



HAL
open science

Valorisation des produits naturels glycosylés pour la santé et l'environnement : du diagnostic de maladies auto-immunes à la protection des cultures

Bastien Petit

► To cite this version:

Bastien Petit. Valorisation des produits naturels glycosylés pour la santé et l'environnement : du diagnostic de maladies auto-immunes à la protection des cultures. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE009 . tel-03252466

HAL Id: tel-03252466

<https://theses.hal.science/tel-03252466>

Submitted on 7 Jun 2021

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.

Université Bourgogne Franche-Comté
Ecole Doctorale E2S

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
DISCIPLINE : PHARMACIE
SPÉCIALITÉ : PHARMACOGNOSIE

Présentée et soutenue publiquement le 2 décembre 2020 par

Bastien PETIT

Valorisation des produits naturels glycosylés pour la santé et
l'environnement : du diagnostic de maladies auto-immunes à la
protection des cultures

Devant le jury composé de

Rapporteur : Pr. Brigitte DEGUIN	Université Paris-Descartes
Rapporteur : Pr. Pascal RICHOMME	Université Angers
Directeur : Pr. Anne-Claire MITAINE-OFFER	Université Bourgogne Franche-Comté
Co-directeur : Pr. Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS	Université Bourgogne Franche-Comté
Examineur : Pr. Anna Maria PAPINI	Université de Florence
Examineur : Dr. Jochen FISCHER	Université technique de Kaiserslautern

Année universitaire 2020-2021

Epigraphe

What we know is a drop, what we don't know is an ocean. — Isaac Newton

Dédicace

À Maxime, pour m'avoir donné le temps de réaliser ce projet. Et à mes parents, pour avoir eu la bonne idée de faire une famille nombreuse.

Remerciements

Je souhaiterais remercier en premier lieu ma directrice de thèse, la Professeure Anne-Claire MITAINE-OFFER, pour m'avoir guidé avec bienveillance durant ces trois années. Je lui suis reconnaissant pour la confiance, l'autonomie et la liberté qu'elle m'a accordé. Je la remercie également pour avoir su accueillir mes idées et m'avoir aidé à les développer. Ce fut très formateur de bénéficier de son expérience et de sa vision de la recherche académique.

J'aimerais aussi remercier ma co-directrice de thèse, la Professeure Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a déjà plusieurs années. Alors étudiant en Master 1, je ne savais pas encore que j'y conduirais une thèse. Je lui suis reconnaissant pour m'avoir formé à la rédaction scientifique avec cette rigueur et ce sens aigu du détail que j'admire beaucoup.

Je remercie également les membres présents ou passés du Laboratoire de Pharmacognosie, notamment David PERTUIT pour ses précieux conseils techniques et pratiques, Dr. Anne-Sophie CHAMPY-TIXIER, pour ses conseils de début de thèse ainsi que Simon DESSERTAINE, pour son implication dans la vie du laboratoire. Merci également aux collaborateurs japonais et belges qui font un excellent travail, Dr. Tomofumi MIYAMOTO, Dr. Chiaki TANAKA et Pr. Clément DELAUDE.

Ceux de passage au laboratoire ne sont pas oubliés. C'est le cas de Dr. Antoine BRUGUIERE, Dr. Walid KHITRI, Amina DAHMOUNE et Dr. Nampoina ANDRIAMISAINA dont j'ai croisé le chemin ne serait-ce qu'une courte période.

Enfin, je veux remercier mes deux chaleureux camarades, « *my friends* », Clément RICHARD et Hung NGUYEN pour leur jovialité et leur sympathie. Je n'oublierai pas les moments passés ensemble, qui ont aussi contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je dois encore remercier mes collègues d'Italie. *Muchas gracias* à Dr. Feliciano REAL-FERNANDEZ pour m'avoir supervisé au cours de ces quelques mois passés à Florence. *Grazie mille* aux Professeurs Anna Maria PAPINI et Paolo ROVERO pour leur apport conceptuel et l'accueil au sein de leurs laboratoires respectifs. Un grand merci aux amitiés nouées durant ce séjour, notamment avec Chiara TESTA, Antonio MAZZOLENI et Lorenzo ALTAMORE.

Vient le tour des collègues et amis allemands. Je ne remerciais jamais assez Dr. Jochen FISCHER, mon superviseur depuis le Master 2, qui m'a beaucoup apporté en matière de techniques

de laboratoire. Ce fut un plaisir de travailler à nouveau ensemble entre les *schnellkochtöpfe* et les *korkringe*. *Viel danke* à Dr. Anja SCHÜFFLER et Pr. Eckhard THINES pour leur expertise scientifique et leur bienveillance. Un grand merci aux amis de l'IBWF, Stefan BONHERT, Kira KINTZLER, Florian SCHMIDT, Sofia HITZLER, Azahara BERNAL et Szabina LENGYEL pour leur camaraderie et leur énergie.

Merci aussi aux collègues bisontins de l'EA4267, en particulier Pr. Céline DEMOUGEOT, Dr. Perle TOTOSON, Dr. Corine GIRARD et les doctorants Rym ATTIA, Jason MULLER, Romain BORDY et Raphaël CORNU.

Un remerciement spécial aux personnes qui, bien qu'éloignées de la recherche, ont apporté leur contribution à cette thèse. C'est le cas d'Olivier TISSOT de l'association AromaPro qui a financé une partie des frais de déplacement en Italie et en Allemagne. C'est aussi la situation de Dominic BATT dont la relecture rigoureuse des publications a été appréciée, *thank you*.

Ce tour d'horizon ne pourrait être complet sans adresser de remerciements à mes amis doctorants ou futur-doctorants, Vincent LHUSSIEZ, Reda BELAICHE, Claire BRENIAUX, Georges SAADE et Daouda KEITA.

Merci aux instances qui m'ont financé ou formé, le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, l'Ecole Doctorale n°554 « Environnements-Santé », le DAAD, l'Université Bourgogne Franche-Comté et la ville de Dijon.

À toutes celles et ceux qui me sont chers et qui m'ont soutenu dans les moments difficiles. Je pense surtout à mes parents, ma sœur, mon frère, Alessandra, Cyril et Françoise. A ma grande famille également, ce qui inclut mes grands-parents, mes oncles et mes tantes, mes nombreux cousins et cousines. À Stéphane, qui m'a donné l'ordinateur sur lequel j'ai écrit ce manuscrit. A mes amis enfin, de toutes les générations : enfance, lycée et université.

Titre : Valorisation des produits naturels glycosylés pour la santé et l'environnement : du diagnostic de maladies auto-immunes à la protection des cultures

Résumé : Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR des Sciences de Santé, situé sur le campus de Dijon et rattaché à l'Université Bourgogne Franche-Comté. Elle a pour objectif la recherche de molécules d'origine végétale, principalement des saponines biologiquement actives issues de la biodiversité tropicale. Dans ce contexte, quatre espèces appartenant à la famille des Sapindaceae, à savoir *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Chytranthus macrobotrys* et *Radlkofera calodendron*, ont été sélectionnées pour une étude phytochimique. La purification des produits naturels impliquait diverses techniques de chromatographie liquide d'adsorption telles que la chromatographie flash, la chromatographie liquide sous vide et la chromatographie liquide haute performance. Celles-ci ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de trente glycosides naturels dont dix-neuf sont de structures nouvelles. Toutes sont des saponines triterpéniques dérivées de l'hédéragénine à l'exception d'un glycoside sesquiterpénique de type farnésène. Les structures ont été élucidées par des techniques spectroscopiques, principalement la RMN 2D et la spectrométrie de masse. L'activité biologique des composés isolés a ensuite été évaluée dans les secteurs de la santé et de l'environnement au cours de deux projets pluridisciplinaires et indépendants menés en partenariat avec des équipes de recherche européennes. Le premier, mené conjointement avec des équipes italiennes de l'Université de Florence, impliquait l'utilisation de saponines comme sondes antigéniques dans la détection de biomarqueurs de grand intérêt diagnostique dans les sérums de patients atteints de sclérose en plaque. Cette approche a mis en évidence une absence de réponse spécifique des sérums de patients envers les saponines des Sapindaceae. Le second projet, réalisé avec un institut allemand spécialisé dans la biologie fongique, avait pour objectif l'évaluation des capacités antimicrobiennes des saponines des Sapindaceae envers divers phytopathogènes de haute importance. Cette démarche a permis d'identifier huit saponines dotées d'activités antimicrobiennes sur les micro-organismes suivants : *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fomitiporia mediterranea*, *Zymoseptoria tritici*, *Trichoderma atroviride*, *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata* et *Xylella fastidiosa*. Les pathogènes les plus susceptibles étaient les champignons *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Fomitiporia mediterranea* pour lesquels des MIC/IC₅₀ au plus bas à 25/10 µg/ml furent enregistrées. Des relations structure-activité et une discussion des résultats à la lumière des interactions plantes microbes ont été proposées.

Mots clés : saponines, Sapindaceae, sclérose en plaques, reconnaissance d'anticorps, agents antimicrobiens, phytopathogènes

Title: Adding value to glycosylated natural products in the fields of health and environment: from diagnosis of autoimmune diseases to crop protection

Abstract: This research project was carried out in the Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Health Sciences, located in Dijon city and attached to the University Burgundy Franche-Comté. This laboratory is conducting research on natural products from tropical plants, mainly saponins. In this context, four species from the soapberry family (Sapindaceae), namely *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Chytranthus macrobotrys* and *Radlkofera calodendron* were selected for phytochemical investigations. Compound isolation was performed using various liquid chromatography techniques including flash chromatography, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. This led to isolation and characterisation of thirty compounds among which nineteen were previously undescribed. All of them were triterpene saponins exhibiting hederagenin as aglycone excepted one sesquiterpenoid, further characterized as a farnesyl glycoside. Structures were determined according to spectroscopic techniques, mainly 2D NMR and mass spectrometry. Biological properties of isolated compounds were then investigated in the fields of health and environment by the means of two interdisciplinary and independent research projects carried out with European peers. The first collaborative project, conducted with Italian researchers of the University of Florence, involved the use of saponins as antigenic probes for the detection of biomarkers of great diagnostic interest in multiple sclerosis patients' sera. The absence of a specific response of patients' sera to Sapindaceae-derived saponins suggested these compounds to be poor antigenic probes for antibody detection in multiple sclerosis. The second project was a partnership with a German research institute specialised in fungal biology. It aimed at assessing the antimicrobial activity of Sapindaceae-derived saponins against a selection of economically-important phytopathogens. This approach unveiled eight compounds exhibiting antimicrobial properties against the following microorganisms: *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fomitiporia mediterranea*, *Zymoseptoria tritici*, *Trichoderma atroviride*, *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata* and *Xylella fastidiosa*. Among the latter, significant growth inhibitions were obtained on the fungi *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Fomitiporia mediterranea* as assessed by MIC/IC₅₀ reaching 25/10 µg/ml at the lowest. Structure activity relationships and significance in plant-microbe interactions were discussed.

Keys words: saponins, Sapindaceae, multiple sclerosis, antibody detection, antimicrobials, phytopathogens

Table des matières

Table des matières.....	13
Liste des figures	17
Liste des tableaux	21
Liste des abréviations.....	23
Introduction générale	25
Partie 1 Synthèse bibliographique.....	29
Chapitre 1.1 Les Sapindaceae	31
1.1.0 Présentation du chapitre	31
1.1.1 Description générale.....	31
1.1.2 Phylogénie.....	35
1.1.3 Intérêts économiques et traditionnels	39
1.1.4 Le genre <i>Blighia</i>	41
1.1.5 L'espèce <i>Blighia unijugata</i>	46
1.1.6 L'espèce <i>Blighia welwitschii</i>	47
1.1.7 Le genre <i>Chytranthus</i>	48
1.1.8 L'espèce <i>Chytranthus macrobotrys</i>	50
1.1.9 Le genre <i>Radlkofera</i> et l'espèce <i>Radlkofera calodendron</i>	52
Chapitre 1.2 Travaux phytochimiques antérieurs.....	55
1.2.0 Présentation du chapitre	55
1.2.1 Généralités sur les saponines.....	55
1.2.2 Structure des saponines	56
1.2.3 Propriétés et activités biologiques	59
1.2.4 Intérêts industriels et traditionnels.....	61
1.2.5 Les saponines des Sapindaceae.....	65
1.2.6 Les saponines du genre <i>Blighia</i>	94
1.2.7 Les saponines du genre <i>Chytranthus</i>	97
1.2.8 Les saponines du genre <i>Radlkofera</i>	98
Chapitre 1.3 Travaux biologiques antérieurs : Les saponines dans la reconnaissance d'anticorps dans la sclérose en plaques.....	99
1.3.0 Présentation du chapitre	99
1.3.1 Généralités sur la sclérose en plaques	99

1.3.2 Rôles des anticorps et enjeux diagnostiques	103
1.3.3 Recherche de(s) autoantigène(s) : l'approche chimique inverse.....	105
1.3.4 Antigènes précédemment testés	106
1.3.5 Produits naturels précédemment testés	110
Chapitre 1.4 Travaux biologiques antérieurs : Saponines et activité antifongique	115
1.4.0 Présentation du chapitre	115
1.4.1 Généralités sur les champignons pathogènes	115
1.4.2 L'activité antifongique des saponines	121
1.4.3 Perspectives d'exploitation des propriétés antifongiques des saponines.....	125
Partie 2 Etude phytochimique.....	129
Chapitre 2.1 Matériels et méthodes appliqués à la phytochimie.....	131
2.1.0 Matériel végétal et extraction.....	131
2.1.1 Chromatographie liquide sous vide.....	131
2.1.2 Chromatographie flash	133
2.1.3 Chromatographie liquide moyenne pression.....	133
2.1.4 Chromatographie liquide haute performance	134
2.1.5 Chromatographie sur couche mince	135
2.1.6 Chromatographie gazeuse	136
2.1.7 Spectrométrie de masse	137
2.1.8 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	139
2.1.9 Polarimétrie	143
2.1.10 Lyophilisation	144
2.1.11 Hydrolyse acide	144
Chapitre 2.2 Exploration phytochimique de l'extrait de <i>Blighia unijugata</i>	145
2.2.0 Analyse de l'extrait.....	145
2.2.1 Isolement des composés	145
2.2.2 Détermination structurale	148
2.2.3 Bu1 (<i>BuG12</i>)	148
2.2.4 Bu2 (<i>BuEB15</i>).....	155
2.2.5 Bu3 (<i>BuGHO</i>)	159
2.2.6 Bu4 (<i>BuDE32</i>)	163
2.2.7 Bu5 (<i>Bu2C1D1</i>)	167
2.2.8 Bu6 (<i>BuLow3_M</i>).....	171

2.2.9 Bu7 (<i>BuLOW135</i>)	176
2.2.10 Bu8 (<i>Bu1F3224</i>)	180
Chapitre 2.3 Exploration phytochimique de l'extrait de <i>Blighia welwitschii</i>	185
2.3.0 Analyse de l'extrait	185
2.3.1 Isolement des composés	185
2.3.2 Détermination structurale	188
2.3.3 Bw1 (<i>Bw41</i>)	188
2.3.4 Bw2 (<i>Bwe321</i>)	193
2.3.5 Bw3 (<i>Bw2CD-1</i>)	198
2.3.6 Bw4 (<i>Bw2CD-2</i>)	204
2.3.7 Bw5 (<i>Bwe3</i>)	209
2.3.8 Bw6 (<i>Bwf3</i>)	214
2.3.9 Bw7 (<i>Bwe2</i>)	218
Chapitre 2.4 Exploration phytochimique de l'extrait de <i>Chytranthus macrobotrys</i>	223
2.4.0 Analyse de l'extrait	223
2.4.1 Isolement des composés	224
2.4.2 Détermination structurale	228
2.4.3 Cm1 (<i>Cms261</i>)	228
2.4.4 Cm2 (<i>Cm2w3</i>)	233
Chapitre 2.5 Exploration phytochimique de l'extrait de <i>Radlkofera calodendron</i>	237
2.5.0 Analyse de l'extrait	237
2.5.1 Isolement des composés	237
2.5.2 Détermination structurale	239
2.5.3 Rc1 (<i>RcB1</i>)	239
2.5.4 Rc2 (<i>RcC2</i>)	244
Chapitre 2.6 Discussion des résultats de l'étude phytochimique	251
2.6.0 Présentation du chapitre	251
2.6.1 Résolution d'une problématique d'isolement des saponines des Sapindaceae	252
2.6.2 Résolution d'une problématique de détermination structurale des saponines des Sapindaceae	256
2.6.3 Chimiotaxonomie	262
Partie 3 Etudes biologiques	279
Chapitre 3.1 Tests de reconnaissance d'anticorps dans des sérums de patients atteints de sclérose en plaque	281

3.1.0 Présentation du chapitre	281
3.1.1 Partie expérimentale	281
3.1.2 Résultats et discussion.....	288
3.1.3 Conclusion.....	297
Chapitre 3.2 Tests d'activité antimicrobienne sur divers micro-organismes pathogènes des grandes cultures.....	299
3.2.0 Présentation du chapitre	299
3.2.1 Partie expérimentale	299
3.2.2 Résultats et discussion.....	304
3.2.3 Conclusion.....	314
Conclusion générale et perspectives	315
Références bibliographiques et webographiques	319
Annexes.....	337
A.1 Article n°1	339
A.2 Article n°2	349
A.3 Manuscrit soumis à <i>Pest Management Science</i> (Wiley).....	361
A.4 Liste des publications, posters et communications orales	365
A.5 Références de la recherche bibliographique sur les saponines des Sapindaceae	367
A.6 Recherche bibliographique sur l'occurrence des composés connus	371

Liste des figures

FIGURE 1. AIRE DE DISTRIBUTION DES SAPINDACEAE (MOBOT.ORG).	32
FIGURE 2. CLÉ D'IDENTIFICATION DES DIFFÉRENTS GENRES DE SAPINDACEAE (D'APRÈS ONUMINYA ET AL., 2017).	33
FIGURE 3. PLANCHE BOTANIQUE DES SAPINDACEAE (CRÉATION DE NICHOLAS ROUGEUX, C82.NET).	34
FIGURE 4. ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE DES ANGIOSPERMES (SELON L'APG IV, 2016).	35
FIGURE 5. LES SAPINDACEAE ORNEMENTALES <i>KOELREUTERIA PANICULATA</i> (SAVONNIER) ET <i>ACER PALMATUM</i> (ÉRABLE JAPONAIS).	41
FIGURE 6. STRUCTURE DES HYPOGLYCINES A ET B.	44
FIGURE 7. PLANCHE BOTANIQUE (GAUCHE) ET AIRE DE DISTRIBUTION (DROITE) DE <i>BLIGHIA UNIJUGATA</i>	47
FIGURE 8. PLANCHE BOTANIQUE (GAUCHE) ET AIRE DE DISTRIBUTION (DROITE) DE <i>BLIGHIA WELWITSCHII</i>	48
FIGURE 9. PHOTOGRAPHIES ET AIRE DE DISTRIBUTION DU GENRE <i>CHYTRANTHUS</i>	50
FIGURE 10. PHOTOGRAPHIE D'HERBIER DE <i>CHYTRANTHUS MACROBOTRYS</i> (GAUCHE) ET AIRE DE DISTRIBUTION (DROITE).	51
FIGURE 11. PHOTOGRAPHIE D'HERBIER DE <i>RADLKOFERA CALODENDRON</i> (GAUCHE) ET AIRE DE DISTRIBUTION (DROITE).	53
FIGURE 12. LES SIX FORMES DE GÉNINES.	57
FIGURE 13. LES SUCRES LES PLUS COMMUNS PARMIS LES SAPONINES (D'APRÈS TIMITE, 2012).	58
FIGURE 14. LES ACIDES ORGANIQUES LES PLUS COMMUNS PARMIS LES SAPONINES (D'APRÈS TIMITE, 2012).	59
FIGURE 15. NOMBRE DE PUBLICATIONS ANNUELLES TRAITANT DES SAPONINES DES SAPINDACEAE ENTRE 1920 ET 2020.	65
FIGURE 16. COMPOSÉS TRITERPÉNIQUES OU STÉROÏDIQUES PRÉCÉDEMMENT ISOLÉS DE <i>BLIGHIA SAPIDA</i>	95
FIGURE 17. COMPOSÉS TRITERPÉNIQUES OU STÉROÏDIQUES PRÉCÉDEMMENT ISOLÉS DE <i>BLIGHIA UNIJUGATA</i>	96
FIGURE 18. COMPOSÉS TRITERPÉNIQUES OU STÉROÏDIQUES PRÉCÉDEMMENT ISOLÉS DE <i>BLIGHIA WELWITSCHII</i>	96
FIGURE 19. COMPOSÉS TRITERPÉNIQUES OU STÉROÏDIQUES PRÉCÉDEMMENT ISOLÉS DE <i>CHYTRANTHUS KLAINIANUS</i>	98
FIGURE 20. ÉVOLUTION DE LA SEP DANS LE TEMPS.	101
FIGURE 21. MÉCANISMES IMMUNITAIRES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES À L'ORIGINE DE LA SEP.	103
FIGURE 22. QUELQUES STRUCTURES D'ANTIGÈNES MYÉLINIQUES.	107
FIGURE 23. QUELQUES STRUCTURES D'ANTIGÈNES GLYCOSYLÉS SYNTHÉTIQUES.	108
FIGURE 24. QUELQUES STRUCTURES D'ANTIGÈNES MIMÉTIQUES.	110
FIGURE 25. SAPONINES PRÉCÉDEMMENT TESTÉES EN APPROCHE CHIMIQUE INVERSE.	113
FIGURE 26. ILLUSTRATIONS DE MALADIES FONGIQUES.	118
FIGURE 27. QUELQUES SAPONINES DOTÉES D'ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES.	123
FIGURE 28. COMPARAISON DES SOURCES D'IONS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE.	138
FIGURE 29. COMPARAISON DES ANALYSEURS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE.	139
FIGURE 30. EXEMPLE DE CORRÉLATIONS COSY DANS UN ARABINOSE.	141
FIGURE 31. EXEMPLE DE CORRÉLATIONS TOCSY DANS UN ARABINOSE.	141
FIGURE 32. EXEMPLE DE CORRÉLATION ROESY ENTRE DEUX ARABINOSES.	142
FIGURE 33. EXEMPLE DE CORRÉLATIONS HSQC DANS UN ARABINOSE.	142
FIGURE 34. EXEMPLE DE CORRÉLATIONS HMBC ENTRE DEUX ARABINOSES ET UN ACÉTYLE.	143
FIGURE 35. CHROMATOGRAMME HPLC DE L'EXTRAIT BRUT DE SAPONINES DE <i>BLIGHIA UNIJUGATA</i>	145
FIGURE 36. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>BLIGHIA UNIJUGATA</i>	146
FIGURE 37. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>BLIGHIA UNIJUGATA</i> (SUITE)	147
FIGURE 38. SPECTRE ET CORRÉLATIONS DE L'HÉDÉRAGÉNINE.	150
FIGURE 39. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu1	152
FIGURE 40. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu1	153
FIGURE 41. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu1	154
FIGURE 42. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu2	156
FIGURE 43. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu2	157
FIGURE 44. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu2	158
FIGURE 45. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu3	160

FIGURE 46. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu3	161
FIGURE 47. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu3	162
FIGURE 48. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu4	164
FIGURE 49. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu4	165
FIGURE 50. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu4	166
FIGURE 51. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu5	168
FIGURE 52. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu5	169
FIGURE 53. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu5	170
FIGURE 54. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu6	173
FIGURE 55. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu6	174
FIGURE 56. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu6	175
FIGURE 57. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu7	177
FIGURE 58. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu7	178
FIGURE 59. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu7	179
FIGURE 60. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bu8	181
FIGURE 61. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bu8	182
FIGURE 62. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bu8	183
FIGURE 63. CHROMATOGRAMME HPLC DE L'EXTRAIT BRUT DE SAPONINES DE <i>BLIGHIA WELWITSCHII</i>	185
FIGURE 64. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>BLIGHIA WELWITSCHII</i>	186
FIGURE 65. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>BLIGHIA WELWITSCHII</i> (SUITE).....	187
FIGURE 66. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw1	190
FIGURE 67. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw1	191
FIGURE 68. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw1	192
FIGURE 69. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw2	194
FIGURE 70. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw2	195
FIGURE 71. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw2 (SUITE).....	196
FIGURE 72. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw2	197
FIGURE 73. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw3	200
FIGURE 74. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw3	201
FIGURE 75. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw3 (SUITE).....	202
FIGURE 76. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw3	203
FIGURE 77. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw4	205
FIGURE 78. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw4	206
FIGURE 79. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw4 (SUITE).....	207
FIGURE 80. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw4	208
FIGURE 81. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw5	210
FIGURE 82. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw5	211
FIGURE 83. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw5 (SUITE).....	212
FIGURE 84. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw5	213
FIGURE 85. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw6	215
FIGURE 86. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw6	216
FIGURE 87. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw6	217
FIGURE 88. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Bw7	219
FIGURE 89. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Bw7	220
FIGURE 90. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Bw7	221
FIGURE 91. CHROMATOGRAMME HPLC DE L'EXTRAIT BRUT DE SAPONINES DE <i>CHYTRANTHUS MACROBOTRYS</i>	223
FIGURE 92. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>CHYTRANTHUS MACROBOTRYS</i>	225
FIGURE 93. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>CHYTRANTHUS MACROBOTRYS</i> (SUITE).....	226
FIGURE 94. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>CHYTRANTHUS MACROBOTRYS</i> (SUITE).....	227

FIGURE 95. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Cm1 .	230
FIGURE 96. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Cm1 .	231
FIGURE 97. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Cm1 .	232
FIGURE 98. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Cm2 .	234
FIGURE 99. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Cm2 .	235
FIGURE 100. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Cm2 .	236
FIGURE 101. CHROMATOGRAMME HPLC DE L'EXTRAIT BRUT DE SAPONINES DE <i>RADLKOFERA CALODENDRON</i> .	237
FIGURE 102. PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES SAPONINES DE <i>RADLKOFERA CALODENDRON</i> .	238
FIGURE 103. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Rc1 .	241
FIGURE 104. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Rc1 .	242
FIGURE 105. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Rc1 .	243
FIGURE 106. SPECTRE ET CORRÉLATIONS DU TERPÉNOÏDE.	245
FIGURE 107. PORTIONS DU SPECTRE HSQC DE Rc2 .	247
FIGURE 108. SPECTRE ET CORRÉLATIONS HMBC DE Rc2 .	248
FIGURE 109. SPECTRE ET CORRÉLATIONS ROESY DE Rc2 .	249
FIGURE 110. PROTOCOLE STANDARD POUR L'ISOLEMENT DES SAPONINES DES SAPINDACEAE.	255
FIGURE 111. COMPARAISON DES SPECTRES HSQC DANS LE MeOH ET LA <i>PYRIDINE-D₅</i> .	257
FIGURE 112. EFFET DES ACÉTYLES SUR LES Δ_C ET Δ_H DES SUCRES.	261
FIGURE 113. DISTRIBUTION DES COMPOSÉS DANS LES QUATRE ESPÈCES ÉTUDIÉES (DIAGRAMME DE VENN).	270
FIGURE 114. DISTRIBUTION DES MOTIFS STRUCTURAUX DANS LES QUATRE ESPÈCES ÉTUDIÉES (DIAGRAMME C-3).	275
FIGURE 115. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU TEST ELISA UTILISÉ.	282
FIGURE 116. SAPONINES TESTÉES EN ELISA POUR LA RECONNAISSANCE D'ANTICORPS DANS LA SEP.	285
FIGURE 117. SAPONINES TESTÉES EN ELISA POUR LA RECONNAISSANCE D'ANTICORPS DANS LA SEP (SUITE).	286
FIGURE 118. OPTIMISATION DU TEST ELISA.	289
FIGURE 119. RÉPONSE DES IGM DES SÉRUMS DE PATIENTS SEP AUX GLYCOSIDES NATURELS, DÉTERMINÉE EN ELISA.	291
FIGURE 120. COMPARAISON DE LA RÉPONSE DES IGM DES SÉRUMS DE PATIENTS SEP ET DES SÉRUMS DE PATIENTS CONTRÔLES AUX GLYCOSIDES NATURELS, DÉTERMINÉE EN ELISA.	294
FIGURE 121. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU TEST UTILISÉ POUR MESURER LES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES.	302
FIGURE 122. STRUCTURES DES SAPONINES PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE SUR LES SOUCHES TESTÉES.	311
FIGURE 123. STRUCTURES DES SAPONINES PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE SUR LES SOUCHES TESTÉES (SUITE).	312

Liste des tableaux

TABLEAU 1. EVOLUTION DE LA PHYLOGÉNIE DES SAPINDACEAE DE RADLKOFER (1933) À BUERKI (2009).	38
TABLEAU 2. UTILISATIONS TRADITIONNELLES DES <i>BLIGHIA</i> SPP. EN MÉDECINE TRADITIONNELLE AFRICAINE.	46
TABLEAU 3. SAPONINES À A ₁ -BARRIGÉNOL.	67
TABLEAU 4. SAPONINES À HÉDÉRAGÉNINE.	73
TABLEAU 5. SAPONINES À R ₁ -BARRIGÉNOL.	75
TABLEAU 6. SAPONINES À CAMELLIAGÉNINE A.	76
TABLEAU 7. SAPONINES À FRIEDÉLINE.	77
TABLEAU 8. SAPONINES À ACIDE OLÉANOLIQUE.	80
TABLEAU 9. SAPONINES À ACIDE ÉCHINOCYSTIQUE.	80
TABLEAU 10. SAPONINES À ACIDE ZANHIQUE.	82
TABLEAU 11. SAPONINES À ACIDE MÉDICAGÉNIQUE.	82
TABLEAU 12. SAPONINES À BARRINGTOGÉNOL C.	84
TABLEAU 13. SAPONINES À GYPSOGÉNINE.	85
TABLEAU 14. SAPONINES À ACIDE BÉTULINIQUE.	85
TABLEAU 15. SAPONINES À SANICULAGÉNINE C.	88
TABLEAU 16. SAPONINES À PROTOAESCIGÉNINE.	90
TABLEAU 17. SAPONINES À 1-METHOXY-3,21,23-EPOXYTIRUCALLA-7,24-DIENE.	91
TABLEAU 18. SAPONINES À ERYTHRODIOL.	92
TABLEAU 19. SAPONINES À MANILADIOL.	93
TABLEAU 20. SAPONINES À 24-OXO-CAMELLIAGÉNINE D.	94
TABLEAU 21. CARACTÉRISTIQUES DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES UTILISÉES.	254
TABLEAU 22. COMPARAISON DES ÉLÉMENTS SPECTROSCOPIQUES DÉTERMINÉS DANS LE CD ₃ OD ET LA PYRIDINE-D ₅ .	258
TABLEAU 23. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Bu9 DANS LA LITTÉRATURE.	263
TABLEAU 24. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Bu10 DANS LA LITTÉRATURE.	263
TABLEAU 25. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Bu11 DANS LA LITTÉRATURE.	264
TABLEAU 26. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Bu12 DANS LA LITTÉRATURE.	264
TABLEAU 27. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm3 DANS LA LITTÉRATURE.	264
TABLEAU 28. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm4 DANS LA LITTÉRATURE.	265
TABLEAU 29. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm5 DANS LA LITTÉRATURE.	265
TABLEAU 30. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm6 DANS LA LITTÉRATURE.	265
TABLEAU 31. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm7 DANS LA LITTÉRATURE.	266
TABLEAU 32. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Cm8 DANS LA LITTÉRATURE.	266
TABLEAU 33. OCCURRENCE DU COMPOSÉ Rc4 DANS LA LITTÉRATURE.	266
TABLEAU 34. DISTRIBUTION DES COMPOSÉS DANS LES QUATRE ESPÈCES ÉTUDIÉES.	269
TABLEAU 35. TAUX DE SAPONINES DE STRUCTURE NOUVELLE.	271
TABLEAU 36. DISTRIBUTION DES MOTIFS STRUCTURAUX DANS LES QUATRE ESPÈCES ÉTUDIÉES.	274
TABLEAU 37. ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS BRUTS EXPRIMÉE EN TANT QUE MIC ET IC ₅₀ EN MG/ML.	304
TABLEAU 38. COMPOSITION DES EXTRAITS BRUTS.	306
TABLEAU 39. ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES COMPOSÉS PURS EXPRIMÉE EN TANT QUE MIC ET IC ₅₀ EN MG/ML.	306

Liste des abréviations

1D	données RMN monodimensionnelles
2D	données RMN bidimensionnelles
APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique
Ara	α -L-arabinopyranosyl
BHE	barrière hémato-encéphalique
ESI	ionisation par électronébuliseur
FC	chromatographie flash
GC	chromatographie gazeuse
Glc	β -D-glucopyranosyl
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HPTLC	chromatographie sur couche mince haute performance
IC ₅₀	concentration inhibitrice médiane
IRM	imagerie par résonance magnétique
LB	lymphocytes B
LCR	liquide céphalo-rachidien
LT	lymphocyte T
MBP	protéine basique de la myéline
MIC	concentration minimale inhibitrice
MOG	glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire
MPLC	chromatographie liquide moyenne pression
prep	mode préparatif
RF	radiofréquences
Rf	rapport frontal
Rha	α -L-rhamnopyranosyl
RMN	résonance magnétique nucléaire
RSA	relations structure-activité
SEP	sclérose en plaques
SNC	système nerveux central
TLC	chromatographie sur couche mince
TOF	temps de vol
Tr	temps de rétention
uma	unité de masse atomique
VLC	chromatographie liquide sous vide
Xyl	β -D-xylopyranosyl

Introduction générale

Historiquement, les produits naturels et leurs dérivés sont la première source de principes actifs des médicaments. Les plantes et les micro-organismes, en particulier, ont fourni des molécules dont l'impact sur la médecine fut décisif. Présenter les plus connues d'entre elles reviendrait à citer en premier lieu la morphine, isolée du pavot somnifère (*Papaver somniferum*) au début des années 1800. Vient ensuite l'acide salicylique, purifié du saule commun (*Salix alba*) vers 1830 et transformé en aspirine par hémisynthèse au sein des laboratoires Bayer. Ce dernier deviendra un des médicaments les plus consommés au monde. Après les plantes, les champignons ont joué un rôle majeur. C'est le cas de *Penicillium notatum* à partir duquel fut découverte la pénicilline en 1928. Son développement et sa commercialisation en 1941 initia une période faste pour la pharmacie appelée « âge d'or des antibiotiques », pendant laquelle la majorité des classes d'antibiotiques connus à ce jour seront caractérisées (Cragg *et al.*, 2014). Cette recherche d'agents antimicrobiens a parfois conduit à des trouvailles inattendues. C'est le cas de la ciclosporine, isolée au début des années 1970 du champignon *Tolypocladium inflatum*. Ce composé révolutionnera la médecine du fait de ses propriétés immunosuppressives, augmentant considérablement la réussite des transplantations d'organes (Tribe, 1998). Cette brève énumération ne pourrait être complète sans une mention particulière aux anticancéreux d'origine naturelle. Le paclitaxel et le docétaxel issus de diverses espèces d'ifs (*Taxus spp.*) font partie des anticancéreux les plus efficaces et les plus utilisés en clinique (Cragg *et al.*, 2014). Bien qu'initialement attribués aux ifs, on sait aujourd'hui que ces composés sont issus de la symbiose entre ces arbres et des champignons endophytes *Taxomyces andreanae* ou *Pestalotiopsis microspora* (Stierle *et al.*, 1993 ; Strobel *et al.*, 1996).

Si l'industrie pharmaceutique a été la première bénéficiaire de la recherche de produits naturels, ces derniers ont aussi permis des développements significatifs dans d'autres secteurs.

C'est le cas du secteur agricole et plus précisément de la protection des cultures. Un exemple concerne l'identification de la strobilurine A purifiée des cultures liquides du basidiomycète *Strobilurus tenacellus* en 1977. Les dérivés synthétiques des strobilurines donnèrent une série de fongicides très efficaces dans le contrôle des maladies fongiques des plantes cultivées (IBWF.de). Les produits naturels présentent également un intérêt pour d'autres domaines comme les secteurs agroalimentaires, cosmétiques, textiles, chimiques et biotechnologiques.

En dehors des applications industrielles, les substances naturelles ont une importance traditionnelle majeure. Il est estimé que 80 % de la population africaine dépend de la médecine traditionnelle, principalement des applications à base de plantes. Ce chiffre s'élèverait à 70 % pour la population indienne d'après une enquête de l'OMS (Zhang, 2004). Ces produits phytothérapeutiques représentent un marché conséquent, fort de plusieurs milliards de dollars en Europe occidentale ou en Chine (Manase, 2013).

Outre un rôle purement utilitariste, les produits naturels sont une source d'inspiration et de fascination pour de nombreux scientifiques et universitaires. La recherche à leur sujet apporte une meilleure description des espèces vivantes sur le plan biochimique. L'étude de leur distribution au sein du monde vivant constitue une science à part entière : la chimiotaxonomie. Cette dernière permet d'établir des liens entre la composition chimique des espèces et leur classification phylogénétique. L'écologie chimique est une autre discipline dérivée de l'étude de la chimie du vivant. Celle-ci considère les substances naturelles à l'échelle de l'écosystème plutôt qu'à l'échelle de l'espèce. Elle permet ainsi d'avoir accès à une meilleure compréhension des écosystèmes et des mécanismes moléculaires qui régissent les interactions entre espèces.

Si l'histoire des produits naturels est riche en avancées scientifiques importantes, son futur est incertain. L'industrie pharmaceutique a considérablement réduit ses capacités de R&D dans ce domaine au cours des trente dernières années. Cette tendance s'explique par l'arrivée de nouvelles technologies telles que la chimie combinatoire, la thérapie génique et les biomédicaments (anticorps monoclonaux etc.). A cela s'ajoutent des contraintes et des difficultés techniques liées à l'inadéquation des produits naturels avec les techniques modernes de screening haut débit (Koehn et Carter, 2005 ; Li et Vederas, 2009). Il semblerait également que la plupart des découvertes « aisées » aient été faites, rendant les prochaines moins fréquentes, plus difficiles et plus coûteuses en temps (Beutler, 2009). Ces contraintes ne sont plus compatibles avec les impératifs et les objectifs d'une industrie hyper financiarisée qui, logiquement, s'oriente vers des processus plus

rapides et moins laborieux. L'université semble *a priori* mieux adaptée à cette thématique bien que celle-ci subisse des contraintes budgétaires importantes. Une ultime menace enfin, concerne la crise écologique et l'érosion de la biodiversité. Certaines espèces disparaissent avant qu'elles n'aient pu être étudiées pour leur composition chimique.

Au cours des dernières années et malgré les incertitudes, la communauté scientifique semble exprimer un regain d'intérêt envers ces molécules. L'attribution du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2015 pour la découverte de deux produits naturels de grande importance dans le contrôle des maladies infectieuses parasitaires, l'ivermectine et l'artémisinine, en est le meilleur exemple (Efferth *et al.*, 2015). Certains auteurs imaginent que des avancées techniques ou conceptuelles rendront moins laborieuse la recherche dans ce domaine. L'automatisation des processus de purification et d'analyse structurale, l'amélioration du réapprovisionnement en matière première et la reconversion d'anciennes molécules dans des domaines d'activité biologique nouveaux sont tant d'approches à explorer (Beutler, 2009 ; Li et Vederas, 2009 ; Cragg *et al.*, 2014 ; Atanasov *et al.*, 2015). D'autres pensent que l'informatique et la bio-informatique pourraient apporter une contribution majeure à la science des molécules naturelles. Il est possible que l'intelligence artificielle et le data mining, couplés au séquençage systématique des génomes, offrent des perspectives inédites. Enfin, il est probable que ce regain d'intérêt de la part des scientifiques trouve son origine dans les dispositions actuelles de la société civile. Le développement considérable de la nourriture bio, des huiles essentielles, des médecines complémentaires et plus généralement d'une reconsidération de la nature devant la crise écologique actuelle, sont de multiples aspirations ayant possiblement infiltrées le domaine académique.

Dans ce contexte général, le Laboratoire de Pharmacognosie EA4267 PEPITE (UBFC) dirigé par la Professeure Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS apporte sa contribution à la recherche de molécules biologiquement actives issues des plantes. Le laboratoire est spécialisé dans les saponines, une vaste classe de composés présents dans diverses familles végétales. Sa stratégie consiste à sélectionner des familles de plantes connues pour leur richesse en saponines. Après l'extraction, l'isolement et l'analyse structurale, les molécules étudiées sont soumises à une évaluation de leur activité biologique *in vitro*. Les scientifiques du laboratoire opèrent ici dans différents domaines allant de l'activité cytotoxique à l'activité antimicrobienne en passant par l'activité immunomodulatrice.

Il sera présenté dans cette thèse l'étude phytochimique de différentes espèces végétales appartenant à la famille des Sapindaceae. Ces espèces, *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Chytranthus macrobotrys* et *Radlkofera calodendron* sont des arbres originaires d'Afrique équatoriale. Peu de données phytochimiques sont disponibles à leur sujet mais des travaux anciens suggèrent qu'ils contiennent des saponines.

La structure de ce manuscrit comporte trois grandes parties :

La première partie sera consacrée à la synthèse bibliographique relative aux familles, aux genres et aux espèces étudiées. Elle comprendra l'étude botanique ainsi que les travaux phytochimiques et biologiques antérieurs.

La deuxième partie portera sur l'étude phytochimique. Celle-ci détaillera les matériels et méthodes, les résultats d'isolement et d'analyse structurale ainsi qu'une discussion chimiotaxonomique.

La troisième et dernière partie décrira l'étude biologique des composés isolés. Celle-ci comporte deux projets interdisciplinaires et indépendants réalisés avec des laboratoires italiens et allemands. Le premier projet, développé à l'Université de Florence, implique l'utilisation de saponines comme sondes antigéniques pour la reconnaissance de biomarqueurs de haute valeur diagnostique dans la sclérose en plaque. Le second, conduit avec l'IBWF gGmbH, un institut allemand spécialisé en biologie fongique, consiste à évaluer les propriétés antimicrobiennes des composés étudiés contre divers phytopathogènes. Ces derniers sont principalement des champignons responsables de vastes destructions agricoles à l'échelle de la planète.

Partie 1 Synthèse bibliographique

Chapitre 1.1 Les Sapindaceae

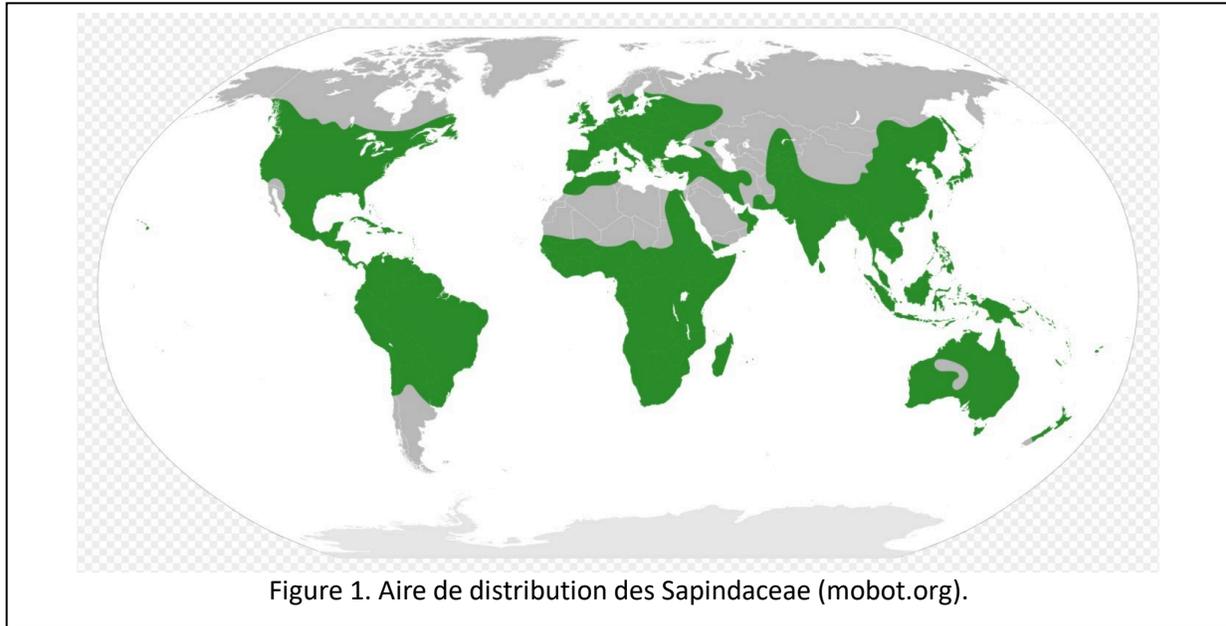
1.1.0 Présentation du chapitre

Ce premier chapitre expose différents aspects des Sapindaceae tels que leurs caractéristiques botaniques, leur répartition géographique, leur phylogénie et leurs éventuels intérêts économiques et traditionnels. Quatre espèces ont été sélectionnées pour la partie expérimentale. Ces dernières sont présentées plus en détails en fin de chapitre.

1.1.1 Description générale

Le mot « Sapindacées » (Sapindaceae Juss.) désigne une famille d'angiospermes dicotylédones composée d'environ 2000 espèces distribuées dans 140 genres (Adeyemi et Ogundipe 2012). Les membres des Sapindaceae présentent des formes diverses et variées. Ces derniers sont souvent décrits comme des arbres, des arbustes et des lianes (Harrington *et al.*, 2005 ; Adeyemi *et al.*, 2012). Certaines sources mentionnent également la présence de plantes herbacées au sein de la famille bien que les espèces ligneuses soient majoritaires (Klaassen, 1999 ; Biang *et al.*, 2020).

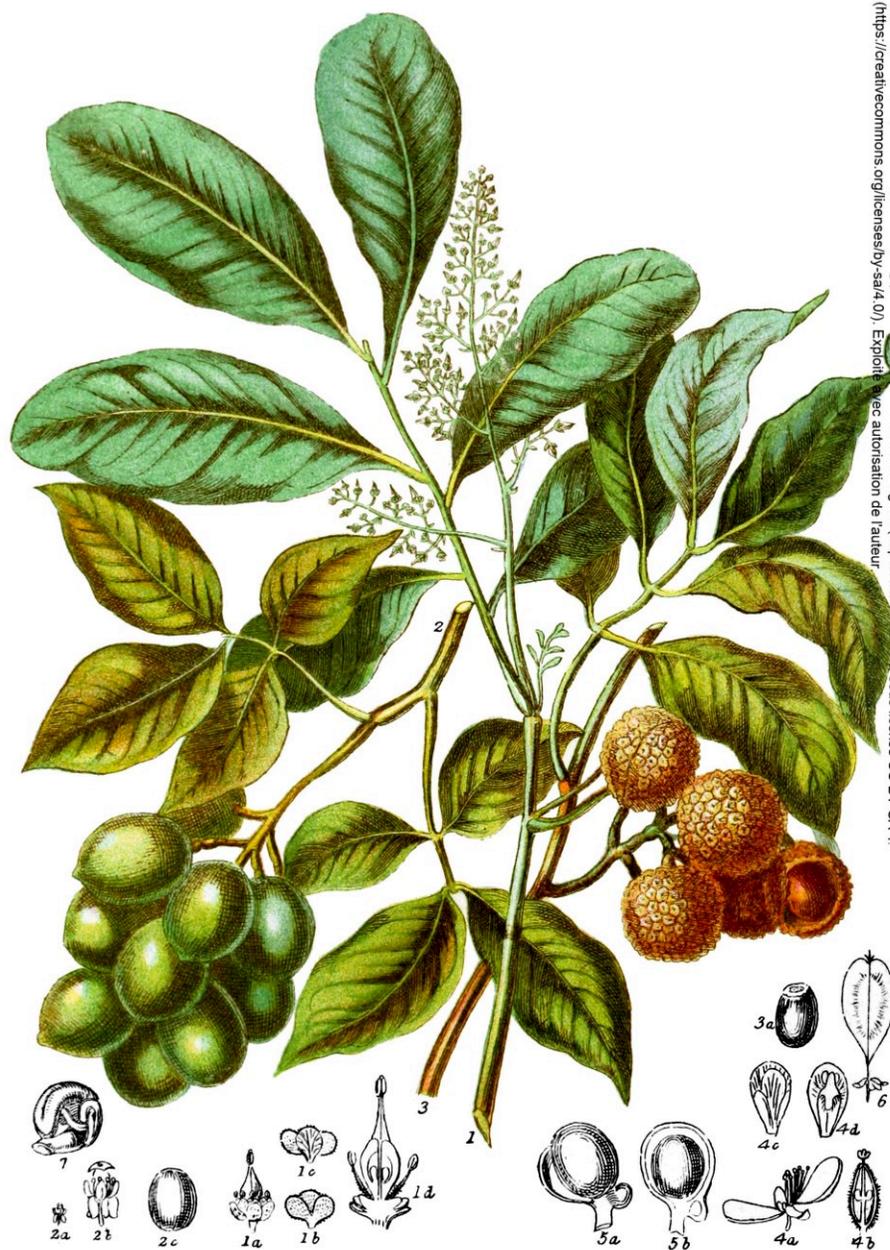
Les Sapindaceae sont associées aux régions tropicales du globe. Leur distribution est souvent qualifiée de pantropicale, c.-à-d. qu'elle concerne toute la zone tropicale de la planète (Buerki *et al.*, 2009). L'Amérique du Sud, l'Amérique centrale, l'Afrique équatoriale ainsi que l'Asie du Sud-Est, d'où la famille semble être originaire, sont les grandes aires géographiques les plus riches en Sapindaceae (APG II, 2003). Bien que considérées comme des plantes exotiques du fait de cette distribution tropicale, les Sapindaceae sont aussi présentes dans les zones subtropicales et tempérées. Leur distribution subtropicale concerne des zones telles que la Chine, le Nord de l'Inde, le Sud du Japon, l'Australie, l'Afrique du Sud, l'Argentine, le Chili, le Mexique, le Sud des États-Unis et le pourtour méditerranéen (tropicos.org, lien 1). Seulement quelques espèces sont adaptées aux climats tempérés d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Asie du Nord-Est. C'est le cas des genres *Acer* (érable) et *Aesculus* (marronnier), par exemple (Buerki *et al.*, 2009).



Au sujet de leurs caractéristiques botaniques, les Sapindaceae présentent des feuilles simples ou composées de trois folioles ou plus. La disposition des feuilles est majoritairement alternée bien que certaines espèces présentent une disposition opposée. Ces dernières sont principalement pennées ou palmées, certaines sont dentées. Les fleurs sont de petite taille, actinomorphes (symétrie radiale) ou zygomorphes (symétrie bilatérale). Celles-ci sont unisexuées et donc mâles (fleurs à pollen) ou femelles (fleurs à ovules). Un même individu peut arborer des fleurs mâles, femelles ou les deux. Les pétales et les sépales sont toujours au nombre de quatre ou cinq. Les sépales sont partiellement fusionnés à leur base. Les étamines sont organisées en deux verticilles de chacun quatre ou cinq étamines. Celles-ci sont filamenteuses (étamines composées d'un long filament, ou filet, terminé par une anthère). Le gynécée est constitué de trois carpelles chacune composée d'un style. La plupart des espèces disposent d'un disque nectarifère situé à la base des étamines et délimité par la corolle (ensemble des pétales). Les fruits sont extrêmement variables en taille, forme et couleur (botany.hawaii.edu, lien 2 ; gobotany.nativeplanttrust.org, lien 3 ; fao.org, lien 4 ; Xu et Deng, 2017).

1a. Leaves imparipinnate, simple, biternate or trifoliolate	2
2a. Tree or Shrub, tendril absent	3
3a. Leaves simple, fruit dehiscent capsule	<i>Dodonaea</i>
3b. Leaves trifoliolate, fruit indehiscent berry	<i>Allophylus</i>
2b. Climbing plant, tendril present	4
4a. Woody, leaves imparipinnate, margin dentate, fruit not inflated	<i>Paulinia</i>
4b. Herbaceous, leaves biternate, margin serrate, fruit inflated	<i>Cardiospermum</i>
1b. Leaves paripinnate, leaflets 3–10 pairs	5
5a. Fruit dehiscent, ovary 2- or 3-lobed	6
6a. Inflorescence cymose, not less than 10 cm long	7
7a. Shrub, leaf elliptic 8–12 cm long	<i>Laccodiscus</i>
7b. Small tree, leaf oblong 10–25 cm long	<i>Lychnodiscus</i>
6b. Inflorescence raceme, less than 10 cm long	8
8a. Fruit 2-lobed, leaf not more than 15 cm long	<i>Aporrhiza</i>
8b. Fruit 3-lobed, leaf up to 30 cm long	9
9a. Inflorescence up to 20 cm long, seed without aril	<i>Pancovia</i>
9b. Inflorescence less than 20 cm long, seed with orange aril	10
10a. Leaflets 5 pairs, base acute	<i>Blighia</i>
10b. Leaflets more than 5 pairs, base cuneate	<i>Eriocoelum</i>
5b. Fruit indehiscent, ovary 1–3-lobed	11
11a. Tree, seeds without aril	12
12a. Petiole less than 5 cm long, ovary 3-lobed	13
13a. Leaf apex cuspidate, leaflets less than 30 cm long, stamen 7–15	<i>Chytranthus</i>
13b. Leaf apex acuminate, leaflets less than 45 cm long, stamen 8	<i>Placodiscus</i>
12b. Petiole up to 10 cm long, ovary 1-lobed	14
14a. Fruit berry, 3–8 cm in diameter	15
15a. Leaf venation pinnate, petiole pubescent	<i>Lecaniodiscus</i>
15b. Leaf venation reticulate, petiole glabrous	16
16a. Leaflet less than 12 cm long, blade up to 34 cm	<i>Sapindus</i>
16b. Leaflets more than 12 cm long, blade up to 42 cm	<i>Schleichera</i>
14b. Fruit drupe, up to 10 cm in diameter	17
17a. Leaflets 3–9 pairs, inflorescence raceme	18
18a. Leaves oblong, leaflets 5–9 pairs, seed 1	<i>Deinbollia</i>
18b. Leaves obovate, leaflets 4 pairs, seed 2	<i>Radlkofera</i>
17b. Leaflets 5 pairs, inflorescence cyme	19
19a. Leaves oblong, inflorescence 10–25 cm long, seed 1	<i>Zanha</i>
19b. Leaves obovate, inflorescence 8–15 cm long, seed 2	<i>Lepisanthes</i>
11b. Shrub or tree, seeds with aril	20
20a. Shrub, fruit 2-lobed	21
21a. Leaflets 3 pairs, more than 7 cm long	<i>Glennia</i>
21b. Leaflets 10 pairs, less than 7 cm long	22
22a. Inflorescence 10 cm long, leaflets up to 5 cm long	<i>Harpullia</i>
22b. Inflorescence 10–15 cm long, leaflets less than 3 cm long	<i>Haplocoelum</i>
20b. Tree, fruit 1–3-lobed	23
23a. Fruit bladder-like, 3-lobed, inflorescence cyme	<i>Majidea</i>
23b. Fruit drupe, 1–2-lobed, inflorescence raceme	24
24a. Leaflets 3–7 cm wide, seed with white aril	25
25a. Fruit 3–6 cm long, seed 3	<i>Litchi</i>
25b. Fruit 5–10 cm long, seed 1	<i>Nephelium</i>
24b. Leaflets 2–6 cm wide, seed with orange aril	26
26a. Leaflets elliptic 8–12 cm long	<i>Ganophyllum</i>
26b. Leaflets oblong, 4–8 cm long	27
27a. Petiole glabrous, seed 1, inflorescence up to 15 cm	<i>Atalaya</i>
27b. Petiole sessile, seed 2, inflorescence less than 10 cm	<i>Melicoccus</i>

Figure 2. Clé d'identification des différents genres de Sapindaceae (d'après Onuminya *et al.*, 2017). Les genres encadrés en rouge ont été sélectionnés pour l'étude phytochimique (voir Partie 2 Etude phytochimique).

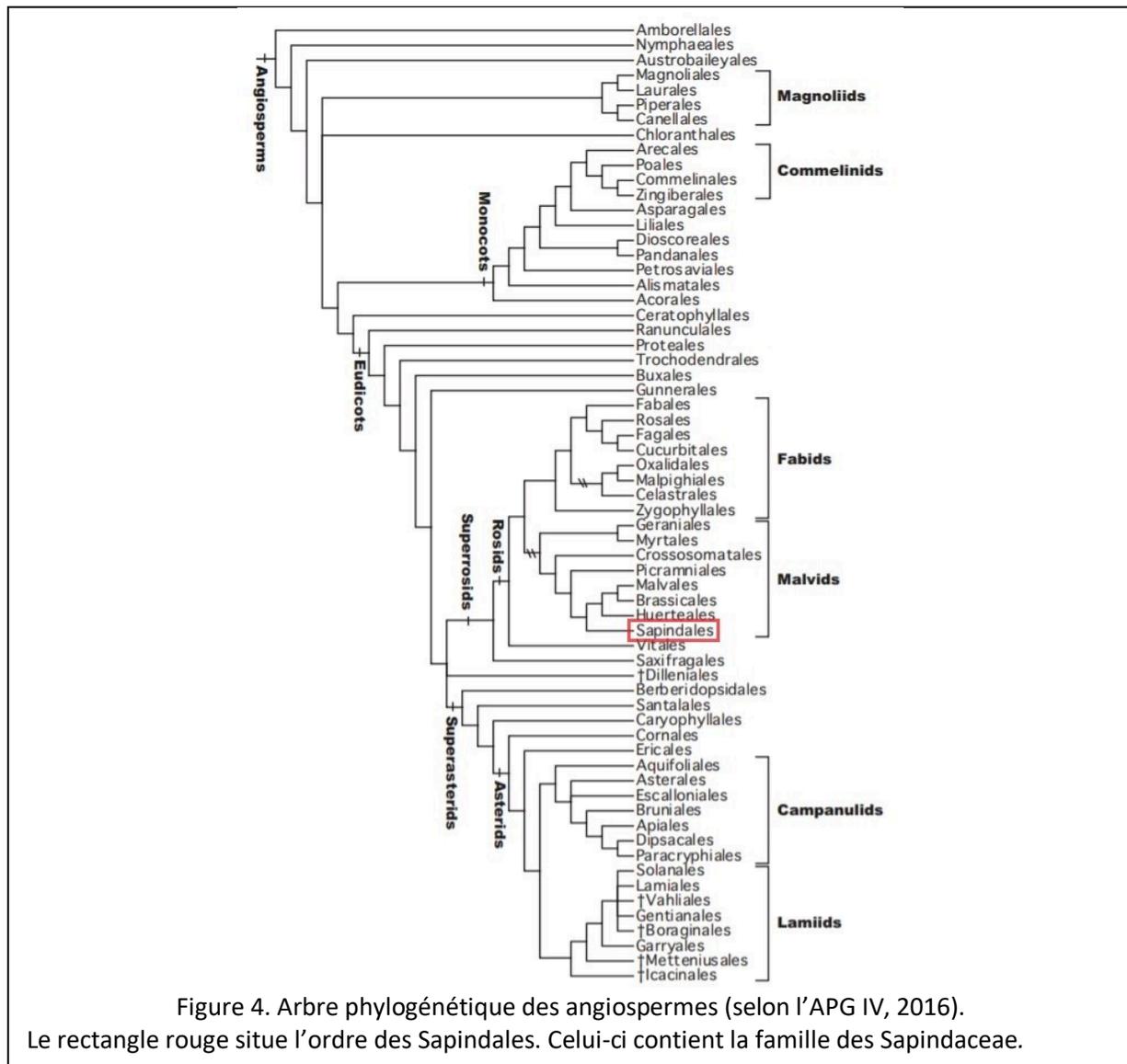


"Sapindaceae" (<https://www.c82.net/twiningplants/?i=28>) par Nicholas Rougeux (<https://www.c82.net/>) sous license CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>). Exploité avec autorisation de l'auteur.

Figure 3. Planche botanique des Sapindaceae (création de Nicholas Rougeux, c82.net). Plusieurs espèces sont représentées. 1. *Sapindus juglandifolius* ; 1A. Fleur, agrandie ; 1B. Pétale, devant ; 1C. Pétale, derrière ; 1D. Section de l'ovaire ; 2. *Melicocca bijuga* ; 2A. Fleur ; 2B. Fleur, agrandie ; 2C. Graine ; 3. *Nephelium litchi* ; 3A. Graine ; 4. *Cariospermum anomalum* ; 4A. Etamines et calice, agrandis ; 4B. Section de l'ovaire ; 4C. Pétale supérieur ; 4D. Pétale inférieur ; 5A. Fruit de *S. frutescens* ; 5B. Fruit, ouvert ; 6. Membrane de capsule de *Urvillea glabra* ; 7. *Ophiocaryon paradoxum*.

1.1.2 Phylogénie

Comme mentionné précédemment, les Sapindaceae sont des angiospermes dicotylédones. Celles-ci appartiennent en fait à l'ordre des Sapindales. L'arbre phylogénétique suivant positionne cet ordre parmi les angiospermes (APG IV, 2016).



Selon la classification APG IV de 2016, les Sapindales sont incluses dans les clades suivants : Angiospermes > Dicotylédones vraies > Superrosidées > Rosidées > Malvidées. Le clade des Superrosidées apparaît récemment avec l'APG IV. Ce dernier vient accentuer la divergence

phylogénétique des Rosidées et des Astéridées, descendant respectivement des Superrosidées et des Superastéridées, les deux principaux clades des dicotylédones vraies (APG IV, 2016).

L'ordre des Sapindales est remanié au cours des différentes APG (APG, 1998 ; APG II, 2003 ; APG III 2009). Ce dernier comprend actuellement neuf familles : Anacardiaceae, Biebersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae, Rutaceae, Sapindaceae et Simaroubaceae (APG IV, 2016).

La première classification des Sapindaceae est fournie par Radlkofer en 1933 (Radlkofer, 1933 – pour une revue détaillée voir Harrington *et al.*, 2005 ou Buerki *et al.*, 2009). Celle-ci est basée sur des caractères macromorphologiques divers tels que le nombre et le type d'ovules par loge, la morphologie des fruits, l'absence ou la présence d'une arillode, le type de feuilles et la forme des cotylédons (Buerki *et al.*, 2009). Sur la base de ces travaux, Radlkofer proposa une organisation des Sapindaceae en quatre sous-familles : Eusapindaceae, Dysapindaceae, Aceraceae et Hippocastanaceae (Harrington *et al.*, 2005). Il est important de noter que ces premières délimitations de sous-familles marqueront la base fondamentale de la classification des Sapindaceae. En effet, les sous-familles Eusapindaceae et Dysapindaceae deviendront par la suite Sapindoideae et Dodonaeoideae, respectivement, et concentreront la majorité des espèces de la famille. Les Aceraceae (sous-famille d'*Acer*) et Hippocastanaceae (sous-famille d'*Aesculus*), en revanche, incluent majoritairement des espèces dont la répartition géographique se situe dans les régions tempérées. Par ailleurs, c'est au sujet de ces deux sous-familles que viendront la majorité des controverses affectant la classification des Sapindaceae. Outre la structuration de la famille en quatre sous-familles, Radlkofer a défini des taxons de rang moins élevé, principalement des tribus et des genres.

Un premier remaniement de la classification de Radlkofer est proposé par Müller et Leenhouts en 1976 (Müller et Leenhouts, 1976 – pour une revue détaillée voir Harrington *et al.*, 2005 ou Buerki *et al.*, 2009). Celui-ci est basé sur l'analyse de différents caractères végétatifs et floraux, couplés à une classification rigoureuse des types de pollen (Harrington *et al.*, 2005 ; Buerki *et al.*, 2009). Les conclusions établies par l'étude de Müller et Leenhouts conduisent à des modifications majeures de la classification initiale de Radlkofer. Ces dernières affectent la composition de la sous-famille des Sapindoideae et rejette l'appartenance des Aceraceae et Hippocastanaceae aux Sapindaceae. Seule la sous-famille des Dodonaeoideae reste inchangée (Buerki *et al.*, 2009). La délimitation de la famille devient extrêmement controversée depuis cette

étude. Certains auteurs maintinrent les Aceraceae et Hippocastanaceae en dehors des Sapindaceae tandis que d'autres adoptèrent une vision plus large de la famille, incluant les deux sous-familles sus-citées (Buerki *et al.*, 2009).

L'avènement des techniques modernes de biologie moléculaire permit d'entreprendre une classification chimiotaxonomique des Sapindaceae sur la base des séquences des macromolécules. Deux études, particulièrement détaillées, ont été publiées à ce sujet. Ces travaux proposent une phylogénie basée sur les données nouvelles de certaines séquences d'ADN. Ils interrogent aussi les relations entre ces classifications récentes et celles plus anciennes, dont il a été question ci-dessus. La première phylogénie moléculaire des Sapindaceae est proposée par Harrington (Harrington *et al.*, 2005). Cette dernière est basée sur les séquences des deux gènes plastidiques *rdhL* et *matK*, largement utilisés en cladistique végétale vers la fin des années 1990. Les données moléculaires conduisent à un remaniement de la classification en quatre sous-familles dont les Sapindoideae, les Dodonaeoideae, les Hippocastanoideae (qui incluent les deux sous-familles à répartition tempérée Aceraceae et Hippocastanaceae) et les Xanthoceroideae, une nouvelle sous-famille monotypique (qui contient un seul genre). Cette étude tend à stabiliser la question principale de la délimitation de la famille dans la mesure où elle supporte l'inclusion des Aceraceae et Hippocastanaceae aux Sapindaceae. En revanche, la comparaison des données moléculaires et macromorphologiques révèle de fortes discordances intrafamiliales. Ils sembleraient que de nombreuses tribus définies par Radlkofer soient polyphylétiques ou paraphylétiques.

Pour finir, une seconde phylogénie moléculaire, relativement récente, a été proposée par Buerki (Buerki *et al.*, 2009). Celle-ci est la plus complète disponible à ce jour de par la diversité de l'échantillonnage (60,3 % des genres échantillonnés contre 45,4 % pour Harrington *et al.*, 2005) et la quantité de données mise en jeu (un marqueur nucléaire, la région ITS, et sept marqueurs plastidiques, *matK*, *rpoB*, *trnL*, *trnD-trnT*, *trnK-matK*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*). Ces travaux supportent les quatre sous-familles définies par Harrington et établissent les liens de parenté entre ces dernières. De plus, ils confirment le caractère polyphylétique ou paraphylétique au niveau des tribus et des genres et proposent une réorganisation de ces phylums au sein des sous-familles.

Pour conclure, l'apport des études moléculaires est majeur. Ce dernier a permis de (i) mieux définir les limites des Sapindaceae en appuyant l'inclusion des sous-familles Aceraceae et Hippocastanaceae et de (ii) stabiliser la structuration de la famille en quatre sous-familles : Sapindoideae, Dodonaeoideae, Hippocastanoideae et Xanthoceroideae. Les interrogations

actuelles se portent sur les tribus et les genres, dont le caractère polyphylétique ou paraphylétique a été révélé. Les propositions de Buerki *et al.* à ce sujet ont été rejetées par l'APG IV, suggérant l'actualité du débat au sein de la communauté internationale (APG IV, 2016).

Radlkofer, 1933	Muller & Leenhouts, 1976	Harrington <i>et al.</i> , 2005	Buerki <i>et al.</i> , 2009
Sous-famille I : Eusapindaceae nomophyllae 1. Paullinieae 2. Thouinieae Eusapindaceae anomophyllae 3. Sapindeae 4. Aphanieae 5. Lepisantheae 6. Meliococcaeae 7. Schleichereae 8. Nephelaeae 9. Cupanieae	Sous-famille I : Sapindoideae Groupe A 1. Paullinieae 2. Thouinieae Groupe B 3. Sapindeae, 4. Lepisantheae (incl. Aphanieae) 5. Meliococcaeae; Groupe C 6. Schleichereae, 7. Nephelaeae 8. Cupanieae	Sous-famille I : Sapindoideae Clade A 1. Lepisantheae 2. Sapindeae Clade B 3. Nephelieae Clade C 4. Cupanieae Clade D 5. Paulinieae 6. Thouinieae	Sous-famille I : Sapindoideae 1. <i>Delavaya</i> group 2. <i>Koelreuteria</i> group 3. <i>Schleichera</i> group 4. <i>Litchi</i> group 5. <i>Macphersonia</i> group 6. <i>Cupania</i> group 7. <i>Tristiropsis</i> group 8. <i>Blomia</i> group 9. <i>Melicoccus</i> group 10. <i>Paullinia</i> group
Sous-famille II : Dyssapindaceae nomophyllae 10. Koelreuterieae 11. Cossignieae 12. Dodonaeae Dyssapindaceae anomophyllae 13. Doratoxyleae 14. Harpullieae (Aceraceae) (Hippocastanaceae)	Sous-famille II : Dodonaeoideae 9. Koelreuterieae 10. Cossinieae 11. Dodonaeae 12. Doratoxyleae 13. Harpullieae (dont Hippocastanaceae) (Aceraceae)	Sous-famille II : Dodonaeoideae 7. Dodonaeae 8. Harpullieae 9. Doratoxyleae	Sous-famille II : Dodonaeoideae 11. <i>Doratoxylon</i> group 12. <i>Dodonia</i> group
		Sous-famille III : Hippocastanoideae 10. Aceraceae 11. Hippocastanaceae	Sous-famille III : Hippocastanoideae 13. <i>Acer</i> group 14. <i>Aesculus</i> group
		Sous-famille IV : Xanthoceroideae (<i>Xanthoceras</i>)	Sous-famille IV : Xanthoceroideae <i>Xanthoceras sorbifolia</i>

Tableau 1. Evolution de la phylogénie des Sapindaceae de Radlkofer (1933) à Buerki (2009). Adapté et étendu de Harrington *et al.*, 2005.

1.1.3 Intérêts économiques et traditionnels

Les Sapindaceae sont reconnues comme des plantes d'intérêt économique dans divers secteurs. Le premier d'entre eux est le secteur agroalimentaire, dans lequel les Sapindaceae s'illustrent par leurs fruits. Ces derniers peuvent servir directement de nourriture ou bien être utilisés dans la confection de boissons, d'huiles et de plats divers. Les fruits comestibles les plus connus sont les litchi (*Litchi chinensis*), les longanes (*Dimocarpus longan*), les ramboutans (*Nephelium lappaceum*), les quenettes (*Melicoccus bijugatus*) et les fruits du pitoulier (*Talisia esculenta*) (Buerki *et al.*, 2009). D'autres fruits, consommés localement, jouissent d'une importance majeure dans leurs cultures d'origines. C'est le cas des fruits de l'aki (*Blighia sapida*), très important dans la cuisine traditionnelle de la Jamaïque, où il entre en dans la composition du plat national (Sinmisola *et al.*, 2019). Un autre exemple concerne le fruit du pometier (*Pometia pinnata*), dont l'importance dans la culture polynésienne est avérée (Thomson et Thaman, 2006). La boisson la plus connue issue d'une Sapindaceae est certainement le guarana, obtenue à partir des extraits de la plante du même nom (*Paullinia cupana*). Des huiles peuvent être obtenus à partir des fruits de *Blighia* spp. et des graines de *Schleichera oleosa* ou *Schleichera trijuga* (Adeyemi *et al.*, 2012). Avec l'ajout des espèces d'érables du genre *Acer*, le sirop d'érable devient un dérivé agroalimentaire majeur.

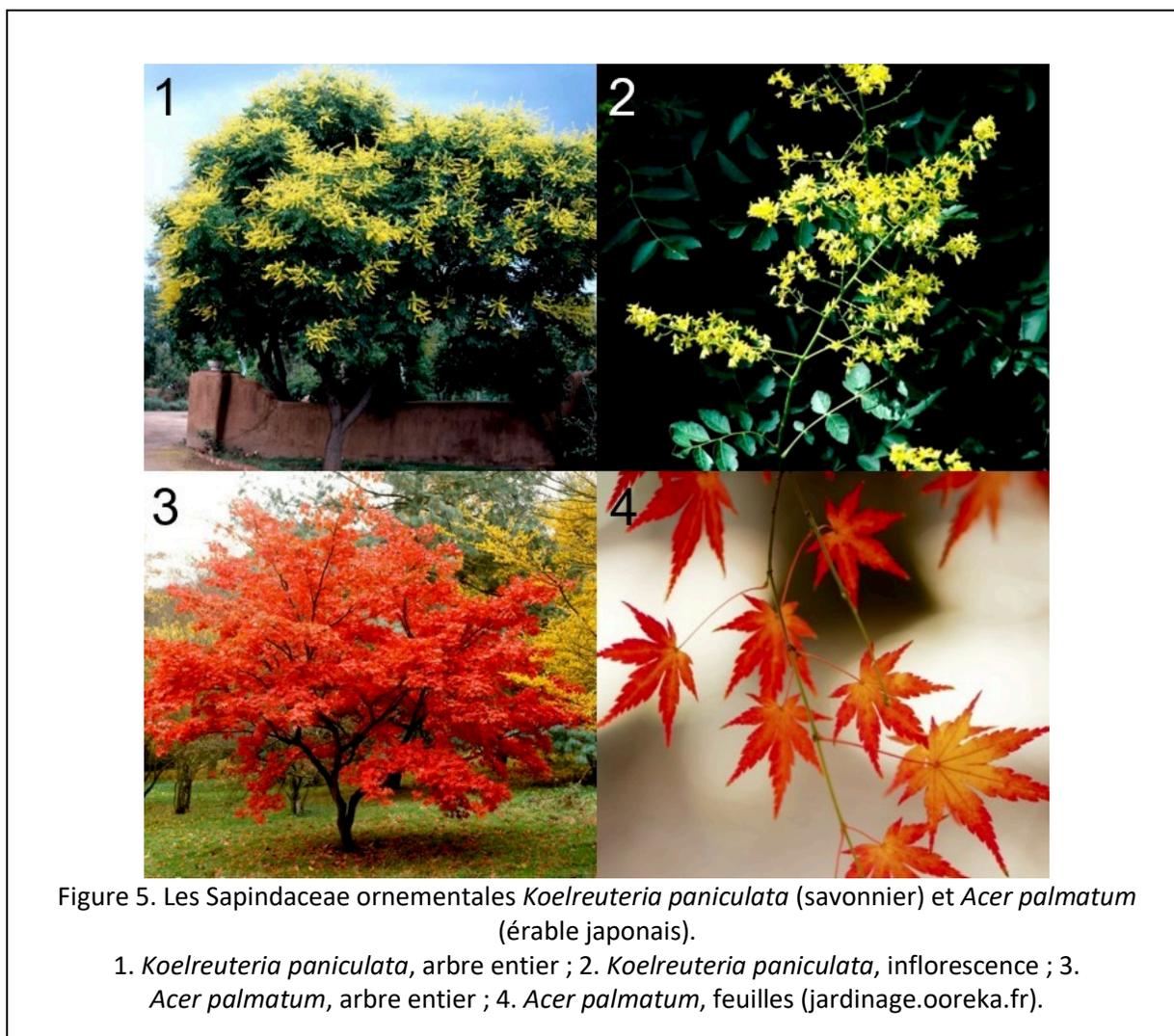
Les Sapindaceae sont également utilisées pour leur bois. Les espèces du genre *Pometia*, originaires d'Asie tropicale et de Polynésie, sont très appréciées à cet effet pour la qualité de leur bois et la taille des arbres pouvant atteindre 50 mètres (Thomson et Thaman, 2006). Certains membres de la famille ont été décrits comme plantes ornementales. C'est le cas des espèces des genres *Koelreuteria*, *Ungnadia* et *Acer* (Buerki *et al.*, 2009).

