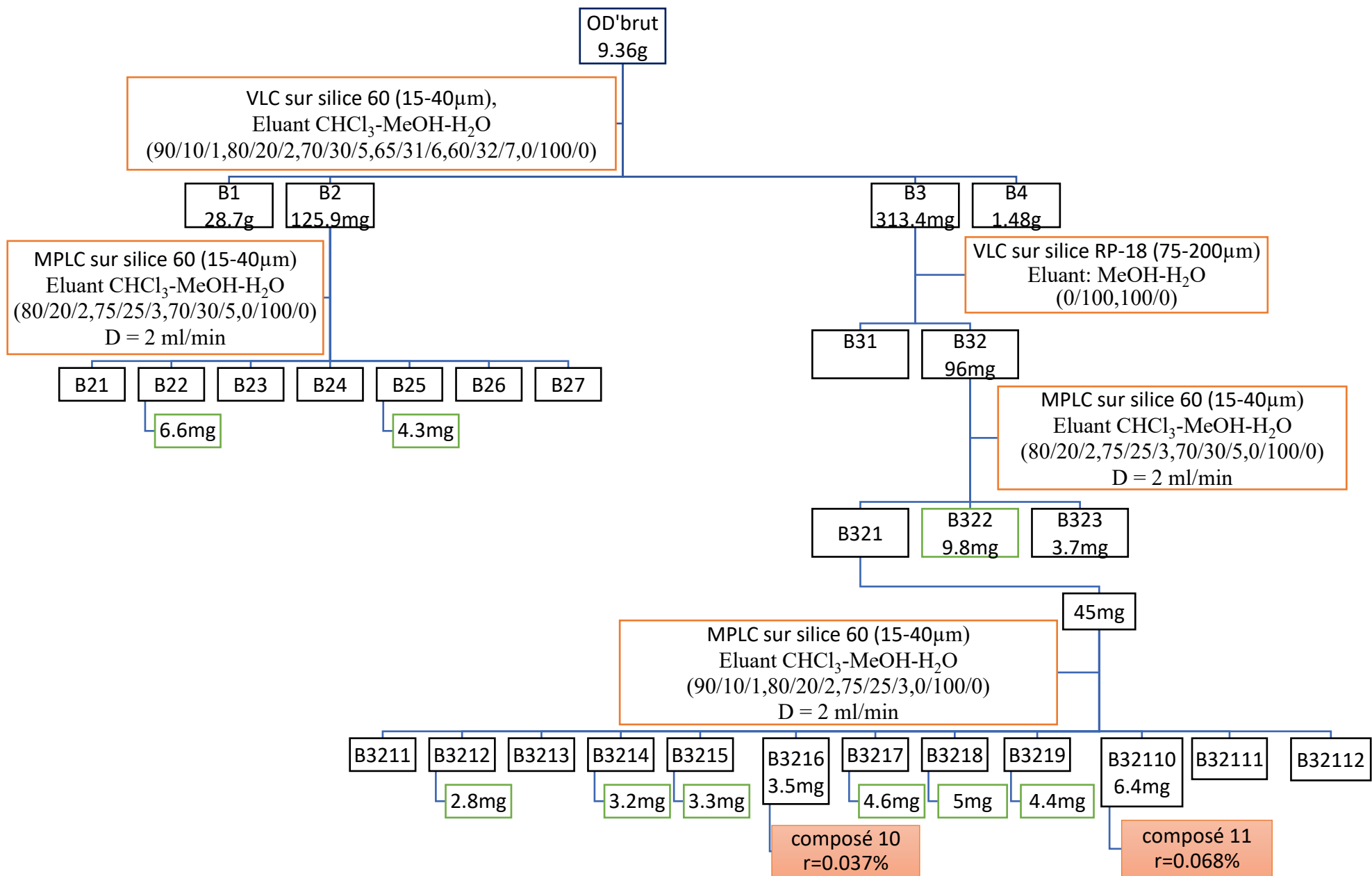


Figure 50: Etapes de purification à partir de 9,36 g d'extrait brut d'OD

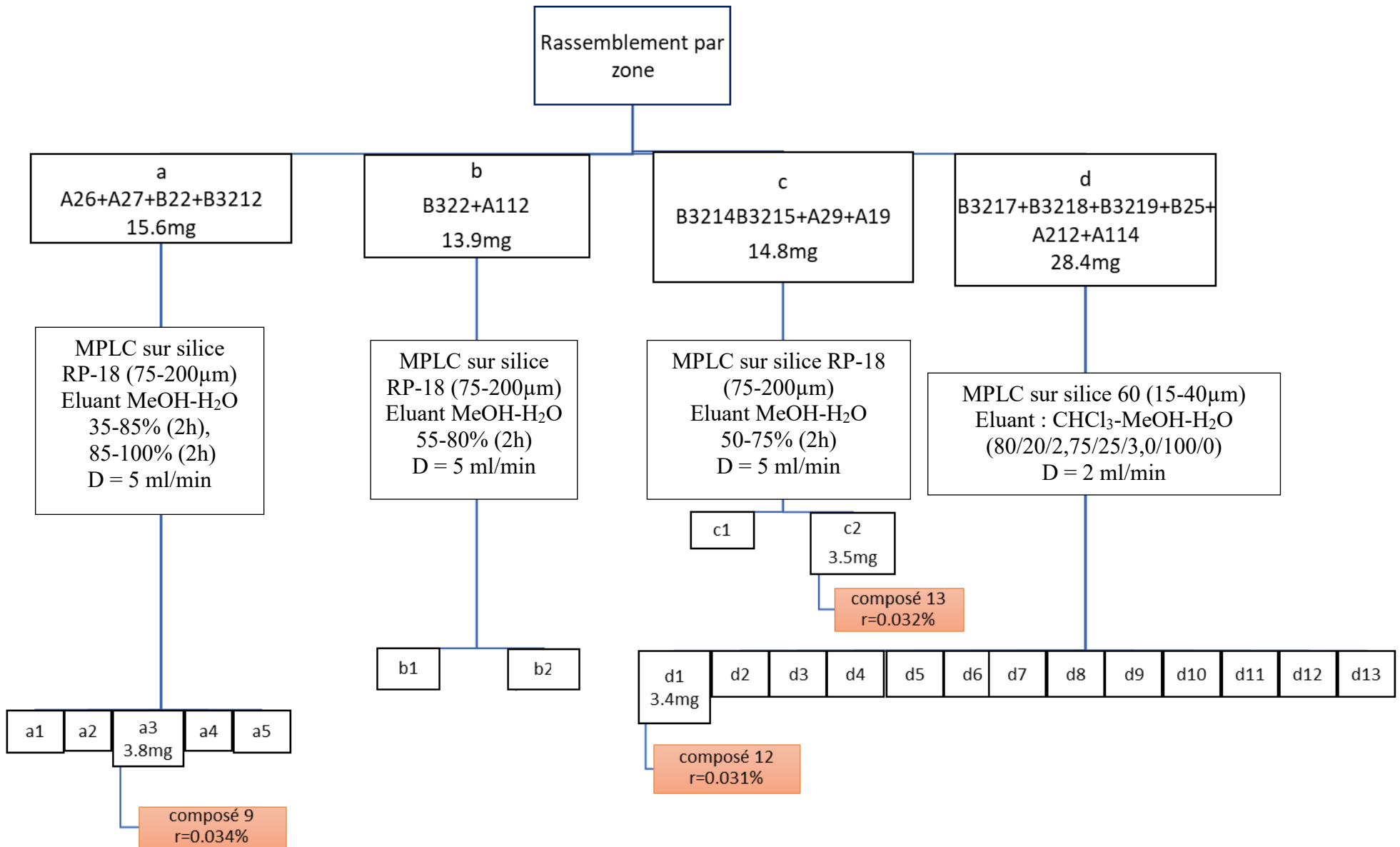


Figure 51: Etapes de purification des fractions réparties par zone d'OD

Cinq composés ont été ainsi isolés. La pureté de ces derniers a été ensuite vérifiée par HPTLC (Fig. 51).

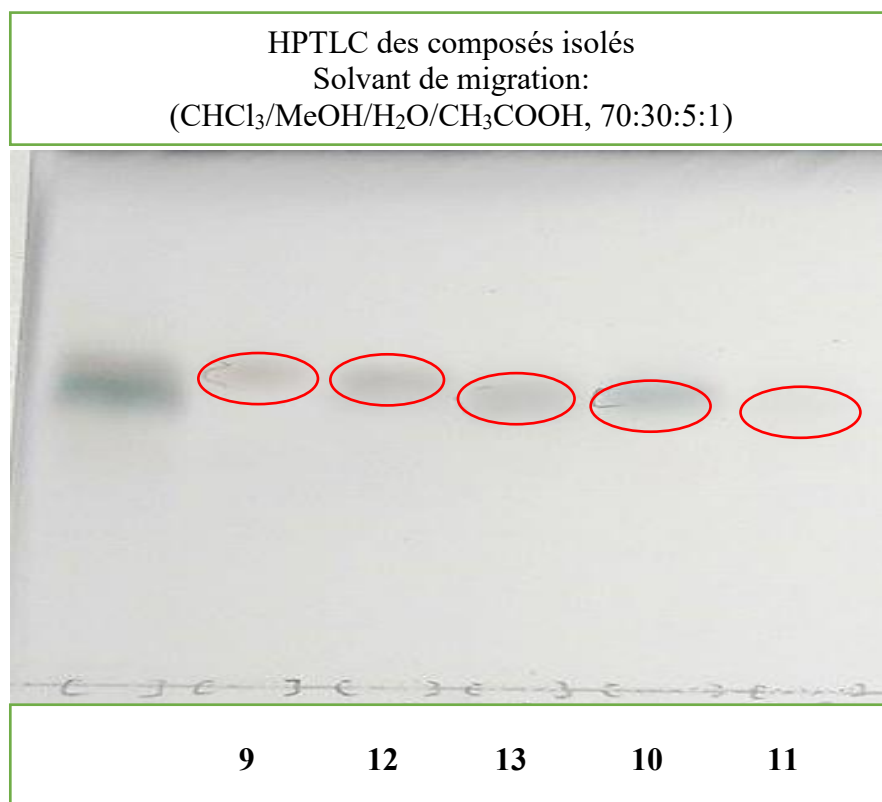


Figure 52: HPTLC des composés **9-13**

2.3.1.2 Détermination structurale du composé **9** :

2.3.1.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **9** en HRESIMS en mode positif, permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 731.5365 $[M + Na]^+$ en accord avec la formule brute $C_{38}H_{60}O_{12}Na$, suggérant une masse moléculaire de 708.

2.3.1.2.2 Résonance magnétique nucléaire.

2.3.1.2.2.1 Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone du composé **9** a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1D (1H et ^{13}C) et 2D (Tab. 3), en particulier grâce aux corrélations observées dans les spectres HSQC et HMBC.

L'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C montre la présence de signaux caractéristiques d'une génine de type Δ^5 spirosténique :

- quatre méthyles dont deux angulaires sous forme de singulet résonnant à δ_H 1.21 (s) (H₃-19) et 0.87 (s) (H₃-18) et deux méthyles secondaires sous forme de doublet résonnant à δ_H 1.09 (d, $J = 6.8$ Hz) (H₃-21), 0.69 (d, $J = 5.6$ Hz) (H₃-27)

- deux carbones oléfiniques à δ_C 139.1 (C-5) et 124.9 (C-6)

- six carbones à δ_C 109.2 (C-22), 31.8 (C-23), 29.2 (C-24), 30.6 (C-25), 66.8 (C-26) et 17.2 ppm (C-27) classiquement attribués au cycle F d'un squelette spirostane sous la forme 22(*R*), 25(*R*) (Agrawal et coll., 1985).

Les corrélations de HMBC à δ_H / δ_C 1.97 (H-2) / 67.9 (C-3) et 2.59 (H-4) / 67.9 (C-3) indiquent une fonction alcool secondaire à la position C-3. Le signal d'un proton méthine déblindé à δ_H 3.77 (dd, $J = 12.0, 4.4$ Hz) montrant des corrélations HMBC à longue distance avec δ_C à 50.8 (C-9), 42.9 (C-10) et 14.5 (C-19) est attribué à H-1. Dans le spectre HSQC, ce signal corrèle au signal de carbone à δ_C 82.3 (C-1), suggérant une glycosylation à cette position. La stéréochimie de l'aglycone a été établie à l'aide des corrélations observées sur le spectre ROESY.

En effet, les corrélations ROESY δ_H / δ_H H-1 α / H-4 α , H-3 α / H-4 α , H-4 β / H₃-19 β , H₃-19 β / H-8 β , H-8 β / H₃-18 β , H₃-18 β / H-20 β , H-20 β / H-25 β , H₃-27 α / H-16 α , et H-16 α / H₃-21 α (Fig.

53) ont permis l'identification de l'aglycone de **9** comme étant le (25*R*)-spirost-5-ène-1β-3β-diol précédemment caractérisé dans *Polygonati rhizome* (Ono et coll., 1988) et *Ornithogalum thyrsoïdes* (Kuroda et coll., 2004).

2.3.1.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre RMN ¹H a montré la présence de deux protons anomériques à δ_H 5.96 (br s) et 5.63 (br s) ppm, donnant respectivement dans le spectre HSQC des corrélations avec deux carbones anomériques à δ_C 104.0 et 96.9 ppm, indiquant ainsi la présence de deux sucres.

Comme pour les analyses structurales précédentes, l'analyse détaillée des spectres RMN 1D et 2D (Tab. 3), notamment la TOCSY à partir des protons anomères, la valeur de la constante de couplage de l'anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux de sucres, ont permis l'identification d'un α-L-arabinopyranosyl (Ara) et d'un α-L-rhamnopyranosyl (Rha) (Fig. 54). Les corrélations HMBC à δ_H / δ_C 5.96 br s (Ara-1) / 79.5 (Rha-2) et NOESY δ_H / δ_H 5.96 (Ara-1) / 4.54 (Rha-2), ont permis l'identification de la séquence oligosaccharidique suivante: α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyl.

La liaison entre la chaîne oligosaccharidique et l'aglycone est déduite de la corrélation HMBC à δ_H / δ_C 5.63 br s (Rha-1) / 82.3 (C-1) (Fig. 55) ainsi que de la corrélation ROESY à δ_H / δ_H 5.63 (Rha-1) / 3.77 (H-1) (Fig. 56), ce qui prouve ainsi la liaison *O*-hétérosidique entre le Rha et le C-1 de l'aglycone.

La structure du composé **9** a donc été établie comme étant le (25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-ène-1β-yl *O*-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside (Fig. 57).

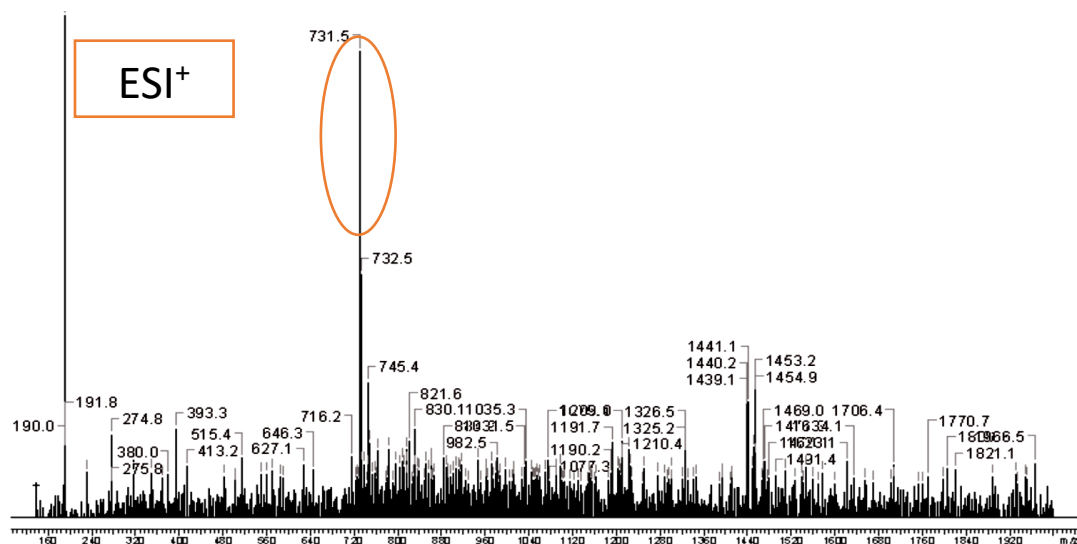


Figure 53: Spectre de masse du composé **9**

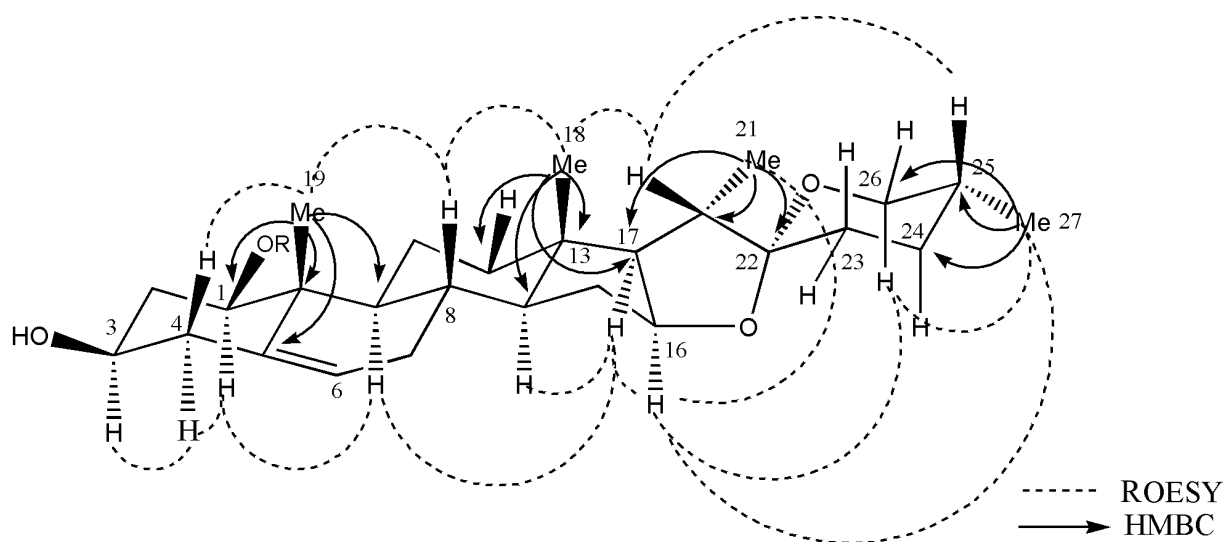


Figure 54: Les corrélations HMBC et ROESY observées dans les spectres RMN du composé **9**

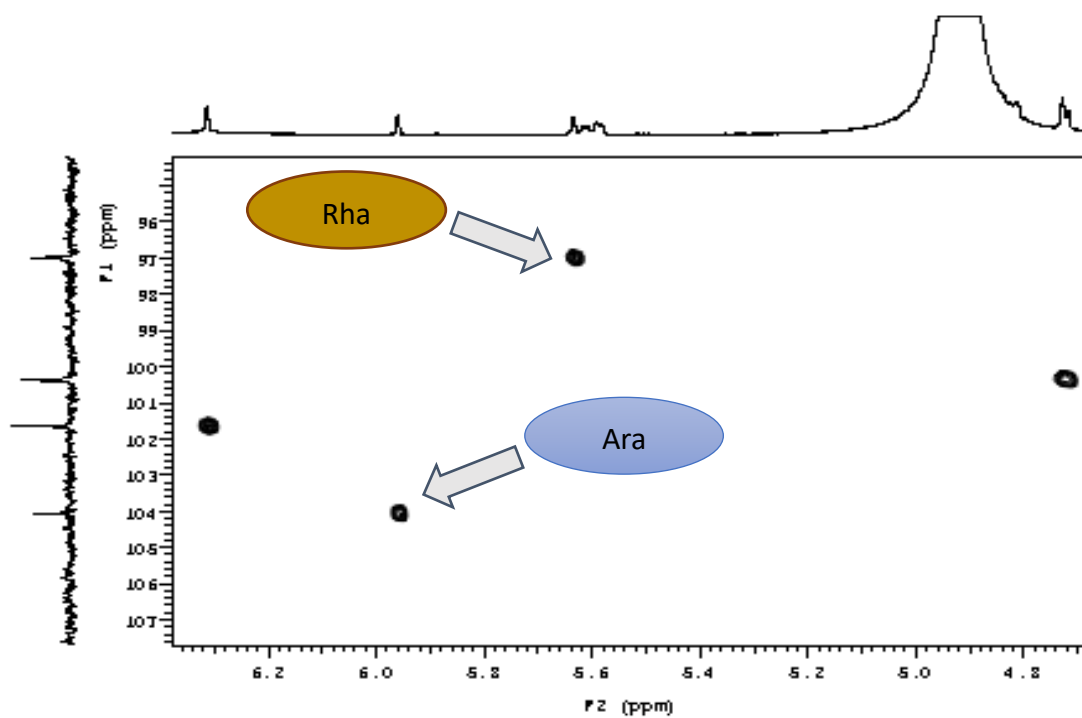


Figure 55: Spectre HSQC du composé **9** montrant les signaux des deux anomères

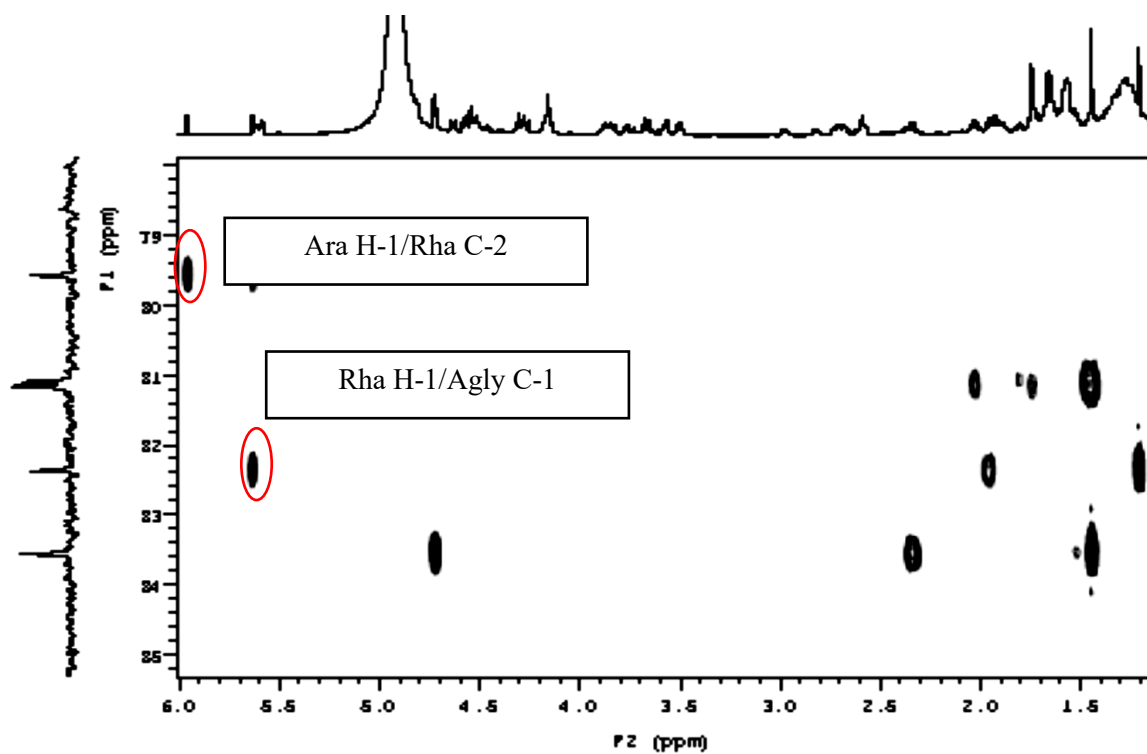


Figure 56: Spectre HMBC du composé 9 montrant les points de liaison des sucres avec la génine

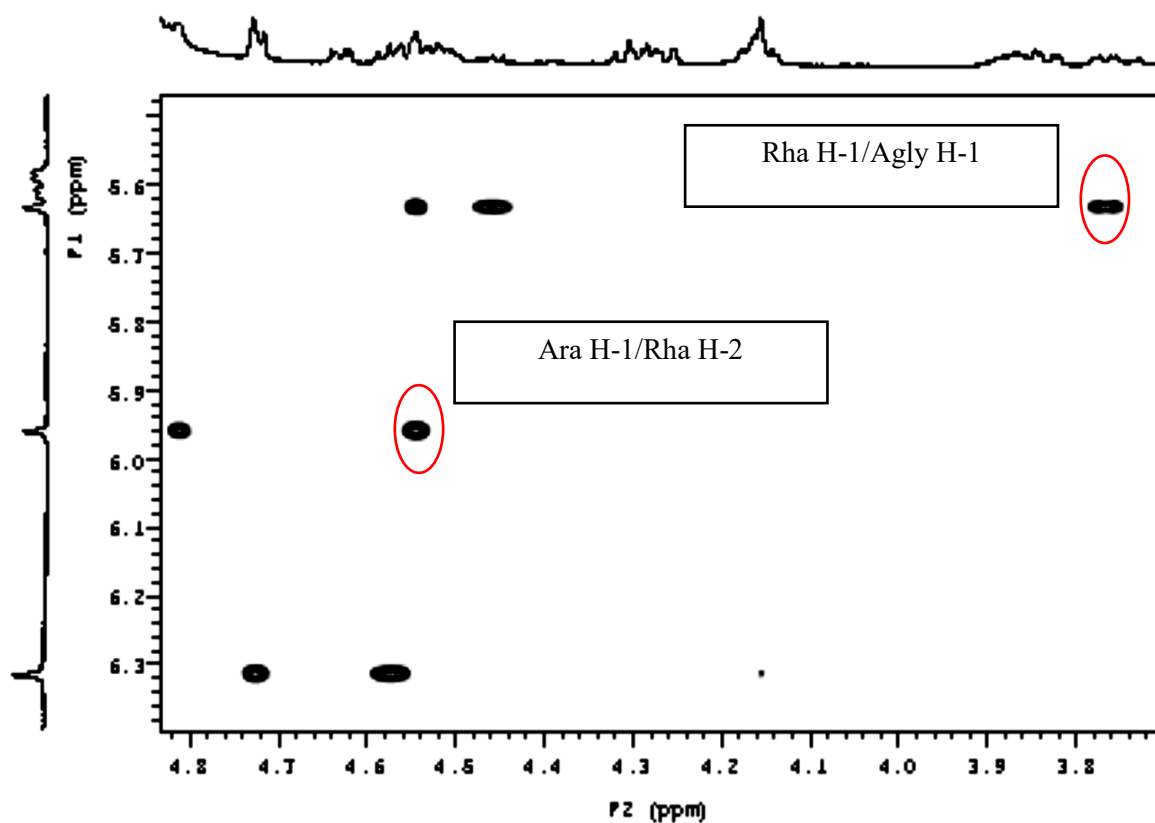


Figure 57: Spectre ROESY du composé 9 montrant les points de liaison des sucres avec la génine

Tableau 3: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine- d_5) du composé **9**

| 9 | | | 9 | | |
|----------|---------------------|----------------------------|----------------|---------------------|---------------------------|
| No | δ_{C} | δ_{H} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 82.3 | 3.77 <i>dd</i> (12.0, 4.4) | 1-O-Rha | | |
| 2 | 36.4 | 1.97 | 1 | 96.9 | 5.63 <i>br s</i> |
| | | 2.82 <i>m</i> | 2 | 79.5 | 4.54 |
| 3 | 67.9 | 3.88 <i>m</i> | 3 | 72.4 | 4.50 |
| 4 | 43.7 | 2.59 | 4 | 74.0 | 4.28 |
| | | 2.68 <i>br d</i> (11.7) | 5 | 70.3 | 4.46 |
| 5 | 139.1 | - | 6 | 18.6 | 1.66 <i>d</i> (6.0) |
| 6 | 124.9 | 5.61 <i>br d</i> (5.6) | Ara | | |
| 7 | 32.3 | 1.43 | 1 | 104.0 | 5.96 <i>br s</i> |
| | | 2.03 <i>m</i> | 2 | 72.1 | 4.81 |
| 8 | 33.5 | 1.55 | 3 | 73.8 | 4.17 |
| 9 | 50.8 | 1.36 <i>m</i> | 4 | 70.8 | 4.17 |
| 10 | 42.9 | - | 5 | 67.2 | 3.67 <i>br d</i> (12.0) |
| 11 | 24.7 | 1.62 <i>m</i> | | | 4.27 <i>dd</i> (9.6, 2.8) |
| | | 2.60 | | | |
| 12 | 40.4 | 1.40 <i>m</i> | | | |
| | | 1.74 <i>m</i> | | | |
| 13 | 40.2 | - | | | |
| 14 | 56.9 | 1.16 <i>m</i> | | | |
| 15 | 32.1 | 1.25 <i>m</i> | | | |
| | | 1.53 | | | |
| 16 | 81.0 | 4.52 | | | |
| 17 | 62.9 | 1.80 <i>dd</i> (8.0, 6.8) | | | |
| 18 | 16.8 | 0.87 <i>s</i> | | | |
| 19 | 14.5 | 1.21 <i>s</i> | | | |
| 20 | 42.0 | 1.94 <i>m</i> | | | |
| 21 | 14.9 | 1.09 <i>d</i> (6.8) | | | |
| 22 | 109.2 | - | | | |
| 23 | 31.8 | 1.56 | | | |
| | | 1.65 <i>br d</i> (5.2) | | | |
| 24 | 29.2 | 1.57 | | | |
| | | nd | | | |
| 25 | 30.6 | 1.57 | | | |
| 26 | 66.8 | 3.50 <i>dd</i> (10.0, 8.8) | | | |
| | | 3.57 <i>dd</i> (10.0, 5.2) | | | |
| 27 | 17.2 | 0.69 <i>d</i> (5.6) | | | |

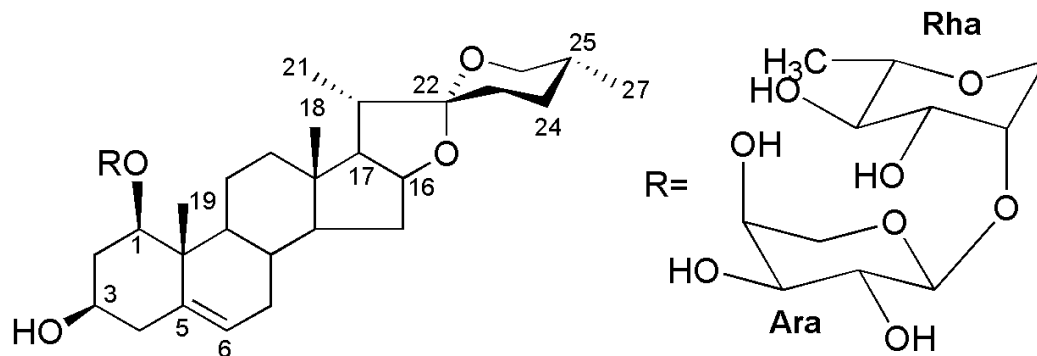


Figure 58: Structure du composé 9

2.3.1.3 Détermination structurale du composé 10:

2.3.1.3.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **10** en HRESIMS (mode positif) permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 911.5322 $[M + Na]^+$ en accord avec la formule brute $C_{45}H_{76}O_{17}Na$, suggérant une masse moléculaire de 888 (Fig. 58).

2.3.1.3.2 Résonance magnétique nucléaire.

2.3.1.3.2.1 Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone du composé **10** a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées dans les spectres HSQC, HMBC et ROESY (Tab. 4).

L'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C montre la présence de signaux caractéristiques d'une génine de type Δ^5 cholesténique (Inoue et coll., 1995; Mimaki et coll., 1993) :

- cinq méthyles dont deux angulaires sous forme de singulet résonnant à δ_H 0.75 (s) (H_3 -18), 0.98 (s) (H_3 -19) et trois méthyles secondaires sous forme de doublet résonnant à δ_H 1.10 (d, $J = 6.4$ Hz) (H_3 -21), 0.85 (d, $J = 6.8$ Hz) (H_3 -26), 0.87 (d, $J = 6.4$ Hz) (H_3 -27).
- deux carbones oléfiniques à δ_C 150.0 (C-5) et 124.2 (C-6) ppm.

Les corrélations observées en HSQC à δ_H / δ_C 3.89 / 78.2, 3.73 / 83.8, 4.05 / 75.2 indiquent la présence de trois fonctions alcools secondaires, respectivement aux positions C-3, C-16 et C-22. Leur stéréochimie est déterminée grâce aux corrélations suivantes, observées dans le spectre ROESY : δ_H / δ_H H-3 α / H-1 α , H-1 α / H-6 α , H-6 α / H-14 α , H-14 α / H-16 α , H-16 α / H-22 α , et H-22 α / H₃-21 α (Fig. 59).

Ces données spectrales ont donc permis l'identification de l'aglycone de **10** comme étant le (22*S*)-cholest-5-ene-3 β ,16 β ,22-triol, génine précédemment caractérisée dans *Allium schubertii* (Kawashima et coll., 1991).

2.3.1.3.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre RMN ¹H a montré la présence de trois protons anomériques à δ_H 5.40 (br s), 5.02 (d, $J = 7.6$ Hz), 5.06 (d, $J = 7.2$ Hz), donnant respectivement dans le spectre HSQC des corrélations avec trois carbones anomériques à δ_C 104.2, 105.6, 103.1 ppm, indiquant ainsi la présence de trois sucres. L'analyse des spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC, la valeur de la constante de couplage de l'anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux de sucres ont permis l'identification de deux β -D-glucopyranoses (Glc) et d'un α -L-rhamnopyranose (Rha) (Fig. 60, Tab. 4). Les corrélations HMBC δ_H / δ_C 5.40 (Rha-1) / 83.8 (C-16) et 5.02 (Glc I-1) / 78.2 (C-3) (Fig. 61), ainsi que les corrélations ROESY à δ_H / δ_H 5.40 (Rha-1) / 3.73 (H-16) et 5.02 (Glc I-1) / 3.86 (H-3), ont permis de montrer l'existence de deux liaisons *O*-hétérosidiques entre Rha et C-16, et entre Glc I et C-3 de l'aglycone (Fig. 62).