Les usages traditionnels des Sapindaceae sont souvent reportés dans la littérature. Ces derniers concernent principalement la médecine traditionnelle asiatique, océanienne et africaine. Quelques exemples des membres de cette famille utilisés en médecine traditionnelle asiatique incluent *Koelreuteria paniculata*, utilisé en Chine pour le traitement des infections fongiques et bactériennes (Mostafa *et al.*, 2016) ainsi que *Sapindus emarginatus*, utilisé en Thaïlande pour ses propriétés antiprurigineuses et contraceptives (Kanchanapoom *et al.*, 2001). Dans la médecine traditionnelle océanienne, on note l'utilisation de *Pometia pinnata* dans l'archipel Tonga pour le traitement de diverses affections telles que les infections buccales, les douleurs abdominales et les troubles gynécologiques (Voutquenue *et al.*, 2003) et de *Elattostachys apetala*, utilisé en Nouvelle-

Calédonie comme abortif (Lavaud *et al.*, 2001). La médecine traditionnelle africaine basée sur l'utilisation des Sapindaceae est extrêmement riche. Celle-ci intègre diverses espèces utilisées pour le traitement de nombreuses affections telles que les maux de tête, la diarrhée, les rhumatismes, les douleurs pulmonaires et dentaires, la dysenterie, le paludisme, les affections de la peau (dont plaies et brûlures), les problèmes cardiovasculaires (dont ulcères, gonflements et œdèmes) et les infections diverses (Faleye *et al.*, 2019 ; Biang *et al.*, 2020). Une liste non exhaustive des espèces d'intérêt utilisées à ces fins comprend : *Blighia* spp., *Ganophyllum giganteum*, *Eriocoelum microspermum*, *Zanha golungensis*, *Lecaniodiscus cupanioides* (Adesegun *et al.*, 2008 ; Mazzola *et al.*, 2011 ; Lavaud *et al.*, 2015 ; Montes *et al.*, 2014 ; Pertuit *et al.*, 2018a).

Les Sapindaceae sont aussi utilisées en tant que substituts de savon et poisons de pêche. Ces usages traditionnels sont intimement liés aux espèces du genre *Sapindus*, dont les fruits sont utilisés pour laver la peau et les objets (Huang *et al.*, 2003 ; Murgu et Rodrigues-Filho, 2006). Les fruits de *Blighia* spp. sont utilisés comme poisons de pêche en Afrique centrale (Penders et Delaude, 1994).

Pour finir, les Sapindaceae suscitent un intérêt particulier en médecine occidentale du fait de leur richesse en métabolites spécialisés. Ceux-ci entrent dans la composition de préparations utilisées en phytothérapie. C'est par exemple le cas de l'aescine du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*), utilisé en pharmacie occidentale pour ces propriétés anti-inflammatoires, vasculoprotectrices et antidouleurs (vidal.fr, lien 5). Des nombreuses études se sont intéressées à leur phytochimie dans le but de découvrir de nouvelles molécules actives d'origine végétale. Celles-ci se sont largement focalisées sur les saponines, particulièrement abondantes chez les Sapindaceae (Lavaud *et al.*, 2001 ; Voutquenne *et al.*, 2003 ; Mazzola *et al.*, 2011 ; Hu *et al.*, 2018 ; Pertuit *et al.*, 2018a ; Biang *et al.*, 2020). Entre autres, les saponines des Sapindaceae ont attiré l'attention des chercheurs pour leur propriétés antifongiques (Ekabo *et al.*, 1996 ; Lunga *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2018). Dernièrement, une étude jamaïcaine a proposé de les utiliser dans la confection d'un dentifrice, illustrant la versatilité de ces composés et l'intérêt qu'ils suscitent à travers le monde (Paul *et al.*, 2020).



Suite à ce paragraphe généraliste sur les Sapindaceae, les quatre espèces étudiées ainsi que leurs genres sont présentés en détails.

1.1.4 Le genre *Blighia*

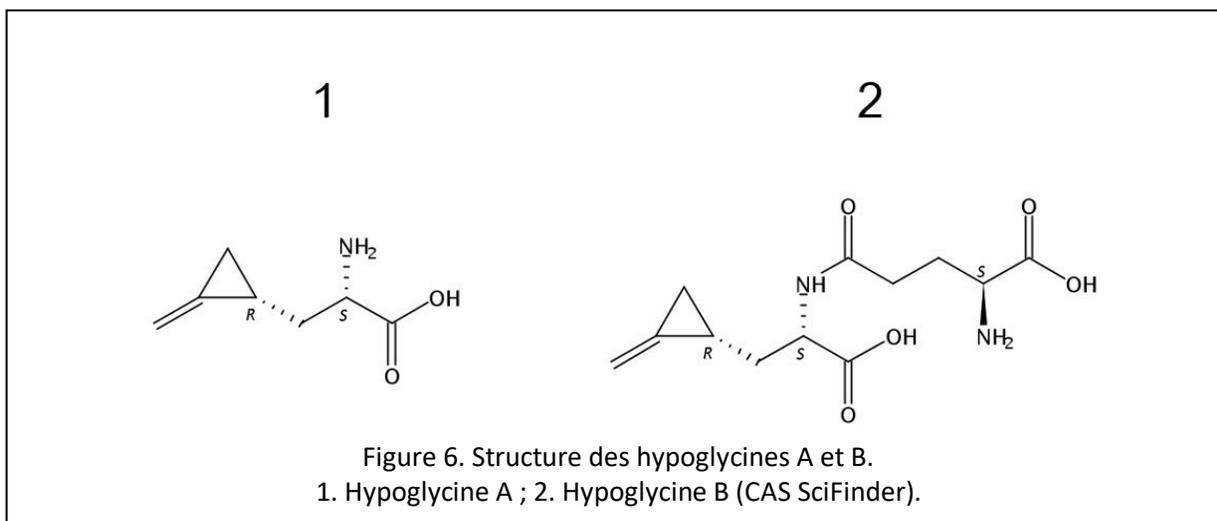
Le genre *Blighia* (Sapindaceae, sous-famille Sapindoideae) inclus plusieurs espèces d'arbres originaires d'Afrique équatoriale. Le nombre d'espèces est sujet à discussion. Certaines sources mentionnent trois espèces bien que la base de données online *The Plant List*, utilisée comme référence en sciences végétales, accepte l'existence de six espèces (Penders *et al.*, 1989 ;

theplantlist.org, lien 6). Le nom de genre « *Blighia* » viendrait du capitaine de marine William Bligh, qui l'aurait introduit dans un jardin botanique britannique à la fin du XVIII^{-ème} siècle (Sinmisola *et al.*, 2019).

Botaniquement, les espèces de *Blighia* sont des arbres dont la taille maximale est comprise entre 25 et 40 mètres. Le tronc est cylindrique et droit, souvent dépourvu de branches jusqu'à une certaine hauteur. L'écorce est lisse et de couleur grise, marron à vert foncé selon les espèces. L'intérieur du tronc est de couleur marron, jaune, orange ou rouge pâle. La couronne est dense et souvent arrondie. Chez toutes les espèces décrites, les jeunes rameaux sont orange et velus puis deviennent rapidement glabres et marron. Les feuilles sont de disposition alternée. Celles-ci sont de composition paripennée, composées de deux à cinq paires de folioles. Les folioles sont opposées et, selon les espèces, de forme elliptique, oblongue ou obovale. Celles-ci peuvent atteindre des dimensions impressionnantes de l'ordre de 40 centimètres de long pour 13 centimètres de largeur mais sont souvent beaucoup plus petites. Les jeunes folioles sont colorées puis deviennent rapidement vert foncé, glabres et coriaces, rappelant la feuille de laurier de par leur couleur et leur texture. Les fleurs sont unisexuées, pentamériques, petites, régulières, pubescentes et organisées en grappe. Elles sont de couleur blanche, jaunâtre ou verdâtre selon les espèces, toutes sont parfumées et sans pétales. Il y a un fort dimorphisme entre les fleurs mâles et femelles, les premières disposent d'un ovaire rudimentaire tandis que les secondes présentent des étamines fortement réduites. Les fruits sont des capsules trilobées n'excédant pas la taille du poing, généralement piriformes dont la couleur est jaune, orange ou rouge à maturité. Ils renferment trois graines ovoïdes, marron foncé à noires, d'aspect lisse et brillant faisant penser aux graines du litchi. Celles-ci sont maintenues au reste du fruit par une arille charnue comestible et riche en lipides qui constitue tout l'intérêt des *Blighia* spp. sur le plan agroalimentaire (Asamoah *et al.*, 2010 ; Obeng, 2010a ; Obeng, 2010b).

L'espèce du genre *Blighia* la plus connue est de loin *Blighia sapida*. Bien qu'originaires d'Afrique comme tous ses congénères, *Blighia sapida* doit sa notoriété à la culture antillaise et plus particulièrement la culture jamaïcaine. L'arbre aurait été introduit en Jamaïque vers la fin du XVIII^{-ème} siècle, probablement par un navire esclavagiste en provenance d'Afrique. L'espèce se serait alors rapidement acclimatée, puis elle aurait été volontairement dispersée et cultivée par la population de l'île pour la grande quantité de fruits produite (Rashford, 2001). Les fruits de *Blighia sapida* constituent aujourd'hui un aliment indissociable de la cuisine jamaïcaine. Ces

derniers sont localement désignés par le terme « *ackee* » qui désigne à la fois la plante et le fruit. Ils entrent dans la composition de nombreux plats locaux dont le plat national, composé d'une friture d'*ackee*, de morue et de divers épices et aromates (Rashford, 2001 ; Emanuel, 2017 ; Sinmisola *et al.*, 2019). Seuls les arilles charnus sont comestibles et ceux-ci doivent être consommés quand le fruit arrive à maturité sous peine d'une forte toxicité. Plusieurs événements d'empoisonnement ont été rapportés en Jamaïque et en Afrique suite à la consommation de fruits immatures. Cette affection, connue sous le nom de maladie des vomissements de la Jamaïque, affectent surtout de jeunes enfants et entraîne des vomissements, une fatigue généralisée, un état de conscience altérée et parfois la mort (Asamoah *et al.*, 2010 ; Mazzola *et al.*, 2011). La maladie a depuis été liée à deux acides aminés toxiques, l'hypoglycine A et B, dont la concentration dans le fruit décroît avec l'état de maturité de ce dernier. Dans l'organisme, ces deux composés altèrent le métabolisme des glucides, notamment la néoglucogénèse et la β -oxydation des acides gras, conduisant à une hypoglycémie sévère (Hassall et Reyle, 1954 ; Von Holt *et al.*, 1966). L'ingestion de sucre jusqu'à trois heures après la prise d'*ackee* immature pourrait limiter les symptômes. Les autres méfaits associés à la consommation inappropriée d'*ackee* sont des anomalies congénitales et des réactions allergiques chez les personnes présentant un historique connu d'allergies alimentaires et d'anaphylaxie (Sinmisola *et al.*, 2019). De nombreuses études sur la maladie des vomissements de la Jamaïque ont été conduites. Celles-ci ont probablement participé à populariser l'espèce *Blighia sapida* dans la culture scientifique et académique. C'est également l'espèce de *Blighia* la plus intéressante sur le plan économique. De nombreux produits dérivés de l'*ackee* sont produits et exportés, principalement depuis la Jamaïque vers le Canada, les États-Unis et le Royaume-Uni. Ce commerce représenterait un bénéfice à l'export de 15,3 millions de dollars américains en 2013 en Jamaïque (Sinmisola *et al.*, 2019).



Sur son continent d'origine, les utilisations des espèces du genre *Blighia* sont avant tout locales et concernent la médecine traditionnelle africaine, le bois de construction et dans une moindre mesure, le caractère ornemental et l'alimentation. Les *Blighia* sont des plantes importantes pour la médecine locale et sont utilisées pour traiter diverses affections dans de nombreux pays d'Afrique équatoriale. Les parties du végétal utilisées et leurs modes d'application sont extrêmement diversifiées. Ces derniers incluent les feuilles, l'écorce, les fruits, les graines et la sève de feuilles utilisés directement ou broyés, en décoction, pansement, embrocation, *per os*, et dans l'eau du bain. Une liste non exhaustive des propriétés de ces préparations inclue des activités antidouleurs, sédatives, stimulantes, aphrodisiaques, antiseptiques, anti-inflammatoires, antipyrétiques, antivertigineuses, antiépileptiques, purgatives et antioœdémateuses. Le deuxième intérêt principal des *Blighia* spp. repose sur l'utilisation de leur bois. Bien que d'excellente qualité pour la construction d'édifices légers, de meubles, de bateaux et de traverses de chemin de fer, le bois est utilisé localement et rarement exporté à l'international. Ce dernier est aussi utilisé pour alimenter le feu et pour la production de charbon de bonne qualité. D'autres usages secondaires inclus le caractère ornemental et l'alimentation, notamment par la consommation des feuilles en salade et la confection de poisons de pêche. Ces arbres sont aussi plantés pour attirer les pollinisateurs, générer de l'ombre dans les villages, produire des parfums et des savons locaux (Asamoah *et al.*, 2010 ; Obeng, 2010a ; Obeng, 2010b).

Espèce	Partie utilisée	Procédé	Mode d'administration	Usage ethno-pharmacologique	Pays
<i>B. sapida</i>	Sève de bourgeons terminaux		Collyre	Traiter ophtalmie et conjonctivite	
<i>B. sapida</i>	Ecorce et feuilles	Décoction	<i>Per os</i>	Traiter œdèmes, douleurs intercostales, dysenterie, diarrhée	
<i>B. sapida</i>	Ecorce	Moulue et associée à du poivron (<i>Capsicum annum</i>)	Frotté sur le corps	Stimulant	Ghana
<i>B. sapida</i>	Pulpe de branches		Frotté sur le front	Traiter migraine	Ghana
<i>B. sapida</i>	Feuilles	Transformées en pâte avec sels végétaux	Application locale	Traiter pian et ulcères	Côte d'Ivoire et Nigeria
<i>B. sapida</i>	Plante entière			Traiter fièvre jaune, épilepsie, œdèmes. Laxatif et diurétique	Côte d'Ivoire
<i>B. sapida</i>	Graines			Traiter nausée et vomissements	Ghana
<i>B. sapida</i>	Feuilles			Traiter fièvre et vertiges	Bénin
<i>B. sapida</i>	Branches			Traiter hépatite, cirrhose et amygdalite	Bénin
<i>B. sapida</i>	Ecorce ou péricarpe de fruits	Décoction	Application locale	Traiter plaies	Togo
<i>B. sapida</i>	Pulpe de fruits		Application locale	Traiter herpès-Whithlow	Togo
<i>B. sapida</i>	Ecorce	Broyée	<i>Per os</i>	Antidote contre piqûres de serpents et scorpions	Togo
<i>B. sapida</i>	Graines	Broyées	<i>Per os</i>	Traiter douleurs estomac	Togo
<i>B. sapida</i>	Graines	Extrait aqueux	<i>Per os</i>	Expulser parasites	Brésil
<i>B. unijugata</i>	Plante entière			Sédatif, analgésique, traiter rhumatismes, douleurs reins, raideur, stimuler contractions utérus	
<i>B. unijugata</i>	Pulpe écorce		<i>Per os</i>	Lavement	

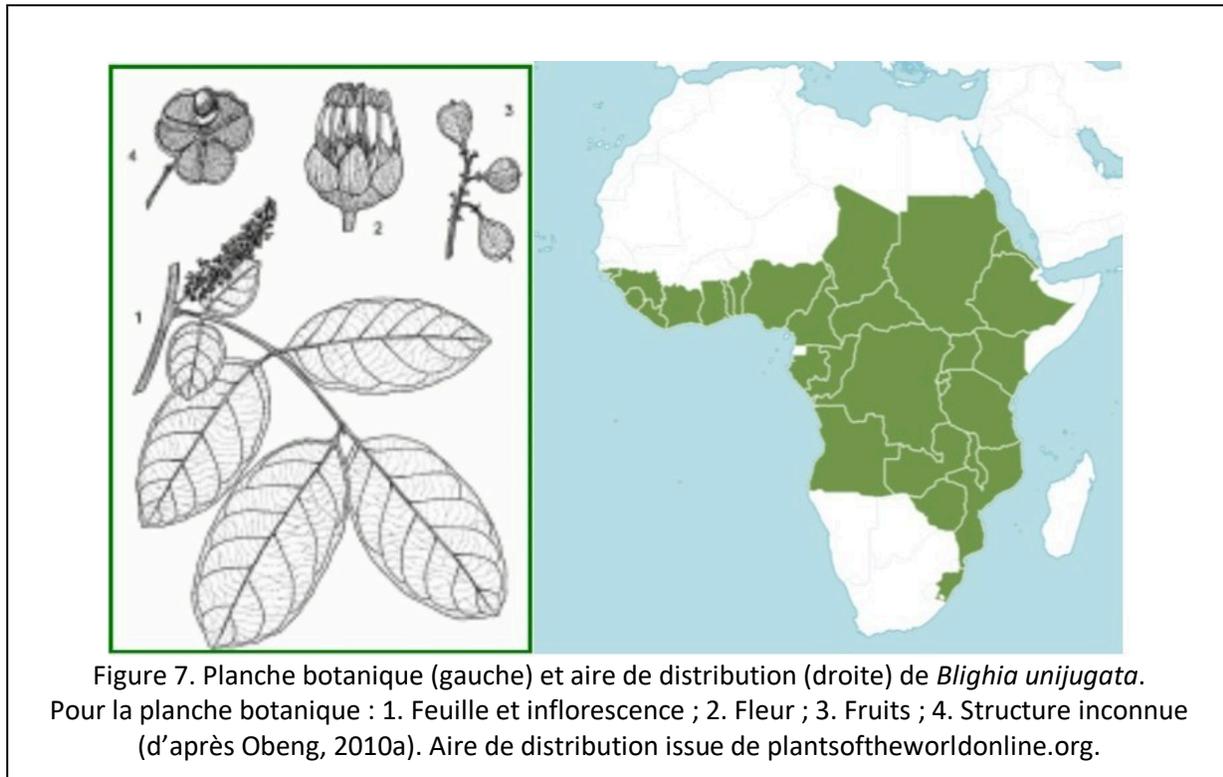
<i>B. unijugata</i>	Ecorce	Décoction	<i>Per os</i>	Purgatif, traiter fièvre	
<i>B. unijugata</i>	Pulpe de feuilles		Pommade	Rajeunissant et relaxant	Côte d'Ivoire
<i>B. unijugata</i>	Feuilles	Dans bain de vapeur	Inhalation	Traiter fièvre enfants, tonifiant	Congo
<i>B. unijugata</i>	Fruits			Traiter nausée et vomissements	Nigeria
<i>B. unijugata</i>	Huile de graines		Pommade		République Centrafricaine
<i>B. unijugata</i>	Feuilles	Décoction		Traiter vertiges	République centrafricaine
<i>B. welwitschii</i>	Ecorce		Révulsif sur la peau	Apaiser douleurs reins, intercostales et lumbago	RDC
<i>B. welwitschii</i>	Ecorce	Décoction	<i>Per os</i>	Purgatif, traiter toux	RDC
<i>B. welwitschii</i>	Feuilles	Moulues et associées à la banane	<i>Per os</i>	Aphrodisiaque	RDC
<i>B. welwitschii</i>	Feuilles	Décoction		Cholagogue	Nigeria et Côte d'Ivoire
<i>B. welwitschii</i>	Sève de feuilles			Traiter inflammations auriculaires	Congo

Tableau 2. Utilisations traditionnelles des *Blighia* spp. en médecine traditionnelle africaine. Généré d'après Asamoah *et al.*, 2010 ; Obeng, 2010a ;b.

1.1.5 L'espèce *Blighia unijugata*

L'espèce *Blighia unijugata* est un arbre pouvant atteindre 35 mètres de haut et 200 centimètres de diamètre à la base du tronc. Il est en moyenne plus grand que *Blighia sapida* mais plus petit que *Blighia welwitschii*. *Blighia unijugata* peut se différencier des autres espèces par la présence de villosités à la base des folioles et par la petite taille de ses fruits (max. 3 cm contre min. 4 cm pour les autres espèces). Cette espèce est retrouvée dans une grande diversité d'habitats bien qu'elle affectionne particulièrement les forêts tropicales humides et montagneuses jusqu'à 1500 mètres d'altitude. Cette diversité d'habitats fait de *Blighia unijugata* l'espèce du genre *Blighia* avec la plus grande distribution en Afrique. Cette dernière s'étend d'Ouest en Est de la Guinée jusqu'à l'Ethiopie, et du Nord au Sud, du Niger au Mozambique. Les utilisations de *Blighia unijugata* par l'homme sont typiques des Sapindaceae et recouvrent le bûcheronnage, la médecine traditionnelle et la confection de poisons de pêche. En Côte-d'Ivoire, par exemple, la pulpe de feuilles est utilisée en embrocation comme rajeunissant et relaxant. Les fruits sont

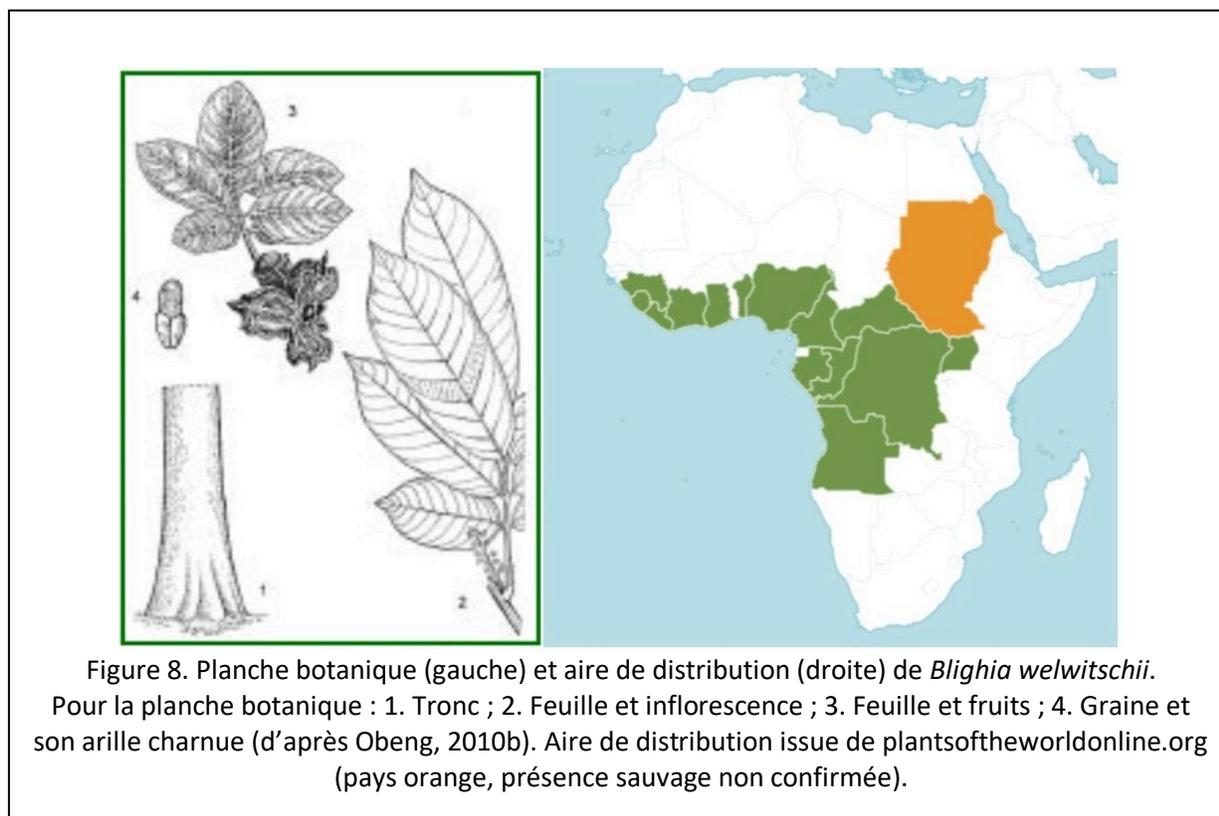
employés au Nigeria dans le traitement des nausées et des vomissements. Enfin, des décoctions de feuilles sont utilisées en République centrafricaine pour le traitement des vertiges. L'espèce est abondante en Afrique équatoriale et pourrait avoir un potentiel encore inexploité en agroforesterie (Obeng, 2010a ; tropicos.org, lien 7).



1.1.6 L'espèce *Blighia welwitschii*

Blighia welwitschii semble être le plus imposant du genre avec une hauteur maximale de 50 mètres et un diamètre du tronc à la base compris entre 80 et 180 centimètres. Outre la taille du spécimen, *Blighia welwitschii* est discernable de ses cousins par la taille et la forme des folioles et des fruits. Ces derniers présenteraient des angles plus prononcés que les capsules des autres espèces. L'espèce est majoritairement retrouvée dans les forêts tropicales humides primaires et secondaires jusqu'à 1200 mètres d'altitude. Son aire de répartition est plus restreinte que celle de *Blighia unijugata* et plus australe que celle de *Blighia sapida*. On le retrouve à l'état sauvage le long de la côte ouest de l'Afrique, du Sierra Leone à l'Angola, et dans les terres à travers les deux Congo jusqu'à l'Uganda. Le bois de *Blighia welwitschii* est communément utilisé pour la

construction de structures diverses et d'objets. Les feuilles sont prises en décoction comme cholagogue en Côte d'Ivoire et au Nigéria. La sève des feuilles est utilisé pour traiter les inflammations auriculaires au Congo. Des poisons de pêche sont confectionnés à partir des fruits. L'espèce pourrait présenter un intérêt non négligeable pour le développement des populations locales. La production de bois et l'alimentation sont les principaux secteurs visés bien que des études complémentaires soient nécessaires. Les paramètres agroforestiers de l'arbre (taux de croissance, dispersion, régénération etc.) ainsi que l'éventuelle toxicité des jeunes feuilles et des arilles doivent encore être définis afin d'envisager une exploitation durable (Obeng, 2010b ; Penders et Delaude, 1994 ; ville-ge.ch, lien 8 ; tropicos.org, lien 9).



1.1.7 Le genre *Chytranthus*

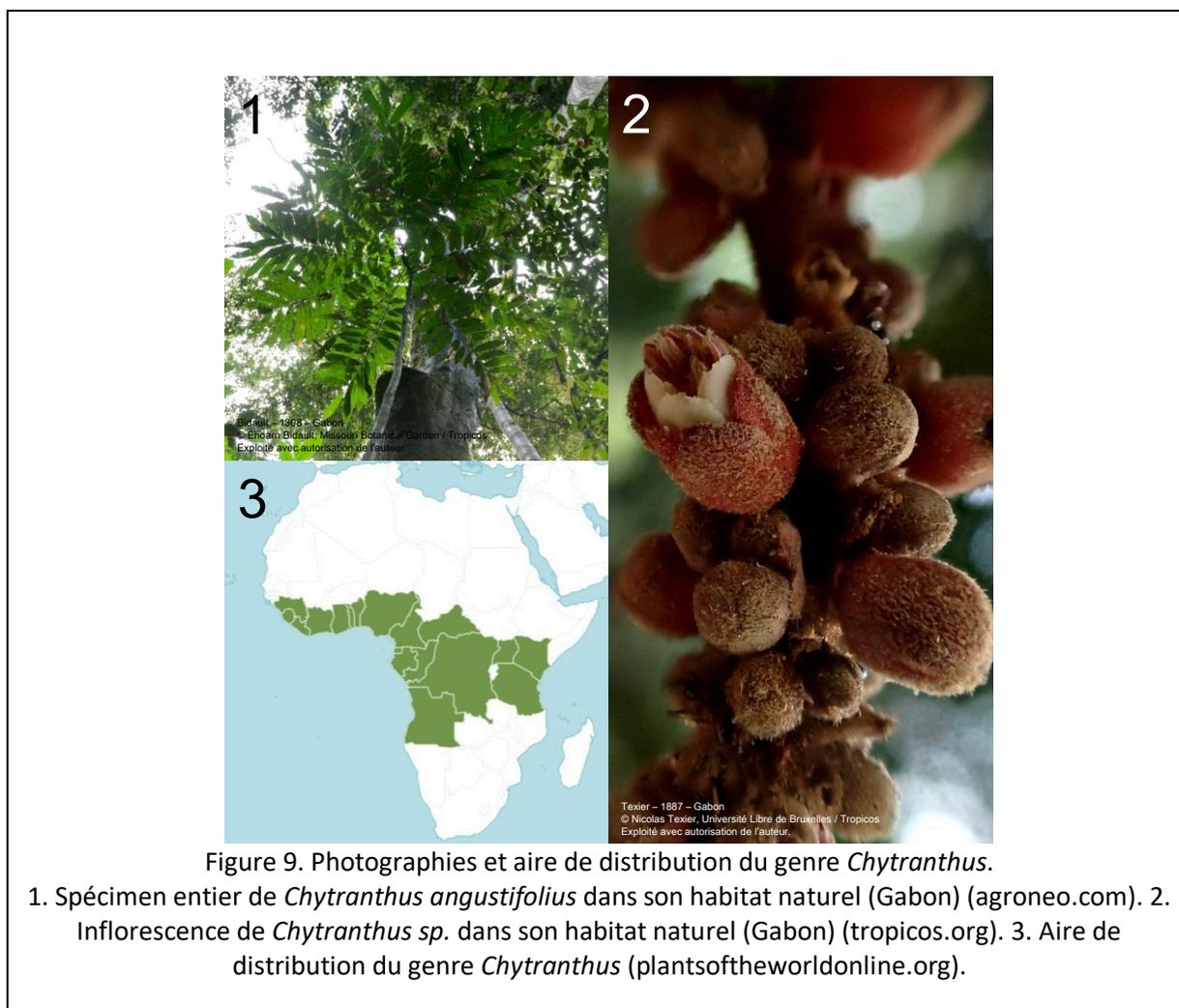
Le genre *Chytranthus* (Sapindaceae, sous-famille Sapindoideae) comprend des arbres et des arbustes d'Afrique équatoriale. Ce dernier est relativement diversifié puisqu'il pourrait inclure jusqu'à 35 espèces différentes (theplantlist.org, lien 10). A titre de comparaison, les genres de

Sapindaceae les plus diversifiés sont *Serjania* (215 espèces, Amérique tropicale et subtropicale) et *Paullinia* (195 espèces, Amérique et Afrique tropicale), suivis d'*Allophylus* (jusqu'à 200 espèces, pantropicale) et d'*Acer* (110 espèces, tempérée à subtropicale) (plantsoftheworldonline.org, lien 11). *Chytranthus* pourrait être un des genres les plus diversifié parmi les Sapindaceae d'Afrique équatoriale (Onuminya *et al.*, 2017). Le mot « chytranthus » provient probablement du grec « *chytra* » désignant initialement un petit contenant en poterie et « *ánthos* » signifiant « fleur ». Ce dénominatif fait écho à la forme des fleurs du *Chytranthus*, celles-ci étant enveloppées par un calice non divisé à sa base.

En botanique, les spécimens du genre *Chytranthus* sont décrits comme des arbres, des petits arbres ou des arbustes dont la taille est variable selon les espèces. Celle-ci ne semble pas excéder les dix mètres de hauteur et la majorité des espèces feraient entre un et cinq mètres (Gojayevev *et al.*, 2013 ; Faleye *et al.*, 2019 ; Biang *et al.*, 2020). Le tronc est de faible diamètre, monocaule, peu ramifié et surplombé d'une couronne terminale présentant de larges feuilles paripennées. La forme globale de la plante est souvent qualifiée de « *palm-shaped* », en forme de palmier. Les feuilles présentent généralement trois à dix paires de folioles. Celles-ci n'excèdent pas 30 centimètres de long, de disposition opposée et de forme oblongue à elliptique. Le bout des folioles est caractérisé par une pointe raide et aigüe (folioles cuspidées). Les inflorescences sont cauliflores (directement sur le tronc), pubescentes, étroites avec des cymes latérales contractées et terminées par des fleurs de petite taille. Les fleurs présentent un calice enveloppant, velu, à peine divisé si ce n'est à l'extrémité apicale de la fleur. Les sépales sont de couleur variable et peuvent être, selon les espèces, blanchâtre, jaunâtre, verdâtre, marron foncé ou rouge sombre. Les pétales sont souvent blanchâtres et portent un appendice bilobé. Les étamines sont filamenteuses, au nombre de sept à quinze, arborant parfois des couleurs vives de rose et de violet. L'ovaire est trilobé. Le fruit est indéhiscent, lisse et présente plusieurs lobes selon les espèces. Celui-ci est vert puis devient coloré à maturité (Thomas et Harris, 1999 ; Onuminya *et al.*, 2017 ; agroneo.com, lien 12).

Très peu de données sont disponibles concernant les possibles utilisations des espèces du genre *Chytranthus*. La petite taille des spécimens ne permet pas d'exploiter leur bois pour la construction, le chauffage ou l'artisanat. De nombreuses études s'accordent sur le fait qu'aucun usage en médecine traditionnelle africaine n'ai été rapporté (Nguenang *et al.*, 2010 ; Gojayevev *et al.*, 2013 ; Biang *et al.*, 2020). L'unique intérêt ethnobotanique pour lequel on trouve des traces dans la littérature est l'alimentation. Les graines de *Chytranthus mortehanii* seraient comestibles

une fois grillées (Gillet et Doucet, 2012). Deux autres espèces, *Chytranthus gilletii* et *Chytranthus talbotii*, seraient utilisées à des fins alimentaires par la population Badjoué du l'est du Cameroun. Ces plantes seraient prélevées directement dans la forêt tropicale primaire et feraient partie d'un ensemble de ressources végétales de haute importance pour la subsistance des populations locales défavorisées (Nguenang *et al.*, 2010).



1.1.8 L'espèce *Chytranthus macrobotrys*

Chytranthus macrobotrys est un petit arbre à la forme de palmier dont la taille oscille entre deux et onze mètres. Les jeunes spécimens sont des arbustes de petite taille, arqués au-dessus du sol. La forme globale de la plante est typique d'un *Chytranthus* et caractérisée par un tronc peu

ramifié surmonté de grandes feuilles composées. Les feuilles font 50 à 80 centimètres de longueur et présentent des pétioles de 16 à 25 centimètres. Bien que d'apparence paripennées, car composées de trois à six paires de folioles opposées, les feuilles sont parfois imparipennées, de par l'existence de folioles ou de vrilles simples. Les folioles sont typiques de *Chytranthus*, glabres et vert foncé. Les inflorescences sont cauliflores, préférentiellement retrouvées à la base du tronc ou sur le sol. Celles-ci sont pendantes et hérissées de fleurs marron foncé, zygomorphes à quatre pétales. Les fruits sont comestibles et virent du vert au jaune intense lors de leur maturation (Faleye *et al.*, 2019 ; ville-ge.ch, lien 13). *Chytranthus macrobotrys* affectionne particulièrement les forêts tropicales primaires d'Afrique équatoriale. La plante semble préférer l'ombre et l'humidité. Les sous-bois ombrageux, fluviaux et parfois marécageux représentent un environnement idéal. On la retrouve aussi dans les forêts moins humides et montagneuses jusqu'à 950 mètres d'altitude (ville-ge.ch, lien 13 ; tropicos.org, lien 14). La littérature s'accorde sur le fait qu'il n'y a pas d'usages ethnobotaniques documentés à ce jour. Seul le caractère comestible des fruits est connu.



Figure 10. Photographie d'herbier de *Chytranthus macrobotrys* (gauche) et aire de distribution (droite). Photographie issue de gbif.org. Aire de distribution issue de plantsoftheworldonline.org.

1.1.9 Le genre *Radlkofera* et l'espèce *Radlkofera calodendron*

Le genre *Radlkofera* (Sapindaceae, sous-famille Sapindoideae) désigne de petits arbres présents dans les forêts tropicales d'Afrique équatoriale (Steentoft, 1988). Le genre semble être monotypique car une seule espèce est reconnue à ce jour (theplantlist.org, lien 15). Cette espèce, *Radlkofera calodendron*, est systématiquement mentionnée dans les recherches portant sur le genre *Radlkofera* et semble bel et bien être la seule représentante du genre (Onuminya *et al.*, 2017). Néanmoins, quelques spécialistes mentionnent l'existence de trois autres espèces non identifiées dans des travaux d'inventaires de la biodiversité des Sapindaceae d'Afrique équatoriale. Ces spécimens sont nommés « *Radlkofera* sp. 1 », « *Radlkofera* sp. 2 » et « *Radlkofera* sp. 3 » et se voient chacun attribuer un numéro de voucher différent, suggérant des espèces différentes (Adeyemi et Ogundipe, 2012 ; Onuminya et Ogundipe, 2014). Les auteurs précisent qu'il pourrait s'agir de nouvelles espèces et que d'autres analyses doivent être réalisées afin d'établir leur identité. Le nom de genre *Radlkofera* a probablement été attribué en hommage au médecin et botaniste Allemand Ludwig Adolph Timotheus Radlkofer (1829-1927), grand spécialiste des Sapindaceae en son temps.

Les descriptifs botaniques de *Radlkofera calodendron* sont rares. Ces derniers décrivent la plante comme un arbre de petite taille, en forme de palmier, peu ramifié et monoïque. Le tronc fait entre quatre et quinze mètres de hauteur pour vingt centimètres de diamètre. Ce dernier est parfois divisé à la base. Les feuilles sont velues à l'apex, font un à deux mètres de long pour 40 à 50 centimètres de large. Le pétiole qui les relie aux rachis mesure 25 à 50 centimètres de long pour un à deux centimètres de diamètre. Les feuilles sont paripennées, composées de trois à neuf paires de folioles. Les folioles sont de disposition alternée, de forme oblongue ou obovale, l'apex est cuspidé. L'ensemble de la feuille est brunâtre tout comme le rachis. Des inflorescences et des fruits sont visibles sur les photos d'herbier en ligne mais rares sont leurs descriptions botaniques complètes. Les fruits sont des drupes indéhiscentes ne dépassant pas dix centimètres de diamètre. Ces derniers sont plurilobés et font penser aux fruits de *Chytranthus* spp.. L'ovaire est monolobé sans arille. Il renferme deux graines (gbif.org, lien 16 ; Onuminya *et al.*, 2017).

Radlkofera calodendron est répartie en Afrique équatoriale dans une région assez restreinte située aux alentours du golfe de Guinée. Les pays suivants sont connus pour héberger l'espèce : Liberia, Nigeria, Cameroun, Gabon, Congo, République Démocratique du Congo, Bénin et

République centrafricaine. Les sous-bois sombres et humides des forêts tropicales primaires semblent être l'habitat typique de la plante. Celle-ci semble affectionner les forêts vallonnées et n'est retrouvée qu'entre 200 et 800 mètres d'altitude (ville-ge.ch, lien 18 ; tropicos.org, lien 17 ; Steentoft, 1988 ; Onuminya *et al.*, 2017). Il n'existe pas de rapport détaillé, dans la littérature récente et facilement accessible, au sujet des usages possibles de la plante. Toutefois, deux sources anciennes et équivoques mentionnent une utilisation, possiblement en médecine traditionnelle africaine. Dans la première référence, l'espèce *Radlkofera calodendron* fait partie d'une liste de près de 1000 noms de plantes répertoriées comme plantes médicinales et toxiques du Congo-Brazzaville (Bouquet, 1966). La deuxième référence nous apprend que l'espèce possède un nom vernaculaire en langue pygmée « *inaolo a otokolo* » ce qui pourrait suggérer un usage ou du moins un intérêt des peuples indigènes pour cette plante (Letouzey, 1966). Il est extrêmement difficile de trouver des informations fiables et facilement accessibles au sujet de *Radlkofera calodendron*. Il semblerait que cette espèce soit largement méconnue de la communauté scientifique. Cette dernière n'a suscité que peu d'intérêt sur le plan agronomique, forestier ou phytochimique. Seules les études d'inventaires de la biodiversité la mentionnent. Les descriptions de ses caractéristiques écologiques et botaniques sont toujours très superficielles.



Chapitre 1.2 Travaux antérieurs

phytochimiques

1.2.0 Présentation du chapitre

Après avoir situé les limites botaniques de l'étude, ce second chapitre délimite la classe de composés d'intérêt. Les glycosides, et un groupe particulier au sein de ces derniers, les saponines, sont définies. Ces dernières voient leurs structures, leurs activités biologiques ainsi que leurs applications industrielles et traditionnelles détaillées. Une revue rigoureuse de toutes les saponines des Sapindaceae identifiées au cours des 30 dernières années est présentée. Enfin, les saponines connues chez les quatre espèces d'intérêt sont exposées.

1.2.1 Généralités sur les saponines

Les termes « saponine » ou « saponoside » désignent une vaste classe de métabolites spécialisés appartenant au groupe des hétérosides. Ces derniers sont très fréquents chez les plantes et en particulier chez les angiospermes. On les retrouve également chez certains organismes marins tels que les échinodermes et les cnidaires. Une caractéristique intrinsèque aux saponines est leur pouvoir tensio-actif : celles-ci forment des mousses dans l'eau. Cette propriété est à l'origine de l'utilisation traditionnelle des plantes à saponines en tant que détergents ménagers. La saponaire (*Saponaria officinalis*) était autrefois utilisée en Europe comme substitut de savon comme l'ont été, ou le sont encore aujourd'hui, les fruits de *Sapindus* spp. dans l'hémisphère sud. Les saponines sont très diversifiées dans leurs structures et leurs activités biologiques. Toutefois, deux autres propriétés leur sont souvent attribuées : une activité hémolytique et une toxicité vis-à-vis des organismes à sang froid (surtout poissons et mollusques). Utilisées en médecine traditionnelle orientale et présentes dans certaines spécialités de phytothérapie, les saponines ont fait l'objet d'un intérêt grandissant au cours du XX -ème siècle. Leurs propriétés et activités pharmacologiques étaient relativement bien décrites dans les années 1920, bien qu'aucune structure ne soit complètement élucidée. Plus de 750 molécules sont décrites en 1987. De nos jours, la littérature sur le sujet est abondante et de nouveaux composés continuent d'être décrits à un rythme élevé. Les saponines présentent un intérêt industriel non négligeable. Ces molécules servent de matière

première dans l'hémisynthèse de médicaments stéroïdiens tels que les contraceptifs, certains anti-inflammatoires et cardiotoniques. Les autres usages pharmacologiques concernent la galénique et la phytothérapie. Les plantes à saponines sont également utilisées dans l'industrie cosmétique pour leurs propriétés détergentes (Hostettmann et Marston, 1995 ; Bruneton, 2009). Malgré leur grand potentiel industriel, très peu de médicaments commercialisés sont basés sur les saponines ou leurs dérivés. Cela est dû à des problèmes de biodisponibilité et de toxicité, ou plus généralement à un manque de connaissances sur le comportement de ces molécules *in vivo* (Gao *et al.*, 2012 ; Moses *et al.*, 2014 ; Jiang *et al.*, 2018). Néanmoins, ces difficultés sont à contraster avec les progrès récents permettant d'utiliser ces molécules en tant qu'adjuvants dans les nouvelles générations de vaccins (Sun *et al.*, 2009 ; Marciani, 2018 ; Lacaille-Dubois, 2019). Des idées innovantes d'applications environnementales, en protection des cultures et en dépollution des sols par exemple, se font de plus en plus précises au sein de la communauté scientifique et suggèrent un avenir prometteur pour ces composés (Liu *et al.*, 2017 ; Walia *et al.*, 2017).

1.2.2 Structure des saponines

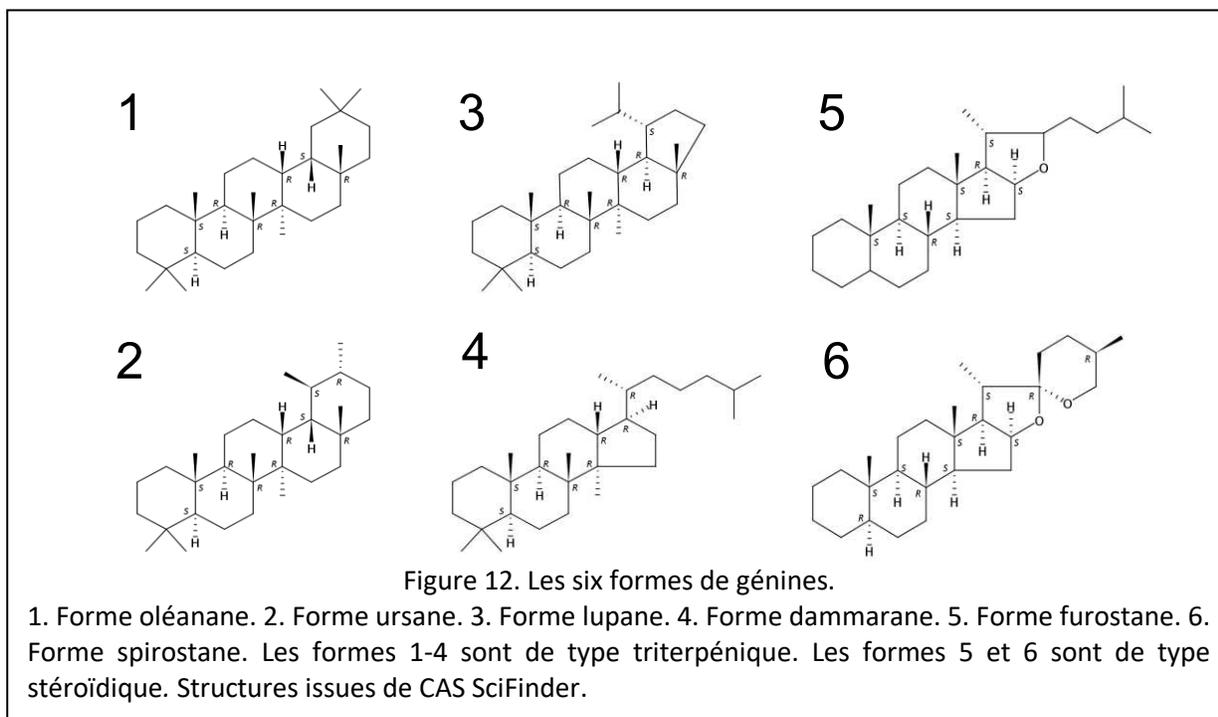
Toutes les saponines sont caractérisées par une structure apolaire cyclique, appelée génine ou aglycone, sur laquelle s'articule une ou plusieurs chaînes osidiques. Les saponosides sont habituellement classés en deux grandes familles selon la nature chimique de leur génine (Hostettmann et Marston, 1995). On distingue les saponosides à génine triterpénique et les saponosides à génine stéroïdique. Les saponines à génine triterpénique sont principalement présentes chez les angiospermes dicotylédones. Au contraire, les saponines à génine stéroïdique sont presque exclusivement retrouvées chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009). Certains spécialistes voient une troisième catégorie de saponines dans les hétérosides d'amines stéroïdiques. Ce rattachement est sujet à débat car d'autres auteurs préfèrent les associer au groupe des glycoalcoïdes, du fait de l'origine biogénétique de leur atome d'azote (Timité, 2012).

1.2.2.1 Les génines ou aglycones

La majorité des saponines connues actuellement comporte une génine triterpénique. Ce type de génine est le plus souvent pentacyclique. Une insaturation en C-12(13), caractéristique de ces séries, est habituellement observée. L'oxydation des carbones des méthyles et des carbones cycliques est récurrente. La présence d'une fonction acide carboxylique en C-28 est fréquente. Des

éthérifications internes et des lactonisations ont été rapportées (Hostettmann et Marston, 1995). L'oléanane (aussi appelé β -amyrine), l'ursane (aussi appelé α -amyrine) et le lupane sont les trois squelettes les plus communs. Plus rarement, on distingue un quatrième type de génine triterpénique nommé dammarane. Plus de 50 % des saponosides connus sont de type oléanane (Bruneton, 2009).

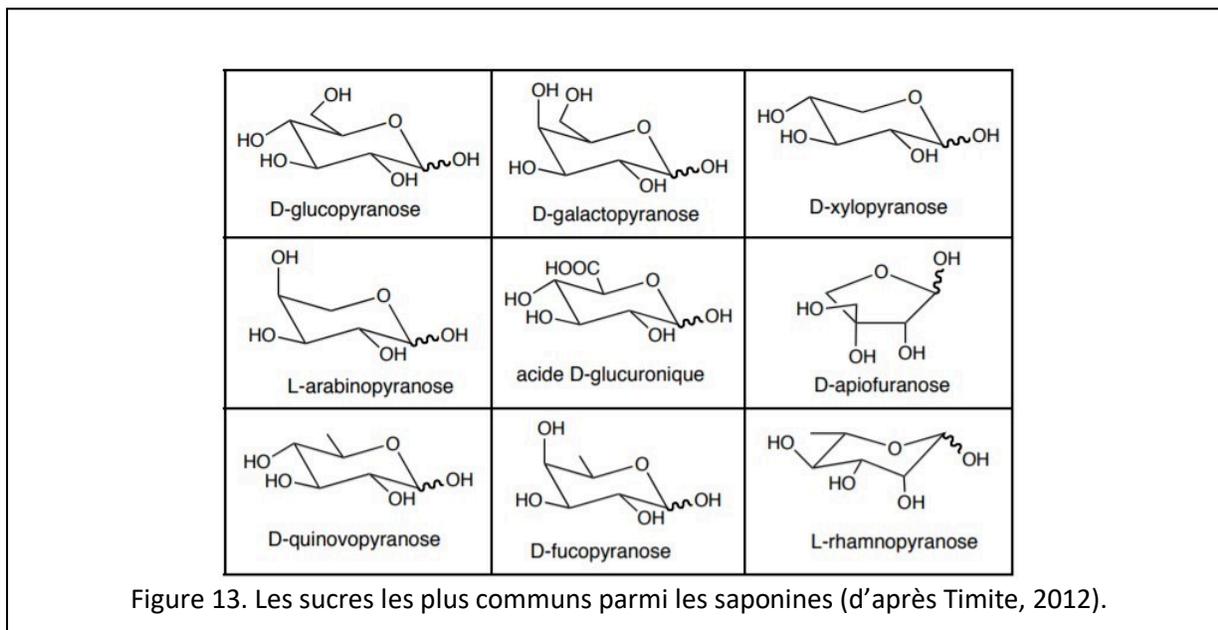
Moins communes que les génines triterpéniques, les génines stéroïdiques comportent 27 atomes de carbone. Ces molécules sont habituellement organisées en six cycles. Il arrive cependant que le dernier cycle soit ouvert, formant alors un squelette pentacyclique. L'hydroxylation en C-3 est presque tout le temps conservé. Selon la famille à l'origine de la génine, un certain nombre de carbones cycliques peuvent être hydroxylés. La forme à six cycles est appelée spirostane tandis que la forme à cinq cycles est appelée furostane. Les dérivés spirostaniques sont principalement présents dans les organes reproducteurs et de réserve : bulbes, racines et graines (Bruneton, 2009).



1.2.2.2 Les sucres

Tous les saponosides ont un ou plusieurs sucres liés à la génine. Ces sucres peuvent être seuls ou former des chaînes osidiques linéaires ou ramifiées. Il est important de noter que les sucres ne sont pas agencés de manière aléatoire sur la génine. En effet, les atomes de carbones portant les

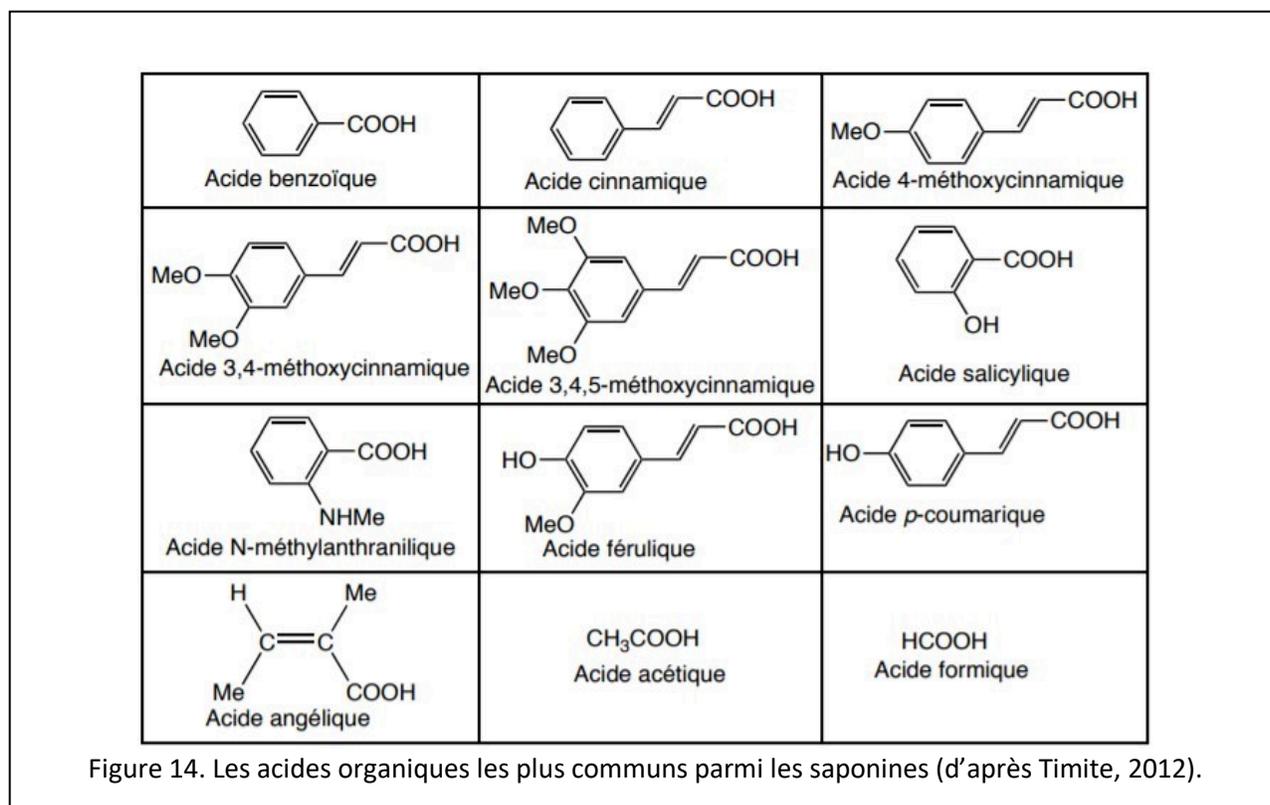
oses sont conservés au sein des différents types de génines (Bruneton, 2009). Les molécules portant une seule partie sucrée sont appelées monodesmosides. Dans ce cas, les sucres sont habituellement liés en C-3 des génines triterpéniques ou stéroïdiques par une liaison *O*-hétérosidique (en fait une fonction éther selon la nomenclature IUPAC). On qualifie de bidesmosides les molécules portant deux chaînes osidiques distinctes. Dans le cas présent, les sucres sont liés en C-28 des génines triterpéniques par une liaison ester et en C-26 des génines stéroïdiques par une liaison *O*-hétérosidique. Les groupements osidiques forment la plupart du temps des chaînes linéaires de trois à cinq résidus. Une saponine comportant 11 sucres a toutefois été caractérisée chez *Clematis mandshurica*, une herbacée originaire du Nord-Est de l'Asie. Les sucres présents dans les saponosides sont communs. Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le L-arabinose et le L-rhamnose sont parmi les plus retrouvés. Des résidus de type D-glucuronique et D-galacturonique sont assez fréquents et peuvent être à l'origine des propriétés acides de certaines molécules (Hostettmann et Marston, 1995).



1.2.2.3 Les acides organiques

Divers acides peuvent estérifier les saponines au niveau des hydroxyles des sucres ou des génines (Hostettmann et Marston, 1995). Les plus communs d'entre eux sont les acides acétique et formique. D'autres, comme les acides benzoïque et cinnamique, sont riches en doubles liaisons

conjuguées. Ce détail structural n'est pas sans importance car il permet aux saponines qui les portent d'être plus facilement détectables en spectroscopie UV.



1.2.3 Propriétés et activités biologiques

1.2.3.1 Propriétés physico-chimiques des saponines

Les saponosides sont solubles dans l'eau et dans divers solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol, les éthers de pétrole et le chloroforme. Leur principale propriété chimique réside dans leur caractère amphiphile. La formation de complexes stables avec les stérols, et notamment le cholestérol des animaux, est assez bien décrite. Ce mécanisme est supposé être à l'origine de plusieurs effets biologiques dont certains seront abordés dans la sous-section suivante. Malgré l'absence d'un chromophore leur permettant d'absorber la lumière dans les UV proches, les saponines absorbent classiquement entre 203 et 210 nm. Cette propriété est largement utilisée afin de les détecter et de les doser en spectroscopie UV (Hostettmann et Marston, 1995 ; Bruneton, 2009).

1.2.3.2 Activités biologiques des saponines

Le nombre d'effets biologiques attribuables aux saponines est important. La liste ci-dessous comprend les principaux d'entre eux mais n'est pas exhaustive. Les saponosides sont capables de provoquer la lyse des cellules sanguines des organismes homéothermes. Cette activité hémolytique serait imputable à leur interaction avec le cholestérol des membranes animales. Ces mêmes molécules ont parfois une activité antibactérienne, antifongique et antivirale (Lunga *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2018 ; Hu *et al.*, 2018 ; Mair *et al.*, 2018). Certains monodesmosides pourraient être des agents de défense des plantes contre les infections (Osbourn, 1996). Une activité cytotoxique, notamment *in vitro* sur des cellules cancéreuses humaines, est fréquemment rapportée (Nguyen *et al.*, 2019). Certaines saponines sont de puissants spermicides. Ces propriétés cytotoxiques seraient également la conséquence d'interactions avec les stérols membranaires. Les saponosides sont à l'origine des activités anti-inflammatoires et anti-oedémateuses de plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise (*Bupleurum* spp.) ou occidentale (*Aesculus* spp.). Ces mêmes composés pourraient expliquer l'action antitussive et/ou expectorante de préparations à base de végétaux tels que la primevère, la réglisse ou le bois de lierre. *Quillaja saponaria* (Rosaceae) est connue pour contenir des saponines pouvant être utilisées comme adjuvants de vaccins (Lacaille-Dubois, 2019). Des activités immunomodulatrices et adaptogènes pourraient être induites par voie orale par le ginseng, l'éleuthérocoque et *Aralia mandshurica* (Araliaceae), toutes des plantes à saponines. Des propriétés analgésiques, antiulcéreuses et des interactions avec le métabolisme du cholestérol ont aussi été décrites. Enfin, l'activité piscicide des saponosides est certainement l'une des premières propriétés à avoir été exploitée. L'usage de diverses plantes pour attraper les poissons était répandu dans l'antiquité. Certaines populations d'Amérique du Sud et d'Afrique continuent d'utiliser ces techniques pour la pêche (Penders et Delaude, 1994). En effet, les saponines piscicides sont actives à des concentrations extrêmement faibles de l'ordre de 1 à 5 ppm. Les principales familles en contenant sont les Fabaceae, les Sapindaceae et les Theaceae (Hostettmann et Marston, 1995 ; Bruneton, 2009).

1.2.4 Intérêts industriels et traditionnels

1.2.4.1 Intérêts industriels

L'utilisation industrielle des saponines concerne surtout les secteurs agroalimentaires, (phyto-)pharmaceutiques et cosmétiques. Les prochains paragraphes désignent les utilisations anciennes et les défis industriels actuels. Les saponosides peuvent être utilisés pour confectionner des savons, des détergents et des agents moussants d'extincteurs. L'industrie cosmétique exploite leurs propriétés afin de confectionner des gels d'émulsion et des bases neutres. Ces formulations servent à produire des savons, des shampoings et des dentifrices. Les principales plantes utilisées pour la production industrielle, dont certaines sont des plantes de grandes cultures, sont : le pois (*Pisum*), la betterave à sucre (*Beta*), la saponaire (*Saponaria*) et le marronnier d'Inde (*Aesculus*). Une importante utilisation des saponosides, à partir de la seconde moitié du XX^e-ème siècle, implique la production de stéroïdes. Ces derniers permettent la synthèse d'hormones sexuelles et de corticoïdes qui constituent à eux seuls une part importante des médicaments vendus à travers le monde. Deux génines stéroïdiques sont employées dans ce but : la diosgénine et la solasodine. Leur obtention permet la synthèse de progestérone et de cortisone en quelques étapes seulement. Une synthèse *de novo* longue et coûteuse peut ainsi être évitée. D'autres marchés impliquant des plantes à saponines existent. La réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) est très utilisée dans l'industrie pour la formulation de confiseries, de boissons, de produits cosmétiques et d'additifs pour cigarettes (Schmid *et al.*, 2018). Cette dernière est également utilisée en phytothérapie pour son activité anti-inflammatoire et antiulcéreuse. Les propriétés des extraits de réglisse sont en partie dues à une saponine, la glycyrrhizine, et ses dérivés. Ces composés entrent dans la composition de collutoires commerciaux comme l'HEXASPRAY® des laboratoires Bouchara-Recordati (vidal.fr, lien 19). Enfin, on peut évoquer la culture du ginseng (*Panax ginseng*) en Corée et en Chine. Celle-ci représente un marché annuel de plus de 10 000 tonnes. Les espèces du genre *Panax* contiennent dans leurs racines une famille particulière de saponines : les ginsénosides. Ces derniers sont supposés être à l'origine des nombreuses vertus attribuées au ginseng par la médecine traditionnelle orientale. On peut citer parmi ces vertus les effets adaptogène, fortifiant, immunostimulateur, anti-stress et anti-fatigue (Hostettmann et Marston, 1995 ; Bruneton, 2009).

Comme mentionné plus haut, le développement de médicaments commerciaux basés sur les saponines ou leurs dérivés est difficile, en particulier dans le secteur pharmaceutique. Cela se traduit aujourd'hui par un faible nombre de médicaments dont la substance active principale est

une saponine ou un dérivé direct, les rares exemples étant la digoxine (Digoxine Nativelle®, Lanoxin®, Cardigox®, Novodigal® etc.) et la solamargine (Curaderm®) (vidal.fr, lien 20 ; Atanasov *et al.*, 2015). Ces difficultés sont la conséquence de propriétés intrinsèques aux saponines telles que leur toxicité et leur vaste gamme d'activités biologiques. Celles-ci sont particulièrement délétères dans le secteur pharmaceutique, où la toxicité et la non-spécificité peuvent donner lieu à des effets secondaires graves. C'est pour ces raisons qu'a été abandonnée une étude clinique prometteuse impliquant la bardoxolone et la méthylbardoxolone, deux dérivés semi-synthétiques de l'acide oléanolique, comme agents anticancéreux et anti-inflammatoires. L'étude clinique de phase III a été arrêtée pour cause d'effets secondaires sévères et de mortalité chez les patients traités (Moses *et al.*, 2014). Malgré ces revers, de récents développements dans la recherche sur les saponines et leurs analogues ont permis d'initier de nouvelles études prometteuses. C'est par exemple le cas du bevirimat, un dérivé de l'acide bétulinique, premier composé classé dans les inhibiteurs de maturation du VIH. Ce dernier a fait l'objet d'études cliniques de phase I et II. Une autre étude impliquant 158 patients, basée sur une formulation nouvelle de l'aescine sous forme de gel en combinaison avec du salicylate de diéthylamine et de l'héparine, a montré plusieurs effets bénéfiques sur les traumatismes physiques. Cette dernière a notamment révélé une réduction rapide de la douleur et une bonne tolérance chez les sujets traités, recommandant la formulation dans le cas de blessures et autres lésions traumatiques (Moses *et al.*, 2014). Enfin, l'avancée récente la plus significative impliquant une saponine est certainement le développement du QS-21 de *Quillaja saponaria* en tant qu'adjuvant de vaccins. Ce mélange de deux saponines triterpéniques présente une forte activité immunomodulatrice ayant conduit les chercheurs à le considérer comme une alternative aux adjuvants classiques, basés sur des sels d'aluminium, dont la toxicité est désormais connue. Le QS-21 a été impliqué dans différentes formulations d'adjuvants, elles-mêmes testées dans de nombreuses études cliniques visant à développer des vaccins contre la malaria, l'herpès, la tuberculose, le VIH et le cancer. Ces travaux, principalement réalisés au cours des 20 dernières années, ont conduit à la commercialisation de deux nouveaux vaccins. Le premier est le Shingrix™, accepté par la FDA en 2017 et par l'EMA en 2018 pour la vaccination des adultes contre le virus varicelle-zona. Le second est le Mosquirix™, accepté par l'EMA en 2015 pour la vaccination des enfants contre la malaria (Lacaille-Dubois, 2019).

Outre ces applications en santé humaine, les saponines suscitent un intérêt grandissant en sciences de l'environnement. Un domaine de recherche prometteur concerne l'utilisation de

saponines en dépollution des sols et des eaux contaminées par des hydrocarbures ou des métaux lourds. Des propriétés très intéressantes ont pu être mises en évidence avec, pour la remédiation des hydrocarbures dans le sol, des effets d'élimination, de lessivage, d'amélioration de la solubilisation, de la désorption, de la phytoremédiation ou de la dégradation des polluants. Ces travaux suggèrent de possibles applications des saponines en tant que biosurfactants dont le caractère biodégradable représente un avantage environnemental conséquent face aux procédés chimiques utilisés actuellement (Liu *et al.*, 2017). D'autres auteurs proposent d'utiliser les saponines comme agents protecteurs du bois de construction, un secteur très dépendant de produits chimiques nocifs pour la santé humaine et l'environnement (Singh et Singh, 2012). Une autre application majeure pourrait concerner l'utilisation des saponines en protection des cultures. Comme il a été abordé précédemment, ces produits naturels présentent des propriétés antimicrobiennes, mais aussi molluscicides et insecticides, qui pourraient s'avérer d'une grande utilité dans la lutte contre les bioagresseurs des plantes cultivées. L'intérêt environnemental de cette approche est conséquent. En effet, les menaces environnementales et sanitaires engendrées par les produits phytosanitaires classiques sont aujourd'hui une préoccupation importante des scientifiques et des citoyens (Addabbo *et al.*, 2014 ; Walia *et al.*, 2017).

1.2.4.2 Intérêts traditionnels

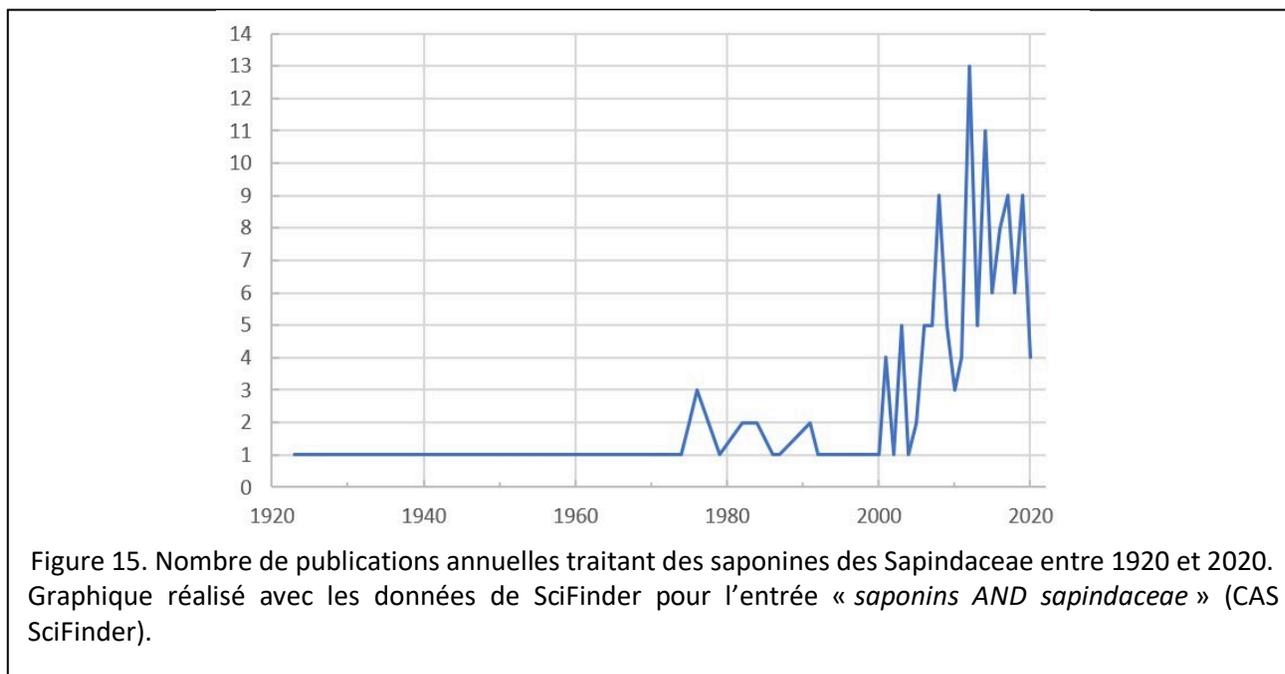
Si l'industrialisation de la société occidentale a gagné les secteurs de la pharmacie et de la médecine, ces derniers sont restés largement traditionnels dans une vaste partie du monde. Il est estimé qu'un tiers de la population n'a pas accès aux médicaments essentiels, principalement pour des raisons économiques. En Inde, 70 % de la population aurait recours à médecine traditionnelle. En l'an 2000, ce chiffre s'élevait à 80 % pour le continent africain d'après une enquête de l'OMS (Zhang, 2004). Les plantes jouent un rôle majeur dans les médecines traditionnelles de part et d'autre du globe. Parmi les nombreux exemples de plantes médicinales contenant des saponines, on peut citer, parmi tant d'autres exemples, l'arbre *Acacia ligulata* (Fabaceae), dont les feuilles et l'écorce sont utilisées par les aborigènes australiens pour traiter la toux, le rhume, les infections pulmonaires et pour le lavage de la peau (Jæger *et al.*, 2017). Un arbre de la même famille, *Burkea africana* (Fabaceae), est utilisé en Afrique pour traiter de nombreuses affections telles que le rhume, la toux, les obstructions intestinales, les maladies sexuellement transmissibles et les empoisonnements par animaux venimeux. Ses saponines présentent une forte activité contre le

virus de la grippe (Mair *et al.*, 2018). Une espèce endémique du Sahara marocain, *Zygophyllum gaetulum* (Zygophyllaceae), est utilisée dans le système de médecine indigène en tant qu'antispasmodique, antiallergique, antidiabétique et antidouleur (Safir *et al.*, 1998). Toujours sur le continent africain, les *Jamesbrittenia* spp. (Scrophulariaceae) sont utilisées sous diverses formes par la médecine traditionnelle zulu dans le traitement des états fébriles, des rhumes, des troubles respiratoires et des règles douloureuses. Les saponines de *Jamesbrittenia fodina* ont démontré des activités antifongiques, antibactériennes et molluscicides (Cogne, 2002). Dans d'autres régions du monde, l'espèce *Solanum paniculatum* (Solanaceae) est utilisée en médecine traditionnelle brésilienne en traitement des maladies respiratoires, de la fièvre, des dysfonctionnements gastriques et hépatiques et en tonifiant (Valerino-Díaz *et al.*, 2018). La réglisse (*Glycyrrhiza* spp.), dont il a été question précédemment dans les applications industrielles des plantes à saponines, est héritière d'une longue histoire en médecine traditionnelle européenne et asiatique. En Chine, celle-ci est utilisée depuis des siècles dans le traitement des affections respiratoires, gastrointestinales, urogénitales et dermatologiques (Schmid *et al.*, 2018). Ces multiples exemples suggèrent un rôle prépondérant des plantes à saponines dans les diverses médecines indigènes. Bien qu'il soit difficile d'évaluer le rôle individuel des saponines dans les activités revendiquées par ces médecines, il est possible que ces dernières y participent de manière significative. Certains auteurs suggèrent que ces composés pourraient être les éléments clés à l'origine de l'activité de nombreuses spécialités traditionnelles (Liu et Henkel, 2002). Néanmoins, il semble plus prudent devant l'extrême complexité de la composition des extraits végétaux et des multiples interactions possibles entre les métabolites qui les composent, de se référer à des faits plutôt qu'à des intuitions, aussi rationnelles soient elles. Peut-être que les études futures pourront aborder cette problématique abyssale qui consisterait à évaluer le rôle spécifique des saponines dans les préparations médicinales traditionnelles.

Ces intérêts en médecine traditionnelle, couplés à l'ubiquité des saponines chez les plantes, ont contribué à populariser ces molécules dans la culture scientifique et académique. La littérature produite sur le sujet est aujourd'hui considérable avec pas moins de 139 000 résultats dans Google Scholar, 69 000 dans SciFinder et 22 000 dans PubMed pour l'entrée « *saponins* ». Les principaux domaines de recherches intéressés sont les sciences végétales et agronomiques, la pharmacie et la chimie, les biotechnologies et les sciences de l'environnement.