La séquence de la chaîne oligosaccharidique est déduite de la corrélation HMBC entre δ_H / δ_C 5.06 (Glc II-1) / 77.9 (Glc I-4), ainsi que de la corrélation ROESY entre δ_H / δ_H 5.06 (Glc II-1) / 4.51 (Glc I-4).

La structure du composé **10** est donc établie comme étant le (22*S*)-16 β -[(α -L-rhamnopyranosyl)-oxy]-22-hydroxycholest-5-en-3 β -yl *O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (Fig. 63).

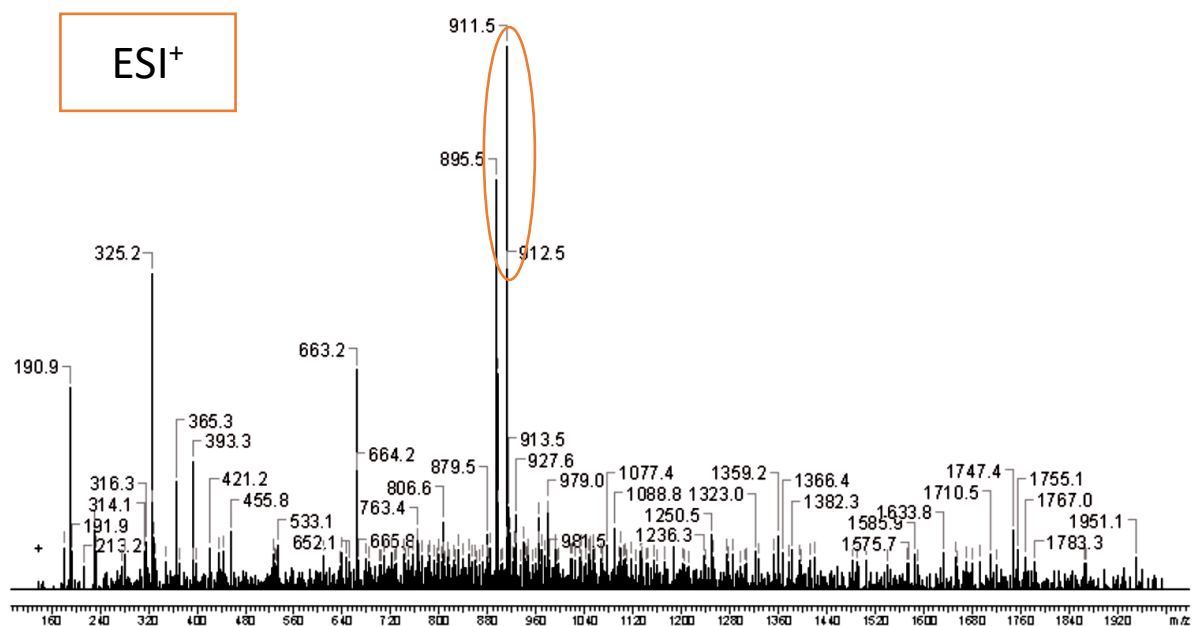


Figure 59: Spectre de masse du composé **10**

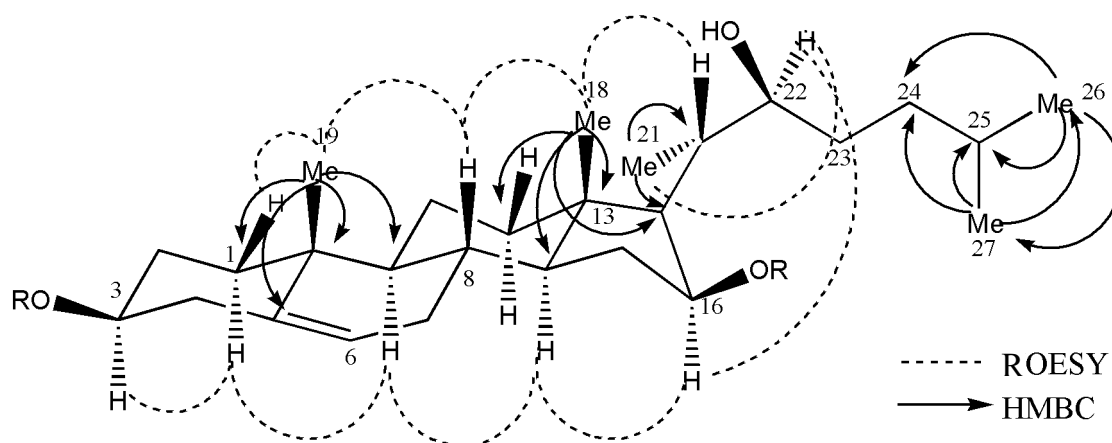


Figure 60: Les corrélations HMBC et ROESY observées dans les spectres RMN du composé **10**

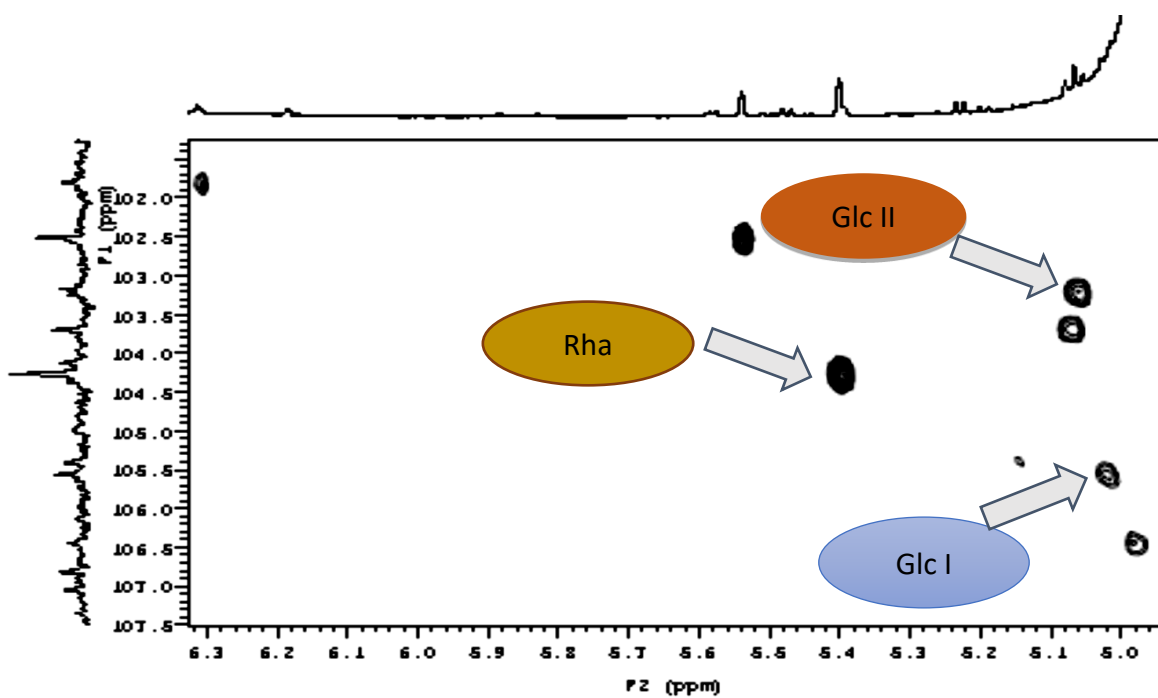


Figure 61 : Spectre HSQC du composé **10** montrant les signaux des anomères

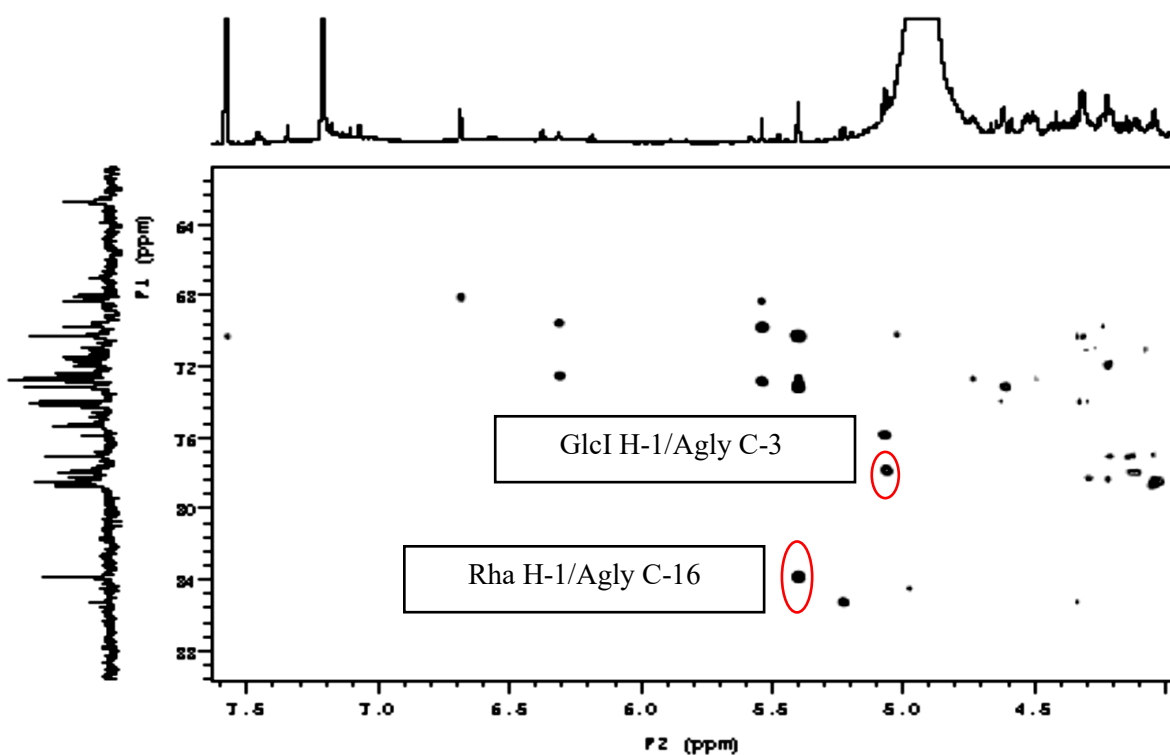


Figure 62: Spectre HMBC du composé **10** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

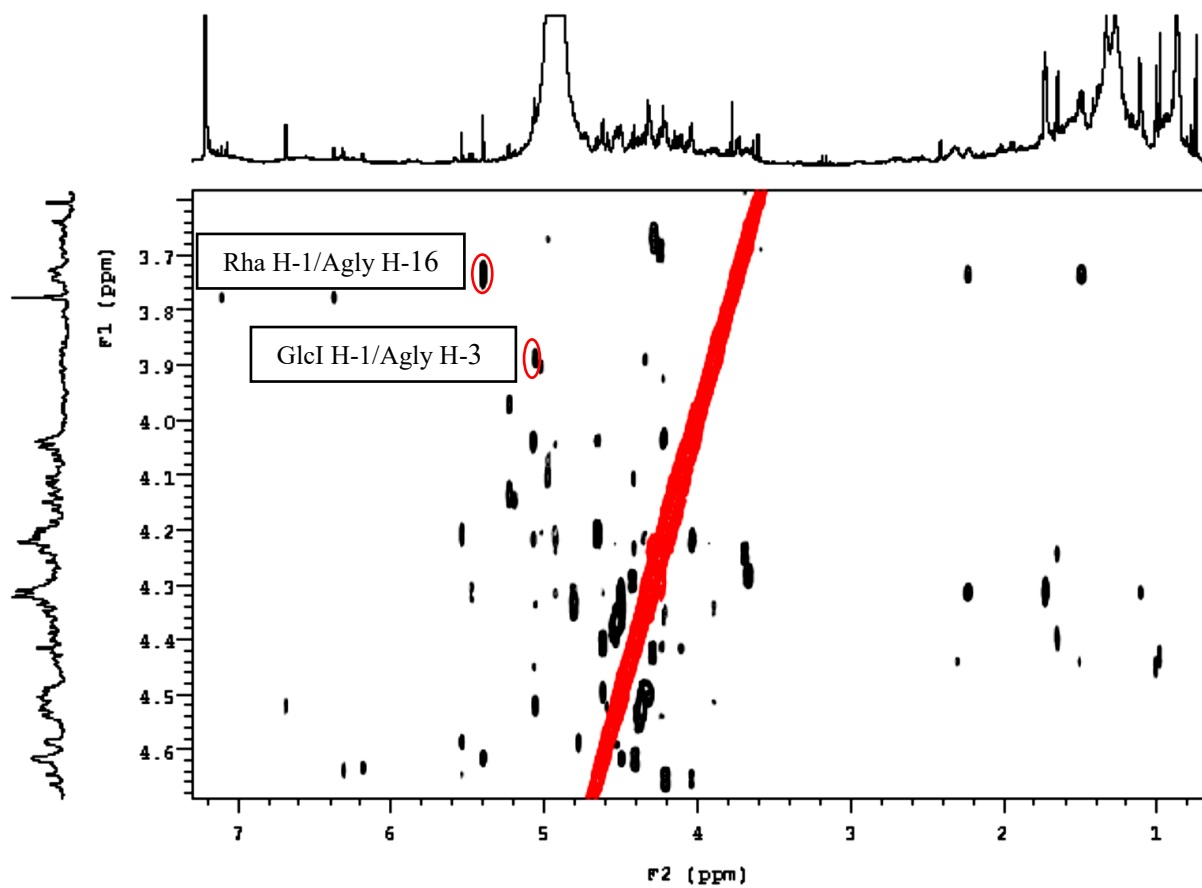


Figure 63: Spectre ROESY du composé **10** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

Tableau 4: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine- d_5) du composé **10**

| 10 | | | 10 | | |
|-----------|---------------------|---|------------------|---------------------|---|
| No | δ_{H} | δ_{C} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 36.6 | 1.38 <i>br d</i> (5.6) 1.70 <i>m</i> | 16-O-Rha | | |
| 2 | 29.5 | 1.26 1.34 <i>m</i> | 1 | 104.2 | 5.40 <i>br s</i> |
| 3 | 78.2 | 3.89 <i>m</i> | 2 | 72.8 | 4.62 <i>m</i> |
| 4 | 43.8 | 2.57 <i>m</i> nd | 3 | 73.1 | 4.50 |
| 5 | 150.0 | - | 4 | 74.0 | 4.31 |
| 6 | 124.2 | 5.58 <i>br d</i> (4.8) | 5 | 70.2 | 4.31 |
| 7 | 33.0 | 0.80 1.25 | 6 | 18.5 | 1.73 <i>d</i> (5.6) |
| 8 | 30.0 | 1.22 | 1-O-Glc I | | |
| 9 | 54.6 | 0.80 | 1 | 105.6 | 5.02 <i>d</i> (7.6) |
| 10 | 38.0 | - | 2 | 75.3 | 4.04 |
| 11 | 19.2 | 1.73 nd | 3 | 78.6 | 4.22 |
| 12 | 43.0 | 1.22 <i>m</i> 2.30 <i>m</i> | 4 | 77.9 | 4.51 |
| 13 | 40.0 | - | 5 | 78.6 | 3.97 <i>m</i> |
| 14 | 55.7 | 0.96 | 6 | 62.7 | 4.39 <i>dd</i> (10.0, 6.4) 4.53 <i>dd</i> (9.6, 3.2) |
| 15 | 34.8 | 1.51 <i>m</i> nd | Glc II | | |
| 16 | 83.8 | 3.73 <i>br d</i> (10.0) | 1 | 103.1 | 5.06 <i>d</i> (7.2) |
| 17 | 53.6 | 1.17 <i>dd</i> (8.0, 6.8) | 2 | 75.3 | 4.05 |
| 18 | 12.5 | 0.75 <i>s</i> | 3 | 77.9 | 4.33 |
| 19 | 19.7 | 0.98 <i>s</i> | 4 | 71.5 | 4.21 |
| 20 | 40.5 | 2.23 <i>m</i> | 5 | 78.2 | 3.93 <i>m</i> |
| 21 | 13.4 | 1.10 <i>d</i> (6.4) | 6 | 62.7 | 4.36 <i>dd</i> (12.4, 5.2) 4.51 <i>dd</i> (8.8, 2.8) |
| 22 | 75.2 | 4.05 | | | |
| 23 | 40.0 | 1.13 <i>m</i> 1.95 <i>m</i> | | | |
| 24 | 36.5 | 1.24 1.49 <i>m</i> | | | |
| 25 | 28.3 | 1.54 | | | |
| 26 | 22.6 | 0.85 <i>d</i> (6.8) | | | |
| 27 | 23.0 | 0.87 <i>d</i> (6.4) | | | |

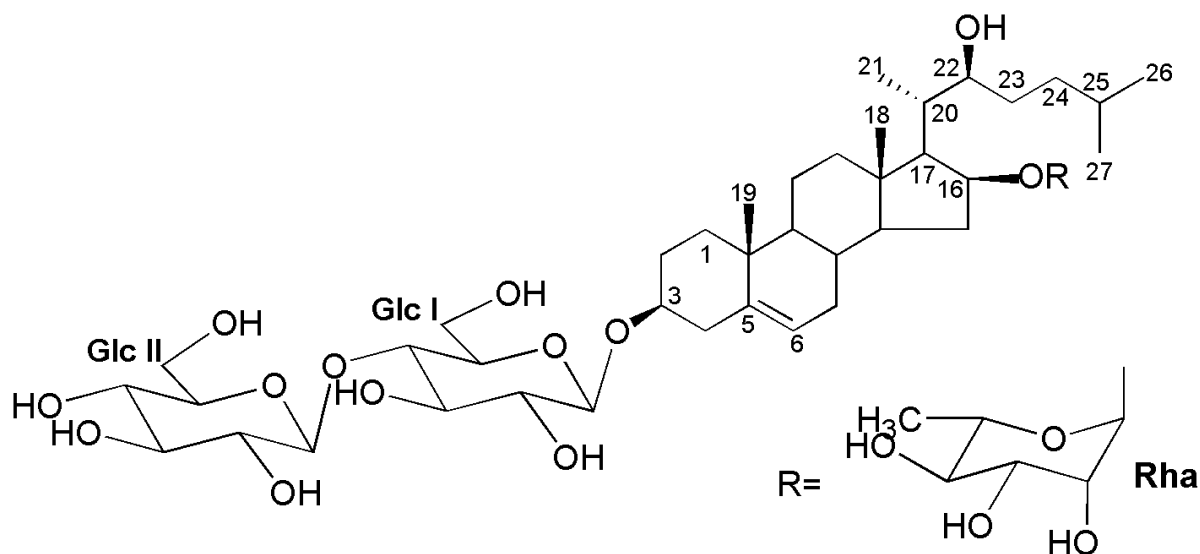


Figure 64: Structure du composé **10**

2.3.1.4 Détermination structurale du composé **11** :

2.3.1.4.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **11** en HRESIMS mode positif, permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 1057.5498 $[M + Na]^+$, en accord avec la formule brute $C_{51}H_{86}O_{21}Na$, suggérant une masse moléculaire de 1034 (Fig. 64).

2.3.1.4.2 Résonance magnétique nucléaire.

2.3.1.4.2.1 Nature de l'aglycone

L'analyse des spectres RMN du composé **11** permet de constater que la zone de l'aglycone est quasiment superposable à celle du composé **10**. Les corrélations HMBC, HSQC et ROESY ont permis d'identifier la génine du composé **11** comme étant le (22*S*)-cholest-5-ène-3 β ,16 β ,22-triol, identique à celle du composé **10** (Tab. 5).

2.3.1.4.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre RMN ^1H a montré la présence de quatre protons anomériques à δ_{H} 5.40 (br s), 5.02 (d, $J = 7.6$ Hz), 5.20 (d, $J = 7.2$ Hz), 5.49 (br s), donnant dans le spectre HSQC des corrélations avec quatre carbones anomériques, respectivement à δ_{C} 104.2, 103.4, 106.8, 102.3 ppm, indiquant ainsi la présence de quatre sucres. L'analyse de leur spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC, la valeur de la constante de couplage du proton anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux de sucres ont permis l'identification de deux Glc et deux Rha (Fig. 65, Tab. 5). Les corrélations HMBC $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 5.40 (Rha I-1) / 83.8 (C-16) et 5.02 (Glc I-1) / 78.4 (C-3) (Fig. 66 et 67), ainsi que les corrélations ROESY à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ 5.40 (Rha I-1) / 3.73 (H-16) et 5.02 (Glc I-1) / 3.95 (H-3) (Fig. 68), ont permis l'identification de la liaison entre la chaîne oligosaccharidique et l'aglycone, montrant ainsi que le Rha I et le Glc I sont liés respectivement au C-16 et au C-3 de l'aglycone.

Les liaisons inter-osidiques sont déduites des corrélations HMBC entre $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 5.20 (Glc II-1) / 85.0 (Glc I-2), et des corrélations ROESY entre $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ 5.20 (Glc II-1) / 4.10 (Glc I-2) et 5.49 (Rha II-1) / 4.17 (Glc I-4). Ceci prouve que le Glc II et le Rha II sont fixés respectivement sur les positions C-2 et C-4 du Glc I.

La structure du composé **11** est donc établie comme étant le (2*S*)-16 β -[(α -L-rhamnopyranosyl)-oxy]-22-hydroxycholest-5-en-3 β -yl *O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (Fig. 69).

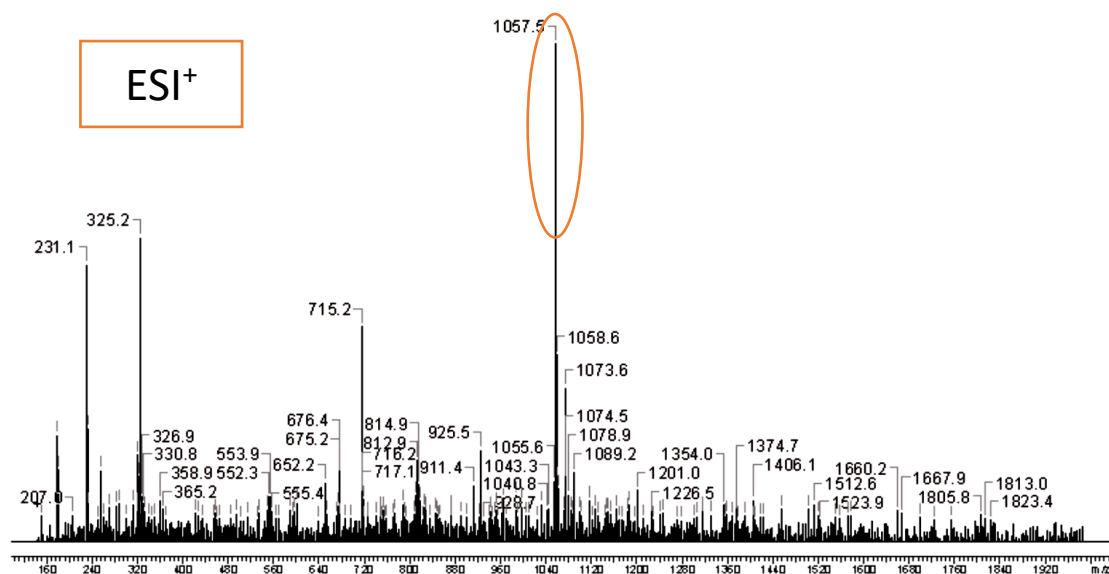


Figure 65: Spectre de masse du composé **11**

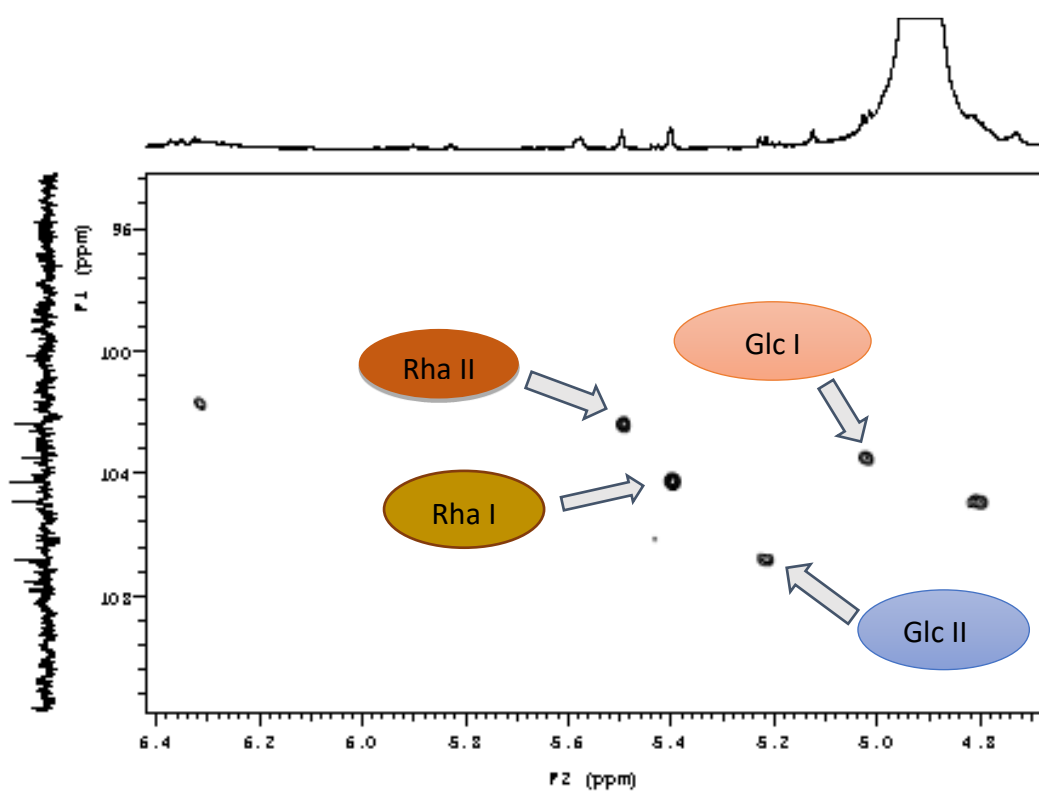


Figure 66: Spectre HSQC du composé **11** montrant les signaux des deux anomères

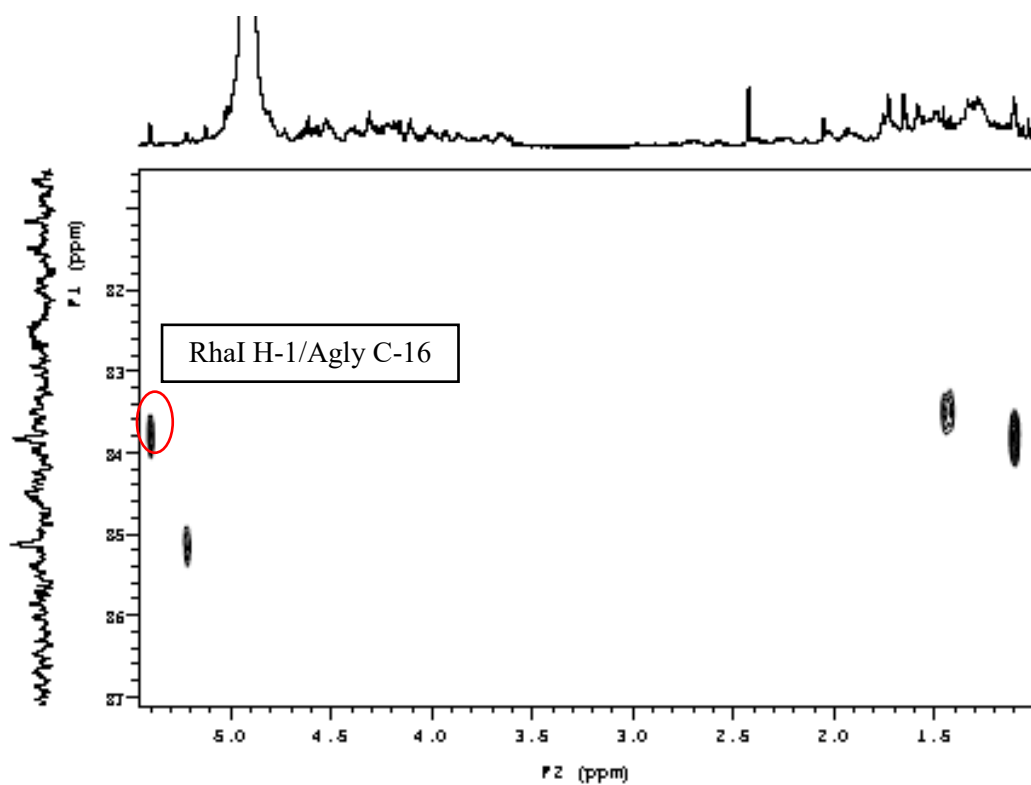


Figure 67: Spectre HMBC du composé **11** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

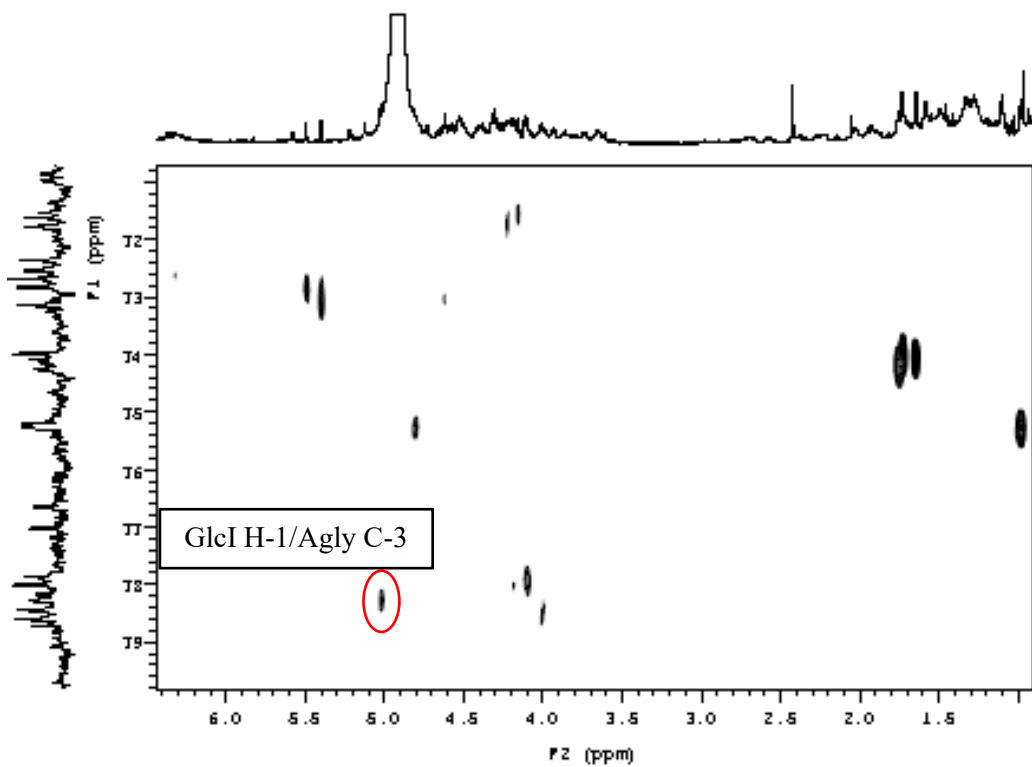


Figure 68: Spectre HMBC du composé **11** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

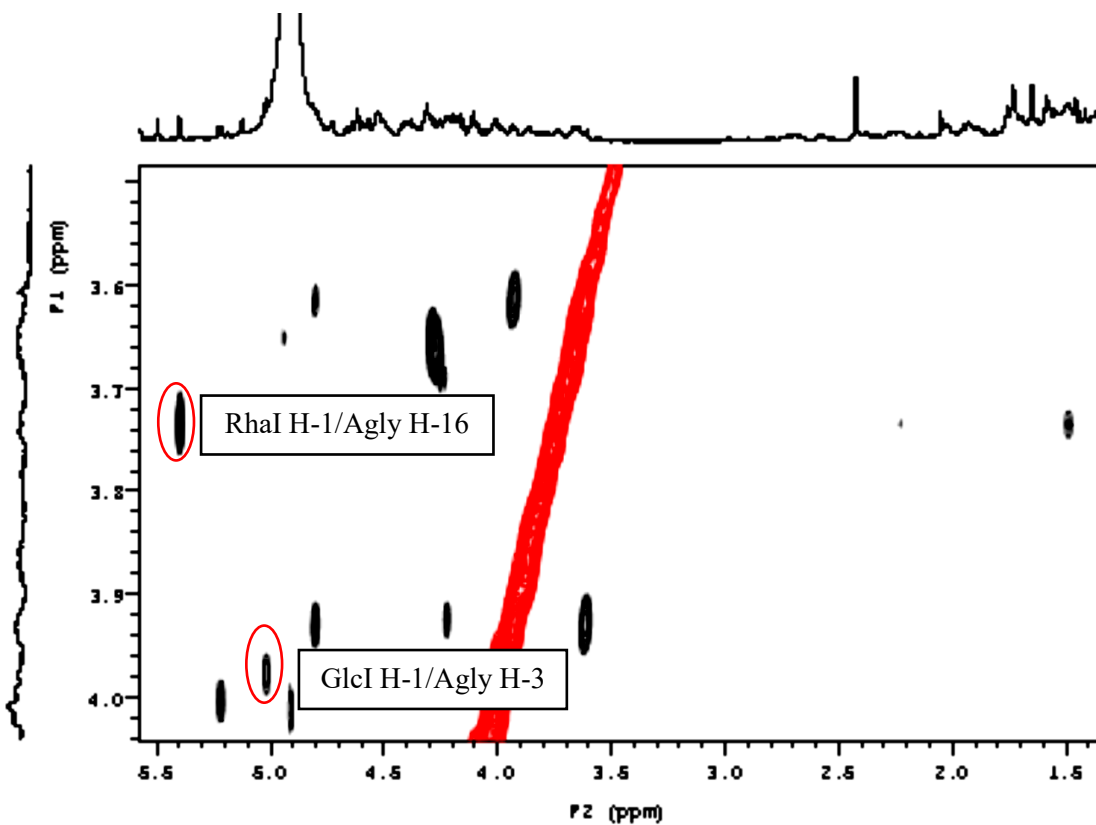


Figure 69: Spectre ROESY du composé **11** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