1.2.5 Les saponines des Sapindaceae

Ce paragraphe relate toutes les structures de saponines répertoriées dans la base de données SciFinder pour l'entrée « *saponins AND sapindaceae* ». Les études biologiques, les reviews et les doublons ont été éliminés afin de garder uniquement les publications traitant d'études phytochimiques des Sapindaceae (voir 3.2.3A.5 Références de la recherche bibliographique sur les saponines des Sapindaceae). Cette recherche met en évidence 39 articles publiés entre 1991 et 2020. Environ 160 saponines différentes ont été isolées dont 120 décrites comme nouvelles pendant cette période. 22 Sapindaceae appartenant à 16 genres différents ont été étudiées. Il est important de noter que l'outil SciFinder ne répertorie pas les études phytochimiques anciennes (antérieures à 1990). Pour une analyse approfondie des travaux antérieurs à cette date, il faudra se référer à l'excellente revue de Delaude intitulée « Les Sapindaceae et leurs saponines » (Delaude, 1993). On peut néanmoins considérer que la synthèse bibliographique présentée ci-dessous est assez représentative de toutes les saponines décrites entre 1991 et 2020 à partir des Sapindaceae.



Cette recherche met en évidence l'existence de 18 génines différentes dont la répartition entre les sous-familles est très inégale. En effet, les espèces de la sous-famille des Sapindoideae produisent presque exclusivement des saponines à hédéragénine ou acide oléanolique. Quelques

exceptions, caractérisées par la synthèse d'erythrodiol, de maniladiol, de 21-methoxy-3,21,23-epoxytirucalla-7,24-diene, d'acide bétulinique et de gypsogénine, principalement par les *Sapindus* spp., doivent être prises en compte. Les espèces de *Sapindus* sont de loin les plus étudiées de la famille et il est possible que la découverte de génines atypiques dans ce genre corresponde à un biais expérimental lié à la surreprésentation de ce dernier dans les études. Il est donc possible que des génines autres que l'acide oléanolique et l'hédéragénine soient discrètement distribuées au sein des Sapindoideae bien que ces deux dernières soient largement majoritaires.

La sous-famille des Dodonaeoideae, en revanche, concentre quasiment toute la diversité de la famille en matière de génines. Bien que celles-ci soient basées sur le motif oléanane des génines des Sapindoideae, les génines des Dodonaeoideae comportent une multitude de fonctions annexes dérivées de l'oxygène. Ainsi, il n'est pas rare de trouver dans cette sous-famille des génines comportant quatre, cinq et même six hydroxyles, auxquels s'ajoutent parfois des fonctions acides carboxyliques et cétones. Les génines les plus répandues sont donc le R₁-barrigénol, le barringtogénol C, la saniculagénine C et la protoaescigénine. D'autres, plus rares mais dépositaires de la grande diversité structurale au sein de la sous-famille, sont le A₁-barrigénol, la camélliagénine A, les acides zanhique et médicagénique et la 24-oxo-camélliagénine D.

Cette dualité de structures entre les génines des Sapindoideae et des Dodonaeoideae est bien décrite (Delaude, 1993 ; Voutquenne, 2001). En ce sens, on peut dire que la chimiotaxonomie et la taxonomie classique des Sapindaceae concordent. Les deux méthodes cladistiques s'accordent à séparer la famille en deux grands groupes (c.-à-d. en deux sous-familles) du fait de leurs différences macromorphologiques, génétiques et moléculaires. Il serait intéressant de voir auxquels de ces deux grands groupes se rapportent les Hippocastanoideae et Xanthoceroideae, les deux autres sous-familles des Sapindaceae. Les tableaux suivants offrent quelques éléments de réponse. En effet, les génines des Xanthoceroideae se rapprochent de celles des Dodonaeoideae tandis que celles des Hippocastanoideae semblent associées aux Sapindoideae.

— Saponines à A₁-barrigénol (2 saponines)

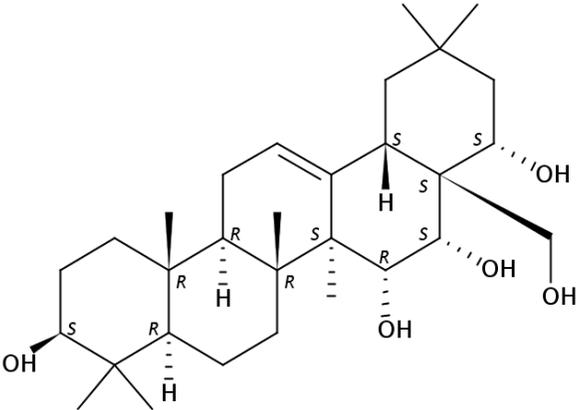
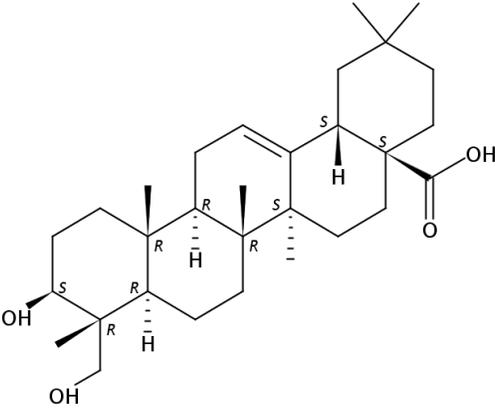
A ₁ -barrigénol					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
	22-O-(2-methylbutyryl)-	Glc-(1→2)- [Araf-(1→3)]- Glu-		<i>Harpullia pendula</i> (*Dodonaeoideae)	Nabil <i>et al.</i> , 2019
	22-O-(2-methylbutyryl)-	Gal-(1→2)- [Araf-(1→3)]- Glu-		<i>Harpullia pendula</i>	Nabil <i>et al.</i> , 2019

Tableau 3. Saponines à A₁-barrigénol.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à Hédéragénine (43 saponines)

Hédéragénine					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)

klaineanoside A		Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Chytranthus klaineanus</i> (Sapindoideae)	Biang <i>et al.</i> , 2020
klaineanoside B		Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Chytranthus klaineanus</i> (Sapindoideae)	Biang <i>et al.</i> , 2020
klaineanoside C		Xyl-(1→4)-Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Chytranthus klaineanus</i> (Sapindoideae)	Biang <i>et al.</i> , 2020
		Rha-(1→3)-[Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→3)-[Glc-(1→3)-Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→4)-[Rha-(1→2)]-Ara-	Glc-	<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→3)-Xyl-(1→4)-Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→3)-Ara-(1→4)-Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018

		Xyl-(1→4)-Ara-(1→4)-Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→4)-Rha-(1→3)-Ara-(1→4)-Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018
		Ara-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Eriocoelum microspermum</i> <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> <i>Sapindus mukorossi</i> <i>Smelophyllum capense</i> (Sapindoideae)	Pertuit <i>et al.</i> , 2018 Adesegun <i>et al.</i> , 2008 Hu <i>et al.</i> , 2018 Lavaud <i>et al.</i> , 1995
paniculatosoide A		Xyl-(1→3)-Rha-(1→3)-Xyl-	Rha-(1→6)-Glc-23-O-Glc-	<i>Koelreuteria paniculata</i> (Sapindoideae)	Mostafa <i>et al.</i> , 2016
		Araf-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Lecaniodiscus cupanioides</i> (Sapindoideae)	Adesegun <i>et al.</i> , 2008

		(4- <i>O</i> -acetyl-Xyl)- (1→3)-Rha-(1→2)- Ara-		<i>Sapindus saponaria</i> <i>Sapindus mukorossi</i> <i>Sapindus emarginatus</i> (Sapindoideae)	Tsuzuki <i>et al.</i> , 2007 Huang <i>et al.</i> , 2003 Hu <i>et al.</i> , 2018 Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001
		(3,4-di- <i>O</i> -acetyl-Xyl)- (1→3)-Rha- (1→2)-Ara-		<i>Sapindus saponaria</i> <i>Sapindus mukorossi</i> <i>Sapindus emarginatus</i> <i>Sapindus rarak</i> (Sapindoideae)	Tsuzuki <i>et al.</i> , 2007 Huang <i>et al.</i> , 2003 Hu <i>et al.</i> , 2018 Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Hamburger <i>et al.</i> , 1992
		(2,4-di- <i>O</i> -acetyl-Ara)- (1→3)-Glc- (1→3)-Rha-(1→2)- Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2003
		(3,4-di- <i>O</i> -acetyl-Ara)- (1→3)-Rha- (1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> <i>Sapindus rarak</i> (Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2003 Hamburger <i>et al.</i> , 1992
		(3- <i>O</i> -acetyl-Xyl)- (1→3)-Rha-(1→2)- Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2003

sapindoside B		Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> <i>Sapindus emarginatus</i> <i>Sapindus rarak</i> <i>Smelophyllum capense</i> (Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2003 Hu <i>et al.</i> , 2018 Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Hamburger <i>et al.</i> , 1992 Lavaud <i>et al.</i> , 1995
		Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> <i>Sapindus emarginatus</i> <i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2003 Hu <i>et al.</i> , 2018 Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
				<i>Sapindus emarginatus</i> <i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Hu <i>et al.</i> , 2018
		(2- <i>O</i> -acetyl-Xyl)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus emarginatus</i> (Sapindoideae)	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001

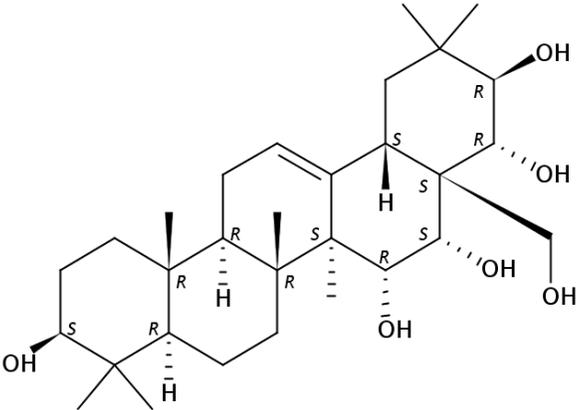
	23- <i>O</i> -acetyl-	(4- <i>O</i> -acetyl-Xyl)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus emarginatus</i> <i>Sapindus rarak</i> (Sapindoideae)	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Hamburger <i>et al.</i> , 1992
		Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Ara-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Rha-(1→2)-[Gal-(1→3)]-Glc-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Xyl-(1→3)-Ara-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
			Apif-(1-2)-Glc-	<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Araf-(1→3)-[Rha-(1→2)]-Xyl-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Apif-(1→3)-[Rha-(1→2)]-Glc-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
		Araf-(1→3)-[Rha-(1→2)]-Ara-		<i>Pometia eximia</i> (Sapindoideae)	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1998
α-hédérine		Rha-(1→2)-Ara-		<i>Smelophyllum capense</i> <i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Lavaud <i>et al.</i> , 1995 Hu <i>et al.</i> , 2018
		Rha-(1→2)-Ara-	Glc-	<i>Smelophyllum capense</i> (Sapindoideae)	Lavaud <i>et al.</i> , 1995
		(5- <i>O</i> -acetyl-Araf)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018
		(3- <i>O</i> -acetyl-Araf)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018

		(3,5-di- <i>O</i> -acetyl-Araf)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018
	23- <i>O</i> -acetyl-	Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018
diptéroside A	21- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-2-méthyl-1-oxo-2-buten-1-yl]-22- <i>O</i> -acetyl-	Ara-(1→4)-[Glc-(1→2)]-Glc-		<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017
billioside A	21- <i>O</i> -[(2 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-2,6-diméthyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoyl]-22- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→2)-[Ara-(1→4)]-Glc-		<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017
pulsatilla saponine D		Rha-(1→2)-[Glc-(1→4)]-Ara-		<i>Serjania marginata</i> (Sapindoideae)	Heredia-Vieira <i>et al.</i> , 2014
salzmannianoside B		Ara-(1→3)-Rha-(1→2)-[Glc-(1→4)]-Ara-		<i>Serjania marginata</i> (Sapindoideae)	Heredia-Vieira <i>et al.</i> , 2014
		Araf-(1→4)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Pometia pinnata</i> (Sapindoideae)	Mohammad <i>et al.</i> , 2012

Tableau 4. Saponines à Hédéragénine.

Les nombres en rouge dans la colonne « chaîne osidique en C-28 » désigne une position de liaison autre que le C-28 de la chaîne osidique.

— Saponines à R₁-barrigénol (13 saponines)

R ₁ -barrigénol					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
	21- <i>O</i> -epoxyangeloyl- 22- <i>O</i> -angeloyl-			<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	21- <i>O</i> -(2,3-dihydroxy-2-methylbutyryl)- 22- <i>O</i> -angeloyl-			<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	28- <i>O</i> -isobutyryl- 21- <i>O</i> -angeloyl-			<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	21- <i>O</i> -angeloyl-	(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-		<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	21- <i>O</i> -angeloyl- 22- <i>O</i> -isobutyryl-	(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-		<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-		<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020

	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-Gal-(1→2)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Li <i>et al.</i> , 2006
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-methylGlu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Guo <i>et al.</i> , 2009
dodoneaside A	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glu-		<i>Dodonaea viscosa</i> (Dodonaeeoideae)	Cao <i>et al.</i> , 2009
xanifolia-Y0	21- <i>O</i> -angeloyl-22- <i>O</i> -isobutyryl-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008
xanifolia-Y2	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-24-hydroxy-	Glc-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008
xanifolia-Y3	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008
xanifolia-Y7	21- <i>O</i> -angeloyl-28- <i>O</i> -(2-methylbutanoyl)-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008

Tableau 5. Saponines à R₁-barrigénol.

— Saponines à Camelliagénine A (2 saponines)

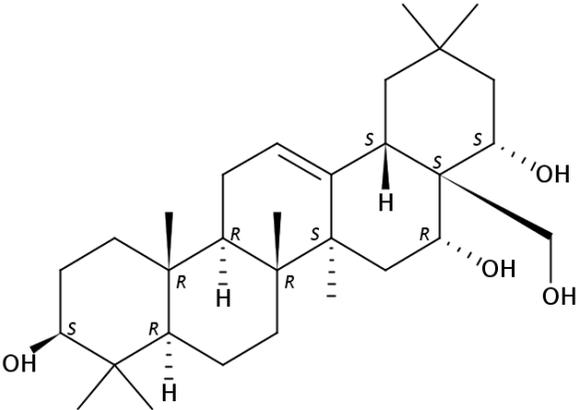
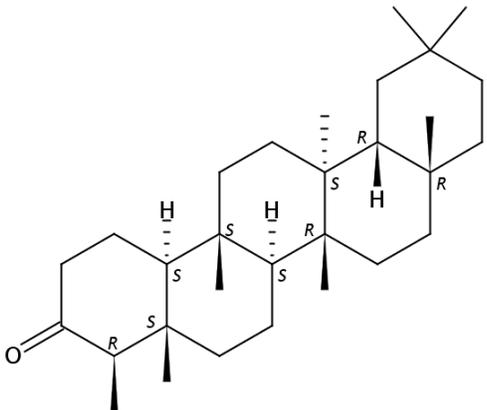
Camelliagénine A					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
paniculatoïde B	22-O-angeloyl-	Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-Glc-		<i>Koelreuteria paniculata</i> (*Sapindoideae)	Mostafa <i>et al.</i> , 2016
paniculatoïde C	22-O-angeloyl-	Rha-(1→2)-Glc-		<i>Koelreuteria paniculata</i>	Mostafa <i>et al.</i> , 2016

Tableau 6. Saponines à Camelliagénine A.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

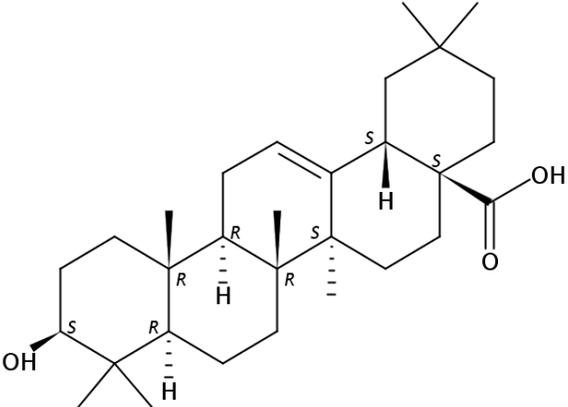
— Saponines à Friedéline (1 saponine)

Friedéline					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)

				<i>Paullinia pinnata</i> (Sapindoideae)	Lunga <i>et al.</i> , 2014
--	--	--	--	--	----------------------------

Tableau 7. Saponines à Friedéline.

— Saponines à Acide oléanolique (26 saponines)

Acide oléanolique					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
		(2'-acetamido-2'-deoxy-Glc)-		<i>Paullinia pinnata</i> (Sapindoideae)	Lunga <i>et al.</i> , 2014
		Glc-(1→3)-(2'-acetamido-2'-deoxy-Gal)-		<i>Paullinia pinnata</i> (Sapindoideae)	Lunga <i>et al.</i> , 2014
		Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus emarginatus</i> <i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001 Hu <i>et al.</i> , 2018
		(4-O-acetyl-Xyl)-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus emarginatus</i> (Sapindoideae)	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001

		Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991
		Rha-(1→2)-Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991
		Glc-(1→4)-Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991
		Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991
hederacolchiside A1		Rha-(1→2)-[Glc-(1→4)]-Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> <i>Serjania marginata</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991 Heredia-Vieira <i>et al.</i> , 2014
		Glc-(1→3)-Rha-(1→2)-[Glc-(1→4)]-Ara-		<i>Thinouia coriaceae</i> (Sapindoideae)	Schenkel <i>et al.</i> , 1991
		Araf-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018
		Ara-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018
billioside B	21,22-dihydroxy-	Gal-(1→2)-Glc-	Ara-(1→4)-Glc-	<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017
billioside C	21,22-dihydroxy-	Gal-(1→2)-[Ara-(1→4)]-Xyl-	Glc-	<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017

billioside D	21,22-dihydroxy-	Gal-(1→2)-[Ara-(1→4)]-Glc-	Glc-	<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017
billioside E	21,22-dihydroxy-	Gal-(1→2)-[Ara-(1→4)]-Glc-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Billia rosea</i> (Hippocastanoideae)	De Freitas <i>et al.</i> , 2017
		Ara-(1→3)-Rha-(1→2)-[Glc-(1→4)]-Ara-		<i>Serjania marginata</i> (Sapindoideae)	Heredia-Vieira <i>et al.</i> , 2014
pométine		Glc-(1→2)-Glc-(1→3)-Glc-		<i>Paullinia pinnata</i> (Sapindoideae)	Mohammad <i>et al.</i> , 2010
		Apif-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glc-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
		Apif-(1→3)-Ara-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glc-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
		Apif-(1→3)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glc-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
		Ara-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Ara-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
		Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Ara-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
		Apif-(1→3)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Ara-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003

acutoside A		Glc-(1→2)-Glc-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003
calenduloside C		Gal-(1→3)-[Glc- (1→2)]-Glc-		<i>Pometia ridleyi</i> (Sapindoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003

Tableau 8. Saponines à Acide oléanique.

— Saponines à Acide échinocystique (1 saponine)

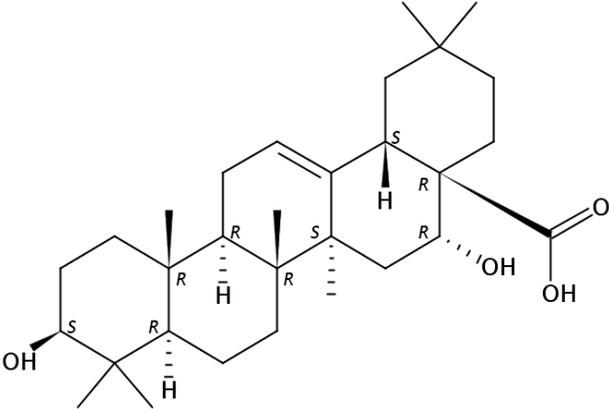
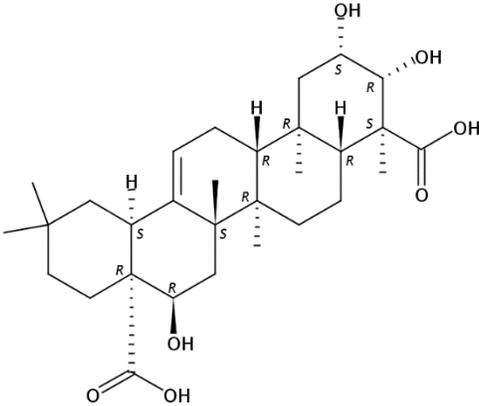
Acide échinocystique					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
	3,16-di hydroxy-	(2'-acetamido-2'-deoxy-Glc)-		<i>Paullinia pinnata</i> (Sapindoideae)	Lunga <i>et al.</i> , 2014

Tableau 9. Saponines à Acide échinocystique.

— Saponines à Acide zanhique (10 saponines)

Acide zanhique					
					

Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
zanhasaponine D		Glu-		<i>Zanha golungensis</i> (*Dodonaeoideae)	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
zanhasaponine E		(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-		<i>Zanha golungensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
zanhasaponine F		Glu-	Rha-(1→2)-(4- <i>O</i> -acetyl-Fuc)-	<i>Zanha golungensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
zanhasaponine G		Glu-	Rha-(1→2)-(4- <i>O</i> -3,3-dimethylacryloyl-Fuc)-	<i>Zanha golungensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
zanhasaponine H		Glu-	Rha-(1→2)-(4-di- <i>O</i> -[3-hydroxy-2-methylbutyroyloxy]-Fuc)-	<i>Zanha golungensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
		Glu-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-(4- <i>O</i> -acetyl-Fuc)-	<i>Zanha golungensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , 2015
		Glu-	Xyl-(1→3)-[Rha-(1→2)]-(4- <i>O</i> -acetyl-Fuc)-	<i>Ganophyllum giganteum</i>	Montes <i>et al.</i> , 2014
		Glc-	Xyl-(1→3)-[Rha-(1→2)]-(4- <i>O</i> -acetyl-Fuc)-	<i>Ganophyllum giganteum</i>	Montes <i>et al.</i> , 2014

			Xyl-(1→3)-[Rha-(1→2)]-(4-O-acetyl-Fuc)-	<i>Ganophyllum giganteum</i>	Montes <i>et al.</i> , 2014
			Rha-(1→2)-(4-di-O-[3-hydroxy-2-methylbutyroyloxy]-Fuc)-	<i>Ganophyllum giganteum</i>	Montes <i>et al.</i> , 2014

Tableau 10. Saponines à Acide zanhique.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à Acide médicagénique (1 saponine)

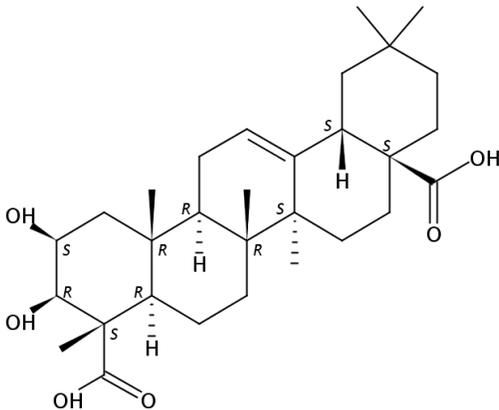
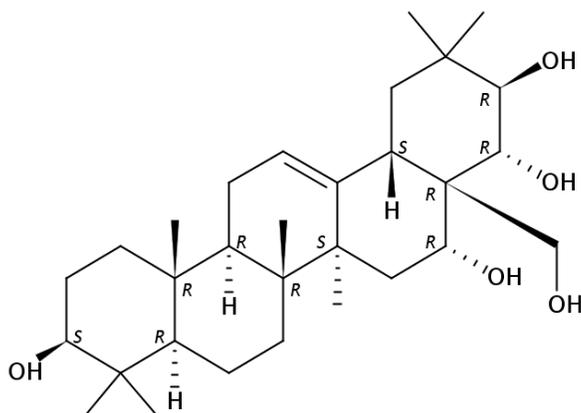
Acide médicagénique					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
			Rha-(1→2)-(4-di-O-[3-hydroxy-2-methylbutyroyloxy]-Fuc)-	<i>Ganophyllum giganteum</i> (Dodonaeoideae)	Montes <i>et al.</i> , 2014

Tableau 11. Saponines à Acide médicagénique.

— Saponines à Barringtogénol C (12 saponines)

Barringtogénol C



Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
bunkankasapnine F	22- <i>O</i> -acetyl-	Gal-(1→2)-Glu-	21- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -angeloyl-Fuc)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
	22- <i>O</i> -acetyl-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-methyl-Glu-	21- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -angeloyl-Rha)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Guo <i>et al.</i> , 2009
dodoneaside B	22-angeloyl-21-epoxyangeloyl-	Araf-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glu-		<i>Dodonaea viscosa</i> (Dodonaeoideae)	Cao <i>et al.</i> , 2009
xanifolia-Y10	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Gal-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008
	16- <i>O</i> -acetyl-		21- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -angeloyl-Rha)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Li <i>et al.</i> , 2007
paniculata saponin C	21-deoxy-28- <i>O</i> -isopentyryl-	Rha-(1→3)-Gal-(1→4)-Gal-		<i>Koelreuteria paniculata</i> (Sapindoideae)	Lei <i>et al.</i> , 2007

	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Gal-(1→2)-Glu-		<i>Harpullia austro-caledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Rha-(1→3)-[Gal-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austro-caledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-[Gal-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austro-caledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	*nommé Barrigénol C (= Barringtogénol C)		21- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -angeloyl-Fuc)-	<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	*nommé Barrigénol C (= Barringtogénol C) 28- <i>O</i> -acetyl-	Araf-(1→3)-[Gal-(1→2)]-(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-	21- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -angeloyl-Fuc)-	<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020
	*nommé Barrigénol C (= Barringtogénol C)	(6- <i>O</i> -methyl-Glu)-	21- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -angeloyl-Fuc)-	<i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Xanthoceroideae)	Chen <i>et al.</i> , 2020

Tableau 12. Saponines à Barringtogénol C.

Les nombres en rouge dans la colonne « chaîne osidique en C-28 » désigne une position de liaison autre que le C-28 de la chaîne osidique.

— Saponines à Gypsogénine (1 saponine)

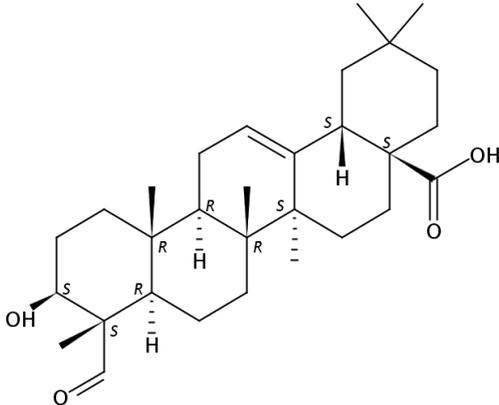
Gypsogénine					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
		Ara-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018

Tableau 13. Saponines à Gypsogénine.

— Saponines à Acide bétulinique (1 saponine)

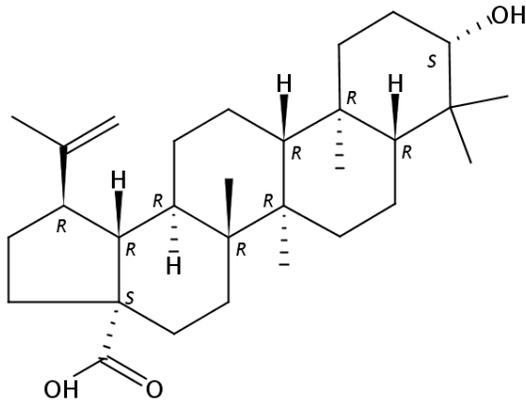
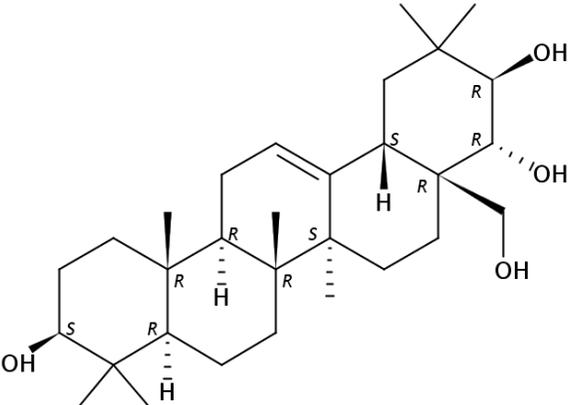
Acide bétulinique					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
		Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara-		<i>Sapindus mukorossi</i> (Sapindoideae)	Hu <i>et al.</i> , 2018

Tableau 14. Saponines à Acide bétulinique.

— Saponines à Saniculagénine C (23 saponines)

Saniculagénine C					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
sorbifoliaside G		Glc-(1→6)-Glc-	Rha-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (*Xanthoeroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside H		Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-4- <i>O</i> -acetyl-Glc)-	Rha-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside I		Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside J	16-oxo-	Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-4- <i>O</i> -acetyl-Glc)-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside K	15-en-	Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside A		Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012

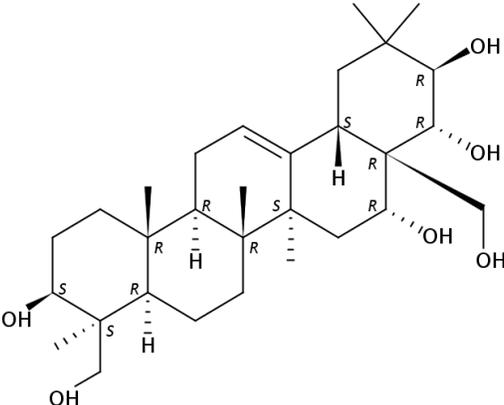
sorbifoliaside B	16-oxo-	Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside C	16-oxo-	Glc-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside D		Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-Glc)-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside E	16-oxo-	Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-Glc)-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside F		Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-4- <i>O</i> -acetyl-Glc)-	Glc-(1→2)-Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
sorbifoliaside		Glc-(1→6)-(2- <i>O</i> -angeloyl-Glc)-	Rha-(1→2)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Fu <i>et al.</i> , 2010
	*nommé 16-Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)	Glc-	Rha-(1→2)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2008
	*nommé 16-Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)	Glc-(1→6)-(3- <i>O</i> -angeloyl-Glc)-	Rha-(1→2)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2008
	*nommé 16-Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)			<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2008

xanthohuskiside s A	*nommé 16- Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)	Glc-(1→6)- [Glc(1→2)]-Glc-	Glc-(1→6)- [Rha-(1→2)]- Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
xanthohuskiside s B	*nommé 16- Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)	Glc-(1→6)-[Glc- (1→2)]-Glc-	Glc-(1→6)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
		Glc-(1→6)-(2- <i>O</i> - angeloyl-Glc)-	Rha-(1→2)- [Glc-(1→6)]- Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Cui <i>et al.</i> , 2012
		Glc-	Glc-(1→2)-Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Cui <i>et al.</i> , 2012
		Glc-	Rha-(1→2)- Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Cui <i>et al.</i> , 2012
xanifolia O54		Glc-(1→6)-Glc-	Glc-(1→6)- [Rha-(1→2)]- Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
	*nommé 16- Deoxybarringt ogénol C (= Saniculagénine C)		Glc	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
21β- <i>O</i> -acetyl- xanthohuskiside s A	21- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→6)- [Glc(1→2)]-Glc-	Glc-(1→6)- [Rha-(1→2)]- Glc-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Wang <i>et al.</i> , 2018

Tableau 15. Saponines à Saniculagénine C.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à Protoaescigénine (13 saponines)

Protoaescigénine					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
bunkankasaponine A	22- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→2)-Glu-	21- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetyl-6-deoxy-3- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-2-methyl-1-oxo-2-buten-1-yl]-Gal)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
bunkankasaponine B	22- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→2)-Glu-	21- <i>O</i> -(6-deoxy-3,4-di- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-2-methyl-1-oxo-2-buten-1-yl]-Gal)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
bunkankasaponine C	28- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→2)-Glu-	21- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetyl-6-deoxy-3- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-2-methyl-1-oxo-2-buten-1-yl]-Gal)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
bunkankasaponine D	28- <i>O</i> -acetyl-	Glc-(1→2)-Glu-	21- <i>O</i> -(6-deoxy-3,4-di- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-2-methyl-1-oxo-2-buten-1-yl]-Gal)-	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Yu <i>et al.</i> , 2012
xanifolia-Y8	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Glc-(1→2)-Araf-(1→3)-Glu-		<i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Xanthoceroideae)	Chan <i>et al.</i> , 2008

	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→2)-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-[Araf-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-[Xyl-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Araf-(1→3)-[Glc-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Xyl-(1→2)-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
harpuloside	21,22-di- <i>O</i> -angeloyl-	Rha-(1→3)-[Xyl-(1→2)]-Glu-		<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2005
			Glc-(1→2)-Glc-24- <i>O</i> -Rha-(1→2)-Glc-	<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2002
	16-deoxy-		Glc-(1→2)-Glc-24- <i>O</i> -Rha-(1→2)-Glc-	<i>Harpullia austrocaledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2002

Tableau 16. Saponines à Protoaescigénine.

Les nombres en rouge dans la colonne « chaîne osidique en C-28 » désigne une position de liaison autre que le C-28 de la chaîne osidique.

— Saponines à 1-methoxy-3,21,23-epoxytirucalla-7,24-diene (5 saponines)

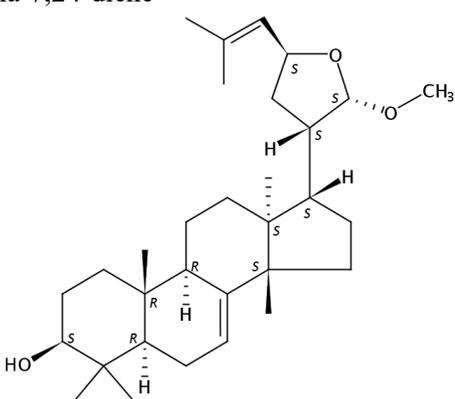
1-methoxy-3,21,23-epoxytirucalla-7,24-diene					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
sapinmusaponin F	21 β	Rha-(1 \rightarrow 6)-Glc-		<i>Sapindus mukorossi</i> (*Sapindoideae)	Huang <i>et al.</i> , 2006
sapinmusaponin G	21 α	Rha-(1 \rightarrow 6)-Glc-		<i>Sapindus mukorossi</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006
sapinmusaponin H		Rha-(1 \rightarrow 2)-Glc-		<i>Sapindus mukorossi</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006
sapinmusaponin I	21 β	diRha-(1 \rightarrow 2,6)-Glc-		<i>Sapindus mukorossi</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006
sapinmusaponin J	21 α	diRha-(1 \rightarrow 2,6)-Glc-		<i>Sapindus mukorossi</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006

Tableau 17. Saponines à 1-methoxy-3,21,23-epoxytirucalla-7,24-diene.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à Erythrodiol (4 saponines)

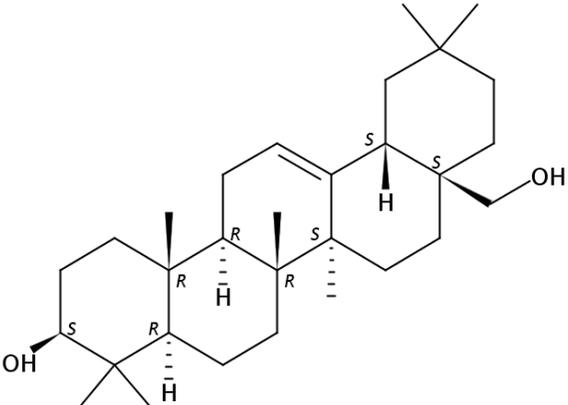
Erythrodiol					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
nephelioside I		Ara-(1→3)-Glc-(1→2)-Xyl-		<i>Nephelium maingayi</i> (Sapindoideae*)	Ito <i>et al.</i> , 2004
nephelioside II		Ara-(1→3)-Glc-(1→2)-Glc-		<i>Nephelium maingayi</i>	Ito <i>et al.</i> , 2004
nephelioside III		(6- <i>O</i> -acetyl-Glc)-(1→3)-Xyl-		<i>Nephelium maingayi</i>	Ito <i>et al.</i> , 2004
nephelioside IV	7-methoxy-	Ara-(1→3)-Glc-(1→2)-Glc-		<i>Nephelium maingayi</i>	Ito <i>et al.</i> , 2004

Tableau 18. Saponines à Erythrodiol.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à Maniladiol (2 saponines)

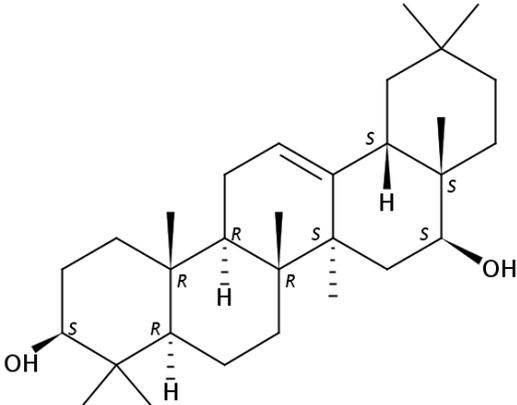
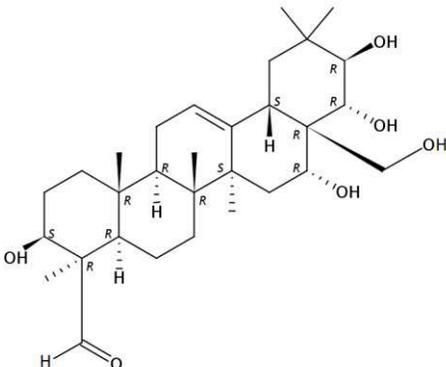
Maniladiol					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)
nephelioside V		Ara-(1→3)-Glc-(1→2)-Xyl-		<i>Nephelium maingayi</i> (Sapindoideae*)	Ito <i>et al.</i> , 2004
nephelioside VI		Ara-(1→3)-Glc-(1→2)-Glc-		<i>Nephelium maingayi</i>	Ito <i>et al.</i> , 2004

Tableau 19. Saponines à Maniladiol.

*, sous-famille valable pour l'ensemble des espèces du tableau.

— Saponines à 24-oxo-camelliagénine D (1 saponine)

24-oxo-camelliagénine D					
					
Nom	Variations de la génine	Chaîne osidique en C-3	Chaîne osidique en C-28	Plante(s) (sous-famille)	Référence(s)

			Glc-(1→2)-Glc- 24-O-Rha-(1→2)-Glc-	<i>Harpullia austro-caledonica</i> (Dodonaeoideae)	Voutquenne <i>et al.</i> , 2002
--	--	--	---------------------------------------	---	---------------------------------

Tableau 20. Saponines à 24-oxo-camelliagénine D.

Les nombres en rouge dans la colonne « chaîne osidique en C-28 » désignent une position de liaison autre que le C-28 de la chaîne osidique.

1.2.6 Les saponines du genre *Blighia*

Les études phytochimiques sur le genre *Blighia* sont nombreuses. Celles-ci sont très largement orientées sur l'étude de *Blighia sapida* (Sinmisola *et al.*, 2019). Les espèces *Blighia unijugata* et *Blighia welwitschii* n'ont reçu que peu d'intérêt jusqu'à présent. On dénombre sept saponines et dérivés pour *Blighia sapida*, trois pour *Blighia unijugata* et deux pour *Blighia welwitschii*.

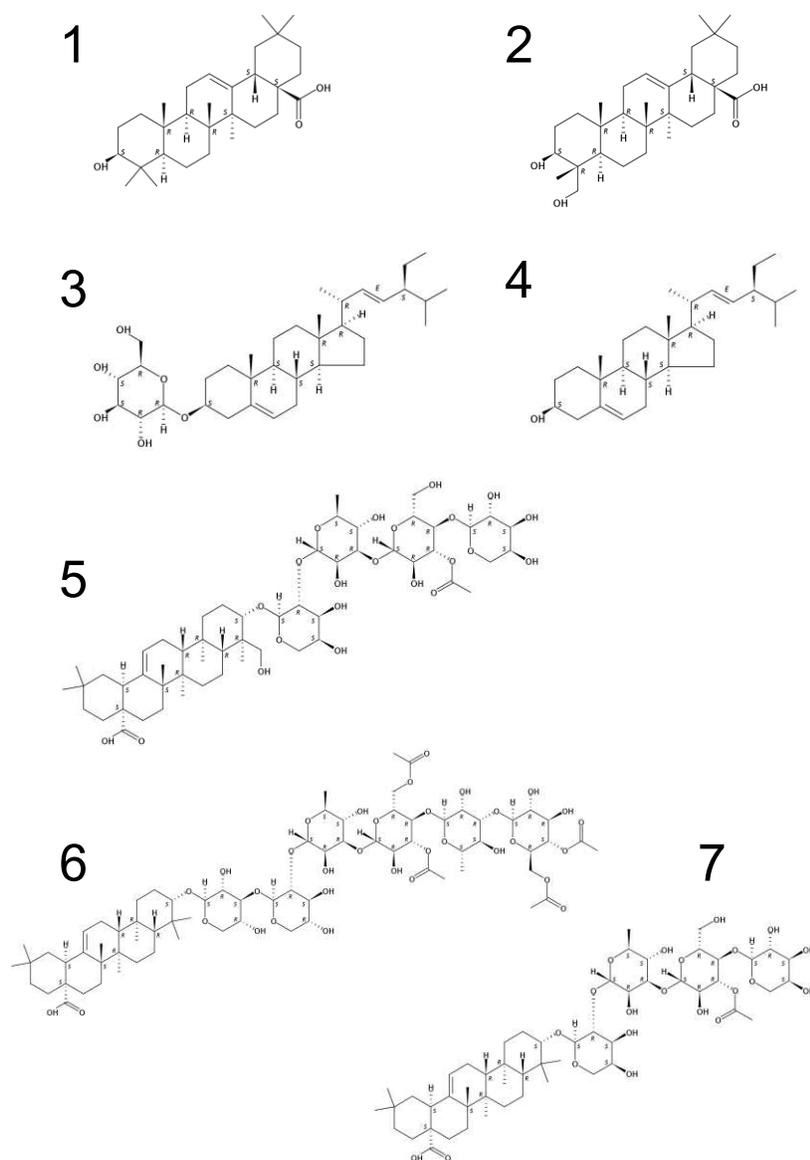


Figure 16. Composés triterpéniques ou stéroïdiques précédemment isolés de *Blighia sapida*.

1. Acide oléanolique (Grag et Mitra, 1967) ; 2. Hédéragénine (Sinmisola *et al.*, 2019) ; 3. 3-O- β -D-glucopyranosylstigmastérol (Sinmisola *et al.*, 2019) ; 4. Stigmastérol (Grag et Mitra, 1967) ; 5. blighoside A ; 6. blighoside C ; 7. blighoside B (Mazzola *et al.*, 2011). Structures issues de CAS SciFinder.

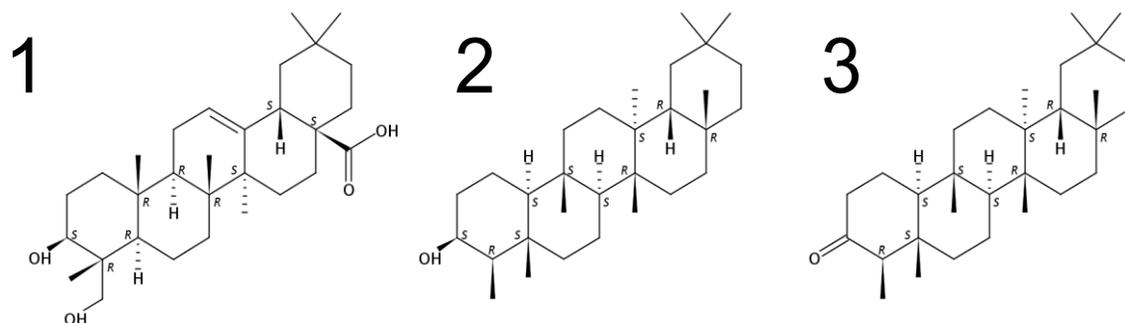


Figure 17. Composés triterpéniques ou stéroïdiques précédemment isolés de *Blighia unijugata*. 1. Héderagénine (Delaude et Welter, 1975) ; 2. Epifriedélinol (Ongarora *et al.*, 2009) ; 3. Friedéline (Ongarora *et al.*, 2009). Structures issues de CAS SciFinder.

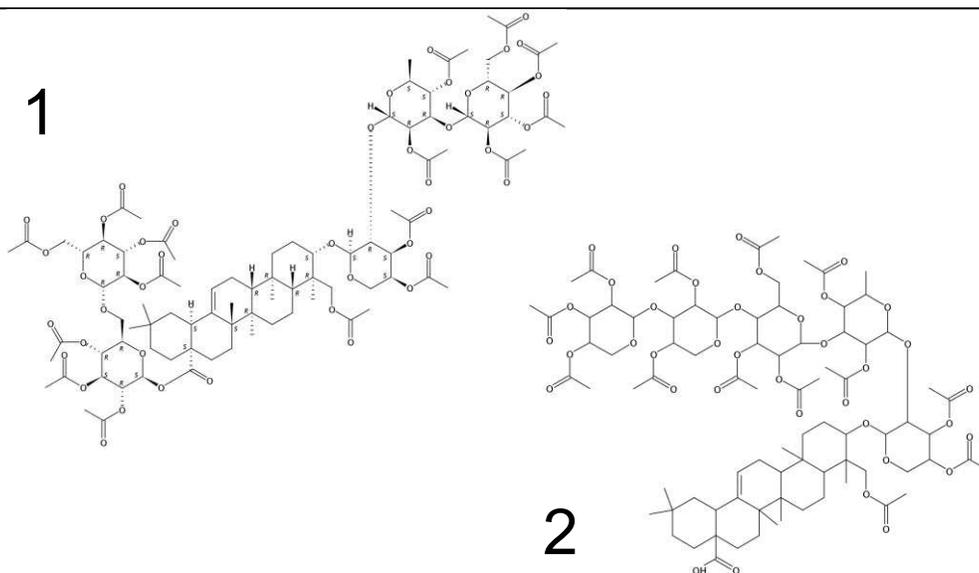


Figure 18. Composés triterpéniques ou stéroïdiques précédemment isolés de *Blighia welwitschii*. 1. 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhéderagénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (Penders et Delaude, 1994) ; 2. 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhéderagénine (Penders *et al.*, 1989). Les deux saponines ont été isolées sous forme d'artefacts acétylés. Structures issues de CAS SciFinder.

1.2.7 Les saponines du genre *Chytranthus*

Les bases de données scientifiques recensent cinq publications relatant des investigations phytochimiques sur *Chytranthus macrobotrys* et *Chytranthus klaineanus* (Delaude *et al.*, 1976 ; Gojayev *et al.*, 2013 ; Faleye *et al.*, 2019 ; Biang *et al.*, 2020). Celles-ci apprécient la composition des différentes parties du végétal, surtout l'écorce et les graines, en métabolites spécialisés. Deux d'entre elles fournissent des structures complètes de saponines et leurs dérivés à partir de l'espèce *Chytranthus klaineanus*.

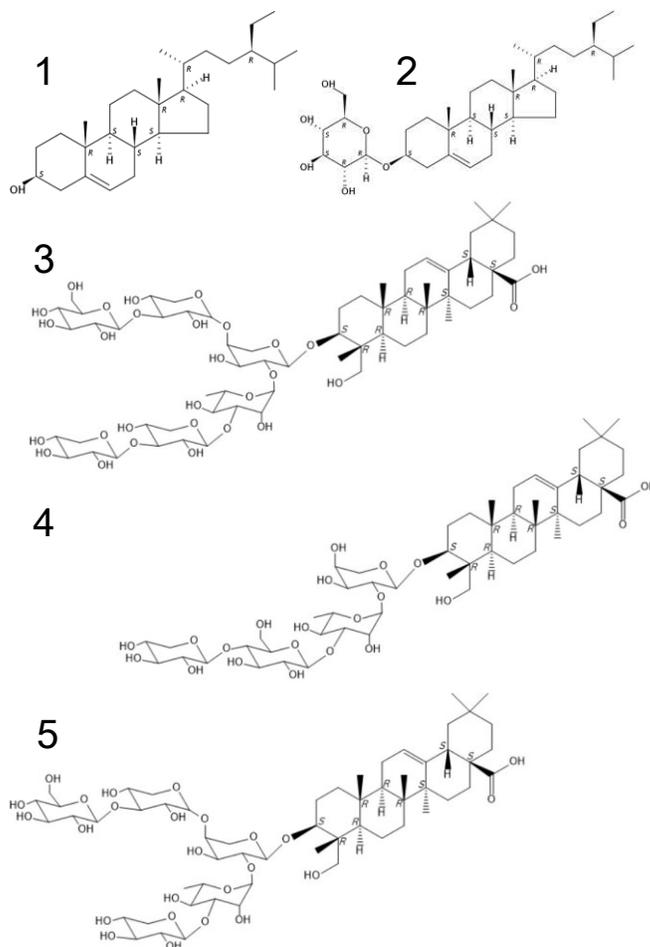


Figure 19. Composés triterpéniques ou stéroïdiques précédemment isolés de *Chytranthus klaineanus*.

1. β -sitostérol ; 2. 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol (Gojayev *et al.*, 2013) ; 3. klaineanoside A ; 4. klaineanoside B ; 5. klaineanoside C (Biang *et al.*, 2020). Structures issues de CAS SciFinder.

1.2.8 Les saponines du genre *Radlkofera*

A l'instar du manque de données bibliographiques sur l'espèce *Radlkofera calodendron*, les études phytochimiques à son sujet sont quasi-inexistantes. Une seule référence datant de 1974 est disponible. Celle-ci relate l'isolement d'une saponine isolée à partir de l'écorce des racines de la plante. Les techniques d'isolement et de détermination structurale des saponines étant relativement limitées à cette période, la structure complète n'a pu être déterminée. L'auteur fournit néanmoins quelques informations importantes : la génine est de l'hédéragénine et les sucres sont du glucose, du xylose, de l'arabinose et du rhamnose (Delaude, 1974).

Chapitre 1.3 Travaux biologiques antérieurs : Les saponines dans la reconnaissance d'anticorps dans la sclérose en plaques

1.3.0 Présentation du chapitre

Ce chapitre aborde le premier projet d'études biologiques entrepris au cours de ce travail de thèse. Celui-ci traite d'une thématique de santé humaine : la reconnaissance d'anticorps dans la sclérose en plaques (SEP). L'utilisation de saponines dans ce registre est récente et novatrice. Nous verrons comment est née l'idée de les utiliser ainsi et comment elles se positionnent par rapport aux autres classes de composés testés dans ce domaine. Afin de replacer le contexte, les prochaines sections présenteront la SEP et le rôle des anticorps dans cette pathologie.

1.3.1 Généralités sur la sclérose en plaques

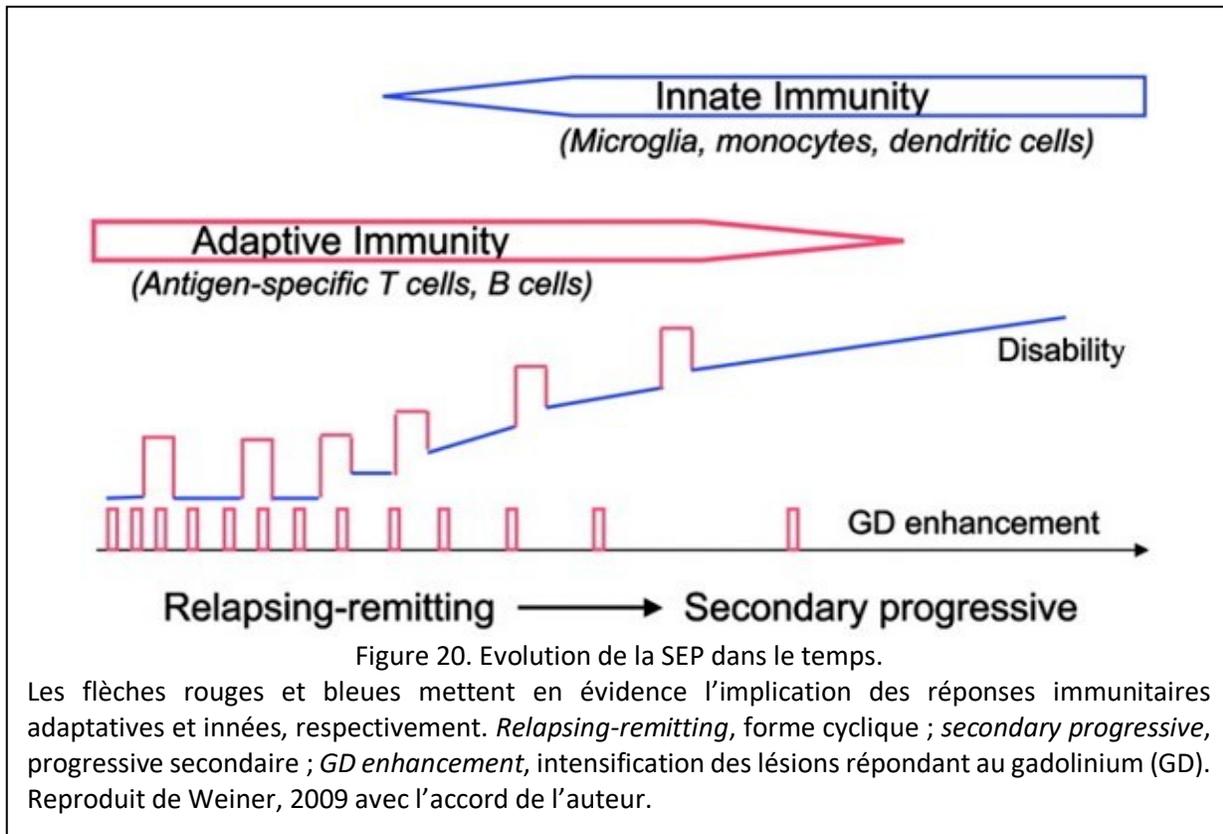
La SEP est une affection acquise et chronique du système nerveux central (SNC) impliquant des composantes inflammatoires et immunitaires. Sur le plan physiopathologique, la maladie est caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires dans le SNC, entraînant rapidement une inflammation locale. Avec le temps, l'inflammation s'installe et s'autoentretient ce qui conduit à l'apparition de dommages structuraux au niveau des cellules du SNC. La gaine de myéline entourant les axones des neurones est la plus touchée. Sa dégradation provoque des lésions multiples et localisées bien visibles en imagerie : les plaques. A terme, les axones sont eux-mêmes touchés, entraînant une dégénérescence neuronale pouvant conduire à un handicap sévère (Karussis, 2014 ; Salou *et al.*, 2013). Cette maladie est considérée comme une des premières causes de handicap des jeunes adultes dans le monde (Garg et Smith, 2015 ; Karussis, 2014).

L'épidémiologie de la SEP est hétérogène, aussi bien dans les populations touchées que leur répartition géographique. Les études s'accordent sur le fait que les jeunes femmes âgées de 20 à 40 ans sont les plus touchées. Le sex-ratio femmes/hommes est de 2,6/1 en France (Salou *et al.*, 2013). La prévalence est variable en fonction des aires géographiques mais celle-ci est généralement fixée à 1/1000 dans les pays industrialisés de l'hémisphère nord (Garg et Smith, 2015). La variation de la prévalence, comprise entre 0,1/1000 et 2,5/1000, suggère une distribution

très hétérogène de la maladie à travers le monde. Les populations de l'hémisphère nord et notamment celles présentant des origines scandinaves ou d'Europe du nord semblent être particulièrement disposées à la contracter (Salou *et al.*, 2013 ; Garg et Smith, 2015). Ces caractéristiques épidémiologiques laissent entrevoir des facteurs de risques génétiques et environnementaux dont il sera question plus tard. Une recrudescence des cas serait à prévoir dans le futur (Garg et Smith, 2015).

Les symptômes sont variables et hétérogènes. Ils impliquent une dégradation progressive des capacités motrices, sensorielles, visuelles et cognitives. Ceux-ci peuvent être associés à de la fatigue, une spasticité, un dysfonctionnement de la vessie, une faiblesse musculaire, une paresthésie et des douleurs. Les symptômes sont généralement considérés comme très handicapant, aussi bien sur le plan social que professionnel (Salou *et al.*, 2013 ; Garg et Smith, 2015). Cela est d'autant plus accentué qu'ils touchent les jeunes adultes pendant une période particulièrement productive de la vie (Alexander *et al.*, 2011).

Que ce soit en matière de physiopathologie, d'épidémiologie ou de symptomatologie, la SEP est en tout point une maladie obscure et hétérogène. Celle-ci est d'ailleurs caractérisée par quatre schémas immuno-pathologiques distincts dont on ne sait pas s'ils sont différentes pathologies ou bien des expressions multiples de la même maladie (Garg et Smith, 2015). A cela s'ajoute la variabilité de la pathologie dans le temps. Plusieurs formes évolutives ont en effet été définies. Au diagnostic, l'affection est caractérisée de « progressive primaire » ou de « progressive secondaire ». La forme progressive primaire, touchant environ 15 % des patients diagnostiqués, est de mauvais pronostic car elle est associée à une évolution défavorable et rapide de la maladie. La forme progressive secondaire, affectant 85 % des patients au diagnostic, est associée à une évolution chronique, plus ou moins longue de la maladie. Une forme cyclique de la SEP s'installe alors, caractérisée par des poussées suivies de phases de récupération. Cette période dure en moyenne quinze ans puis devient progressive dans 60 à 80 % des cas (d'où l'appellation « progressive secondaire » par opposition à « progressive primaire », la forme agressive de la maladie). L'évolution peut aussi stagner, et ainsi demeurer cyclique tout au long de la vie, dans 40 à 20 % des cas (Salou *et al.*, 2013).



L'origine de la SEP est indéterminée à ce jour mais on sait qu'elle est multifactorielle. De manière unanime, la littérature s'accorde sur l'existence de facteurs génétiques et environnementaux (Salou *et al.*, 2013 ; Karussis, 2014 ; Garg et Smith, 2015 ; Planas *et al.*, 2018). Les hypothèses les plus sérieuses mentionnent une origine infectieuse, vasculaire, environnementale et génétique. Une très grande majorité de spécialistes s'accordent sur le caractère auto-immun de la SEP. Cette conception partagée de ce qu'est la maladie est basée sur l'apport des modèles animaux, des études mécanistiques diverses et sur le fait que la maladie réponde favorablement à l'immunothérapie (Salou *et al.*, 2013 ; Planas *et al.*, 2018). Le rôle majeur du système immunitaire ainsi que la rupture de la tolérance du soi sont donc deux notions fortement associées à la SEP (Grag et Smith, 2015).

D'un point de vue mécanistique, les composantes du système immunitaire initialement impliquées dans la SEP sont issues de l'immunité adaptative, principalement les lymphocytes T (LT). Le rôle des lymphocytes B (LB) et des anticorps a longtemps été relayé au second plan. Néanmoins, ces derniers sont aujourd'hui considérés comme des acteurs émergents, notamment

pour les enjeux diagnostiques de la pathologie qui seront traités dans le prochain paragraphe. Les LT CD4+ et leurs formes différenciées, Th1 et Th17, sont considérés comme les acteurs majeurs. Ces derniers pourraient être à l'origine de l'initiation de l'inflammation dans le CNS après avoir été activés en périphérie puis avoir traversés la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une fois à l'intérieur du CNS, ces cellules seraient également responsables des premières étapes de propagation de l'inflammation par la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires ainsi que de monoxyde d'azote. Ces messagers chimiques contribueraient alors au recrutement d'autres cellules immunitaires, amplifiant la réponse inflammatoire naissante. Dans le recrutement généralisé de cellules immunitaires, il se produirait un événement important dont le caractère pourrait expliquer la nature chronique de la SEP : l'activation de l'immunité humorale par l'immunité adaptative. Les composantes alors impliquées dans la pathogénèse ne seraient plus retraits aux LT mais s'étendraient aux anticorps, au complément, aux macrophages et aux cellules immunes locales du CNS telles que les microglies. L'inflammation, qui au départ était spécifique, devient par le biais d'une cascade auto-immune, non-spécifique, locale et autoentretenu ce qui contribuerait au caractère chronique de la maladie. Les macrophages, les anticorps et les LT CD8+ participeraient à la destruction de la gaine de myéline. L'action des cellules immunitaires et des messagers chimiques de l'inflammation, dont certains sont pro-apoptotiques pour les cellules du CNS, entraînerait *in fine* des dommages axonaux irréversibles (Weiss *et al.*, 2009 ; Salou *et al.*, 2013 ; Garg et Smith, 2015 ; Planas *et al.*, 2018). L'ensemble de ces mécanismes constituent une explication rationnelle à la dégénérescence du SNC, l'apparition de plaques démyélinisées en imagerie et les symptômes neurologiques observés dans la SEP.

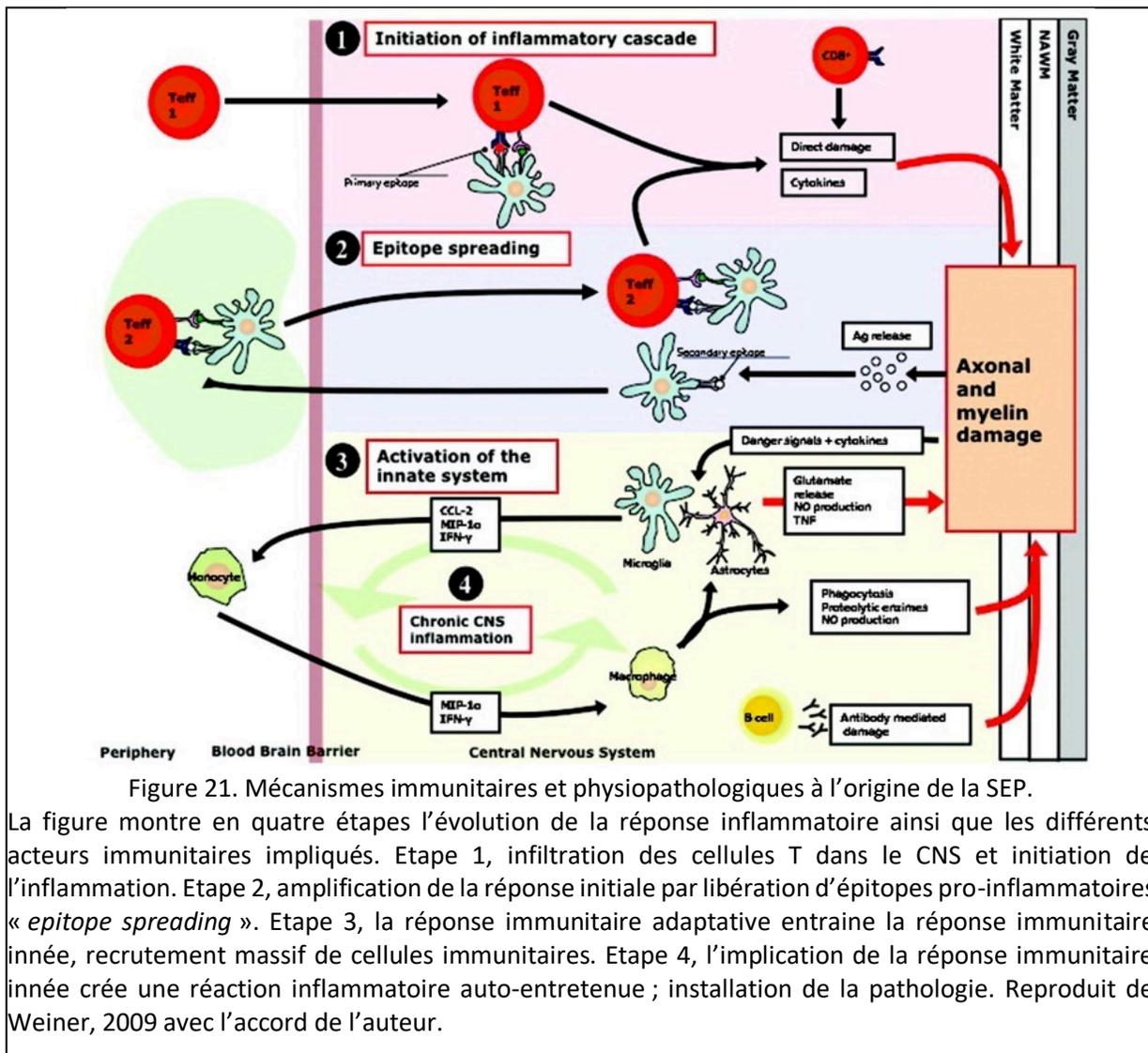


Figure 21. Mécanismes immunitaires et physiopathologiques à l'origine de la SEP.

La figure montre en quatre étapes l'évolution de la réponse inflammatoire ainsi que les différents acteurs immunitaires impliqués. Etape 1, infiltration des cellules T dans le CNS et initiation de l'inflammation. Etape 2, amplification de la réponse initiale par libération d'épitopes pro-inflammatoires « *epitope spreading* ». Etape 3, la réponse immunitaire adaptative entraîne la réponse immunitaire innée, recrutement massif de cellules immunitaires. Etape 4, l'implication de la réponse immunitaire innée crée une réaction inflammatoire auto-entretenue ; installation de la pathologie. Reproduit de Weiner, 2009 avec l'accord de l'auteur.

1.3.2 Rôles des anticorps et enjeux diagnostiques

Le rôle des LB et des anticorps dans la SEP a longtemps été sous-estimé. Ces derniers sont aujourd'hui considérés comme des acteurs émergent sur la base de différents arguments physiopathologiques. En effet, les LB font partie de l'infiltrat de cellules immunitaires retrouvés dans le SNC des patients atteints (Garg et Smith, 2015). Ceux-ci sont présents au niveau des lésions actives et pourraient être impliqués dans les phénomènes de démyélinisation. Leur présence est aussi corrélée à celle d'une autre population de cellule, les cellules dendritiques folliculaires, dont le rôle est de présenter des antigènes aux LB afin de les activer. La présence de ce type de cellules

dans le SNC est associée à des dommages tissulaires importants et à des formes progressives et sévères de la maladie (Salou *et al.*, 2013 ; Garg et Smith, 2015). Des études *in vitro* ont montré que des anticorps monoclonaux anti-MOG sont capables de se fixer à des oligodendrocytes vivants et d'en altérer sévèrement la fonction et la morphologie (Marta *et al.*, 2005). Ensemble, ces éléments suggèrent que les LB et leurs dérivés pourraient jouer un rôle majeur dans la pathogénèse de la SEP.

La présence de LB n'est pas restreinte au SNC puisque ceux-ci ont également été détectés dans le liquide céphalorachidien (LCR) où leur nombre concorde avec la quantité d'anticorps circulant dans ce compartiment (Karussis, 2014). La présence d'anticorps oligoclonaux dans le LCR est présente chez 90 à 95 % des patients atteints de SEP (Karussis, 2014 ; Salou *et al.*, 2013). Cette caractéristique est parfois intégrée comme une preuve clinique de haute valeur diagnostique dans les critères de McDonald. Ces critères constituent un ensemble de règles misent au point pour organiser et standardiser le diagnostic de la SEP. Ces règles sont basées sur le principe de dissémination spatiale et temporelle des attaques et des indices cliniques objectifs, ces derniers reposant sur des données d'imagerie et d'analyse du LCR (Karussis, 2014 ; Garg et Smith, 2015). En plus de leur rôle putatif dans la pathogénèse, les anticorps pourraient donc avoir un rôle majeur à jouer dans le diagnostic et la prise en charge de la maladie. Ceux présents dans le LCR, principalement des IgG, sont des indicateurs d'évolution de la maladie dont la fiabilité est avérée (Karussis, 2014).

Parmi les inconvénients des techniques de diagnostics actuelles basées sur l'imagerie et l'analyse du LCR, on trouve le coût, la technicité ou encore le caractère intrusif du prélèvement et des injections. La technique d'imagerie utilisée dans le diagnostic de la SEP est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dont le coût et le haut niveau de technicité peuvent être contraignant pour les établissements de santé publiques ou privés. De plus, les critères de McDonald requièrent l'injection de gadolinium comme agent de contraste en IRM (Weiss *et al.*, 2009). Ce produit permet certes d'obtenir une image assurant une évaluation sans ambiguïté du CNS, mais il est controversé pour des raisons de toxicité et d'accumulation dans l'organisme (Gale *et al.*, 2015). L'analyse du LCR, enfin, nécessite un prélèvement par ponction lombaire, une pratique pouvant être perçue comme intrusive et douloureuse par les patients.

Le fait que le siège de la SEP soit le CNS et moindrement, le système nerveux périphérique, rend toute opération de diagnostic et de suivi compliqué. S'ajoute à cela la nature « rétroactive »

des tests diagnostiques, c.-à-d. que ces derniers rendent compte d'un état physiopathologique apparu dans le passé. Le développement de tests prédictifs, autorisant la détection de la maladie au stade le plus précoce possible permettrait probablement d'augmenter les chances des patients (DeMarshall *et al.*, 2017). L'identification de biomarqueurs immunologiques dans le sang périphérique représente donc un enjeu majeur dans la SEP. Les anticorps ciblant les antigènes de surface de la myéline sont naturellement au premier plan de ces approches (Karussis, 2014 ; DeMarshall *et al.*, 2017). Néanmoins, la détection de ces anticorps dans les sérums de patients requiert d'en connaître précisément les antigènes qui y sont associés. Cette « recherche des autoantigènes » a depuis toujours animé la recherche sur la SEP, et pour cause : leur identification précise permettrait de mieux comprendre la pathologie, d'améliorer son diagnostic et sa prise en charge et de développer de nouvelles immunothérapies antigènes-spécifiques (Planas *et al.*, 2018). Un aspect expérimental de cette recherche des autoantigènes est l'approche chimique inverse, qui sera présentée au prochain paragraphe.

1.3.3 Recherche de(s) autoantigène(s) : l'approche chimique inverse

L'approche chimique inverse consiste à utiliser des composés comme sondes antigéniques afin de reconnaître des anticorps dans les fluides de patients. Cette approche a surtout été conçue pour la recherche sur les maladies auto-immunes. En effet, les anticorps jouent un rôle important dans ces pathologies et sont considérés comme des candidats biomarqueurs dont l'identification est cruciale (Papini, 2009). Dans le cas de la SEP, l'approche chimique inverse a été initiée vers le début des années 2000 et a connue différentes phases dans lesquelles différents types d'antigènes ont été testés. Au moment de leur emploi en approche chimique inverse, la nature de ces antigènes était en accord avec les hypothèses dominantes concernant la pathogénèse de la SEP. Ces derniers peuvent être divisés en trois types : (i) les antigènes dérivés de la myéline, (ii) les antigènes synthétiques glycosylés et (iii) les antigènes mimétiques. Ces différentes classes d'antigènes ainsi que leurs principaux représentants seront présentés ci-après.

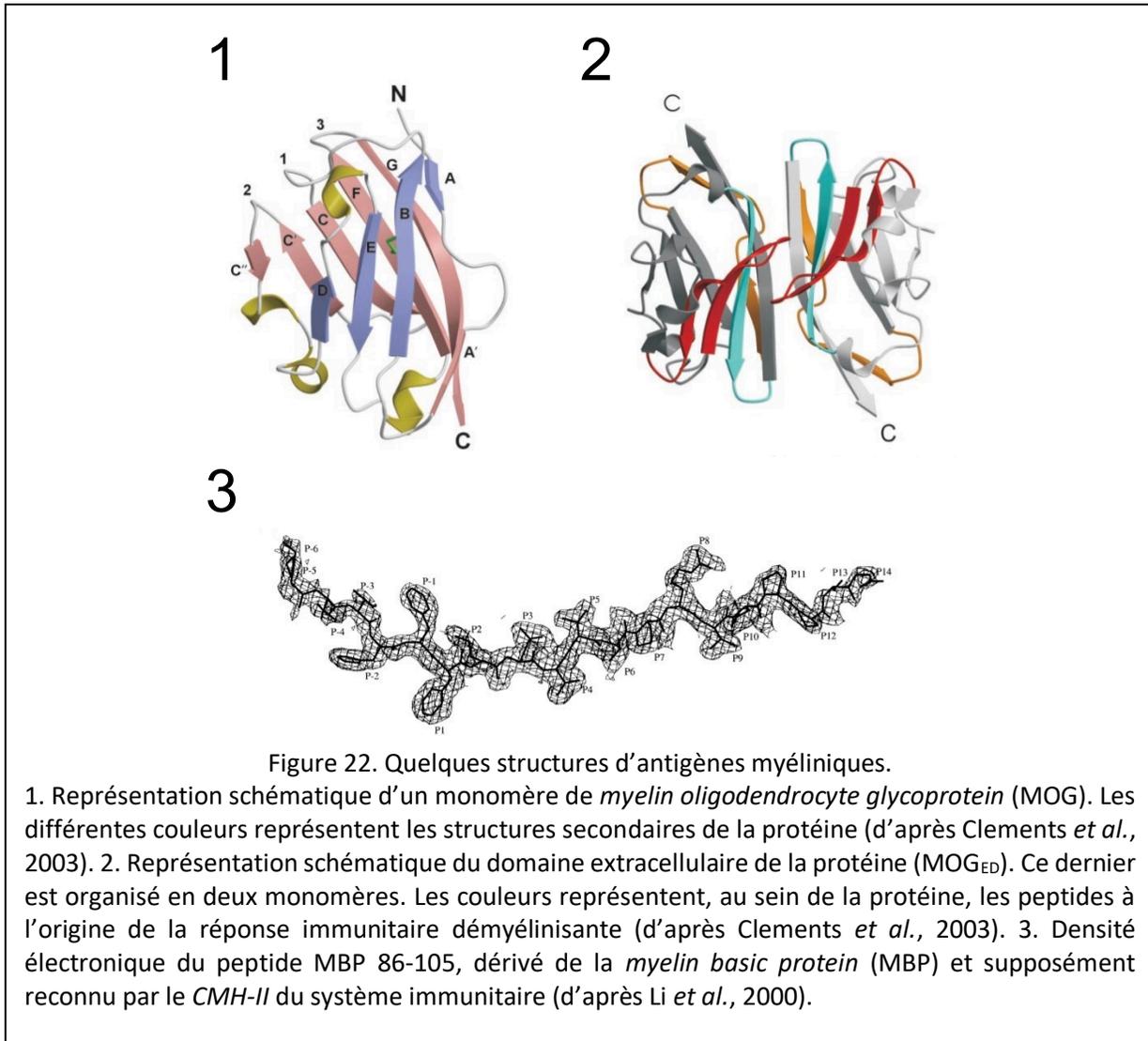
D'un point de vue expérimental, les sondes antigènes sont généralement immobilisées sur un support. Le support est alors mis en contact avec le fluide du patient, très souvent du sérum, contenant les potentiels candidats biomarqueurs. Une méthode de détection est alors employée afin

de détecter ou non la présence d'interactions entre la sonde antigénique et les anticorps. Différents tests et contrôles sont alors réalisés afin d'évaluer si les anticorps détectés sont spécifiques de la pathologie d'intérêt et si ces derniers pourraient faire de bons biomarqueurs. Dans le cas de la SEP, par exemple, un test immunohistochimique de colocalisation entre les anticorps reconnus et des coupes de CNS pourrait fournir un argument favorable (Lolli *et al.*, 2005b). Les méthodes les plus souvent utilisées afin d'immobiliser les sondes antigéniques sont les tests ELISA, la résonance des plasmons de surface et les micropuces à glycanes (Real-Fernández *et al.*, 2012, 2015 ; Oyelaran *et al.*, 2009a, b). Pour plus de détails au sujet des tests ELISA utilisés dans ce travail de thèse, voir Partie 3 Etudes biologiques.