Tableau 5 : Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine- d_5) du composé **11**

| 11 | | | 11 | | |
|-----------|---------------------|--------------------------------|------------------|---------------------|---|
| No | δ_{H} | δ_{C} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 37.9 | nd | 16-O-Rha | | |
| 2 | 29.9 | 1.28 1.33 <i>m</i> | 1 | 104.2 | 5.40 <i>br s</i> |
| 3 | 78.4 | 3.95 <i>m</i> | 2 | 72.6 | 4.62 <i>m</i> |
| 4 | 43.8 | 2.56 <i>m</i> 2.70 <i>m</i> | 3 | 73.0 | 4.50 |
| 5 | 149.6 | - | 4 | 74.0 | 4.28 |
| 6 | 124.5 | 5.58 <i>br d</i> (4.6) | 5 | 70.2 | 4.31 |
| 7 | 30.0 | nd 1.26 | 6 | 18.5 | 1.73 <i>d</i> (5.6) |
| 8 | 30.0 | 1.28 | 1-O-Glc I | | |
| 9 | 54.8 | 0.73 | 1 | 105.6 | 5.02 <i>d</i> (7.6) |
| 10 | 36.6 | - | 2 | 85.0 | 4.10 |
| 11 | 19.6 | nd 2.04 | 3 | 77.8 | 4.30 |
| 12 | 43.1 | nd 2.26 <i>m</i> | 4 | 78.0 | 4.17 |
| 13 | 40.0 | - | 5 | 75.2 | 4.02 <i>m</i> |
| 14 | 55.7 | nd | 6 | 62.8 | 4.50 <i>dd</i> (10.1, 6.3) 4.53 <i>dd</i> (9.4, 3.3) |
| 15 | 34.8 | 1.48 <i>m</i> nd | Glc II | | |
| 16 | 83.8 | 3.73 <i>br d</i> (10.0) | 1 | 106.8 | 5.20 <i>d</i> (7.2) |
| 17 | 53.6 | 1.15 <i>dd</i> (8.0, 6.8) | 2 | 77.0 | 4.12 |
| 18 | 12.1 | 0.73 <i>s</i> | 3 | 78.5 | 4.22 |
| 19 | 19.6 | 0.97 <i>s</i> | 4 | 71.7 | 4.20 |
| 20 | 40.4 | 2.23 <i>m</i> | 5 | 78.6 | 4.01 <i>m</i> |
| 21 | 13.4 | 1.10 <i>d</i> (6.4) | 6 | 62.7 | 4.43 <i>dd</i> (12.1, 5.3) 4.51 <i>dd</i> (8.9, 2.7) |
| 22 | 73.9 | 4.25 | Rha II | | |
| 23 | 40.0 | nd | 1 | 102.3 | 5.49 <i>br s</i> |
| 24 | 36.4 | 1.25 1.49 <i>m</i> | 2 | 72.3 | 4.57 |
| 25 | 28.3 | 1.55 | 3 | 72.8 | 4.53 |
| 26 | 22.6 | 0.85 <i>d</i> (6.8) | 4 | 73.9 | 4.31 |
| 27 | 23.0 | 0.88 <i>d</i> (6.4) | 5 | 69.7 | 4.39 |
| | | | 6 | 18.6 | 1.65 <i>d</i> (5.8) |

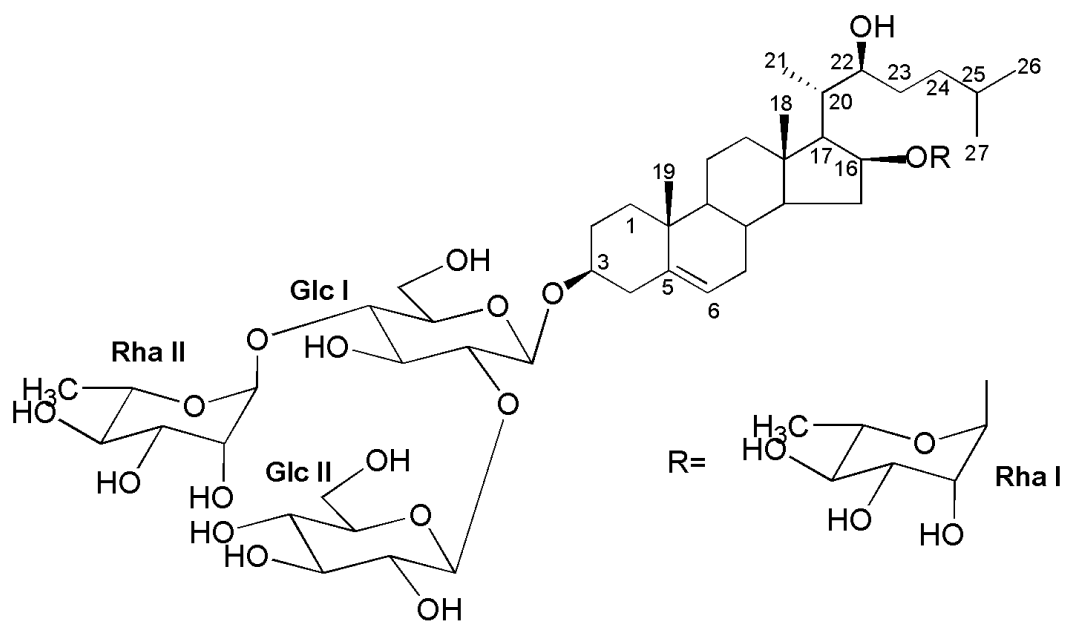


Figure 70: Structure du composé **11**

L'étude phytochimique des racines et bulbes d'*O. dubium* a donc permis d'isoler 5 composés dont trois nouveaux et deux connus (décrits dans la conclusion 2.3.4.) (Fig. 90). Nous poursuivons dans la partie suivante l'étude d'*O. dubium* mais cette fois des tiges et des feuilles.

2.3.2 Tiges et feuilles

L'étude phytochimique des tiges et feuilles d'*O. dubium* a permis l'isolement de 2 composés de structures nouvelles (**14**, **15**), en utilisant diverses techniques chromatographiques. Les étapes d'extraction et de purification sont présentées synthétiquement dans les figures 70-73 et sont suivies de leurs déterminations structurales.

2.3.2.1 Extraction et isolement des composés **14** et **15**

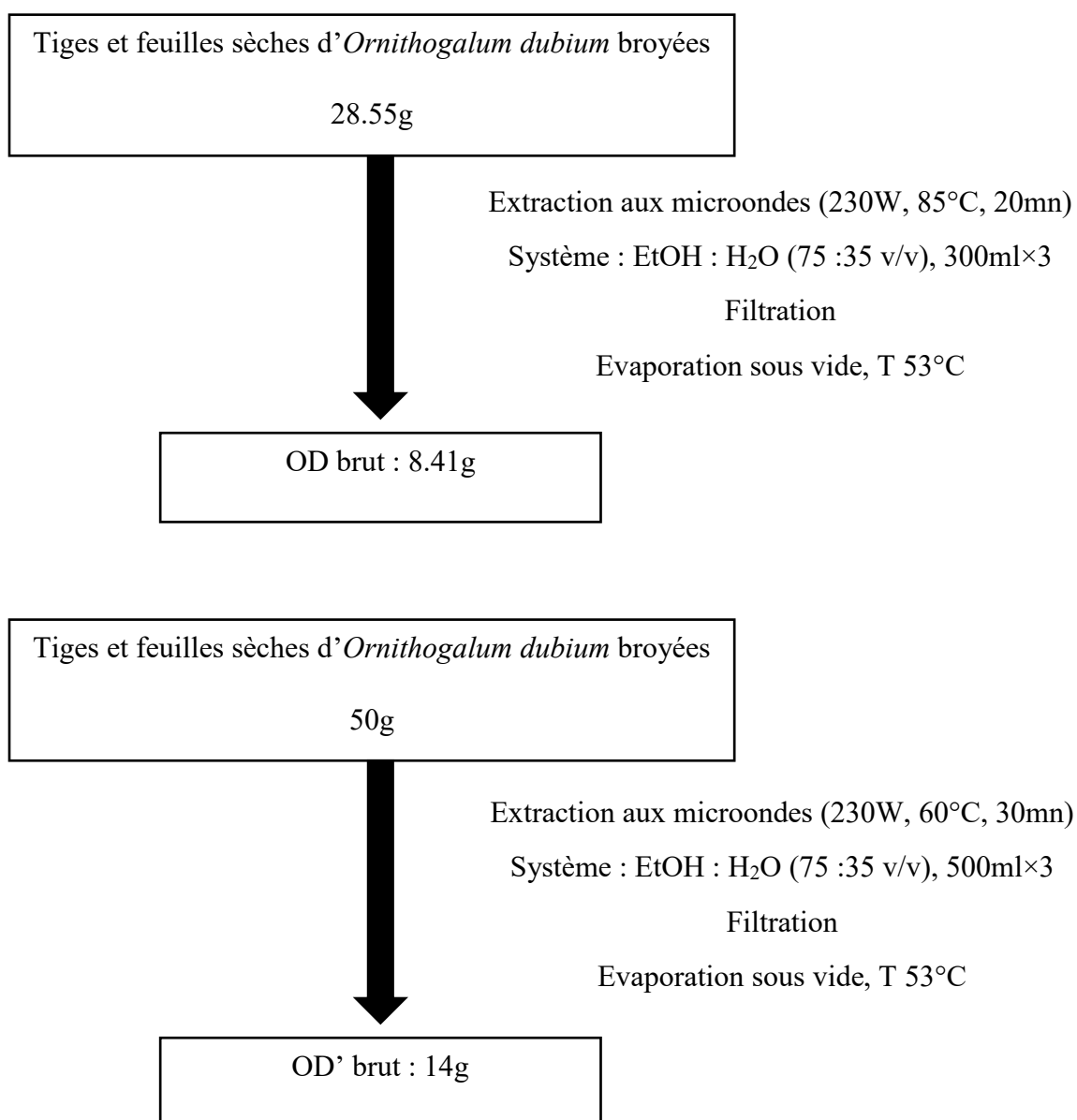


Figure 71: Etapes d'extraction des saponines des tiges et feuilles d'*O. dubium*

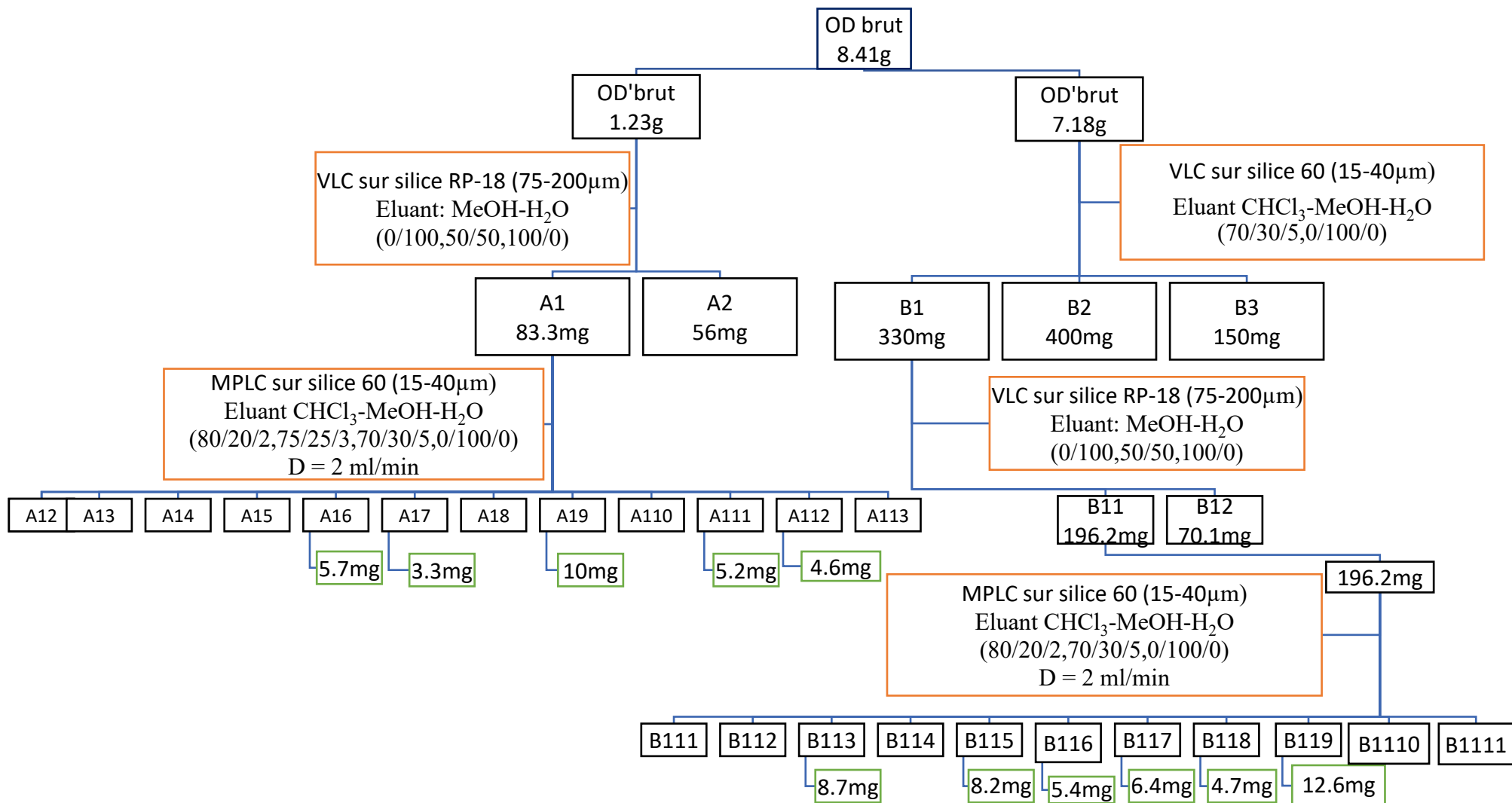


Figure 72: Etapes de purification à partir de 8,41 g d'extrait brut de tiges et feuilles d'OD

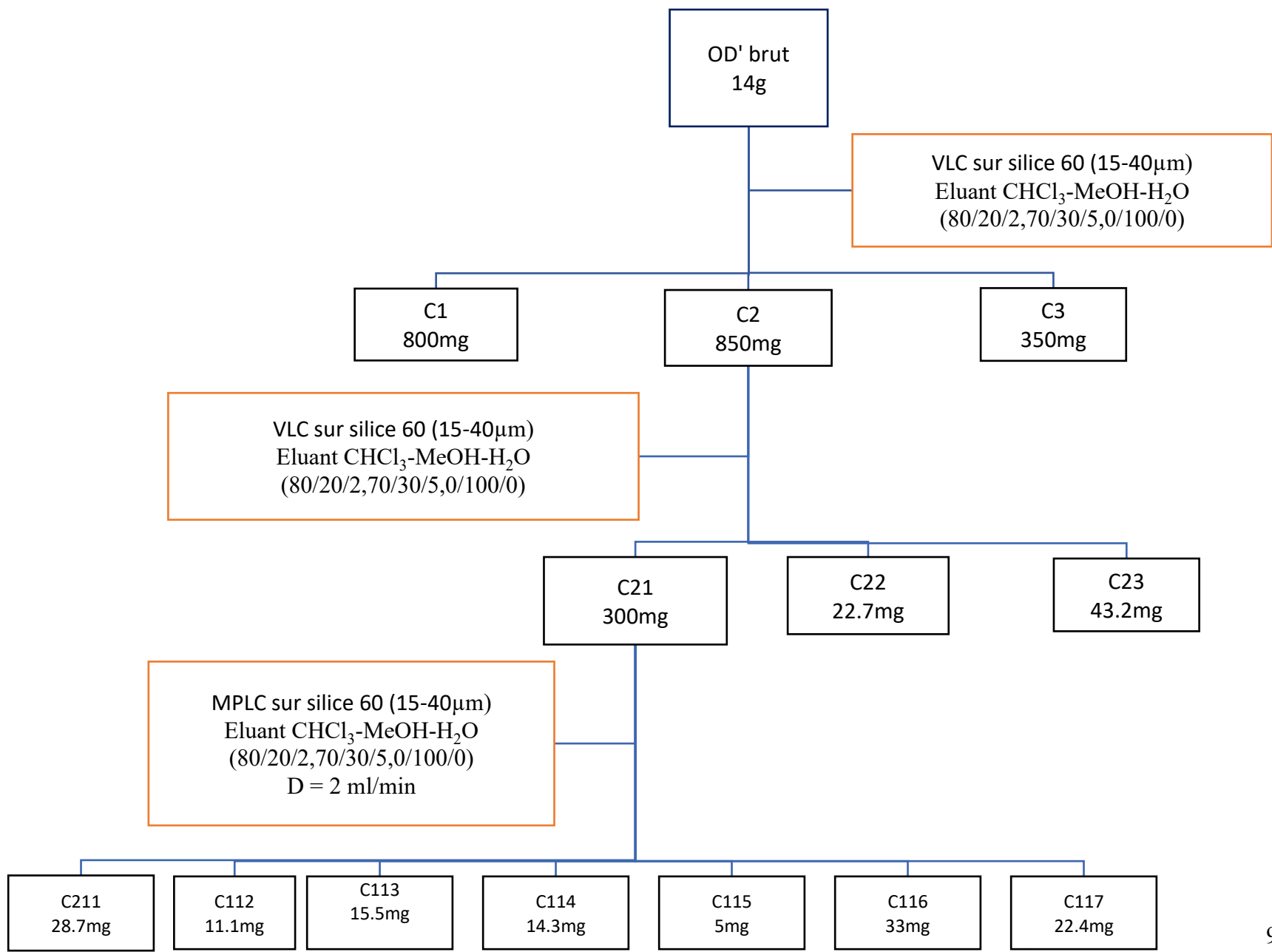


Figure 73: Etapes de purification à partir de 14 g d'extrait brut de tiges et feuilles d'OD

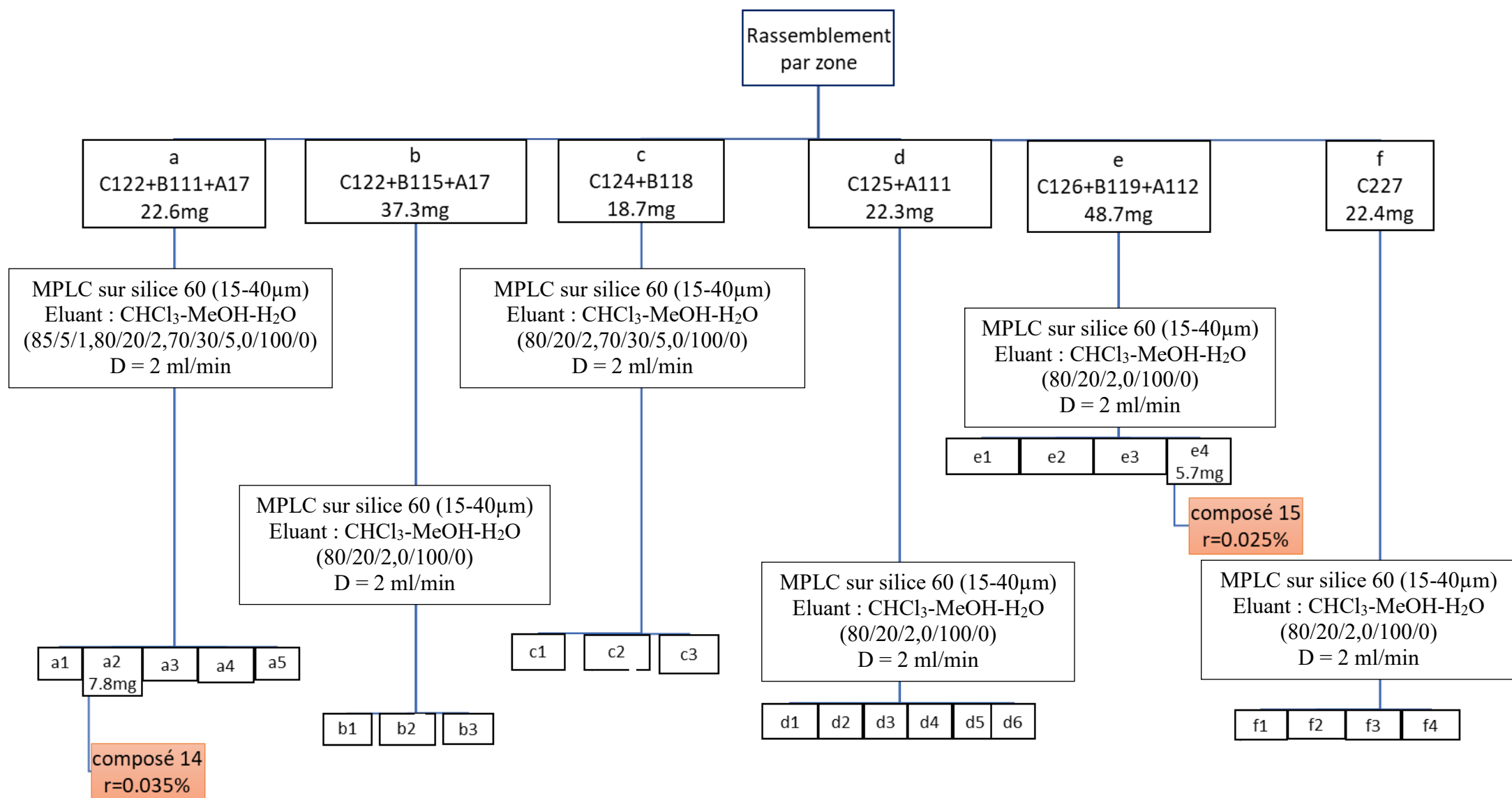


Figure 74: Etapes de purification des fractions réparties par zone jusqu'à obtention des composés 14 et 15

Deux composés ont été ainsi isolés. La pureté de ces derniers a été ensuite vérifiée par HPTLC (Fig. 74).

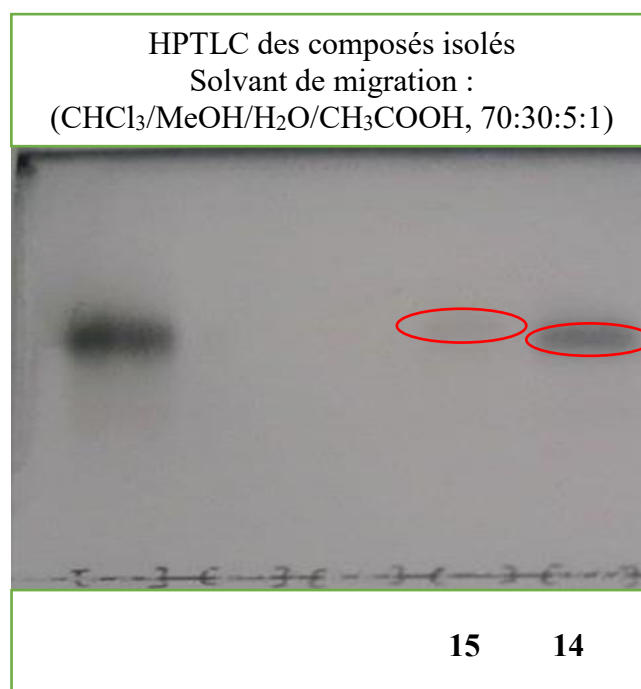


Figure 75: HPTLC des composés **14-15**

2.3.2.2 Détermination structurale du composé **14** :

2.3.2.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **14** en HRESIMS (mode positif) permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 777.5661 $[M + Na]^+$, en accord avec la formule brute $C_{39}H_{62}O_{14}Na$. Ceci suggère une masse moléculaire de 754 (Fig. 75).

2.3.2.2.2 Résonance magnétique nucléaire

2.3.2.2.2.1 Nature de l'aglycone

L'analyse des spectres RMN du composé **14** permet de constater que la zone de l'aglycone est quasiment superposable à celle du composé **9**, précédemment isolé des bulbes et racines, à l'exception de la configuration de la position 25, ($25S$) à la place de ($25R$) (Tab. 6). En effet l'analyse des corrélations HMBC, HSQC et NOESY montre la présence des signaux

caractéristiques d'un squelette spirostane sous la forme (25*S*), qui correspondent aux six carbones du cycle F à δ_C 110.0 (C-22), 30.0 (C-23), 29.8 (C-24), 34.0 (C-25), 67.0 (C-26) et 17.2 (C-27) ppm (Agrawal et coll, 1995; Agrawal, 2003). Cela permet d'établir la structure de la génine du composé **14** comme étant le (25*R*)-spirost-5-ène-1 β -3 β -diol.

2.3.2.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre RMN ^1H a montré la présence de deux protons anomériques à δ_H 4.93 et 4,94 ppm, donnant respectivement dans le spectre HSQC, des corrélations avec deux carbones anomériques à δ_C 101.0 et 105.0 ppm, indiquant ainsi la présence de deux sucres. L'analyse des spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC, la valeur de la constante de couplage de l'anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux des sucres ont permis l'identification de deux Glc (Fig. 76, Tab. 6). Les corrélations HMBC à δ_H / δ_C 4.94 (Glc II-1) / 69.5 (Glc I-6) et NOESY à δ_H / δ_H 4.94 (Glc II-1) / 4.29, 4.79 (Glc I-6a, 6b) ont permis l'identification de la séquence oligosaccharidique suivante: β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside.

La corrélation NOESY entre δ_H / δ_H 4.93 (Glc II-1) / 3.90 (H-1) montre la liaison *O*-hétérosidique entre Glc I et C-1 de l'aglycone (Fig. 77).

La structure du composé **14** est donc établie comme étant le (25*S*)-3 β -hydroxyspirost-5-en-1 β -yl *O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (Fig. 78).

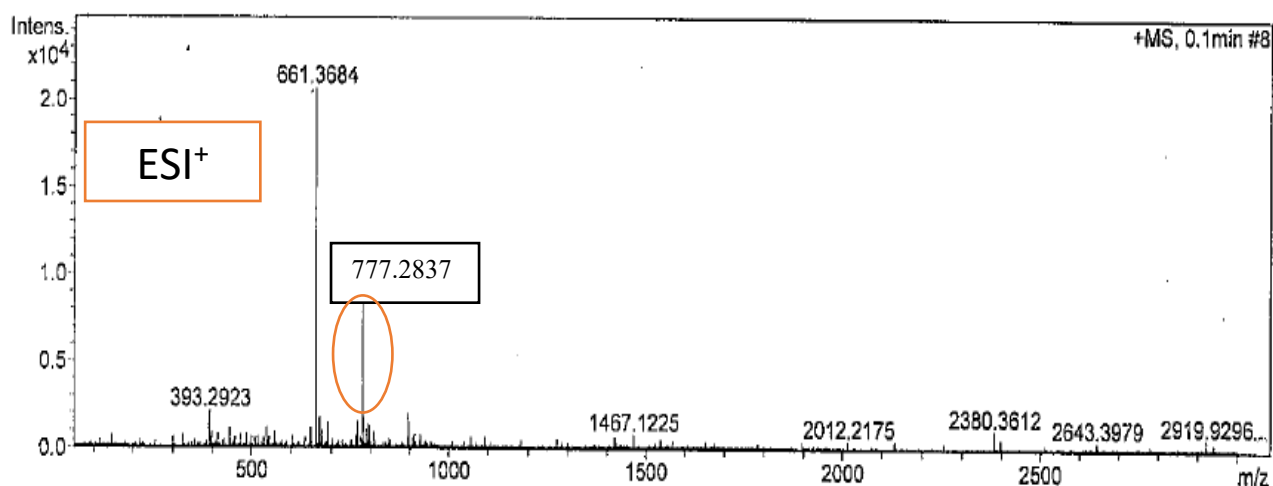


Figure 76: Spectre de masse du composé **14**

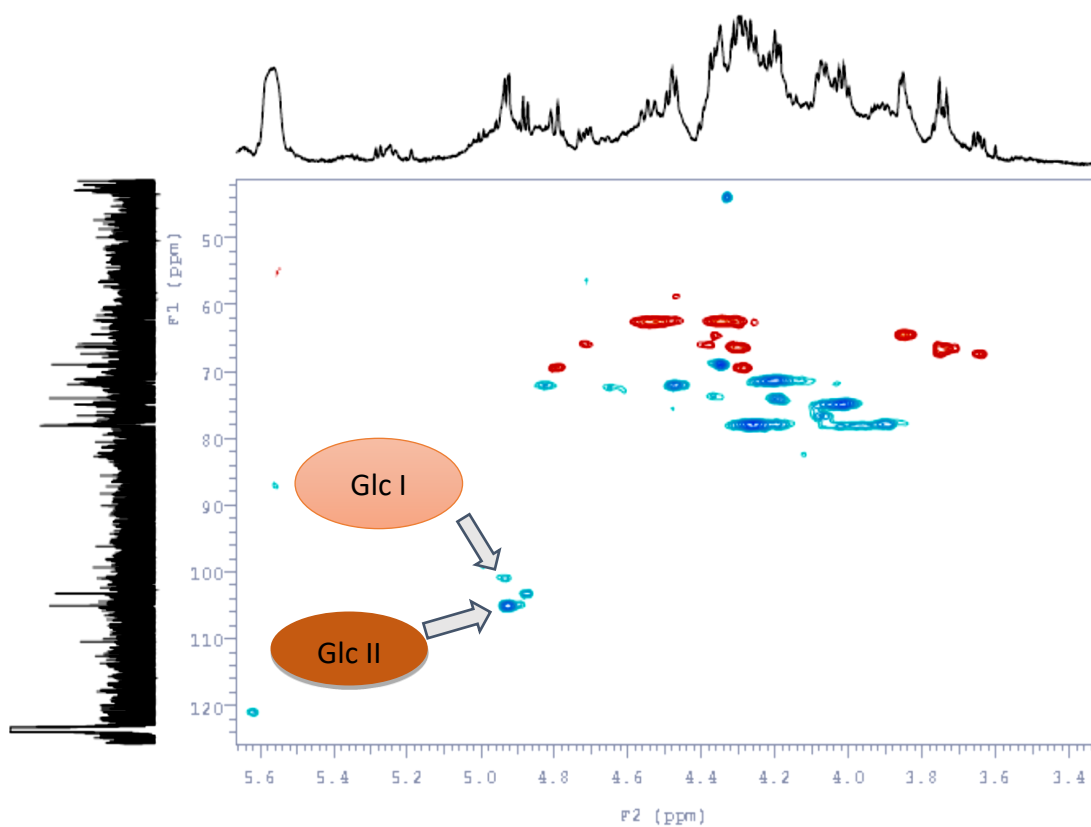


Figure 77: Spectre HSQC du composé **14** montrant les signaux des anomères des sucres

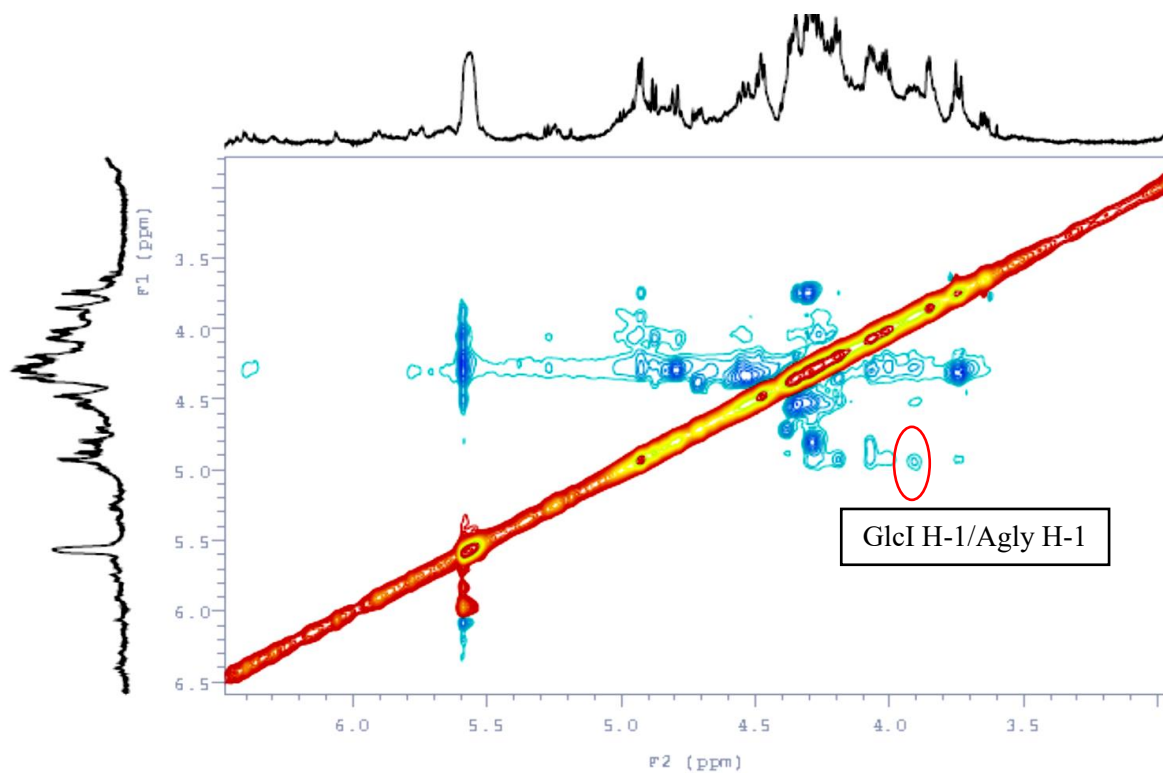


Figure 78: Spectre NOESY du composé **14** montrant le point qui relie les sucres et la génine

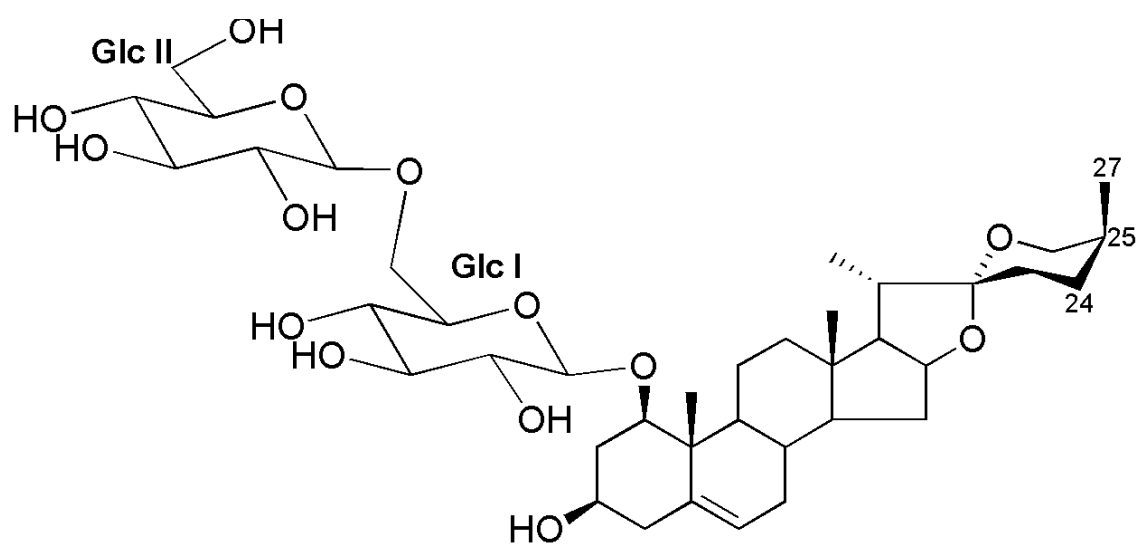


Figure 79: Structure du composé **14**

Tableau 6: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine- d_5) du composé **14**

| 14 | | | 14 | | |
|-----------|---------------------|--|------------------|---------------------|------------------------------------|
| No | δ_{C} | δ_{H} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 83.6 | 3.90 <i>dd</i> (13.3, 5.3) | 1-O-Glc I | | |
| 2 | 37.0 | 2.18 <i>m</i> nd | 1 | 101.0 | 4.93 |
| 3 | 64.5 | 3.85 <i>m</i> | 2 | 71.0 | 4.13 |
| 4 | 43.0 | 2.69 <i>br d</i> (13.3) nd | 3 | 78.0 | 4.20 |
| 5 | 138.5 | - | 4 | 71.9 | 4.20 |
| 6 | 121.0 | 5.62 <i>m</i> | 5 | 78.0 | 4.02 |
| 7 | 32.0 | 1.46 1.92 <i>m</i> | 6 | 69.5 | 4.29 4.79 <i>br d</i> (11.0) |
| 8 | 32.3 | 1.68 | Glc II | | |
| 9 | 50.0 | nd | 1 | 105.0 | 4.94 |
| 10 | 43.0 | - | 2 | 74.0 | 4.03 |
| 11 | 27.0 | 1.38 <i>m</i> nd | 3 | 78.0 | 4.23 |
| 12 | 42.0 | 1.66 1.72 | 4 | 72.0 | 4.03 |
| 13 | 40.0 | - | 5 | 78.0 | 3.90 |
| 14 | 53.8 | nd | 6 | 62.2 | 4.35 4.53 <i>dd</i> (10.5, 1.7) |
| 15 | 32.0 | 1.46 1.62 | | | |
| 16 | nd | nd | | | |
| 17 | 85.0 | - | | | |
| 18 | 11.8 | 0.66 <i>s</i> | | | |
| 19 | 13.9 | 1.23 <i>s</i> | | | |
| 20 | 40.2 | 2.02 <i>br d</i> (10.6) | | | |
| 21 | 16.3 | 1.66 | | | |
| 22 | 110.0 | - | | | |
| 23 | 30.0 | 1.60 1.64 <i>m</i> | | | |
| 24 | 29.8 | 1.26 <i>m</i> 1.34 <i>m</i> | | | |
| 25 | 34.0 | 1.60 | | | |
| 26 | 67.0 | 3.64 <i>dd</i> (13.3, 9.3) 3.74 <i>dd</i> (13.3, 5.3) | | | |
| 27 | 17.2 | 1.06 <i>d</i> (6.6) | | | |

2.3.2.3 Détermination structurale du composé **15** :

2.3.2.3.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **15** en HRESIMS (mode positif) permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 651.5900 $[M + Na]^+$ en accord avec la formule brute $C_{33}H_{56}O_{11}Na$, suggérant une masse moléculaire de 628.