1.3.4 Antigènes précédemment testés

1.3.4.1 Les antigènes dérivés de la gaine de myéline

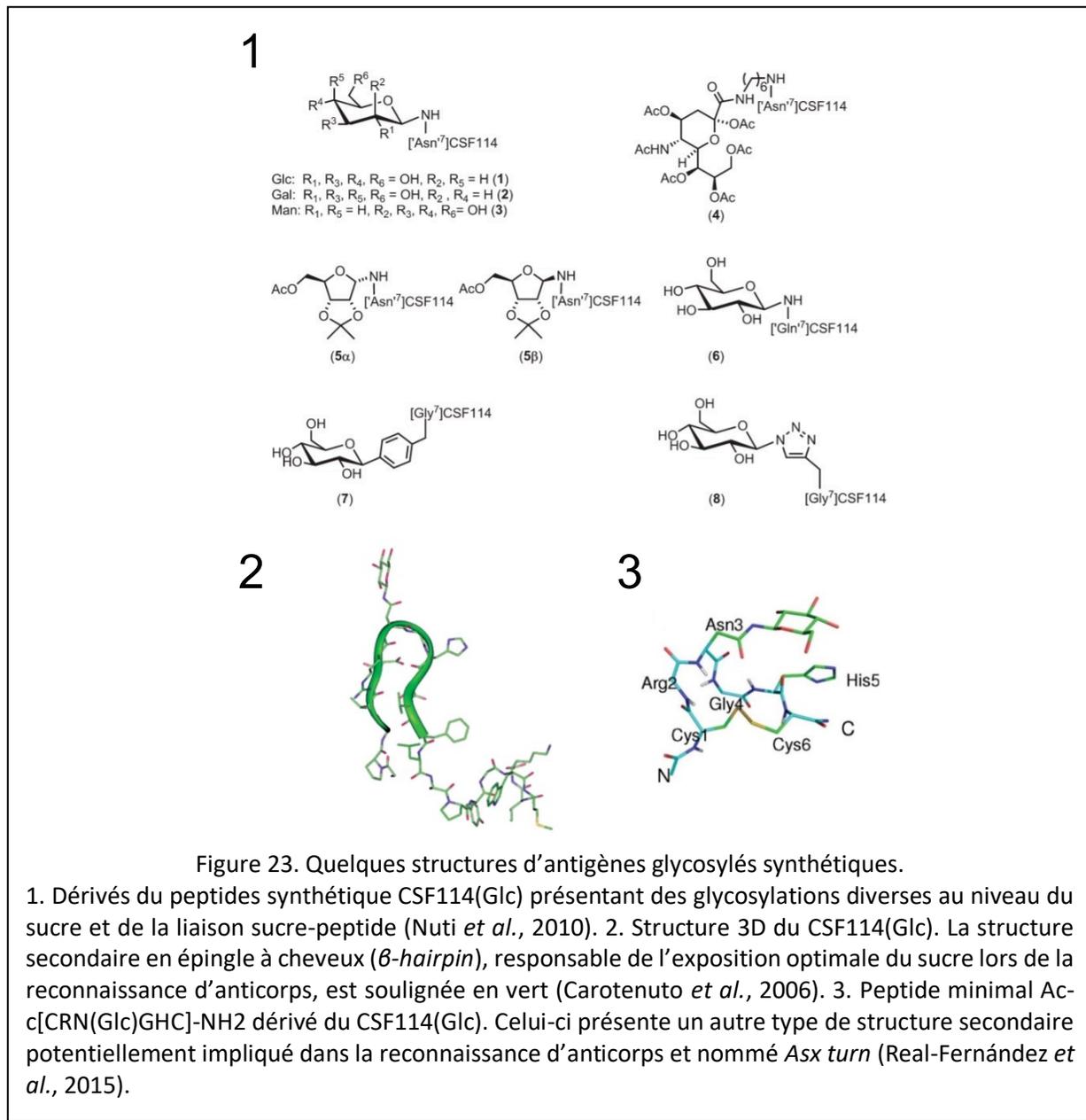
Les antigènes initialement testés comme sondes antigéniques pour la reconnaissance de d'anticorps dans la SEP étaient des dérivés de la myéline. Parmi ceux-ci, les protéines de surface de la myéline et leurs fragments peptidiques occupent une place prépondérante. Deux protéines en particulier sont considérées comme des auto-antigènes à l'origine de la réponse immunitaire démyélinisante : la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) et la *myelin basic protein* (MBP), ainsi que leurs peptides dérivés (Clements *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2000). Ces antigènes sont souvent qualifiés « d'innées » ou « d'endogènes » dans la mesure où ils représentent des autoantigènes cohérents avec la physiopathologie de la SEP. En effet, les cibles de la réaction auto-immune étant des éléments de la gaine de myéline, il peut sembler logique que les antigènes retrouvés naturellement dans cette même gaine de myéline constituent les autoantigènes à l'origine de la maladie (Reindl *et al.*, 1999 ; Carotenuto *et al.*, 2001 ; Menge *et al.*, 2005 ; Karussis, 2014).



1.3.4.2 Les antigènes synthétiques glycosylés

Les antigènes synthétiques glycosylés ont commencé à être envisagés comme sondes antigéniques après une découverte surprenante. Celle-ci révélait que certaines fonctions glycosidiques étaient spécifiquement reconnues par les anticorps des sérums des patients SEP. C'est par exemple le cas du CSF114(Glc), un peptide de 21 acides aminés présentant une glycosylation lui permettant d'être spécifiquement reconnu par les anticorps des patients SEP (Lolli *et al.*, 2005a, b). Il s'en est suivi une période d'optimisation structurale des antigènes porteur de fonctions glycosylées. Ces antigènes sont parfois qualifiés « d'aberrants » car ils ne sont pas retrouvés dans le CNS humain. Néanmoins, des performances diagnostiques élevées ont été

obtenues avec certains antigènes synthétiques suggérant une existence cryptique de ces derniers dans le CNS des malades. Des phénomènes de glycosylations post-traductionnelles non détectées pourraient expliquer cette hypothèse des antigènes cryptiques (Schwarz *et al.*, 2003, 2006 ; Nuti *et al.*, 2010 ; Real-Fernández *et al.*, 2012, 2015 ; Lolli *et al.*, 2005a, b ; Brettschneider *et al.*, 2009 ; Freedman *et al.*, 2009 ; Braganza *et al.*, 2018 ; Arrambide *et al.*, 2013 ; Carotenuto *et al.*, 2006 ; Bruno *et al.*, 2015).



1.3.4.3 Les antigènes mimétiques

L'hypothèse mécanistique dite « théorie classique Th1 » a été formulée assez tôt et implique une origine exogène de la SEP (Sospedra et Martin, 2005). Dans cette hypothèse, les LT seraient activés en dehors du CNS par des antigènes viraux. Cette activation leur permettrait de traverser la BHE et, par un mécanisme de réactivité croisée entre les antigènes viraux et les antigènes endogènes du CNS, d'activer la cascade auto-immune conduisant à la pathologie (Salou *et al.*, 2013). Cette hypothèse de la réactivité croisée, parfois aussi mentionnée comme « hypothèse du mimétisme moléculaire », est une théorie explicative majeure de la pathogénèse de la SEP. Cette dernière a surtout été formulée car il est apparu assez tôt que la SEP pourrait trouver son origine dans une infection par le virus Epstein-Barr. Des antigènes du virus seraient alors à l'origine de la réponse auto-immune bien que cela n'a pas pu être totalement démontré. Des études récentes ont avancé des arguments pour le moins pertinents quant au rôle d'autres agents infectieux comme sources d'antigènes mimétiques. Ces dernières se sont surtout concentrées sur des bactéries et le microbiote (Walvoort *et al.*, 2016 ; Planas *et al.*, 2018).

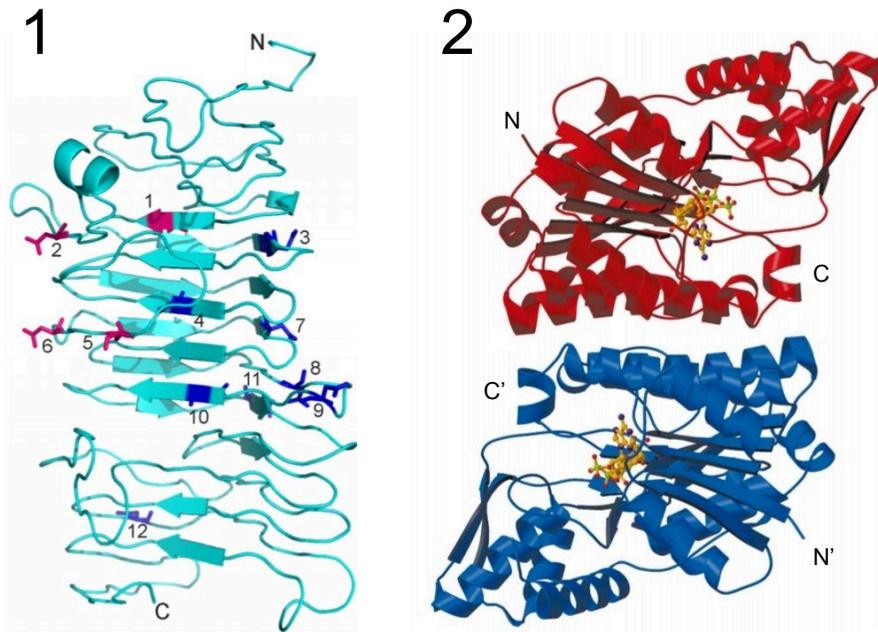


Figure 24. Quelques structures d'antigènes mimétiques.

1. Représentation schématique de la protéine HMW1A de la bactérie *Haemophilus influenzae*, le seul antigène natif connu à ce jour présentant une glycosylation aberrante identique à celle de CSF114(Glc). Cette protéine est un candidat pertinent à l'activation du système immunitaire envers les composantes du soi par un mécanisme de mimétisme moléculaire. Les sites colorés en magenta et bleu sont les sites de glycosylation (d'après Walvoort *et al.*, 2016). 2. Représentation schématique de la GDP-fucose synthase de *Escherichia coli* sous sa forme dimérique (différents monomères en bleu et rouge, respectivement). Les extrémités N-ter et C-ter sont indiquées. Le cofacteur NADP⁺ est représenté en jaune (d'après Somers *et al.*, 1998). La GDP-fucose synthase a récemment été suspectée d'induire ou de participer à la réponse auto-immune pathologique caractéristique de la SEP (Planas *et al.*, 2018).

1.3.5 Produits naturels précédemment testés

L'utilisation de saponines pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP s'inscrit dans la suite logique des antigènes synthétiques glycosylés introduits précédemment. Ces derniers ont montré que les sondes antigéniques présentant des fonctions glycosidiques étaient préférentiellement reconnues par les anticorps des patients atteints de SEP (Lolli *et al.*, 2005a, b). Des tentatives d'optimisation de ces sondes antigéniques par la chimie de synthèse ont été conduites (Real-Fernández *et al.*, 2015 ; Bruno *et al.*, 2015). Celles-ci ont rapidement montré leurs limites devant la complexité de la chimie des sucres. Les sondes synthétiques glycosylées ne

permettaient plus d'augmenter les performances des tests diagnostiques. De plus, la sélection des antigènes basée sur l'étude des relations structure-activité (RSA) suggérait des modifications structurales de plus en plus fines. Ces modifications chimiques fines concernaient la conformation anomérique des sucres et la position des liaisons *O*-hétérosidiques, paramètres qu'il est extrêmement difficile de contrôler par la synthèse (Braganza *et al.*, 2018).

Les produits naturels glycosylés furent donc envisagés comme sondes antigéniques. Ces derniers présentaient l'avantage d'être déjà synthétisés et permettaient ainsi de contourner le problème de la synthèse chimique des sucres. Les autres avantages des produits naturels glycosylés concernent l'incroyable diversité des fonctions glycosidiques disponibles. Cette grande diversité permet d'orienter rapidement la sélection des antigènes, à condition qu'un grand nombre de molécules soit testé. Elle permet aussi de tester des antigènes qui n'ont jamais été testés dans le cadre de la SEP. Enfin, les glycosides naturels sont très abondants à l'état naturel, en particulier chez les plantes. Leur isolement et leur caractérisation structurale, bien que nécessitant des connaissances et un savoir-faire spécialisé, sont rendus de plus en plus aisés par les techniques modernes de chromatographie et de spectroscopie. Une fois isolés, ces derniers sont stables et peuvent être facilement manipulés pour des tests biologiques ou immunologiques.

Les inconvénients d'utiliser ces produits en approche chimique pour la reconnaissance d'anticorps sont peu nombreux mais doivent être considérés. Le principal d'entre eux est la complexité structurale des glycosides naturels. Ces derniers sont en effet composés d'un aglycone plus ou moins variable dont le rôle dans les interactions antigène-anticorps est à prendre en considération. L'aglycone pourrait inhiber ou accentuer la capacité des fonctions glycosidiques à reconnaître les anticorps et biaiser toute évaluation des performances des sondes antigéniques. De plus, la complexité structurale rend difficile toute tentative d'optimisation structurale par hémisynthèse. Ce dernier point pourrait rapidement brider l'évolution des performances des tests diagnostiques, qui pourtant est l'objectif recherché.

Les contraintes en chimie des sucres, couplées à l'intérêt potentiel des glycosides naturels en approche chimique inverse ont conduit au rapprochement du Laboratoire de Pharmacognosie de l'EA 4267 PEPITE et des laboratoires italiens Peptlab@UNIFI et CHIM Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff' de l'Université de Florence, spécialisés dans ces thématiques. Dans le cadre de ce partenariat, le rôle du laboratoire de pharmacognosie consiste à fournir des glycosides naturels purs, principalement des saponines. Ces composés sont ensuite testés comme sondes antigéniques

aux Peptlab et au département de chimie Ugo Schiff dans le but d'évaluer leurs capacités de reconnaissance d'anticorps dans la SEP. Ces travaux ont conduit à la publication de deux articles et d'une thèse (Peroni *et al.*, 2016 ; Champy-Tixier *et al.*, 2018 ; Champy-Tixier, 2018). Les structures de quelques composés naturels précédemment testés dans le cadre ce partenariat de recherche sont présentées ci-dessous.

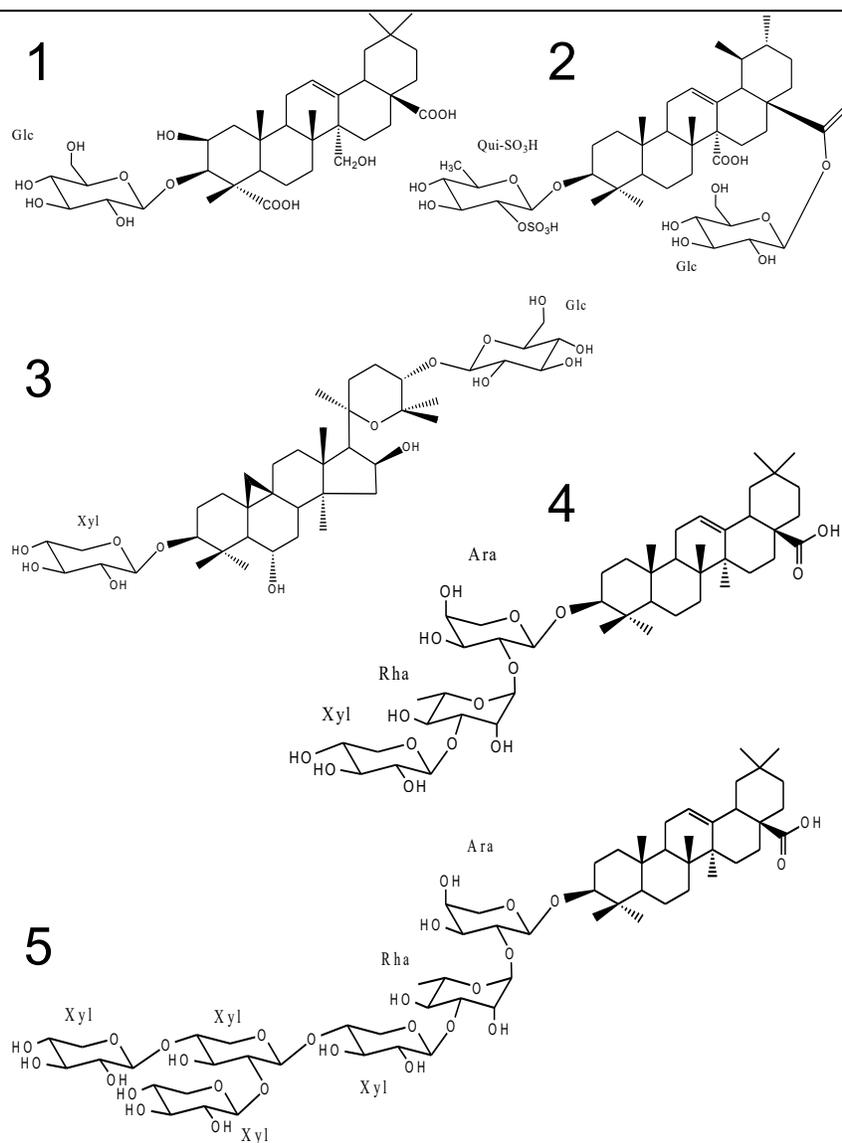


Figure 25. Saponines précédemment testées en approche chimique inverse.

1. 3-*O*-β-D-glucopyranosylpresenegenin (tenuifoline) de *Polygala ruwenzoriensis* ; 2. 3-*O*-(β-D-2-*O*-sulfonylquinovopyranosyl) quinovic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl ester (zygophyloside G) isolée de *Zygophyllum geslini* ; 3. 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-24-*O*-β-D-glucopyranosyl-20,25-epoxycycloartane-3β,6α,16β,24α-tetrol de *Astragalus caprinus* ; 4. 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyloleanolic acid et 5. 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-[β-D-xylopyranosyl-(1→4)]-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyloleanolic acid isolées de *Weigela florida*.

Chapitre 1.4 Travaux biologiques antérieurs : Saponines et activité antifongique

1.4.0 Présentation du chapitre

Après avoir détaillées les bases bibliographiques sur lesquelles reposent l'emploi de saponines en reconnaissance d'anticorps dans la SEP, nous nous intéresserons à un tout autre sujet. Ce dernier expose le potentiel des saponines dans le contrôle des maladies infectieuses d'origine fongique. Le présent chapitre est organisé en plusieurs sections dont la première expose la menace que représentent les champignons pathogènes pour les plantes, les animaux et les humains. La deuxième évalue la capacité de contrôle des saponines envers ces mêmes organismes, et les positionnent par rapport aux antifongiques classiques. La troisième enfin, présente quelques perspectives et autres avantages associés à l'utilisation de saponines comme antifongiques.

1.4.1 Généralités sur les champignons pathogènes

1.4.1.1 Les données quantitatives

Les champignons pathogènes représentent une menace biologique majeure pour les écosystèmes sauvages ou anthropisés. La pression qu'ils exercent sur les plantes cultivées menace la sécurité alimentaire et la stabilité des sociétés humaines. L'événement historique le plus marquant est certainement la Grande Famine irlandaise du XIX^{-ème} siècle, lors de laquelle l'Oomycète *Phytophthora infestans* ravagea quasi-entièrement la production de pomme de terre du pays. Ce drame infléchi durablement l'histoire de l'Irlande, qui perdit la moitié de sa population dans les décennies qui suivirent, principalement par un phénomène d'immigration structurelle. La destruction des châtaigniers d'Amérique du Nord au début du XX^{-ème} siècle par l'Ascomycète *Cryphonectria parasitica* est un autre exemple illustrant la capacité des champignons à impacter les populations végétales (Fisher *et al.*, 2012). Aujourd'hui, on estime que les champignons phytopathogènes détruisent jusqu'à 30 % de la production agricole annuelle (Avery *et al.*, 2019). Une première partie de ces pertes, environ 10 à 23 % du rendement total, serait générée dans les cultures malgré l'utilisation de fongicides. Les 10 % restant sont perdus après récolte (Fisher *et al.*, 2018). Ces chiffres représentent un dommage économique de l'ordre de 60 milliards d'euros par

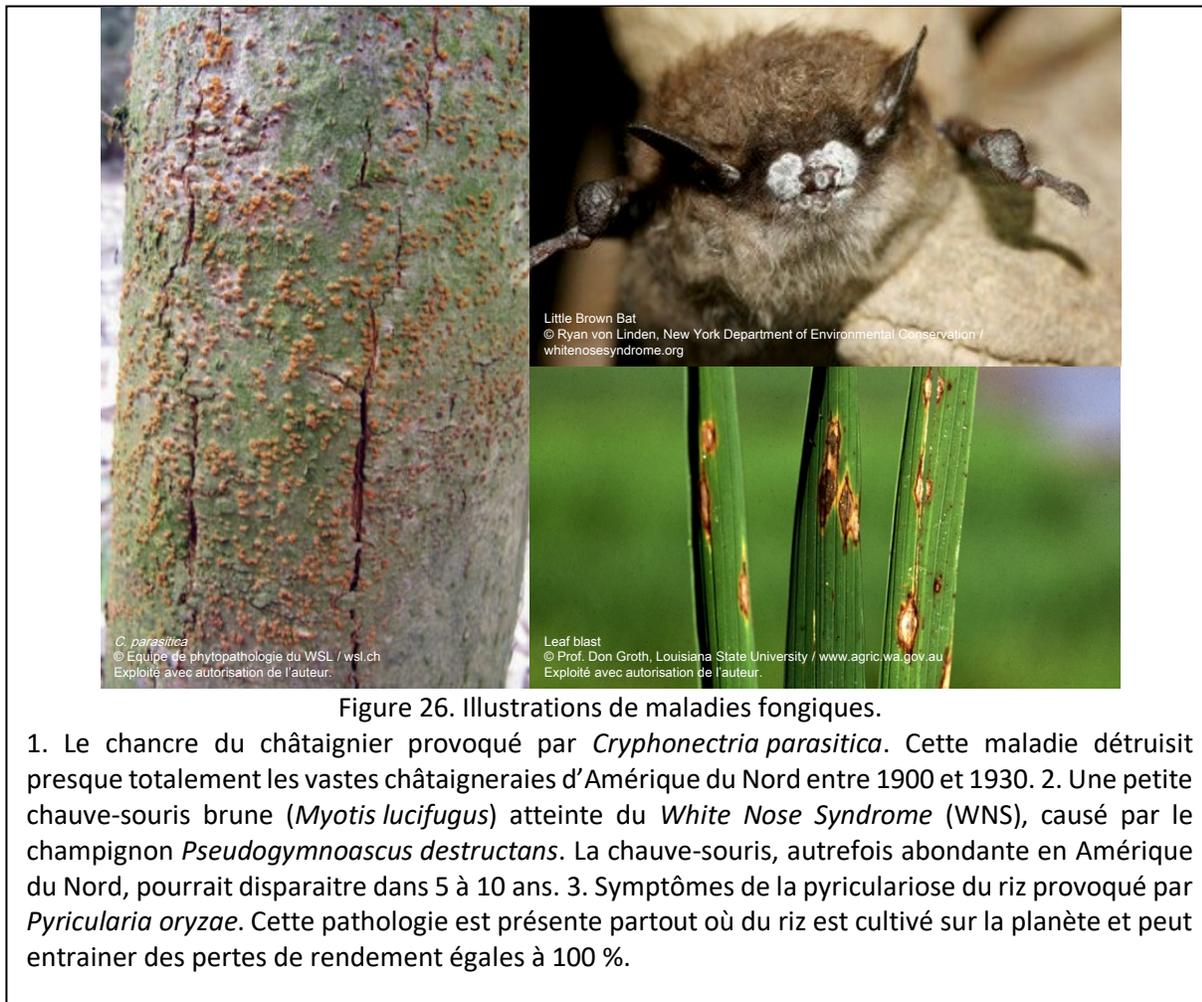
an (Kettles et Luna, 2019). Ces pertes brutes de production déstabilisent la sécurité alimentaire en réduisant directement la quantité de nourriture disponible à la consommation. Un autre levier affectant directement la sécurité alimentaire est la production de denrées contaminées. Celles-ci peuvent contenir des mycotoxines ou des champignons de l'environnement potentiellement pathogènes pour l'homme (Avery *et al.*, 2019).

Bien que surtout connus comme pathogènes des plantes, les champignons peuvent aussi affecter les populations animales avec une grande intensité et sur de larges échelles géographiques. Cet impact sur le monde animal a largement été sous-estimé jusqu'à présent et pourrait être révélateur de l'aspect global des maladies fongiques. L'ensemble de ces pathologies, qu'elles affectent les plantes, les animaux ou l'homme, sont une nuisance que les auteurs anglophones désignent sous le terme de « *fungal threat* », la menace fongique, bien que cette dénomination ne soit pas employée dans la littérature scientifique française (Sternberg, 1994). Un article récent a recensé et analysé l'impact des champignons pathogènes à l'échelle des écosystèmes. Ce dernier a révélé une recrudescence des cas de destruction de populations animales naturelles par des champignons au cours des 20 dernières années. Ces destructions conduisent dans certains cas à des extinctions locales d'espèces, impactant durablement la santé des écosystèmes et par conséquent, celle des populations humaines (Fisher *et al.*, 2012). Parmi ces cas, le syndrome du nez blanc ou WNS (*White Nose Syndrome*) affectant différentes espèces de chauves-souris d'Amérique du Nord, est particulièrement préoccupant. Ce dernier entraîne des dégâts énormes dans les populations de chauves-souris nord-américaines pouvant conduire à des extinctions d'espèces et à une perte des services écosystémiques rendus par ces dernières, notamment en agriculture (Blehert *et al.*, 2008). Un autre événement plus ancien et mieux connu est la chytridiomycose dont l'agent est le Chytriomycète *Batrachochytrium dendrobatidis*. Ce pathogène hypervirulent et ultra-généraliste est responsable en grande partie du déclin de la biodiversité des amphibiens à l'échelle de la planète. D'autres cas de grande ampleur affectant les tortues, les abeilles et les coraux ont également été répertoriés. Ces derniers suggèrent une généralisation et une amplification de la menace fongique aux cours des 20 dernières années (Fisher *et al.*, 2012).

La dégradation des écosystèmes a des impacts sur les populations humaines. Les champignons pathogènes, comme d'autres agents infectieux, peuvent se transmettre des animaux à l'homme. Parmi les maladies fongiques affectant l'homme, certaines mycoses associées à une origine animale sont des problèmes de santé publique. D'autres zoonoses fongiques sont surveillées

car susceptibles de passer des animaux à l'homme (Seyedmousavi *et al.*, 2015). Ces dernières n'ont reçu que peu d'attention jusqu'à présent. En effet, les humains ne sont pas considérés comme des hôtes optimaux des champignons pathogènes et peu d'espèces sont capables de les infecter. Les cas graves d'infections fongiques concernent en grande majorité les personnes immunodéprimées pour cause d'autres affections comme le SIDA, le cancer, l'asthme ou la greffe d'organe (Seyedmousavi *et al.*, 2015 ; Bongomin *et al.*, 2017). Ces cas graves d'infections fongiques sont le plus souvent restreints à l'hôpital et ont peu d'impact sur la culture populaire et les pouvoirs publics.

Malgré le peu d'attention qu'elles suscitent, les pathologies infectieuses liées aux champignons affectent un grand nombre de personnes chaque année. On estime à 1 milliard le nombre d'infections de la peau, 100 millions le nombre d'infections des muqueuses, 10 millions le nombre d'allergies sévères et 1 million le nombre de morts par an. La mortalité globale liée à ces affections est supérieure à celle de la malaria ou du cancer du sein, et équivalente à l'impact du VIH ou de la tuberculose (Gow et Netea, 2016 ; Bongomin *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que les infections d'origine fongique constituent une menace majeure à la santé humaine ainsi qu'un fardeau conséquent pour les budgets de santé publique à l'échelle du globe.



1.4.1.2 Les arguments biologiques

Les données quantitatives précédentes identifiant la menace fongique comme une menace sérieuse sur la santé des écosystèmes et des humains sont appuyées par un faisceau d'arguments biologiques explicatifs. Les mycologues ont identifié plusieurs caractéristiques, récurrentes chez les champignons, qui pourraient être à l'origine de leur dangerosité. La première concerne la haute virulence des mycètes infectieux. Celle-ci entraîne des taux de mortalité atteignant parfois 100 % dans les populations d'hôtes comme c'est le cas pour les exemples précédents du WNS ou de la Grande Famine irlandaise. En écologie, 100 % de mortalité signifie une extinction locale de l'espèce hôte. Ce premier facteur explique en grande partie l'impact majeur des champignons pathogènes sur la santé des écosystèmes. Une deuxième caractéristique biologique typiques des champignons et leur capacité à survivre longtemps dans l'environnement. Cette dernière est

intrinsèque au cycle de vie de nombreuses espèces, qui comporte une phase saprophyte où l'organisme survit en consommant de la matière organique en décomposition. Contrairement aux pathogènes obligatoires qui disparaissent rapidement en absence de leurs hôtes, les champignons pathogènes sont plus résilients et s'installent durablement dans leur environnement. Ce dernier est d'ailleurs très diversifié et peut être le sol, l'air ou l'eau, y compris à des niveaux de salinité élevée. La dispersion des spores dans l'air est aussi considérée comme un facteur majeur affectant leur pathogénicité. Les champignons sont présents de manière ubiquitaire dans l'environnement aérien et représenteraient la première biomasse de l'air. Une étude estime qu'une respiration humaine moyenne contiendrait entre une à dix spores d'origine fongique (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009). Nombreux sont les champignons pathogènes généralistes. Leur gamme d'hôtes est considérée comme la plus large des pathogènes avec certaines espèces pouvant infecter jusqu'à 500 espèces d'hôtes différentes. Certains genres, comme *Fusarium* et *Pythium*, contiennent des espèces capables d'infecter à la fois des plantes et des animaux, une caractéristique rare parmi les agents infectieux (Fisher *et al.*, 2012). Enfin, les changements globaux des conditions de vie sur Terre pourraient être une autre raison expliquant la pression croissante des mycètes sur les écosystèmes. L'augmentation du taux de CO₂ et de la température pourrait en effet favoriser le règne des champignons dans les prochaines décennies. Ce dernier argument est sujet à débat chez les spécialistes et demeure incertain (Fisher *et al.*, 2012 ; Kettles et Luna, 2019).

1.4.1.3 Les réponses possibles à la menace fongique

Si les universitaires alertent sur la recrudescence des maladies infectieuses depuis la fin du XX -ème siècle à nos jours, ceux-ci proposent également des solutions pour la limiter. Dans le cas de la menace fongique, les solutions sont multifactorielles. Une première proposition consisterait à renforcer la législation relative à la biosécurité. Cette mesure pourrait limiter la dispersion de souches pathogènes par les activités humaines, première cause de dispersion des maladies fongiques à travers le monde (Fisher *et al.*, 2012). Une deuxième solution réside dans une surveillance et une prospective accrue des zoonoses fongiques (Seyedmousavi *et al.*, 2015). Une troisième proposition réside dans une meilleure compréhension des maladies fongiques sur le plan physiopathologique et en particulier de l'immunité. Une augmentation de l'effort de recherche sur ce plan permettrait de mieux diagnostiquer, prendre en charge et soigner les affections liées aux champignons pathogènes chez l'homme (Gow et Netea, 2016). Toujours sur le plan clinique, une

meilleure reconnaissance des champignons comme cause de mortalité secondaire dans de nombreuses maladies telles que SIDA, le cancer, l'asthme et les greffes d'organes, permettrait d'attirer l'attention des pouvoirs publics sur l'importance de la menace (Bongomin *et al.*, 2017). Enfin, le développement de nouveaux fongicides, dernière ligne de défense contre les mycètes pathogènes, est à prioriser aussi bien à l'université que dans l'industrie (Chandrika et Sharma, 2020). Cette prérogative semble être relativement bien respectée car une douzaine de molécules seraient actuellement dans les pipelines pour un usage médical ou agricole (Fisher *et al.*, 2018). Cette dernière doit cependant s'accompagner de deux autres conditions indispensables sans quoi ces précieuses molécules seront rendues inefficaces dans les décennies qui suivent : (i) économiser leur utilisation et (ii) compartimenter les usages environnementaux et cliniques. Enfin, une réduction de la lutte chimique au profit d'autres méthodes de management des maladies est à prévoir. Les solutions possibles sont les OGM et l'adaptation des pratiques culturales en agriculture. En santé humaine, les vaccins, l'immunothérapie et des avancées dans les causes primaires de mortalité par infection fongique (SIDA, cancer etc.) sont à prioriser (Fisher *et al.*, 2018).

Les produits naturels ont toujours été une source abondante d'agents antimicrobiens (Beutler, 2009 ; Wang *et al.*, 2020). Les glycosides des plantes, et en particulier les saponines, sont connus pour leur activité antifongique (Ekabo *et al.*, 1996 ; Saha *et al.*, 2010 ; Abbruscato *et al.*, 2014 ; Lunga *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2018 ; Porsche *et al.*, 2018 ; Kim *et al.*, 2018). Ayant pris connaissance de l'ampleur des maladies fongiques, de la nécessité de développer rapidement de nouveaux fongicides et du potentiel antifongique des saponines, le laboratoire de pharmacognosie a initié un partenariat avec l'Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH (IBWF gGmbH). Cet institut allemand est spécialisé dans la biologie fongique et héberge une collection d'espèces de champignons dont certaines sont pathogènes. Ce rapprochement entre l'EA4267 et l'IBWF a été conçu dans le but de permettre l'évaluation des propriétés antifongiques des saponines isolées pendant ce travail de thèse. Pour d'avantage de détails concernant les données produites grâce à ce partenariat, voir Partie 3 Etudes biologiques. Les paragraphes suivants détaillent quelques aspects de l'activité antifongique des saponines tels que les valeurs typiques d'IC₅₀ (concentration inhibitrice médiane) et de MIC (concentration minimale inhibitrice), les RSA, les mécanismes d'action de ces composés et les stratégies mises en place par les champignons pour les contourner.

1.4.2 L'activité antifongique des saponines

Les glycosides triterpéniques et stéroïdiques sont connus pour leur activité antifongique. Celle-ci est relativement bien décrite dans la littérature et a fait l'objet de nombreuses publications. Un bon nombre de ces études ont été conduites sur des champignons pathogènes des tissus superficiels des animaux dont l'homme. Ces derniers sont principalement représentés par des espèces des genres *Aspergillus* (champignons imparfaits), *Cryptococcus* (levures), *Candida* (levures), *Microsporium* (dermatophytes), *Trichophyton* (dermatophytes), *Epidermophyton* (dermatophytes). Une brève revue bibliographique permet d'évaluer le pouvoir antifongique des saponines de diverses familles végétales.

Sautour *et al.* ont isolé des saponines stéroïdiques à partir de *Dioscorea cayenensis* (Dioscoreaceae) montrant des MIC de l'ordre de 12,5 à 25 µg/ml contre diverses espèces de *Candida* (Sautour *et al.*, 2004). Une autre étude a mesuré le pouvoir antifongique de nombreux produits naturels de *Polyscias fulva* (Araliaceae). Parmi ces composés, les deux plus actifs étaient deux saponines triterpéniques dérivées de l'hédéragénine dont les MIC étaient comprises entre 0,78 et 100 µg/ml (Njateng *et al.*, 2015). Similairement, Lunga *et al.* ont isolé diverses saponines triterpéniques de la Sapindaceae *Paullinia pinnata* (Sapindaceae). Ces dernières exerçaient un effet antifongique sur des levures et des dermatophytes, caractérisé par des MIC comprises entre 1,56 et 25 µg/ml (Lunga *et al.*, 2014). Pour conclure, une étude impliquant des scientifiques argentins, italiens et espagnols a évalué les MIC de saponines triterpéniques isolées de *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae), une espèce à risque critique d'extinction. Ces valeurs étaient comprises entre 25 et 125 µg/ml sur des levures et dermatophytes pathogènes (Escalante *et al.*, 2002).

D'autres études, dont la fréquence tend à augmenter ces dernières années, évaluent la capacité des saponines à contrôler des champignons pathogènes des plantes. Celles-ci ont permis de mettre en évidence l'activité de saponines triterpéniques de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*) contre *Pyricularia oryzae*, l'agent responsable de la pyriculariose du riz. En fonction des analogues testés, ces composés présentaient des MIC comprises entre 30 et 250 µg/ml (Abbruscato *et al.*, 2014). Une autre étude a testé les propriétés antifongiques de l'anginoside, une saponine stéroïdique issue d'*Allium nigrum* (Amaryllidaceae) sur des maladies de la tomate et de la fraise causées respectivement par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Colletotrichum gloeosporioides*. *In vivo*, 10 ppm de ce composé inhibait de 50 % la maladie de la fraise tandis que le même taux d'inhibition était atteint à 50 ppm pour la maladie de la tomate

(Mostafa *et al.*, 2013). Pour finir, une équipe vietnamo-coréenne a récemment publié des structures de saponines triterpéniques isolées de *Trevesia palmata* (Araliaceae) montrant une forte activité antifongique contre divers phytopathogènes. Ces derniers montraient des IC₅₀ compris entre 2 et 5 µg/ml contre *Pyricularia oryzae*, 24 et 44 µg/ml contre *Botrytis cinerea* et 81 et 205 µg/ml contre *Phytophthora infestans* (Kim *et al.*, 2018).

Ces quelques études, bien que non exhaustives de toute la bibliographie disponible sur le sujet, permettent de mettre en évidence l'activité biocide des saponines contre divers champignons pathogènes. Cette activité est caractérisée par des MIC comprises entre 1 et 25 µg/ml contre les pathogènes des animaux et de l'homme. A titre de comparaison, les antifongiques commerciaux utilisés comme contrôles positifs présentent des MIC comprises entre 0,01 et 6 µg/ml. Sur les phytopathogènes, les MIC des saponines sont comprises entre 5 et 250 µg/ml tandis que celles des fongicides commerciaux oscillent entre 1 et 10 µg/ml contre ces mêmes pathogènes.

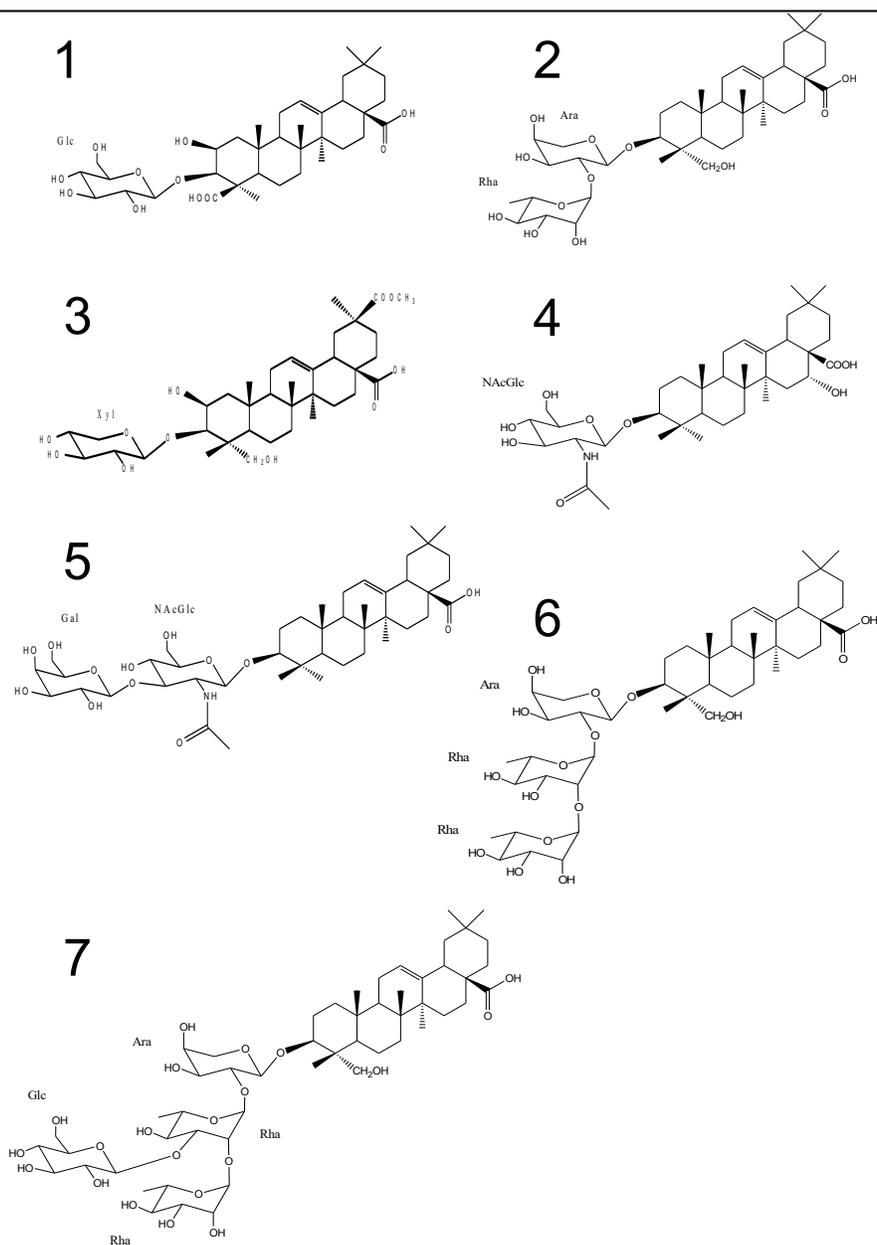


Figure 27. Quelques saponines dotées d'activités antifongiques.

1. 3-*O*- β -D-glucopyranosylmedicagenic acid isolée de *Medicago sativa* ; 2. 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine isolée de *Polyscias fulva* ; 3. 3-*O*- β -D-xylopyranosylphytolaccagenic acid isolée de *Phytolacca tetramera* ; 4. (3 β ,16 α -hydroxy)-3-*O*-(2'-acetamido-2'-deoxy- β -D-glucopyranosyl)echinocystic acid et 5. (3 β)-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(2'-acetamido-2'-deoxy- β -D-galactopyranosyl)oleanolic acid isolées de *Paullinia pinnata* ; 6. 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine et 7. 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine isolées de *Trevesia palmata* (Abbruscato *et al.*, 2014 ; Njateng *et al.*, 2015 ; Escalante *et al.*, 2002 ; Lunga *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2018).

Les RSA sont difficiles à déterminer tant les saponines présentent des structures diverses. Celles-ci paraissent parfois contradictoires et indéterminées même si quelques tendances se dessinent à la comparaison de multiples études. Les facteurs structuraux ayant le plus d'effet sur l'activité antifongique des saponines semblent être (i) le type de génine, (ii) le nombre de chaînes de sucres ainsi que (iii) la nature et la longueur des fonctions glycosylées. (i) Les saponines présentant des fonctions alcool ou acide carboxylique libres au niveau de leurs génines semblent être plus actives que celles dénuées de tels groupements (Escalante *et al.*, 2002 ; Barile *et al.*, 2007 ; Lunga *et al.*, 2014). La fonction acide carboxylique en C-28 des génines triterpéniques pourrait être un facteur important d'activité (Njanteng *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2018). Les génines triterpéniques de type oléanane comme l'hédéragénine ou l'acide oléanolique sont souvent responsables de l'activité antifongique (Tsuzuki *et al.*, 2007). (ii) Le nombre de chaînes de sucres apparait comme le facteur principal régulant l'activité antifongique des saponines. La dualité monodesmosides (une chaîne de sucres) contre bidesmosides (deux chaînes de sucres) est très souvent retrouvée dans les études. Une grande majorité des spécialistes s'accordent à dire que les monodesmosides sont actifs tandis que bidesmosides sont inactifs (Escalante *et al.*, 2002 ; Abbruscato *et al.*, 2014 ; Njanteng *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2018). (iii) Enfin, la nature de la chaîne et en particulier sa taille est un facteur important. Les chaînes de sucres longues de plus de quatre à cinq résidus sont généralement considérées comme dénuées d'activité antifongique (Escalante *et al.*, 2002 ; Njanteng *et al.*, 2015).

Concernant le mécanisme d'action des saponines, une seule piste est proposée et semble faire l'unanimité parmi les chercheurs. Ces composés pourraient créer des pores dans les membranes fongiques entraînant une dégradation structurelle et fonctionnelle de ces dernières. La perte d'intégrité membranaire serait à l'origine de la lyse cellulaire et de l'activité biocide. Outre cette activité, il est souvent observé une inhibition de la formation des hyphes chez les champignons traités par des saponines (Zhang *et al.*, 2006). Cette inhibition pourrait être directement issue de la déstabilisation des membranes. On pense que la formation de pores à l'origine de la lyse cellulaire provient de la capacité des saponines à interagir avec l'ergostérol des membranes fongiques (Osbourn, 1996). Cette caractéristique des saponines, qui consiste à interagir avec les stérols membranaires, est assez bien décrite et pourrait également expliquer l'effet cytotoxique de ces molécules (Timité, 2012).

Enfin, les champignons pathogènes ont acquis au cours de l'évolution des mécanismes de défense face aux saponines. Certains d'entre eux sont élucidés bien que les études sur cet aspect soient assez rares. Le premier élément permettant à un champignon d'éviter l'effet biocide des saponines est l'absence de stérols membranaires. C'est par exemple le cas des Oomycètes, dont les membranes cellulaires sont dénuées d'ergostérol (Barile *et al.*, 2007). Ces derniers incluent notamment les *Pythium* spp. et *Phytophthora infestans*, des pathogènes généralistes des plantes contre lesquels les saponines sont très souvent inactives. Il existe aussi des mécanismes de résistance plus complexes impliquant des enzymes capables d'altérer la structure des saponines. De nombreuses glycosidases détoxifiantes spécifiques des saponines, parfois appelées saponinases, ont été identifiées chez certains phytopathogènes. Celles-ci sont capables d'hydrolyser les chaînes de sucres en C-3 des monodesmosides actifs, les transformant ainsi en génine seule, inactive par perte de solubilité dans l'eau (Bouarab *et al.*, 2002 ; Barile *et al.*, 2007 ; Porsche *et al.*, 2018). Une autre étude suggère que les champignons pathogènes pourraient aussi inactiver les monodesmosides actifs en estérifiant la fonction acide carboxylique en C-28 des génines triterpéniques (Amaral *et al.*, 2008). Cette estérification serait rendue possible par des enzymes spécifiques capables d'ajouter des sucres aux saponines. Bien que cette dernière étude ait reçu peu de support, elle est révélatrice d'un second mécanisme enzymatique permettant aux mycètes d'éviter l'activité antifongique des saponines. Pour finir ce chapitre sur les saponines et leurs propriétés antifongiques, quelques pistes d'utilisation et autres avantages offerts par ces composés seront succinctement abordés.

1.4.3 Perspectives d'exploitation des propriétés antifongiques des saponines

En santé humaine, l'utilisation de saponines comme antifongiques recouvre plusieurs avantages.

(1) Le premier concerne l'originalité structurale des saponines par rapport aux antifongiques actuels. Ces derniers reposent principalement sur le groupe des azoles, partageant tous une nature chimique commune autour de laquelle s'articulent quelques variations structurales. Ce manque de diversité chimique couplé à l'apparition de résistances aux azoles chez les champignons pathogènes, conduit à l'inefficacité de parts entières de la pharmacopée antifongique

(Fisher *et al.*, 2018). Le développement de nouvelles molécules structurellement éloignées des azoles est une condition indispensable au design de nouveaux antifongiques. Les saponines répondent à cette condition et il a été démontré que des mycètes résistants aux azoles demeurent sensibles aux saponines (Tsuzuki *et al.*, 2007).

(2) Comme il a été mentionné précédemment, l'hémato-toxicité des saponines est une des raisons principales de leur sous-représentation dans la pharmacopée mondiale. Les maladies fongiques de l'être humain sont pour la plupart des affections superficielles de la peau, dont l'épiderme n'est pas vascularisé. Un traitement de l'épiderme par des saponines pourrait être envisageable en théorie, dans la mesure où les contacts entre ces molécules et le compartiment vasculaire seraient réduits ou inexistant, limitant ainsi les effets indésirables liés à l'hémato-toxicité. Sur la base de ce raisonnement, il est possible d'imaginer une application locale des saponines limitant les problèmes rencontrés lors d'autres modes d'administration tels que *per os* (problème d'absorption) ou intraveineuse (problème d'hémato-toxicité). Cette hypothèse mériterait d'être testée par des études physiologiques *in vitro* et *in vivo*.

(3) Enfin, l'optimisation structurale des saponines pourrait représenter un levier permettant de découpler l'activité de la toxicité. Leur taille importante ainsi que leur diversité structurale offrent de nombreuses approches en hémisynthèse. Ces mêmes caractéristiques sont aussi perçues comme une source de complexité et de difficulté, décourageant les chimistes à travailler sur ces composés. Toutefois, quelques rares études ont montré qu'il est possible de séparer l'activité de la toxicité par un processus d'optimisation structural rigoureux (Fernández-Tejada *et al.*, 2014 ; Fernández-Tejada *et al.*, 2016 ; Fernández-Tejada, 2017). Ces études ont grandement participé au développement de nouvelles approches synthétiques et héli-synthétiques facilitant la chimie des saponines. Il est possible que ces technologies soient plus accessibles à l'avenir, favorisant la mise au point de dérivés de saponines plus actifs et plus sûrs. Le groupe des antifongiques pourrait être l'un des premiers à bénéficier de ces avancées, tant les saponines présentent déjà des capacités prometteuses dans ce domaine d'activité (Coleman *et al.*, 2009).

En agriculture, les perspectives d'utilisation des saponines s'appuient sur divers éléments.

(1) L'emploi de saponines comme phytosanitaires présente des avantages environnementaux, sécuritaires et pratiques. Le premier d'entre eux concerne le caractère biodégradation de ces molécules. Ces dernières étant des produits naturels, elles sont plus facilement dégradées par les micro-organismes du sol et par conséquent, moins persistantes dans

l'environnement que les phytosanitaires synthétiques (Walia *et al.*, 2017). Le deuxième est justifié par la toxicité moins élevée des saponines vis-à-vis des mammifères, comparativement à d'autres pesticides (Pensec, 2013). Le troisième avantage est pratique puisque les saponines sont solubles dans l'eau et donc facilement dispersables en grandes cultures à l'aide des moyens mécanisés classiquement utilisés par les agriculteurs. Enfin, la production de ces molécules en grandes quantités est envisageable par extraction de sources primaires abondantes en saponines. Certaines de ces sources primaires sont des plantes telles que la luzerne (*Medicago* spp.), le pois (*Pisum* spp.) ou encore la betterave (*Beta* spp.), cultivées à grande échelle dans les pays agricoles de l'hémisphère nord (D'Addabbo *et al.*, 2014).

(2) Les problématiques inquiétantes de résistances aux antifongiques, dont il était question au paragraphe précédent, sont aussi vraies pour les fongicides utilisés en agriculture. Les azoles, notamment, sont aussi bien utilisés en clinique qu'au champ, favorisant la dispersion de résistances dans l'environnement et les populations humaines (Fisher *et al.*, 2018). Pour des raisons de divergence structurale avec toutes les autres classes d'antifongiques connues à ce jour, les saponines pourraient représenter des leads de fongicides synthétiques ou semi-synthétiques novateurs.

(3) Enfin, l'étude de l'activité antifongique des saponines a permis par le passé de mieux comprendre les stratégies de résistance des phytopathogènes aux molécules de défenses des plantes. Ces études, ont permis de mettre en évidence différents mécanismes moléculaires permettant aux mycètes de neutraliser les défenses naturelles des plantes, dont font partie les saponines (Osbourn *et al.*, 1996 ; Bouarab *et al.*, 2002 ; Amaral *et al.*, 2008). Il est fort à parier que ces stratégies sont des facteurs de virulence associés à la pathogénèse des maladies végétales. La compréhension de ces mécanismes, qui constituent le cœur des interactions plantes-pathogènes, pourrait permettre de mieux comprendre les pathologies des plantes cultivées et, *in fine*, de mieux les contrôler.

Après avoir exposé les bases bibliographiques de cette thèse, il est temps de présenter les travaux personnels. La partie suivante détaille l'étude phytochimique. Un chapitre introductif précise les matériels et méthodes utilisés. Les résultats obtenus sont détaillés dans quatre chapitres, un pour chaque espèce étudiée, dont le contenu est centré sur l'élucidation structurale des composés isolés. Une discussion de l'étude phytochimique fait l'objet d'un dernier chapitre. Celui-ci répond aux défis expérimentaux rencontrés et propose une analyse chimiotaxonomique des Sapindaceae étudiées.

Partie 2 Etude phytochimique

Chapitre 2.1 Matériels et méthodes appliqués à la phytochimie

2.1.0 Matériel végétal et extraction

Le matériel végétal utilisé dans ce travail fait l'objet d'une mention particulière car il a été collecté et transformé par des collègues chercheurs tiers. Les fruits de *Blighia unijugata* Baker et *Blighia welwitschii* (Hiern) Radlk., ainsi que l'écorce des racines de *Chytranthus macrobotrys* (Gilg) Exell & Mendonça et *Radlkofera calodendron* Gilg (Sapindaceae) ont été collectés en République Démocratique du Congo. Des exemplaires de voucher reposent au jardin botanique de Meise au sein de l'herbarium « Luc Pawels », nommé selon le botaniste ayant collecté et identifié les spécimens.

Le matériel a ensuite été transformé par l'équipe du Pr. Clément Delaude de l'Institut de recherche phytochimique de l'Université de Liège, en Belgique. La technique d'extraction utilisée implique différents procédés dont la macération dans une solution éthanolique, la précipitation du résidu dans l'éther diéthylique suivie d'une dialyse et d'une décoloration sur charbon actif. Ces étapes ont permis d'obtenir plusieurs dizaines de grammes d'extrait brut pour chacune des espèces. Les extraits ont été stockés dans des récipients hermétiques sous forme de poudre lyophilisée puis remis au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Bourgogne-Franche Comté, où le travail présenté ici a été initié.

2.1.1 Chromatographie liquide sous vide

La chromatographie liquide sous vide (VLC) est une technique de chromatographie liquide sur colonne dont les principaux éléments sont une phase stationnaire et une phase mobile. La phase stationnaire est constituée d'un verre fritté rempli de silice présentant des ouvertures en haut et en bas. L'ouverture du haut permet de déposer l'extrait et d'y appliquer différentes phases mobiles dont la composition sera précisée plus tard. L'ouverture du bas permet de récolter les fractions liquides dans une fiole à vide. C'est également depuis cette fiole à vide qu'est appliquée une pression négative, permettant de mettre en mouvement la phase mobile au travers de la phase stationnaire. La VLC opère donc à une basse pression avoisinant 1 atm, soit environ 1 bar.

Les constituants de l'extrait sont séparés dans la colonne de silice en fonction de leur affinité pour celle-ci. Les constituants ayant la plus forte affinité pour la phase stationnaire sont retenus ou adsorbés tandis que ceux ayant une affinité moindre sont élués ou désorbés. La VLC sur silice est donc une chromatographie d'adsorption séparant les constituants d'un mélange selon leur polarité. Toutes les techniques chromatographiques présentées ci-dessous sont des chromatographies d'adsorption et répondent donc au même principe.

La nature chimique de la phase stationnaire est importante puisqu'elle régit directement la séparation. Les phases stationnaires utilisées en VLC sont toutes constituées de gels de silice pouvant être en phase normale ou en phase inverse. La phase normale est un polymère de formule SiO_2 dont la nature est polaire ou hydrophile. Cette phase présente une forte affinité pour les molécules polaires et va donc être indiquée pour leur séparation. La phase inverse est un polymère de silice et de chaînes aliphatiques, généralement à 18 atomes de carbone appelées C-18 ou RP-18 dont la nature est apolaire ou hydrophobe. Cette phase présente une forte affinité pour les molécules apolaires et va donc être indiquée pour leur séparation. Toutes les techniques chromatographiques présentées ci-dessous comportent des gels de silice en phase normale (SiO_2) ou en phase inverse (RP-18) et répondent donc au même mécanisme. Seule la taille des particules change en fonction des applications mais la nature de la silice reste la même.

La taille des particules composant la phase stationnaire est un autre facteur important pour comprendre le fonctionnement de la chromatographie liquide d'adsorption. En effet, plus celle-ci est fine et plus la séparation est efficace. Les particules fines, bien qu'autorisant des séparations difficiles, provoquent une forte contre-pression lors de la mise en mouvement de la phase mobile au travers de celles-ci. Ce désavantage rend leur utilisation difficile et requiert des appareillages de plus en plus tolérants à la pression, et donc de plus en plus sophistiqués (Majors, 2015).

La VLC utilise des particules de silice relativement grosses n'offrant qu'une faible efficacité séparative mais produisant en contrepartie une faible contre-pression, la rendant facile à utiliser. Un autre avantage réside dans la capacité de charge élevée des frittés, autorisant à travailler avec de grandes quantités d'extrait. Ces caractéristiques en font une technique appréciable pour les séparations préliminaires. Les descriptifs techniques des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en VLC sont présentés ci-dessous :

— **Phase stationnaire :**

- Merck, silice 60, 63-200 μm , SiO_2

— **Phases mobiles :**

– CHCl₃–MeOH–H₂O (70–35–5)

– AcEt–EtOH–H₂O (70–35–5)

2.1.2 Chromatographie flash

La chromatographie flash (FC) utilise des colonnes commerciales à grosses particules et tolère une charge d'échantillon importante. Pour ces raisons, son utilisation dans les étapes de purification des glycosides est relativement similaire à la VLC. La FC utilise toutefois des appareillages plus sophistiqués intégrant divers composants tels qu'un injecteur, une pompe et un collecteur de fractions. Les pompes de FC délivrent des débits de phase mobile importants permettant une élution rapide des composés. Les collecteurs de fractions sont généralement automatisés ce qui augmente le confort de l'expérimentateur. Ces éléments en font une technique particulièrement appréciée pour traiter rapidement une grande quantité de matériel végétal. Les descriptifs techniques des instruments, des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en FC sont présentés ci-dessous :

— **Instrument :**

– Teledyne ISCO, appareil RETRIEVE CombiFlash

— **Phase stationnaire :**

– Teledyne ISCO, colonne RediSepRf SiO₂ (40-60 μm, 12 ou 40 g de silice)

— **Phases mobiles :**

– CHCl₃–MeOH–H₂O (70–30–5, 65–31–6, 60–32–7)

2.1.3 Chromatographie liquide moyenne pression

La chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) utilise des colonnes de silice dont les particules sont de taille moyenne. Celles-ci assurent des séparations d'efficacité intermédiaire à élevée tout en limitant la contre-pression à quelques bars. Les colonnes sont généralement de faible diamètre mais de longueur importante afin de maximiser l'efficacité de séparation. Comme pour la FC, une pompe et un collecteur de fractions assurent l'automatisation et le confort d'utilisation. Seule l'injection de l'échantillon est manuelle et permise par une pré-colonne. Ces caractéristiques en font une technique polyvalente associant facilité d'utilisation et efficacité

séparative. Les descriptifs techniques des instruments, des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en MPLC sont présentés ci-dessous :

— Instruments :

- Büchi, manager de pompe C-615 et pompe C-601
- Alltech, pompe Model 426
- Büchi, colonne en verre (230 mm × 15 mm ou 460 mm × 15 mm) et pré-colonne en verre (110 mm × 15 mm)
- Büchi, collecteur de fractions C-660

— Phases stationnaires :

- Merck, silice 60, 15-40 µm, SiO₂
- Silicycle, 75-200 µm, RP-18

— Phases mobiles :

- CHCl₃-MeOH-H₂O (90-10, 90-10-1, 85-15-1, 80-20, 80-20-2, 75-25-3, 70-30-5, 65-31-6, 65-35-10 phase inférieure, 60-32-7) pour SiO₂.
- Différents gradients MeOH-H₂O pour RP-18

2.1.4 Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilise des colonnes commerciales de haute technologie dont les particules sont très fines. Celles-ci permettent de réaliser des séparations difficiles mais génèrent une forte contre-pression. La gestion de cette pression requière des instruments sophistiqués, composés de différents modules automatisés commandés par un ordinateur. Ces modules intègrent un dégazeur, une pompe haute pression, un injecteur automatique, un four à colonne et des détecteurs adaptés aux molécules d'intérêt. La sensibilité des systèmes de détection HPLC en font une technique d'analyse fiable et puissante. Les protocoles de séparation, optimisés par l'analyse, peuvent aussi être conduits en mode préparatif (prep). Ceux-ci permettent des purifications difficiles mais ne tolèrent qu'une faible quantité d'échantillon par injection. Un autre désavantage souvent observé en prep réside dans les faibles rendements en sortie de colonne. Cela est lié à des phénomènes d'adsorption définitive sur les phases stationnaires des colonnes et des pré-colonnes servant à les protéger. Ces caractéristiques font de l'HPLC une technique spécialisée et puissante dont l'utilisation peut se révéler compliquée en prep. L'utilisation en mode analytique, plus aisée, est recommandée dans la mesure où elle procure une

grande quantité d'information. Celle-ci permet d'avoir accès au nombre de composés composant un extrait ainsi que leurs proportions relatives ou bien de mesurer la pureté des composés isolés (Beesley, 2010). Les descriptifs techniques des instruments, des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en HPLC sont présentés ci-dessous :

— Instruments :

– Agilent, appareil Infinity 1260 en tandem avec Sedex, détecteur 85 LT-ELSD pour HPLC analytique et ½ prep

– Gilson, appareil composé des pompes 305 et 306, têtes de pompe 25 SC, module manométrique 805, mixer dynamique 811C et détecteur UV/VIS-151 pour HPLC prep

— Phases stationnaires :

– Phenomenex, colonne LUNA RP-18 (5 µm, 100 Å, 250 mm × 4.60 mm) pour HPLC analytique

– Phenomenex, colonne LUNA RP-18 (5 µm, 100 Å, 250 mm × 10.00 mm) pour HPLC ½ prep

– Phenomenex, colonne LUNA RP-18 (10 µm, 100 Å, 250 mm × 21.20 mm) pour HPLC prep

— Phases mobiles :

– Différents gradients ACN–0.01 % TFA dans H₂O

2.1.5 Chromatographie sur couche mince

La TLC, pour Thin Layer Chromatography, équivalent à CCM, pour Chromatographie sur Couche Mince, est une technique de chromatographie liquide classique dont l'adsorbant est présenté sur une plaque plutôt que dans une colonne. Le dépôt des échantillons, solubilisés dans un solvant organique adéquat, se fait directement sur la plaque à l'aide d'une pipette Pasteur. La plaque est ensuite partiellement immergée dans une cuve verticale contenant la phase mobile. Cette dernière est mise en mouvement par capillarité, assurant la séparation des échantillons au contact de la phase stationnaire. La TLC repose sur du matériel simple dont l'utilisation est facile et intuitive. Elle est utilisée comme technique d'analyse de routine pour ces raisons. Une variante haute performance, l'HPTLC, utilise des plaques revêtues d'un adsorbant à particules fines. Cette dernière permet des analyses fiables et précises, utilisées pour évaluer la pureté des isolats. Les

descriptifs techniques des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en TLC sont présentés ci-dessous :

— **Phases stationnaires :**

- Silicycle, silice 60 F₂₅₄, SiO₂ pour TLC
- Merck, silice 60 F₂₅₄, SiO₂ pour HPTLC

— **Phases mobiles :**

- CHCl₃–MeOH–H₂O (70–30–5)
- CHCl₃–MeOH–H₂O–MeCOOH (70–30–5–1)

— **Révéléateur :**

- vanilline sulfurique (1 % vanilline dans EtOH–H₂SO₄, 50–1)

2.1.6 Chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse (GC) répond au principe de la chromatographie d'adsorption mais diffère des techniques précédentes du fait que la phase mobile n'est plus un liquide mais un gaz. De par cette modification majeure, les colonnes utilisées diffèrent largement dans leur forme et leur composition. Celles-ci sont généralement présentées sous forme d'un tube capillaire de quelques dixièmes de millimètres de diamètre pour plusieurs dizaines de mètres de longueur. La phase stationnaire est composée d'un polymère de chimie très variable tandis que la phase mobile est un gaz inerte, souvent l'hélium ou le diazote. Une autre différence majeure est la haute température utilisée, plusieurs centaines de degrés Celsius, afin d'assurer la vaporisation de l'échantillon. Du fait de ces caractéristiques, la GC est limitée aux composés volatiles et thermorésistants, des propriétés peu répandues chez les produits naturels. Pour ces raisons, cette technique n'est pas utilisée pour l'analyse ni la séparation des composés faisant l'objet de ce travail. Son utilisation repose plutôt sur la détermination des configurations absolues des sucres constitutifs des glycosides naturels. Cet objectif est réalisé par analyse GC des dérivés triméthylsilyles des sucres selon le procédé développé par Hara *et al.* (Hara *et al.*, 1987). Cette méthode permet de déterminer la configuration absolue, D ou L, des énantiomères de sucre communément trouvés dans les glycosides naturels. Les descriptifs techniques des instruments, des phases stationnaires et des phases mobiles utilisées en GC sont présentés ci-dessous :

— **Instrument :**

- Thermo Scientific, appareil ThermoQuest Trace GC

— **Phase stationnaire :**

– G-SCOT, colonne Silicone OV-17/Silanox (0.3 mm × 50 m)

— **Phase mobile :**

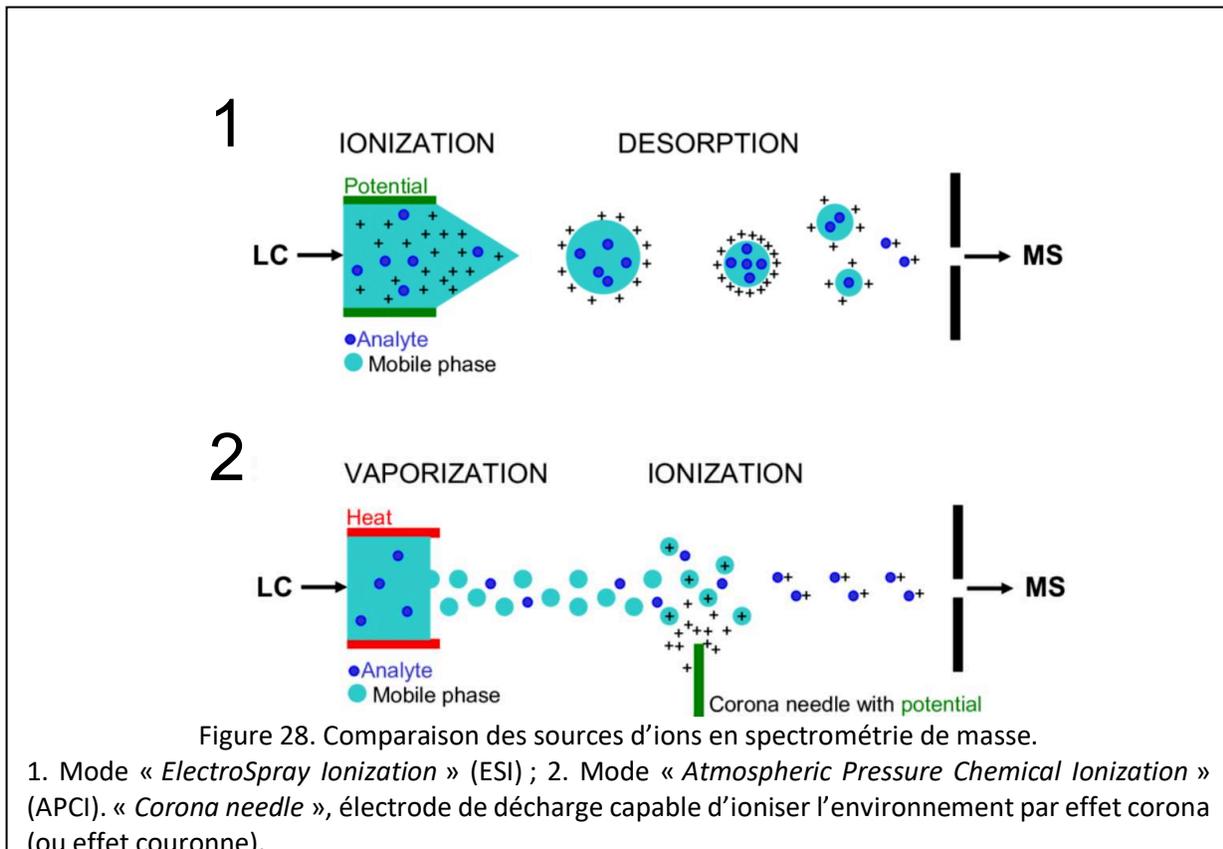
– Helium

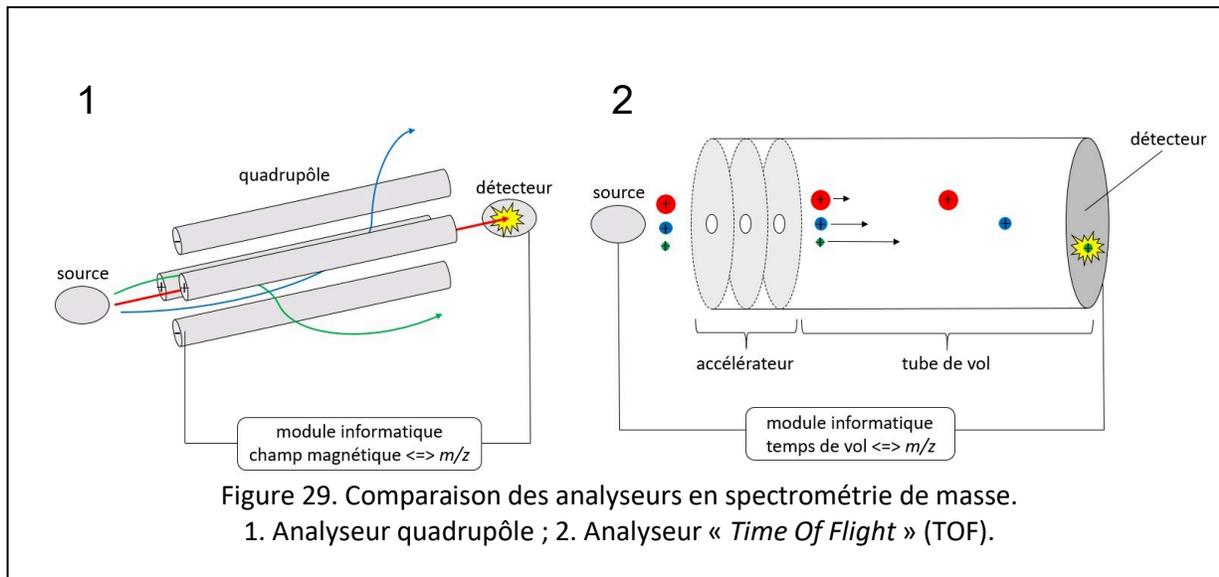
2.1.7 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique spectroscopique permettant de mesurer la masse des molécules. Elle occupe une place privilégiée dans les laboratoires de disciplines variées du fait de ses nombreux avantages et du faible nombre de techniques d'analyses permettant d'avoir accès à la masse moléculaire. Son principe repose sur l'ionisation de la substance d'intérêt suivie de la séparation des ions en phase gazeuse selon leur rapport masse/charge (m/z). Les deux étapes clés que sont l'ionisation et la séparation des ions sont réalisées par deux organes du spectromètre de masse appelés source d'ions et analyseur, respectivement. Les sources d'ions peuvent être de différentes technologies parmi lesquelles le FAB, l'ESI, l'APCI et le MALDI sont les plus répandues. Les analyseurs également sont de technologies variées parmi lesquelles on peut citer le quadrupôle, le temps de vol (TOF), le piège à ions ou encore l'orbitrap (Silverstein *et al.*, 2016). Les technologies utilisées dans ce travail relèvent de l'ESI et de l'APCI pour les sources d'ions et du quadrupôle et du TOF pour les analyseurs. Leurs mécanismes seront détaillés en figures dans ce paragraphe. La détection des ions en sortie d'analyseur est permise par un multiplicateur d'électron, un organe assurant la conversion du flux ionique en un courant électrique détectable par des moyens électroniques conventionnels. La technologie la plus répandue ici est celle de la dynode discontinue, permettant théoriquement de générer un signal mesurable à partir d'un seul ion capturé. Le signal électrique détecté fait ensuite l'objet de traitements informatiques permettant de le lier au rapport m/z de l'ion capturé. Les données générées sont restituées sous forme d'un spectre de masse, représentant l'intensité du signal détecté par les ions capturés en fonction du rapport m/z de ces derniers. Bien qu'ayant des applications extrêmement variées, la spectrométrie de masse est fondamentale en chimie des substances naturelles (Silverstein *et al.*, 2016). Elle trouve tout son intérêt dans les activités de détermination structurale, où elle permet souvent d'orienter ou de valider la structure finale proposée. Les descriptifs techniques des instruments utilisés en spectrométrie de masse sont présentés ci-dessous :

— Instruments :

- Bruker, spectromètre de masse micrOTOF II (ESI-TOF)
- Agilent, spectromètre de masse HPLC-MS (APCI/ESI-quadrupôle)





2.1.8 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique d'absorption permettant d'obtenir des informations détaillées sur la structure des molécules analysées. Celle-ci est basée sur le principe de résonance magnétique des noyaux atomiques possédant un spin non nul lorsque ces derniers sont placés dans un champ magnétique B_0 puis soumis à une onde électromagnétique dans le domaine des radiofréquences (RF). Le phénomène de résonance réside dans l'absorption de l'énergie de l'onde électromagnétique RF par les noyaux d'atomes, suivie de sa restitution lors de la relaxation. Le véritable intérêt de la RMN réside alors dans le fait que l'énergie restituée pendant la relaxation possède une valeur de fréquence très spécifique, dépendante du champ magnétique initial B_0 et des caractéristiques physico-chimiques des noyaux d'atomes. Cette propriété est à l'origine des applications spectroscopiques de la RMN et permet ainsi d'obtenir des informations sur la structure des molécules par mesure des fréquences auxquelles les atomes qui les composent raisonnent (Günther, 2013 ; Silverstein *et al.*, 2016).