2.3.2.3.2 Résonance magnétique nucléaire.

2.3.2.3.2.1 Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone du composé **15** est réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées dans les spectres HSQC, HMBC et NOESY (Tab. 7).

L'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C montre la présence des signaux caractéristiques d'une génine de type Δ^{24} cholesténique :

- quatre méthyles angulaires sous forme de singulet résonnant à δ_H 0.70 (s) (H₃-18), 1.23 (s) (H₃-19), 1.78 (s) (H₃-26), 1.74 (s) (H₃-27) ppm, et un méthyle secondaire sous forme de doublet résonnant à δ_H 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz) (H₃-21) ppm

- un proton oléfinique à δ_H 5.36 (d, $J = 10.3$ Hz) (H-24), qui donne des corrélations en HMBC avec δ_C 24.7 (C-27) et 17.3 (C-26) ppm

- deux carbones oléfiniques à δ_C 121.0 (C-24) et 138.5 (C-25) ppm

Les corrélations observées sur le spectre HSQC à δ_H / δ_C 3.69 (H-1) / 74.0 (C-1), 3.81 (H-3) / 68.0 (C-3), 4.13 (H-11) / 66.6 (C-11), 3.80 (H-16) / 66.0 (C-16), 4.64 (H-22) / 82.5 (C-22), 4.80 (H-23) / 70.0 (C-23), indiquent la présence de six fonctions alcool secondaires.

Leurs positions sont déterminées par l'observation des corrélations HMBC à δ_H / δ_C 1.67 (H-2) / 68.0 (C-3), 2.18 (H-4) / 68.0 (C-3), 1.42 (H-9) / 66.6 (C-11), 4.13 (H-11) / 49.2 (C-12), 1.40 (H-17) / 66.0 (C-16), 2.20 (H-20) / 82.5 (C-22), 4.80 (H-23) / 82.5 (C-22), 4.80 (H-23) / 121.0 (C-24), et des corrélations COSY à δ_H / δ_H 1.42 (H-9) / 4.13 (H-11), 2.20 (H-20) / 4.64 (H-22), 4.64 (H-22) / 4.80 (H-23), 4.80 (H-23) / 5.36 (H-24) . La stéréochimie à ces positions (1, 3, 11,

16, 22 et 23) (Fig. 79) est déterminée par les corrélations observées dans le spectre NOESY à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ H-1 α / H-3 α , H-1 α / H-9 α , H-9 α / H-14 α , H-14 α / H-16 α , H-16 α / H₃-21 α , H₃-21 α / H-23 α , H-23 α / H-22 α , H₃-19 β / H-11 β , H-11 β / H₃-18 β , H₃-18 β / H-20 β .

Sur la base des données spectrales ci-dessus, la structure de l'aglycone de **15** est déterminée comme étant le (22*S*,23*S*)-5 α -cholest-24-ene-1 β ,3 β ,11 α ,16 β ,22,23-hexaol, qui s'avère être un dérivé de type cholestane, inhabituel pour le genre *Ornithogalum*.

2.3.2.3.2 Détermination de la nature du sucre et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre HSQC montre la présence d'un signal anomérique à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 4.20 (d, $J = 7.6$ Hz) / 97.6. A l'aide de l'analyse des spectres COSY, TOCSY et HMBC, ainsi que la GC-MS et la valeur de la constante de couplage de l'anomère, le sucre est identifié comme étant du Glc (Fig. 80, Tab. 7). Les corrélations HMBC à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 4.20 (Glc-1) / 82.5 (C-22) et NOESY à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ 4.20 (Glc-1) / 4.64 (H-22), prouvent que le Glc est lié au C-22 de l'aglycone.

La structure du composé **15** est donc établie comme étant le (22*S*,23*S*)-1 β ,3 β ,11 α ,16 β ,23-pentahydroxy-5 α -cholest-24-en-22-yl β -D-glucopyranoside (Fig. 81).

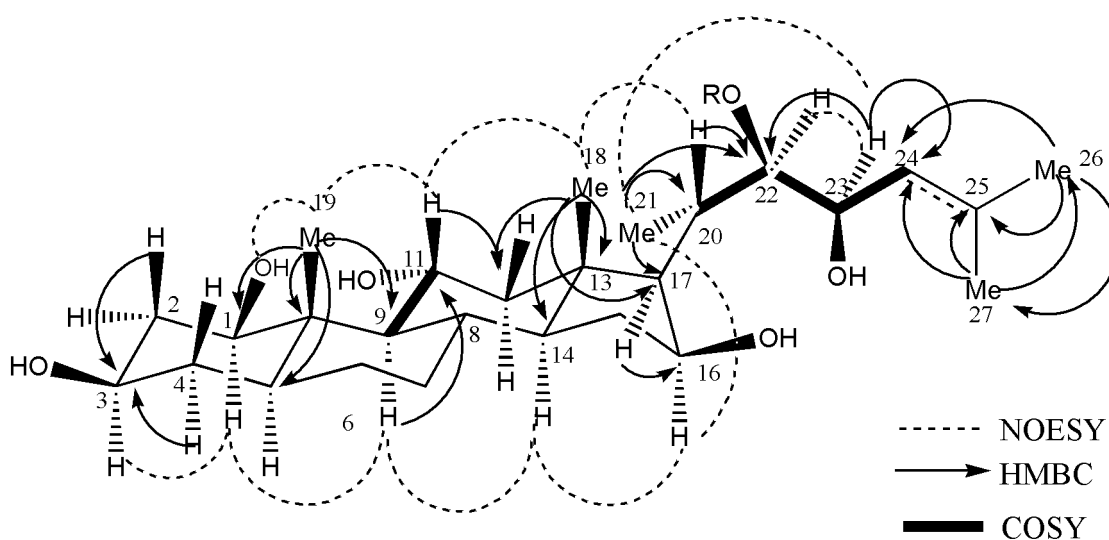


Figure 80: Les corrélations HMBC et NOESY observées dans les spectres RMN du composé **15**

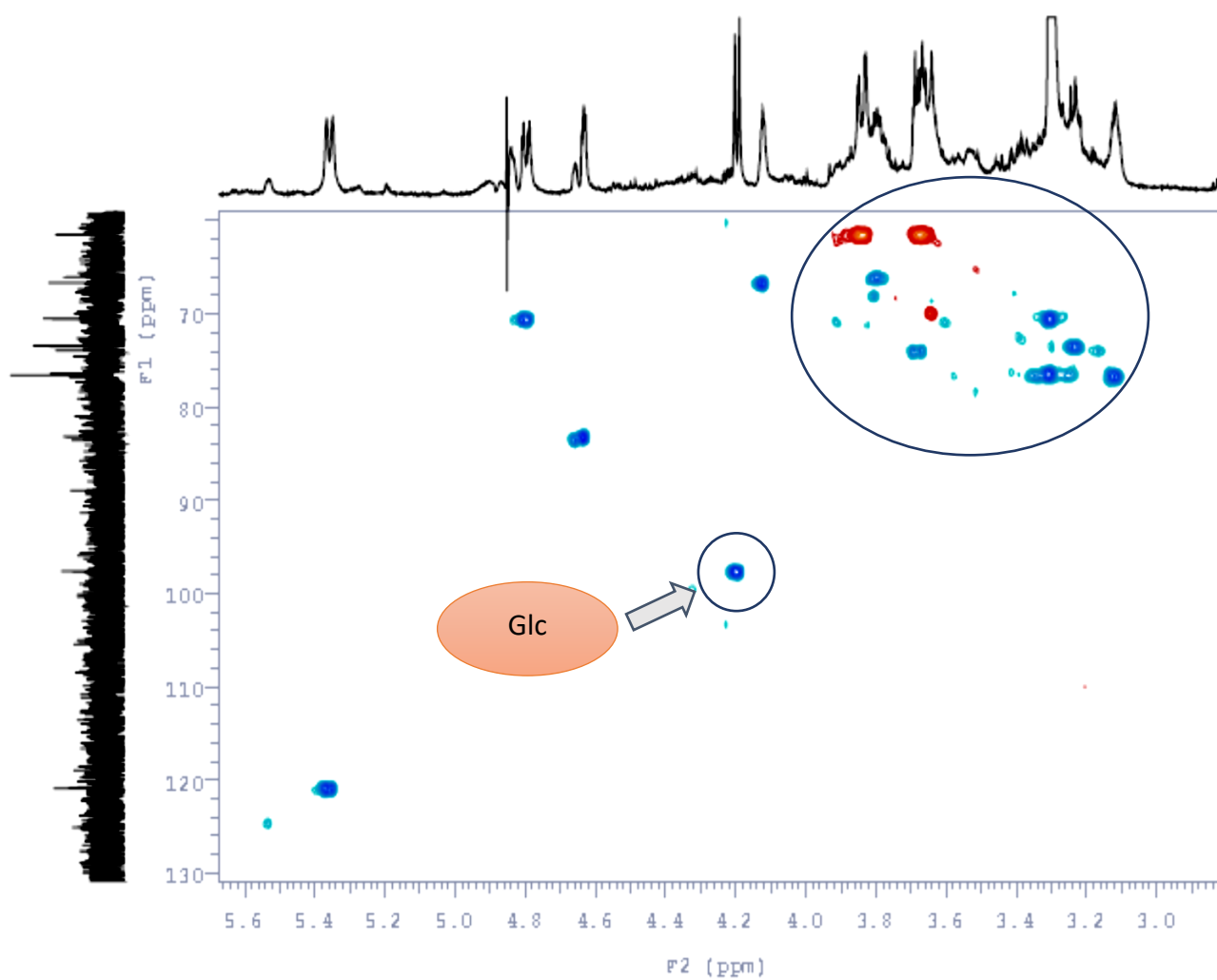


Figure 81: Spectre HSQC du composé **15**

Tableau 7: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans le CD_3OD) du composé **15**

| 15 | | | 15 | | |
|-----------|---------------------|----------------------------|-----------|---------------------|----------------------------|
| No | δ_{C} | δ_{H} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 74.0 | 3.69 <i>bd</i> (12.3) | 1 | 97.6 | 4.20 <i>d</i> (7.6) |
| 2 | 36.1 | 1.67 | 2 | 73.4 | 3.24 |
| | | 2.07 <i>m</i> | 3 | 76.4 | 3.32 |
| 3 | 68.0 | 3.81 <i>m</i> | 4 | 70.4 | 3.32 |
| 4 | 42.0 | 2.18 <i>m</i> | 5 | 76.5 | 3.12 <i>m</i> |
| | | nd | 6 | 61.4 | 3.66 |
| 5 | 47.0 | 1.57 <i>m</i> | | | 3.84 <i>dd</i> (11.7, 2.3) |
| 6 | 27.0 | 1.54 <i>m</i> | | | |
| | | 2.04 <i>m</i> | | | |
| 7 | 33.2 | 1.28 <i>m</i> | | | |
| | | nd | | | |
| 8 | 36.2 | 1.71 <i>m</i> | | | |
| 9 | 53.5 | 1.42 <i>t</i> (10.5) | | | |
| 10 | 42.4 | - | | | |
| 11 | 66.6 | 4.13 <i>m</i> | | | |
| 12 | 49.2 | 1.21 | | | |
| | | 2.30 <i>dd</i> (11.7, 4.9) | | | |
| 13 | 42.7 | - | | | |
| 14 | 55.0 | 1.18 <i>m</i> | | | |
| 15 | 38.2 | 1.80 <i>m</i> | | | |
| | | 1.82 <i>m</i> | | | |
| 16 | 66.0 | 3.80 <i>m</i> | | | |
| 17 | 53.9 | 1.40 <i>t</i> (9.9) | | | |
| 18 | 11.6 | 0.70 <i>s</i> | | | |
| 19 | 18.5 | 1.23 <i>s</i> | | | |
| 20 | 39.2 | 2.20 <i>m</i> | | | |
| 21 | 12.7 | 0.96 <i>d</i> (6.4) | | | |
| 22 | 82.5 | 4.64 <i>dd</i> (3.9, 2.8) | | | |
| 23 | 70.0 | 4.80 <i>dd</i> (10.3, 2.8) | | | |
| 24 | 121.0 | 5.36 <i>d</i> (10.3) | | | |
| 25 | 138.5 | - | | | |
| 26 | 24. | 1.78 <i>s</i> | | | |
| 27 | 17.3 | 1.74 <i>s</i> | | | |

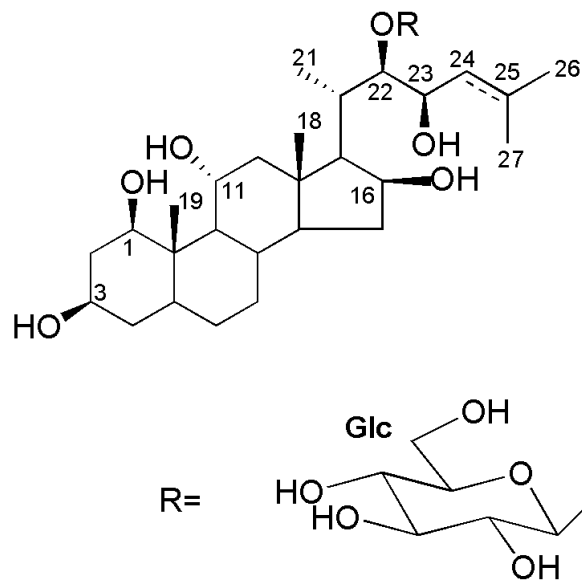


Figure 82: Structure du composé **15**

L'étude phytochimique des tiges et feuilles d'*Ornithogalum dubium* a donc permis d'isoler deux nouveaux composés. Nous verrons dans la partie suivante l'étude des fleurs.

2.3.3 Fleurs

L'étude phytochimique des fleurs d'*O. dubium* a permis l'isolement d'un composé de structure nouvelle (**16**) en utilisant diverses techniques chromatographiques. Les étapes d'extraction et de purification de ce dernier sont présentées synthétiquement dans les figures 82 et 83 et sont suivies de sa détermination structurale.

2.3.3.1 1 Extraction et isolement du composé 16

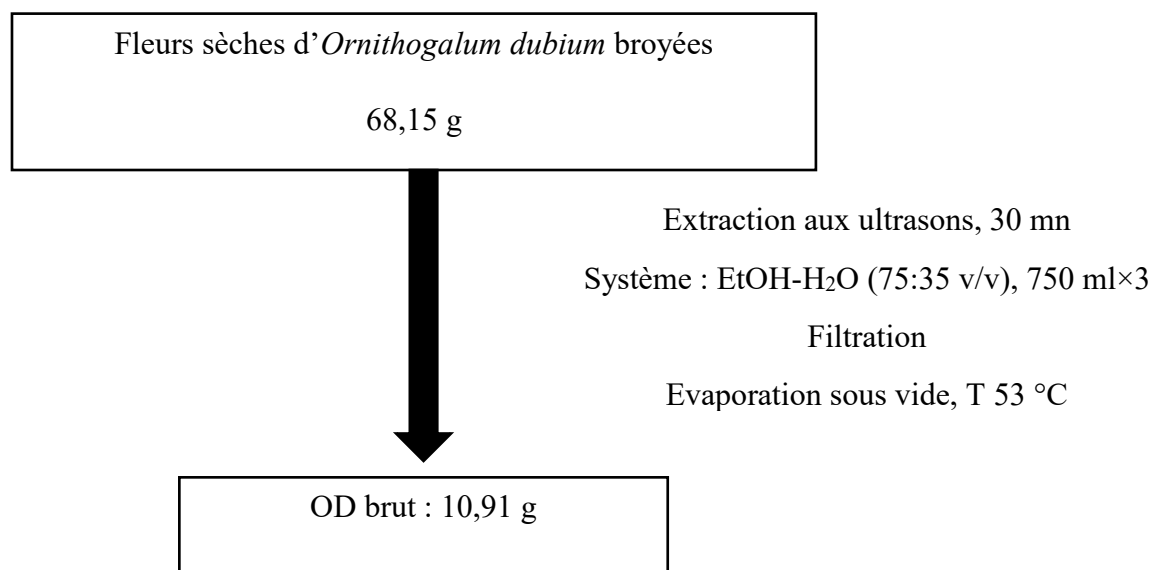


Figure 83: Schéma d'extraction des saponines des fleurs d'*O. dubium*

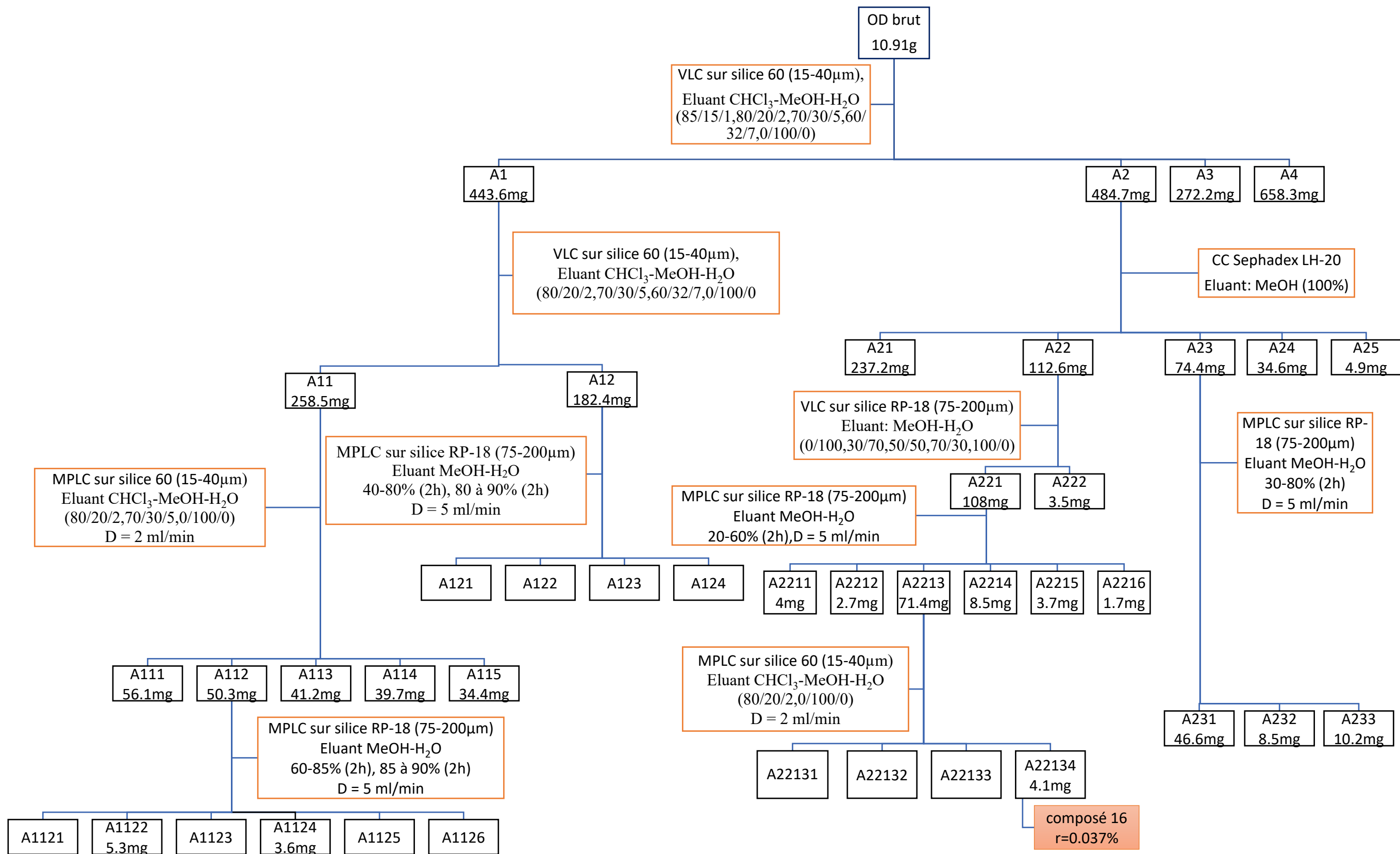


Figure 84: Etapes de purification du composé 16

Un composé a été ainsi isolé. La pureté de ce dernier a été ensuite vérifiée par HPTLC (Fig. 84).

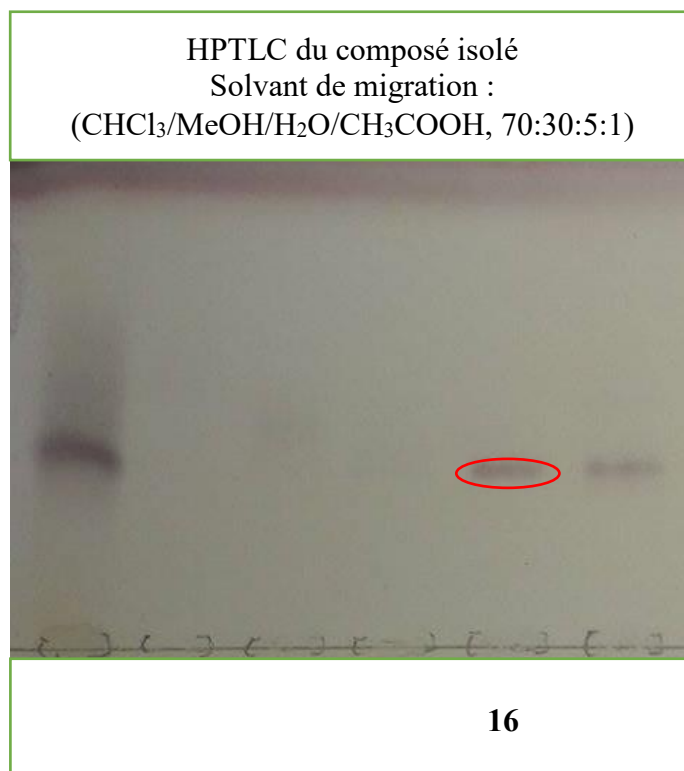


Figure 85: HPTLC du composé **16**

2.3.3.2 Détermination structurale du composé **16** :

2.3.3.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse du composé **16** en HRESIMS mode positif, permet d'observer un ion quasi-moléculaire à m/z 927.522 $[M + Na]^+$ en accord avec la formule brute C₄₅H₇₆O₁₈Na. Le spectre de masse ESIMS en mode négatif montre un pic quasi-moléculaire à m/z 903 $[M - H]^-$, qui suggère un poids moléculaire de 904 (Fig. 85).

2.3.3.2.2 Résonance Magnétique Nucléaire

2.3.3.2.2.1 Nature de l'aglycone

L'analyse des spectres RMN du composé **16** permet de constater que la zone de l'aglycone est quasiment superposable à celle du composé **15**, précédemment isolé des tiges et feuilles, sauf au niveau des positions C-1 et C-11 (Tab. 8). Dans le spectre HSQC, les deux fonctions alcooliques secondaires à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 3.69 (H-1) / 74.0 (C-1) et 4.13 (H-11) / 66.6 (C-11) dans **15** sont remplacées par deux signaux méthyléniques à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 1.92 (H-1) / 35.1 (C-1) et 1.06, 2.04 (H-11a, H-11b) / 19.0 (C-11) de **16**.

La stéréochimie des positions (3, 16, 22 et 23) est déterminée par les corrélations observées dans le spectre NOESY $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ H-3 α / H-9 α , H-9 α / H-14 α , H-14 α / H-16 α , H-16 α / H₃-21 α , H₃-21 α / H-23 α , H-23 α / H-22 α , H₃-19 β / H-8 β , H-8 β / H₃-18 β , et H₃-18 β / H-20 β . Sur la base des données ci-dessus, la structure de **16** est déterminée comme étant le (22*S*,23*S*)-5 α -cholest-24-ene-3 β ,16 β ,22,23-tetraol, un dérivé de type cholestane inhabituel pour le genre *Ornithogalum*, tout comme le composé **15**.

2.3.3.2.2.2 Détermination de la nature des sucres, leur enchainement, et liaison avec l'aglycone

L'analyse du spectre RMN ¹H a montré la présence de trois protons anomériques à δ_{H} 4.81 (d, $J = 7.9$ Hz), 4.96 (d, $J = 7.2$ Hz), 6.29 (br s), corrélant dans le spectre HSQC avec trois carbones anomériques à δ_{C} 105.0, 101.3, 101.3 ppm. L'analyse des spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC, la valeur de la constante de couplage de l'anomère ainsi que l'analyse par GC des dérivés chiraux de sucres ont permis l'identification de deux Glc et d'un Rha (Fig. 86, Tab. 8). Grâce aux corrélations HMBC à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 4.81 (d, $J = 7.9$ Hz) (Glc I-1) / 78.0 (C-3), 4.96 (d, $J = 7.2$ Hz) (Glc II-1) / 84.7 (C-16) (Fig. 87) et NOESY à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ 4.81 (Glc I-1) / 3.96 (H-3) (Fig. 88), les liaisons entre Glc I et C-3 et entre Glc II et C-16, ont été déterminées.

La corrélation HMBC à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 6.29 (br s, Rha-1) / 78.0 (Glc II-4), ainsi que la corrélation NOESY à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ 6.29 (Rha-1) / 4.18 (Glc II-4), montrent que Rha est lié en position 4 du Glc II.

La structure du composé **16** est donc établie comme étant le (22*S*,23*S*)-3β-[(β-D-glucopyranosyl)-oxy]-22,23-dihydroxy-5α-cholest-24-en-16β-yl *O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→4)-β-D-glucopyranoside (Fig. 89).

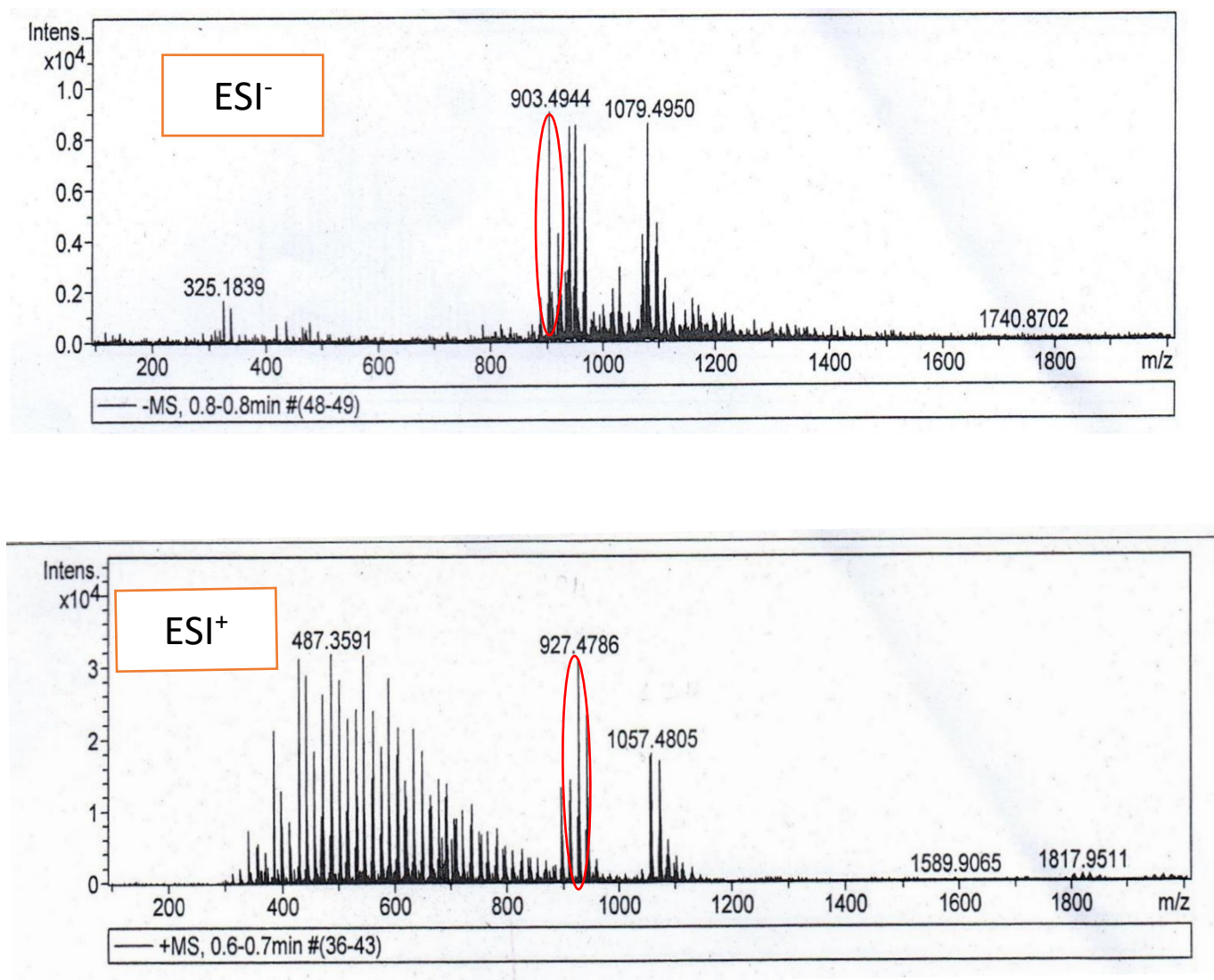


Figure 86: Spectre de masse du composé **16**

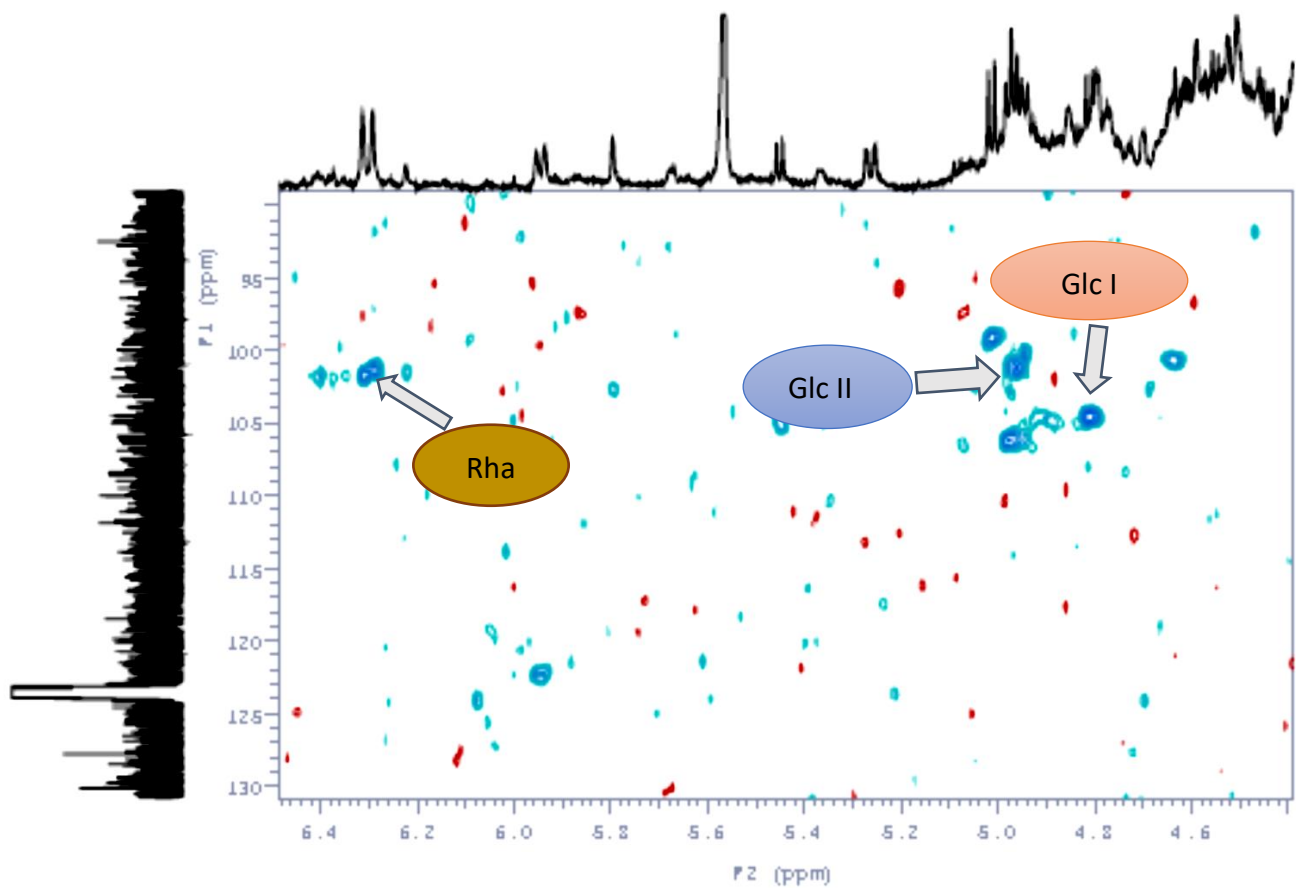


Figure 87: Spectre HSQC du composé **16**

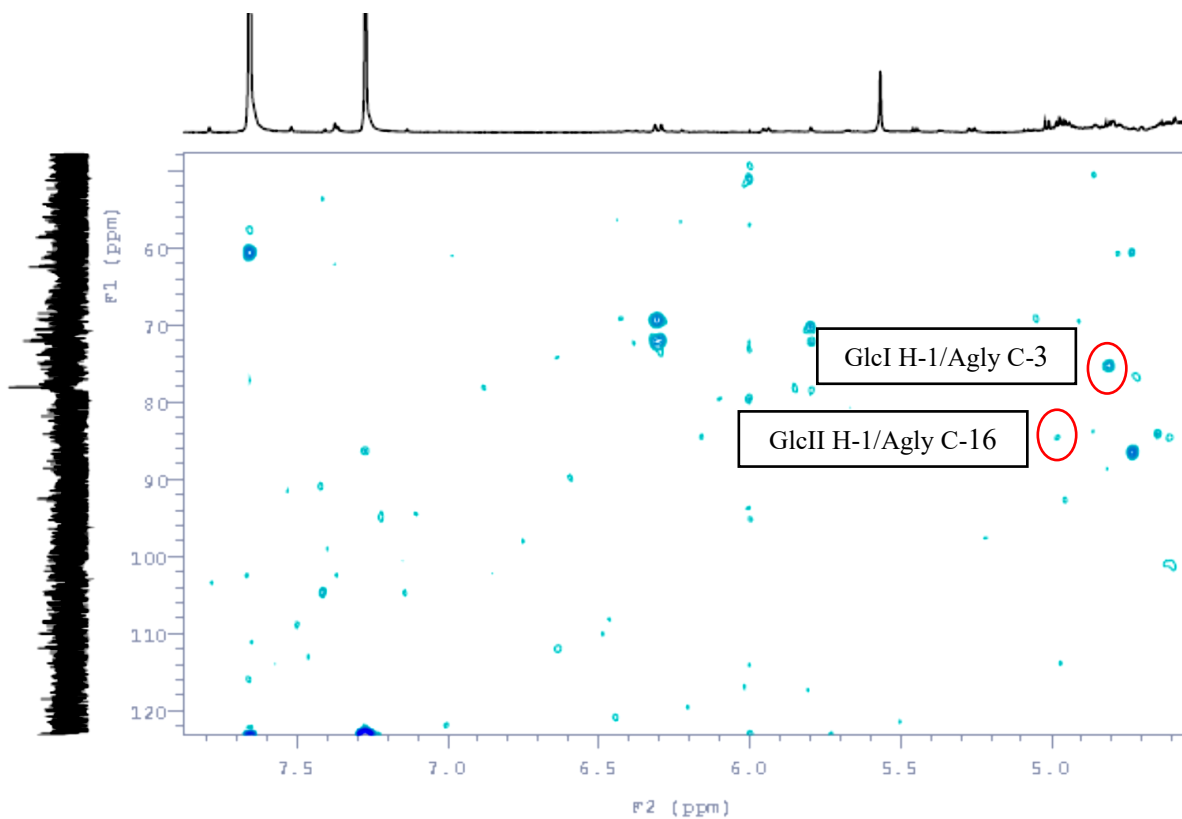


Figure 88: Spectre HMBC du composé **16** montrant les points de liaison des sucres avec la génine

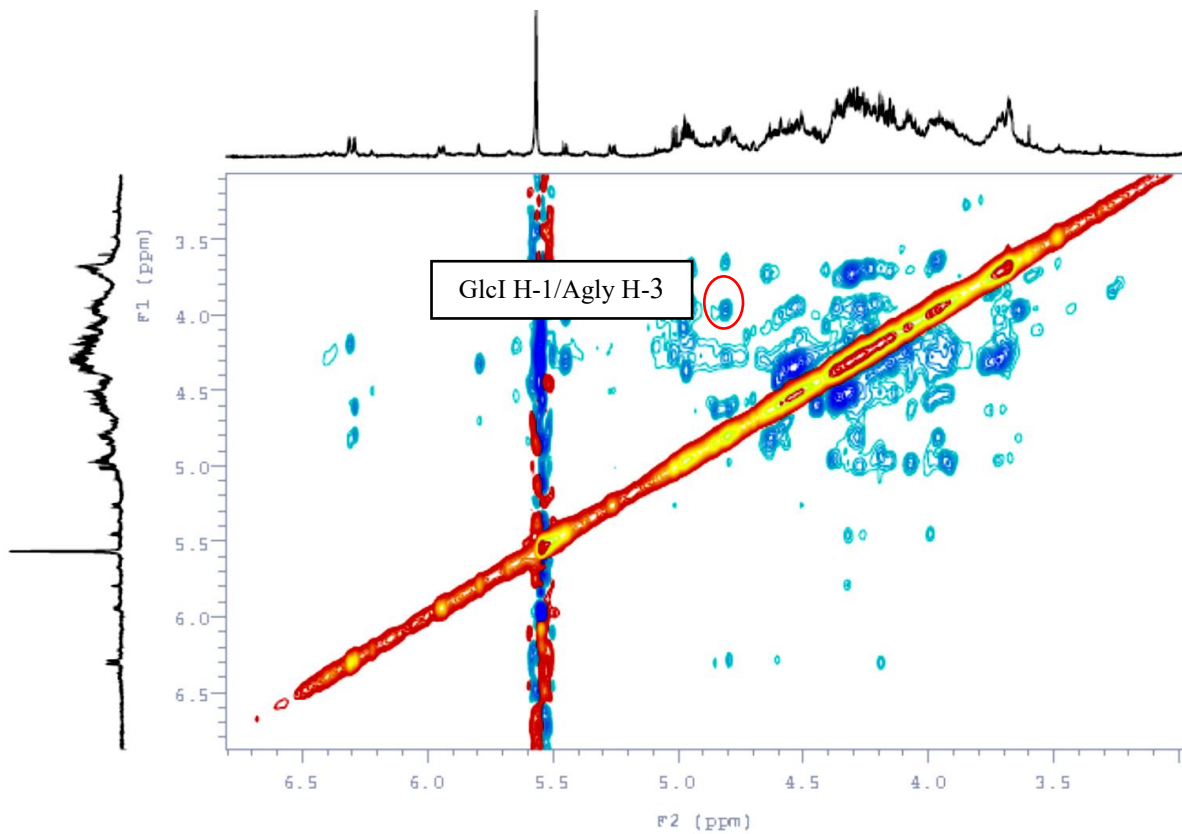


Figure 89 : Spectre NOESY du composé **16**

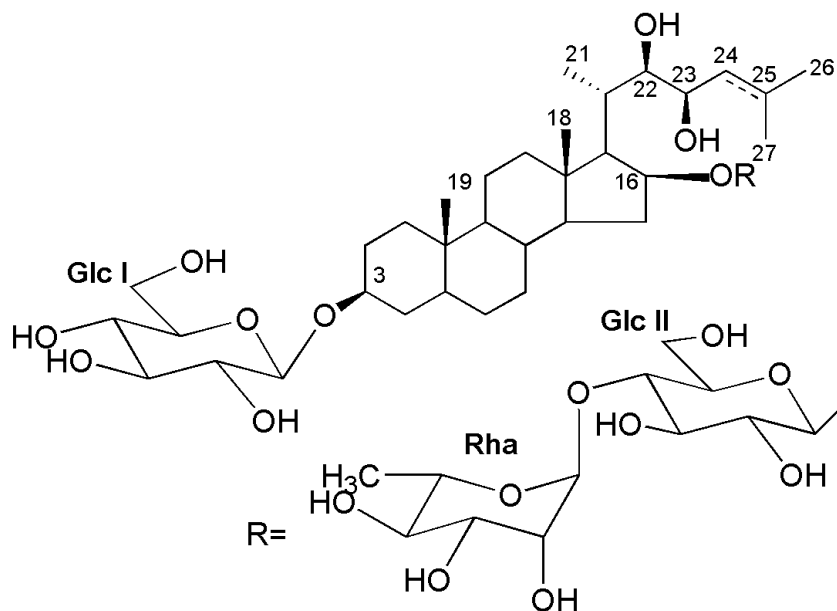


Figure 90: Structure du composé **16**

Tableau 8: Valeurs des déplacements chimiques du carbone et du proton (RMN ^1H et ^{13}C dans la pyridine- d_5) du composé **16**

| 16 | | | 16 | | |
|-----------|---------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|------------------------------------|
| No | δ_{C} | δ_{H} | No | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 35.1 | nd 1.92 <i>m</i> | 3-O-Glc I | | |
| 2 | 30.8 | nd 1.82 <i>m</i> | 1 | 105.0 | 4.81 <i>d</i> (7.9) |
| 3 | 78.0 | 3.96 <i>m</i> | 2 | 75.2 | 4.05 |
| 4 | 40.5 | nd 2.26 <i>m</i> | 3 | 78.0 | 4.28 |
| 5 | 41.5 | 2.10 <i>m</i> | 4 | 72.0 | 4.24 <i>t</i> (9.9) |
| 6 | 26.7 | 1.20 <i>m</i> 1.80 <i>m</i> | 5 | 78.0 | 3.90 <i>m</i> |
| 7 | 30.5 | 1.52 <i>m</i> 1.60 <i>m</i> | 6 | 62.4 | 4.35 4.53 <i>dd</i> (11.4, 4.4) |
| 8 | nd | nd | 16-O-Glc II | | |
| 9 | 54.5 | nd | 1 | 101.3 | 4.96 <i>d</i> (7.2) |
| 10 | 36.8 | - | 2 | 75.0 | 3.97 |
| 11 | 19.0 | 1.06 <i>m</i> 2.04 <i>m</i> | 3 | 78.0 | 4.16 <i>t</i> (9.4) |
| 12 | 43.5 | nd 2.60 <i>m</i> | 4 | 78.0 | 4.18 <i>t</i> (8.8) |
| 13 | 44.0 | - | 5 | 78.0 | 3.95 <i>m</i> |
| 14 | 56.2 | nd | 6 | 62.4 | 4.35 4.53 <i>dd</i> (11.4, 4.4) |
| 15 | 37.0 | nd 2.94 <i>m</i> | Rha | | |
| 16 | 84.7 | nd | 1 | 101.3 | 6.29 <i>bs</i> |
| 17 | 54.0 | 1.15 <i>t</i> (7.0) | 2 | 72.8 | 4.80 |
| 18 | 11.9 | 0.62 <i>s</i> | 3 | 72.8 | 4.64 |
| 19 | 23.8 | 0.97 <i>s</i> | 4 | 74.0 | 4.38 |
| 20 | 41.5 | 2.10 <i>m</i> | 5 | 69.2 | nd |
| 21 | 14.1 | 1.25 <i>d</i> (7.0) | 6 | 19.0 | 1.70 <i>d</i> (5.9) |
| 22 | 75.5 | 4.07 | | | |
| 23 | 73.0 | 5.25 <i>dd</i> (10.3, 2.5) | | | |
| 24 | 122.0 | 5.94 <i>d</i> (10.3) | | | |
| 25 | 138.0 | - | | | |
| 26 | 25.9 | 1.72 <i>s</i> | | | |
| 27 | 18.5 | 2.04 <i>s</i> | | | |

2.3.4 Conclusion

Huit saponines ont été isolées d'*Ornithogalum dubium* dont cinq dans les bulbes et racines (**9-13**), deux autres dans les tiges et les feuilles (**14,15**) et une seule dans les fleurs (**16**). Leurs structures ont été établies par une analyse détaillée de leurs données spectrales principalement par des expériences de RMN 2D à 600 MHz (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), et par spectrométrie de masse (electrospray). Les composés **12** et **13**, de structures connues, ont été préalablement isolés respectivement du *Polygonati rhizoma* (Ono et coll., 1988) et d'*Ornithogalum thyrsoïdes* (Kuroda et coll., 2004). Ces molécules ont été identifiées comme (25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-en-1β-yl *O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside (**12**) et (25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-en-1β-yl *O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-α-L-arabinopyranoside (**13**), par comparaison des données spectroscopiques obtenues avec les valeurs de la littérature. Les six autres saponines sont des nouveaux composés (Fig. 90).

D'un point de vue chimiotaxonomique, le genre *Ornithogalum* est riche en glycosides de type spirostane et cholestane, en particulier chez *O. thyrsoïdes* (Kuroda et coll., 2002, 2004, 2006 ; Cao et coll., 2012), et *O saundersiae* (Kubo et coll., 1992 ; Kuroda et coll., 1995, 1999, 2001 ; Mimaki et coll., 1996, 1997 ; Iguchi et coll., 2017). Ce n'est donc pas surprenant de trouver les aglycones de **9-14** parmi les saponines isolées à partir de l'*O. dubium*. Par contre, dans notre étude, des dérivés inhabituels d'aglycones de type cholestane (**15** et **16**), avec une fonction alcoolique en position 23, ont été découverts pour ce genre.

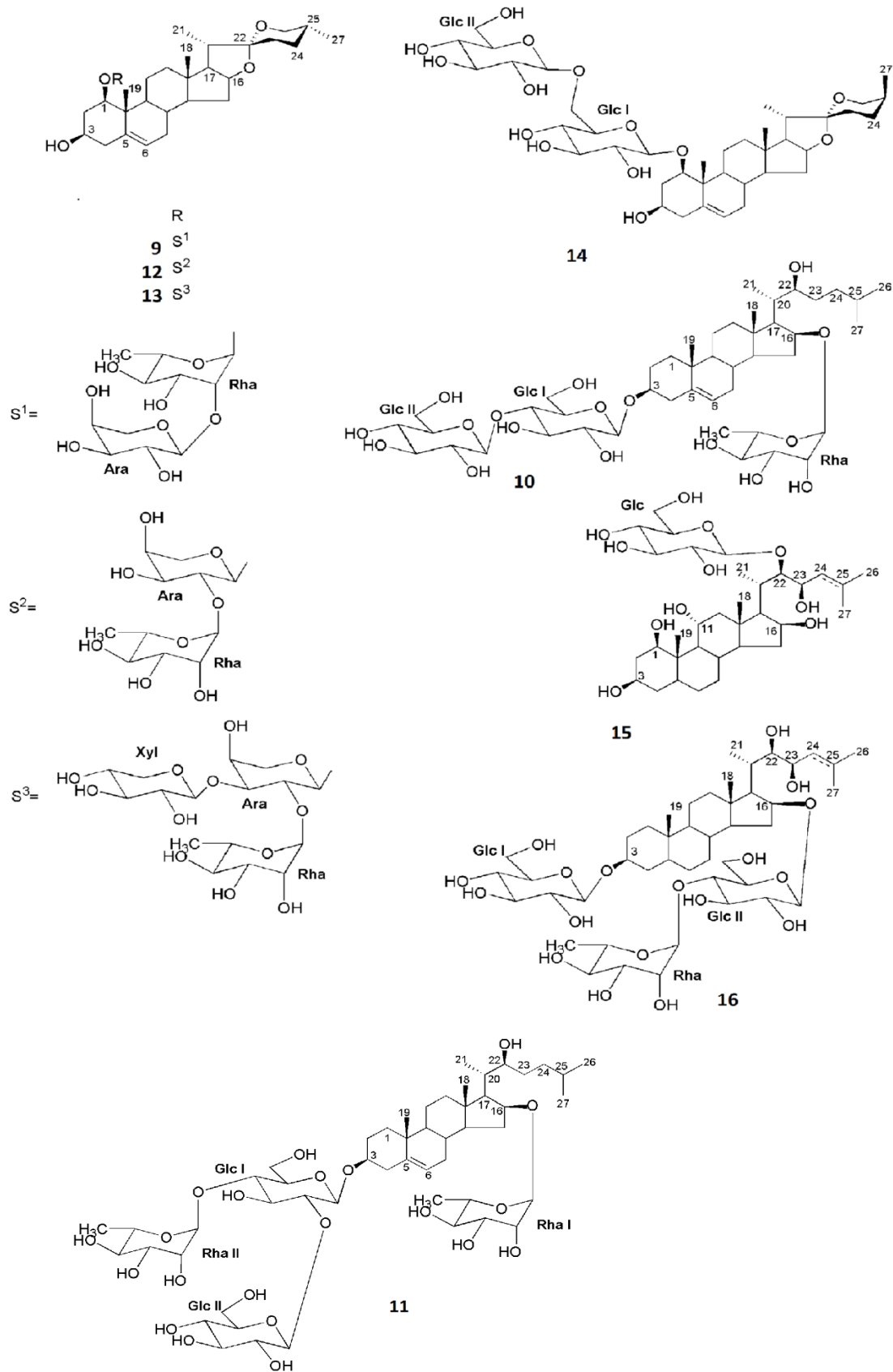


Figure 91: Structure des composés 9-16

Partie III : Etude biologique

Reconnues pour leur potentiel biologique et pharmacologique, les saponines ont suscité un intérêt croissant au cours des dernières années. De nombreuses revues scientifiques ont traité l'aspect pharmacologique *in vitro* de cette classe de métabolites secondaires. Ainsi, plusieurs articles ont souligné leur pouvoir anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobien, immunoadjuvant, immunostimulant, antiparasitaire et antiviral (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996, 2000 ; Lacaille-Dubois, 1999, 2005a et b ; Rao et coll., 2000, Francis et coll., 2000 ; Sparg et coll., 2004 ; Yang et coll., 2006). En raison de leur toxicité après administration parentérale due au pouvoir hémolytique de certains composés, les études cliniques sont limitées. A ce jour, un dérivé de *Quillaja saponaria* QS21 a reçu un avis favorable de l'agence européenne des Médicaments (EMA, 2016) pour son utilisation comme adjuvant dans un vaccin contre le paludisme. En revanche, en raison de la faible toxicité par voie orale, ces molécules sont largement utilisées dans des phytomédicaments.

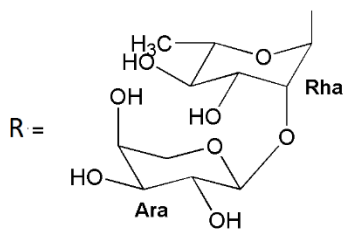
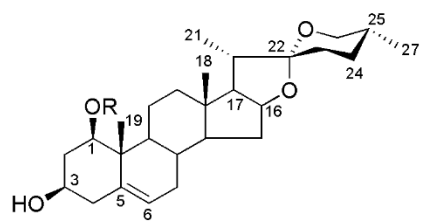
L'activité cytotoxique a été décrite pour un certain nombre de saponines, et de nombreux articles traitant ce sujet continuent à apparaître dans la littérature scientifique chaque année. L'une des premières études a été rapportée en 1960 par Fries et coll., dans laquelle les saponines isolées du concombre de mer ont montré une activité anti-tumorale intéressante. Et depuis, de nombreuses publications sont apparues sur les propriétés cytotoxiques et antitumorales de cette classe phytochimique (Hostettman et coll., 2000; Lacaille-Dubois et Wagner, 1996; Lacaille-Dubois, 2005; Pettit et coll., 1991 ; Sautour et coll., 2007 ; Rao et coll., 1995). Les saponines pourraient donc agir en tant qu'agents anticancéreux potentiels en inhibant la carcinogénèse ou par des effets antiprolifératifs et/ou cytotoxiques directs contre des cellules cancéreuses (Lacaille Dubois et Wagner, 1996; Lacaille-Dubois , 2005 ; Pettit et coll., 1991). La plupart de ces études sont réalisées *in vitro*, et seulement 10% d'entre elles ont atteint le stade préclinique, principalement sur des rongeurs. Il est intéressant de noter que la plupart des composés ont été testés sur des souris, et que seulement 24% des études ont été réalisées sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines, dont les principales sont ; HeLa (épithéliales de l'utérus), MCF-7, MDA-MB43 (adénocarcinôme mammaire), Hep-G2 (carcinôme du foie), HL-60 (leucémie aigüe promyélocytaire), Caco-2, HT-29, HCT116 et SW480 (colon) (Thakur et coll., 2011).

Le chapitre suivant présente les résultats des tests biologiques réalisés sur des saponines que nous avons isolées et sélectionnées.

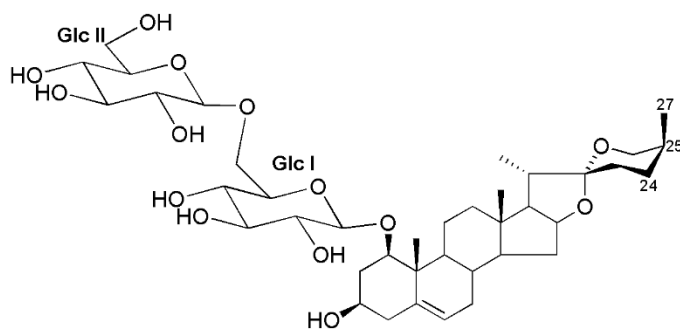
1 Travaux biologiques sur les saponines isolées d'*Ornithogalum dubium* Houtt

Les tests biologiques ont été réalisés au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, INSERM, U1231, Lipides Nutrition Cancer, par l'équipe du Dr Frédéric Lirussi.

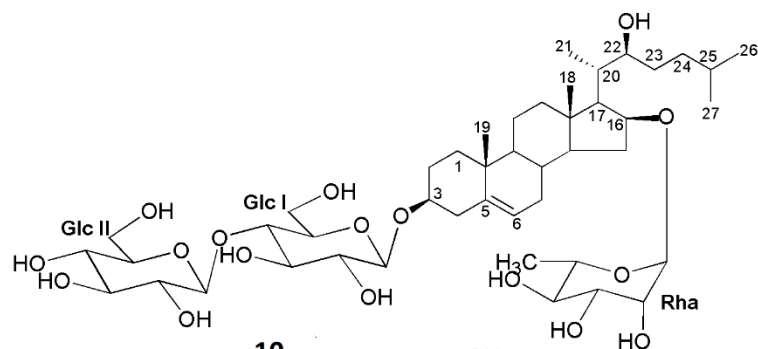
Étant donné que certaines saponines, des dérivés du cholestane, isolées de *Ornithogalum saundersiae* sont cytotoxiques sur des lignées cellulaires humaines HL 60 avec des CI_{50} de l'ordre du nM (Kuroda et coll., 2001), nous avons étudié la cytotoxicité des composés **9**, **10**, **14**, **15** et **16** en utilisant le test au XTT, sur des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire humain A549 et de leucémie aigüe promyélocytaire humaine HL 60, à différentes doses (0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Au niveau structural, **9** et **14** sont des dérivés du spirostane, et **10**, **15** et **16** des dérivés du cholestane (Fig. 91).



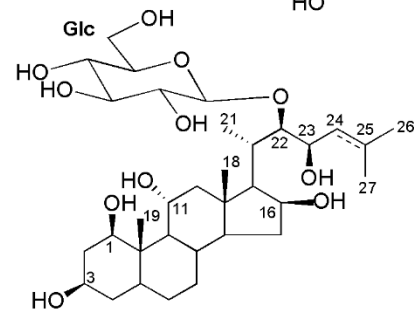
9



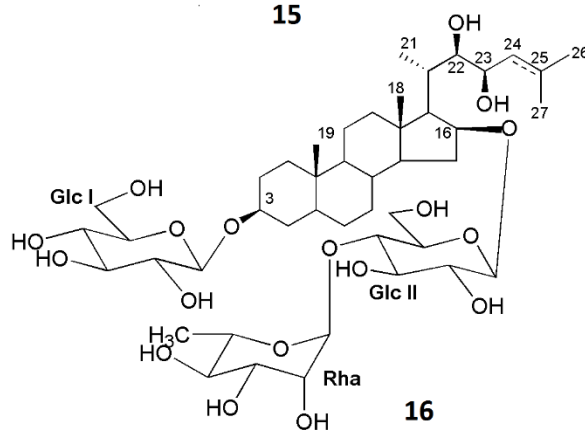
14



10



15



16

Figure 92: Structure des composés **9**, **10**, **14**, **15** et **16**

1.1 Etude de la viabilité cellulaire – test au XTT

Le test de prolifération cellulaire au XTT (2H-tétrazolium,2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophényle)-5-[(phénylamino)carbonyle]-,inner salt) a été décrit pour la première fois par Scudiero et coll., 1988 comme étant une technique efficace pour évaluer la croissance cellulaire et la sensibilité aux drogues des lignées cellulaires tumorales.

Le principe de ce test est similaire au test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) et permet de mesurer l'activité métabolique de cellules vivantes en culture. Le XTT est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale (enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale) des cellules vivantes actives en un composé orangé hautement soluble dans l'eau (Fig. 92). La quantité de composé réduit formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et actives métaboliquement et peut être quantifiée à l'aide d'un dosage spectrophotométrique en mesurant la densité optique à deux longueurs d'onde : une longueur d'onde comprise entre 450-500 nm (490 nm) (test) et une longueur d'onde entre 630 - 690 nm (660 nm) (blanc). L'expression des résultats est donnée par les valeurs de CI_{50} , c'est-à-dire la concentration de la molécule testée qui réduit de 50% le nombre de cellules viables par rapport aux cellules témoin sans le produit à tester.

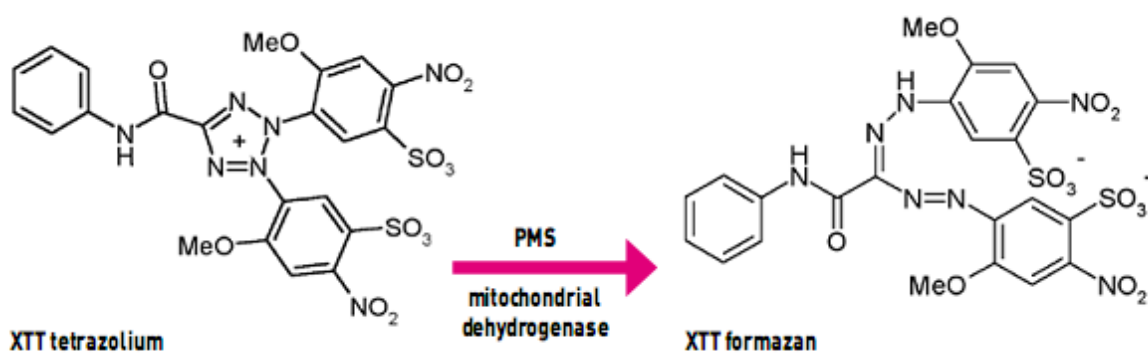


Figure 93: Réaction de réduction enzymatique du XTT

www.applichem.com

1.2 Protocole expérimental

1.2.1 Réactifs :

-milieu de culture : RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*),

-solution de pénicilline/streptomycine,

-solution tampon : tampon phosphate salin (PBS),

-sérum fœtal bovin (FBS),

-cisplatine,

-XTT,

-kit de prolifération cellulaire (Sigma Aldrich, Réf 114 651 5001).

1.2.2 Culture cellulaire.

Les lignées cellulaires HL-60 (phénotype leucémie aigüe promyélocytaire, ATCC ® CCL-240™) et A-549 (phénotype pulmonaire épithélial, ATCC ® CCL - 185EMT™) ont été fournies par l'ATCC (*American Type Culture Collection*, fournisseur de lignées cellulaires). Elles ont été cultivées dans le milieu RPMI-1640 contenant 2 mM de L-glutamine, 20% de FBS (pour les HL-60) ou 10% (pour les A-549) et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été stockées dans un incubateur humidifié à 37C° avec 5% de CO₂. Les cellules ont été utilisées lorsque la confluence atteignait 70 à 80%.

La dose CI₅₀ et l'effet cytotoxique des composés isolés ont été déterminés à l'aide du test au XTT dans les cellules A-549 et HL-60 selon la méthode de Zhang et coll., 2018. Les composés ont été dissous dans l'éthanol et le cisplatine (témoin positif) dans l'eau. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de 10³cellules / puits et les plaques sont incubées pendant 24 h. Chaque lignée cellulaire a été traitée avec différentes doses de composés (0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 200 µM) seules (HL-60, A549) ou avec 10 µM de cisplatine (A-549) pendant 48 h. Ensuite, 50 µl de solution de XTT a été ajoutée aux puits et les plaques ont été ré-incubées pendant 4 h. La quantité de viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm (longueur d'onde de référence 450-500 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques (VICTOR). Chaque essai a été

effectué en octuplicate et en trois expériences indépendantes. La cytotoxicité a été exprimée en % de la viabilité par rapport à celle des cellules témoins incubées dans le même milieu sans les composés testés.

1.3 Résultats et interprétation des tests de cytotoxicité

Le cisplatine a été utilisé comme témoin positif à une concentration de 10 μM . Les composés **9**, **10**, **14**, **15** et **16** étaient inactifs sur les cellules A-549 à toutes les concentrations testées. Ils étaient également inactifs sur les cellules HL-60 à l'exception du composé **9** qui présentait une cytotoxicité modérée de 30% à 10 μM . Ce composé a donc été sélectionné pour la détermination de son CI_{50} qui s'est révélée non significative ($\text{CI}_{50} = 200 \mu\text{M}$).

De plus, tous les composés (**9**, **10**, **14**, **15** et **16**) ont été testés en association avec le cisplatine sur une lignée cellulaire A-549. Une légère potentialisation de la cytotoxicité du cisplatine a été observée uniquement pour le composé **9**, allant de 63% de survie (cisplatine seul) à 47% (cisplatine + composé **9** à 10 μM).

Ces résultats ont montré une faible sensibilité de ces deux lignées cellulaires aux saponines d'*O. dubium*.

Si l'on compare ces résultats avec les données de la littérature, les deux dérivés spirostaniques, glycosylés en C-1 (**9**, **14**) sont inactifs, ce qui est en accord avec les résultats rapportés dans la revue de Podolak et coll., 2010, selon lesquels les saponines de type spirostane glycosylées en C-1 n'ont montré aucune activité. De même, les glycosides de type cholestane se sont montrés inactifs (**10**, **15**, **16**), ce qui est conforme aux résultats de Tang et coll., en 2013. Ces auteurs ont rapporté que les dérivés désacylés d'OSW-1 d'*O. saundersiae* (connue pour être l'une des saponines les plus cytotoxiques) (Fig. 93) étaient significativement moins puissants que les composés natifs possédant un groupement acyle aromatique et une fonction acétyle localisés sur le diglycoside en C-16. Il semblerait que les groupements acyles fixés sur la portion diglycosylée pourraient être la raison de l'activité puissante de ces derniers. Dans notre cas, **10**, **15**, et **16** possèdent une structure analogue à celle des composés d'*O. saundersiae*, mais sans acylation.