Dans la pratique, la spectroscopie RMN est réalisée à l'aide d'instruments appelés spectromètres de résonance magnétique nucléaire. Au sein de ces derniers, les échantillons sont soumis à trois étapes parmi lesquelles (i) l'alignement des spins nucléaires selon le champ

magnétique initial B_0 , (ii) la perturbation de cet alignement par émission d'ondes RF pulsées dont l'absorption est dépendante de B_0 et des caractéristiques des atomes d'intérêt et (iii) la détection de la relaxation des atomes d'intérêt par mesure des fréquences auxquelles ces derniers se replacent dans le champ B_0 . Le signal enregistré lors de relaxation est traité par transformée de Fourier afin d'obtenir le spectre RMN, représentant l'intensité du signal RMN en fonction de la fréquence de résonance. Le spectre ainsi obtenu permet de visualiser la fréquence à laquelle raisonnent les différents noyaux d'atomes de la substance d'intérêt. Cette fréquence est exprimée en ppm et correspond au déplacement chimique des noyaux d'atomes noté δ (Günther, 2013 ; Silverstein *et al.*, 2016). Le déplacement chimique ainsi que d'autres caractéristiques des signaux telles que leur multiplicité et leur constante de couplage, permettent à l'utilisateur entraîné d'attribuer ces derniers à des éléments de structures de la substance en question.

Dans le cas des produits naturels et plus particulièrement des glycosides, c'est la RMN du proton (^1H) et du carbone 13 (^{13}C) qui est utilisée pour l'élucidation structurale. Les déplacements chimiques de ces derniers répondent à un découpage bien défini qui peut être résumé comme suit :

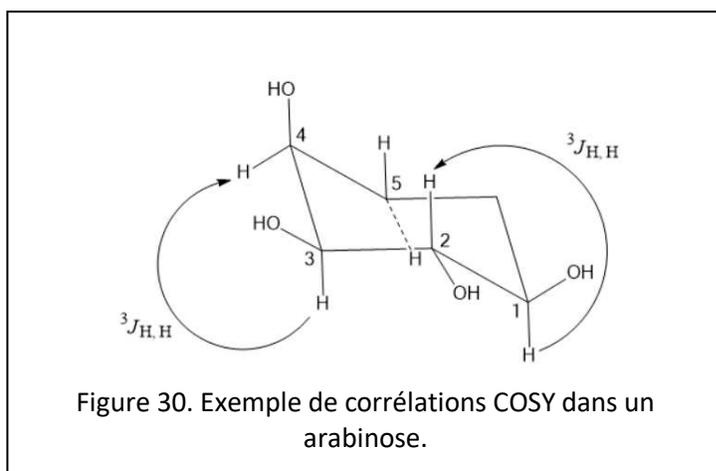
- les déplacements chimiques faibles correspondant aux ^1H et ^{13}C des génines, aussi appelées aglycones, et des méthyles des désoxy-6-héxoses (rhamnose). Ces signaux sont qualifiés de blindés.

- les déplacements chimiques intermédiaires correspondant aux ^1H et ^{13}C des sucres, à l'exception des anomères, et des fonctions alcools primaires et secondaires de l'aglycone. Ces signaux sont qualifiés de déblindés.

- les déplacements chimiques forts correspondant aux ^1H et ^{13}C des anomères pour les sucres et aux insaturations et fonctions esters pour l'aglycone. Ces signaux sont qualifiés de très déblindés.

Bien qu'offrant des indices sur la structure globale du composé, les spectres monodimensionnels (1D) du ^1H et ^{13}C ne permettent pas à eux seuls de déterminer la structure des glycosides naturels du fait de la grande taille de ces derniers. C'est donc la RMN bidimensionnelle (2D) qui permet d'avoir accès aux détails structuraux. Différents modes de corrélations 2D ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C sont utilisés. Ceux-ci sont présentés dans les paragraphes suivants.

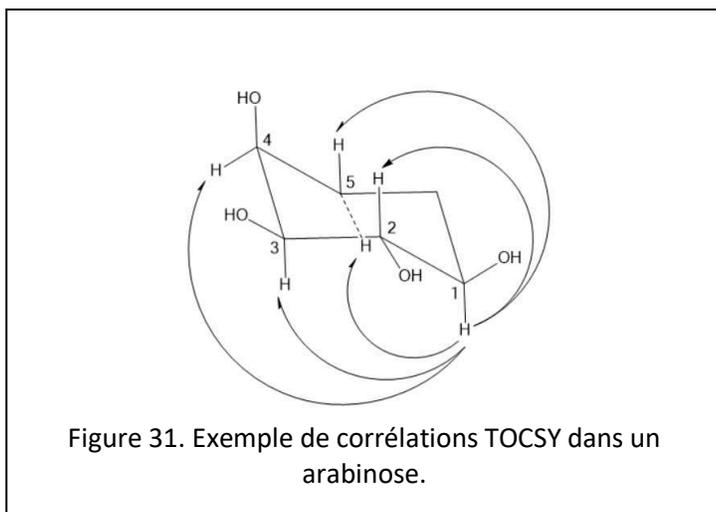
2.1.8.1 Corrélations ^1H - ^1H COSY



Le mode de corrélation COSY (correlation spectroscopy) met en évidence les liaisons $^3J_{\text{H-H}}$ entre protons vicinaux. Ce système de corrélation est particulièrement indiqué pour identifier l'enchaînement des ^1H sur les cycles osidiques. Bien que les corrélations ne soient pas toujours observées entre tous les ^1H

d'un cycle osidique, il permet quasi systématiquement d'identifier le ^1H n°2 à partir de son voisin anomérique (^1H n°1).

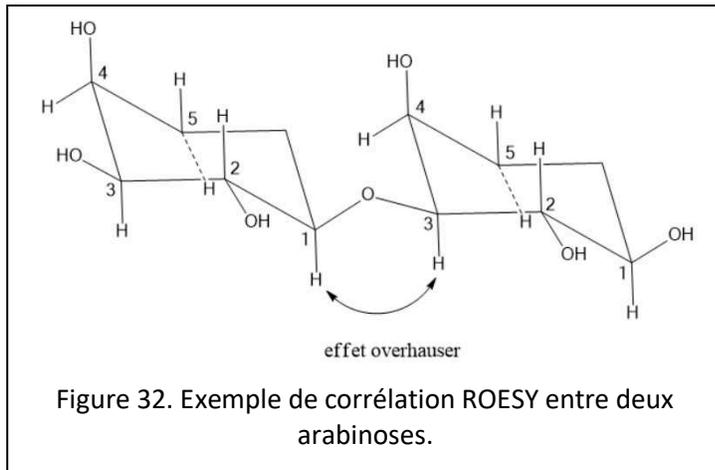
2.1.8.2 Corrélations ^1H - ^1H TOCSY



Le mode de corrélation TOCSY (total correlation spectroscopy) met en évidence les protons d'un même système de spin. Cela se traduit en pratique par l'observation des couplages entre tous les noyaux d'un même réseau de noyaux, tel qu'un cycle osidique par exemple. Contrairement au COSY, ce mode de corrélation n'est pas limité par le nombre de liaisons (2J , 3J , 4J , ...). Il permet par

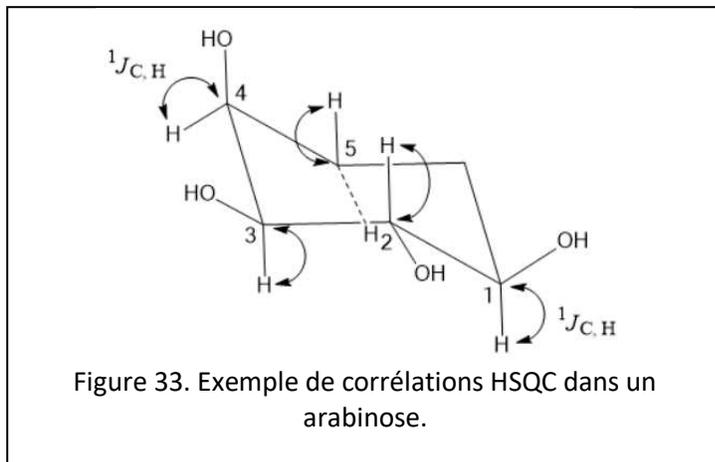
conséquent de mettre en évidence tous les ^1H d'un cycle osidique à partir de l'identification d'un seul d'entre eux. Il n'est pas rare d'observer par TOCSY les ^1H n°2, 3, 4 et 5 à partir de l'anomère du même cycle osidique.

2.1.8.3 Corrélations ^1H - ^1H ROESY



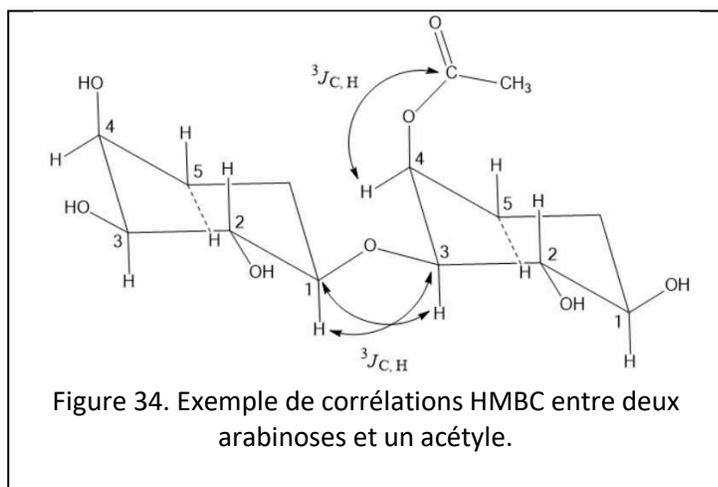
Le mode de corrélation ROESY (rotating-frame overhauser spectroscopy) met en évidence les effets overhauser entre protons proches dans l'espace. Cette expérience RMN permet de s'affranchir des liens covalents entre les protons. Elle est par conséquent indiquée pour la l'élucidation des liaisons longues distances, dont certaines impliquent des hétéroatomes, telles que les liaisons *O*-glycosidiques. Ce système de corrélation est indiqué pour la détermination des séquences glycosidiques ainsi que leur point d'attache à l'aglycone, à condition que ce dernier soit de nature *O*-hétérosidique (liaison éther-oxyde).

2.1.8.4 Corrélations ^1H - ^{13}C HSQC



Le mode de corrélation HSQC (heteronuclear multiple quantum coherence) met en évidence les couplages directs $^1J_{\text{C-H}}$. Ce dernier est très utile pour identifier un carbone non identifié à partir d'un proton identifié et vis-versa. Il met également en valeur les carbones porteurs de deux protons géminés dont les δ_{H} diffèrent, tel que les désoxy-5-pentose (arabinose, xylose) ou les alcools primaires des sucres et de la génine.

2.1.8.5 Corrélations ^1H - ^{13}C HMBC



Le mode de corrélation HMBC (heteronuclear multiple bond coherence) révèle les couplages indirects $^2J_{\text{C-H}}$ et $^3J_{\text{C-H}}$. Ce dernier permet de mettre en évidence des liaisons longue distance à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire. Il trouve toute son utilité au sein des cycles carbonés tels que l'aglycone mais aussi dans l'élucidation des

liaisons *O*-glycosidiques et esters. Il constitue ainsi la seule expérience RMN permettant de mettre en évidence les liaisons esters entre oligosaccharides et aglycones ou bien entre acétyles et oligosaccharides (Timité, 2012).

Les descriptifs techniques des instruments utilisés en spectroscopie RMN sont présentés ci-dessous :

— **Instrument :**

– Agilent, spectromètre RMN Varian INOVA 600

— **Solvants de mesure :**

– méthanol- d_4 (CD_3OD) ou pyridine- d_5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

— **Paramètres**

– voir 3.2.3A.1 Article n°1 pour paramétrage complet des appareils

2.1.9 Polarimétrie

La polarimétrie mesure la polarisation des ondes électromagnétiques et notamment celle de la lumière. La polarisation de la lumière peut être utilisée à des fins spectroscopiques dans la mesure où celle-ci peut être modifiée au contact d'un objet optiquement actif. La mesure de cette variation permet d'obtenir des informations sur l'objet traversé par l'onde lumineuse. Les molécules chirales sont historiquement connues pour leur capacité à faire varier l'angle de polarisation de la lumière polarisée. Ce dernier est défini par une valeur standardisée, appelée pouvoir rotatoire spécifique et notée $[\alpha]$. $[\alpha]$ est mesuré avec un polarimètre à l'aide de la formule suivante : $[\alpha]^\text{T}_\lambda = (100 \times \alpha)/(l \times$

c) ou T est la température (en °C), λ la longueur d'onde (en nm), α la rotation de l'angle de polarisation (en degrés positifs (+) ou négatifs (-)), l la longueur de la cuve (en dm) et c la concentration (en g/100 ml). Bien que cette valeur n'offre aucune donnée sur la structure du composé d'intérêt, elle est spécifique de ce dernier et systématiquement donnée lors de la caractérisation d'une molécule naturelle nouvelle. Les descriptifs techniques des instruments utilisées en polarimétrie sont présentés ci-dessous :

— **Instrument :**

– Optical activity limited, polarimètre automatique AA-10R

2.1.10 Lyophilisation

La lyophilisation est un procédé permettant d'éliminer l'eau d'un échantillon par sublimation. Cette technique est appréciée car elle permet d'obtenir des poudres sèches de matériel végétal permettant de le peser, de le stocker et d'en caractériser l'aspect macroscopique. Les températures et les pressions extrêmement basses auxquelles opère le lyophilisateur permet de préserver les constituants des échantillons, là où l'évaporation de l'eau aurait nécessité des températures élevées. Les descriptifs techniques des instruments utilisées en lyophilisation sont présentés ci-dessous :

— **Instrument :**

– Heto, lyophilisateur Drywinner 6-55

2.1.11 Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est une technique d'hydrolyse chimique forte permettant de rompre les liaisons covalentes C—O. Dans le cas des glycosides naturels, celle-ci permet de libérer les monomères de sucres des liaisons éther oxyde et ester les liant entre eux et à leur génine. Cette réaction permet d'isoler les sucres libres afin d'en caractériser la configuration absolue. La génine libre peut également être isolée afin d'en définir la nature ou d'en tester l'activité biologique. Le descriptif de la réaction utilisée en hydrolyse acide est présenté ci-dessous :

— **Réaction :**

2 M TFA dans l'H₂O, 95 °C pendant 3 h

Chapitre 2.2 Exploration phytochimique de l'extrait de *Blighia unijugata*

2.2.0 Analyse de l'extrait

Les analyses TLC et HPLC de l'extrait de *Blighia unijugata* révèlent une richesse importante en métabolites. Environ quinze composés différents sont dénombrés sur la base de leurs rapports frontaux (Rf) et temps de rétention (Tr) en TLC et HPLC, respectivement. Le chromatogramme HPLC révèle l'existence de deux clusters de composés bien séparés correspondant aux saponines monodesmosidiques et bidesmosidiques. Les composés existent en proportions variables dont seulement quelques-uns sont très minoritaires. Ces caractéristiques en font un extrait favorable à l'isolement d'un grand nombre de molécules.

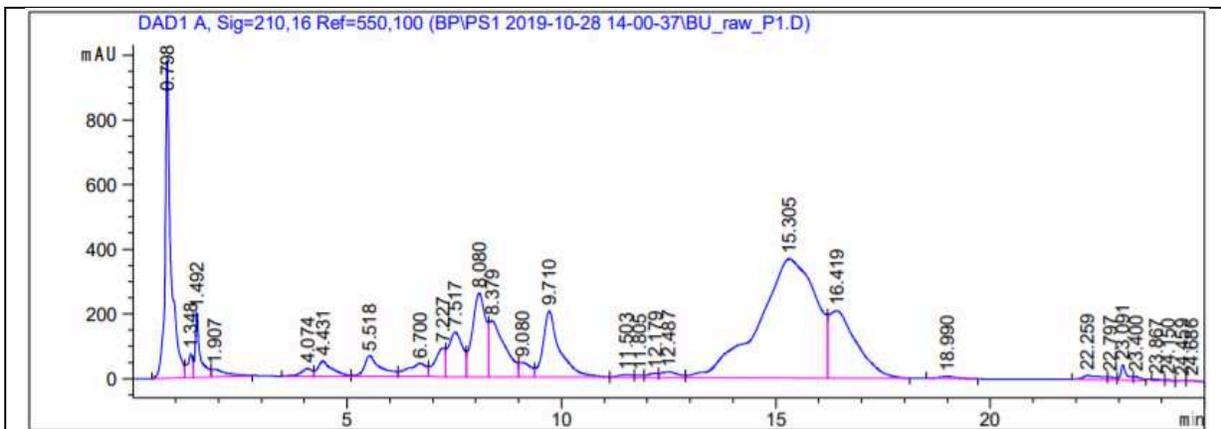


Figure 35. Chromatogramme HPLC de l'extrait brut de saponines de *Blighia unijugata*.

On distingue bien les deux clusters, le premier entre 4 et 10 min et le second entre 13 et 18 min. Ces derniers correspondent en fait au saponines monodesmosidiques et bidesmosidiques présentés dans l'extrait.

2.2.1 Isolement des composés

Treize isolats ont été obtenus à partir de l'extrait brut de *Blighia unijugata*. Les méthodes employées pour les obtenir ainsi que les quantités de matière utilisées sont détaillées dans le schéma d'isolement suivant.

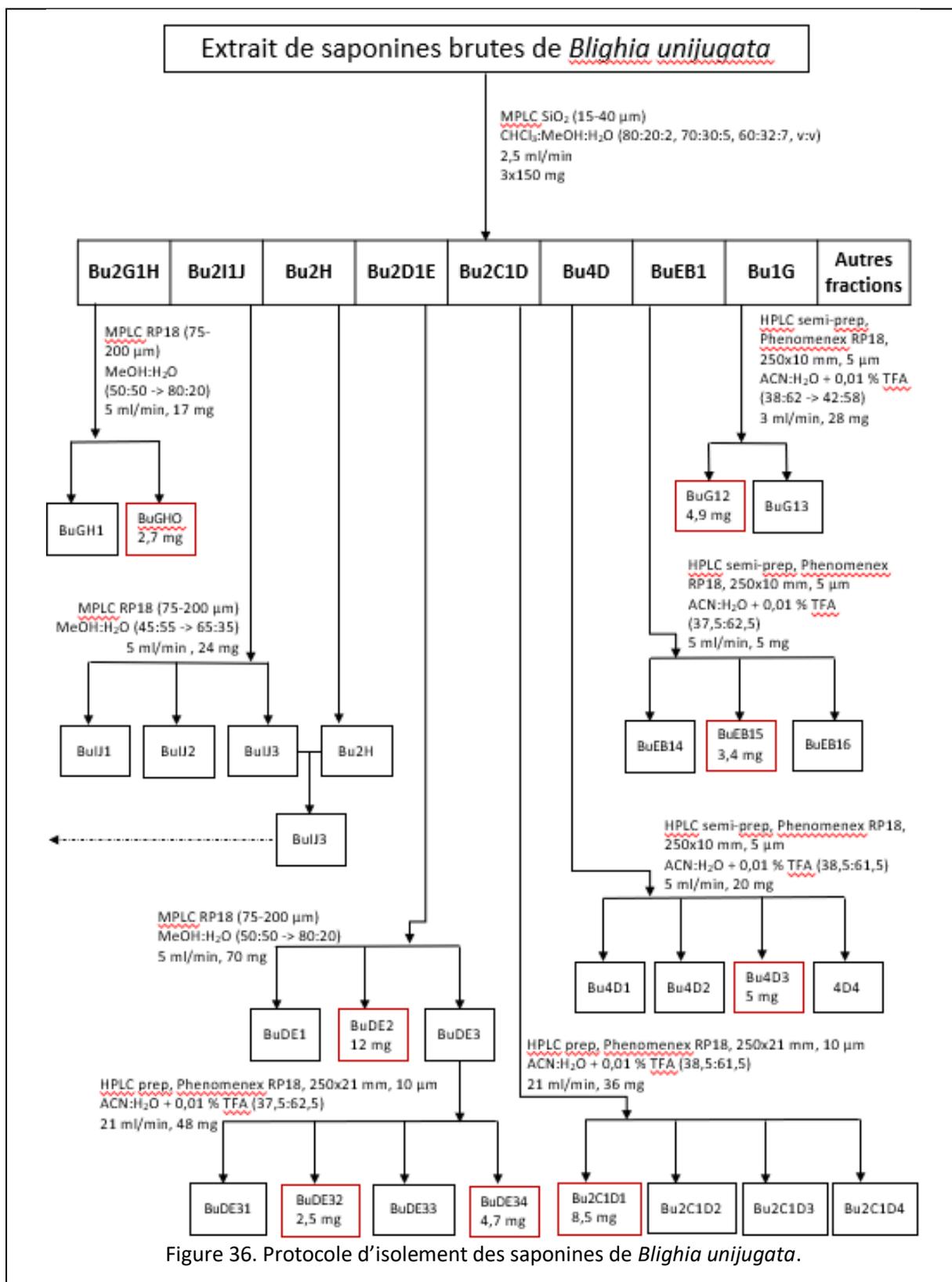


Figure 36. Protocole d'isolement des saponines de *Blighia unijugata*.

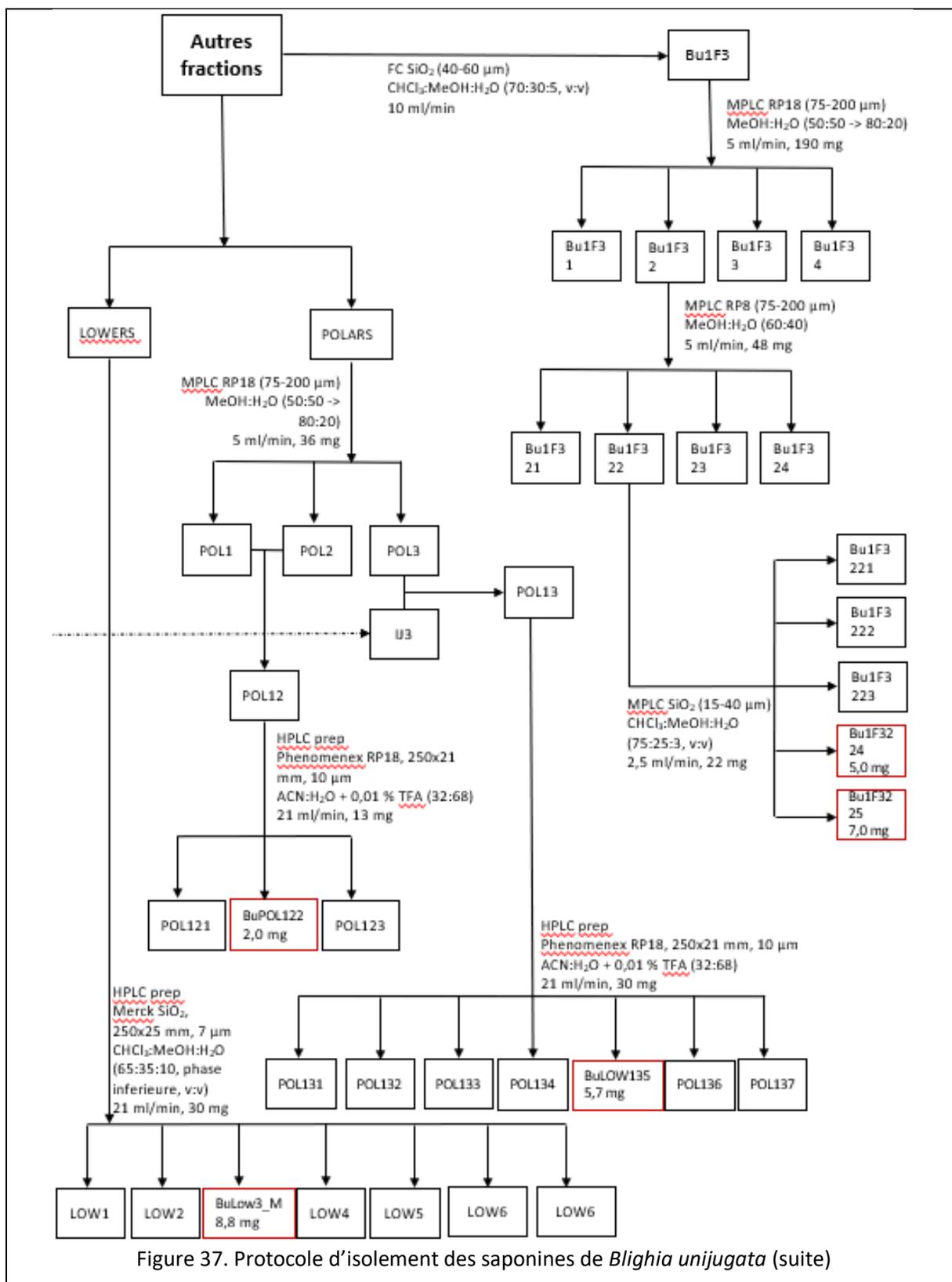


Figure 37. Protocole d'isolement des saponines de *Blighia unijugata* (suite)

2.2.2 Détermination structurale

Les analyses spectroscopiques révéleront que sur les treize isolats obtenus, **Bu13** (*BuDE34*) est un mélange inséparable de deux composés dont les structures ne peuvent être déterminées et que les composés **Bu7** (*BuLOW135*) et **Bu12** (*BuIF3225*) partagent la même structure.

Onze composés différents sont donc dénombrés parmi lesquels huit sont de structures nouvelles (**Bu1-Bu8**). Les trois autres composés (**Bu9-Bu11**), connus mais nouvellement rapportés dans l'espèce *Blighia unijugata*. Ces derniers sont identifiés par comparaison de leurs données spectroscopiques à celles trouvées dans la littérature comme étant du 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (dipsacocide B) (**Bu9**) (*BuPOL122*), 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (blighoside A) (**Bu10**) (*Bu4D3*) et 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**Bu11**) (*BuDE2*).

2.2.3 **Bu1** (*BuG12*)

— Spectrométrie de masse

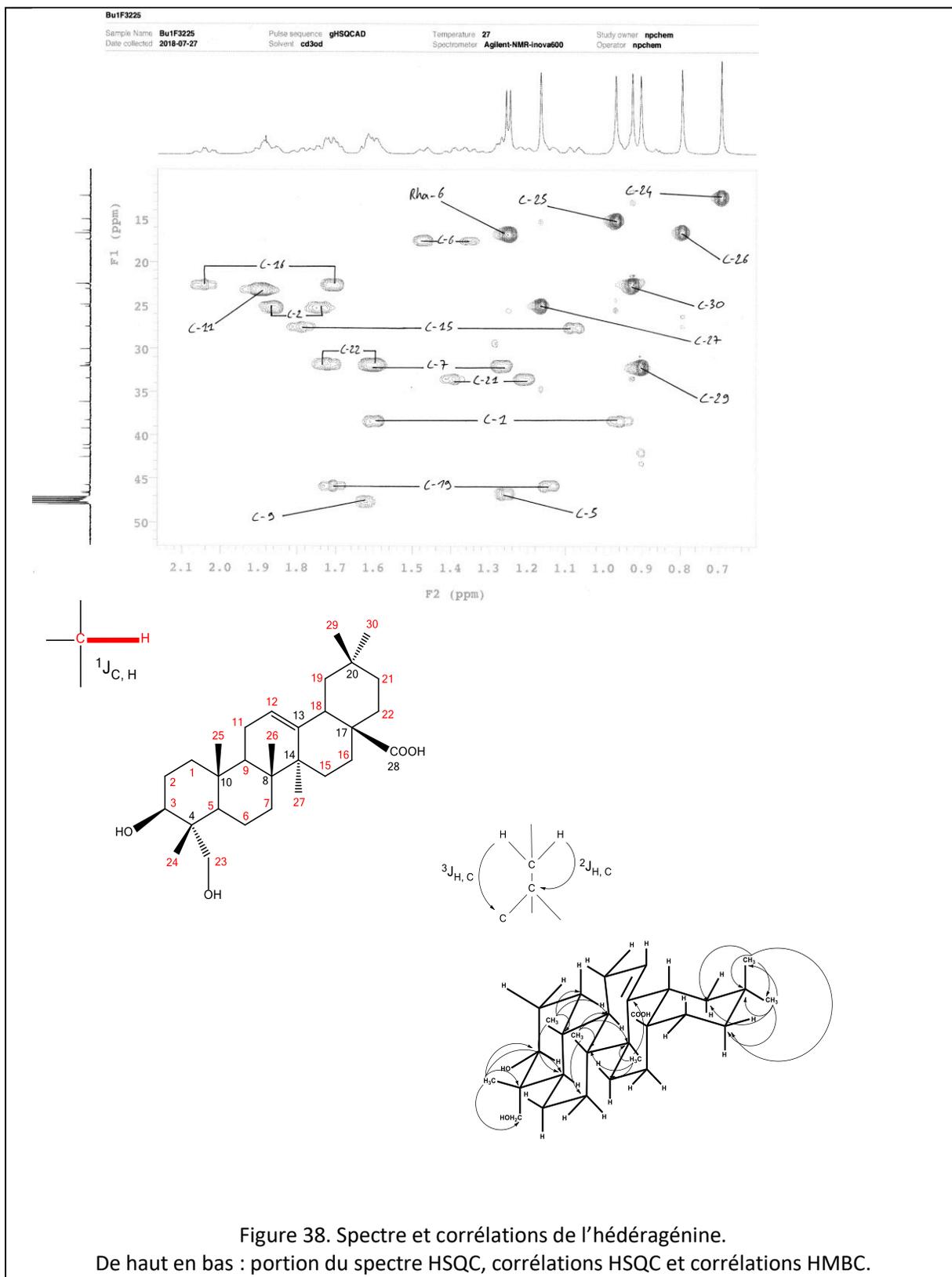
Le spectre de masse de **Bu1**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1199$, correspondant à un poids moléculaire de 1176, compatible avec la formule brute $C_{57}H_{92}O_{25}$.

— Spectroscopie RMN

Il est important de rappeler que les tableaux de déplacements chimiques pour tous les composés nouveaux décrits de *Blighia unijugata* sont disponibles dans l'article n°1. Toutes références à ces valeurs dans le texte sont exprimées en ppm.

Tous les composés isolés de *Blighia unijugata* partagent le même aglycone. Les données spectroscopiques de **Bu12** (*BuIF3225*) étant particulièrement résolutes, ces dernières serviront à caractériser l'aglycone pour tous les autres glycosides partageant ce motif structural. Le spectre HSQC de **Bu12** dans la région de l'aglycone présente des signaux attribuables à six méthyles résonant aux δ_H/δ_C suivants : 0.70/12.3 (C-24), 0.83/16.7 (C-26), 0.90/32.1 (C-29), 0.93/22.6 (C-30), 0.96/15.0 (C-25) et 1.17/25.1 (C-27). Les autres signaux remarquables correspondent à un proton et un carbone oléfinique à δ_H/δ_C 5.22/121.8 (H-12/C-12), une fonction alcool primaire à

δ_H/δ_C 3.54, 3.32/63.2 (H_a , H_b -23/C-23), une fonction alcool secondaire à δ_H/δ_C 3.60/81.0 (H-3/C-3) ainsi qu'une fonction ester à δ_C 179.2 (C-28). Le spectre HMBC, à partir duquel sont observables les couplages hétéronucléaires $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$, émanant des méthyles identifiés précédemment (3H-24, 25, 26, 27, 29 and 30), permet d'identifier la plupart des atomes de la génine. Cette analyse approfondie des données RMN, couplée à leur comparaison aux données préexistantes trouvées dans la littérature, permet d'identifier la génine comme étant de l'hédéragénine (acide (3 β)-3,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oic) (Rezgui *et al.*, 2016). La valeur déblindée du C-3, enregistrée à δ_C 81.0, signifie que l'oxygène de la fonction alcool secondaire est engagé dans une liaison O-glycosidique. En effet, les atomes de carbone porteurs d'une fonction alcool déblindent fortement lorsque celle-ci est engagée dans une liaison covalente (à titre de comparaison, δ_C C-3 hédéragénine libre 74.0 soit + 7.0 ppm en cas de liaison). Le C-28 impliqué dans la fonction ester résonne à δ_C 179.2, valeur déblindée indicative que cette dernière n'est pas substituée. Contrairement aux atomes de carbone porteurs d'une fonction alcool, ceux porteurs d'une fonction ester déblindent quand la fonction est libre (à titre de comparaison, δ_C C-28 hédéragénine lié 176.0 soit - 4.0 ppm en cas de liaison). Sur la base de ces informations, **Bu1** semble être un monodesmoside de l'hédéragénine dont la chaîne oligosaccharidique est branchée en C-3.



Le spectre du proton de **Bu1**, dans la région des sucres et de leurs anomères, présente cinq signaux à δ_H 4.36 (d, $J = 7.5$ Hz), 4.49 (br s), 4.51 (d, $J = 7.5$ Hz), 4.53 (d, $J = 7.9$ Hz) et 5.19 (br s) corrélant en HSQC avec cinq autres signaux à δ_C 103.6, 103.6, 104.9, 104.3 et 100.2, respectivement. Cela indique la présence de cinq sucres, identifiés par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme un β -D-glucopyranosyl (Glc), nommé Glc I, un β -D-xylopyranosyl (Xyl), nommé Xyl II, deux α -L-arabinopyranosyl (Ara), nommés Ara I et II et un α -L-rhamnopyranosyl (Rha).

L'enchaînement des sucres, essentiellement déterminé à l'aide des spectres HMBC et ROESY, est établi comme suit :

– La corrélation HMBC entre le proton anomérique de Ara I et le C-3 de l'aglycone à δ_H/δ_C 4.49 (br s) (Ara I-1)/81.0 (C-3) ainsi que la corrélation ROESY à δ_H/δ_H 4.49 (br s) (Ara I-1)/3.60 (H-3) confirment la liaison de Ara I en C-3 de la génine.

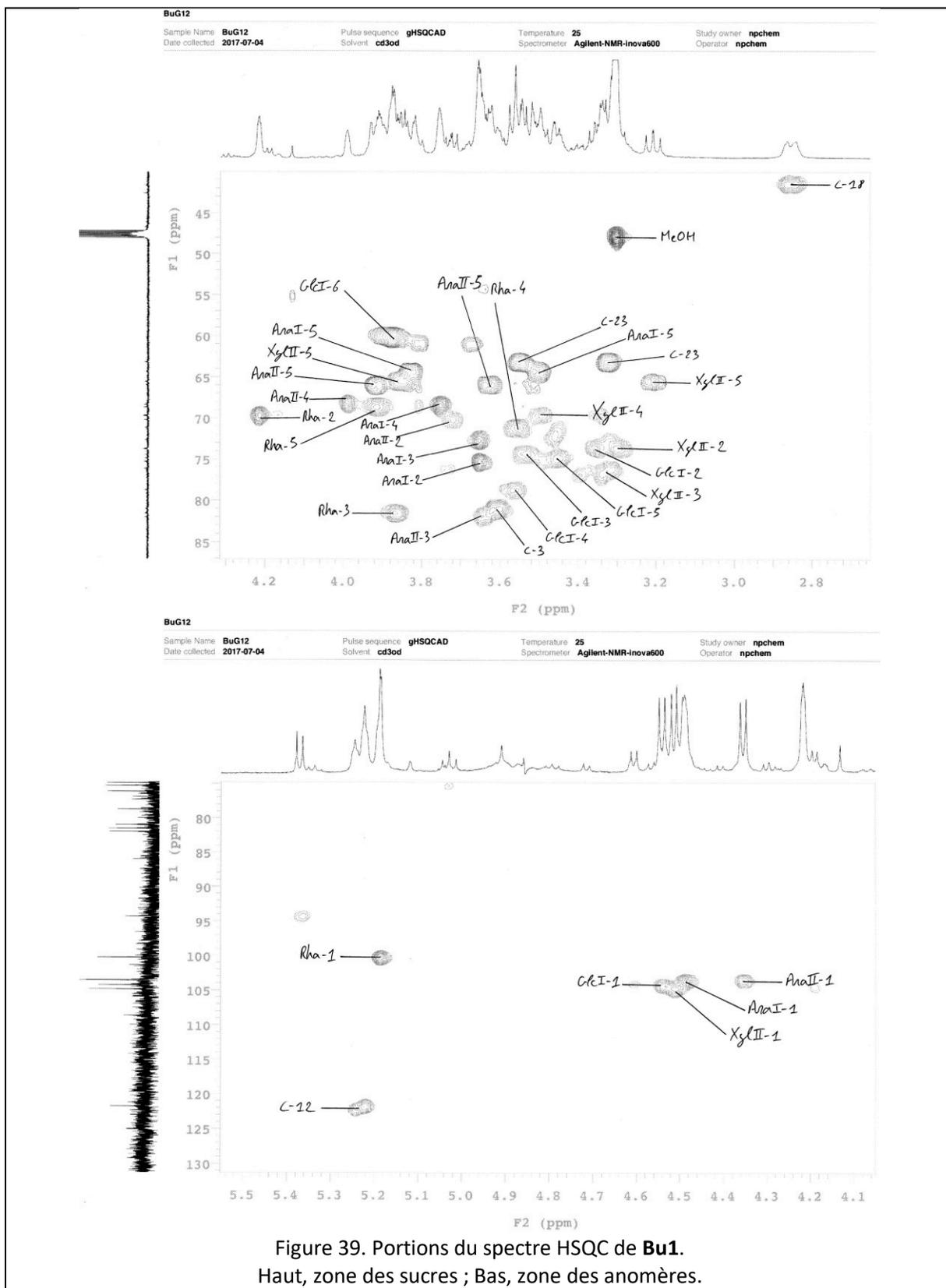
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 5.19 (br s) (Rha-1)/75.3 (Ara I-2) et δ_H/δ_H 5.19 (br s) (Rha-1)/3.65 (Ara I-2) confirment la liaison entre Rha-1 et Ara I-2.

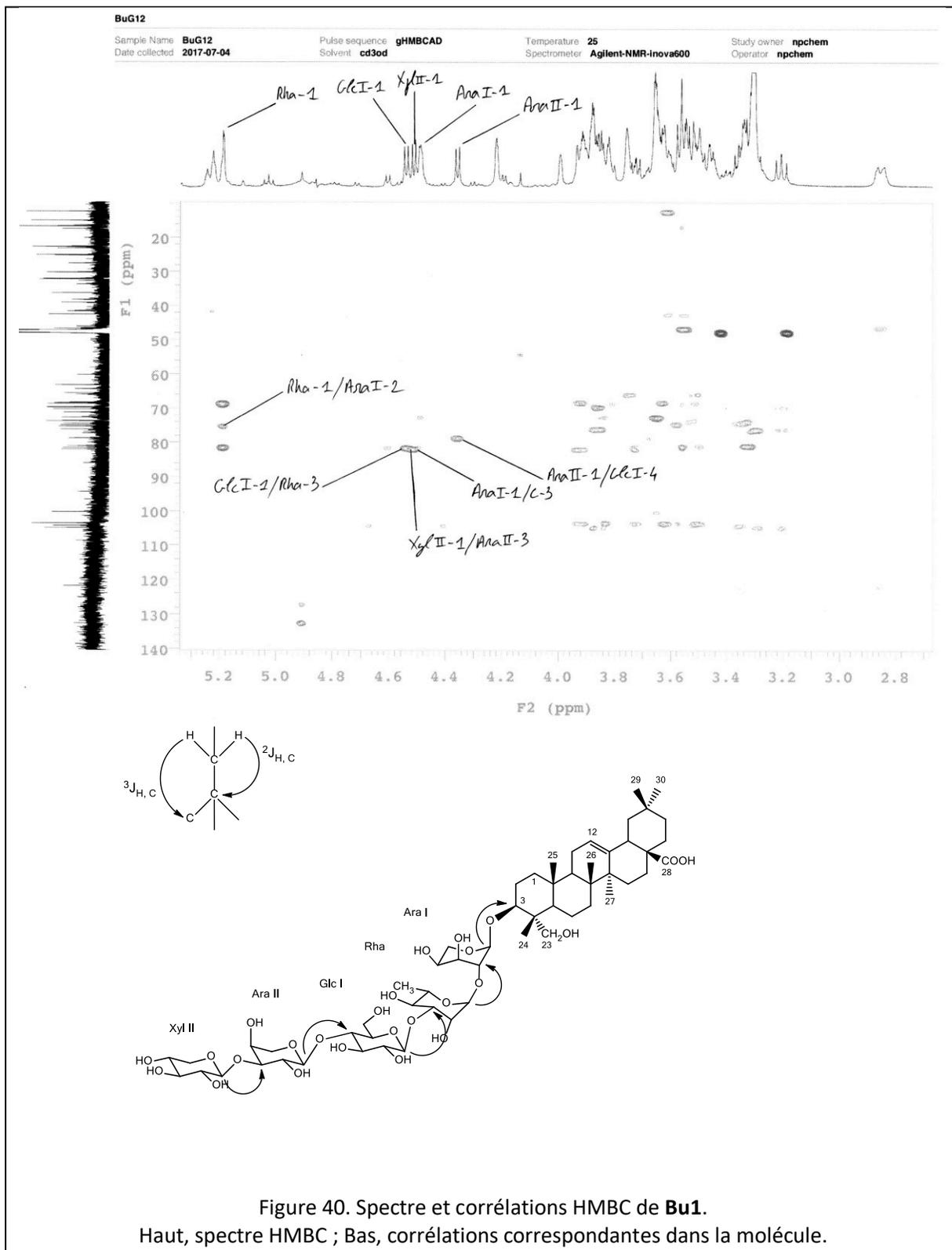
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.53 (d, $J = 7.9$ Hz) (Glc I-1)/81.6 (Rha-3) et δ_H/δ_H 4.53 (d, $J = 7.9$ Hz) (Glc I-1)/3.87 (Rha-3) confirment la liaison entre Glc I-1 et Rha-3.

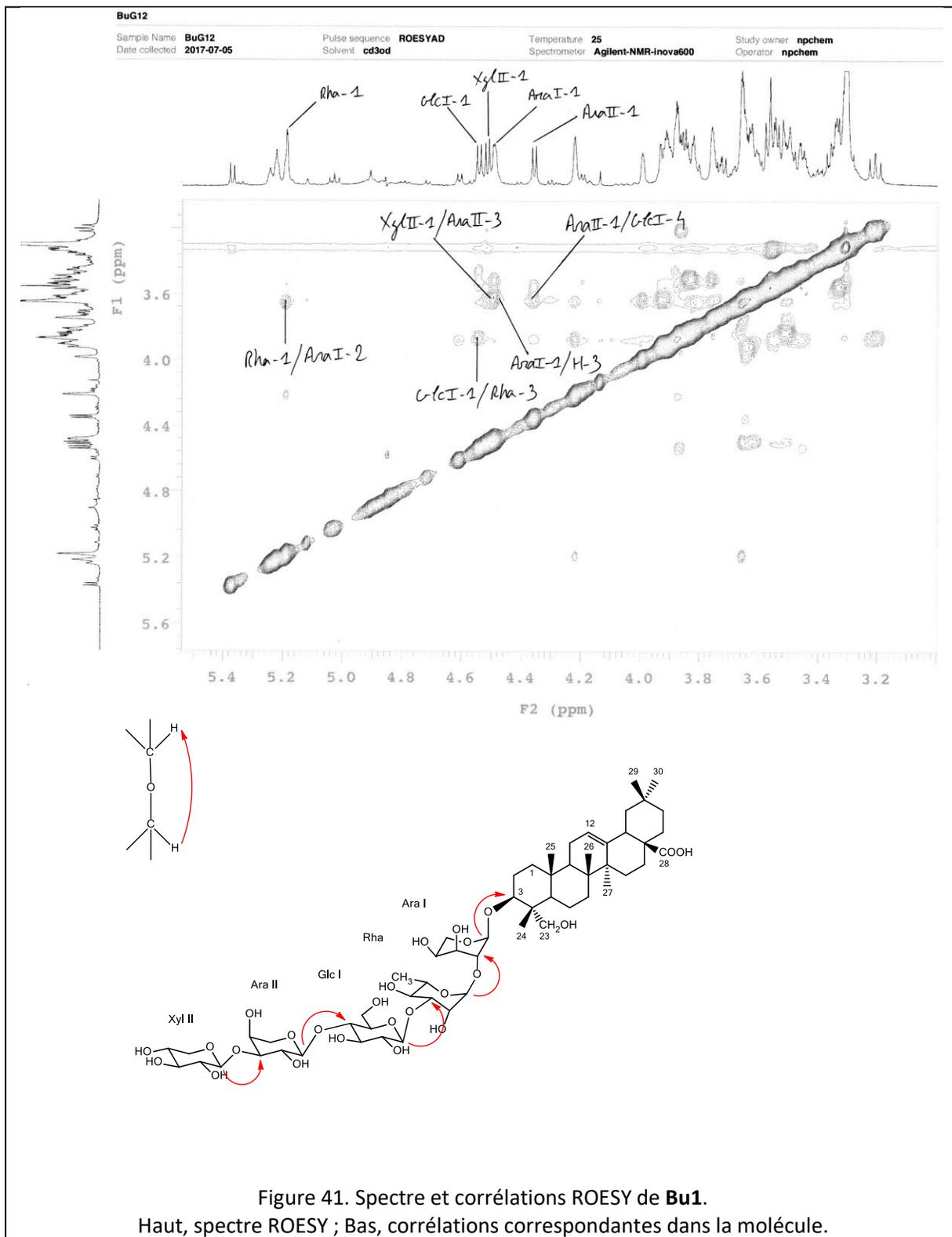
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.36 (d, $J = 7.5$ Hz) (Ara II-1)/78.7 (Glc I-4) et δ_H/δ_H 4.36 (d, $J = 7.5$ Hz) (Ara II-1)/3.57 (Glc I-4) confirment la liaison entre Ara II-1 et Glc I-4.

– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.51 (d, $J = 7.5$ Hz) (Xyl II-1)/82.0 (Ara II-3) et δ_H/δ_H 4.51 (d, $J = 7.5$ Hz) (Xyl II-1)/3.64 (Ara II-3) confirment la liaison entre Xyl II-1 et Ara II-3.

Sur la base de ces informations, la structure de **Bu1** est déterminée comme étant la suivante : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérageénine.







2.2.4 **Bu2** (*BuEB15*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu2**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1241$, correspondant à un poids moléculaire de 1218, compatible avec la formule brute $C_{59}H_{94}O_{26}$.

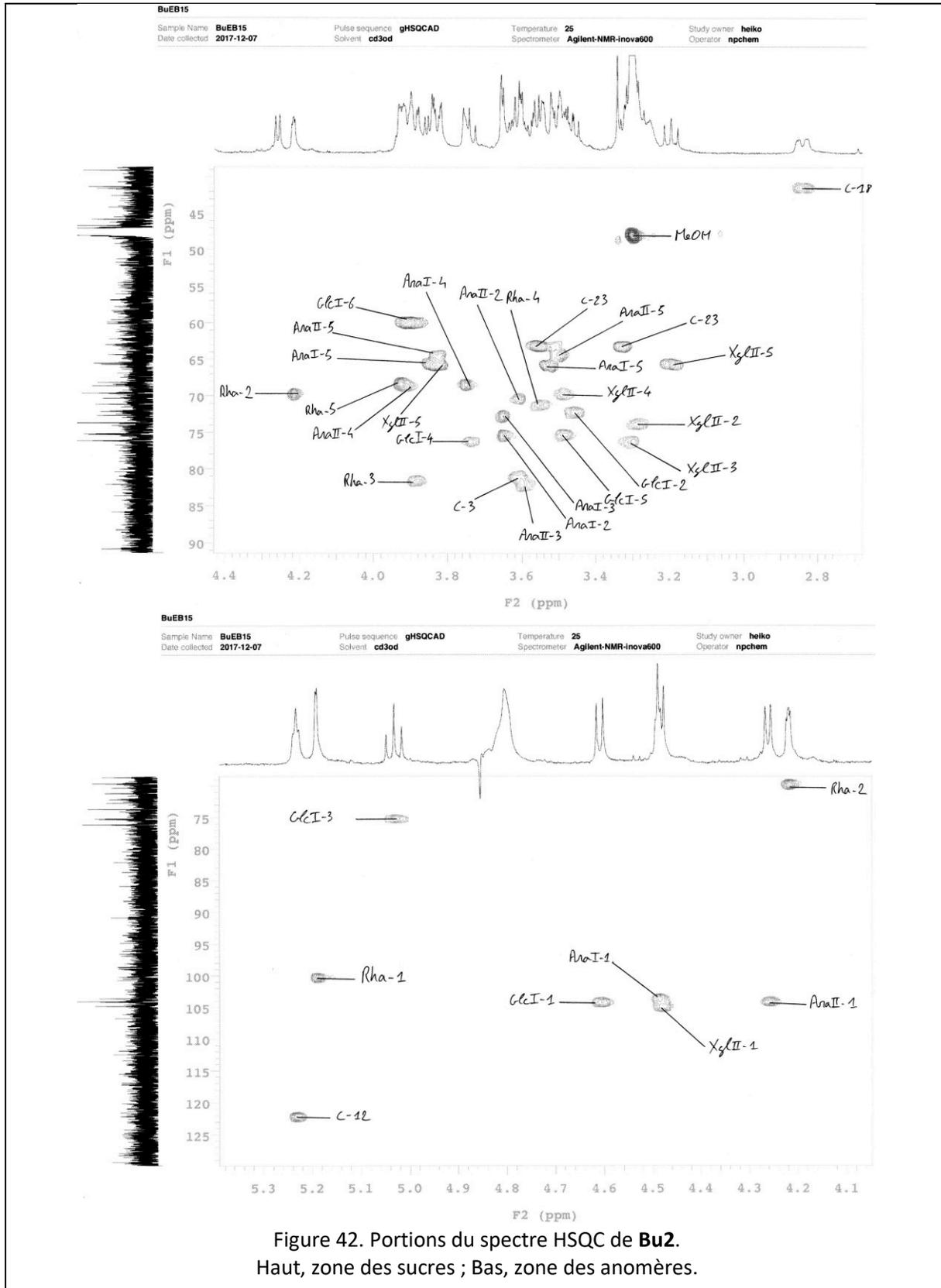
— Spectroscopie RMN

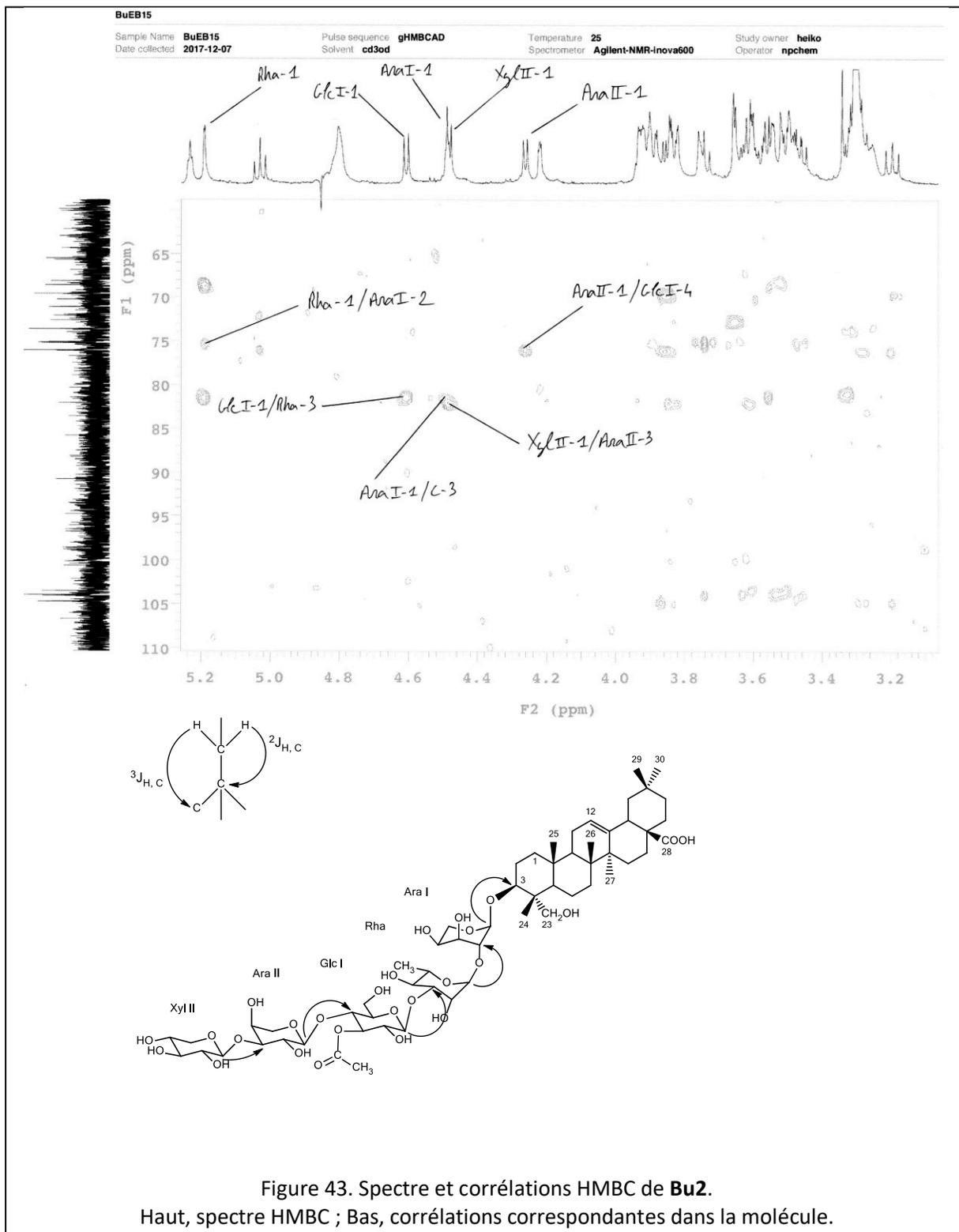
De manière similaire à **Bu1**, l'aglycone de **Bu2** est établi comme étant de l'hédéragénine sur la base d'une analyse RMN approfondie des spectres HMBC et HSQC.

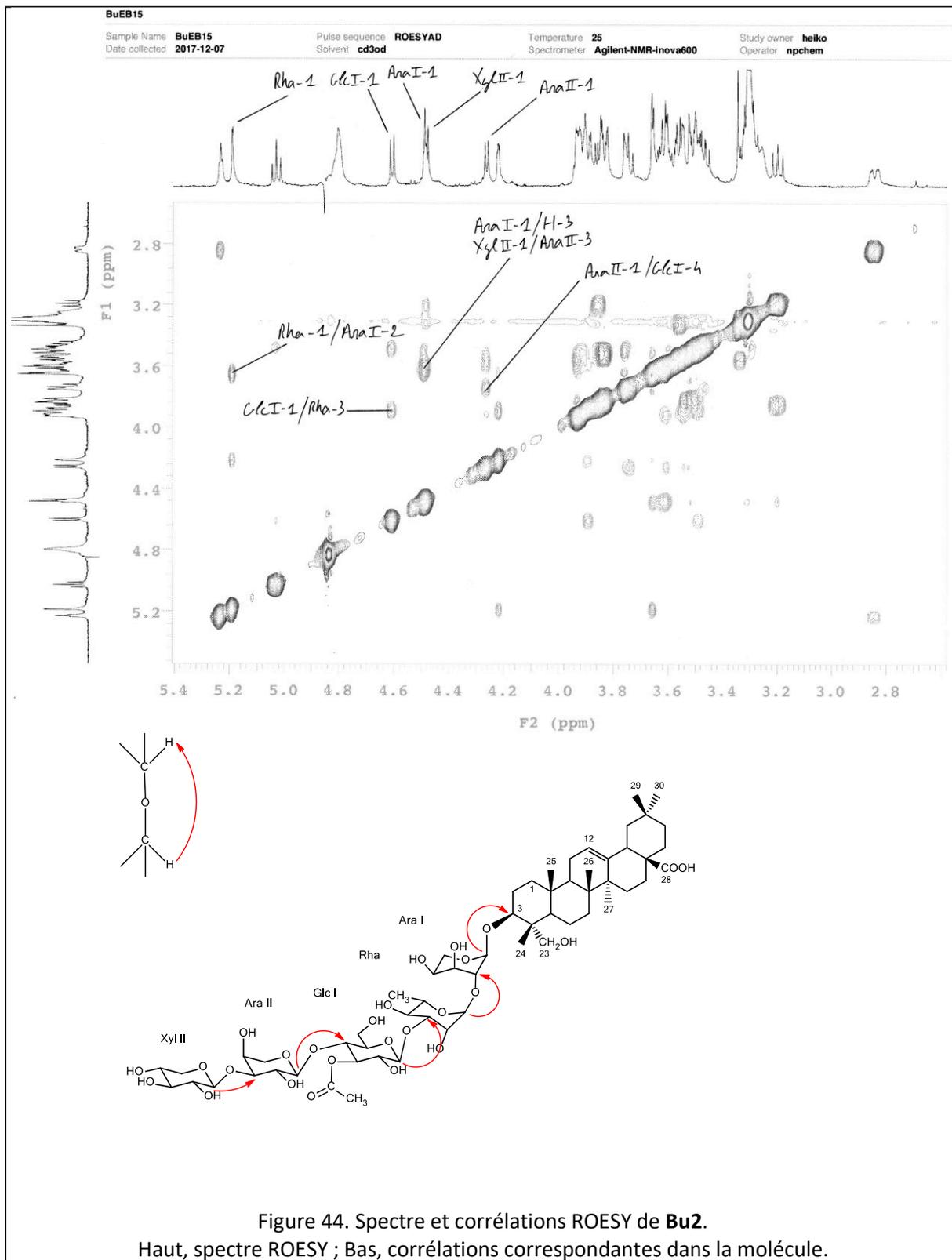
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu2** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.26 (d, $J = 6.4$ Hz) (Ara II-1)/104.0, 4.47 (d, $J = 7.6$ Hz) (Xyl II-1)/104.8, 4.48 (Ara I-1)/103.6, 4.60 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc I-1)/104.4 et 5.19 (br s) (Rha-1)/100.4. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant un Glc (Glc I), deux Ara (Ara I et Ara II), un Rha et un Xyl (Xyl II).

La nature identique de l'aglycone et des sucres de **Bu1** et **Bu2** suggère deux structures très similaires. Cette hypothèse est confirmée par analyse comparative des spectres HMBC et ROESY des deux composés, révélant un enchainement similaire des sucres de la chaîne oligosaccharidique branchée en C-3. Les seules particularités observées au niveau des données spectrales de **Bu2** concernent la présence de corrélations HSQC à δ_H/δ_C 2.09 (s, 3H)/20.0 (Ac CH₃) et à 5.03 (t, $J = 9.3$ Hz) (Glc I-3)/75.2 ainsi que 42 unités de masse atomique (uma) supplémentaires en spectrométrie de masse. Ces signaux sont typiques de la présence d'une fonction acétyle, absente chez **Bu1** mais localisée en Glc I-3 de **Bu2**.

La structure de **Bu2** est donc déterminée ainsi : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.2.5 **Bu3** (*BuGHO*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu3**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1229$, correspondant à un poids moléculaire de 1206, compatible avec la formule brute $C_{58}H_{94}O_{26}$.

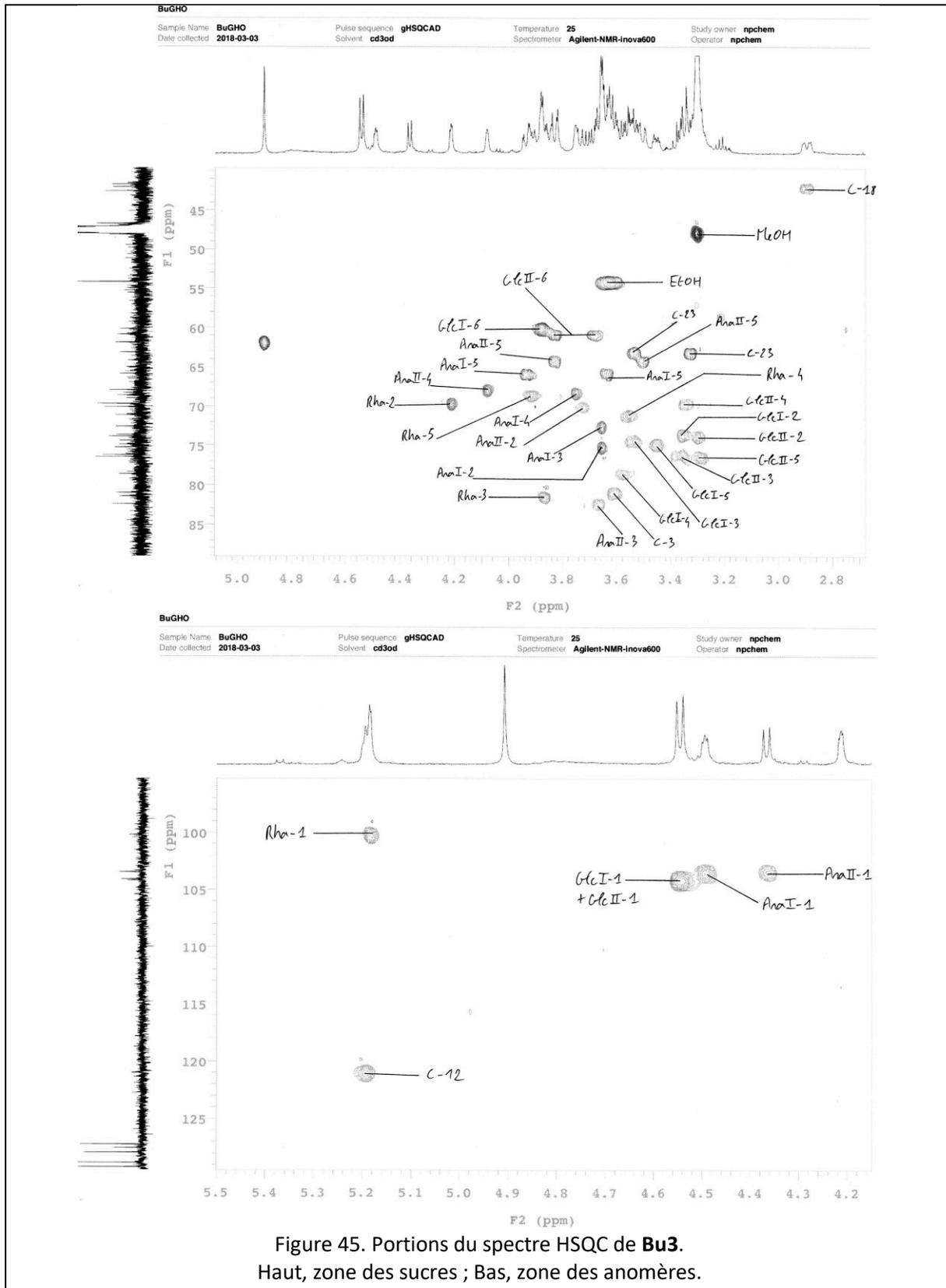
— Spectroscopie RMN

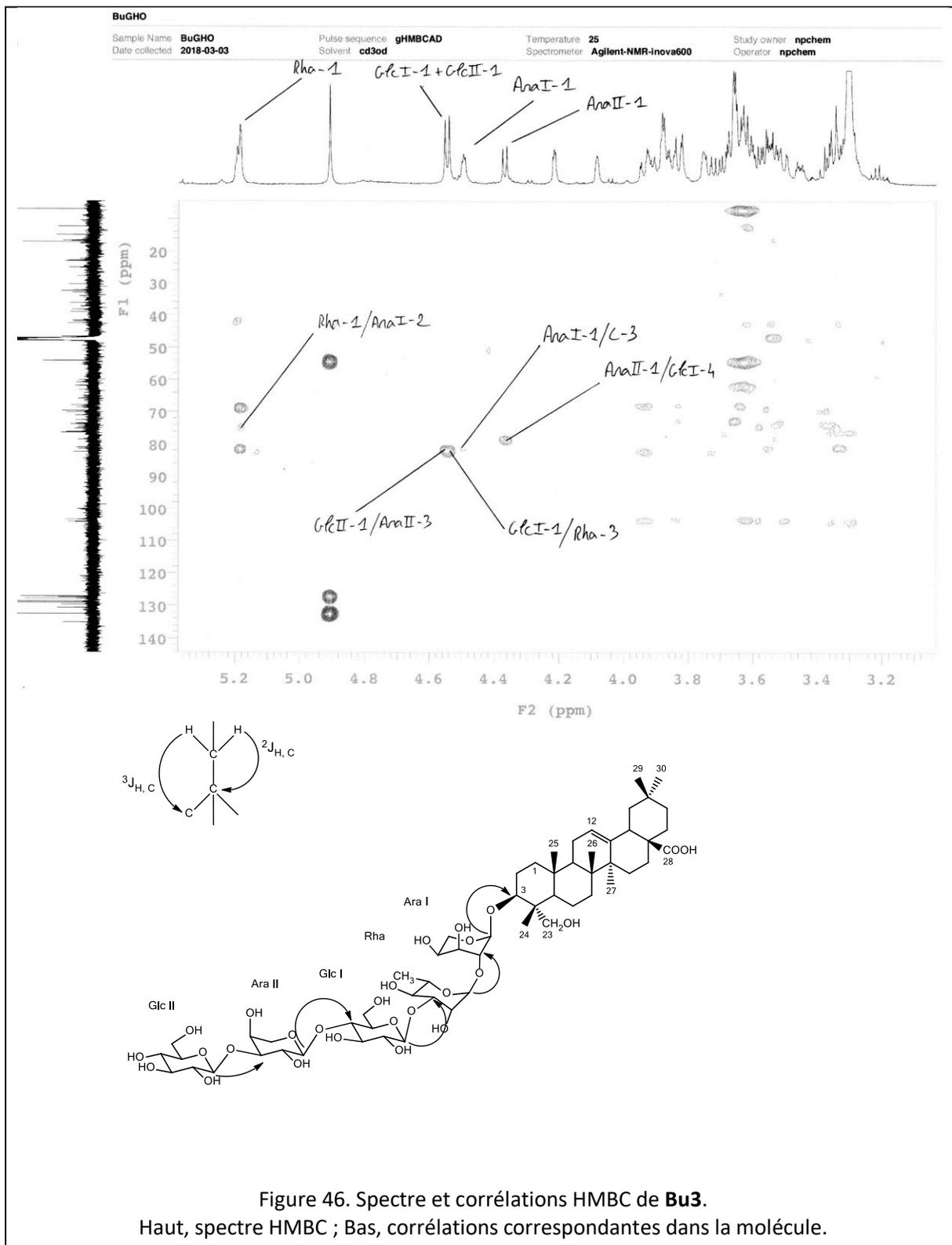
De manière similaire à **Bu1**, l'aglycone de **Bu3** est établi comme étant de l'hédéragénine.

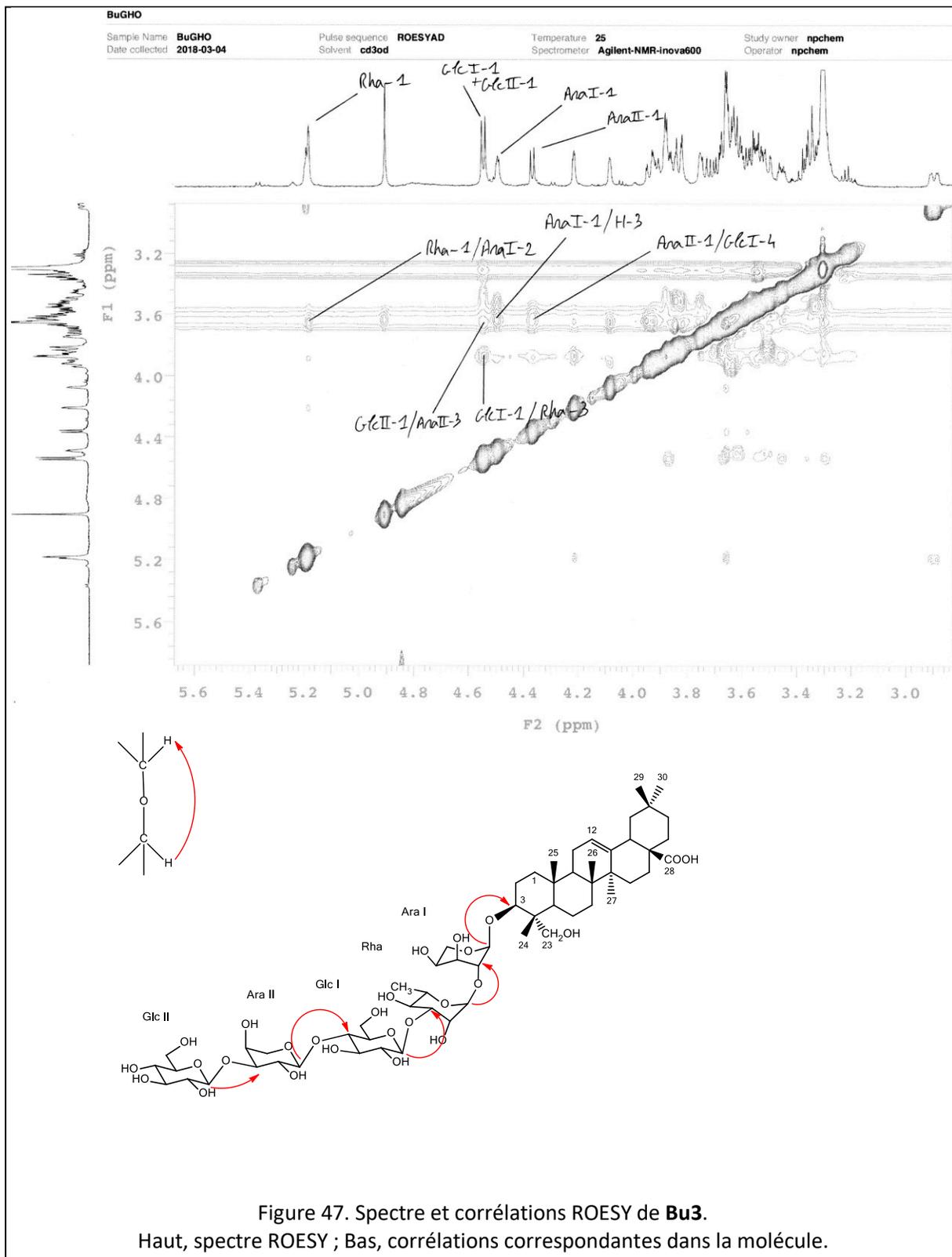
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu3** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.36 (d, $J = 7.6$ Hz) (Ara II-1)/103.5, 4.49 (br s) (Ara I-1)/103.5, 4.54 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc I-1)/104.1, 4.54 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc II-1)/104.2 et 5.19 (br s) (Rha-1)/100.2. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant deux Glc (Glc I et Glc II), deux Ara (Ara I et Ara II), un Rha.

L'analyse des spectres HMBC et ROESY révèle une chaîne oligosaccharidique en C-3 en grande partie similaire à celles de **Bu1** et **Bu2**. En effet, le motif structural Ara II-(1→4)-Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I est retrouvé chez les trois composés. La particularité du **Bu3** réside dans le fait qu'un Glc, nommé Glc II, vient substituer Ara II en sa position n°3 comme attesté par les corrélations HMBC et ROESY à δ_H/δ_C 4.54 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc II-1)/82.4 (Ara II-3) et δ_H/δ_H 4.54 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc II-1)/3.66 (Ara II-3), respectivement.

La structure de **Bu3** est donc déterminée comme la suivante : 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-arabinopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.2.6 **Bu4** (*BuDE32*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu4**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1199$, correspondant à un poids moléculaire de 1176, compatible avec la formule brute $C_{57}H_{92}O_{25}$.

— Spectroscopie RMN

De manière similaire à **Bu1**, l'aglycone de **Bu4** est établi comme étant de l'hédéragénine.

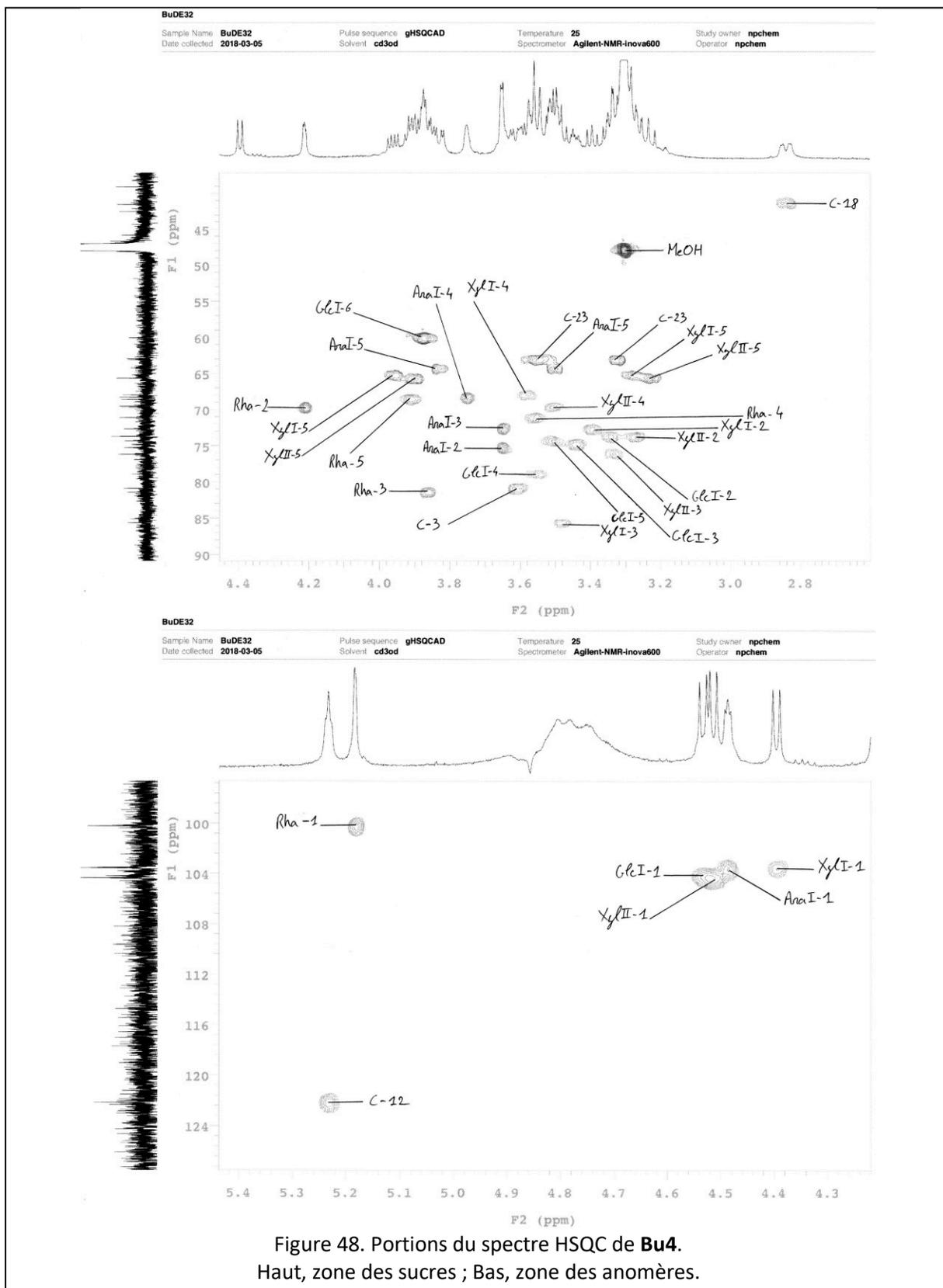
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu4** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.39 (d, $J = 6.6$ Hz) (Xyl I-1)/103.6, 4.49 (br s) (Ara I-1)/103.6, 4.51 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl II-1)/104.4, 4.53 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/104.4 et 5.18 (br s) (Rha-1)/100.2. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant deux Xyl (Xyl I et Xyl II), un Ara (Ara I), un Rha et un Glc (Glc I).

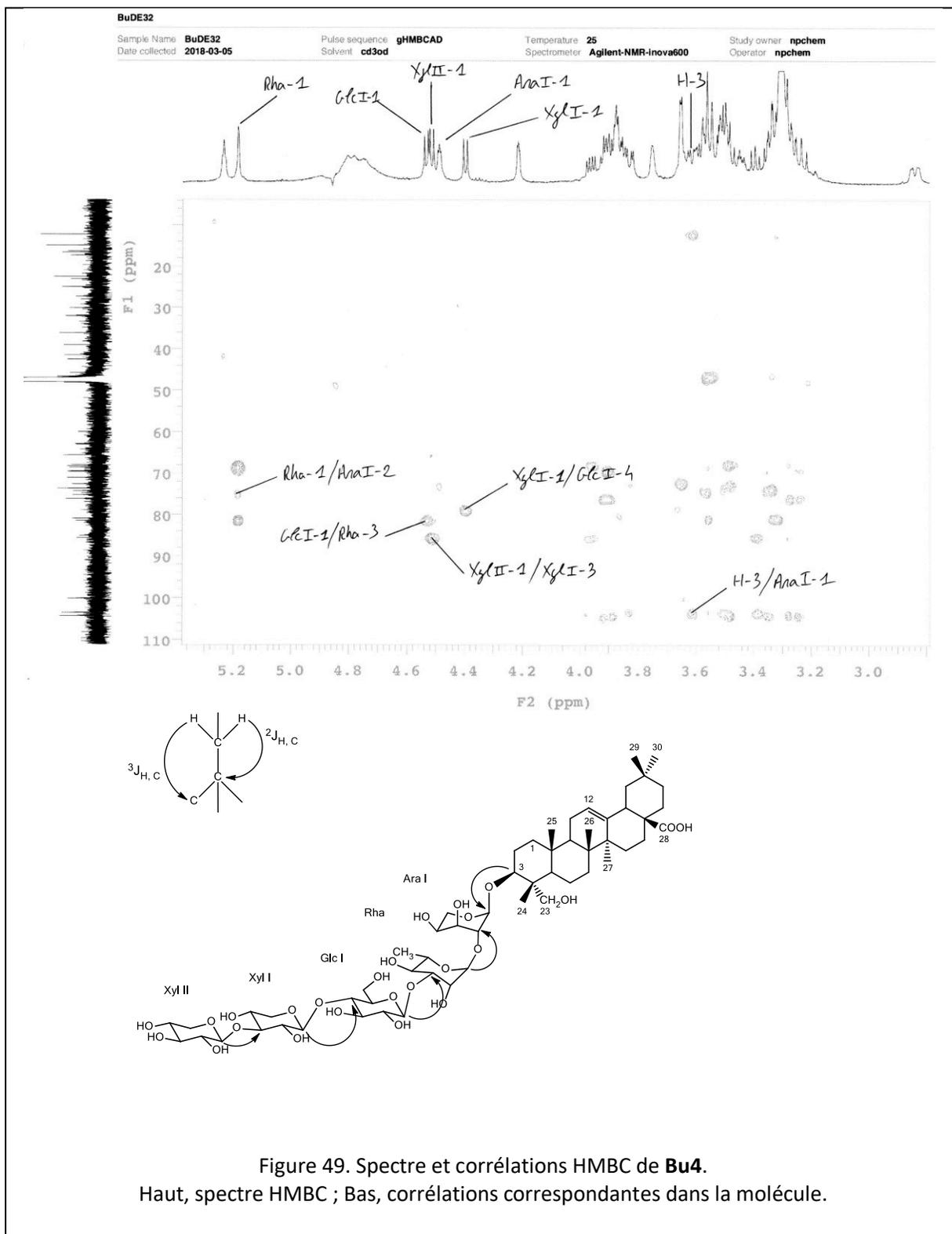
L'analyse détaillée des spectres HMBC et ROESY révèlent l'existence d'un motif structural conservé entre **Bu4** et les autres glycosides précédemment décrits, le trisaccharide Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I. Ce motif est redondant chez les saponines isolées du genre *Blighia* et sera retrouvé chez tous les composés nouvellement rapportés de l'espèce *Blighia unijugata*. On notera ici que la corrélation HMBC directe entre Ara I-1 et le C-3 de l'hédéragénine est masquée où n'est pas observée, c'est donc la corrélation HMBC inverse à δ_H/δ_C 3.60 (dd, $J = 12.3, 3.9$ Hz) (H-3)/103.6 (Ara I-1) qui vient appuyer cette liaison. La particularité structurale de **Bu4** réside dans la présence de deux unités Xyl, nommés Xyl I et Xyl II, liées entre elles par une liaison (1→3) *O*-glycosidique et au reste de la chaîne tri-saccharidique au niveau de la position n°4 du Glc I. Ces suppositions sont confirmées par les arguments spectroscopiques suivants :

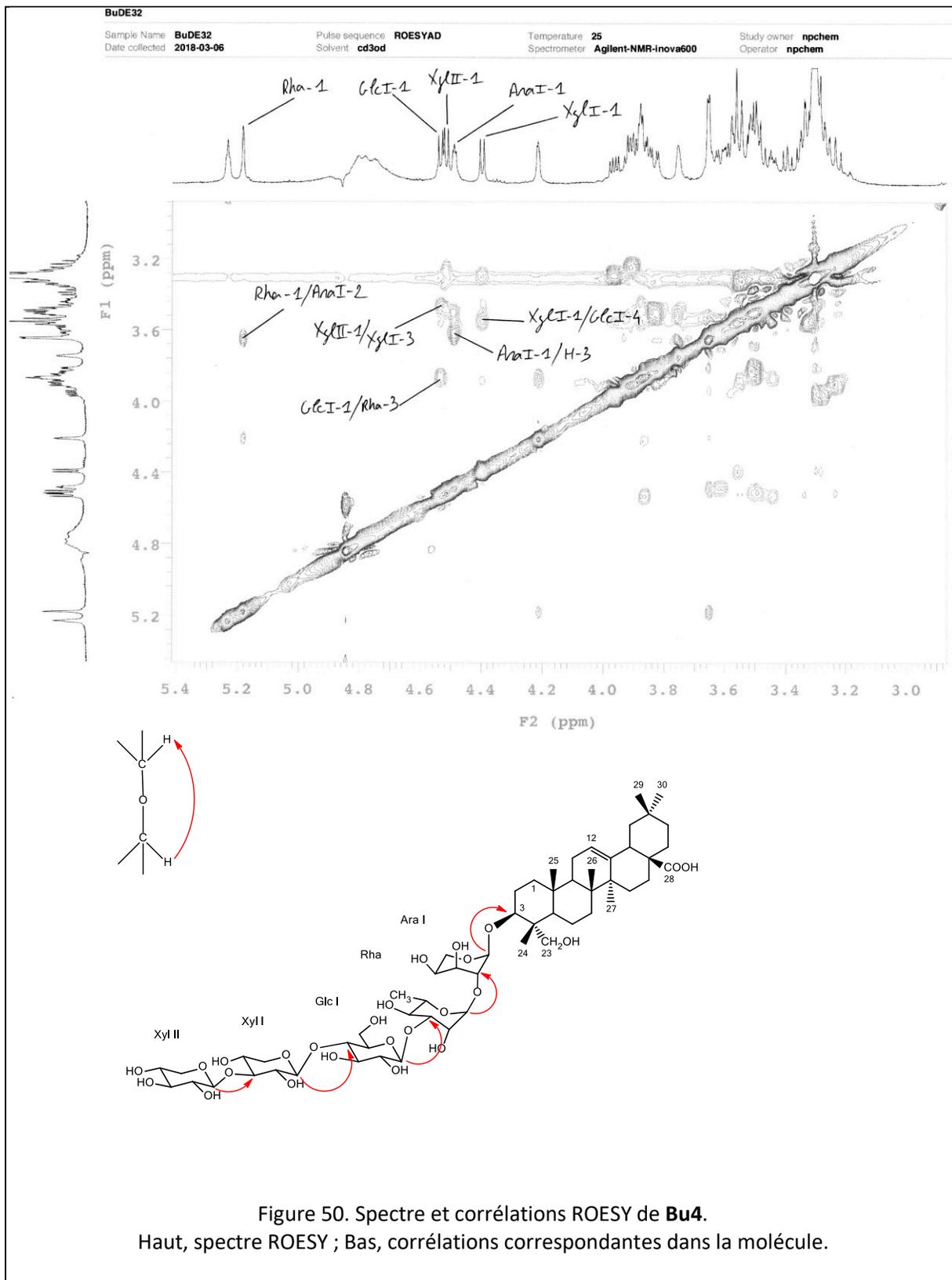
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.39 (d, $J = 6.6$ Hz) (Xyl I-1)/79.0 (Glc I-4) et δ_H/δ_H 4.39 (d, $J = 6.6$ Hz) (Xyl I-1)/3.55 (Glc I-4) prouvant la liaison entre Xyl I-1 et Glc I-4.

– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.51 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl II-1)/85.7 (Xyl I-3) et δ_H/δ_H 4.51 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl II-1)/3.48 (Xyl I-3) prouvant la liaison entre Xyl II-1 et Xyl I-3.

Sur la base de ces analyses RMN, la structure de **Bu4** est établie comme étant la suivante : 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.2.7 **Bu5** (*Bu2C1D1*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu5**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1241$, correspondant à un poids moléculaire de 1218, compatible avec la formule brute $C_{59}H_{94}O_{26}$.

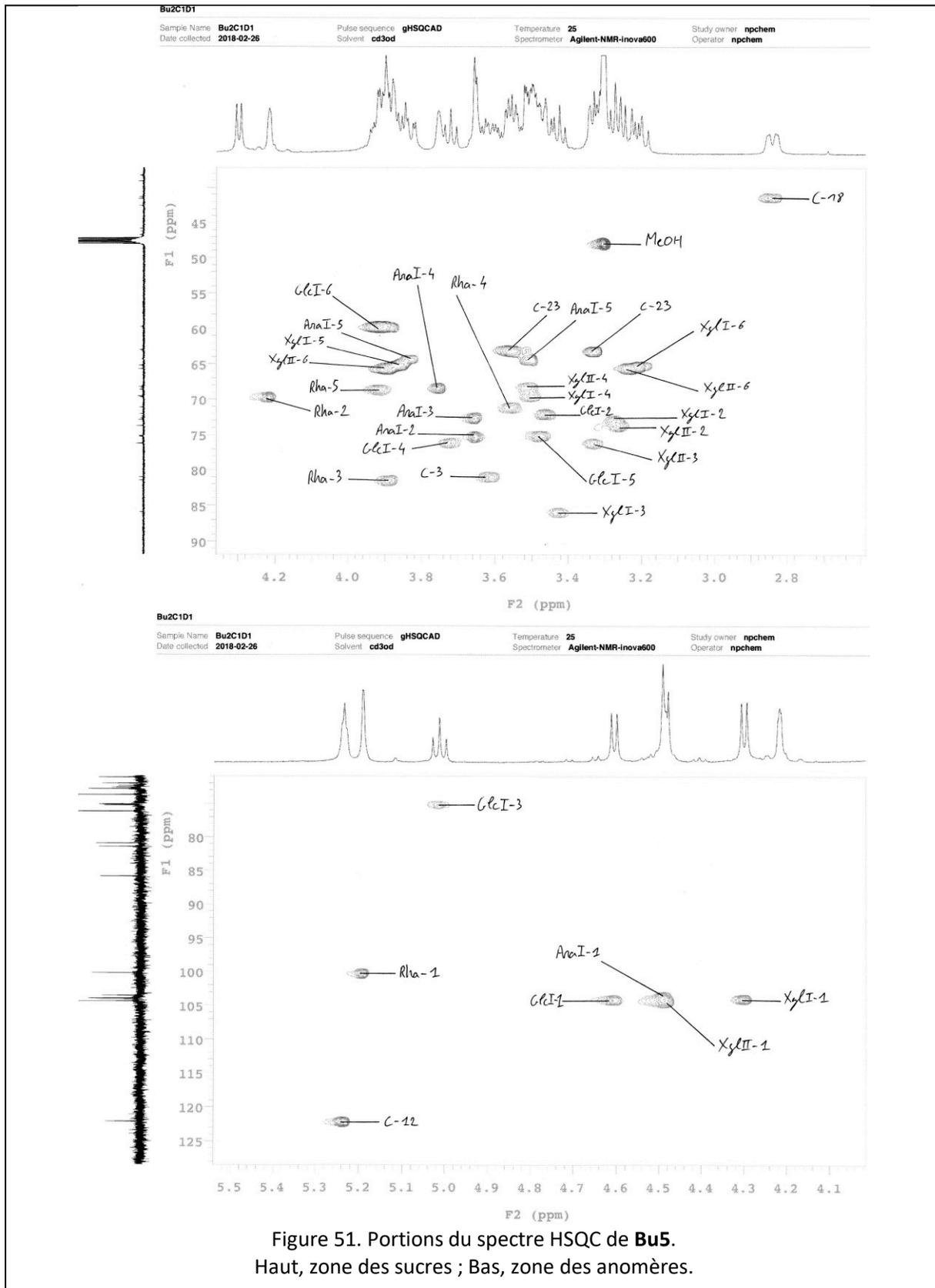
— Spectroscopie RMN

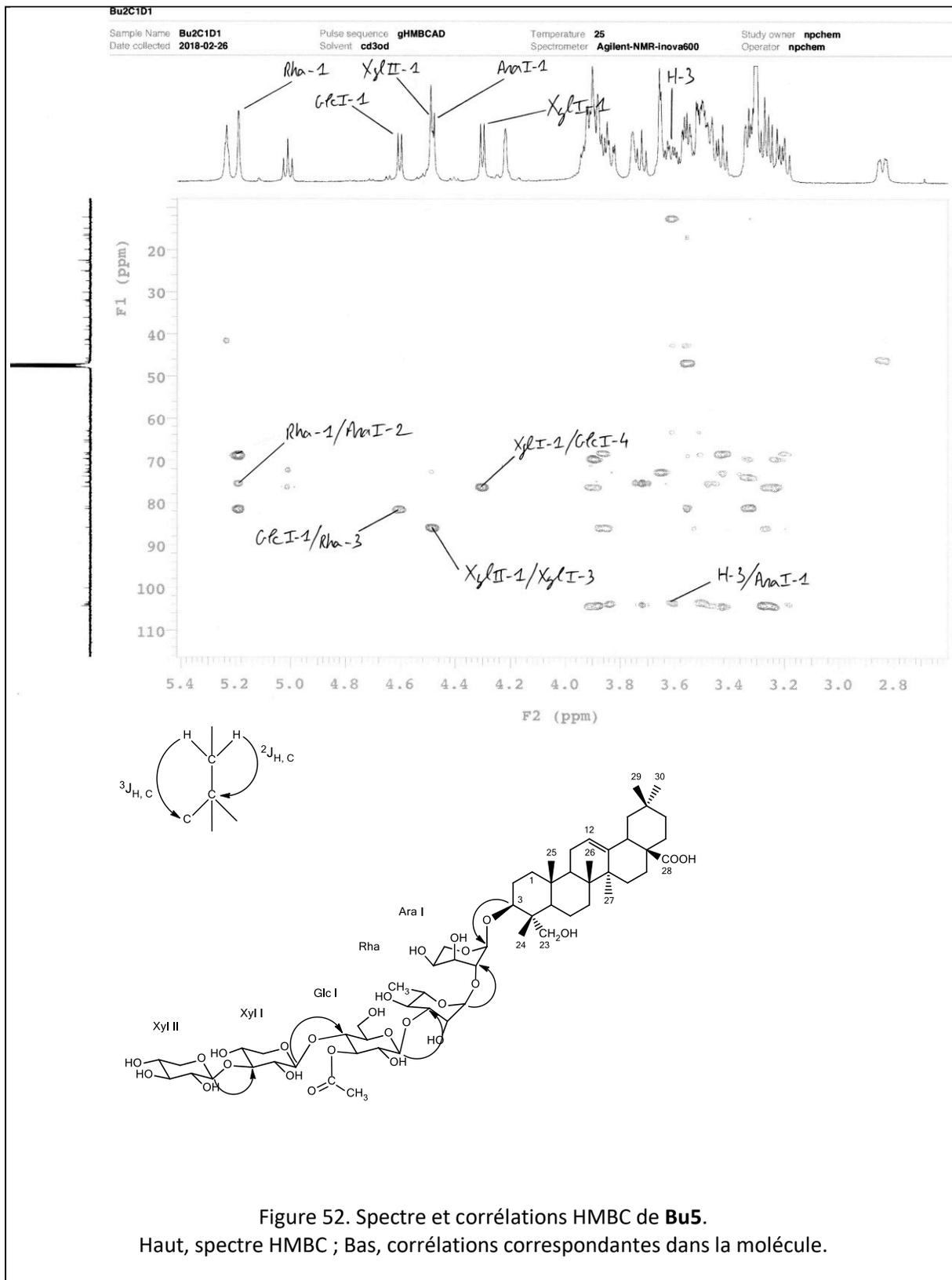
De manière similaire à **Bu1**, l'aglycone de **Bu5** est établi comme étant de l'hédéragénine.

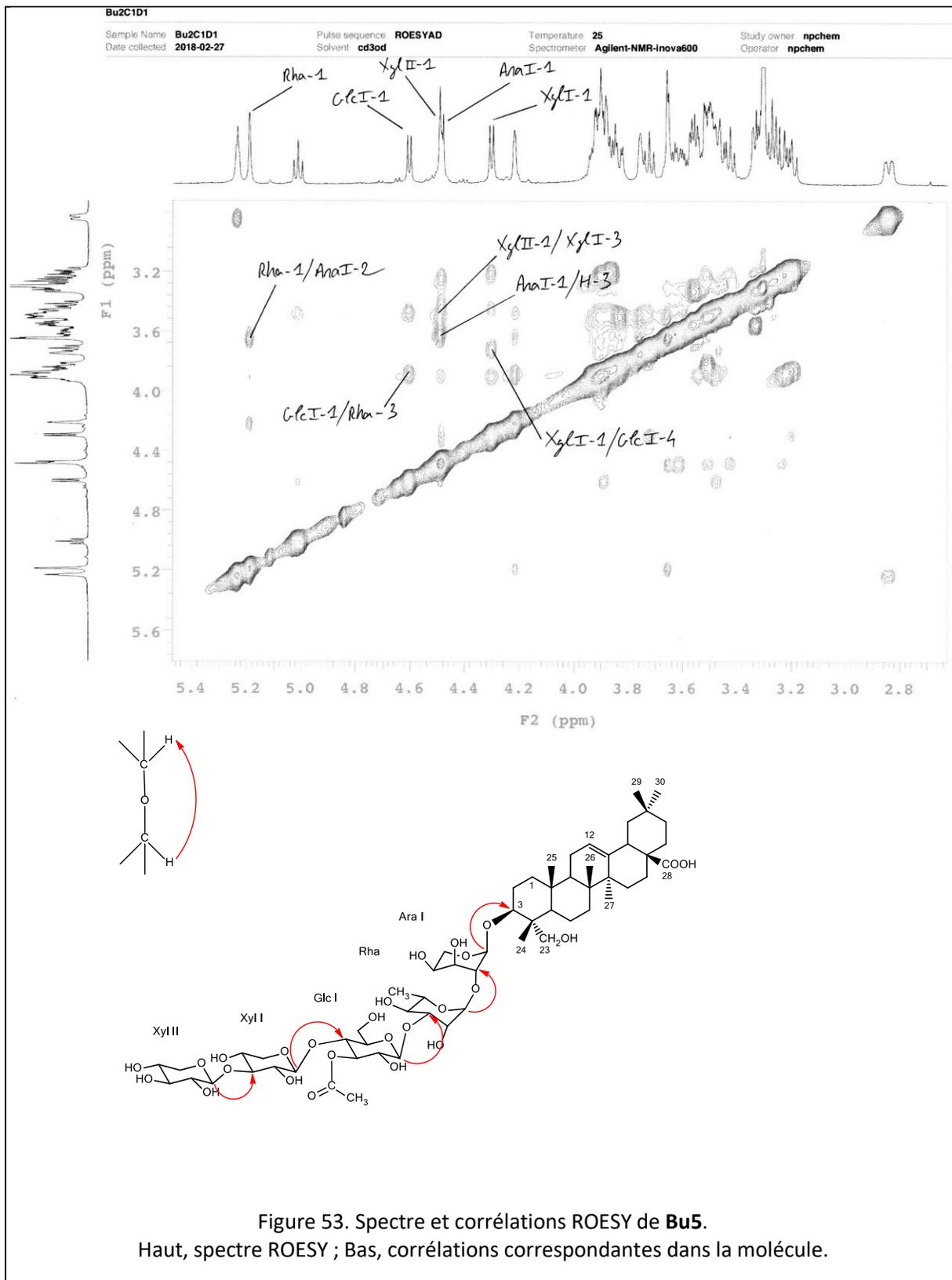
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu5** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.30 (d, $J = 7.6$ Hz) (Xyl I-1)/104.1, 4.48 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl II-1)/104.4, 4.49 (Ara I-1)/103.6, 4.60 (d, $J = 7.2$ Hz) (Glc I-1)/103.9 et 5.20 (br s) (Rha-1)/100.2. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant deux Xyl (Xyl I et Xyl II), un Ara (Ara I), un Rha et un Glc (Glc I).

La nature identique des sucres de **Bu4** et **Bu5** suggère de fortes similitudes structurales entre ces deux composés. Cette hypothèse est confirmée par analyse comparative de leurs spectres HMBC et ROESY, révélant un enchaînement similaire des sucres de la chaîne oligosaccharidique branchée en C-3. Les seules particularités observées au niveau des données spectrales de **Bu5** concernent la présence de corrélations HSQC à δ_H/δ_C 2.05 (s, 3H)/20.0 (Ac CH₃) et à 5.00 (t, $J = 9.7$ Hz) (Glc I-3)/75.2 ainsi que 42 uma supplémentaires en spectrométrie de masse. Ces signaux sont typiques de la présence d'une fonction acétyle, absente chez **Bu4** mais localisée en Glc I-3 de **Bu5**.

La structure de **Bu5** est donc déterminée ainsi : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.2.8 **Bu6** (*BuLow3_M*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu6**, en source ESI et mode positif, présente un ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 1368$, correspondant à un poids moléculaire de 1369, compatible avec la formule brute $C_{64}H_{104}O_{31}$.

— Spectroscopie RMN

De manière similaire à **Bu1**, l'aglycone de **Bu6** est établi comme étant de l'hédéragénine. Celle-ci présente toutefois une variation au niveau du C-28, dont le δ_C résonne à 176.7, valeur indicative d'une substitution de la fonction ester. **Bu6** serait donc un bidesmoside de l'hédéragénine porteur de fonctions glycosylées en C-3 et en C-28.

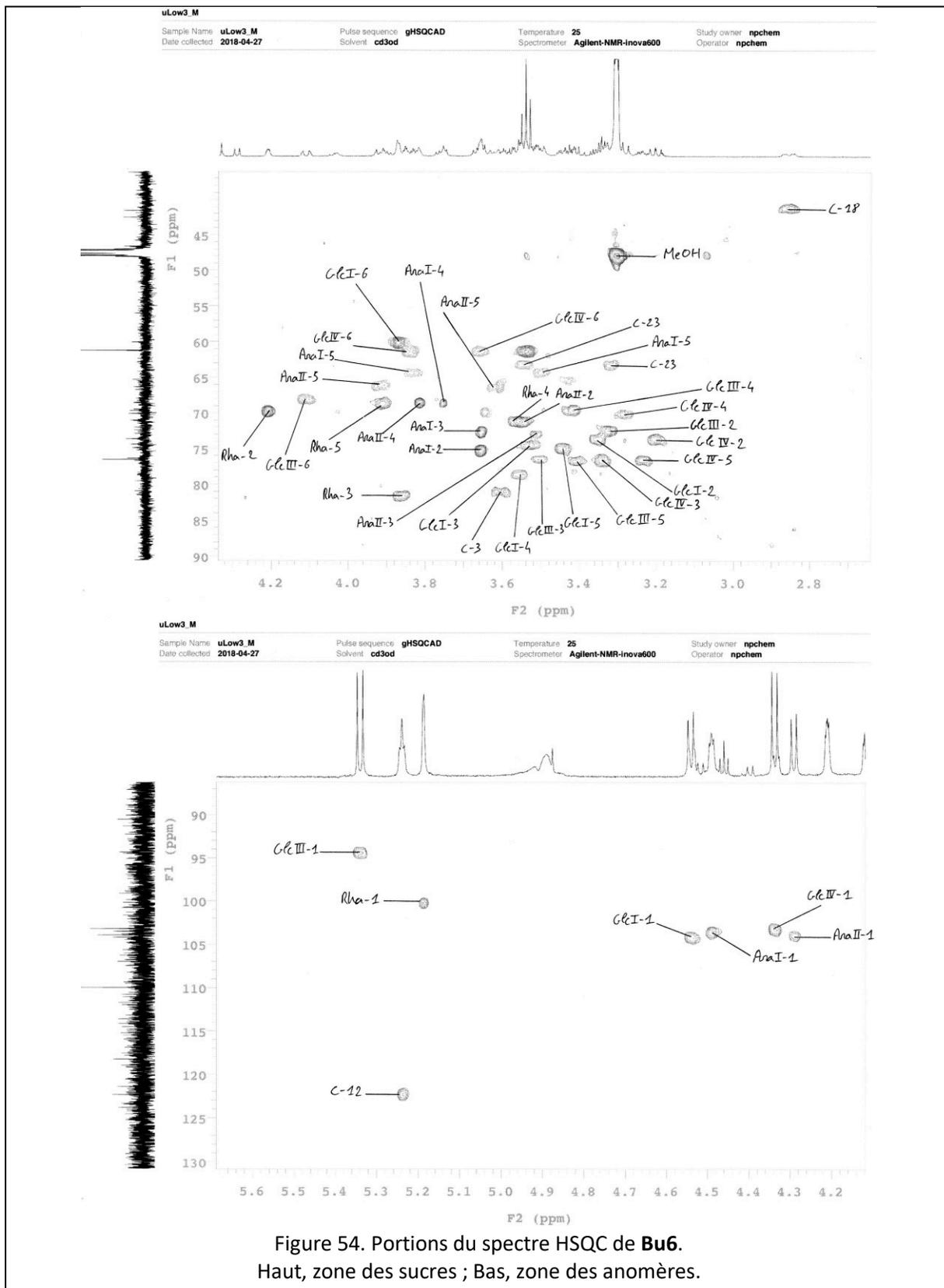
Dans la région des anomères, le spectre du proton de **Bu6** présente des signaux résonant à δ_H 4.29 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.49 (br s), 4.54 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.19 (br s) et 5.34 (d, $J = 8.4$ Hz), corrélant en HSQC avec d'autres signaux à δ_C 104.0, 103.2, 103.5, 103.9, 100.0 et 94.5, respectivement. Cela indique la présence de six sucres, identifiés par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme trois Glc (Glc I, Glc III et Glc IV), deux Ara (Ara I et II) et un Rha.

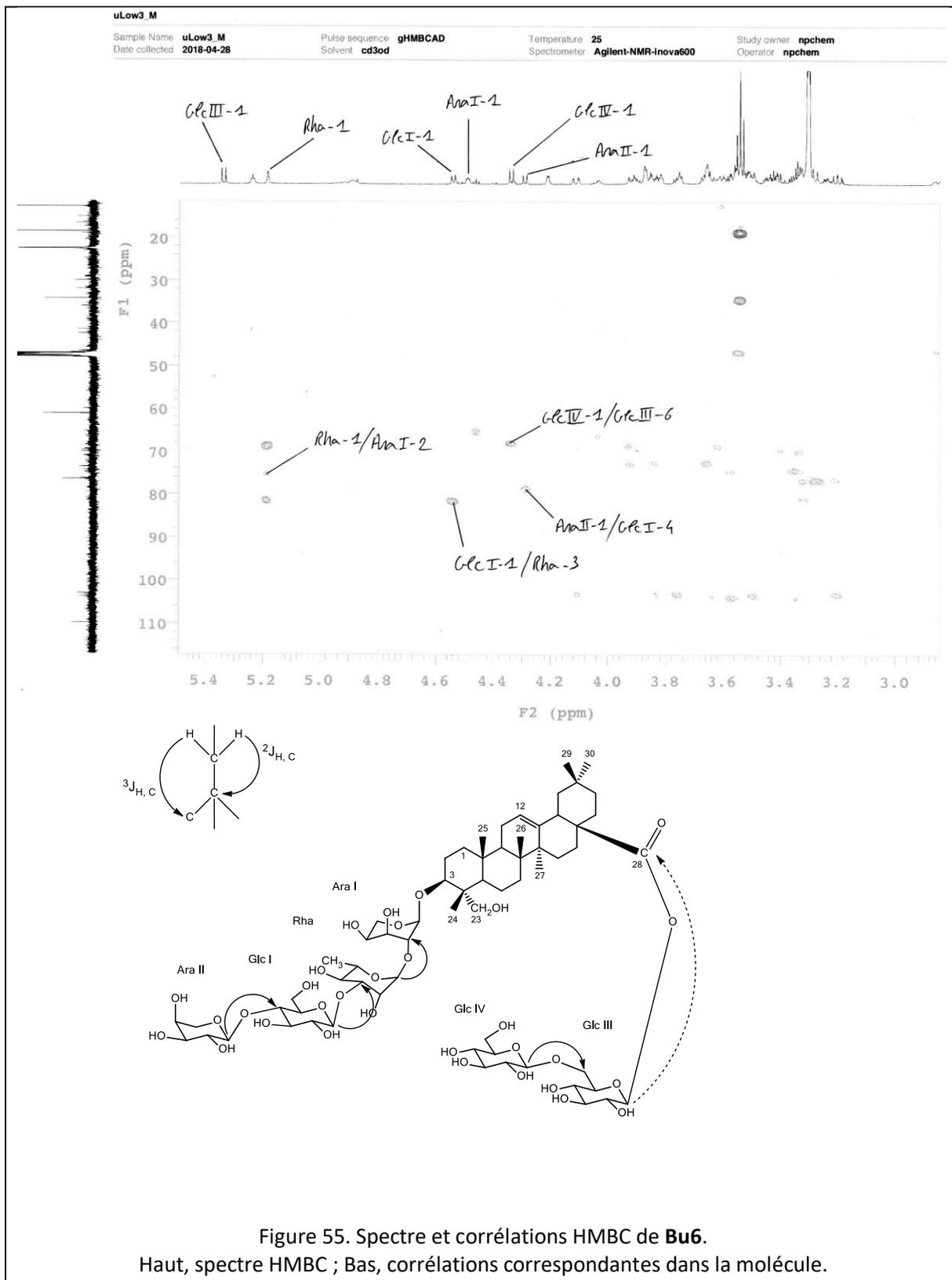
L'analyse détaillée des spectres HMBC et ROESY révèlent l'existence d'un motif structural conservé entre **Bu6** et les autres saponines **Bu1-3** décrites précédemment. L'oligosaccharide Ara II-(1→4)-Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I constitue donc la chaîne de sucre en C-3 de **Bu6** bien que la corrélation HMBC entre Ara I et C-3 ne soit pas observée. C'est la corrélation ROESY à δ_H/δ_H 4.49 (br s) (Ara I-1)/3.61 (H-3) à laquelle s'ajoute le déblindage du C-3 de l'aglycone à δ_C 81.0 qui viennent attester de la liaison entre Ara I-1 et C-3. La particularité structurale de **Bu6** réside dans la présence de deux unités Glc, nommés Glc III et Glc IV, liées entre elles par une liaison (1→6) *O*-glycosidique et au reste de la molécule par une liaison ester au niveau du C-28 de l'hédéragénine. Ces suppositions sont confirmées par les arguments spectroscopiques suivants :

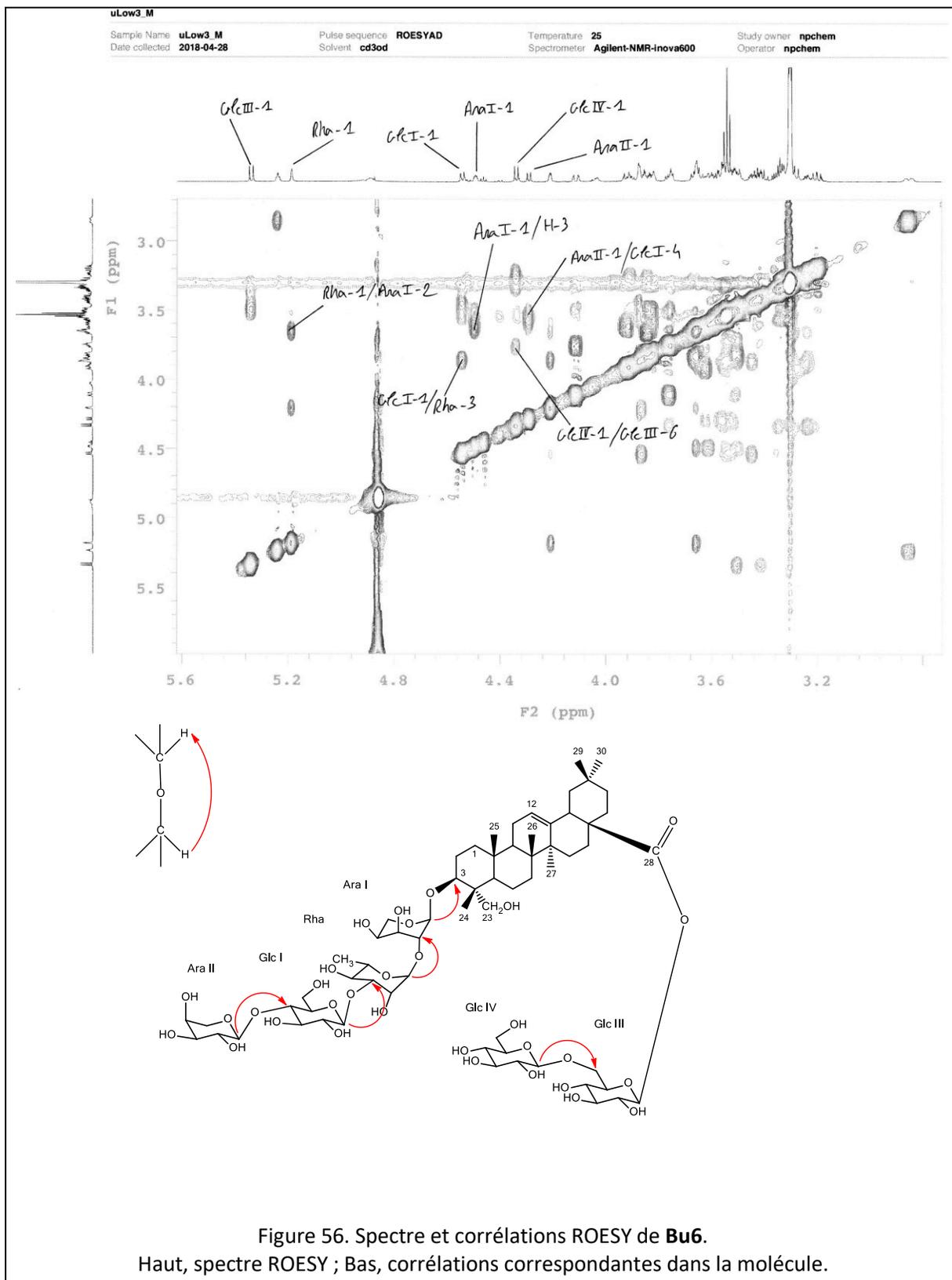
– La corrélation HMBC, à δ_H/δ_C 5.34 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc III-1)/176.7 (C-28) prouvant la liaison entre Glc III-1 et le C-28 de l'aglycone.

– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc IV-1)/67.0 (Glc III-6) et δ_H/δ_H 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc IV-1)/4.10 (dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz) (Glc III-6) prouvant la liaison entre Glc IV-1 et Glc III-6.

Sur la base de ces analyses RMN, la structure de **Bu6** est établie comme étant la suivante :
3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.







2.2.9 **Bu7** (*BuLOW135*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu7**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1229$, correspondant à un poids moléculaire de 1206, compatible avec la formule brute $C_{58}H_{94}O_{26}$.

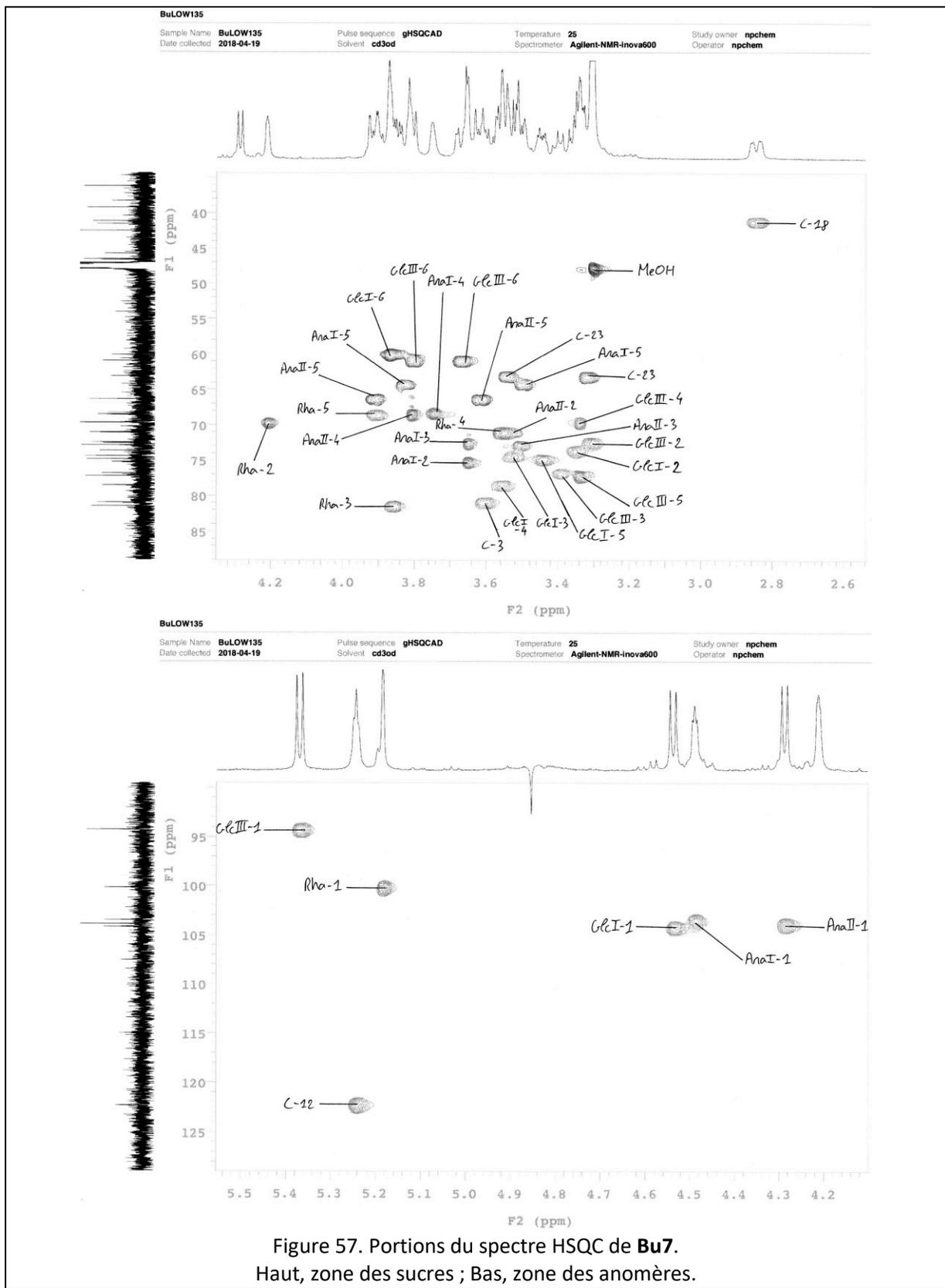
— Spectroscopie RMN

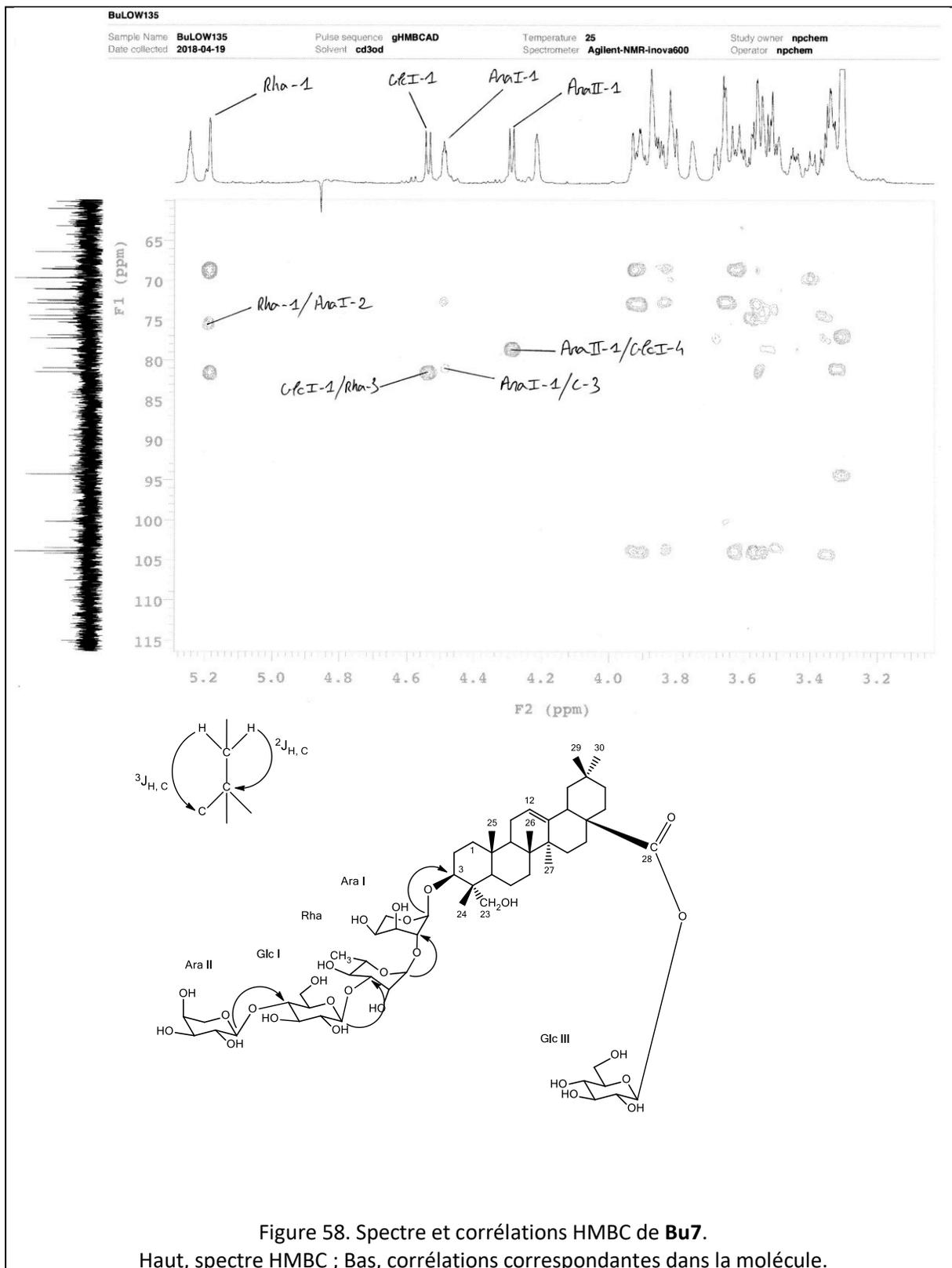
De manière similaire à **Bu6**, une analyse détaillée des données HMBC et HSQC de **Bu7** révèle de l'hédéragénine substituée en C-3 et C-28 comme aglycone.

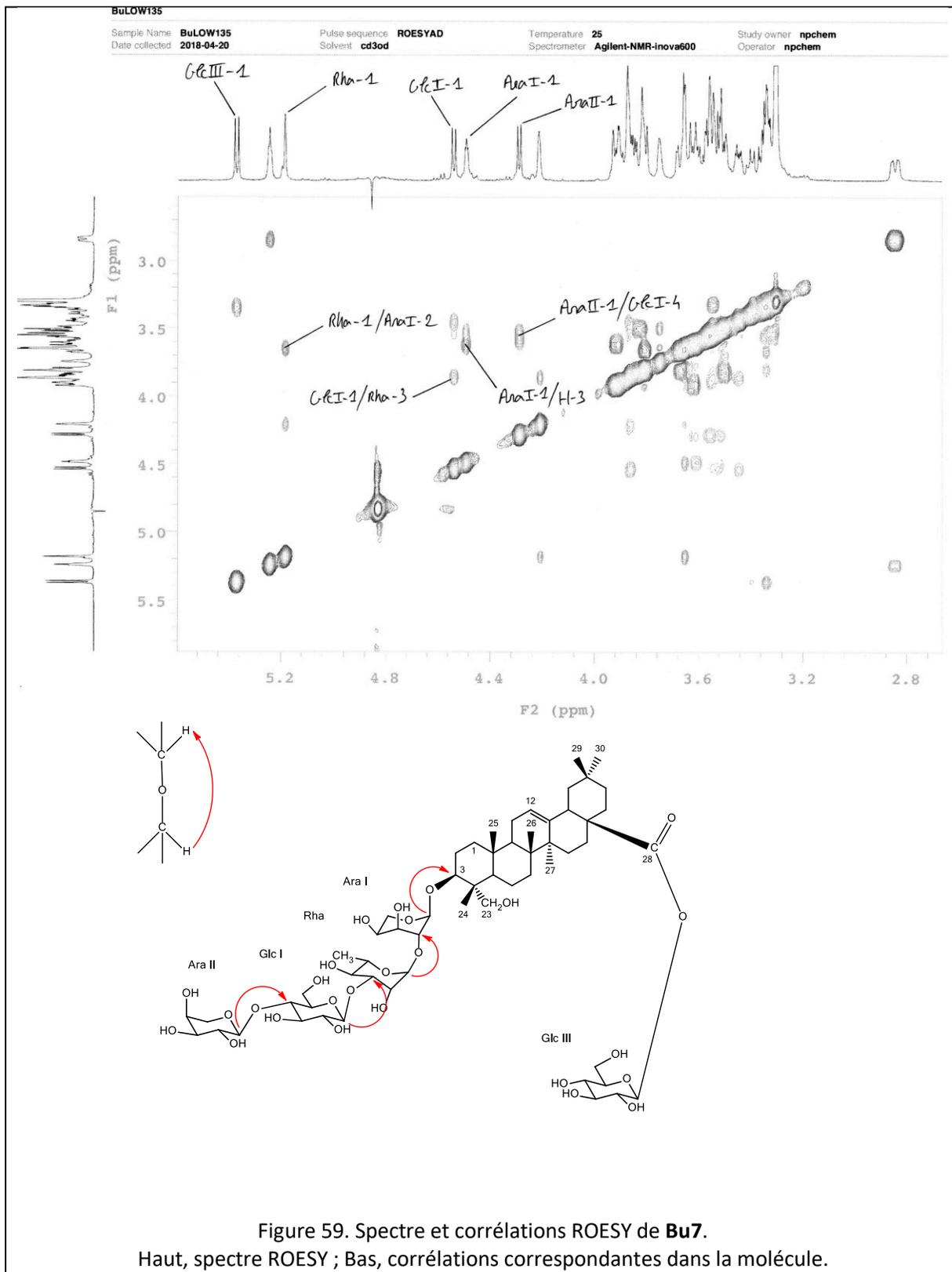
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu7** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.28 (d, $J = 7.8$ Hz) (Ara II-1)/103.9, δ_H/δ_C 4.49 (br s) (Ara I-1)/103.5, δ_H/δ_C 4.53 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc I-1)/104.2, δ_H/δ_C 5.18 (br s) (Rha-1)/100.2 et δ_H/δ_C 5.37 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc III-1)/94.3. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant deux Glc (Glc I et Glc III), deux Ara (Ara I et Ara II) et un Rha.

L'analyse HMBC et ROESY traduit une très forte similitude entre **Bu6** et **Bu7**, ces derniers présentent la même chaîne de sucre en C-3. La seule différence observable se situe au niveau de la chaîne en C-28, composée d'un seul résidu Glc (Glc III) chez **Bu7** contre un disaccharide de Glc (Glc IV-(1→6)-Glc III) chez **Bu6**. En l'absence d'une corrélation HMBC observable, la liaison ester entre Glc III-1 et C-28 est confirmée par le blindage de leurs valeurs respectives de δ_C à 94.3 et 176.7.

La structure de **Bu7** est donc déterminée comme étant la suivante : 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.







2.2.10 **Bu8** (*Bu1F3224*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bu8**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1229$, correspondant à un poids moléculaire de 1206, compatible avec la formule brute $C_{58}H_{94}O_{26}$.

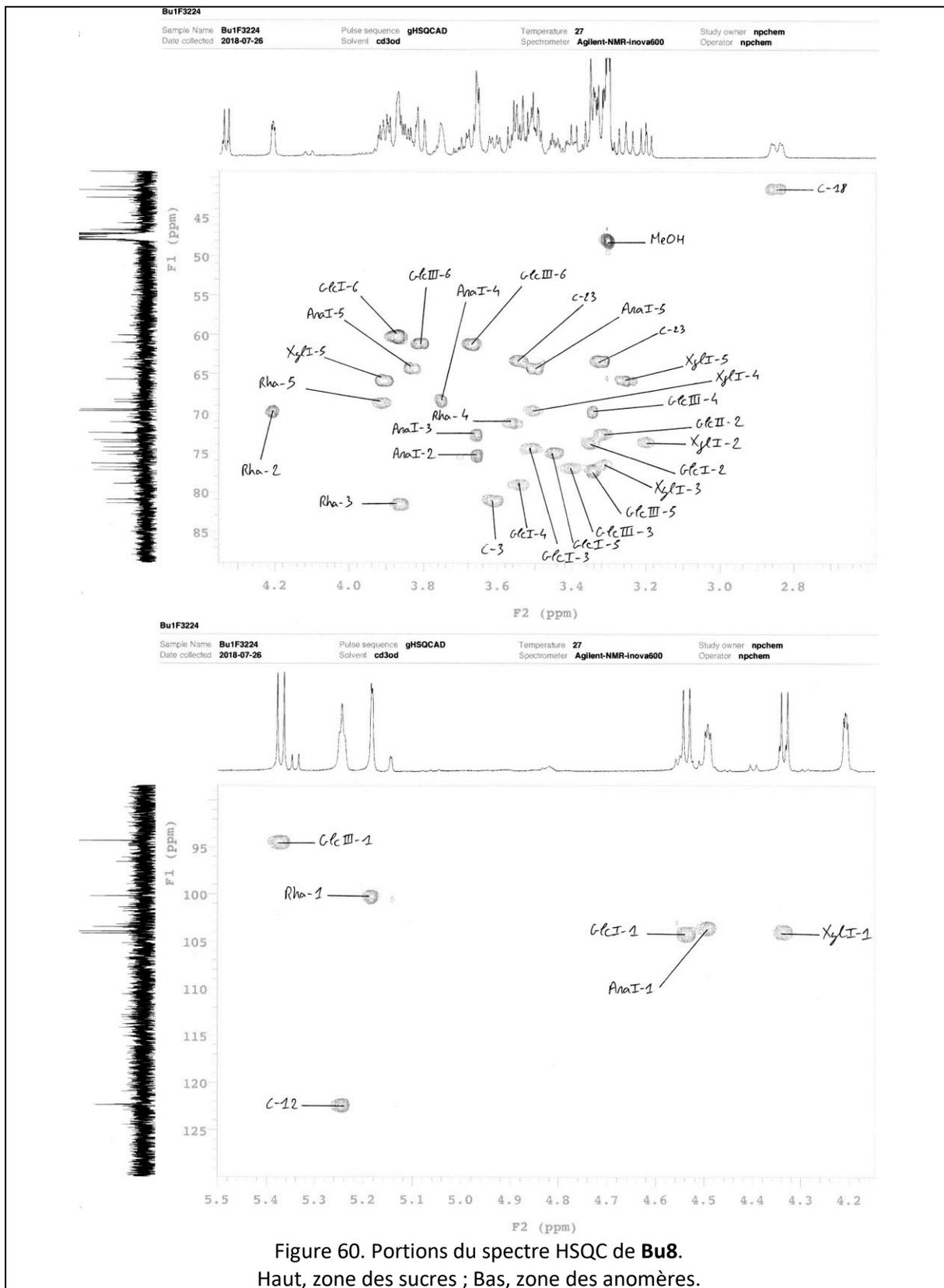
— Spectroscopie RMN

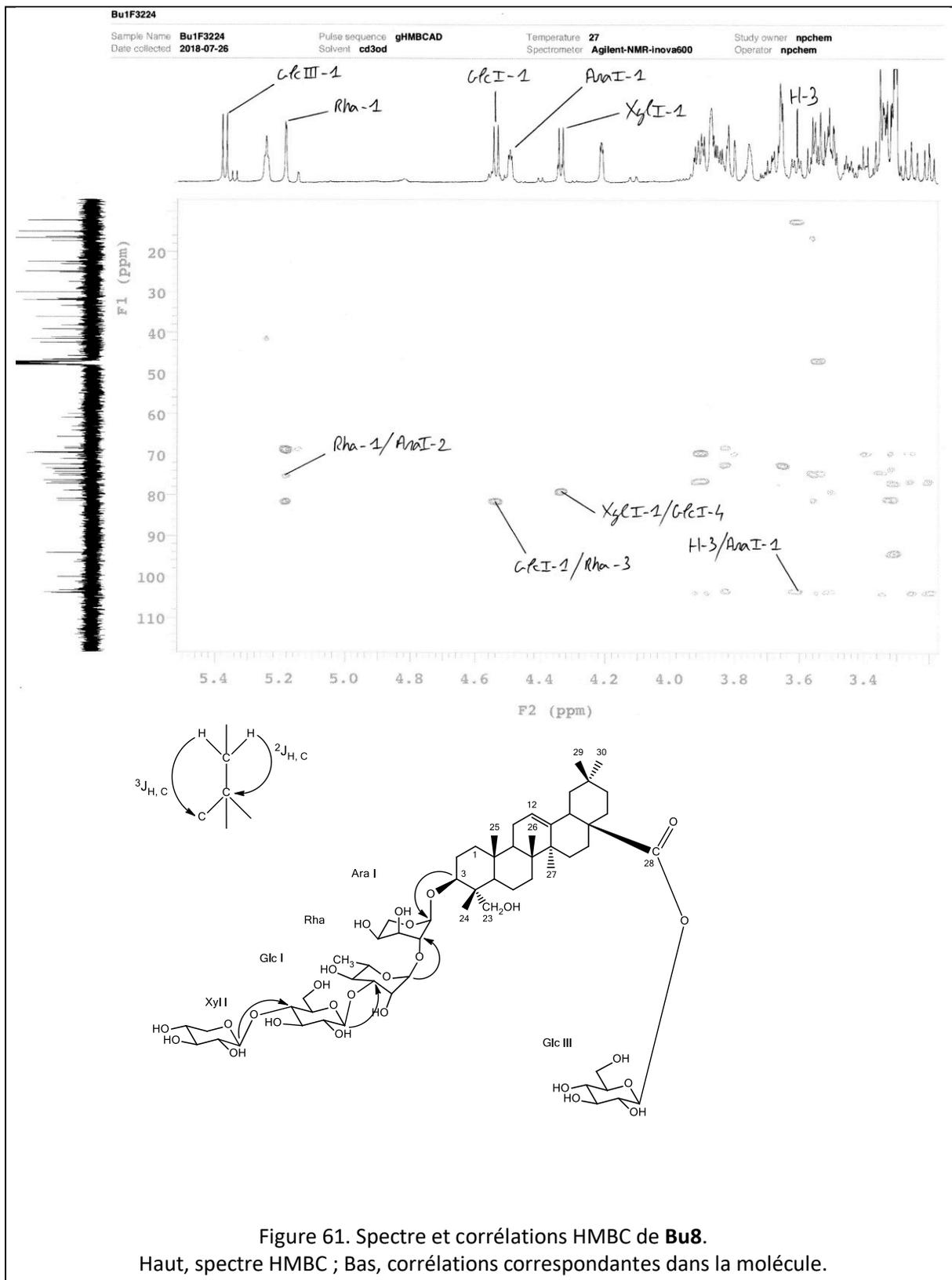
De manière similaire à **Bu6** et **Bu7**, une analyse détaillée des données HMBC et HSQC de **Bu8** révèle de l'hédéragénine substituée en C-3 et C-28 comme aglycone.

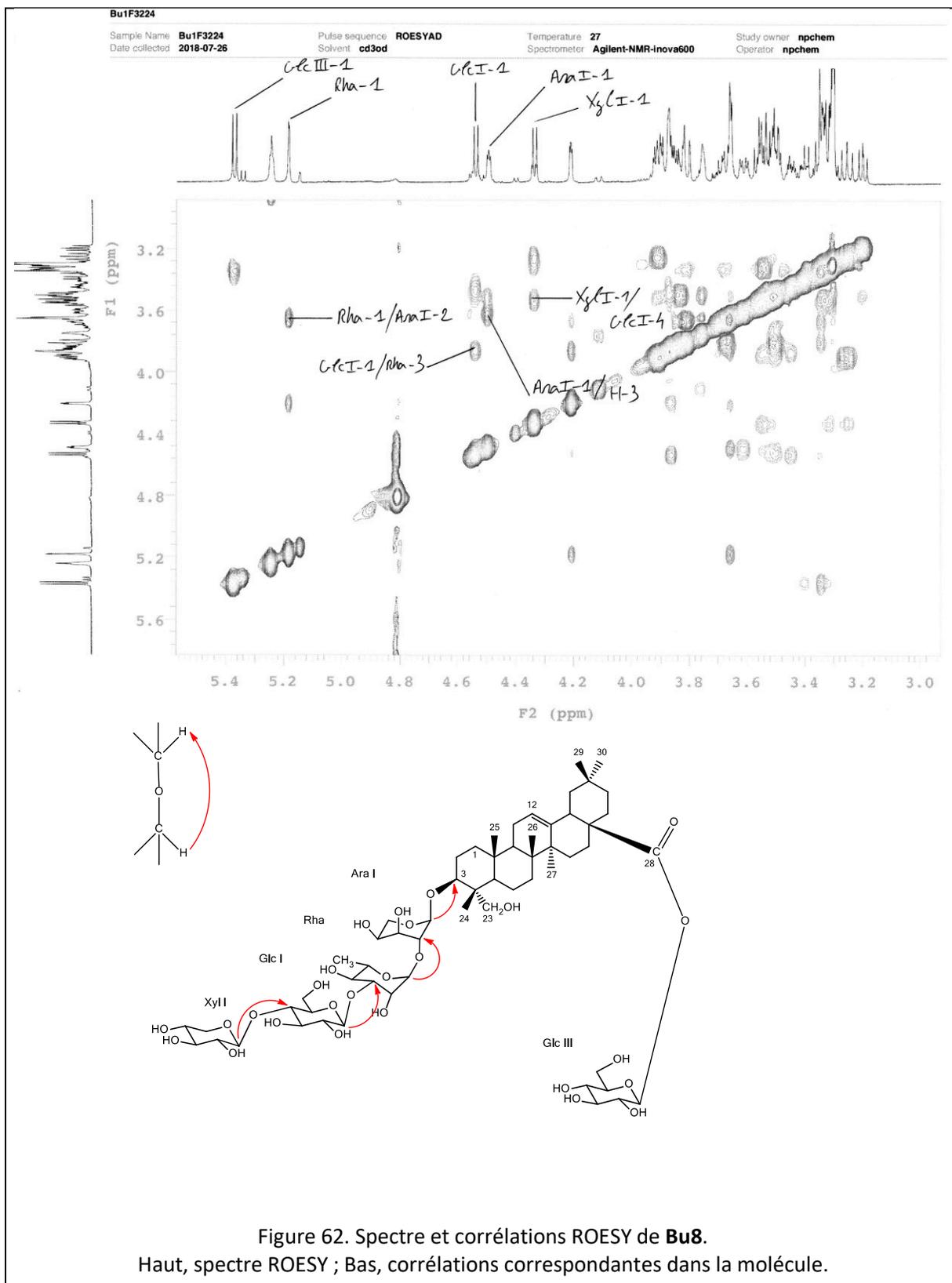
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bu8** présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl I-1)/103.9, δ_H/δ_C 4.49 (br s) (Ara I-1)/103.5, δ_H/δ_C 4.53 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/104.2, δ_H/δ_C 5.18 (br s) (Rha-1)/100.2 et δ_H/δ_C 5.37 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc III-1)/94.4. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant deux Glc (Glc I et Glc III), un Ara (Ara I), un Xyl (Xyl I) et un Rha.

Une analyse approfondie des données HMBC et ROESY permet de mettre en évidence de très fortes similitudes entre **Bu7** et **Bu8** concernant la nature des oligosaccharides retrouvés en C-3 et C-28. La liaison de ces derniers est assurée en C-3 par la corrélation HMBC inverse à δ_H/δ_H 3.61 (dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz) (H-3)/103.5 (Ara I-1) tandis qu'elle est confirmée en C-28 par le caractère blindé du C-28 et du Glc III-1 à δ_C 176.7 et 94.4, respectivement. La particularité de **Bu8** tient dans la partie terminale du tétra-saccharide en C-3, comportant un Xyl (Xyl I) chez **Bu8** contre un Ara (Ara II) chez **Bu7**. Cette hypothèse est confirmée par les corrélations HMBC et ROESY à δ_H/δ_C 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl I-1)/78.9 (Glc I-4) et δ_H/δ_C 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl I-1)/3.54 (Glc I-4).

La structure de **Bu8** est ainsi déterminée comme étant la suivante : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



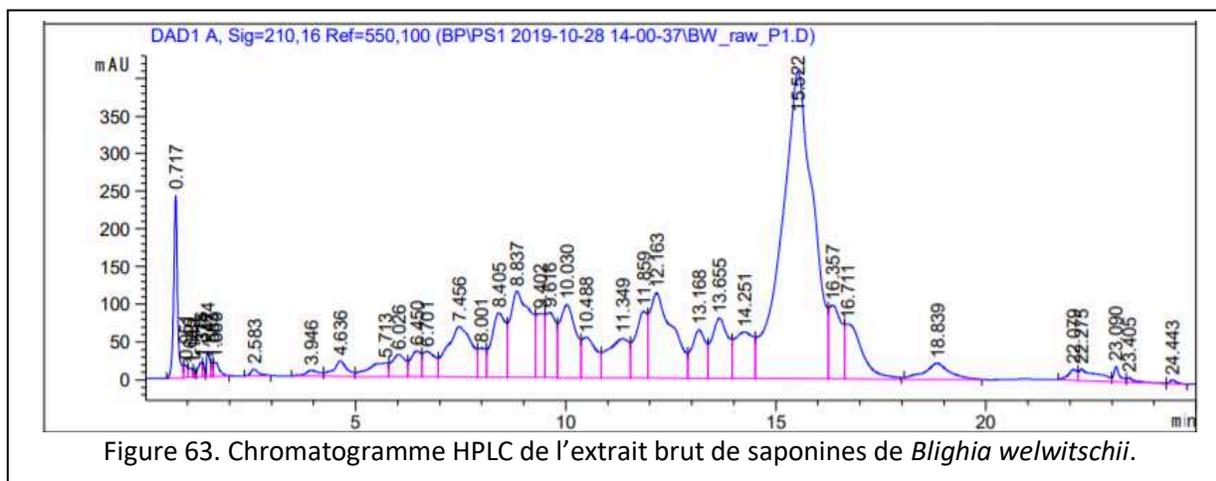




Chapitre 2.3 Exploration phytochimique de l'extrait de *Blighia welwitschii*

2.3.0 Analyse de l'extrait

Les analyses TLC et HPLC de l'extrait de *Blighia welwitschii* révèlent une richesse importante en métabolites. Au moins vingt-cinq composés différents sont dénombrés sur la base de leurs R_f et Tr en TLC et HPLC, respectivement. Les clusters de composés, identifiés lors de l'analyse HPLC de *Blighia unijugata*, sont beaucoup moins bien délimités chez *Blighia welwitschii*. Le chromatogramme HPLC révèle également l'existence d'un grand nombre de composés minoritaires dont les Tr sont proches. Ces caractéristiques en font un extrait difficile en ce qui concerne les perspectives d'isolement de composés.



2.3.1 Isolement des composés

Treize isolats ont été obtenus à partir de l'extrait brut de *Blighia welwitschii*. Les méthodes employées pour les obtenir ainsi que les quantités de matière utilisées sont détaillées dans le schéma d'isolement suivant.

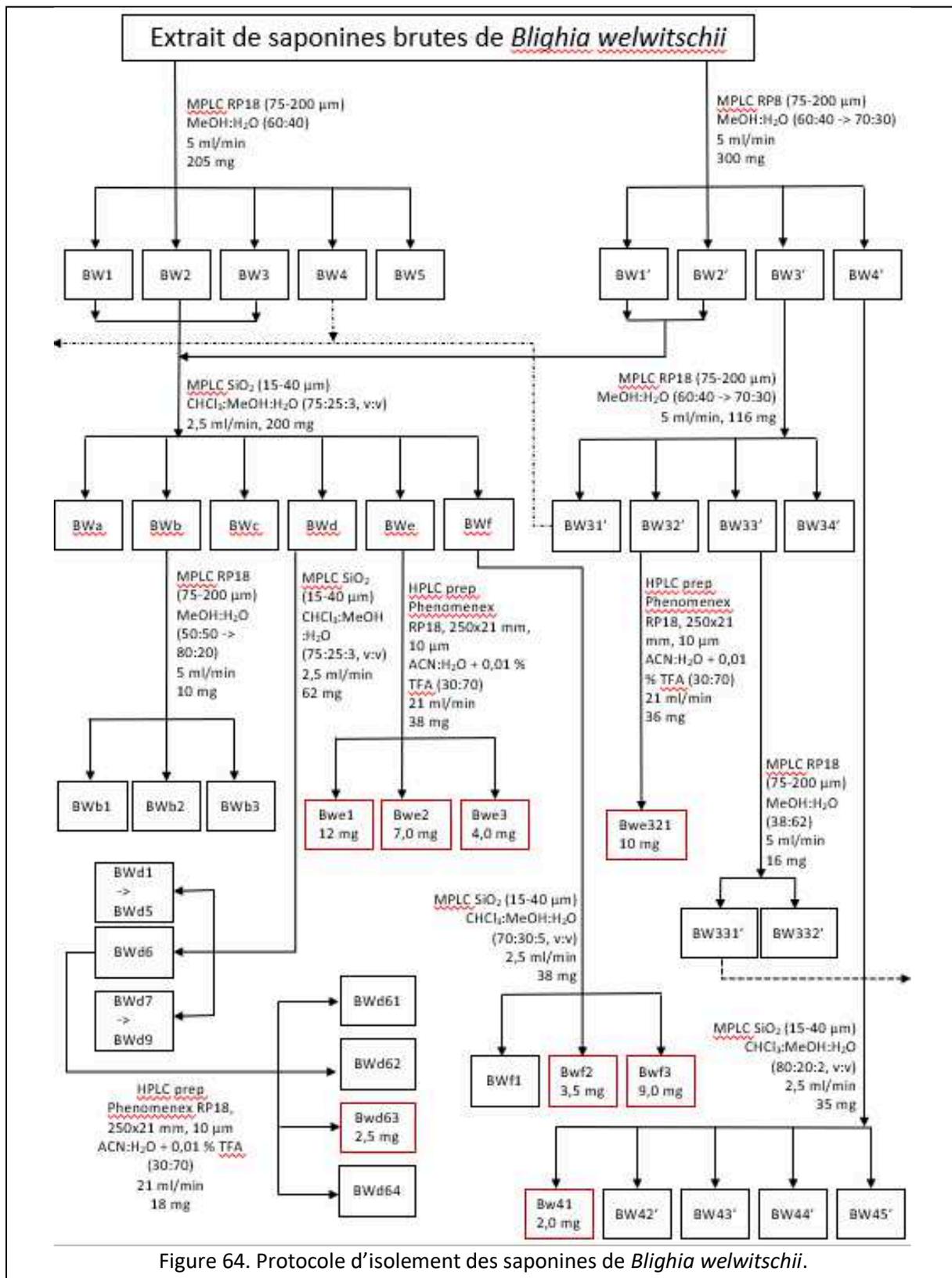


Figure 64. Protocole d'isolement des saponines de *Blighia welwitschii*.

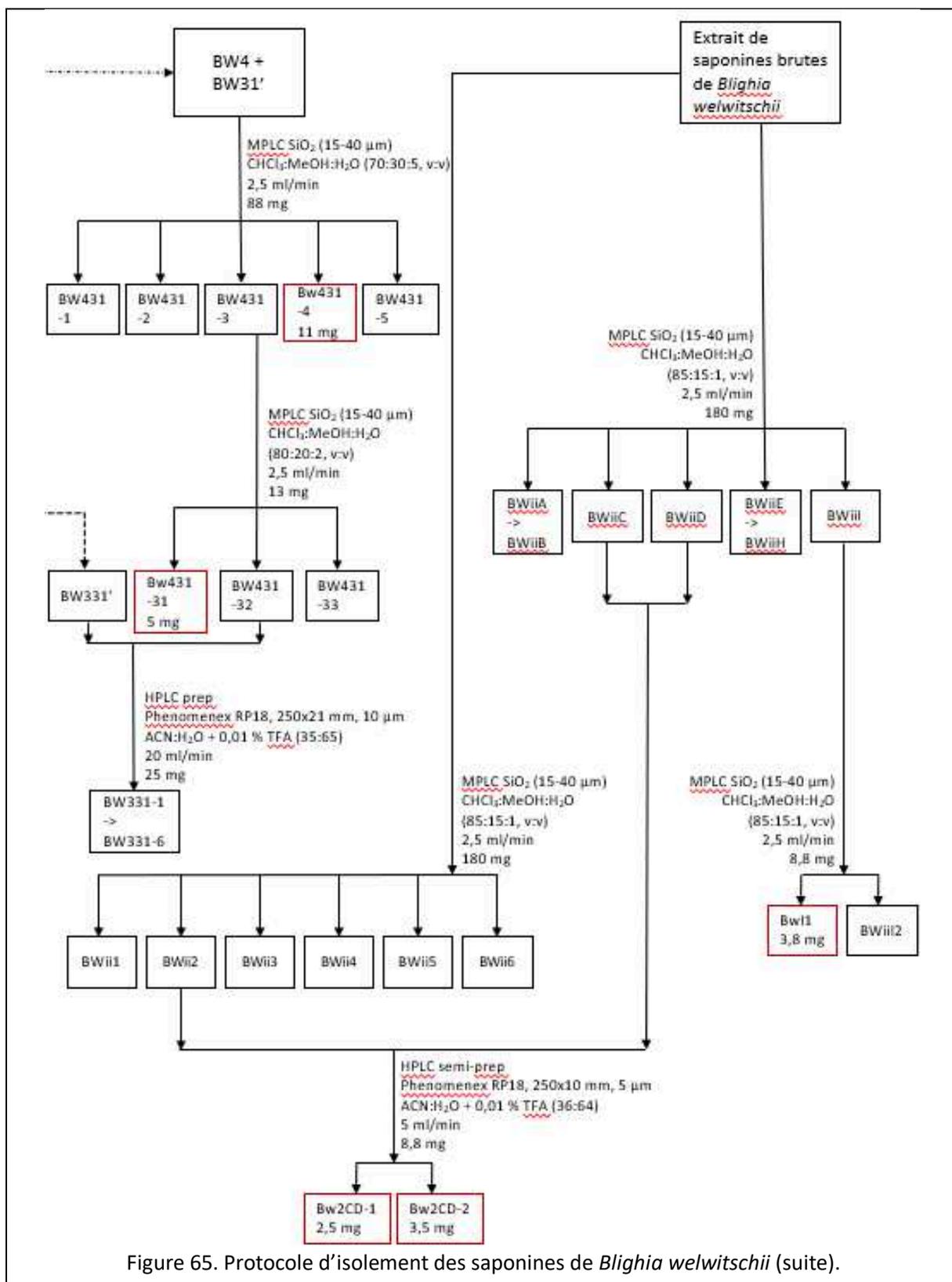


Figure 65. Protocole d'isolement des saponines de *Blighia welwitschii* (suite).