Ces résultats préliminaires ainsi que ceux de la littérature ont montré que l'activité cytotoxique de ces saponines de type cholestane pourrait être liée à un certain degré de lipophilie de leur structure.

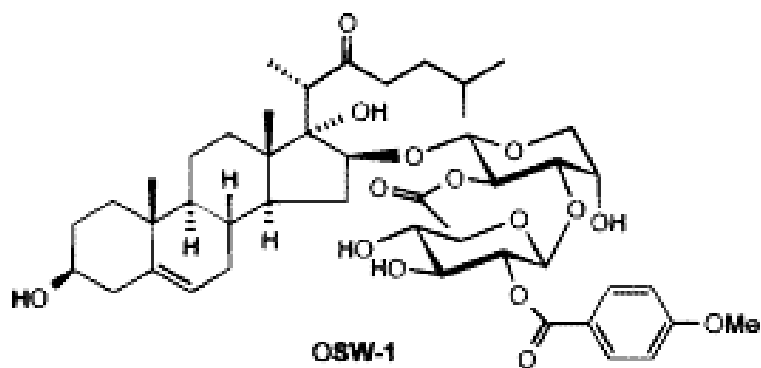


Figure 94: Structure de l'OSW-1

2 Travaux biologiques sur les saponines isolées de *Weigela* × « *kosteriana variegata* »

Les tests biologiques ont été réalisés au sein du laboratoire de l'UMR INSERM 1231 Lipides, Nutrition, Cancer par l'équipe du Dr. Benoist Pruvot et Pr. Johanna Chluba.

Les saponines ont été rapportées comme étant des composés cytotoxiques dans plusieurs modèles *in vitro* (Lacaille-Dubois, 2005 ; Podolak et coll., 2010). En ce qui concerne leur toxicité *in vivo*, elle peut être évaluée en utilisant le poisson-zèbre (ou *zebrafish*). Les effets des glycosides triterpéniques de *Quillaja saponaria* sur le développement précoce du poisson-zèbre ont été étudiés (Hassan et coll., 2008) ainsi que la cardiotoxicité *in vivo* induite par l'aescinate de sodium chez les larves (Liang et coll., 2016) (l'aescine étant un mélange de saponines et principal composé actif responsable des propriétés médicinales du fruit du marronnier d'Inde, *Aesculus hippocastanum*). Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un modèle animal vertébré couramment utilisé dans la recherche scientifique. Ces dernières années, il a été démontré que ce modèle animal est très utile pour détecter la tératogénicité, la cardiotoxicité, la neurotoxicité, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et la génotoxicité des composés (Mandrekar et coll., 2009).

Il semblait donc intéressant d'évaluer la toxicité des saponines triterpéniques isolées sur ce modèle *in vivo*. Nous présentons donc dans ce sous-chapitre les effets toxiques et tératogènes des glycosides de type oléanane isolés de *Weigela* × « *kosteriana variegata* » (Fig. 94), déterminés dans un test *in vivo* de poisson-zèbre. Les effets de différentes concentrations de 5-7 ont été examinés en ce qui concerne la létalité et les changements de morphologie au cours des 72 premières heures de développement du poisson-zèbre, selon un protocole décrit par Pruvot et coll., 2012.

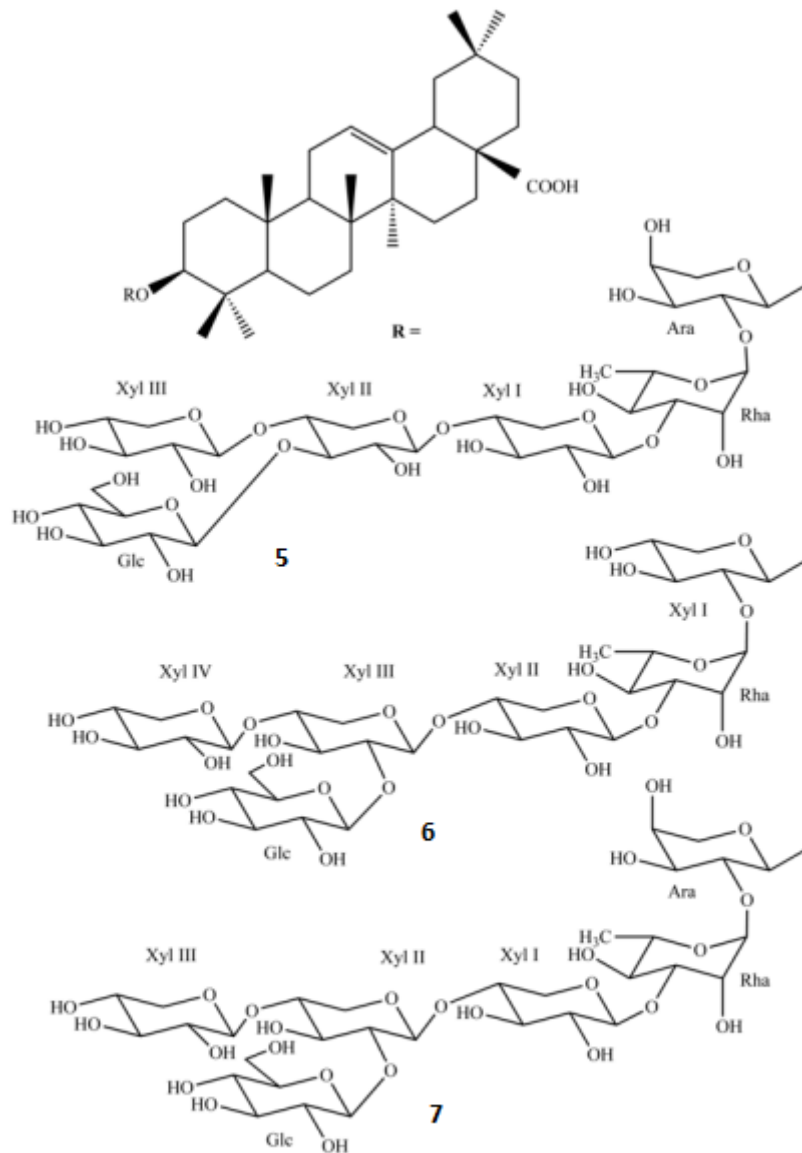


Figure 95: Structure des composés **5-7**

2.1 Protocole expérimental

2.1.1 Modèle expérimental :

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un des modèles le mieux adapté pour établir une comparaison entre la sensibilité des adultes et celle des stades embryo-larvaires vis-à-vis des produits toxiques en raison de son développement rapide. C'est un poisson d'eau douce appartenant à la classe des poissons osseux de la famille des Cyprinidés (Fig. 95). Il mesure jusqu'à 45 mm de long et pèse environ 300 mg. On peut donc aisément élever un grand nombre de poissons zèbres

dans un volume d'eau restreint. Les femelles ont un abdomen plus gonflé que les mâles et sont reconnaissables à leur papille urogénitale. Elles pondent des œufs transparents non collants qui sont très perméables. La ponte s'effectue dans les 30 minutes après le début de l'illumination de la pièce où ils sont élevés avec un rapport optimal mâle/femelle de 2/1 (Meyer, 1993). Une seule femelle mature peut pondre 50 à 200 œufs par jour, ce qui permet de réaliser un très grand nombre de tests. D'autre part, le développement embryo-larvaire du poisson zèbre est très bien décrit dans de nombreuses études, et permet une interprétation facile des effets des produits toxiques. De plus, il est très rapide, l'éclosion des œufs a lieu 4 à 5 jours après la ponte (Laale, 1997). Les tests de toxicité sur ces stades sont donc très rapides.



Figure 96: Le poisson zèbre *Danio rerio*

www.Aquaportail.com

2.1.2 Maintenance du poisson-zèbre :

Le poisson-zèbre a été maintenu dans un système aquacole de recirculation (Müller & Pflieger, Allemagne) dans les conditions suivantes :

-photopériode : 14 L :10 D (lumière: obscurité)

-conductivité : 600-700 μ s

-pH : 6.0 – 8.0

-température : 26 – 28 ° C

Les expériences ont été effectuées à l'aide de la lignée de type sauvage WIK (ZIRC). Les œufs ont été récoltés dans l'heure qui suit la ponte et conservés à 28° C dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau de source (Volvic, France), où 0,3 µg/ml de bleu de méthylène ont été ajoutés.

2.1.3 Déclaration d'éthique :

Toutes les expériences ont été exécutées en stricte conformité avec la directive du Conseil Européen (2010/63/EC). Selon la directive de l'UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE) et la décision d'exécution de la Commission (2012/707/UE), les poissons sont des animaux non protégés jusqu'au stade de l'alimentation libre; cette limite a été fixée à 120 heures après la fécondation (HPF : *Hours Post Fecondation*) pour le poisson-zèbre. Aucune approbation d'éthique spécifique n'était requise pour ce projet, puisque tous les embryons de poisson-zèbre utilisés dans cette étude étaient âgés de 48 à 72 HPF.

2.1.4 Traitements avec les composés :

Les solutions stock pour les composés **5-7** ont été préparées par dissolution des composés purs dans le milieu E3. Elles ont été ensuite diluées aux concentrations souhaitées dans E3 (5 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,4 mM de CaCl₂ et 0,16 mM de MgSO₄). Les solutions ont été administrées aux larves de poisson-zèbre à 48 HPF qui ont été ensuite réparties dans des bacs (20 larves par bac). Les tests ont été réalisés dans des plaques de culture cellulaire de 6 puits contenant le milieu E3. 24 heures après le traitement (72 HPF), les larves ont été rincées deux fois avec E3. Après les deux rinçages successifs, elles ont été observées. L'exposition a été réalisée dans 5 ml sur n=20 individus. Six concentrations ont été au moins testées pour chaque composé. Les expériences ont été réalisées au minimum en triplicata pour chaque concentration adéquate. La survie et les altérations morphologiques ont été évaluées à 48 et 72 HPF à l'aide d'un stéréomicroscope Olympus SZX10 couplé à une caméra Olympus XC50. Pour l'évaluation de la tératogénicité, on a observé sur les larves survivantes les anomalies morphologiques, et le nombre de larves présentant au moins un défaut morphologique est rapporté en pourcentage des larves survivantes. Les embryons de poisson-zèbre incubés dans l'eau de bac sont utilisés comme des témoins négatifs (100% de survie et 1.66% de tératogénicité), et ceux exposés à l'éthanol ont servi de contrôle positif de la toxicité. Le traitement avec 2% d'éthanol a montré $98,33 \pm 2,22\%$ de survie et $86,67 \pm 2,22\%$ de tératogénicité, alors que le traitement à 3%

d'éthanol a entraîné la mort embryonnaire de 100%. Pour le calcul des valeurs CL50, CL10 (concentrations létales) et CE50, CE10 (concentrations de défauts morphologiques) les graphiques et calculs de valeurs (CL et CE) ont été réalisés sur le software Prism et les photographies ont été réalisées sur Axiozoom (Zeiss) à Cellimap. L'acquisition de ces images a été réalisée à l'aide du programme Zen (Zeiss) puis retouchées par GIMP, un outil d'édition et de retouche d'image.

2.1.5 Les analyses statistiques :

Les valeurs CL et CE ont été calculées en reportant la proportion de larves survivantes ou affectées en fonction du log de la concentration testée. La courbe ainsi obtenue a été ajustée à une courbe sigmoïdale de type dose réponse suivant l'équation suivante :

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{\log CL_{50} - x})$$

Bottom et *Top* représentent respectivement la valeur de y la plus basse et la plus élevée (% larves survivantes/affectées). Les résultats de log CE/CL calculés ont été extraits et leurs écarts types (S.D : *standard deviation*) correspondants ont été donnés.

2.2 Résultats et interprétation

Étant donné que les saponines triterpéniques de *Quillaja saponaria* étaient létales pour le poisson-zèbre à une concentration > 10 µg/ml (Hassan et coll., 2008), les composés **5-7** ont été évalués pour leurs effets toxiques et tératogènes en utilisant un dosage toxicologique standard avec le modèle du poisson-zèbre (Pruvot et coll., 2012). Ces effets sont évalués par exposition continue des embryons aux composés à tester à partir du stade le plus précoce possible (2-3 h après la fécondation (HPF)). Les principales étapes de développement (formation des yeux, rythme cardiaque, circulation sanguine) ont lieu pendant les 48 premières heures. Le troisième jour du développement du poisson-zèbre est critique pour l'organogenèse chez les larves. La toxicologie et les anomalies morphologiques ont donc été évaluées après l'exposition des larves de 48 à 72 HPF. Chaque composé a été testé à 6 concentrations différentes (1 µM, 1,25 µM, 1,5 µM, 2 µM, 2,5 µM, 3 µM). Les résultats sont rapportés sur les courbes de la figure 96. Les embryons de poisson-zèbre exposés à 3% d'éthanol sont les témoins positifs (100% de décès embryonnaire). Les taux de survie ont été analysés pour la première fois à 72 HPF pour

plusieurs concentrations. CL50, CL10 (concentrations létales) et CE50, CE10 (concentrations de défauts morphologiques) ont été déterminées pour chaque composé et sont présentées dans le tableau 9.

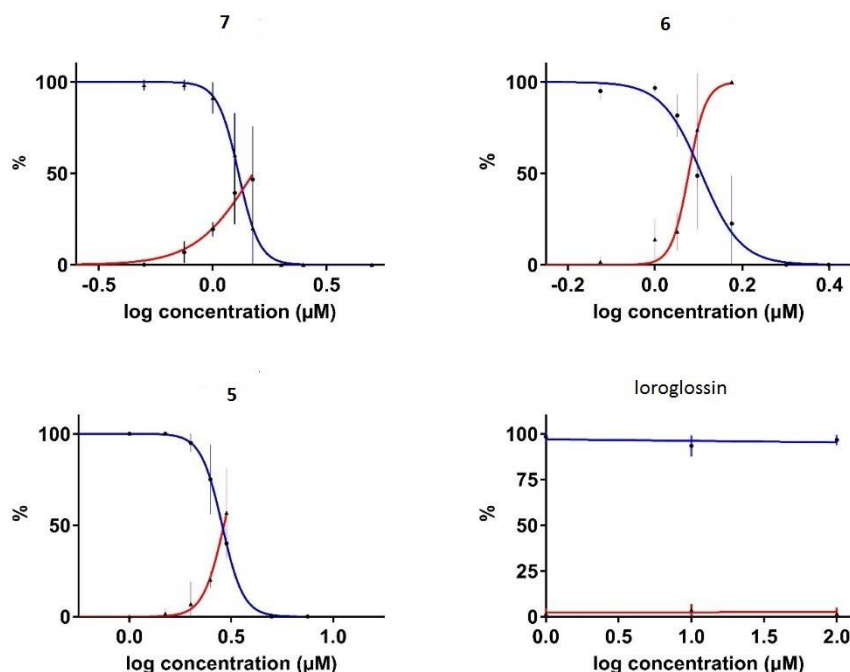


Figure 97: Survie et tératogénicité des larves après exposition aux composés **5-7** et à la loroglossine, glycoside phénolique

Fraction de larves survivantes (ligne bleue), fraction de larves présentant une quelconque altération morphologique (ligne rouge) à 72 HPF après 24 h d'exposition

Tableau 9 : Valeurs calculées de CL50, CE50, CL10 et CE10 pour les composés testés.

| | CL50 | CE50 | CL10 | CE10 |
|--------------|----------|----------|----------|-----------|
| 5 | 2,855 µM | 2,914 µM | 2,192 µM | 2,240 µM |
| 6 | 1,277 µM | 1,195 µM | 1,016 µM | 1,081 µM |
| 7 | 1,299 µM | 1,491 µM | 1,031 µM | 0,7923 µM |
| Loroglossine | >100 µM | >100 µM | >100 µM | >100 µM |

La CL50 et la CL10 ont été obtenues sous traitement à partir de 48 à 72 HPF. L'observation est faite à 73 h.

Les composés **6** et **7** paraissent induire une toxicité similaire (CL50 = 1,277 μ M vs 1,299 μ M) et le composé **5** est moins actif (CL50 = 2,855 μ M). La loroglossine n'est pas toxique dans les conditions testées.

Les valeurs de CL et CE ont été calculées en reportant la proportion de larves survivantes en fonction du log de la concentration testée, ce qui a entraîné des courbes sigmoïdes de type dose-réponse. Les résultats calculés (log CE et log CL) et les écarts-types correspondants sont indiqués dans le tableau 10 et confirment que les effets létaux ont été observés pour les trois composés, les composés **6** et **7** étant plus toxiques que **5**.

Afin de prouver le rôle du triterpène de l'aglycone dans la toxicité, par rapport à la partie osidique, un autre type de glycoside que les saponines a été testé. Un dérivé phénolique a été choisi, (2*R*,3*S*)-1-[*p*-(β -D-glucopyranosyloxy)benzyl]-4-[*p*-(β -D-glucopyranosyloxy)benzyl]-2-isobutyltartrate (loroglossine), isolé du *Chlorophytum blepharophyllum*, décrit dans la partie II.1 (Fig. 97).

Ce composé phénolique glycosylé n'a montré aucune toxicité, ce qui suggère l'importance de la structure de type triterpénoïde de l'aglycone.

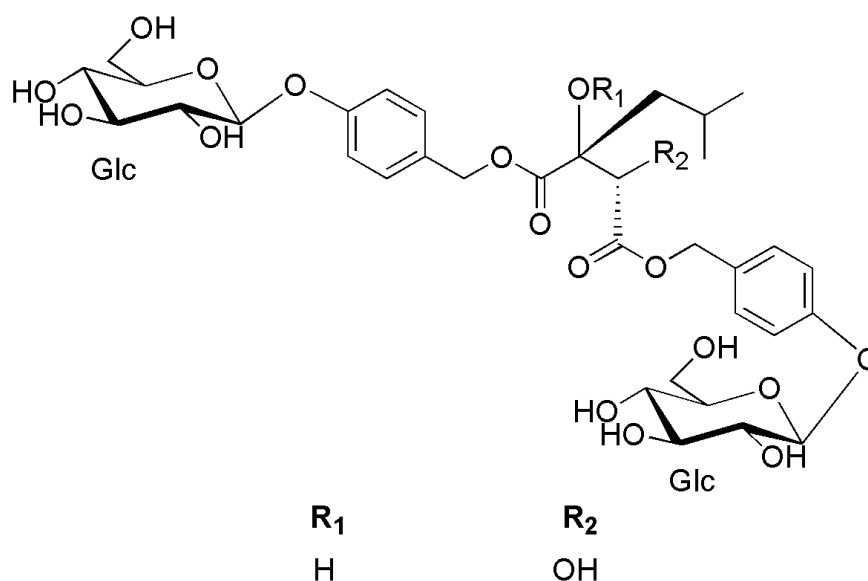


Figure 98: Structure de la loroglossine

Tableau 10: Concentrations toxicologiques des composés testés.

| | Log CL50 | Log CE50 | Log CL10 | Log CE10 |
|--------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 5 | 0,4556±0,0084 | 0,4645±0,0121 | 0,3408±0,0190 | 0,3503±0,0291 |
| 6 | 0,1063±0,0111 | 0,0723±0,0070 | 0,0070±0,0245 | 0,0339±0,0158 |
| 7 | 0,1138±0,0102 | 0,1736 ±0,034 | 0,0134±0,0238 | -0,1011±0,0699 |
| Loroglossine | - | - | - | - |

Afin d'évaluer leurs effets sur le développement des larves, les embryons (à 48 HPF) ont été traités avec plusieurs concentrations des composés **5-7**. Un jour plus tard (à 72 HPF), la présence d'altérations morphologiques chez les larves survivantes indiquant une cardiotoxicité comme l'œdème péricardique et l'hémorragie a été évaluée. La courbure des larves et les défauts de développement ont également été évalués. Les résultats des anomalies morphologiques observées sont présentés sous forme de pourcentage dans le tableau 11, et graphiquement dans la figure 98. La figure 99 montre les défauts observés.

Tableau 11: Défauts morphologiques

| | | <i>pericardial edema</i> | <i>hemorrhage</i> | <i>pericardial edema & hemorrhage</i> | <i>curved</i> | <i>developmental defect</i> |
|----------|---------------|--------------------------|-------------------|---|---------------|-----------------------------|
| 5 | Concentration | | | | | |
| | 2 µM | 50 | - | 25 | - | 25 |
| | 2,5 µM | 55,56±37,04 | 5,56±7,41 | 33,33±44,44 | 5,56±7,41 | - |
| | 3 µM | 39,05±26,03 | 9,52±12,70 | 33,33±44,44 | 18,10±14,60 | - |
| 6 | 1 µM | 43,33±28,89 | 6,67±8,89 | - | 50±33,33 | - |
| | 1,125 µM | 18,75±16,67 | 56,25±16,67 | 25±44,4 | - | - |
| | 1,25 µM | 44,64±24,6 | 2,86±6,36 | 50±22,22 | 2,5±5,56 | - |
| 7 | 1µM | - | 50±33,33 | 16,67±11,11 | - | 33.33±11,11 |
| | 1,25µM | 25±33,33 | 19,45±12,96 | 22,23±14,82 | 33,11±22,08 | - |
| | 1.5µM | 20±20 | - | 30±30 | 50±50 | - |
| EtOH | 2% | 58,50±1,96 | 3,70±2,47 | 15,14±6,39 | 22,66±3,99 | |

Le tableau 11 montre les proportions de larves présentant différents défauts morphologiques lors de l'exposition aux composés 5-7 aux concentrations indiquées de 48 à 72 HPF, par rapport à l'éthanol à 2%.

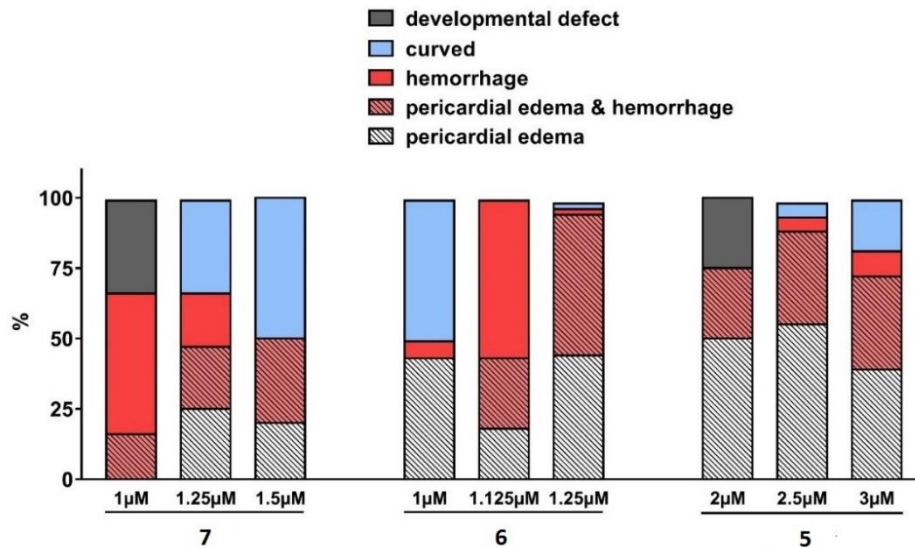


Figure 99: Proportion des différents défauts morphologiques observés (% de larves morphologiquement altérées)

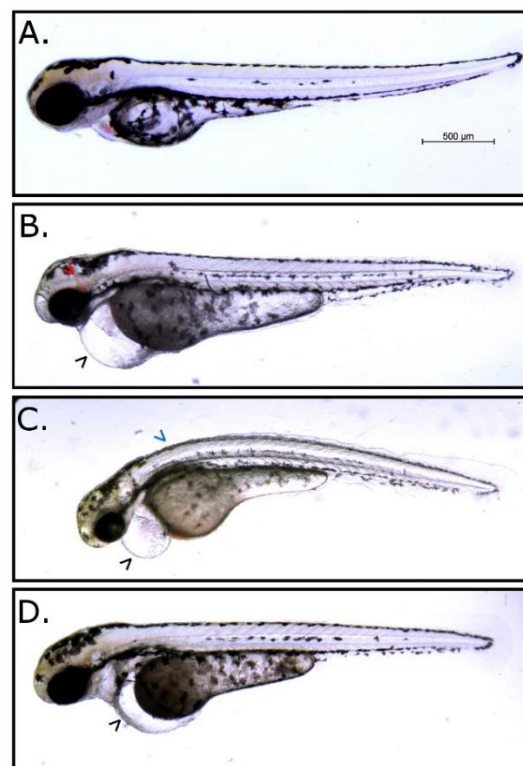


Figure 100: Défauts morphologiques observés

A : non traité, œdèmes (flèche1 noire), hémorragie (flèche rouge), et courbures (flèche bleue).

L'exposition au composé **5** a causé des défauts morphologiques mais non significatifs puisqu'elle a montré une induction d'œdème péricardique dans 50% des larves à 2 μM , jusqu'à $39 \pm 26\%$ à 3 μM , alors que l'exposition au composé **6** induit ce défaut dans $43 \pm 28\%$ des larves à 1 μM jusqu'à $44 \pm 24\%$ à 1,25 μM et l'exposition au composé **7** dans $25 \pm 33\%$ à 1,25 μM jusqu'à $20 \pm 20\%$ à 1,5 μM .

Le composé, qui induit le plus d'hémorragies, est donc le composé **7** avec des valeurs de $50 \pm 33\%$ à 1 μM et $19,45 \pm 12\%$ à 1,25 μM , comparé au composé **5** (de $5,56 \pm 7\%$ des larves à 2,5 μM jusqu'à $9,52 \pm 12\%$ à 3 μM).

L'œdème péricardique et les hémorragies étaient également du même ordre, le composé **6** induisant les pourcentages les plus importants de défauts dans $25 \pm 44\%$ jusqu'à $50 \pm 22\%$ des larves à des concentrations de 1,125 à 1,5 μM . Des résultats similaires ont été observés pour $50 \pm 33\%$ des larves observées, qui ont présenté une courbure après exposition aux composés **6** à 1 μM et **7** à 1,5 μM .

Pour conclure, les composés **6** et **7** causent plus de létalité et de défauts morphologiques significatifs aux doses testées que le composé **5**, notamment une toxicité cardiovasculaire chez les larves de poisson-zèbre. D'autres expériences avec un plus grand nombre de saponines seront utiles pour une étude de relation structure/activité et la compréhension du mécanisme d'action toxique des saponines chez le poisson zèbre. Ces résultats montrant un effet létal à de faibles concentrations de trois saponines monodesmosidiques sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Rezgui et coll. en 2016. En effet, cette étude porte sur l'analyse phytochimique des saponines de type oléanane du *Weigela stelzneri* et montre que les saponines monodesmosidiques sont plus cytotoxiques que les bidesmosidiques soulignant l'importance de la chaîne oligosaccharidique en C-3 de l'aglycone (Rezgui et coll., 2016, Podolak et coll., 2010).

Conclusion générale et perspectives

Ce travail présente les travaux phytochimiques et biologiques réalisés sur trois espèces appartenant à deux familles végétales notamment *Chlorophytum blepharophyllum* et *Ornithogalum dubium* (Asparagaceae) et *Weigela* × « *kosteriana variegata* » (Caprifoliaceae). Le choix des espèces a été fondé, suite à une recherche bibliographique approfondie, sur la richesse en saponines de certaines espèces du même genre.

L'étude phytochimique a permis l'isolement de seize composés naturels (**1-16**), dont sept nouveaux, à l'aide des différentes méthodes chromatographiques (Chromatographie liquide sous vide, Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie liquide moyenne pression). Leur caractérisation a été réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse).

A partir des racines de *C blepharophyllum*, quatre glycosides phénoliques ont été isolés et identifiés à loroglossine (**1**), dactylorhine A (**2**) et B (**3**) et gastrodine (**4**). Ces molécules, et d'autres glycosides phénoliques proches, ont déjà été décrits dans des études phytochimiques de plantes de la famille des Orchidaceae, *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* (Huang et coll., 2002, 2004), *Pleione bulbocodioides* (Han et coll., 2015) et *Gymnadenia conopsea* (Zi et coll., 2008). Le fait que la famille des Asparagaceae appartienne au même ordre que les Orchidaceae, les Asparagales, selon la classification phylogénétique APG III, pourrait expliquer la présence ces métabolites dans cette espèce de *Chlorophytum*.

A partir d'*Ornithogalum dubium* huit glycosides stéroïdiques de type spirostane ou cholestane ont été isolés dont cinq dans les bulbes et racines ((25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-ène-1β-yl *O*-α-*L*-arabinopyranosyl-(1→2)-α-*L*-rhamnopyranoside (**9**), (22*S*)-16β-[(α-*L*-rhamnopyranosyl)-oxy]-22-hydroxycholest-5-en-3β-yl *O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→4)-β-*D*-glucopyranoside (**10**), (22*S*)-16β-[(α-*L*-rhamnopyranosyl)-oxy]-22-hydroxycholest-5-en-3β-yl *O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1→4)-[β-*D*-glucopyranosyl(1→2)]-β-*D*-glucopyranoside (**11**), (25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-en-1β-yl *O*-α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-*L*-arabinopyranoside (**12**) et (25*R*)-3β-hydroxyspirost-5-en-1β-yl *O*-α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*-[β-*D*-xylopyranosyl-(1→3)]-α-*L*-arabinopyranoside (**13**), deux autres dans les tiges et les feuilles (25*S*)-3β-hydroxyspirost-5-en-1β-yl *O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→6)-β-*D*-glucopyranoside (**14**) et (22*S*,23*S*)-1β,3β,11α,16β,23-pentahydroxy-5α-cholest-24-en-22-yl β-*D*-glucopyranoside

(15)) et une seule dans les fleurs (22*S*,23*S*)-3β-[(β-D-glucopyranosyl)-oxy]-22,23-dihydroxy-5α-cholest-24-en-16β-yl *O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→4)-β-D-glucopyranoside (16). Parmi ces huit molécules figurent six nouveaux composés naturels (9-11, 14-16) dont deux (15, 16) possèdent des dérivés inhabituels d'aglycones de type cholestane, en raison de la présence d'une fonction alcoolique en position 23.

A partir de *Weigela* × « *kosteriana variegata* », quatre saponines (5-8) à génines triterpéniques, acide oléanolique et hédéragénine, ont été isolées dont une de structure nouvelle, acide oléanolique 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(14)-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)]-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside (5). Il n'est pas étonnant de trouver ces composés dans cette espèce étant donné que d'un point de vue chimiotaxonomique, les espèces de *Weigela* sont riches en saponines à aglycone de type oléanane, comme l'acide oléanolique et l'hédéragénine (Rezgui et coll., 2016 ; Murayama et coll., 2003 ; Champy et coll., 2018).

Les effets toxiques et tératogènes de trois saponines triterpéniques isolées de *Weigela* × « *kosteriana variegata* » (5-7) ont été déterminés dans un modèle de test *in vivo* de poisson-zèbre. Les effets de différentes concentrations de ces composés ont été examinés en ce qui concerne la létalité et les changements de morphologie au cours des 72 premières heures de développement du poisson-zèbre. Deux composés (6,7) causent létalité et défauts morphologiques significatifs aux doses testées, notamment une toxicité cardiovasculaire chez les larves de poisson-zèbre. Les résultats montrent également un effet léthal à de faibles concentrations de trois saponines monodesmosidiques, et confirment les résultats précédemment rapportés par Rezgui et coll. en 2016. Ces auteurs montrent que les saponines monodesmosidiques sont plus cytotoxiques que les bidesmosidiques et que la présence de la chaîne oligosaccharidique en C-3 de l'aglycone y joue un rôle important (Rezgui et coll., 2016 ; Podolak et coll., 2010).

En vue d'évaluer leurs activités biologiques, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur les saponines stéroïdiques de type cholestane ou spirostane isolées d'*Ornithogalum dubium* sur des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire humain A549 et de leucémie aigüe promyélocytaire humaine HL 60 à différentes doses, en comparaison avec le témoin positif, le cisplatine. Les résultats ont montré une faible sensibilité de ces deux lignées cellulaires aux saponines d'*O. dubium*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Podolak et coll., en 2010, selon lesquels les saponines de type spirostane glycosylés en C-1 n'ont montré aucune

activité. De même, les glycosides de type cholestane se sont montrés inactifs ce qui est conforme aux résultats de Tang et coll., en 2013. Ces auteurs ont rapporté que les dérivés non acylés de OSW-1 d'*O. saundersiae* étaient significativement moins puissants que les composés natifs possédant une chaîne oligosaccharidique acylée en C-16 de la génine, comportant un groupement acyle aromatique et une fonction acétyle. Il semblerait que les groupements acyles fixés sur la portion diglycosylée pourraient être la raison de l'activité puissante de ces derniers. Dans notre cas, les trois saponines de type cholestane possèdent une analogie structurale avec les composés d'*O. saundersiae*, mais sans acylation.

En conclusion, cette étude phytochimique vient compléter celles déjà réalisées sur certaines espèces appartenant aux genres étudiés et les résultats obtenus sont en parfait accord avec les données de la littérature. En effet, cette étude montre une fois de plus que les saponines de type stéroïdiques demeurent les constituants dominants des Asparagaceae. Il en est de même pour la famille des Caprifoliaceae réputée riche en saponines triterpéniques de type oléane.

Quant aux travaux biologiques, ils ont permis l'établissement de relations structure / activité résumées ainsi :

- les saponines triterpéniques monodesmosidiques sont plus cytotoxiques que les bidesmosidiques et la présence de la chaîne oligosaccharidique en C-3 de l'aglycone y joue un rôle important,
- les saponines stéroïdiques de type spirostane glycosylées en C-1 n'ont montré aucune activité,
- l'activité puissante d'OSW-1 (saponine stéroïdique) d'*O. saundersiae*, connue pour être l'une des saponines les plus cytotoxiques, serait due à la présence d'une chaîne oligosaccharidique en C-16 de la génine, acylée par un groupement acyle aromatique et une fonction acétyle.