2.3.2 Détermination structurale

Les analyses spectroscopiques permettront d'obtenir les structures de douze isolats sur treize. **Bw13** (*Bwd63*) est donc écarté car ses données spectrales sont illisibles, probablement par cause de pollution de l'échantillon par des solvants ou de la silice. Parmi les autres composés, sept sont de structures nouvelles (**Bw1-Bw7**) et cinq (**Bw8-Bw12**) sont de structures précédemment décrites. Ces derniers sont identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles trouvées dans la littérature comme étant du 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (blighoside A) (**Bw8**) (*Bw11*) (=Bu10), 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (**Bw9**) (*Bw431-4*) (=Bu1), 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (**Bw10**) (*Bw431-31*) (=Bu2), 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (**Bw11**) (*Bwf2*) (=Bu6) et 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (giganteaside J) (**Bw12**) (*Bwe1*).

2.3.3 **Bw1** (*Bw41*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw1**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 977$, correspondant à un poids moléculaire de 954, compatible avec la formule brute $C_{49}H_{78}O_{18}$.

— Spectroscopie RMN

Il est important de rappeler que les tableaux de déplacements chimiques pour tous les composés nouveaux décrits de *Blighia welwitschii* sont disponibles dans l'article n°2. Le décalage des valeurs de déplacement chimique entre les données RMN des deux *Blighia*, vient du fait que les mesures ont été effectuées dans le méthanol (CD_3OD) pour *Blighia unijugata* alors qu'elles ont été réalisées dans la pyridine (pyridine- d_5) pour *Blighia welwitschii*. Ce changement de solvant

correspond à une optimisation des mesures RMN et permet de réduire la forte superposition des signaux du proton dans la zone des sucres.

De manière similaire aux produits de *Blighia unijugata*, toutes les saponines isolées de *Blighia welwitschii* ont pour aglycone l'hédéragénine. La génine de **Bw1** présente un C-3 et un C-28 dont les δ_C résonnent à 80.9 et 180.2, respectivement, valeurs indicatives d'un monodesmoside de l'hédéragénine branché en C-3.

Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bw1** présente des corrélations attribuables à la présence de trois sucres dont les anomères résonnent à δ_H/δ_C 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/104.2, 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/105.9 and 6.19 (br s) (Rha-1)/101.0. Les spectres COSY, TOCSY et HSQC confirment la nature de ces derniers comme étant un Glc (Glc I), un Ara (Ara I) et un Rha. Une fonction acétyle est aussi identifiée sur la base d'une corrélation HMBC à δ_H/δ_C 2.05 (s, 3H) (Ac CH₃)/171.1 (Ac C=O).

Une analyse approfondie des données HMBC et ROESY permet de mettre en évidence les liaisons de la chaîne oligosaccharidique. Celle-ci est établie en fonction des éléments suivants :

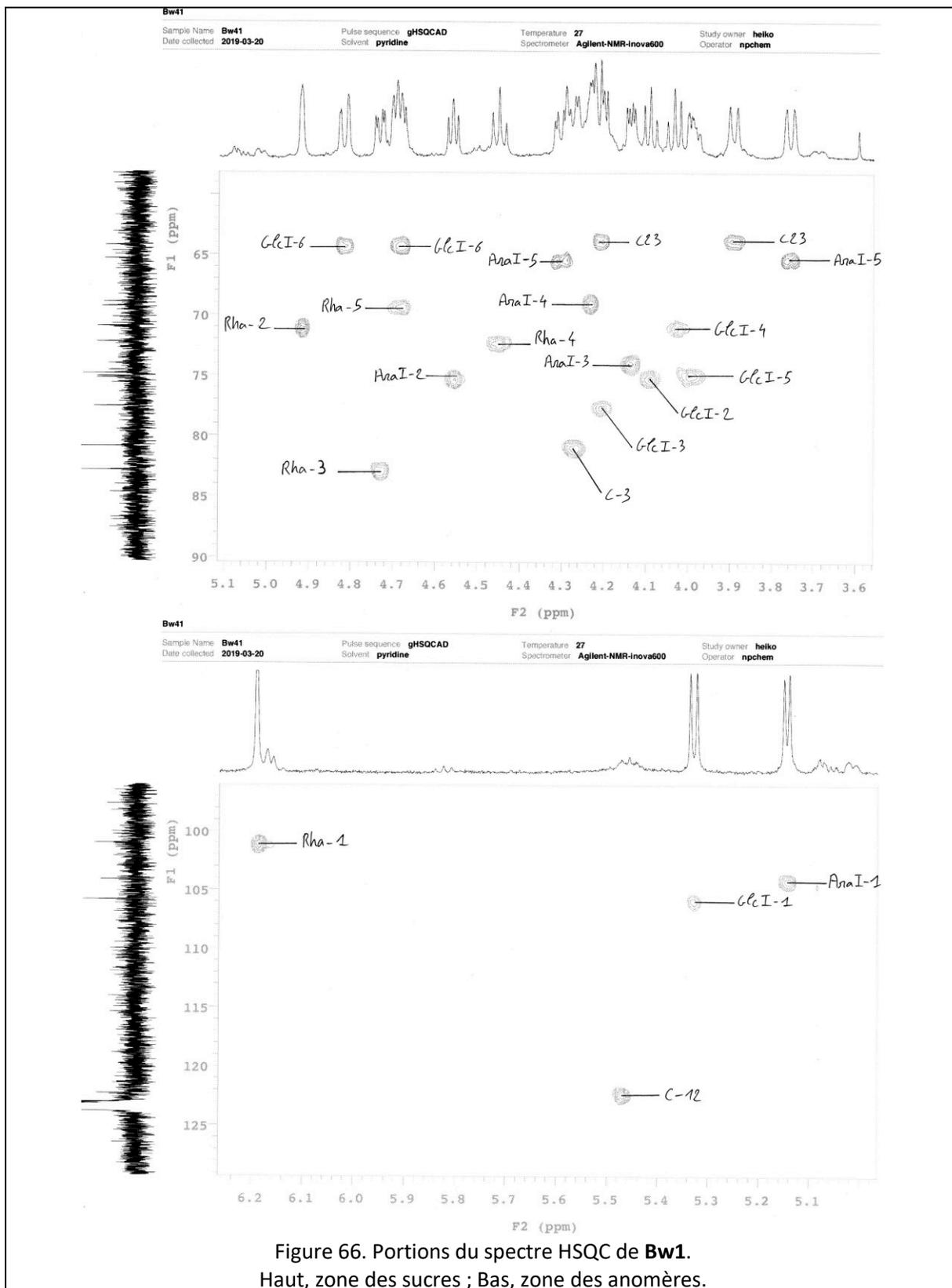
– La corrélation HMBC entre le proton anomérique de Ara I et le C-3 de l'aglycone à δ_H/δ_C 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/80.9 (C-3) ainsi que la corrélation ROESY à δ_H/δ_H 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/4.26 (H-3) confirment la liaison de Ara I en C-3 de la génine.

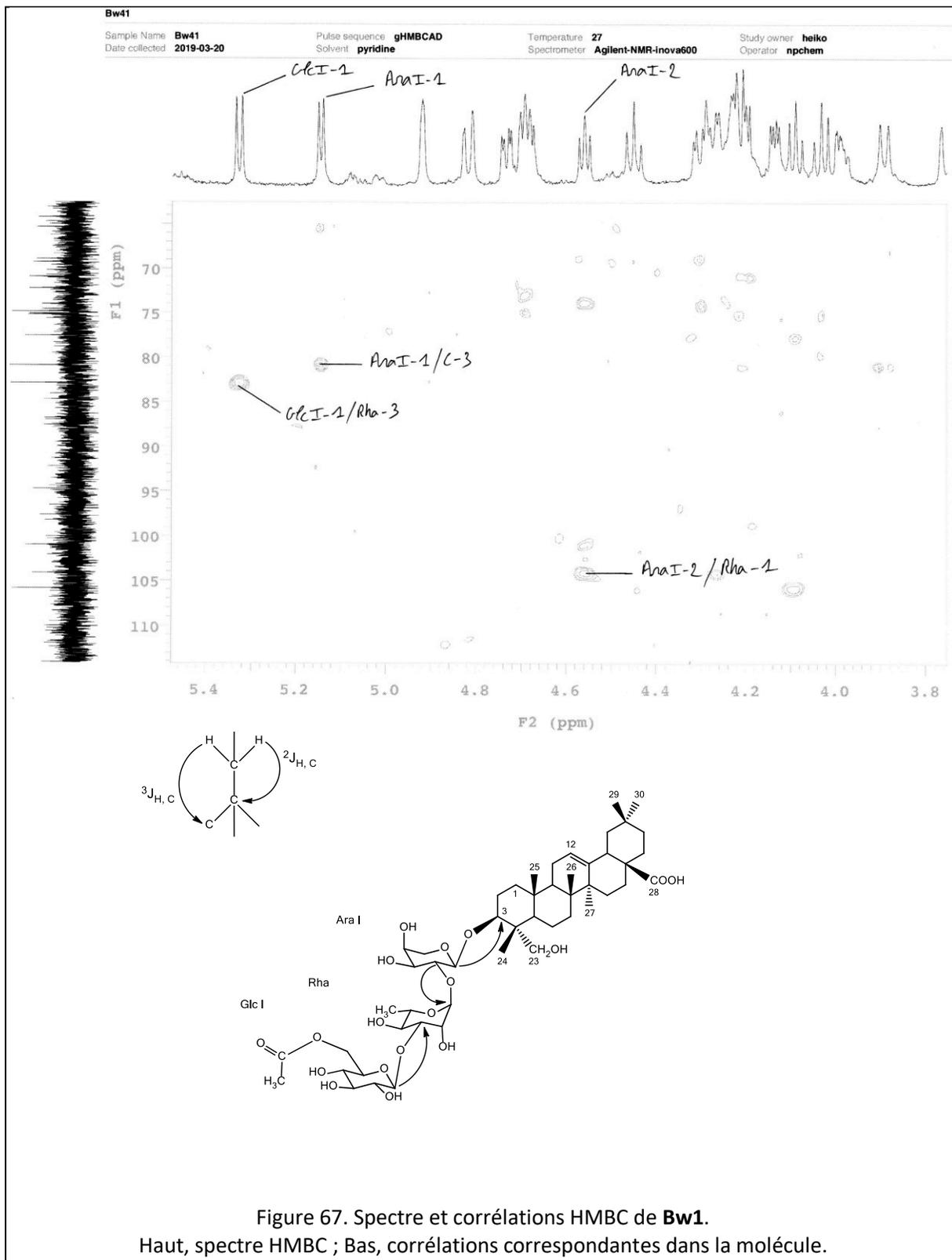
– Les corrélations HMBC inverse et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.56 (t, $J = 7.2$ Hz) (Ara I-2)/101.0 (Rha-1) et δ_H/δ_H 6.19 (br s) (Rha-1)/4.56 (t, $J = 7.2$ Hz) (Ara I-2) confirment la liaison entre Rha-1 et Ara I-2.

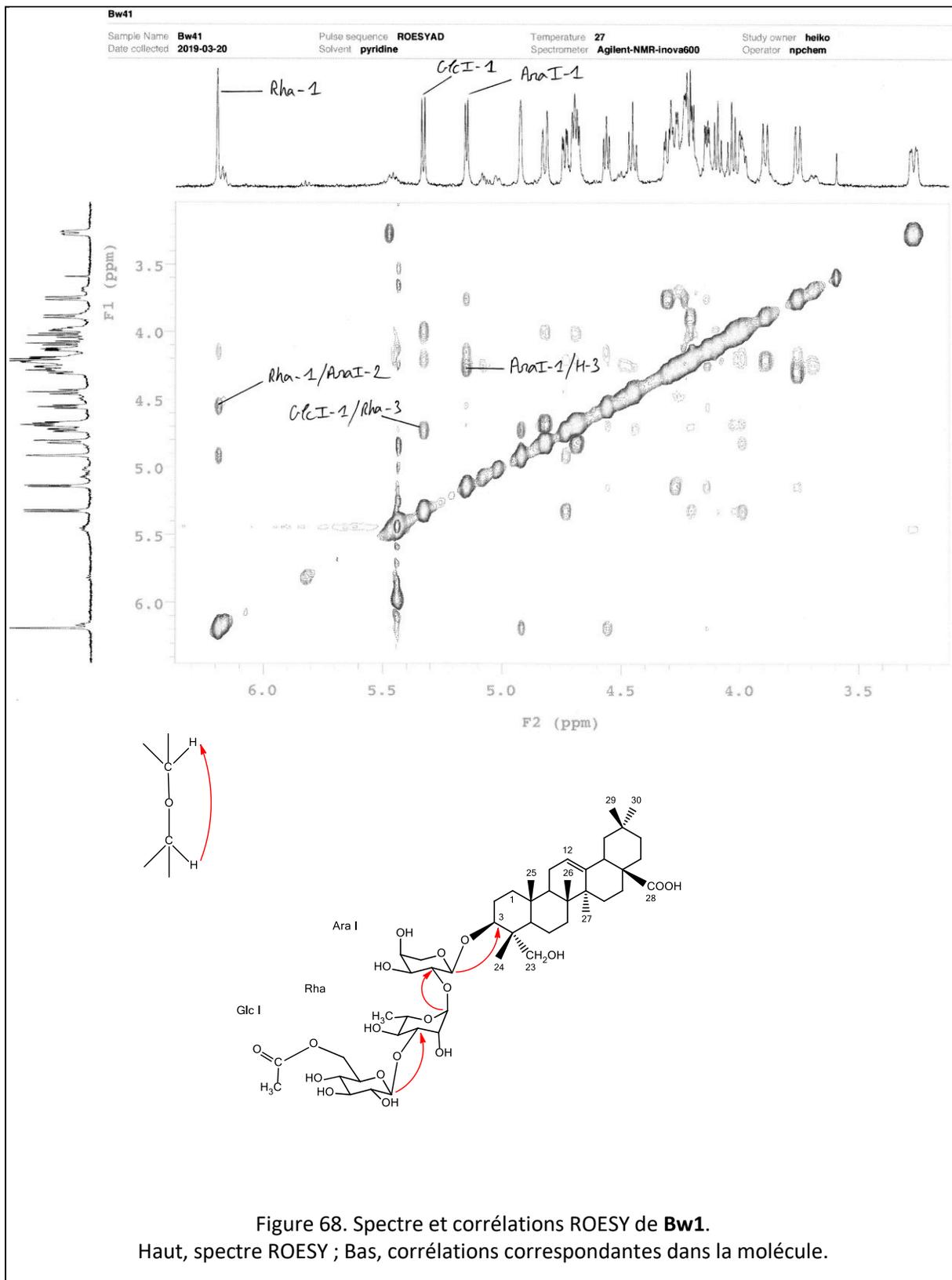
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/82.9 (Rha-3) et δ_H/δ_H 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/4.73 (dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz) (Rha-3) confirment la liaison entre Glc I-1 et Rha-3.

– Finalement, l'acétyle est engagé dans une liaison avec l'hydroxyle n°6 du Glc I comme le confirme les valeurs déblindées de H_a, H_b-Glc I-6 résonant à δ_H 4.81 (dd, $J = 10.8, 2.6$ Hz) et δ_H 4.68, respectivement.

Sur la base des résultats précédents, la structure de **Bw1** est déterminée comme étant la suivante : 3-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.3.4 **Bw2** (*Bwe321*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw2**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1301$, correspondant à un poids moléculaire de 1278, compatible avec la formule brute $C_{61}H_{98}O_{28}$.

— Spectroscopie RMN

L'hédéragénine de **Bw2**, dont le C-28 résonne à δ_C 176.7, indique une substitution de la fonction ester à cette position. **Bw2** semble être un bidesmoside de l'hédéragénine branché en C-3 et en C-28.

Dans la région des anomères, le spectre du proton de **Bw2** présente des signaux résonant à δ_H 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.08 (d, $J = 6.6$ Hz), 5.40 (d, $J = 7.8$ Hz), 6.15 (br s) and 6.22 (d, $J = 8.4$ Hz), corrélant en HSQC avec d'autres signaux à δ_C 104.5, 104.5, 105.9, 101.2 et 95.3, respectivement. Cela indique la présence de cinq sucres, identifiés par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme trois Glc (Glc I, Glc II et Glc III), un Ara (Ara I) et un Rha. Une fonction acétyl est aussi identifiée sur la base d'une corrélation HMBC à δ_H/δ_C 1.99 (s, 3H) (Ac CH_3)/171.2 (Ac C=O).

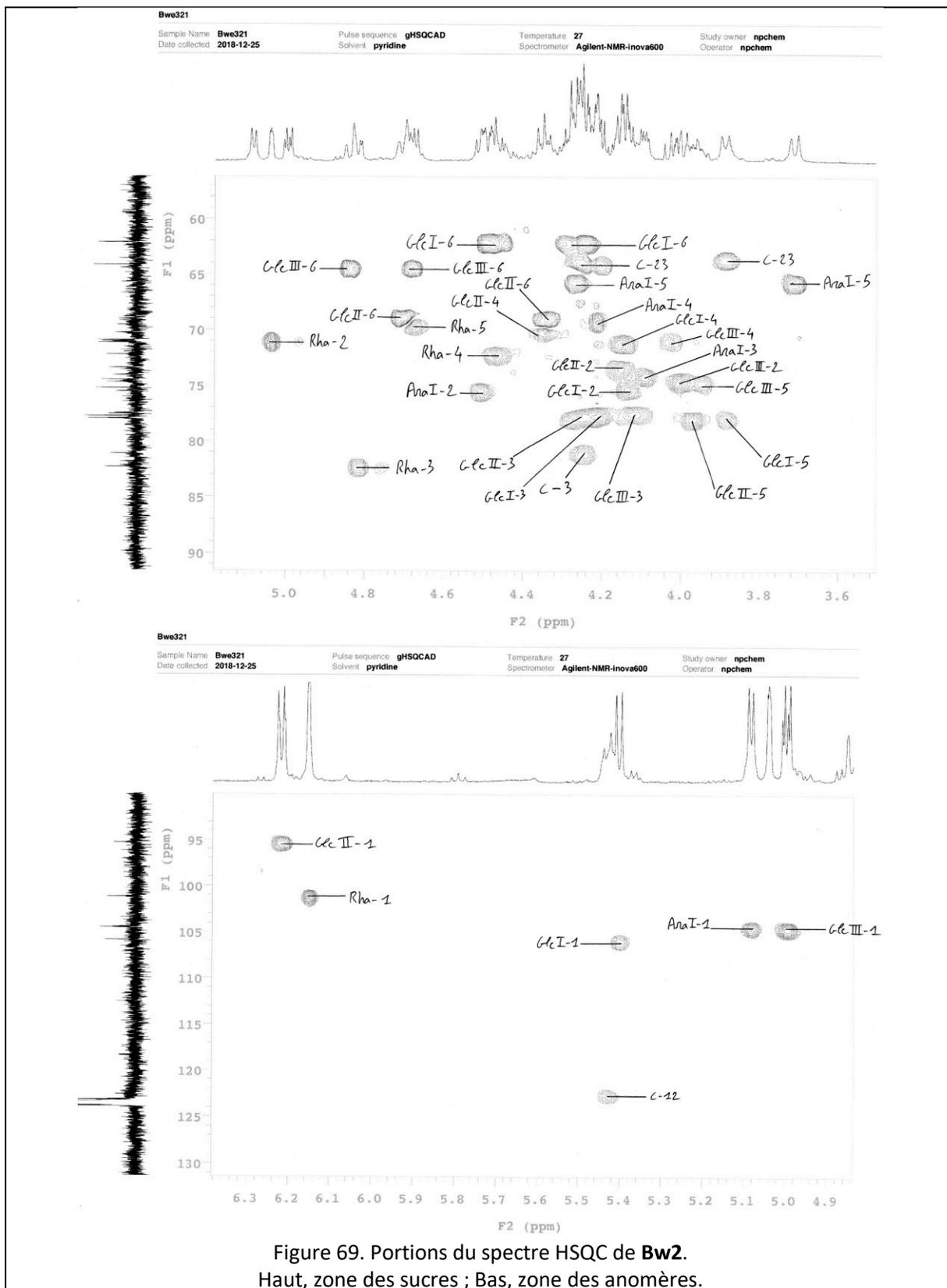
Une analyse approfondie des spectres HMBC et ROESY révèle de fortes similitudes entre **Bw1** et **Bw2**. En effet ces derniers partagent la chaîne tri-saccharidique Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I en C-3 de l'aglycone. Les deux unités Glc restantes, Glc II et Glc III, ainsi que la fonction acétyl, sont attribuées en fonction des données spectroscopiques suivantes :

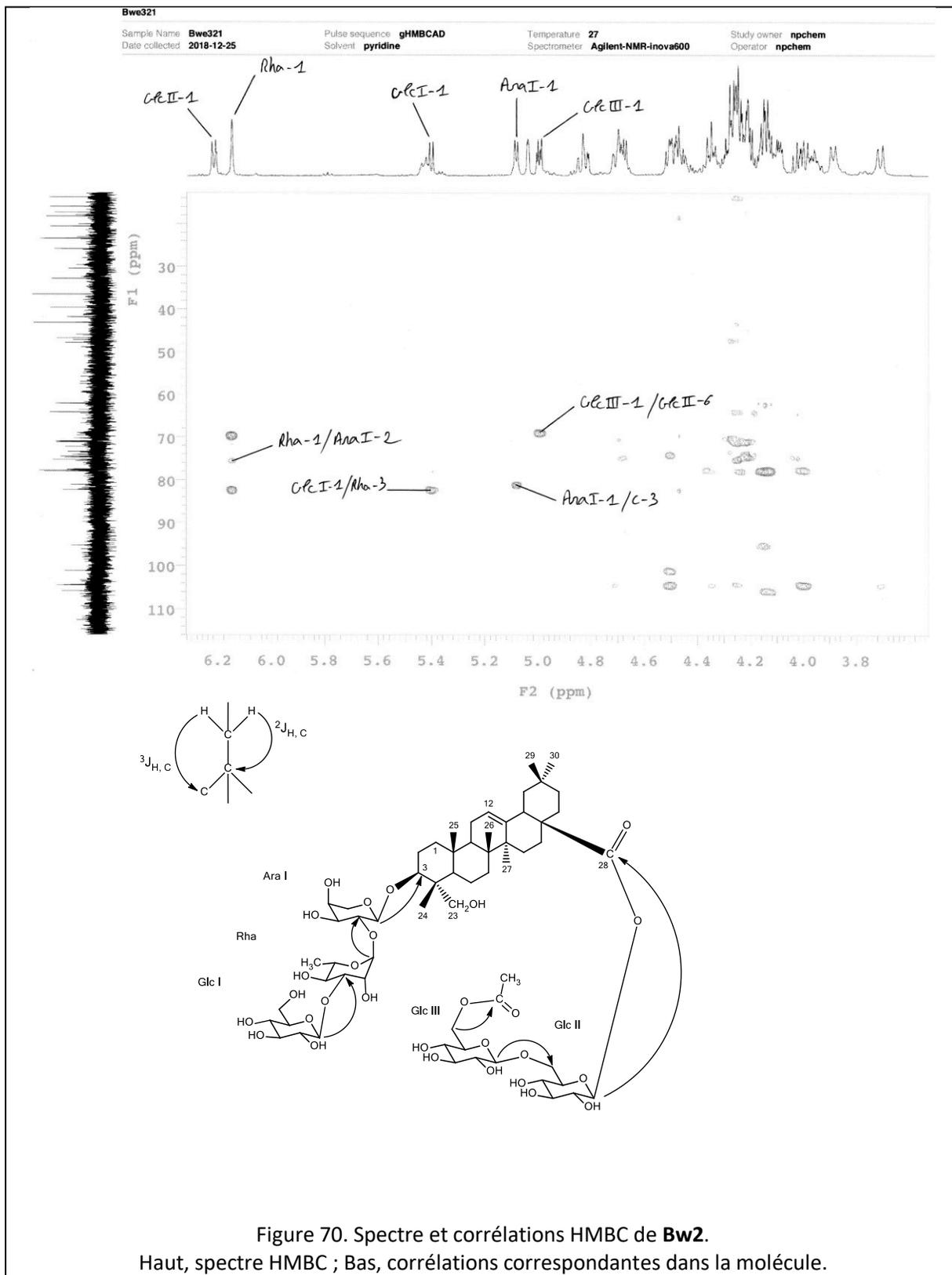
– La corrélation HMBC, à δ_H/δ_C 6.22 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc II-1)/176.7 (C-28) prouvant la liaison entre Glc II-1 et le C-28 de l'aglycone.

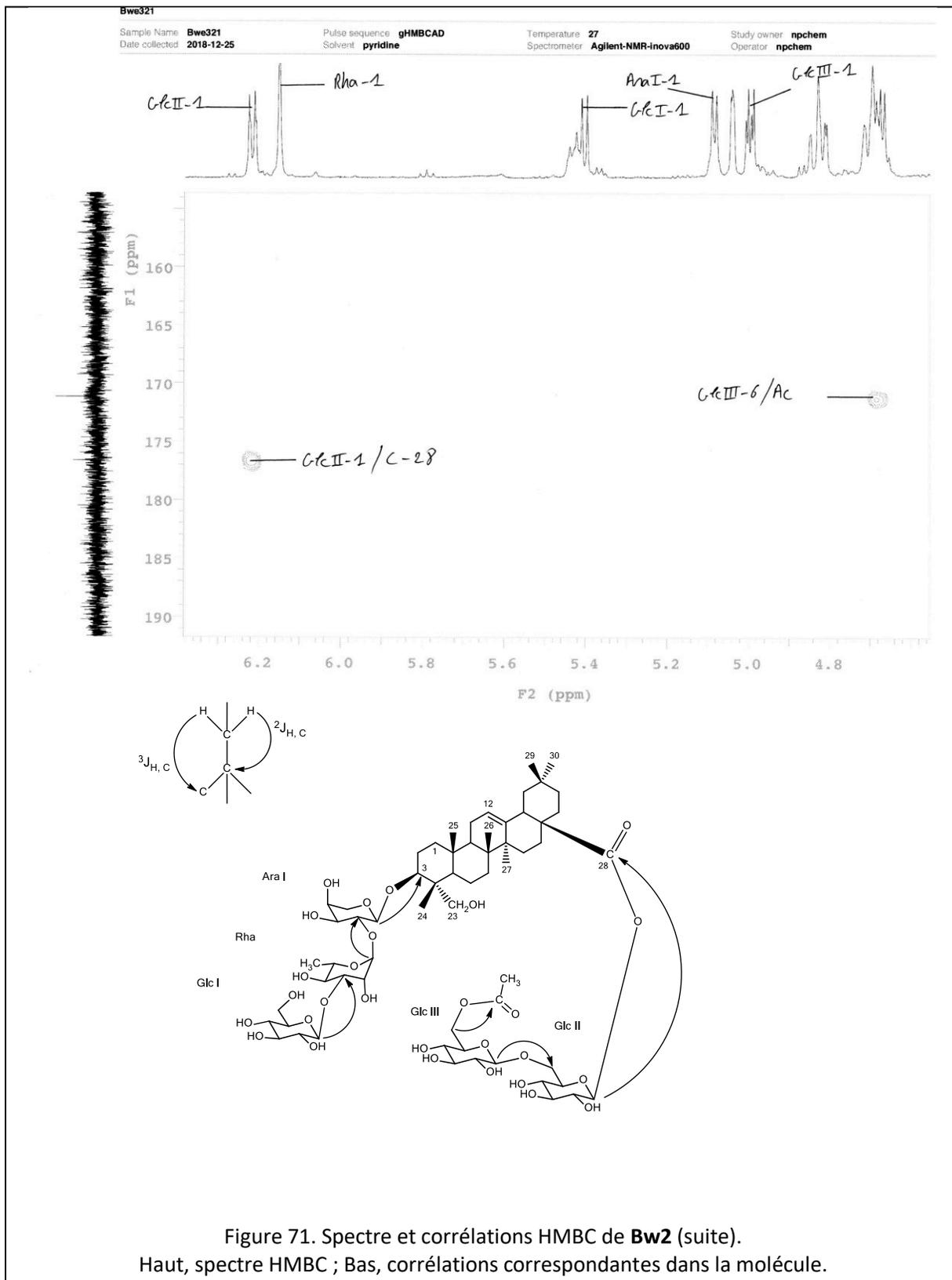
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc III-1)/69.2 (Glc II-6) et δ_H/δ_H 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc III-1)/4.34 (Glc II-6) prouvant la liaison entre Glc III-1 et Glc II-6.

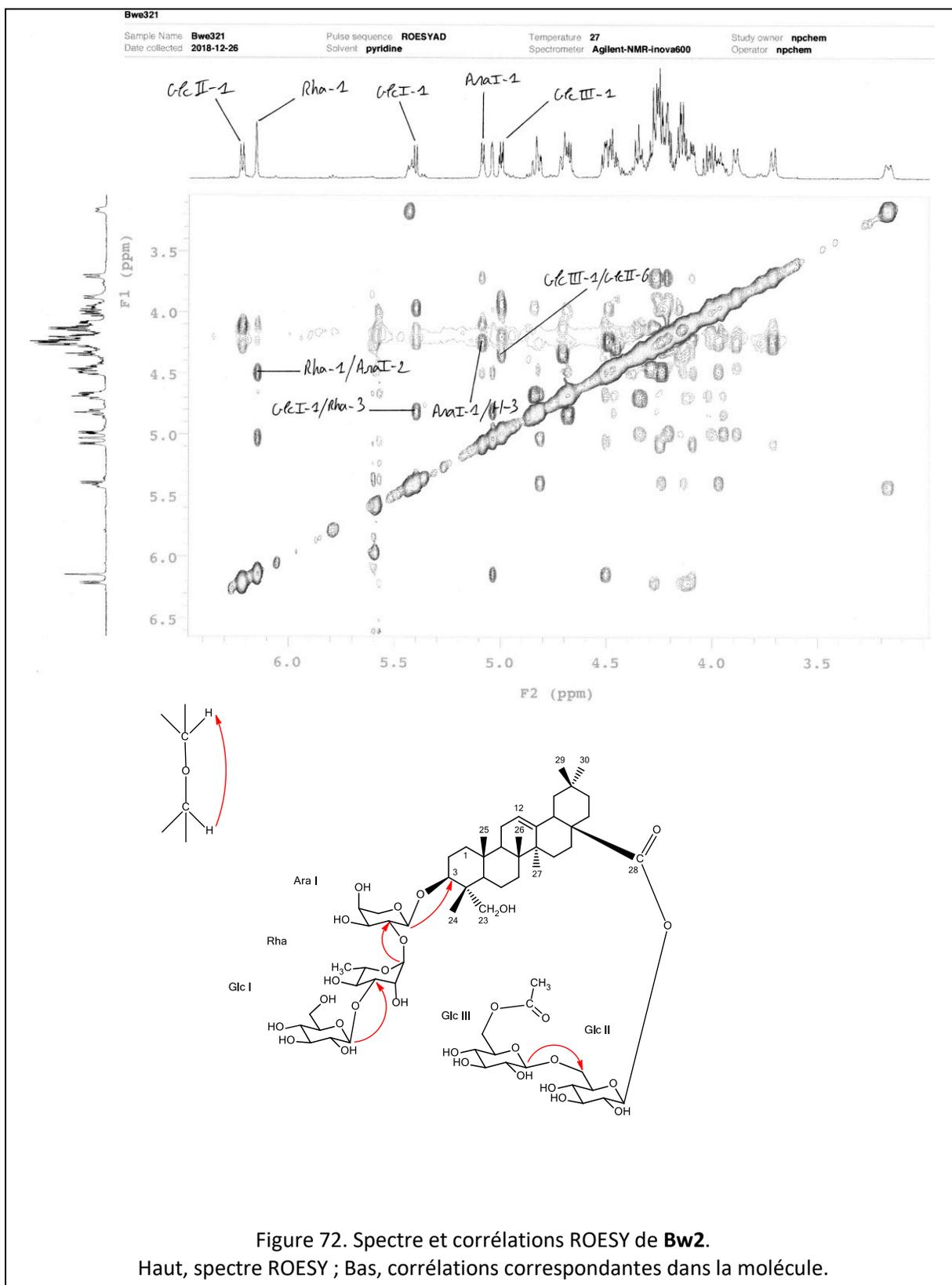
– La corrélation HMBC à δ_H/δ_C 4.68 (Glc III-6)/171.2 (Ac C=O), prouvant la position de l'acétyl au niveau du Glc III-6.

Sur la base de ces informations, la structure de **Bw2** est établie comme étant la suivante : 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*-(6-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranosyl ester.









2.3.5 **Bw3** (*Bw2CD-1*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw3**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1427$, correspondant à un poids moléculaire de 1404, compatible avec la formule brute $C_{67}H_{104}O_{31}$.

— Spectroscopie RMN

Similairement à **Bw2**, **Bw3** est un bidesmoside de l'hédéragénine substitué en C-3 et C-28.

Dans la région des anomères, son HSQC présente des corrélations attribuables à la présence de cinq sucres à δ_H/δ_C 5.08 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/105.6, 5.09 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc III-1)/105.6, 5.45 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/107.0, 6.16 (br s) (Rha-1)/102.6, 6.20 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc II-1)/96.7. Ces derniers verront leur nature confirmée par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme étant trois Glc (Glc I, Glc II et Glc III), un Ara (Ara I) et un Rha. Quatre fonctions acétyles sont également identifiées sur la base de corrélations HMBC à δ_H/δ_C 2.01 (s, 3H) (Ac CH₃)/172.2 (Ac C=O), 2.06 (s, 3H) (Ac CH₃)/172.1 (Ac C=O), 2.09 (s, 3H) (Ac CH₃)/172.4 (Ac C=O) et 2.10 (s, 3H) (Ac CH₃)/171.7 (Ac C=O).

Une analyse approfondie des spectres HMBC et ROESY révèle de fortes similitudes entre **Bw2** et **Bw3**. En effet ces derniers partagent les mêmes chaînes oligosaccharidiques Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I et Glc III-(1→6)-Glc II en C-3 et C-28 de l'aglycone, respectivement. En l'absence d'une corrélation HMBC observable, la liaison ester entre Glc II-1 et C-28 est confirmée par le blindage de leurs valeurs respectives de δ_C à 95.3 et 176.6.

Les positions des quatre fonctions acétyles sont attribuées sur la base des corrélations HMBC suivantes :

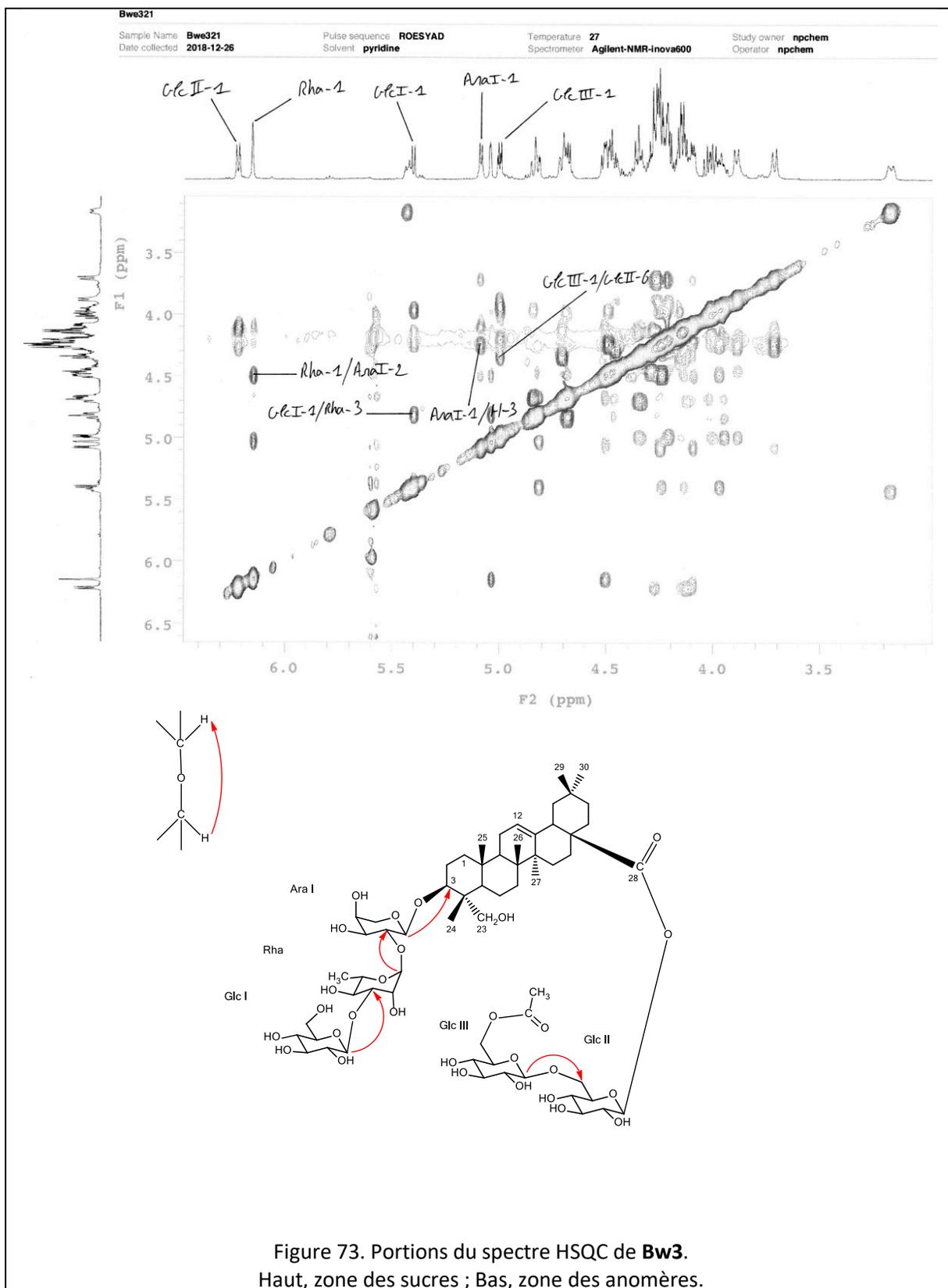
– La corrélation HMBC à δ_H/δ_C 5.81 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz) (Glc I-3)/172.2 (Ac C=O) prouvant l'acétylation du Glc I-3.

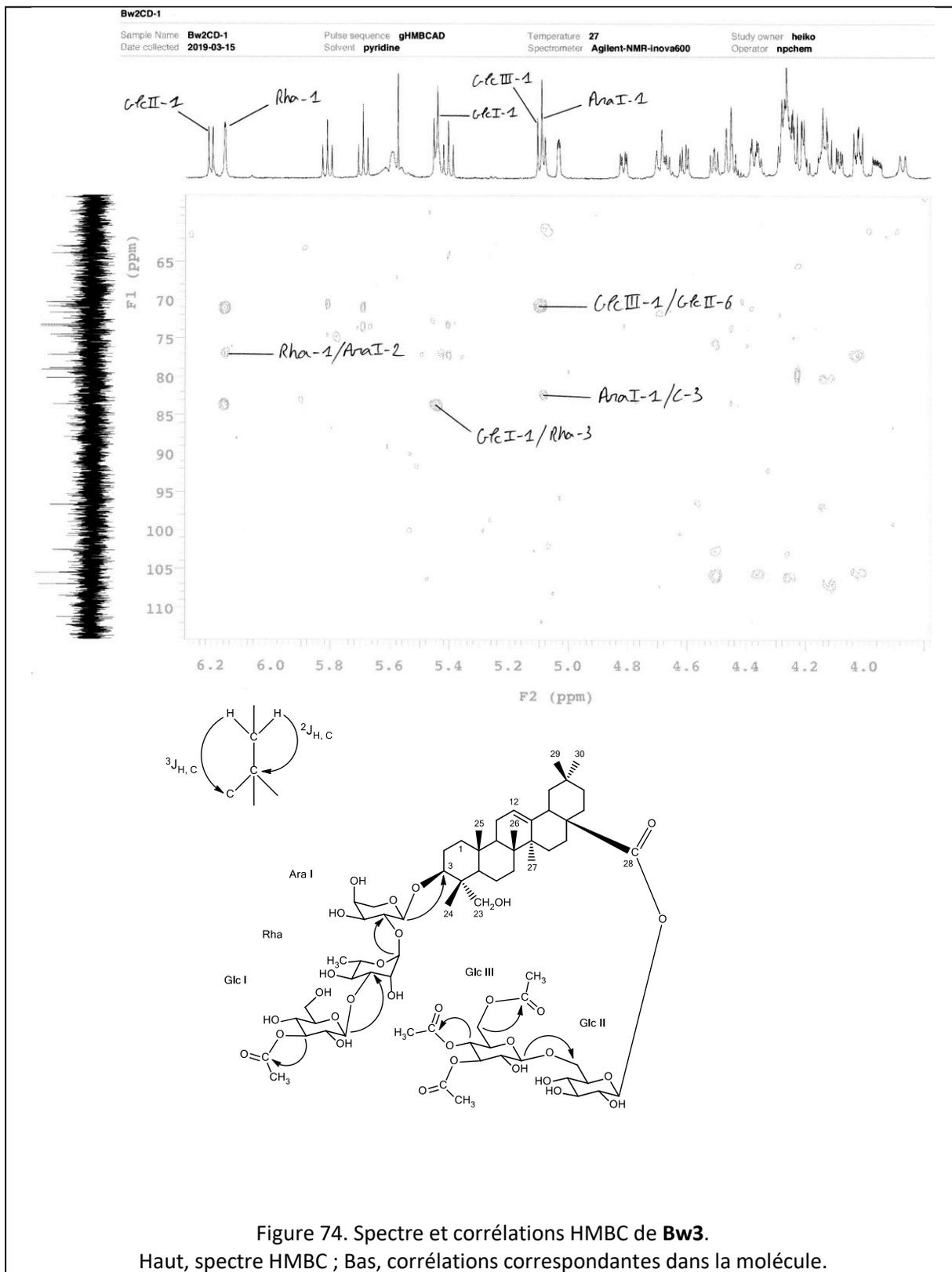
– La corrélation HMBC à δ_H/δ_C à 5.40 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz) (Glc III-4)/171.7 (Ac C=O) confirmant l'acétylation du Glc III-4.

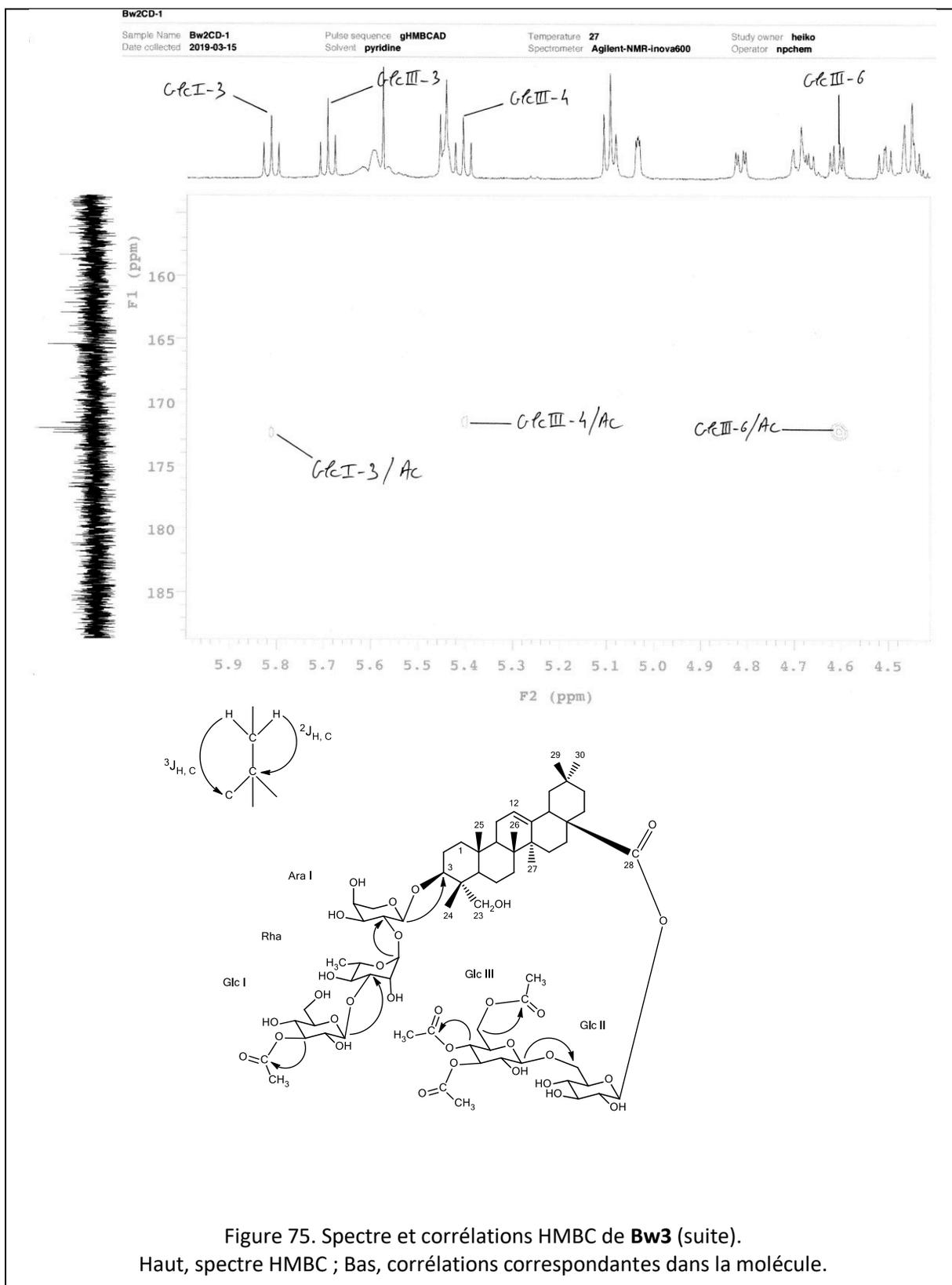
– La corrélation HMBC à δ_H/δ_C à 4.60 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz) (Glc III-6)/172.1 (Ac C=O) prouvant l'acétylation du Glc III-6.

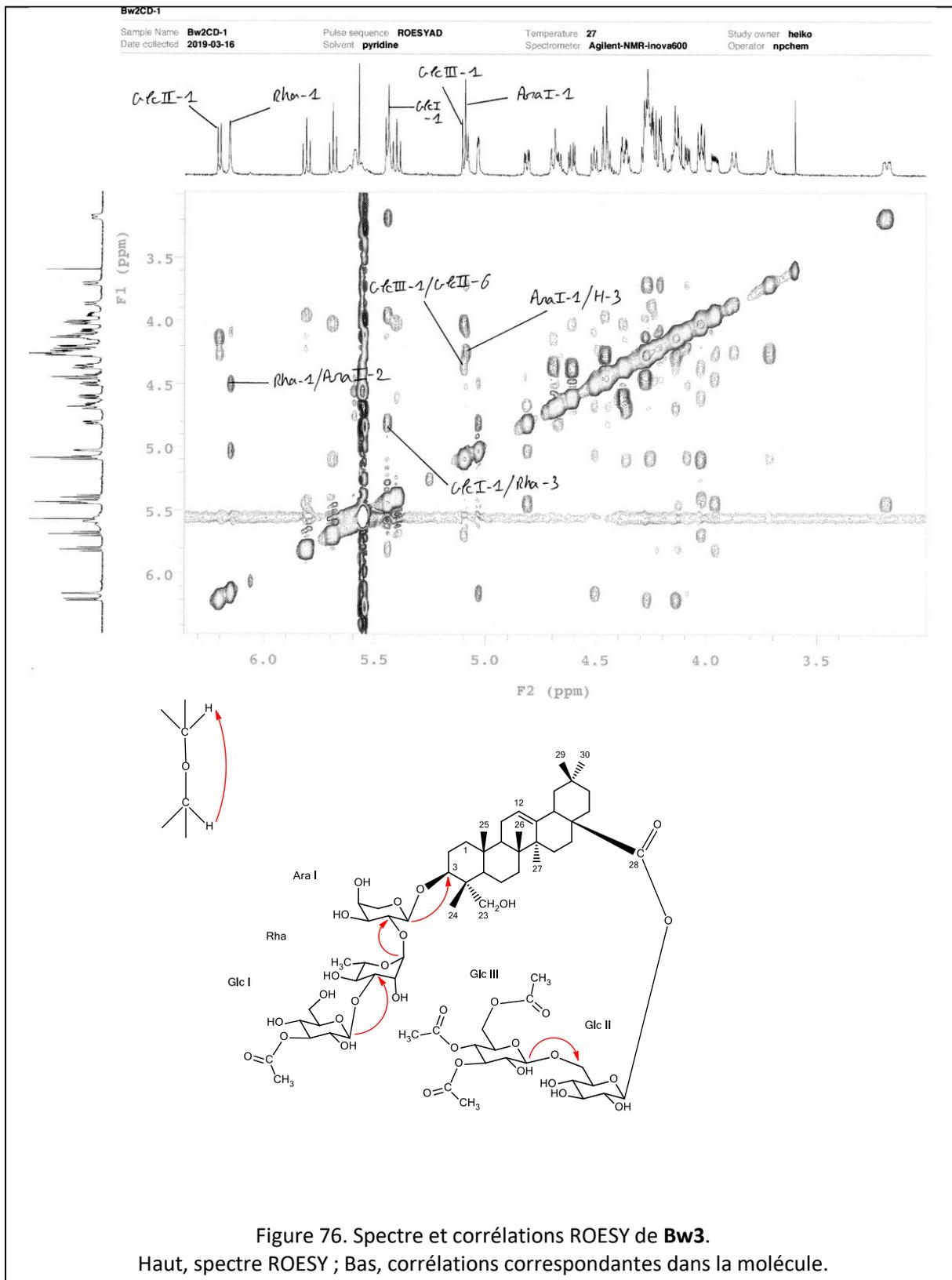
– Le caractère déblindé du proton n°3 du Glc III, résonant à 5.69 (dd, $J = 9.6, 9.0$ Hz) (Glc III-3), et démontrant la présence d'une acétylation à cette position malgré l'absence de corrélation HMBC.

Sur la base de ces arguments spectroscopiques, la structure de **Bw3** est établie comme étant la suivante : 3-*O*-(3-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.









2.3.6 **Bw4** (*Bw2CD-2*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw4**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1427$, correspondant à un poids moléculaire de 1404, compatible avec la formule brute $C_{67}H_{104}O_{31}$.

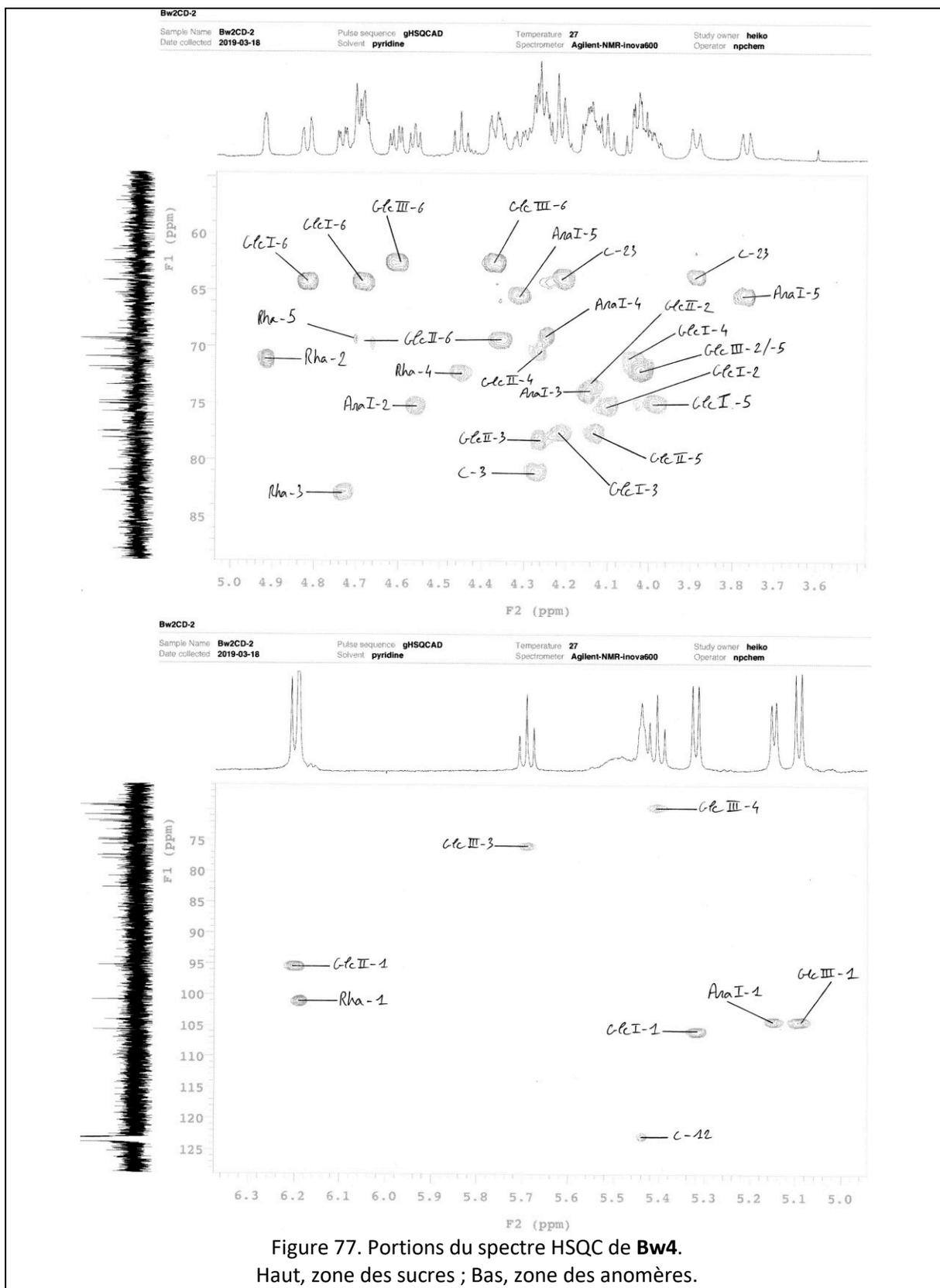
— Spectroscopie RMN

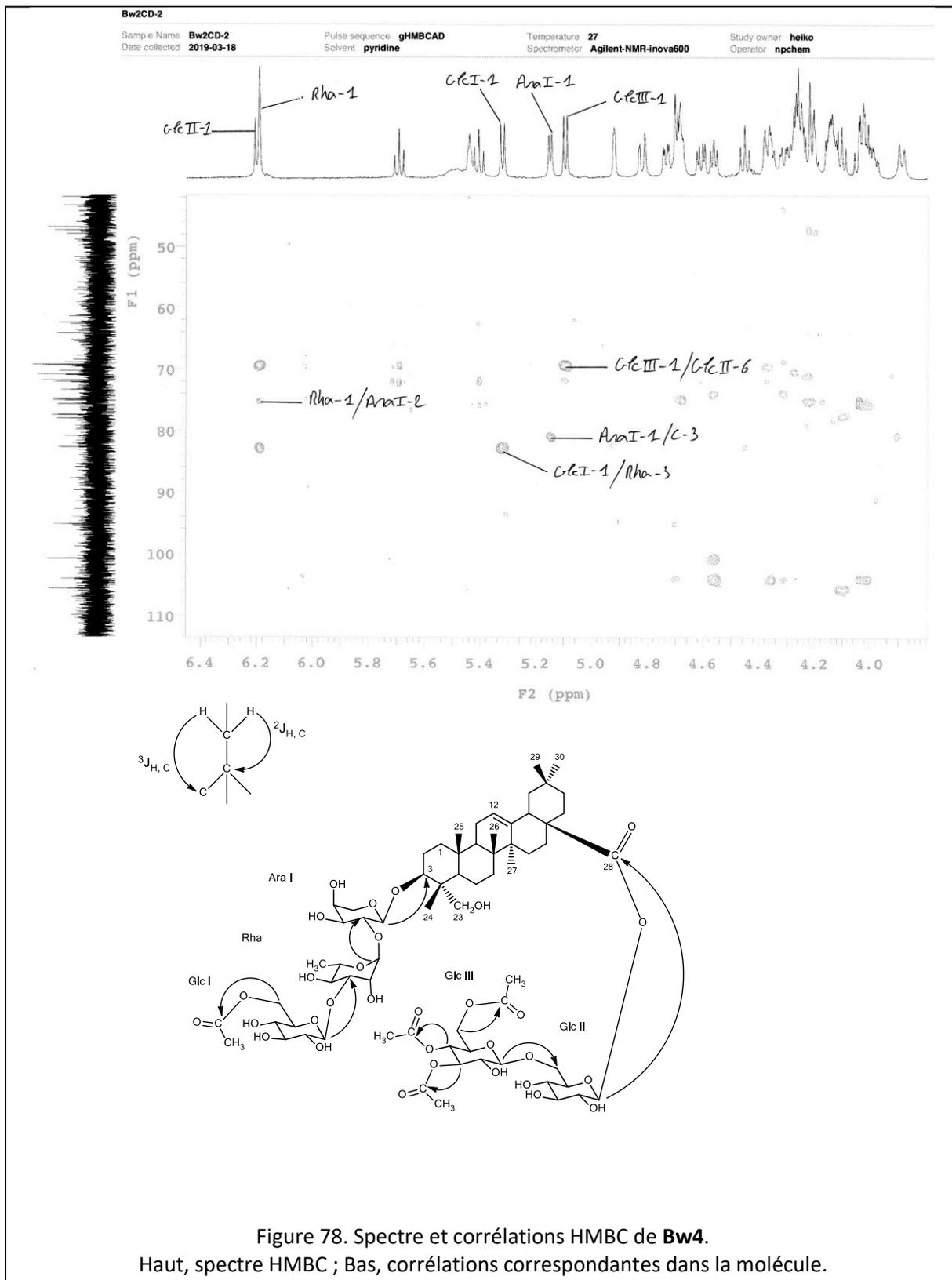
Similairement à **Bw3**, **Bw4** est un bidesmoside de l'hédéragénine substitué en C-3 et C-28.

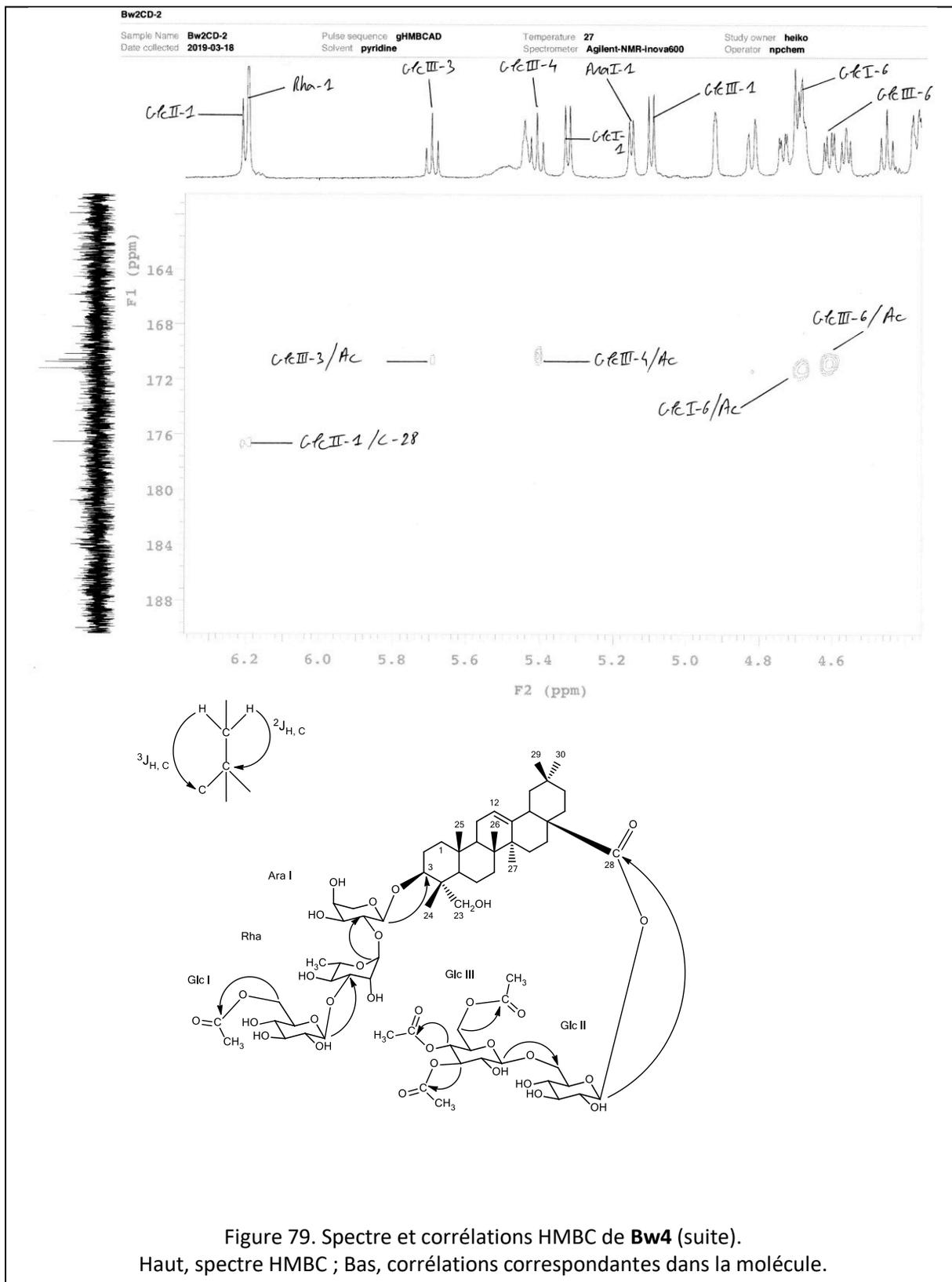
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bw4** est superposable à celui de **Bw3**, suggérant une conservation des cinq monomères de sucres précédemment identifiés (Glc I, Glc II, Glc III, Ara I et Rha). Quatre fonctions acétyles sont également identifiées sur la base de corrélations HMBC à δ_H/δ_C 2.06 (s, 3H) (Ac CH₃)/170.8 (Ac C=O), 2.07 (s, 3H) (Ac CH₃)/171.2 (Ac C=O), 2.08 (s, 3H) (Ac CH₃)/170.6 (Ac C=O) et 2.09 (s, 3H) (Ac CH₃)/170.2 (Ac C=O).

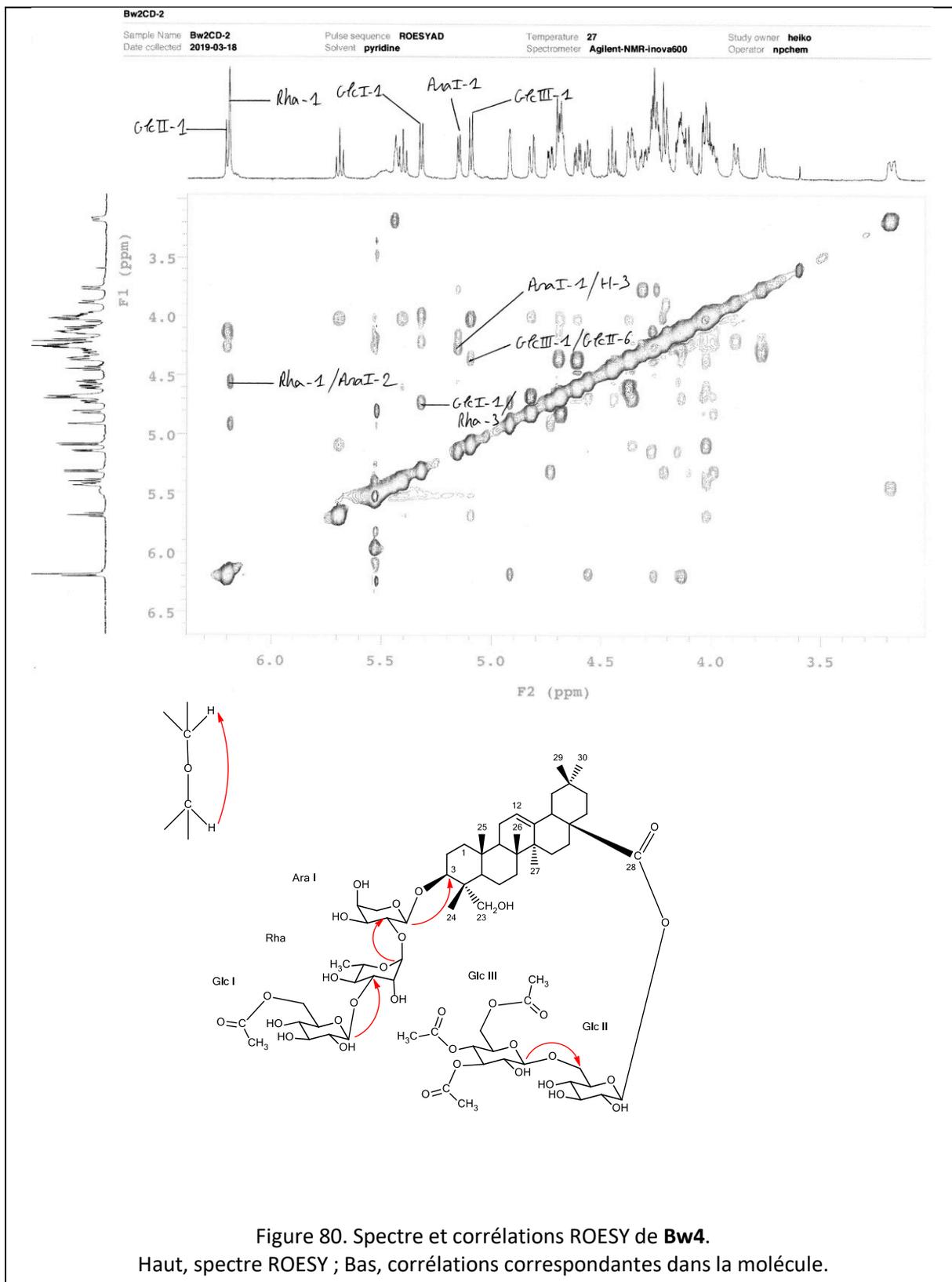
Une analyse approfondie des spectres HMBC et ROESY révèle que **Bw3** et **Bw4** ne diffèrent que par la position des acétyles. Le motif tri-acétylé en Glc III étant conservé chez les deux composés, c'est la position de l'acétyle en Glc I qui varie. En effet, l'acétyle précédemment identifié en Glc I-3 chez **Bw3** est localisé en Glc I-6 chez **Bw4**. Cette hypothèse est confirmée par la corrélation HMBC à δ_H/δ_C 4.69 (Glc I-6)/171.2 (Ac C=O).

La structure de **Bw4** est donc déterminée ainsi : 3-*O*-(6-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.









2.3.7 **Bw5** (*Bwe3*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw5**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1433$, correspondant à un poids moléculaire de 1410, compatible avec la formule brute $C_{66}H_{106}O_{32}$.

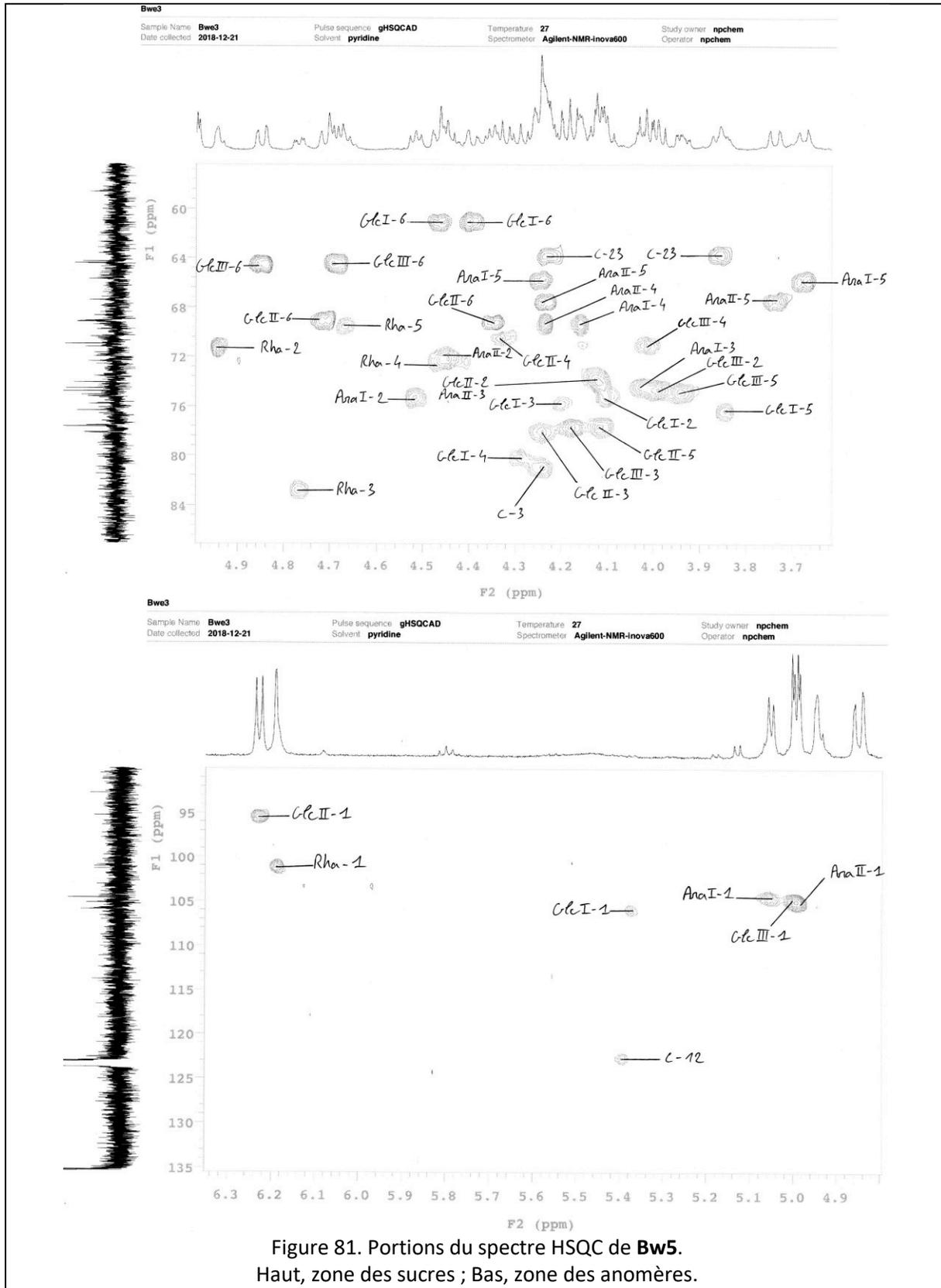
— Spectroscopie RMN

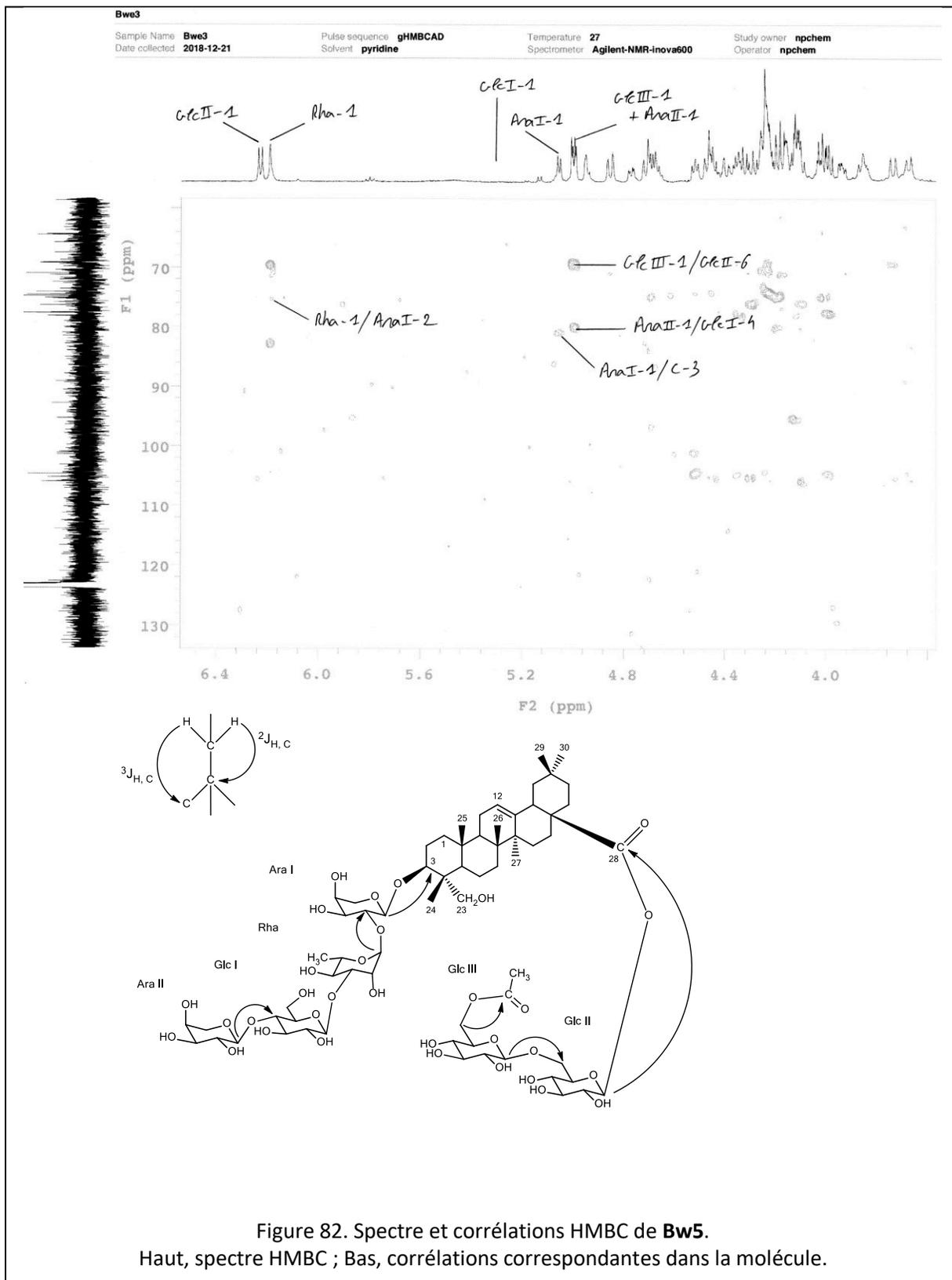
Similairement à **Bw4**, **Bw5** est un bidesmoside de l'hédéragénine substitué en C-3 et C-28.