Cependant, d'autres expériences avec un plus grand nombre de saponines seront utiles pour une étude de relation structure/activité et la compréhension du mécanisme d'action toxique des saponines chez le poisson zèbre.

Du point de vue phytochimique, au vu des résultats très prometteurs, il est intéressant de lancer une investigation plus poussée sur d'autres plantes des familles des Asparagaceae et des Caprifoliaceae, ceci dans le but de contribuer à l'enrichissement des bases de données des saponines.

Références bibliographiques :

Acharya D., Mitaine-Offer A.C., Kaushik N., Miyamoto T., Paululat T., Lacaille-Dubois M.A. (2008). Furostane-type steroidal saponins from the roots of *Chlorophytum borivilianum*. *Helv. Chim. Acta.* 91, 2262-2269.

Acharya D., Mitaine-Offer A.C., Kaushik N., Miyamoto T., Paululat T., Mirjolet J.F., Duchamp O., Lacaille-Dubois M.A. (2009). Cytotoxic spirostane-type saponins from the roots of *Chlorophytum borivilianum*. *J. Nat. Prod.* 72, 177–181.

Acharya D., Mitaine-Offer A.C., Kaushik N., Miyamoto T., Paululat T., Mirjolet J.F., Duchamp O., Lacaille-Dubois M.A. (2010). Steroidal saponins from *Chlorophytum orchidastrum*. *J. Nat. Prod.* 73, 7–11.

Agrawal P.K., Jain DC., Gupta RK., Thakur RS. (1985). Carbon-13 spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* 24, 2479-2496.

Agrawal, P.K. (2003). 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. *Magn. Reson. Chem.* 41, 965–968.

Agrawal, P.K., Jain, D.C., Pathak, A.K. (1995). NMR spectral investigation. Part 37. NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins: an update. *Magn. Reson. Chem.* 33, 923–953.

Anizon J.Y., Lemaire B., Surbled M. (2003). Extraction assistée par micro-ondes, Ed. Techniques Ingénieur F3060 V1, 1-10.

APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105–121.

Aquaportail, Le genre *Ornithogalum* (Ornithogales) URL <https://www.aquaportail.com/genre-ornithogalum-1379.html>.

Augustin J.M., Kuzina V. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 435-457.

- Baba M., Ohmura M., Kishi N., Okada Y., Shibata S., Peng J., Yao SS., Nishino H., Okuyama T. (2000). Saponins isolated from *Allium chinense* G. Don and antitumor-promoting activities of isoliquiritigenin and laxogenin from the same drug. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 660–662.
- Balas L. (1992). Tanins catéchiques : isolement, Hémisynthèse et analyse structurale par RMN 2D homo et hétéronucléaire. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux.
- Beasse A. (2009). Isolement de produits actifs à partir d'extraits d'organismes marins. Bioprospection et substances actives marines. CRISP 32p.
- Bonneau D., Pomero V. (2002). Le phénomène de cavitation. *Revue de médecine Vertébrale& des Articulations Périphériques* volume 8.
- Botineau M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec&Doc (Eds.) Lavoisier 1336 p.
- Bruneton. (2016). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales 5ème édition. Eds Lavoisier Tec&Doc 1487 p.
- Cao X.P., Zou J.H.O., Qiu D.Y., Dai J.G. (2012). Steroidal saponins and flavonoids from *Ornithogalum thyrsoides*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 24, 768–771.
- Champy-Tixier A.S., Mitaine-Offer A.C., Real Fernández F., Miyamoto T., Tanaka C., Papini A.M., Lacaille-Dubois M.A. (2018). Oleanane-type glycosides from the roots of *Weigela florida* "rumba" and evaluation of their antibody recognition. *Fitoterapia* 128, 198-203.
- Chase M.W., De Bruijn A.Y., Cox A.V., Reeves G., Rudall P.J., Johnson M.A.T., Eguiarte L.E. (2000). Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): An analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Annals of Botany* 86, 935-951.
- Chen S., Kim D.K, Chase M.W., Kim J.H. (2013). Networks in a large-scale phylogenetic analysis: reconstructing evolutionary history of Asparagales (Lilianaes) Based on Four Plastid Genes. *PLoS ONE* 8, e59472.
- Cota B.B., Magalhães A., Pimenta A.M.C., Siqueira E.P., Alves T.M.A., Zani C.L. (2008). Chemical Constituents of *Habenaria petalodes* Lindl. (Orchidaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 1098–1104.

De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V. (1999). Spectrométrie de masse : Cours et exercices corrigés, 2e édition. Dunod (Eds) Paris 399 p.

De Lamarck J.B. (1808). Encyclopédie méthodique botanique. Agasse (Eds) V8, 788p.

Du Plessis N., Graham D. (1989). Bulbous plants of Southern Africa: A Guide to their cultivation and propagation, Tafelberg Publishers Ltd 192p.

European Medicines Agency. Assessment report: MosquirixTM, 2015 (URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2015/10/WC500194576.pdf, accessed January 2016).

Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K. (2002). The biological action of saponins in animal systems. Br. J. Nutr. 88, 587–605.

Fries S.L., Standaert F.G., Whitcomb E.R., Nigrelli R.F., Chanley J.D., Sobotka H. (1959). Somme pharmacologic properties of holothurin A, a glycosidic mixture from the sea cucumber. J. Pharmacol. Exp. Therap. 126, 323-329.

Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y. (2000). Formation of monoclonal antibody against a major Ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. Monoclonal antibody for a Ginseng saponin. Cytotechnol. 34, 197-204.

Ghannamy U., Kopp B., Robien W., Kubelka W. (1987). Cardenolides from *Ornithogalum boucheanum*. Planta Med. 53, 172–175.

Guclu-Ustundag O., Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 47, 231-258.

Gunther H. (1994). La spectroscopie de RMN: Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.) 557 p.

Haddad M., Miyamoto T., Delaude C., Lacaille-Dubois M.A. (2003). New acylated saponins from *Polygala myrtifolia*. Helv. Chim. Acta. 86, 3055–3065.

Han S.W., Wang C., Cui B.S., Li S. (2015). Studies on Glucosyloxybenzyl 2-isobutylmalates of *Pleione Bulbocodioides*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 40, 908–914.

- Hara S., Okabe H., Mihashi K. (1987). Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2(polyhydroxyalkyl)thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 501-506.
- Hassan S.M., Moussa E.A., Abbott L.C. (2008). Effects of *Quillaja* saponin (*Quillaja saponaria*) on early embryonic zebrafish (*Danio rerio*) development. *Int. J. Toxicol.* 27, 273–278.
- Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Chem.* 24, 3–12.
- Hostettmann K., Marston A. (1995). Saponins: chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: University Press 548 p.
- Hostettmann K., Marston A., Ndjoko K., Wolfender J.L. (2000). The potential of African plants as a source of drugs. *Curr. Org. Chem.* 4, 973-1010.
- Hostettmann K., Marston M., Hostettmann M. (1997). Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation, vol. 53. Springer Verlag, Berlin, 2 Eds 247 p.
- Hu Q., Noll R.J. Li H., Makarov A., Hardman M., Graham Cooks R. (2005). The orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40, 430-443.
- Huang S.Y., Li G.Q., Shi J.G., Mo S.Y., Wang S.J., Yang Y.C. (2004). Chemical constituents of the rhizomes of *Coeloglossum Viride* var. *bracteatum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* 6, 49–61.
- Huang S.Y., Shi J.G., Yang Y.C., Hu S.L. (2002). Studies on the chemical constituents of *Coeloglossum Viride* Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter. *Yao Xue Xue Bao* 37, 199-203.
- Huber H. (1977). The treatment of monocotyledons in an evolutionary system of classification. *Plant. Syst. Evol.* 1, 285-298.
- Iguchi T., Kuroda M., Naito R., Watanabe T., Matsuo Y., Yokosuka A., Mimaki Y. (2017). Structural characterization of cholestane rhamnosides from *Ornithogalum saundersiae* bulbs and their cytotoxic activity against cultured tumor cells. *Molecules* 22, 1243–1264.

Inoue T., Mimaki Y., Sashida Y., Nishino A., Satomi Y., Nishino H. (1995). Steroidal glycosides from *Allium macleanii* and *A. senescens*, and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of Hela cells. *Phytochemistry* 40, 521–525.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P. (2002). *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*. De Boeck Université s.a, 1 Eds 467 p.

Just M.J., Recio M.C., Giner R.M., Cuellar M.J., Manez S., Bilia A.R., Rios J.L. (1998). Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta Med.* 64, 404-407.

Kaushik N. (2005). Saponins of *Chlorophytum* species. *Phytochem. Rev.* 4, 191–196.

Kawashima K., Mimaki Y., Sashida Y. (1991). Schubertosides A - D, new (22S)-hydroxycholestane glycosides from *Allium schubertii*. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2761–2763.

Kubo S., Mimaki Y., Sashida Y., Mikaido T., Ohmoto T. (1992). New polyhydroxylated cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2469–2472.

Kubo S., Mimaki Y., Sashida Y., Mikaido T., Ohmoto T. (1992). Acylated cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *Phytochemistry* 31, 3969-3973.

Kuroda M., Mimaki Y., Ori K., Sakagami H., Sashida Y. (2004). Steroidal glycosides from the bulbs of *Ornithogalum thyrsoides*. *J. Nat. Prod.* 67, 1690–1696.

Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y. (1999). Cholestane rhamnosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *Phytochemistry* 52, 445–452.

Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y. (1999). Saundersiosides C-H, rearranged cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry* 52, 435–443.

Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y., Hirano T., Oka K., Dobashi A. (1995). A novel 16,23-epoxy-5 beta-cholestane glycoside with potent inhibitory activity on proliferation of human peripheral blood lymphocytes from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1257–1259.

Kuroda M., Mimaki Y., Yokosuka A., Hasegawa F., Sashida Y. (2002). Cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum thyrsoides* and their cytotoxic activity against HL-60 leukemia cells. *J. Nat. Prod.* 65, 1417–1423.

Kuroda M., Mimaki Y., Yokosuka A., Sashida Y., Beutler J.A. (2001). Cytotoxic cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *J. Nat. Prod.* 64, 88–91.

Kuroda M., Ori K., Mimaki Y. (2006). Ornithosaponins A-D, four new polyoxygenated steroidal glycosides from the bulbs of *Ornithogalum thyrsoides*. *Steroids* 71, 199–205.

Laale H.W. (1997). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *J. Fish. Biol.* 10, 121-173.

Lacaille-Dubois M.A. (2005a). Bioactive saponins from plants: recent developments. In *Handbook of Medicinal Plants* Z. Yani & U. Bachrach (Eds). Haworth Press Inc, Binghamton, NY 399-428.

Lacaille-Dubois M.A. (2005b). Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments in: *Studies in Natural Products Chemistry Series* (Ed: Atta-Ur-Rahman), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands 32, 209-246.

Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 2, 363-86.

Lacaille-Dubois M.A. (1999). Saponins as immunostimulants and immunoadjuvants in: *Immunomodulatory agents from plants*, H. Wagner, Basel, Boston, Berlin (Eds.). Birkhäuser Verlag AG 243–272.

Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. (2000). Bioactive saponins from plants: an update in: *Studies in Natural Products Chemistry Series*, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Elsevier Science 21, 633–87.

Li X.C., Wang D.Z., Yang C.R. (1990). Steroidal Saponins from *Chlorophytum malayense*. *Phytochemistry* 29, 3893-3898.

Liang J., Jin W., Li H., Liu H., Huang Y., Shan X., Li C., Shan L., Efferth T. (2016). In vivo cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. *Molecules* 21, 190–199.

Liu S., Cui M., Liu Z., Song F., Mo W. (2004). Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 133–41.

Mandrekar N., Thakur N.L. (2009). Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. *Biotechnol. Lett.* 31, 171–179.

Marouf A., Tremblin G. (2013). *Mémento technique à l'usage des biologistes et biochimistes.* (Eds) EDP Sciences ISBN. 978-2-7598-0965-3. 865 p.

Massiot G., Lavaud C. (1995). Structural elucidation of saponins. *Studies in Natural Products Chemistry* 15, 187–224.

Meyer A., Biermann C.H., Ortí G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 252, 231-236.

Mi-aime-a-ou, *Ornithogalum dubium* Houtt. URL http://www.mi-aime-a-ou.com/ornithogalum_dubium.php

Milgate J., Roberts D.C.K. (1995). The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr. Res.* 15, 1223–1249

Mimaki Y., Kanmoto T., Kuroda M., Sashida Y., Satomi Y., Nishino A., Nishino H. (1996). Steroidal saponins from *Hosta longipes* and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry* 42, 1065.

Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y., Nishino A., Satomi Y., Nishino H. (1996). Steroidal saponins from the underground parts of *Chlorophytum comosum* and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipids metabolism of Hela cells. *Phytochemistry* 41, 1405–1410.

Mimaki Y., Kawashima K., Kanmoto T., Sashida Y. (1993). Steroidal glycosides from *Allium albopilosum* and *A. ostromskianum*. *Phytochemistry* 34, 799–805.

Mimaki Y., Kuroda M., Kameyama A., Sashida Y., Hirano T., Oka K., Koike K., Nikaido T. (1996). A new cytotoxic cholestane bisdesmoside from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1049–1050.

- Mimaki Y., Kuroda M., Kameyama A., Sashida Y., Hirano T., Oka K., Maekawa R., Wada T., Sugita K., Beutler J.A. (1997). Cholestane glycosides with potent cytostatic activities on various tumor cells from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 633–636.
- Murayama T., Kasahara A., Shiono Y., Ikeda M. (2003). Structure elucidation of a triterpene glycoside isolated from *Weigela hortensis*. *Nat. Med.* 57, 181–184.
- Ono M., Shoyama K., Nohara T. (1988). The constituents of *Chinese polygonati officinalis rhizoma* and *polygonati rhizoma*. *Shoyakugaku Zasshi.* 42, 135–142.
- Osbourn A.E. (1996). Saponins and plant defence - a soap story. *Trends. Plant. Sci.* 1: 4-9
- Panov D.A., Grishkovets V.I., Kachala V.V., Shashkov A.S. (2006). Triterpene glycosides from *Kalopanax septemlobum*. VI. Glycosides from leaves of *Kalopanax septemlobum* var. *typicum* introduced to Crimea. *Chem. Nat. Compd.* 42, 49–54.
- Pettit G.R., Doubek D.L., Herald D.L. (1991). Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the african medicinal plant *Balanites aegyptiaca*. *J. Nat. Prod.* 54, 1491-1502.
- Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* 9, 425–474.
- Pruvot B., Quiroz Y., Voncken A., Jeanray N., Piot A. (2012) A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants of late stage of zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 34, 568–583.
- Rabasso N. (2007). *Chimie organique, généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques.* (Eds) De boeck. ISBN 978-2-8041-52109. 351 p.
- Rao A.V., Sung M.K. (1995). Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.* 125, 717S– 724S.
- Rezgui A., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Tanaka C., Delemasure S., Dutartre P., Lacaille-Dubois M.A. (2016). Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*. *Phytochemistry* 123, 40–47.
- Rouessac F., Rouessac A., Cruché D., Duverger-Arfulso C. (2009). *Analyse chimique - Méthodes et techniques instrumentales.* (Eds) Dunod ISBN-13: 9782100518616. 552 p.

San Martín R., Briones R. (2000). Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. J. Sci. Food Agric. 80, 2063-2068.

Sautour M., Mitaine-Offer A.C., Lacaille-Dubois M.A. (2007). The Dioscorea genus: a review of bioactive steroid saponins. J. Nat. Med. 61, 91–101.

Schöpke T. (2000). Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants, NonNMR methods for structure elucidation of saponins. (Eds) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 10, 96-106.

Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48, 4827–33.

Sheffield Botanical Gardens. (2012). *Weigela* genus. URL:<http://www.sbg.org.uk/weigela.asp>.

Skoog D.A. (2002). Chimie Analytique. Ed de boeck. ISBN 2-8041-2114-3. 870 p.

Sparg S.G., Light M.E., van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. J. Ethnopharmacol. 94, 219–243.

Tabopda T.K., Mitaine-Offer A.C., Paululat T., Delemasure S., Dutartre P., Ngadjui B.T., Lacaille-Dubois M.A. (2016). Steroidal Saponins from *Chlorophytum deistelianum*. Phytochemistry 126, 34–40.

Tandon M., Shukla Y.N. (1997). Arundinoside A – a new spirostane saponin from *C. arundinaceum*. J. Ind. Chem. Soc.74, 56–58

Tang Y., Li N., Duan J.A., Tao W. (2013). Structure, bioactivity, and chemical synthesis of OSW-1 and other steroidal glycosides in the genus *Ornithogalum*. Chem. Rev. 113, 5480–5514.

Thakur M., Melzig M.F., Fuchs H., Weng A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. Botanicals Targets and Therapy 1, 19-29.

Truffaut, *Weigela* x "*Kosteriana variegata*", URL <https://www.truffaut.com/produit/weigela-x-kosteriana-variegata-touffe-ctr-7-5-litres/13088/10583>.

Willow J.H.L. (2011). Traditional Herbal Medicine Research Methods. Identification, Analysis, Bioassay, Pharmaceutical and Clinical studies. (Eds) Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN 978-0-470-14936-2. 488 p.

Wilson D.M., Fenical W., Hay M., Lindquist N., Bolser R. (1999). Habenariol, a freshwater feeding deterrent from the aquatic orchid *Habenaria Repens* (Orchidaceae). *Phytochemistry* 50, 1333–1336.

Yang C.R., Zhang Y., Jacob M.R., Khan S.I., Zhang Y.J., Li X.C. (2006). Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1710-1714.

Yang Q.X., Yang C.R. (2000). A new steroidal saponin from *Chlorophytum malayense*. *Acta Botanica Yunnanica* 22, 191-196

Zhang Y., Cao J., Meng Y., Qu C., Shen F., Xu L. (2018). Overexpression of *Xeroderma pigmentosum* group C decreases the chemotherapeutic sensitivity of colorectal carcinoma cells to cisplatin. *Oncology Lett.* 15, 6336–6344.

Zi J., Li S., Liu M., Gan M., Lin S., Song W., Zhang Y.. (2008). Glycosidic constituents of the tubers of *Gymnadenia Conopsea*. *J. Nat. Prod.* 71, 799–805.

Listes des publications, posters et communications orales

Publications

1. Andriamisaina N., Mitaine-Offer A.C, Pruvot B., Chluba J., Miyamoto T., Tanaka C., Lacaille-Dubois M.A. (2018). Phytochemistry of *Weigela* x “kosteriana variegata” (Caprifoliaceae), *Natural Product Communications*, 13 : 403-406
2. Andriamisaina N., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Tanaka C., Paululat T., Lirussi F., Lacaille-Dubois M.A. (2018). Steroidal glycosides from *Ornithogalum dubium* Houtt, submitted in *Phytochemistry*. PHYTOCHEM_2018_252

Posters et Communications orales

1. 22ème Forum des jeunes chercheurs, 16-17 Juin 2016, Besançon, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques,

Poster : Extraction, purification et analyse structurale de métabolites secondaires issus de l'espèce *Chlorophytum blepharophyllum*
2. 23ème Forum des jeunes chercheurs, 15-16 Juin 2017, Dijon, UFR SVTE,

Poster : Oleanolic Acid Glycosides from *Weigela* x « kosteriana variegata »
3. PSE Young Scientists' Meeting LILLE 2017, Trends in Natural Product Research, 28 Juin- 1 Juillet 2017, Polytech Lille,

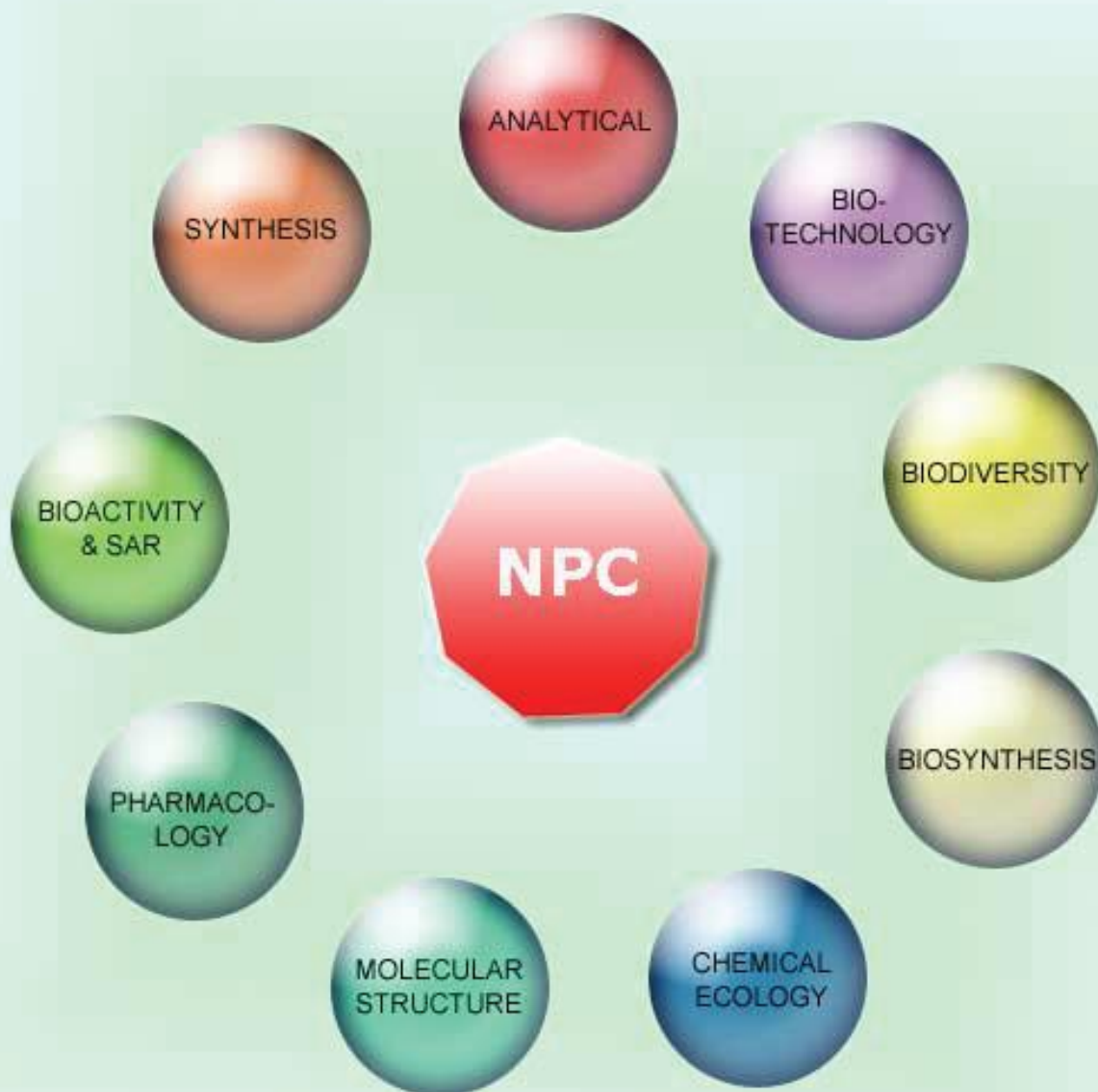
Poster : Chemical study of saponins from *Weigela* x « kosteriana variegata »
4. 5th AFERP - International Symposium ANGERS 2017, 17-19 Juillet 2017, UFR Droit Economie Gestion, Université d'Angers,

Poster: A new oleanolic acid glycoside from *Weigela* x « kosteriana variegata »
5. 24ème Forum des jeunes chercheurs, 14-15 Juin 2016, Besançon, UFR Sciences et Techniques,

Communication orale : Analyse phytochimique de *Weigela* x “kosteriana variegata” (Caprifoliaceae)

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all Aspects of Natural Products Research



EDITOR-IN-CHIEF

DR. PAWAN K AGRAWAL

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS

PROFESSOR MAURIZIO BRUNO

Department STEBICEF,
University of Palermo, Viale delle Scienze,
Parco d'Orleans II - 90128 Palermo, Italy
maurizio.bruno@unipa.it

PROFESSOR CARMEN MARTIN-CORDERO

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy,
University of Seville, Seville, Spain
carmenmc@us.es

PROFESSOR VLADIMIR I. KALININ

G.B. Eiyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Pr. 100-letiya Vladivostoka 159, 690022,
Vladivostok, Russian Federation
kalininv@piboc.dvo.ru

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry, University of Wollongong,
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry, Texas Christian University,
Fort Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR PING-JYUN SUNG

National Museum of Marine Biology and Aquarium
Checheng, Pingtung 944
Taiwan
pjsung@mmba.gov.tw

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
david.thurston@kcl.ac.uk

HONORARY EDITOR

PROFESSOR GERALD BLUNDEN

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
acuf64@dc1.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Norbert Arnold
Halle, Germany

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Vassaya Bankova
Sofia, Bulgaria

Prof. Roberto G. S. Berlinck
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Francesco Epifano
Chiati Scalo, Italy

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Judith Hohmann
Szeged, Hungary

Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Göttingen, Germany

Prof. Marie Laccaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. Marina Stefova
Skopje, Republic of Macedonia

Prof. Leandros A. Skaltsounis
Zografou, Greece

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2017 subscription price: US\$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,995 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Phytochemistry of *Weigela* x “*kosteriana variegata*” (Caprifoliaceae)

Nampoina Andriamisaina^a, Anne-Claire Mitaine-Offer^a, Benoist Pruvot^c, Johanna Chluba^{b,c}, Tomofumi Miyamoto^d, Chiaki Tanaka^d and Marie-Aleth Lacaille-Dubois^{a,*}

^aPEPITE EA 4267, Laboratoire de Pharmacognosie, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

^bUFR SVTE - UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

^cUMR INSERM 1231 'Lipides, Nutrition, Cancer-LNC', Dijon, France

^dGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr

Received: December 19th, 2017; Accepted: February 12th, 2018

One new triterpene glycoside 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)]-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyloleanolic acid, was isolated from *Weigela* x “*kosteriana variegata*” (Caprifoliaceae), with three known ones. Their structures were characterized by a combination of mass spectrometry and 1D and 2D NMR spectroscopic techniques including ¹H- and ¹³C NMR, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC experiments. The toxicological properties of some glycosides were determined with a zebrafish-based assay. The results show that the most active compounds were toxic to the larvae in the range of 1 μM.

Keywords: Oleanolic acid glycosides, 2D NMR, *Weigela* x “*kosteriana variegata*”, Caprifoliaceae, Zebrafish-based assay.

Previous researches have shown that the genus *Weigela* Thunb. (or *Weigelia*) contains ten species from Japan, China, Korea and Manchuria but many cultivars, more than 200, were produced [1]. One of them, *Weigela* x “*kosteriana variegata*” is a hybrid shrub of medium size, recognized by the green foliage edged with cream color. This genus belongs to the Caprifoliaceae family, subfamily Diervilloideae according to the APGIII classification [2]. Three species, *Weigela hortensis* [3], *W. subsessilis* [4] and *W. stelzneri* [5], were already described as a source of oleanane-type glycosides. We decided to realize the phytochemical study of *W.* x “*kosteriana variegata*”, to add some chemotaxonomic data about saponins from the genus *Weigela* and from the Caprifoliaceae family too.

In this paper, we report the extraction, isolation, and structure elucidation of one previously undescribed triterpene glycoside from an aqueous ethanolic extract of the roots, together with three known ones. Their structures were mainly determined by spectroscopic methods including 1D and 2D NMR experiments (¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, NOESY HSQC and HMBC) in combination with HRESIMS, and by comparison of their spectral data with literature values.

The saponins have been widely reported as cytotoxic compounds in several *in vitro* models [6,7]. In the majority of cases, while structure elucidation process was the main focus of the research, cytotoxic activity tests were performed as additional part of experimental studies. Although many novel bioactive molecules have also been identified using zebrafish model screens [8]. Several zebrafish-based studies of triterpene glycosides have been reported as the study of the effects of *Quillaja* saponins on early embryonic zebrafish development [9] and the *in vivo* cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae [10]. Zebrafish (*Danio rerio*), is an important and widely used vertebrate animal model system in scientific research. In recent years, it has been demonstrated that this animal model is very useful to screen compounds for

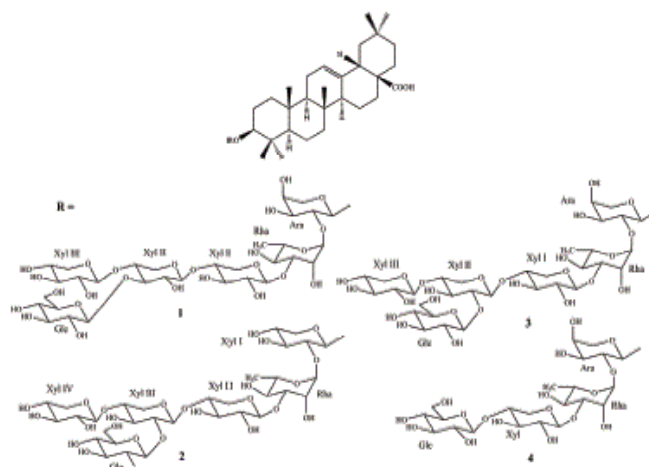


Figure 1: Structures of compounds 1-4

teratogenicity, cardiotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, and genotoxicity [11]. We present in this paper the isolation and characterization of three oleanane-type glycosides 1-3 from *W.* x “*kosteriana variegata*”, and their toxic and teratogenic effects determined in an *in vivo* zebrafish assay. The effects of different concentrations of 1-3 were examined with respect to lethality and changes in morphology during the first 72 h of zebrafish development according to Pruvot *et al.*, 2012 [12].

The aqueous ethanolic EtOH-H₂O (75:35) extract of the roots was subjected to multiple chromatographic steps by vacuum liquid chromatography (VLC) and successive medium-pressure liquid chromatography (MPLC) on normal or reversed phase silica gel yielding four saponins (1-4) (Figure 1). The known saponins (2-4) were identified by comparison of their spectral data with literature

values as 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyloleanolic acid (**2**) and 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyloleanolic acid (**3**) previously isolated from *Weigela stelzneri* [5], and 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyloleanolic acid (**4**) previously obtained from *Kalopanax septemlobium* var. *typicum* [13].

Compound **1** was isolated as a white amorphous powder and its high-resolution electrospray-ionization mass spectrum (HRESIMS) established its molecular formula as C₆₂H₁₀₀O₂₈. Its ESIMS (negative-ion mode) displayed a quasimolecular ion peak [M - H]⁻ at *m/z* 1291, indicating a molecular weight of 1292. Oleonic acid was identified by comparison of the NMR data with the literature (Table 1) [5]. The HSQC spectrum of the glycosidic part showed cross-peaks corresponding to six anomers at δ_{H} 4.77 (1H, d, *J* = 6.0 Hz) / δ_{C} 104.6, δ_{H} 4.81 (1H, d, *J* = 7.9 Hz) / δ_{C} 102.4, δ_{H} 5.13 (1H, d, *J* = 7.4 Hz) / δ_{C} 106.1, δ_{H} 5.22 (1H, d, *J* = 6.7 Hz) / δ_{C} 102.9, δ_{H} 5.41 (1H, d, *J* = 8.2 Hz) / δ_{C} 103.7, and δ_{H} 6.01 (1H, br s) / δ_{C} 101.0. Acid hydrolysis and GC analysis [14], and extensive 2D NMR analysis, allowed the full identification of the sugar units as one β -D-glucopyranosyl (Glc), three β -D-xylopyranosyl (Xyl), one α -L-arabinopyranosyl (Ara), and one α -L-rhamnopyranosyl (Rha).

The linkages between these six sugars were established using mainly HMBC and NOESY spectra (S1). The HMBC correlation between δ_{H} 3.21 (H-3) and δ_{C} 104.6 (Ara-1) suggested the glycosidic linkage of the Ara at the C-3 position of the aglycone. This was confirmed by the NOESY cross-peak at δ_{H} 4.77 (Ara-1) / δ_{H} 3.21 (H-3). The HMBC cross-peak at δ_{H} 4.44 (1H, dd, *J* = 6.4, 6.0 Hz, Ara-2) / δ_{C} 101.0 (Rha-1) and the NOESY cross-peak at δ_{H} 6.01 (Rha-1) / δ_{H} 4.44 (Ara-2), proved the (1 \rightarrow 2) linkage between Rha and Ara. The correlations at δ_{H} 5.13 (Xyl I-1) / δ_{C} 81.9 (Rha-3) in the HMBC spectrum, and at δ_{H} 5.13 (Xyl I-1) / δ_{H} 4.57 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, Rha-3) in the NOESY spectrum, confirmed the (1 \rightarrow 3) linkage between Xyl I and Rha. Another β -D-xylopyranosyl moiety (Xyl II) is linked at the position 4 of the Xyl I. This was proved by the HMBC cross-peak at δ_{H} 4.81 (Xyl II-1) / δ_{C} 77.4 (Xyl I-4), and the NOESY cross-peak at δ_{H} 4.81 (Xyl I-1) / δ_{H} 4.12 (1H, m, Xyl I-4). Finally, the terminal sequence β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl was determined according to the HMBC correlation between δ_{H} 4.42 (1H, dd, *J* = 9.1, 8.6 Hz, Xyl II-3) / δ_{C} 103.7 (Glc-1), and the NOESY cross-peak at δ_{H} 5.22 (Xyl III-1) / δ_{H} 4.32 (1H, m, Xyl II-4).

On the basis of the above results, the structure of **1** was elucidated as 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyloleanolic acid.

The partial sequence 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyloleanolic acid found in compounds **1**, **3**, **4** was shown to possess additional glycosylations by β -D-xylopyranosyl and/or β -D-glucopyranosyl units. This sequence already encountered in other species from Caprifoliaceae such as *W. stelzneri* [5] and *Scabiosa tschiliensis* [15] may represent a chemotaxonomic marker of this family.

Since triterpene saponins from *Quillaja saponaria* were reported to be lethal to zebrafish at a concentration > 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a zebrafish

Table 1: ¹H- and ¹³C NMR data (pyridine-*d*₅, δ in ppm)^a of compound **1**.

| Position | δ_{H} | δ_{C} (<i>J</i> in Hz) | Position | δ_{H} | δ_{C} (<i>J</i> in Hz) |
|----------|---------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------|---------------------------------------|
| 1 | 38.6 | 0.86 m, 1.42 m | Ara-1 | 104.6 | 4.77 d (6.0) |
| 2 | 26.2 | 1.74 m, 1.99 m | 2 | 75.4 | 4.44 dd (6.4, 6.0) |
| 3 | 88.5 | 3.21 dd (11.6, 3.1) | 3 | 73.5 | 4.20 dd (6.4, 1.2) |
| 4 | 39.4 | - | 4 | 68.5 | 4.25 m |
| 5 | 55.6 | 0.74 | 5 | 64.6 | 3.76 dd (11.7, 1.9), 4.26 |
| 6 | 18.2 | 1.20, 1.48 m | Rha-1 | 101.0 | 6.01 br s |
| 7 | 32.5 | 1.18 m, 1.36 m | 2 | 71.1 | 4.78 br s |
| 8 | 39.2 | - | 3 | 81.9 | 4.57 dd (8.6, 2.0) |
| 9 | 47.7 | 1.56 dd (14.1, 7.8) | 4 | 72.1 | 4.38 |
| 10 | 36.7 | - | 5 | 69.2 | 4.49 dq (8.8, 6.0) |
| 11 | 23.4 | 1.81 m, 1.89 | 6 | 18.1 | 1.48 d (6.0) |
| 12 | 122.1 | 5.39 br t (3.0) | Xyl I-1 | 106.1 | 5.13 d (7.4) |
| 13 | 144.5 | - | 2 | 74.8 | 3.97 dd (7.8, 7.4) |
| 14 | 41.6 | - | 3 | 75.5 | 4.05 |
| 15 | 27.8 | 1.10 m, 2.10 m | 4 | 77.4 | 4.12 m |
| 16 | 23.4 | 1.89, 2.04 m | 5 | 64.1 | 3.49 t (11.1), 4.28 |
| 17 | 46.4 | - | Xyl II-1 | 102.4 | 4.81 d (7.9) |
| 18 | 41.8 | 3.19 | 2 | 74.3 | 3.94 dd (8.6, 7.9) |
| 19 | 46.2 | 1.20, 1.73 dd (14.2, 13.3) | 3 | 81.2 | 4.42 dd (9.1, 8.6) |
| 20 | 30.6 | - | 4 | 73.9 | 4.32 m |
| 21 | 33.8 | 1.12 m, 1.39 m | 5 | 66.2 | 3.65 t (11.0), 4.41 |
| 22 | 33.0 | 1.69 m, 1.89 | Xyl III-1 | 102.9 | 5.22 d (6.7) |
| 23 | 27.8 | 1.24 s | 2 | 74.5 | 4.03 |
| 24 | 16.7 | 1.02 s | 3 | 76.9 | 4.08 |
| 25 | 15.2 | 0.75 s | 4 | 70.5 | 4.09 |
| 26 | 17.1 | 0.87 s | 5 | 66.1 | 3.63 t (11.1), 4.35 |
| 27 | 25.8 | 1.22 s | Glc-1 | 103.7 | 5.41 d (8.2) |
| 28 | 179.8 | - | 2 | 75.2 | 4.02 |
| 29 | 32.9 | 0.86 s | 3 | 77.2 | 4.10 |
| 30 | 23.4 | 0.92 s | 4 | 70.2 | 4.11 |
| | | | 5 | 77.3 | 3.83 m |
| | | | 6 | 62.0 | 4.14, 4.37 |

^a) Overlapped signals are reported without designated multiplicity.

embryo assay [9], we evaluated compounds **1-3** for their toxic and teratogenic effects by using a standard toxicological assay with the zebrafish model system [12]. The effects are performed by continuous exposure of the embryos to the test compounds starting at the earliest possible stage (2-3 h post-fertilization (hpf)). The major developmental events (eyes formation, heart-beat, blood circulation) take place during the first 48 hours of development. The third day of zebrafish development is critical for organogenesis in the developing larvae. We decided to evaluate the effects after exposure of the larvae from 48 to 72 hpf. We investigated whether exposure between 48 and 72 hpf would lead to morphological abnormalities. We tested each compound at 6 defined concentrations (1 μM , 1.25 μM , 1.5 μM , 2 μM , 2.5 μM , 3 μM). The results are reported on the curves of Figure 2. Zebrafish embryos exposed to 3 % ethanol were positive controls (100 % embryonic death). Survival rates were first analyzed at 72 hpf for several concentrations and LC50, LC10 (lethal concentrations), and EC50, EC10 (morphological defect concentrations) were determined for each compound and are presented in Table 2.

Table 2: Toxicological values of tested compounds. LC50 and LC10 were obtained under treatment starting from 48 to 72 hpf, observation at 73 hpf.

| Comps | LC50 | EC50 | LC10 | EC10 |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 2.855 μM | 2.914 μM | 2.192 μM | 2.240 μM |
| 2 | 1.277 μM | 1.195 μM | 1.016 μM | 1.081 μM |
| 3 | 1.299 μM | 1.491 μM | 1.031 μM | 0.792 μM |
| cb | >100 μM | >100 μM | >100 μM | >100 μM |

Compound **2** and **3** appear to induce similar (LC50 = 1.277 μM vs 1.299 μM) toxicity and compound **1** was less active (LC50 = 2.855 μM). The values of LC and EC were calculated with the percentage of survival larvae in function of the tested concentration log resulting in sigmoid curves of dose-response type (see experimental). The calculated results (log EC and log LC) and the corresponding standard deviations are reported in Table 3 and confirmed that the lethal effects were observed for the three compounds, compounds **2** and **3** being more toxic than **1**. In order to prove the role of the triterpenoid aglycone in the toxicity, another type of glycoside was tested. A phenolic one was chosen in the glycosides

library of the laboratory, named loroglossin (2*R*,3*S*)-1-[*p*-(β -D-glucopyranosyloxy)benzyl]-4-[*p*-(β -D-glucopyranosyloxy)benzyl]-2-isobutyltartrate [16], and was thus evaluated. No toxicity was observed underlying the importance of the triterpenoid structure of the aglycone (Figure 2).

Table 3: Toxicological and effective concentrations of tested compounds.

| Comps | Log LC50 | Log EC50 | Log LC10 | Log EC10 |
|-------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 1 | 0.4556±0.0084 | 0.4645±0.0121 | 0.3408±0.0190 | 0.3503±0.0291 |
| 2 | 0.1063±0.0111 | 0.0723±0.0070 | 0.0070±0.0245 | 0.0339±0.0158 |
| 3 | 0.1138±0.0102 | 0.1736±0.034 | 0.0134±0.0238 | -0.1011±0.0699 |
| cb | - | - | - | - |

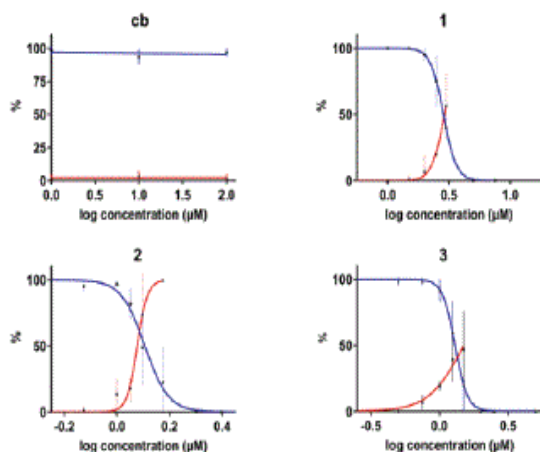


Figure 2: Survival and abnormalities of larvae after exposure to compounds 1-3 and Cb (loroglossin, a phenol glycoside). Fraction of surviving larvae (blue line) presenting any morphological abnormalities (red line) at 72 hpf upon exposure to 1-3 for 24h.

To assess the developmental effects caused on the larvae, embryos were treated with several concentrations of compounds 1-3 at 48 hpf and evaluated 1 day later (72 hpf) in the survived larvae for occurrence of morphological alterations indicative of a cardiotoxicity such as pericardial edema, hemorrhage, pericardial edema and hemorrhage. Curvature of the larvae and developmental defects were also assessed. The results of observed morphological defects are presented as percentages in Table 4, and graphically in S2. The observed defects appear in the images of S3.

Table 4: Morphological defects. The table shows the proportions of larvae presenting different morphological defects upon exposure to compounds 1-3 at the indicated concentrations: from 48 to 72 hpf, in comparison with 2% ethanol.

| concentration | pericardial edema | hemorrhage | pericardial edema & hemorrhage | curved | developmental defect | |
|---------------|-------------------|-------------|--------------------------------|-------------|----------------------|---|
| 1 | | | | | | |
| 2 μ M | 50 | - | 25 | - | 25 | |
| 2.5 μ M | 55,56±37.04 | 5,56±7.41 | 33,33±44.44 | 5,56±7.41 | - | |
| 3 μ M | 39,05±26.03 | 9,52±12.70 | 33,33±44.44 | 18,10±14.60 | - | |
| 2 | | | | | | |
| 1 μ M | 43,33±28.89 | 6,67±8.89 | - | 50,00±33.33 | - | |
| 1.125 μ M | 18,75±16.67 | 56,25±16.67 | 25,00±44.40 | - | - | |
| 1.25 μ M | 44,64±24.60 | 2,86±6.36 | 50,00±22.22 | 2,50±5.56 | - | |
| 3 | | | | | | |
| 1 μ M | - | 50±33.33 | 16,67±11.11 | - | 33,33±11.11 | |
| 1.25 μ M | 25±33.33 | 19,45±12.96 | 22,23±14.82 | 33,11±22.08 | - | |
| 1.5 μ M | 20,00±20.00 | - | 30,00±30.00 | 50,00±50.00 | - | |
| EtOH | 2% | 58,50±1.96 | 3,70±2.47 | 15,14±6.39 | 22,66±3.99 | - |

Compound 1 exposure did not cause significant morphological defects since it was shown to induce pericardial edema in 50 % of the larvae at 2 μ M to 39±26% at 3 μ M, whereas 2 induces this defect in 43±28 % of the larvae at 1 μ M to 44±24 % at 1.25 μ M and 3 in 25±33 % at 1.25 μ M to 20±20 % at 1.5 μ M. The compound,

which induces most hemorrhages, was compound 2 with 50±33 % at 1 μ M and 19.45±12 % at 1.25 μ M v/s 1 with defects from 5.56 ±7 % at 2.5 μ M to 9.52±12 % at 3 μ M. Pericardial edema and hemorrhages were also in the same order, compound 2 inducing the most important percentages of defects in 25±44 % to 50±22 % of the larvae at concentrations ranging from 1.125 to 1.5 μ M. Similar concluding remarks were observed for 50±33 % of observed larvae which presented curvature after exposure to compounds 2 and 3 at 1 μ M and 1.5 μ M respectively.

In conclusion, compounds 2 and 3 cause more lethality and significant morphological defects at the tested doses such as a cardiovascular toxicity to the zebrafish larvae than compound 1. Further experiments with a higher number of tested saponins will be useful for a structure/activity relationship study and the exploration of the toxic mechanism of saponins in zebrafish. However, these results showing a lethal effect at low concentrations of three monodesmosidic saponins are in good agreement with literature data showing that monodesmosidic saponins were more cytotoxic than the bidesmosidic ones, and highlighting the presence of an oligosaccharidic chain at C-3 of an oleanane-type aglycon [5,7].

Experimental

General experimental procedures: For spectroscopic and chromatographic data see ref [17]. Thin-layer chromatography (TLC, Silicycle) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC, Merck) were carried out on precoated silica gel plates 60F₂₅₄, solvent system CHCl₃/MeOH/H₂O/AcOH 70:30:5:1. The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH/H₂SO₄, 50:1)

Plant material: *Weigela x "kosteriana variegata"* was provided in 2015 from Botanic ® (Quétigny, France). The plant was properly identified with a voucher specimen (N° 20111003) deposited in the herbarium of the Laboratory of Pharmacognosy, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

Extraction and isolation: The dried powdered roots of *W. x "kosteriana variegata"* (25 g) were refluxed three times with EtOH-H₂O (75/35, 3 x 250 mL) for 30 min. After evaporation of the solvent under vacuum, the resulting extract (7.35 g) was submitted to VLC on silica gel [CHCl₃/MeOH/H₂O 90:10:1 (900 mL), 80:20:2 (1000 mL), 70:30:5 (1600 mL), 60:32:7 (1700 mL) and 0:100:0 (1700 mL)], yielding five fractions (fractions A-E). Fraction C, eluted with CHCl₃/MeOH/H₂O 70:30:5, was submitted to VLC on RP-18 reversed-phase silica gel [MeOH/H₂O 0:100 (800 mL), 70:30 (800 mL), 50:50 (800 mL), 30:70 (500 mL) and 100:0 (500 mL)]. The fraction eluted with MeOH/H₂O 50:50 was fractionated by CC (Sephadex LH-20, MeOH) to give a fraction rich in saponin (120 mg). The latter was submitted to a MPLC on silica gel (CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2, 70:30:5 and 0:100:0) yielding four pure compounds, 1 (8.5 mg), 2 (17 mg), 3 (12.4 mg), and 4 (8.7 mg). All the compounds met the criteria > 95 % purity as inferred by HPLC and NMR analyses.

Acid hydrolysis and GC analysis: See ref [5, 14].

3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyloleanolic acid (1)

White amorphous powder.

$[\alpha]_D^{25}$: -24 (c 0.75, MeOH)

¹H NMR and ¹³C NMR (600 and 150 MHz): Table 1.

HRESIMS: m/z 1315.6293 ($[M + Na]^+$ calcd. $C_{62}H_{100}NaO_{28}$, 1315.6299); ESIMS (negative mode): m/z 1291 $[M - H]^-$.

Zebrafish lines and maintenance: Zebrafish were maintained in a re-circulating aquaculture system (Müller & Pflieger, Germany). Photoperiod was 14 L:10D (light: dark), and the mean ranges for conductivity, pH, and temperature in the system were 600–700 μ S, 6.0–8.0, and 26–28°C, respectively. Experiments were performed using the wild-type line *WIK* (ZIRC). Eggs were collected within one hour of laying and kept at 28°C in Petri dishes containing source water (Volvic, France) supplemented with 0.3 μ g/mL of methylene blue.

Ethics statement: All experiments were executed in strict accordance with the European Council Directive (2010/63/EC). According to the EU Directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU) and the Commission Implementing Decision (2012/707/EU), fish are non-protected animals until the stage of free feeding; this limit was set at 120 hours post fertilization (hpf) for zebrafish. No specific ethics approval was required for this project, as all zebrafish embryos used in this study were between 48 and 72 hpf old.

Drug treatments: Stock solutions of compounds 1–3 were prepared by dissolution of the pure compounds in E3 medium and then diluted to desired concentrations in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂, and 0.16 mM MgSO₄). Treatments were administered to 48 hpf zebrafish larvae distributed in pools of 20 into 6-well plates in E3 medium. Controls wells contained E3 medium. One day post-treatment (72hpf), the larvae were rinsed twice in E3 before observation. All experiments were achieved at least in triplicate on $n=20$ larvae per test, each experiment was

performed at least three times. Survival and morphological development defects were evaluated on 48 hours and 72 hpf using an Olympus SZX10 stereomicroscope coupled with an Olympus XC50 camera. To assess teratogenicity, the surviving larvae were observed for morphological defects and the number of larvae presenting at least one morphological defect was reported as percentage of the surviving larvae. Zebrafish embryos incubated in fish water are considered as negative control and resulted in 100% survival and 1.66% teratogenicity. Zebrafish embryos exposed to ethanol are considered as a positive control for toxicity. Treatment with 2% ethanol showed 98.33 ± 2.22 % survival and 86.67 ± 2.22 % teratogenicity, whereas the treatment with 3 % ethanol resulted in 100% embryonic death. For calculation of LC50, LC10, EC50, EC10 values, the Prism software was used. Photographs were carried out on Axiozoom (Zeiss) at Cellimap platform (Dijon). Image acquisition was carried out by using the Zen program (Zeiss) and then adjusted via GIMP.

Statistical analyses: LC50, LC10, EC50, EC10 were calculated by plotting the surviving/affected larvae against the log transformed test concentrations and the obtained curves were fitted to a sigmoidal concentration-response relation according to the following equation: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1 + 10^{\log EC_{50} - x})$, in which bottom and top represent respectively the lowest and the highest y -value (% survivors/affected). The resulting calculated log EC/LC were extracted and their corresponding S.D. given.

Supplementary data: Figures S1 to S3.

Acknowledgments - The authors would like to thank Tatiana Lopez for fish care, and the Conseil Régional de Bourgogne (PARI program) and the FEDER program for financial support.

References

- [1] FOBS, Friends of the Botanical Gardens. <http://www.fobssheffield.co.uk/weigela.html#weigela>
- [2] The Angiosperm phylogeny group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
- [3] Murayama T, Kasahara A, Shiono Y, Ikeda M. (2003) Structure elucidation of a triterpene glycoside isolated from *Weigela hortensis*. *Nature Medicines*, 57, 181–184.
- [4] Won YM, Seong ZK, Kim JL, Kim HS, Song HH, Kim DY, Kim JH, Oh SR, Cho HW, Cho JH, Lee HK. (2015) Triterpene glycosides with stimulatory activity on melanogenesis from the aerial parts of *Weigela subsessilis*. *Archive of Pharmacal Research*, 38, 1541–1551.
- [5] Rezgui A, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Tanaka C, Delemasure S, Dutarte P, Lacaille-Dubois MA. (2016) Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelnieri*. *Phytochemistry*, 123, 40–47.
- [6] Lacaille-Dubois MA. (2005) Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: *Studies in Natural Products Chemistry Series*. Vol. 32, Atta-Ur-Rahman (Ed). Elsevier Science, 209–246.
- [7] Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. (2010) Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9, 425–474.
- [8] Challal S, Bohi N, Buenate OE, Esguerra CV, de Witte PAM, Wolfender JL, Crawford AD. (2012) Zebrafish bioassay-guided microfractionation for the rapid *in vivo* identification of pharmacologically active natural products. *Chimia*, 66, 229–232.
- [9] Hassan SM, Moussa EA, Abbott LC. (2008) Effects of *Quillaja* saponin (*Quillaja saponaria*) on early embryonic zebrafish (*Danio rerio*) development. *International Journal of Toxicology*, 27, 273–278.
- [10] Liang J, Jin W, Li H, Liu H, Huang Y, Shan X, Li C, Shan L, Efferth T. (2016) *In vivo* cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. *Molecules*, 21 190–199.
- [11] Mandrekar N, Thakur NL. (2009) Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. *Biotechnology Letters*, 31, 171–179.
- [12] Pruvot B, Quiroz Y, Voncken A, Jeanray N, Piot A. (2012) A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants of late stage of zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology*, 34, 568–583.
- [13] Panov DA, Grishkovets VI, Kachala VV, Shashkov AS. (2006) Triterpene glycosides from *Kalopanax septemlobum*. VI. Glycosides from leaves of *Kalopanax septemlobum* var. *typicum* introduced to Crimea. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 49–54.
- [14] Hara S, Okabe H, Mihashi K. (1987) Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 501–506.
- [15] Zheng Q, Koike K, Han LK, Okuda H, Nikaido T. (2004) New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. *Journal of Natural Products*, 67 604–613.
- [16] Huang SY, Li GQ, Shi JG, Mo SY, Wang SJ, Yang YC. (2004) Chemical constituents of the rhizomes of *Coelogyne viride* var. *bracteatum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 6, 49–61.
- [17] Champy AS, Mitaine-Offer AC, Paululat T, Papini AM, Lacaille-Dubois MA. (2017) Triterpene saponins from *Wisteria floribunda* “macrobotrys” and “rosea”. *Natural Product Communications*, 12, 1573–1576.

| | |
|--|-----|
| Characteristic Aromas of <i>Quercus crispula</i> (Japanese Oak) Toshio Hasegawa, Ryosuke Mamada, Takahisa Yamanaka, Bujiyuro Shimazaki and Takashi Fujihara | 475 |
| Microbial Transformation of <i>Calamintha glandulosa</i> Essential Oil by <i>Aspergillus niger</i> Miroslav Novakovic, Danka Bukvicki, Vlatka Vajs, Vele Tesevic, Slobodan Milosavljevic, Petar Marin and Yoshinori Asakawa | 479 |
| Altered Antimicrobial and Anti-biofilm Forming Effect of Thyme Essential Oil due to Changes in Composition Csilla Gömöri, Anita Vidács, Erika Beáta Kerekes, Elvira Nacsá-Farkas, Andrea Böszörményi, Csaba Vágvolgyi and Judit Krisch | 483 |

Accounts/Reviews

| | |
|---|-----|
| Chemo- and Enantioselective Catalytic Hydrogenation of α,β-Unsaturated Ketones and Aldehydes as a Tool to Introduce Chiral Centers at α- or β-Positions of Ketones Hisahiro Hagiwara | 489 |
| A Phytochemical and Pharmacological Review on <i>Cynomorium songaricum</i> as Functional and Medicinal Food Jin-Long Cui, Yi Gong, Xiao-Zan Xue, Yan-Yan Zhang, Meng-Liang Wang and Jun-Hong Wang | 501 |

Natural Product Communications 2018

Volume 13, Number 4

Contents

| <u>Original Paper</u> | <u>Page</u> |
|---|-------------|
| Spatial Structure and Antimicrobial Activity of Cyclopropane Derivative of Limonene Daniyar Sadyrbekov, Timur Saliev, Yuri Gatilov, Ivan Kulakov, Roza Seidakhmetova, Tulegen Seilkhanov and Sholpan Askarova | 387 |
| Chemical and Genetic Identity of <i>Ligularia tsangchanensis</i> and <i>L. muliensis</i>. Isolation of a Cacalol Precursor from a Hybrid of <i>L. tsangchanensis</i> and <i>L. velleera</i> Chiaki Kuroda, Taketo Itoh, Yurika Suzuki, Yuko Suzuki, Yasuko Okamoto, Motoo Tori, Ryo Hanai and Xun Gong | 389 |
| Sesquiterpene Lactones and Phenolics from Roots of <i>Leontodon hispidus</i> subsp. <i>hispidus</i> Klaudia Michalska, Katarzyna Pieron and Anna Stojakowska | 393 |
| Synthesis and Insecticidal Activity of β-Dihydroagarofuran Acetal Derivatives Xin Xi, Ximei Zhao, Feng Zhu, Jieliu Wei, Zhan Hu, Wenjun Wu and Jiwen Zhang | 395 |
| Isolation, and Structural Characterization of a New Hexa β-D-Glucoopyranosyl Diterpene from <i>Stevia rebaudiana</i> Venkata Sai Prakash Chaturvedula and Srinivasa Rao Meneni | 399 |
| Phytochemistry of <i>Weigela</i> x "<i>kosteriana variegata</i>" (Caprifoliaceae) Nampoina Andriamisaina, Anne-Claire Mitaine-Offier, Benoist Pruvot, Johanna Chluba, Tomofumi Miyamoto, Chiaki Tanaka and Marie-Aleth Lacaille-Dubois | 403 |
| New Acetylated Saponins from the Leaves of <i>Trevesia palmata</i> Le Thi Thanh Thao, Do Quyen, Duong Binh Vu, Bui Huu Tai and Phan Van Kiem | 407 |
| A New Saponin with Anti-HIV-1 Protease Activity from <i>Acacia pennata</i> Van-Dung Nguyen, Hong-Loan Thi Nguyen, Linh-Chi Do, Vu Van Tuan, Phuong Thien Thuong and Tuan-Nghia Phan | 411 |
| Ginsenoside Rg1 Exhibits Anti-asthmatic Activity in an <i>Aspergillus</i> Protease-Induced Asthma Model in Mice Chiyeon Lim, Sehyun Lim, ByoungHo Lee and Sun Cho | 415 |
| Daffodils as Potential Crops of Biologically-active Compounds: Assessment of 40 Ornamental Taxa for their Alkaloid Profile and Cholinesterases Inhibition Activity Kateřina Breiterová, Miroslav Ločárek, Eliška Kohelová, Markéta Taláčková, Daniela Hulcová, Lubomír Opletal and Lucie Cahliková | 419 |
| Antifouling Potentials and Metabolite Profiles of Two Marine-derived Fungal Isolates Xiao-Yong Zhang, Muhammad Amin, Xin-Ya Xu and Shu-Hua Qi | 423 |
| New Flavanol Dimers from the Bark of <i>Celtis tetrandra</i> and Their TRAIL Resistance-Overcoming Activity Prapairot Seephonkai, Ryusho Ishikawa, Midori A. Arai, Thaworn Kowithayakorn, Takashi Koyano and Masami Ishibashi | 427 |
| Anti-oxidative Fraction of <i>Lycorma delicatula</i> Alleviates Inflammatory Indicators Seung-hwa Baek, Okjin Joung, Ho-Young Lee, Jae-Cheon Shin, Won-Sik Choi, Tae Hun Lee, Jae-Sam Hwang, Sung-Hee Nam, Hyeong-U Son and Sang-Han Lee | 431 |
| A New 3-Prenyl-2-flavene and Other Extractives from <i>Baphia massaiensis</i> and Their Antimicrobial Activities Ngonye Keroletswe, Runner R. T. Majinda and Ishmael B. Masesane | 435 |
| <i>In vitro</i> Shoot Cultures of <i>Pterospartum tridentatum</i> as an Alternative to Wild Plants as a Source of Bioactive Compounds José Carlos Gonçalves, Maria Teresa Coelho, Maria da Graça Diogo, Vitor D. Alves, Maria Rosário Bronze, Manuel António Coimbra, Vitor Manuel Martins and Margarida Moldão-Martins | 439 |
| Effect of Pretreatment of Morin on the Cisplatin-Induced Toxicity on LLC-PK1 and T24 Cells Claudia Bello-Alvarez, Angela Patricia Moreno-Londoño and José Pedraza-Chaverri | 443 |
| Cancer Chemopreventive Activity of Xanthenes from <i>Calophyllum elatum</i> Chihiro Ito, Takuya Matsui, Takashi Kobayashi, Harukumi Tokuda, Sivabalan Shanmugam and Masataka Itoigawa | 447 |
| A New Secondary Metabolite from Korean Traditional Herb Plant <i>Hovenia dulcis</i> Tu Cam Le, Kyung-Yun Kang, Inho Yang, Alain S. Leutou, Jaeyoung Ko, Young-Jin Son, Sung-Tae Yee and Sang-Jip Nam | 451 |
| Resveratrol Oligosaccharide Induces mRNA Expression for <i>SIRT</i> Hiroki Hamada, Kei Shimoda, Yasukazu Saitoh, Shouta Doi, Yuya Fujitaka, Tsubasa Ono, Hatsuyuki Hamada and Minami Araki | 455 |
| Ultrasound-assisted Extraction of Polysaccharide from Radix Bupleuri using Response Surface Methodology and Antioxidant Research of the Polysaccharide Changchun Hao, Hongjin Qu, Shi Chen, Wenjing Han and Runguang Sun | 457 |
| α-Glucosidase Inhibitor Isolated from <i>Blechnum pyramidatum</i> Lilia Cherigo and Sergio Martínez-Luis | 461 |
| <i>Cordyceps militaris</i> Extract Inhibits the NF-κB pathway and Induces Apoptosis through MKK7-JNK Signaling Activation in TK-10 Human Renal Cell Carcinoma Soo Jung Park, Hyun-Jin Jang, In-Hu Hwang, Jung Min Kim, Eunbi Jo, Min-Goo Lee, Ik-Soon Jang and Jong Cheon Joo | 465 |
| <i>Aceriphyllum rossii</i> Exerts Lipid-Lowering Action in Both Normal and Hyperlipidemic Mice Mun Ock Kim, Jee Hee Seo, Eun Bin Kwon, Myung Ji Kang, Su Ui Lee, Dong Oh Moon, Mi Kyeong Lee, Chul-Ho Lee and Hyun Sun Lee | 471 |

Continued inside backcover

Natural Product Communications 2018

Volume 13, Number 0, Pages

Phytochemistry of *Weigela x "kosteriana variegata"* (Caprifoliaceae)

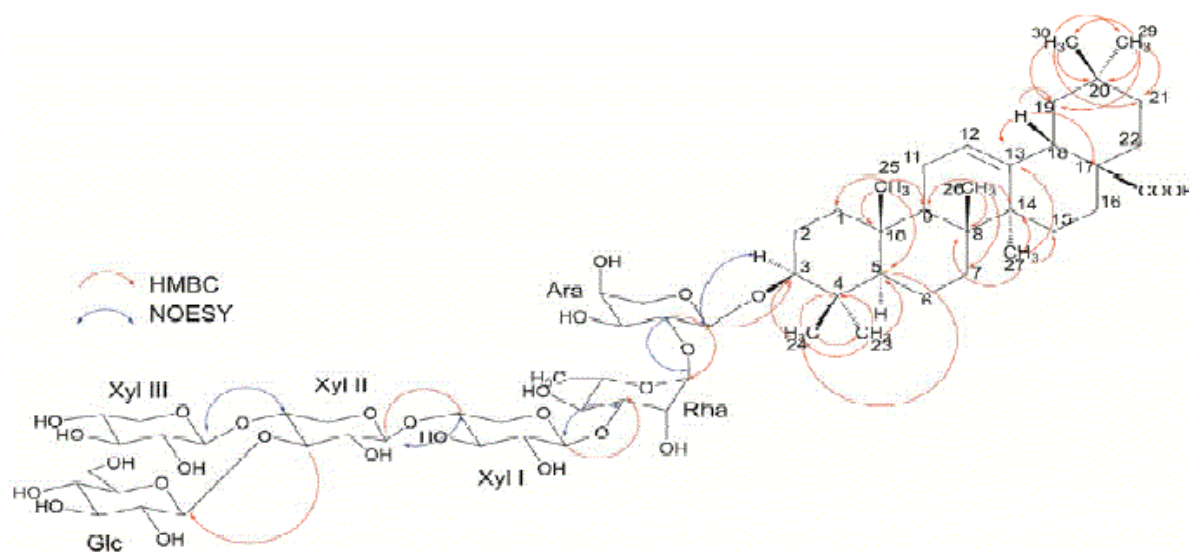
Nampoina Andriamisaina^a, Anne-Claire Mitaine-Offier^a, Benoist Pruvot^c, Johanna Chluba^{b,c},
Tomofumi Miyamoto^d, Chiaki Tanaka^d and Marie-Aleth Lacaille-Dubois

Supplementary data

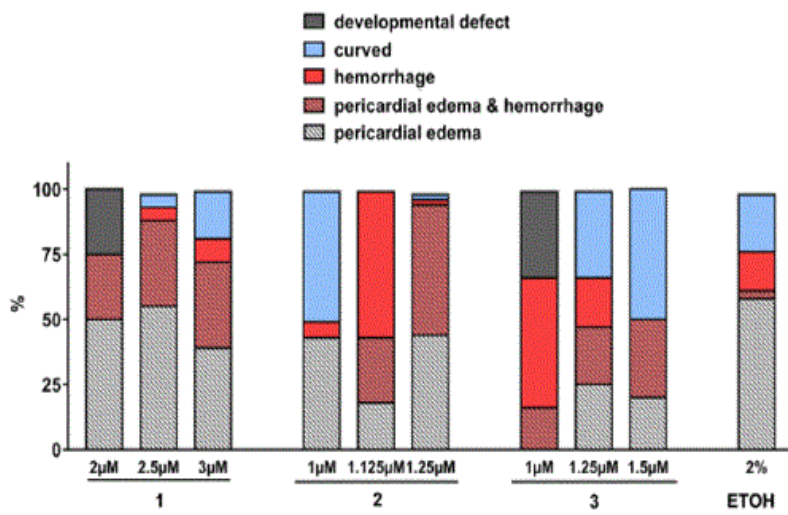
S1: Key HMBC and NOESY correlations of compound 1.

S2: Percentage of the different morphological defects (expression of the results in % of altered larvae).

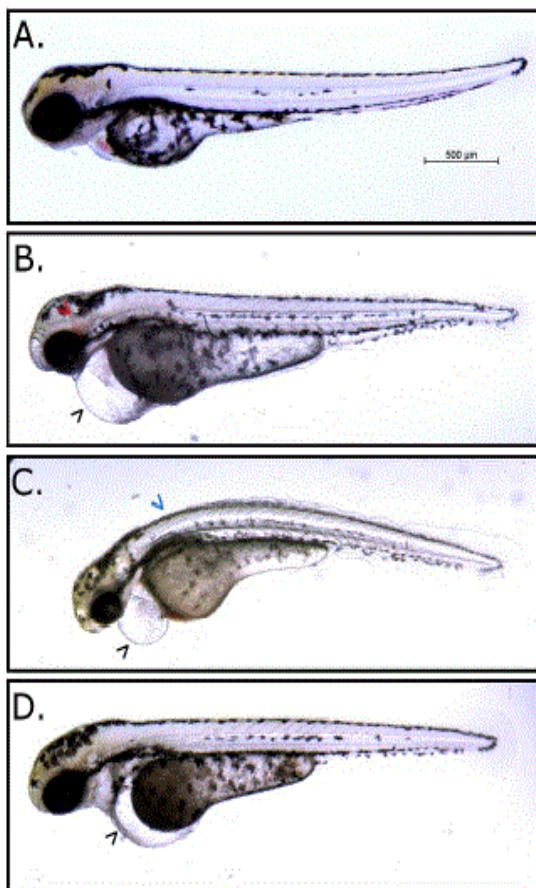
S3: Observed morphological defects; A: untreated; oedema (black arrows), hemorrhage (red arrow) and curvature (blue arrow).



S1: Key HMBC and NOESY correlations of compound 1.



S2: Percentage of the different morphological defects (expression of the results in % of altered larvae).



S3: Observed morphological defects; A: untreated; oedema (black arrows), hemorrhage (red arrow) and curvature (blue arrow).