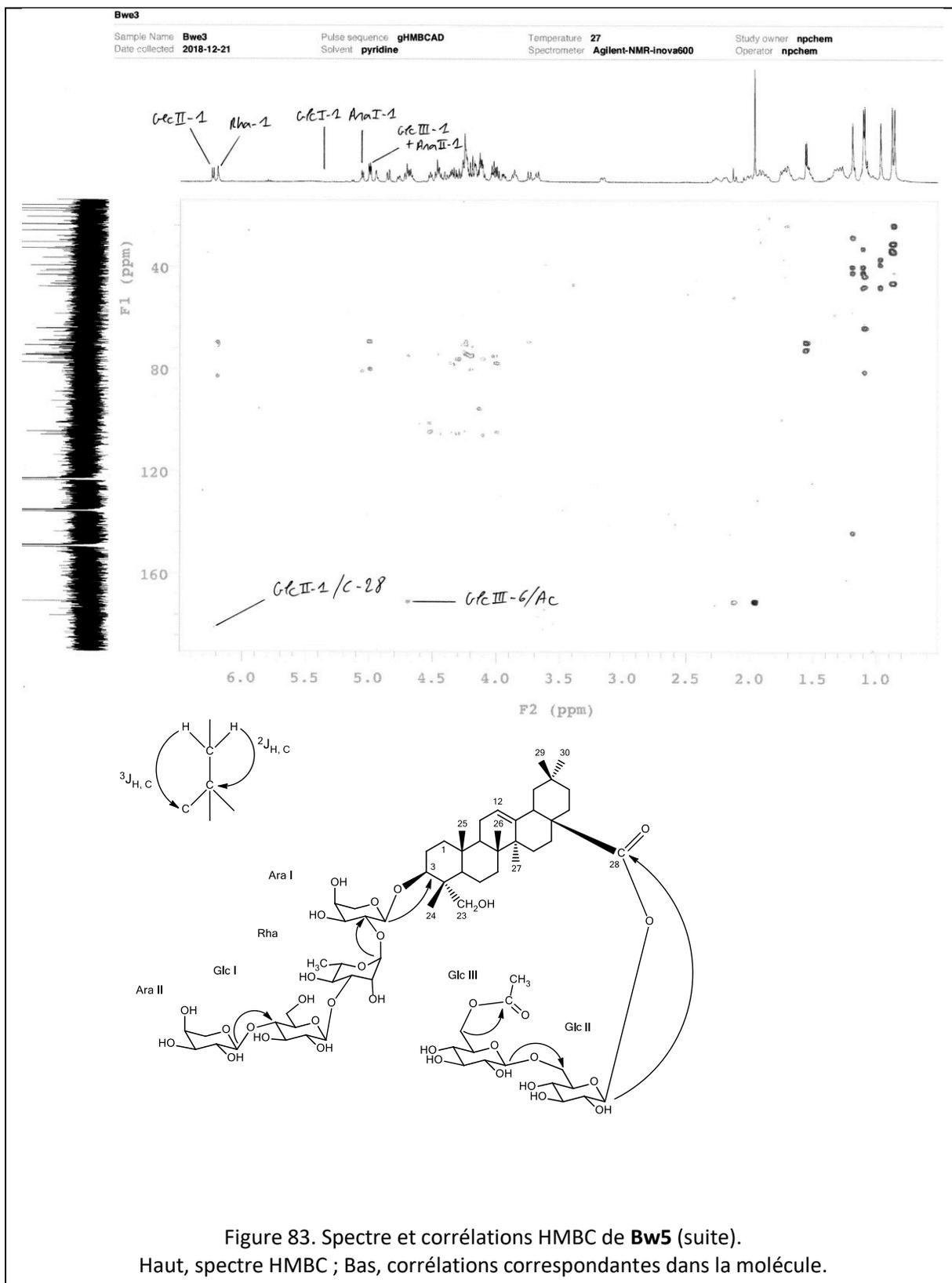
Dans la région des anomères le spectre du proton de **Bw5** présente des signaux à δ_H 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 5.00 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.05 (d, $J = 6.0$ Hz), 5.37, 6.19 (br s) et 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz) corrélant en HSQC avec d'autres signaux à δ_C 106.0, 105.2, 104.7, 106.0, 101.4 and 95.3, respectivement. Cela indique la présence de six sucres, identifiés par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme étant trois Glc (Glc I, Glc II et Glc III), deux Ara (Ara I et Ara II) et un Rha. Une fonction acétyle est également identifiée, sur la base d'une corrélation HMBC à δ_H/δ_C 1.96 (s, 3H) (Ac CH₃)/170.9 (Ac C=O).

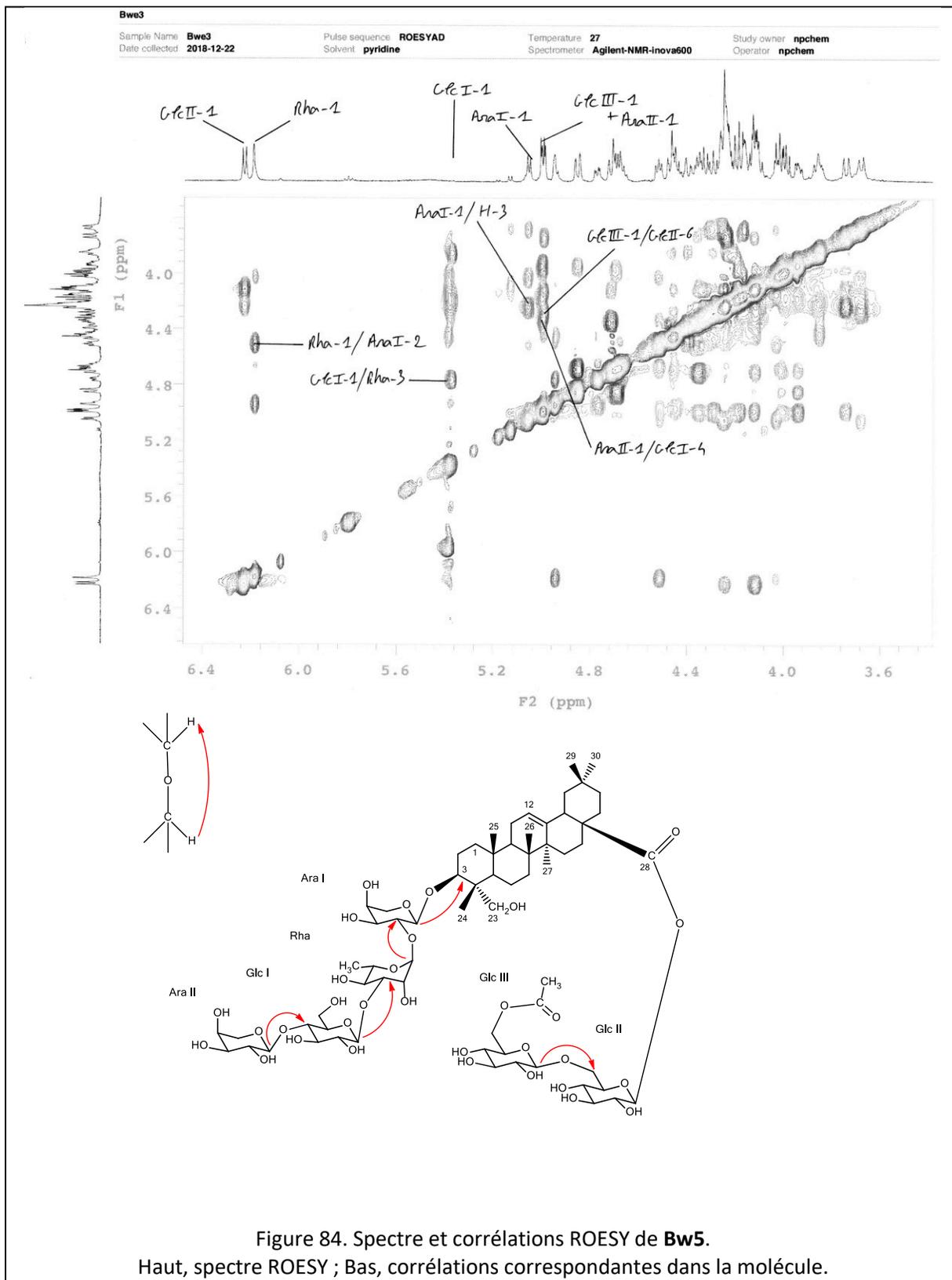
Après analyse détaillée des spectres HMBC et ROESY, **Bw5** montre de fortes similitudes structurales avec **Bw2**. Ces derniers partagent en effet un motif structural commun en C-3 et en C-28 avec la présence des oligosaccharides Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I et Glc III-(1→6)-Glc II, respectivement. La position de l'acétyle, en Glc III-6, est aussi conservée entre les deux composés. La particularité structurale de **Bw5** concerne la partie terminale de la chaîne sucrée en C-3, celle-ci comporte un Ara surnuméraire, nommé Ara II, et lié à Glc I par un pont (1→4) *O*-glycosidique. Ce résultat est appuyé par les corrélation HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/80.0 (Glc I-4) et δ_H/δ_H 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/4.29 (dd, $J = 9.6, 9.0$ Hz) (Glc I-4).

Sur la base de ces informations, la structure de **Bw5** est établie comme étant la suivante : 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*-(6-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranosyl ester.









2.3.8 **Bw6** (*Bwf3*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw6**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1523$, correspondant à un poids moléculaire de 1500, compatible avec la formule brute $C_{69}H_{112}O_{35}$.

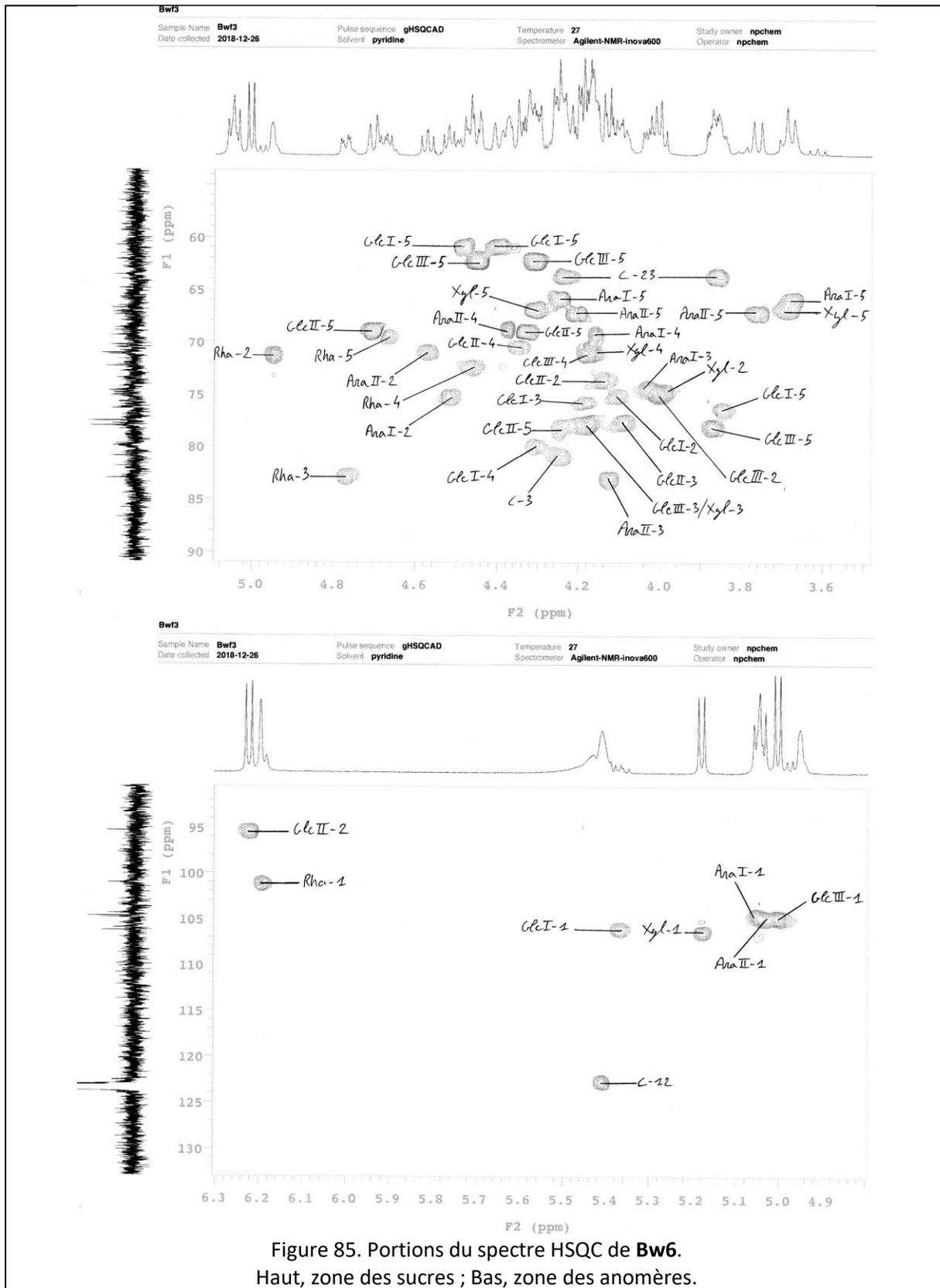
— Spectroscopie RMN

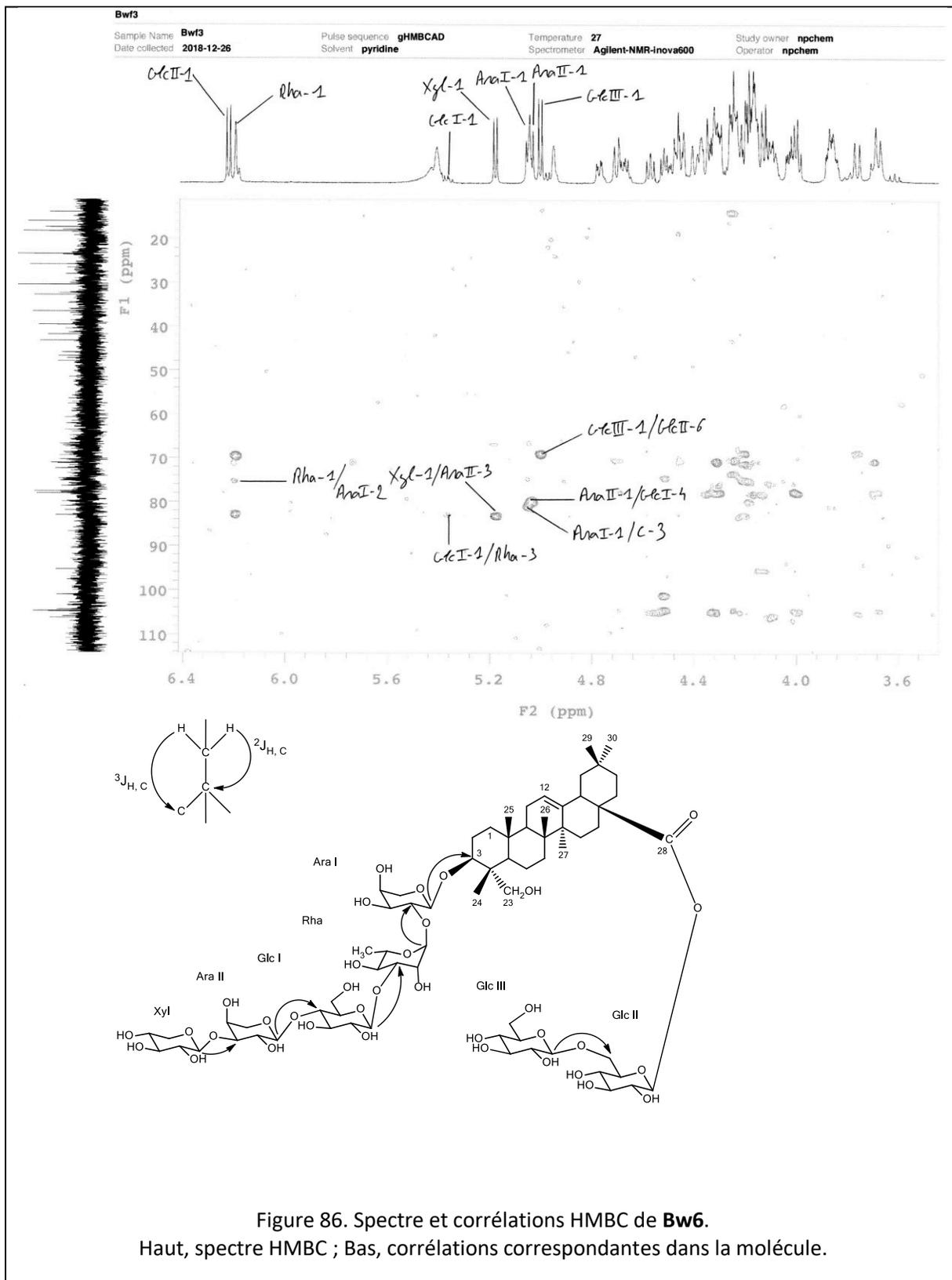
Similairement à **Bw5**, **Bw6** est un bidesmoside de l'hédéragénine substitué en C-3 et C-28.

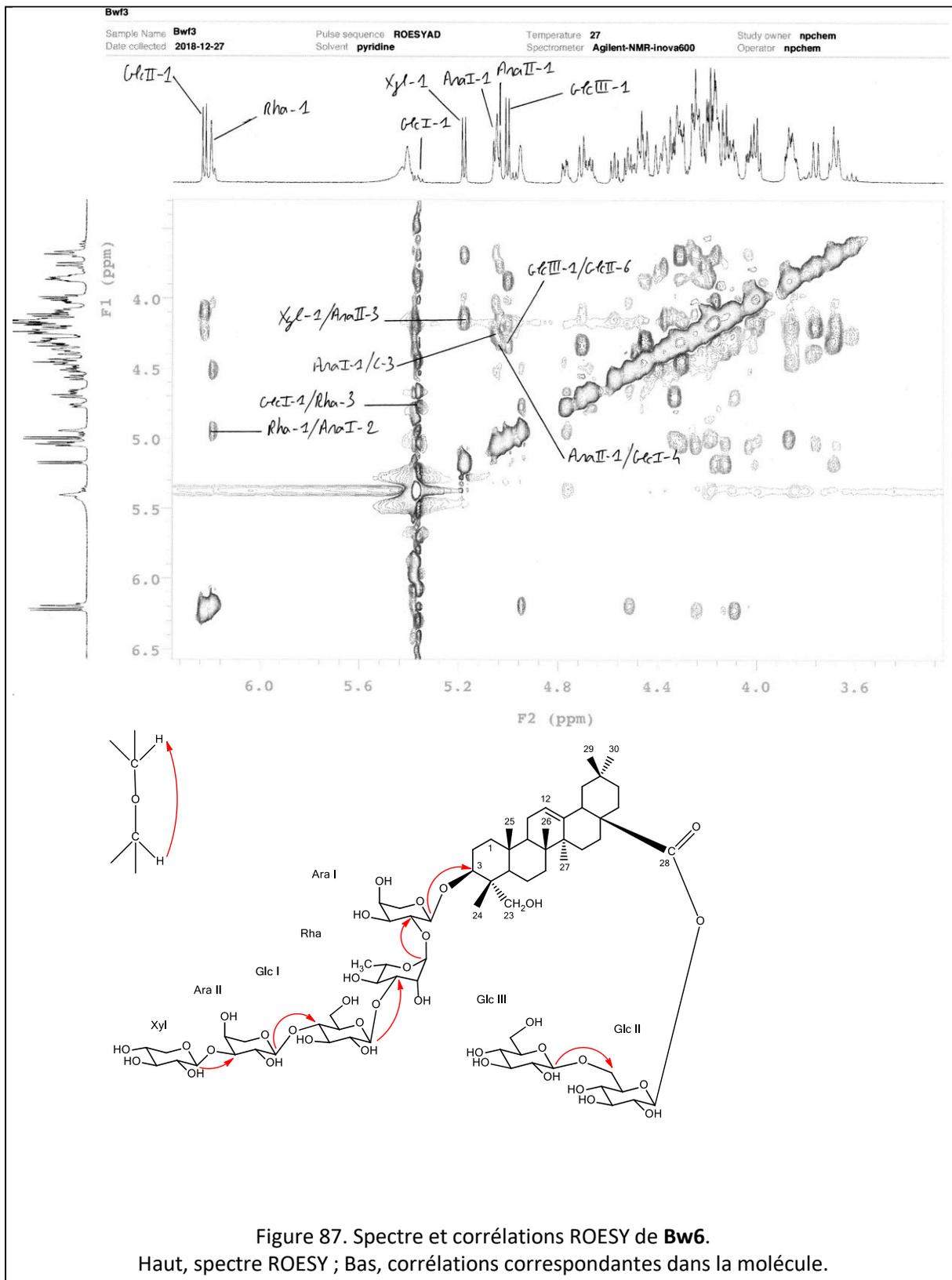
Le spectre HSQC de **Bw6** démontre, dans la région des anomères, des corrélations à δ_H/δ_C 5.00 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc III-1)/104.7, 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz) (Ara II-1)/104.7, 5.05 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/104.4, 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/106.3, 5.26 (d, $J = 7.4$ Hz) (Glc I-1)/106.0, 6.20 (br s) (Rha-1)/101.1 et 6.22 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc II-1)/95.4, attribuables à la présence de sept sucres. Ces derniers sont identifiés par exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme étant trois Glc (Glc I, Glc II et Glc III), deux Ara (Ara I et Ara II), un Rha et un Xyl.

Une analyse approfondie des spectres HMBC et ROESY démontre que **Bw6** partage une grande partie de sa structure avec **Bw5**. Les séquences glycosidiques Ara II-(1→4)-Glc I-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara I et Glc III-(1→6)-Glc II en C-3 et C-28 sont conservées. La particularité structurale de **Bw6** sur **Bw5**, concerne l'élongation de la chaîne sucrée en C-3 par un résidu Xyl. Ce dernier est lié à la position n°3 de Ara II sur la base des corrélations HMBC et ROESY respectives à δ_H/δ_C 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/83.1 (Ara II-3) et δ_H/δ_H 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/4.12 (Ara II-3).

La structure de **Bw6** est ainsi déterminée comme étant la suivante : 3-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester.







2.3.9 **Bw7** (*Bwe2*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Bw7**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1565$, correspondant à un poids moléculaire de 1542, compatible avec la formule brute $C_{71}H_{114}O_{36}$.

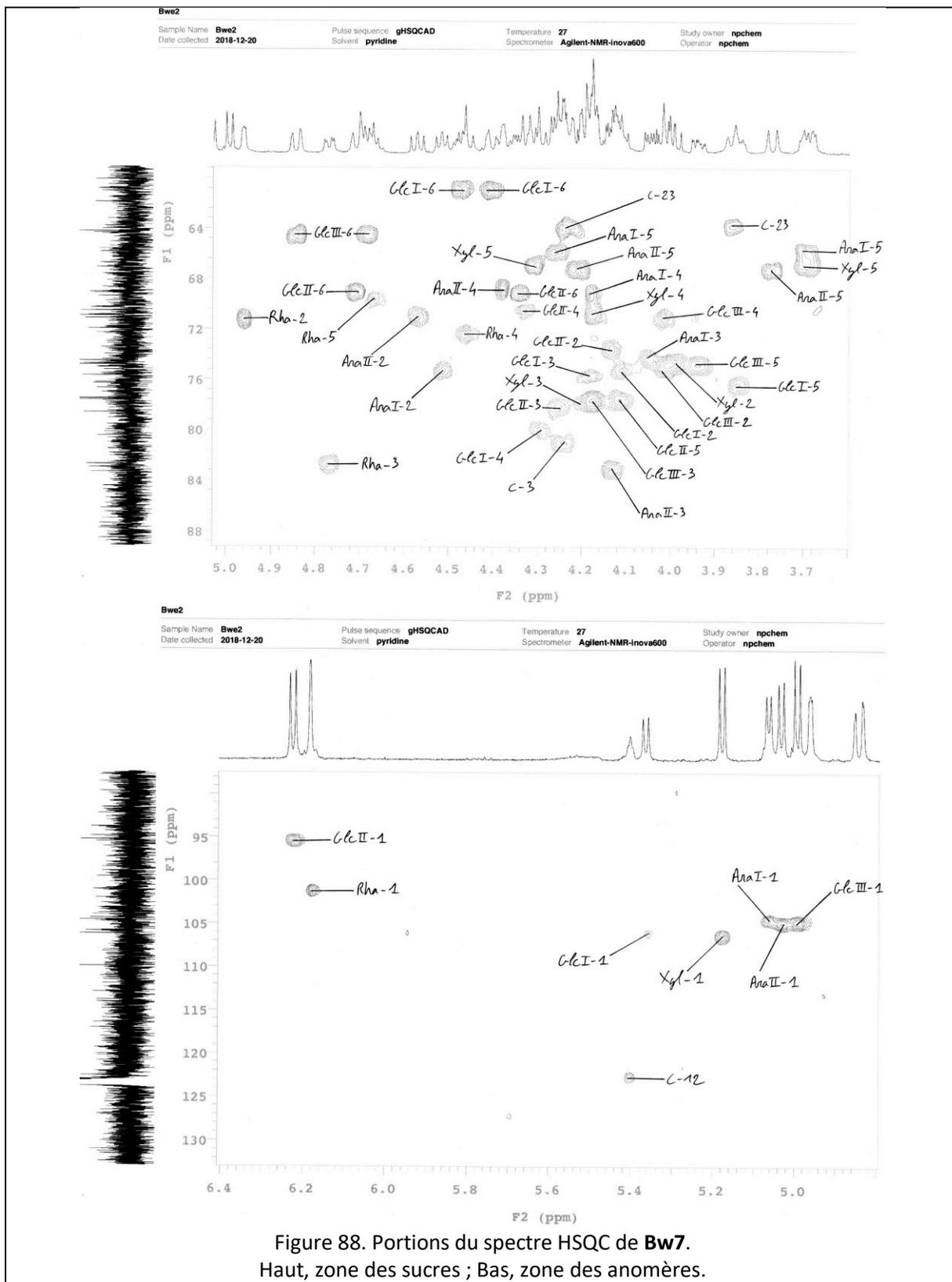
— Spectroscopie RMN

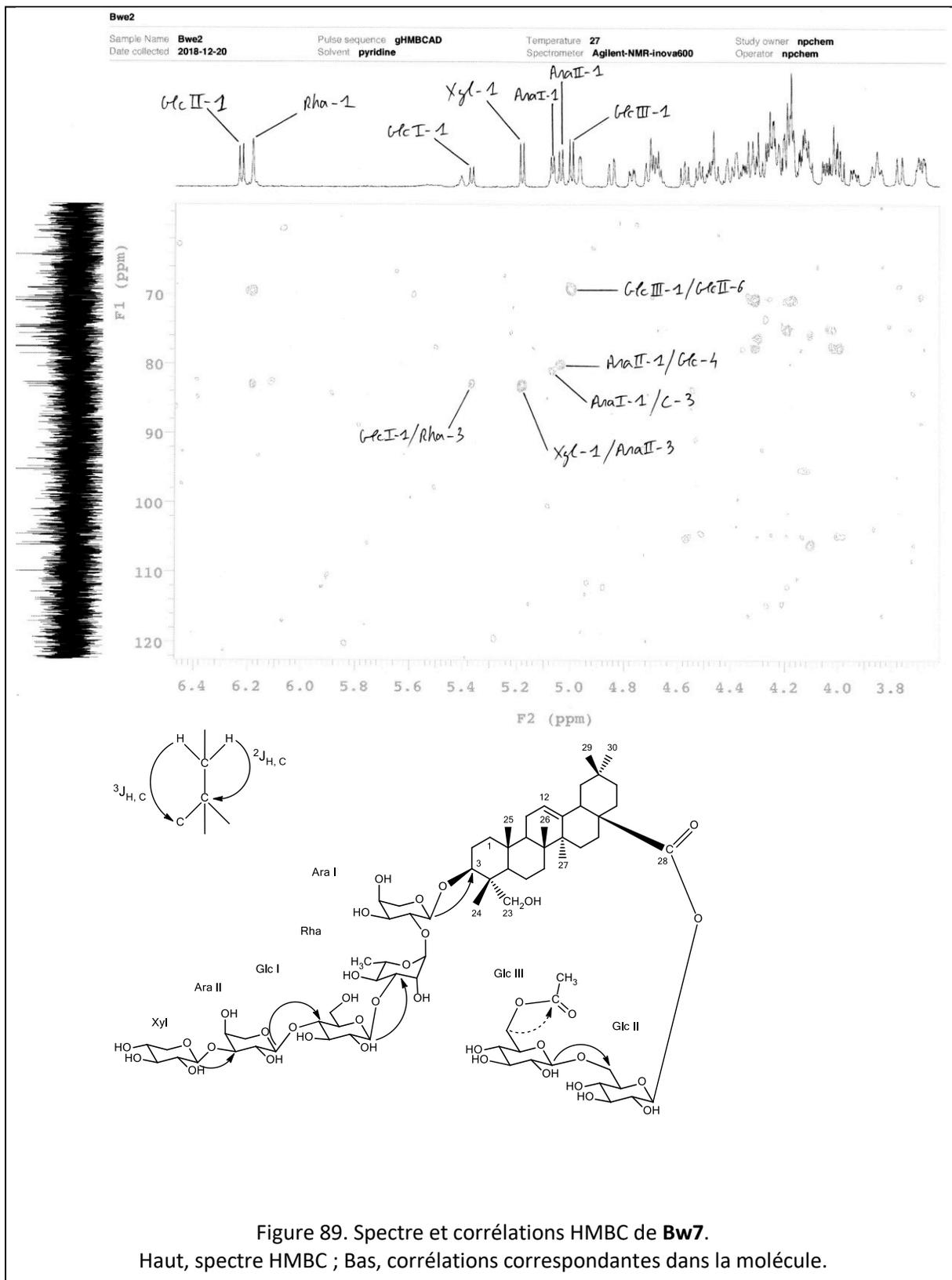
Similairement à **Bw6**, **Bw7** est un bidesmoside de l'hédéragénine substitué en C-3 et C-28.

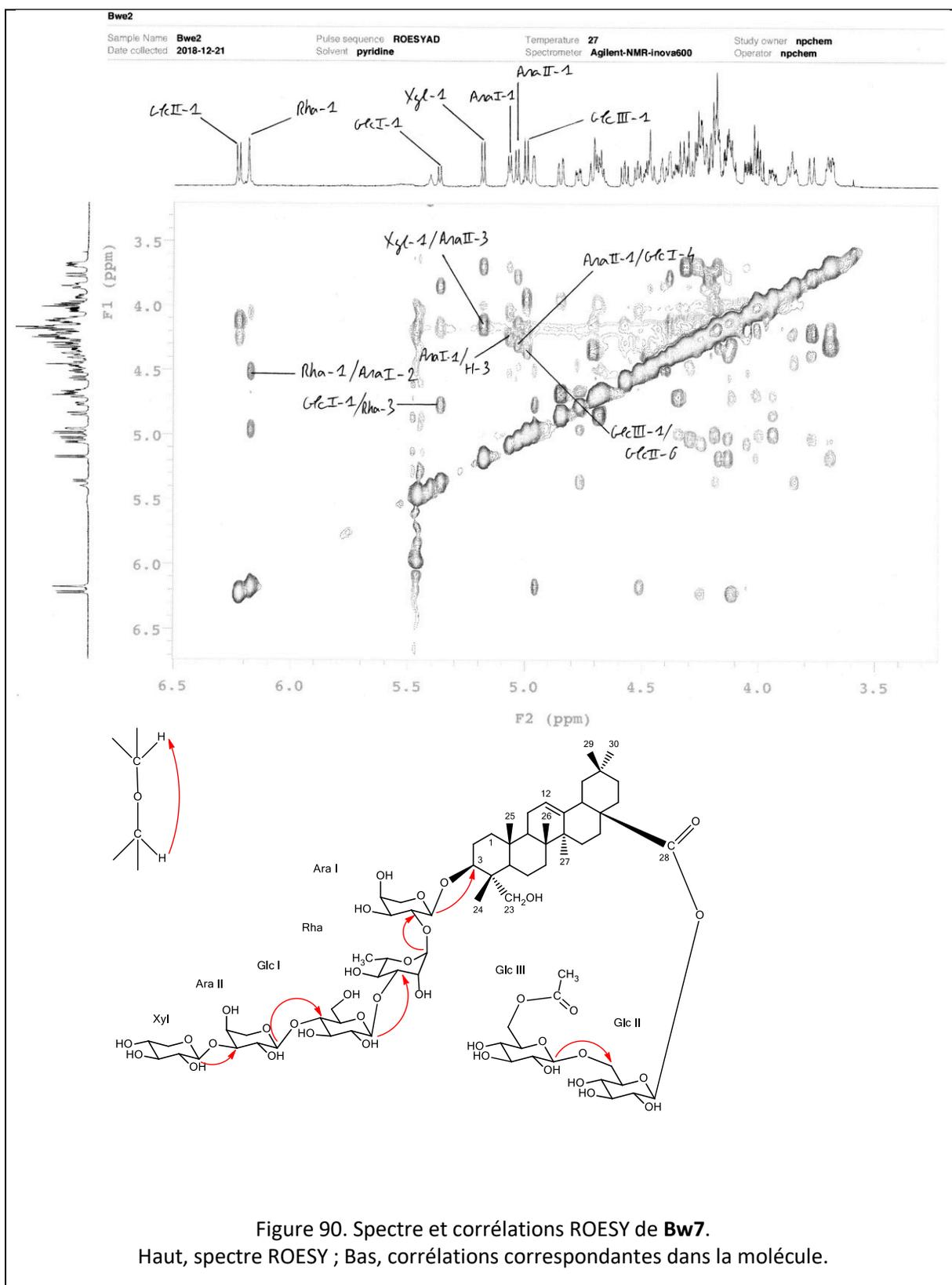
Dans la région des anomères, le spectre HSQC de **Bw7** est superposable à celui de **Bw6**, suggérant une conservation des sept monomères de sucres précédemment identifiés (Glc I, Glc II, Glc III, Ara I, Ara II, Rha et Xyl). Une fonction acétyle est également identifiée sur la base d'une corrélation HMBC à δ_H/δ_C 1.97 (s, 3H) (Ac CH₃)/171.0 (Ac C=O).

L'analyse comparative des données HMBC et ROESY de **Bw6** et **Bw7** révèle que les deux composés partagent quasiment la même structure. La seule différence observable concerne la présence d'un acétyle surnuméraire chez **Bw7**. Ce dernier est localisé au niveau de la position n°6 du Glc III comme attesté par la corrélation HMBC à δ_H/δ_C 4.68 (Glc III-6)/ δ_C 171.0 (Ac C=O).

Sur la base de ces éléments spectroscopiques, la structure de **Bw7** est identifiée comme étant la suivante : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*-(6-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.



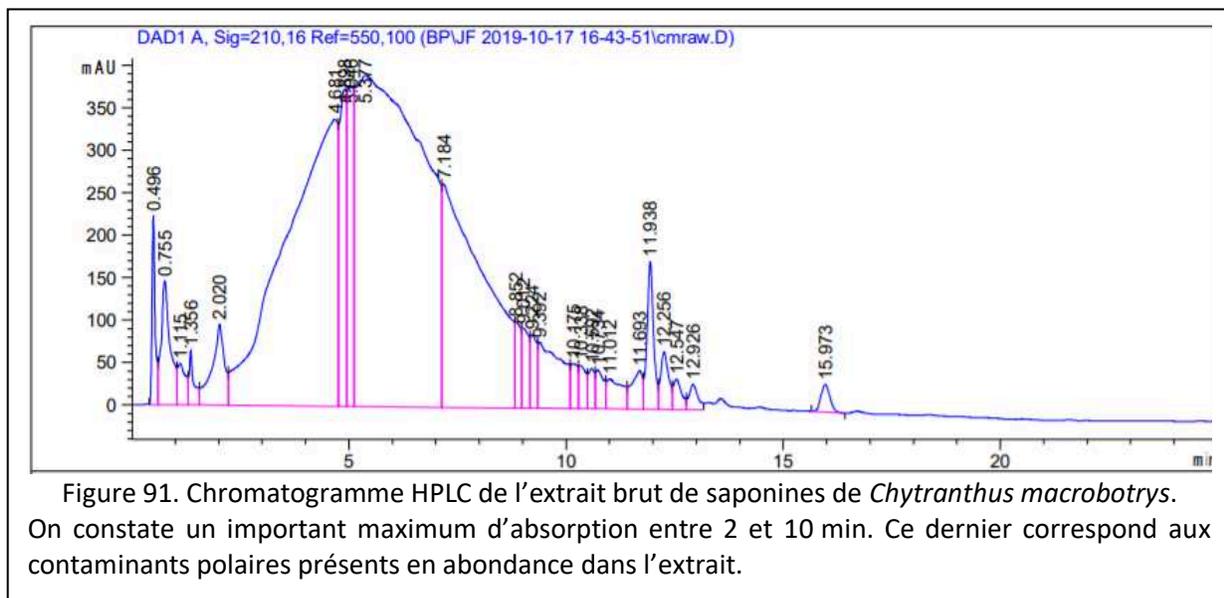




Chapitre 2.4 Exploration phytochimique de l'extrait de *Chytranthus macrobotrys*

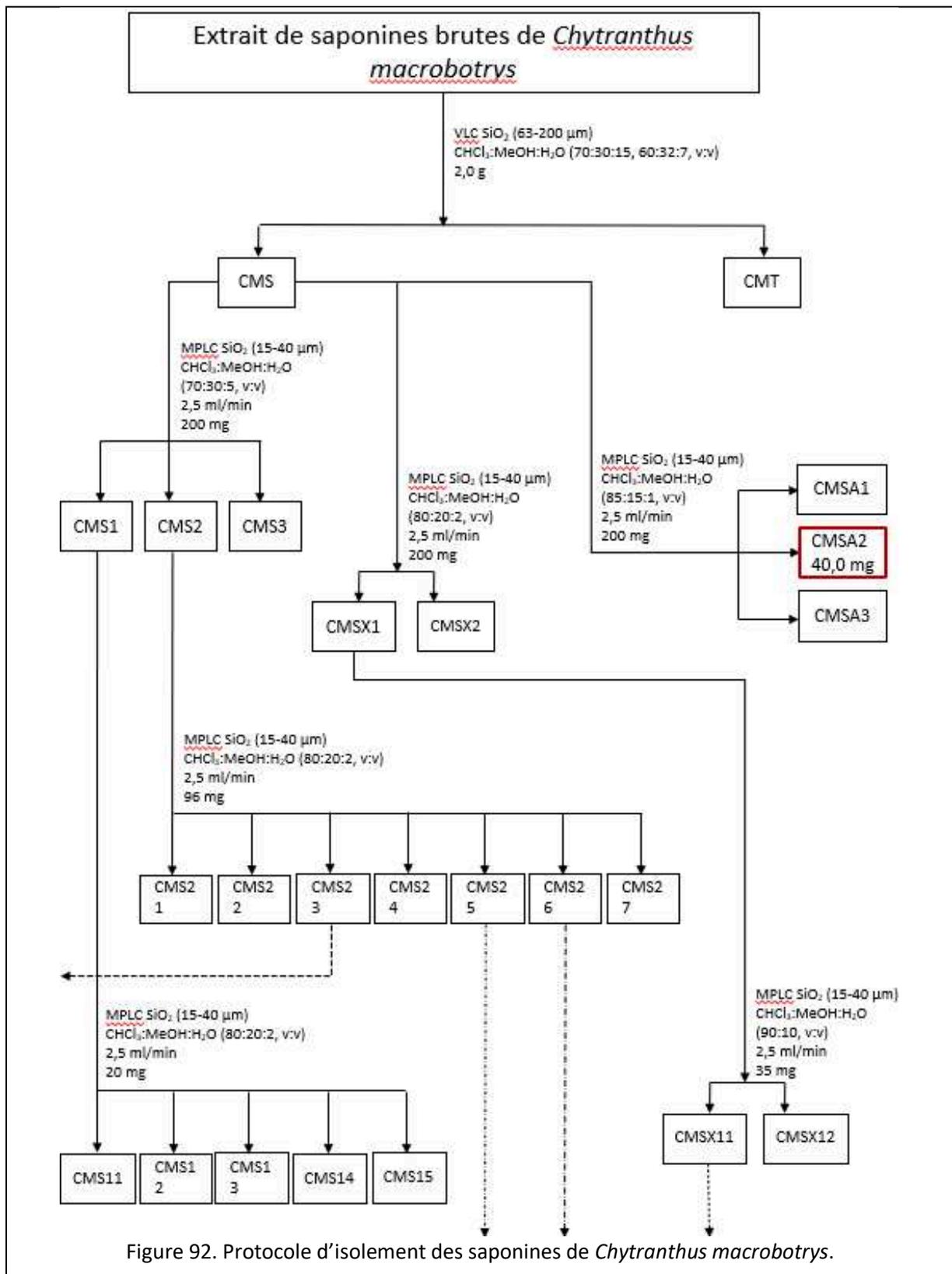
2.4.0 Analyse de l'extrait

Les analyses TLC et HPLC de l'extrait de *Chytranthus macrobotrys* montrent la présence de contaminants polaires colorés ne correspondant pas à des glycosides. Une analyse approfondie en HPLC-DAD-MS permet de mettre en évidence de multiples maximums d'absorption entre 200 et 300 nm ainsi que des poids moléculaires avoisinant les 100 uma. Leur caractérisation complète n'a pas été réalisée. Toutefois, ces contaminants semblent correspondre à des tannins ou à d'autres polyphénols de plus petite taille. Après élimination de la fraction contaminante, représentant environ les deux-tiers de l'extrait en masse, les analyses phytochimiques révèlent la présence d'une douzaine de composés répartis en deux clusters attribués à des saponines mono- et bidesmosidiques. Les bidesmosides sont très minoritaires et ne représentent que 5 % de la fraction saponine. L'ensemble de ces caractéristiques rend difficile l'isolement des saponines de *Chytranthus macrobotrys*, dans la mesure où de nombreuses étapes préliminaires seront nécessaires pour amplifier la fraction saponine ainsi que la fraction bidesmoside, extrêmement minoritaire.



2.4.1 Isolement des composés

Neuf composés purs ont été obtenus à partir de l'extrait brut de *Chytranthus macrobotrys*. Les méthodes employées pour les obtenir ainsi que les quantités de matière utilisées sont détaillées dans le schéma d'isolement suivant.



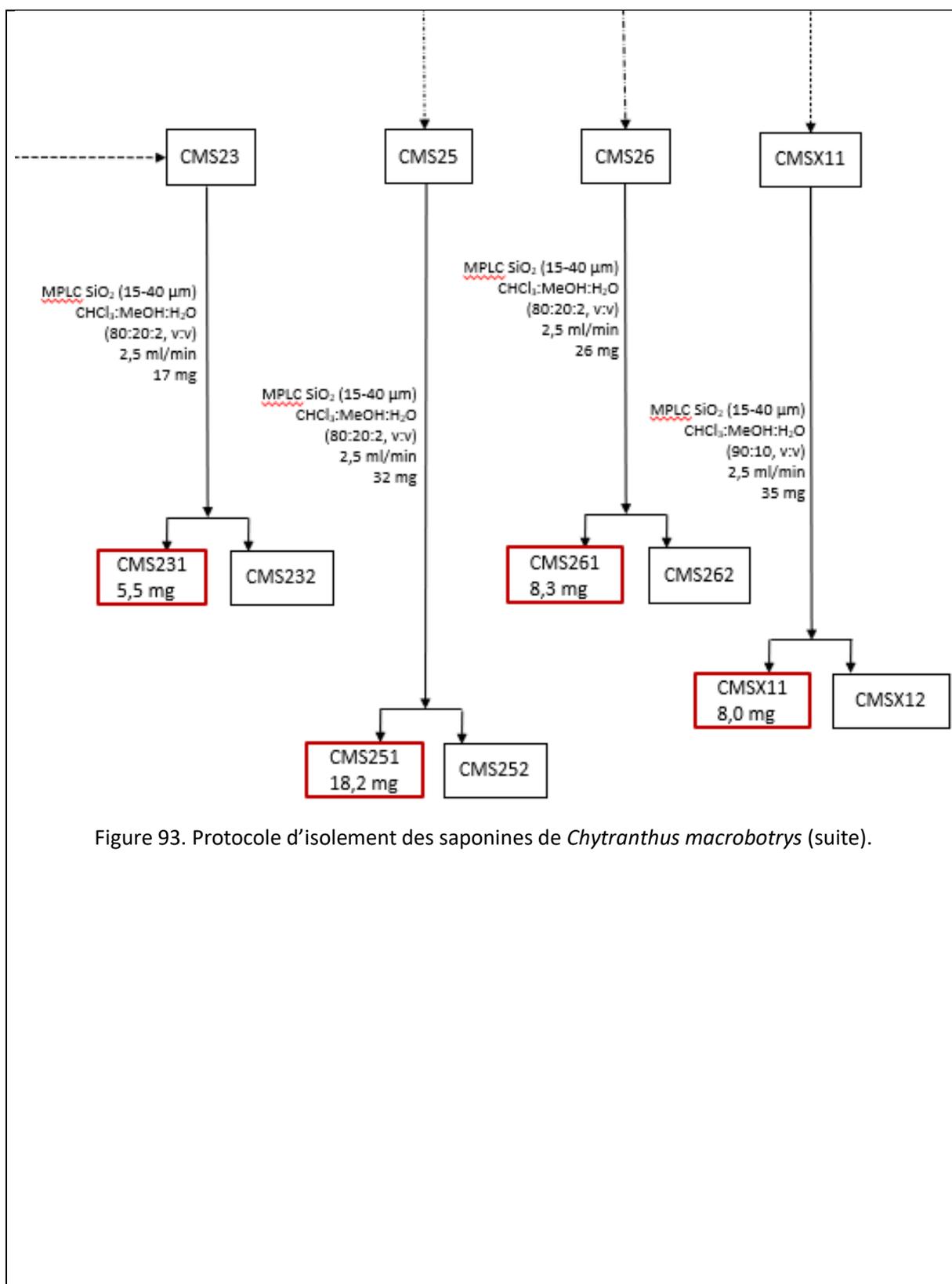
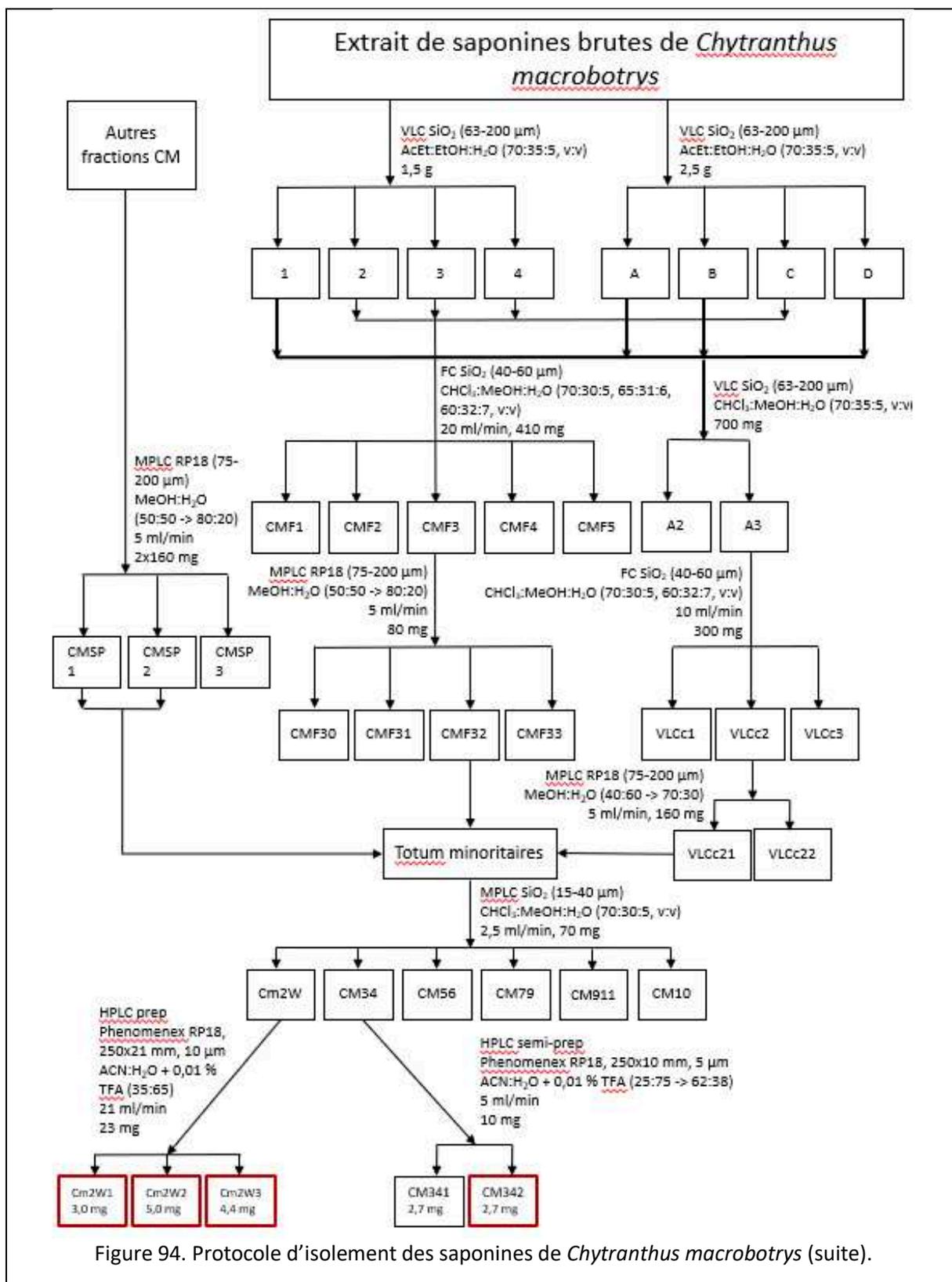


Figure 93. Protocole d'isolement des saponines de *Chytranthus macrobotrys* (suite).



2.4.2 Détermination structurale

Les analyses spectroscopiques révéleront les structures des neuf composés dont deux saponines de structures nouvelles (**Cm1-Cm2**) auxquelles s'ajoutent sept composés précédemment décrits (**Cm3-Cm9**). Ces derniers voient leurs structures élucidées, sur la base d'une analyse comparative de leurs données spectroscopiques avec celles de la littérature, comme étant du 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (klainanoside C) (**Cm3**) (*Cms251*), de l'hédéragénine (**Cm4**) (*CmsX11*), du 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (α -hederin) (**Cm5**) (*CmsA2*), 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (macranthoside A) (**Cm6**) (*Cms231*), 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**Cm7**) (*Cm2w2*), 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénin 28-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl ester (**Cm8**) (*Cm2w1*), 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénin 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**Cm9**) (*Cm341*) (=Bu8).

2.4.3 Cm1 (*Cms261*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Cm1**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1067$, correspondant à un poids moléculaire de 1044, compatible avec la formule brute $C_{52}H_{84}O_{21}$.

— Spectroscopie RMN

Il est important de rappeler que les tableaux de déplacements chimiques pour tous les composés nouveaux décrits de *Chytranthus macrobotrys* sont disponibles dans l'article n°3.

De manière similaire aux produits isolés de *Blighia unijugata* et *Blighia welwitschii*, toutes les saponines de *Chytranthus macrobotrys* ont pour aglycone l'hédéragénine. La génine de **Cm1** présente un C-3 et un C-28 dont les δ_C résonnent à 81.2 et 181.1, respectivement, valeurs indicatives d'un monodesmoside de l'hédéragénine branché en C-3.

Le spectre du proton de **Cm1** présente des signaux à δ_H/δ_C 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz) (Ara II-1)/105.0, 5.12 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/104.3, 5.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/105.4 et 6.09 (br s)

(Rha-1)/101.1 attribuables à la présence de quatre sucres. Ces derniers sont identifiés sur la base des données COSY, TOCSY et HSQC comme étant deux Ara (Ara I et Ara II), un Rha et un Glc (Glc I).

Une analyse approfondie des données HMBC et ROESY permet de mettre en évidence la séquence glycosidique. Celle-ci est basée sur les éléments spectroscopiques suivants :

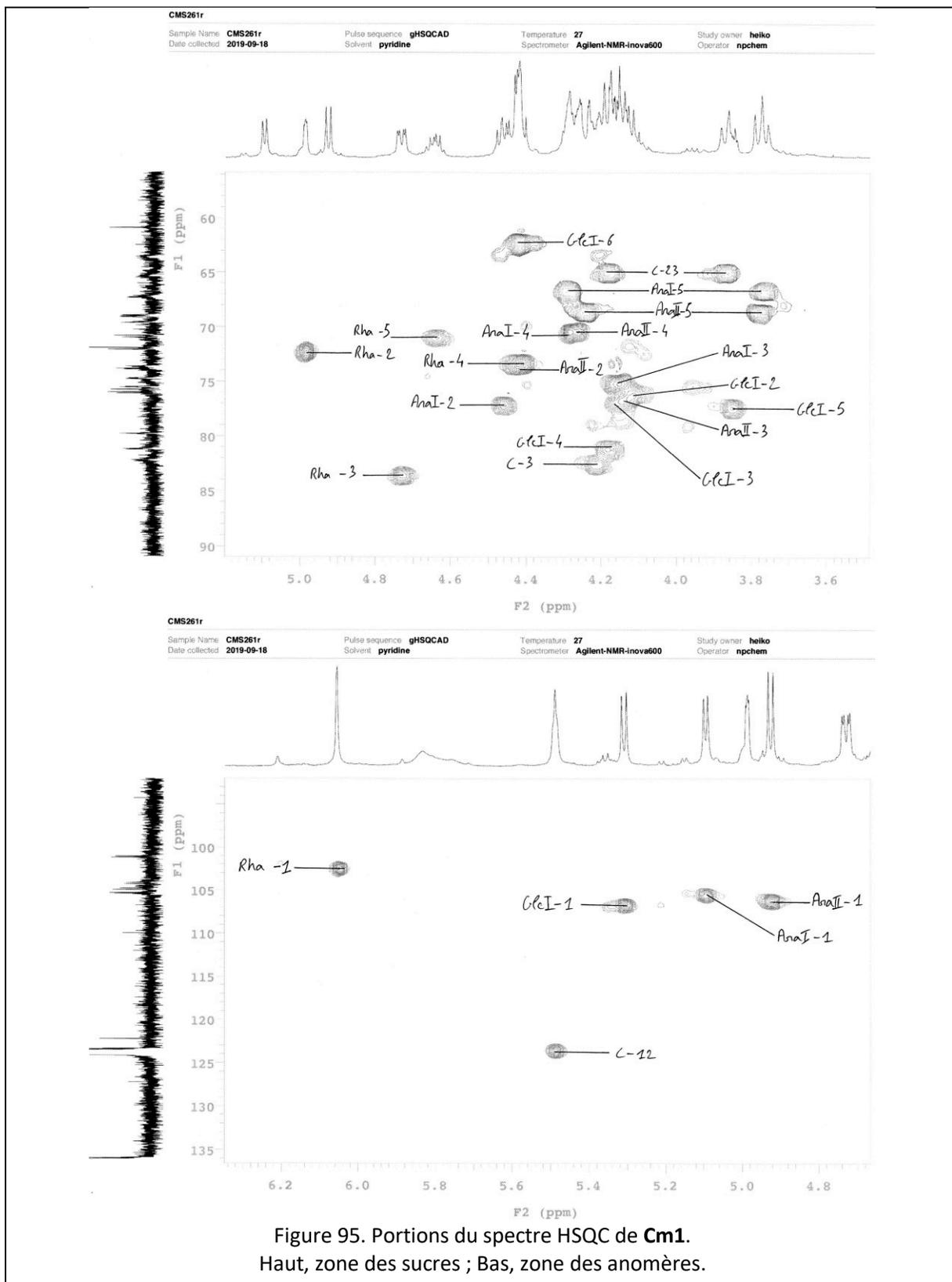
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 5.12 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/81.2 (C-3) et δ_H/δ_H 5.12 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/4.22 (H-3) prouvent la liaison entre Ara I-1 et le C-3 de l'aglycone.

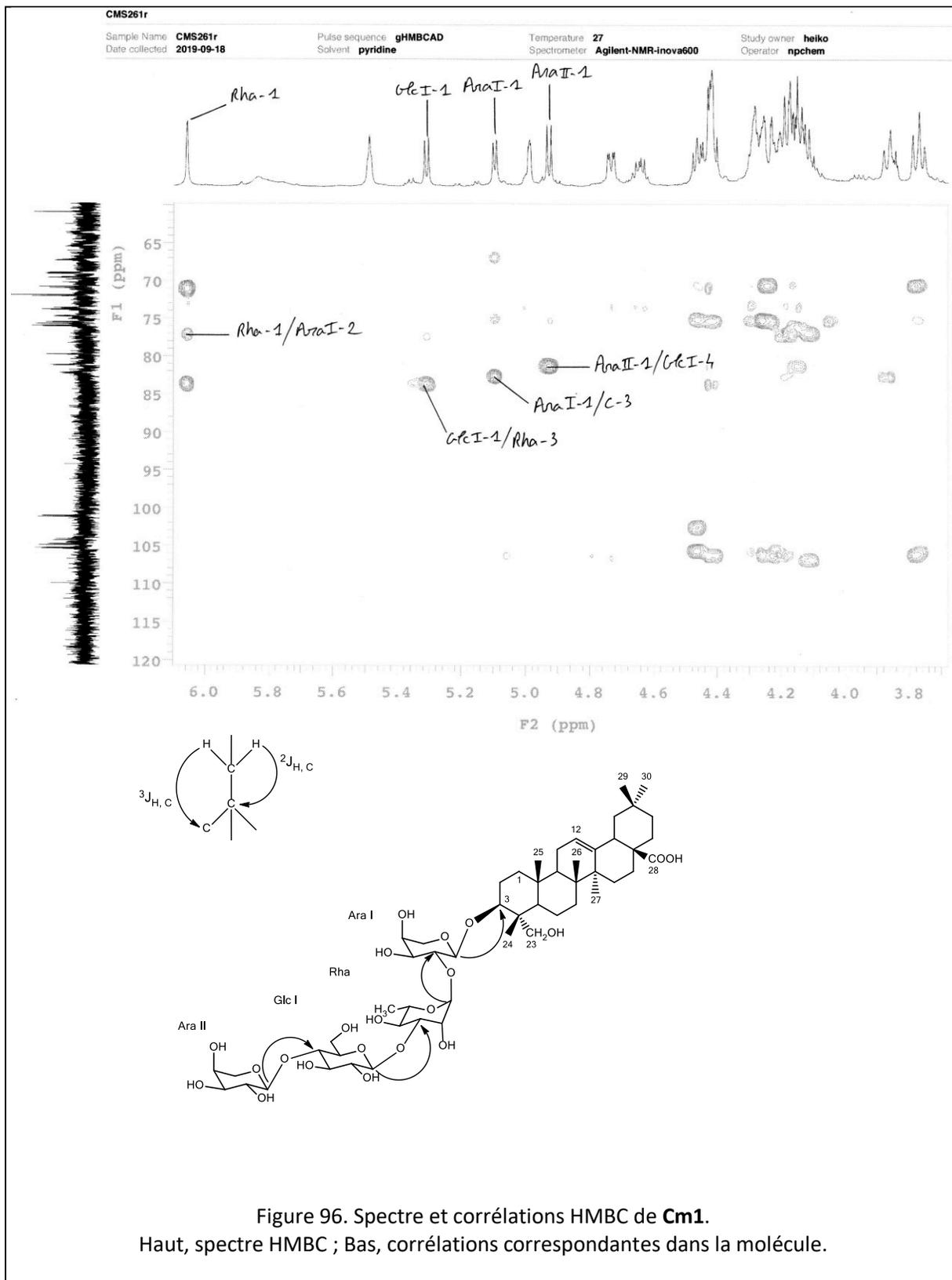
– Les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 6.09 (br s) (Rha-1)/76.1 (Ara I-2) et δ_H/δ_H 6.09 (br s) (Rha-1)/4.49 (dd, $J = 7.8, 6.6$ Hz) (Ara I-2) établissent la liaison (1→2) *O*-glycosidique entre Rha-1 et Ara I-2.

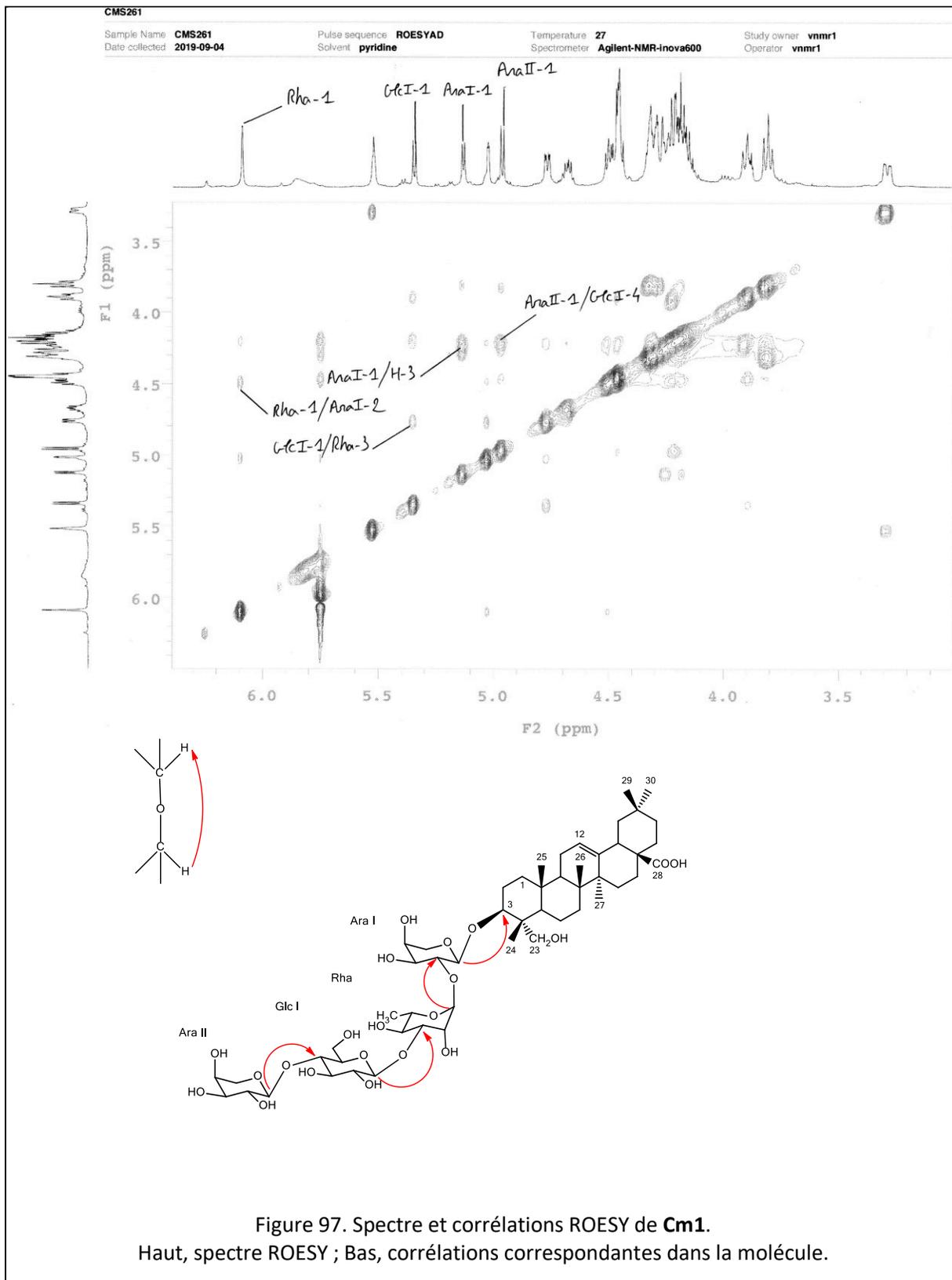
– Les corrélations HMBC et ROESY respectivement à δ_H/δ_C 5.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/82.2 (Rha-3) et δ_H/δ_H 5.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/4.75 (dd, $J = 9.3, 2.7$ Hz) (Rha-3) prouvent la liaison (1→3) *O*-glycosidique entre Glc I-1 et Rha-3.

– Les corrélations respectives HMBC et ROESY à δ_H/δ_C 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz) (Ara II-1)/79.8 (Glc I-4) et δ_H/δ_H 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz) (Ara II-1)/4.19 (Glc I-4) démontrent la présence d'une liaison (1→4) *O*-glycosidique entre Ara II-1 et Glc I-4.

La structure de **Cm1** est donc établie ainsi : 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine.







2.4.4 **Cm2** (*Cm2w3*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Cm2**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1067$, correspondant à un poids moléculaire de 1044, compatible avec la formule brute $C_{52}H_{84}O_{21}$.

— Spectroscopie RMN

L'hédéragénine de **Cm2** voit son C-28 blindé à δ_C 176.6, valeur indicative d'une substitution de la liaison ester à cette position.

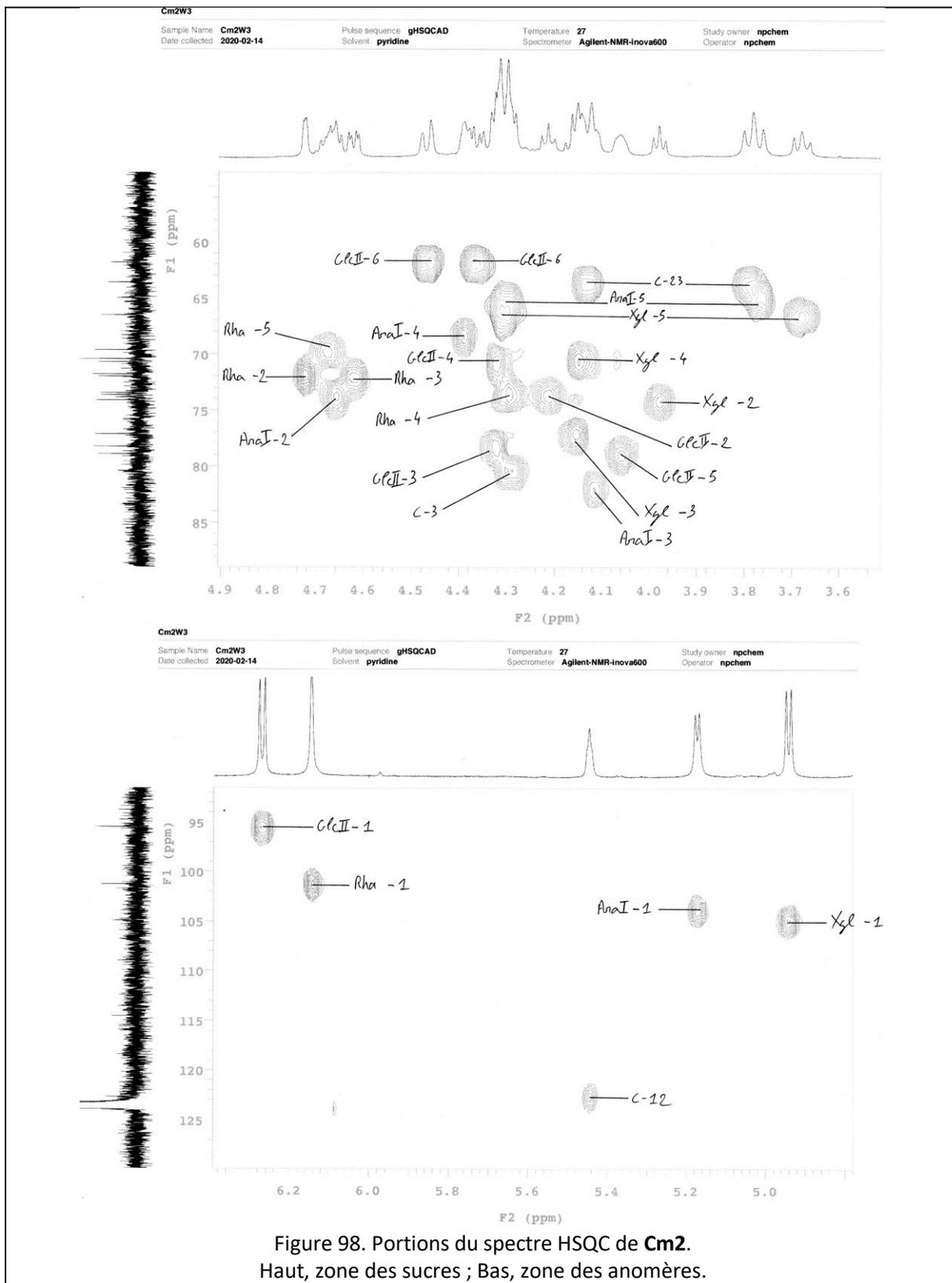
Le spectre du proton de **Cm2** présente des signaux à δ_H 4.94 (d, $J = 7.2$ Hz), 5.17 (d, $J = 6.0$ Hz), 6.14 (br s) and 6.27 (d, $J = 7.8$ Hz) corrélant en HSQC avec d'autres signaux à δ_C 106.0, 104.9, 101.3 and 95.5, respectivement. Ces valeurs sont attribuées à la présence de quatre sucres, identifiés par exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme étant un Ara (Ara I), un Rha, un Glc (Glc II) et un Xyl.

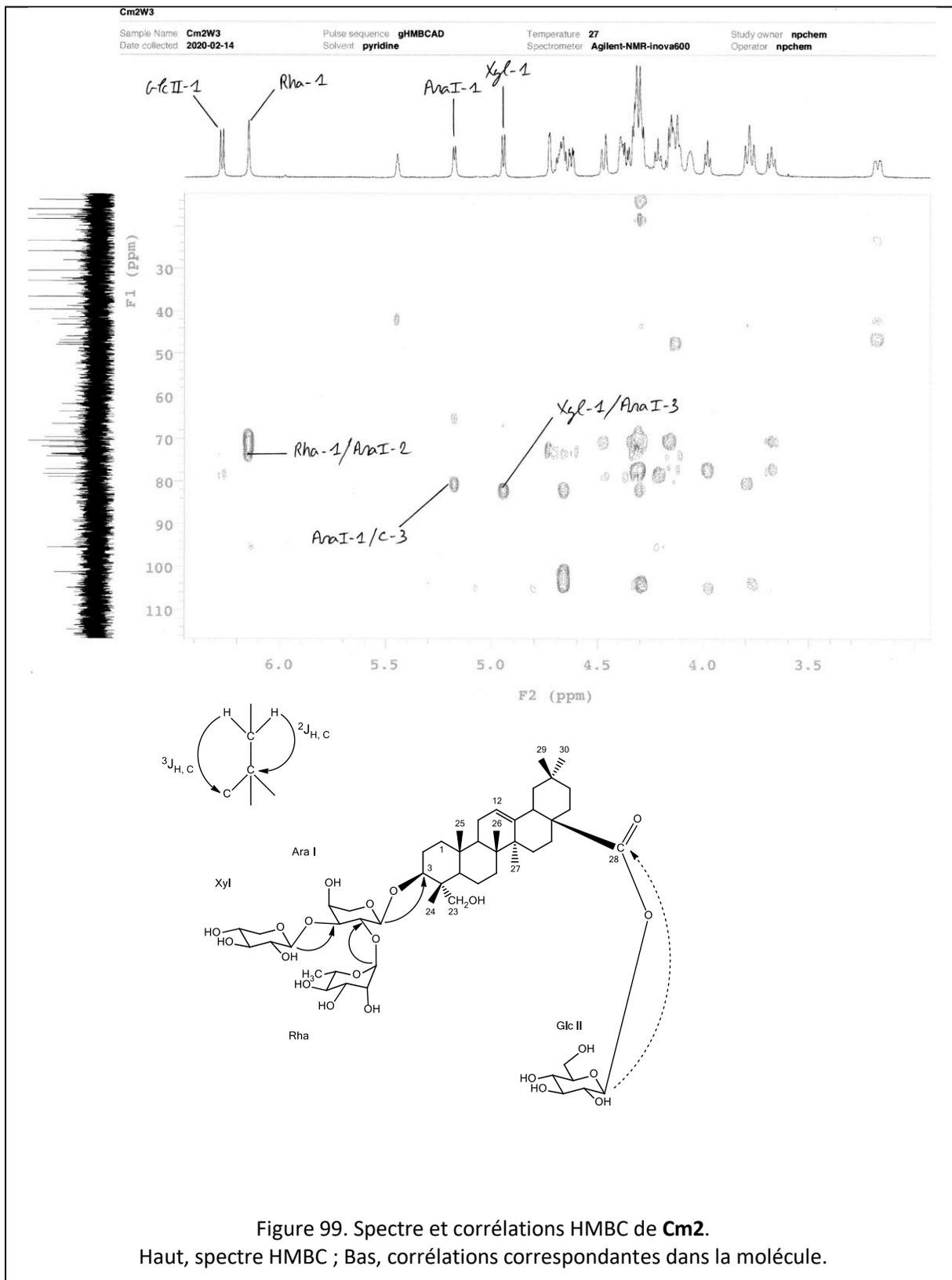
Une analyse détaillée des spectres HMBC et ROESY permet de mettre en évidence la conservation du motif Rha-(1→2)-Ara I en C-3 de l'hédéragénine, précédemment retrouvé chez **Cm1**. Des différences structurales sont toutefois observées, basées sur les éléments suivants :

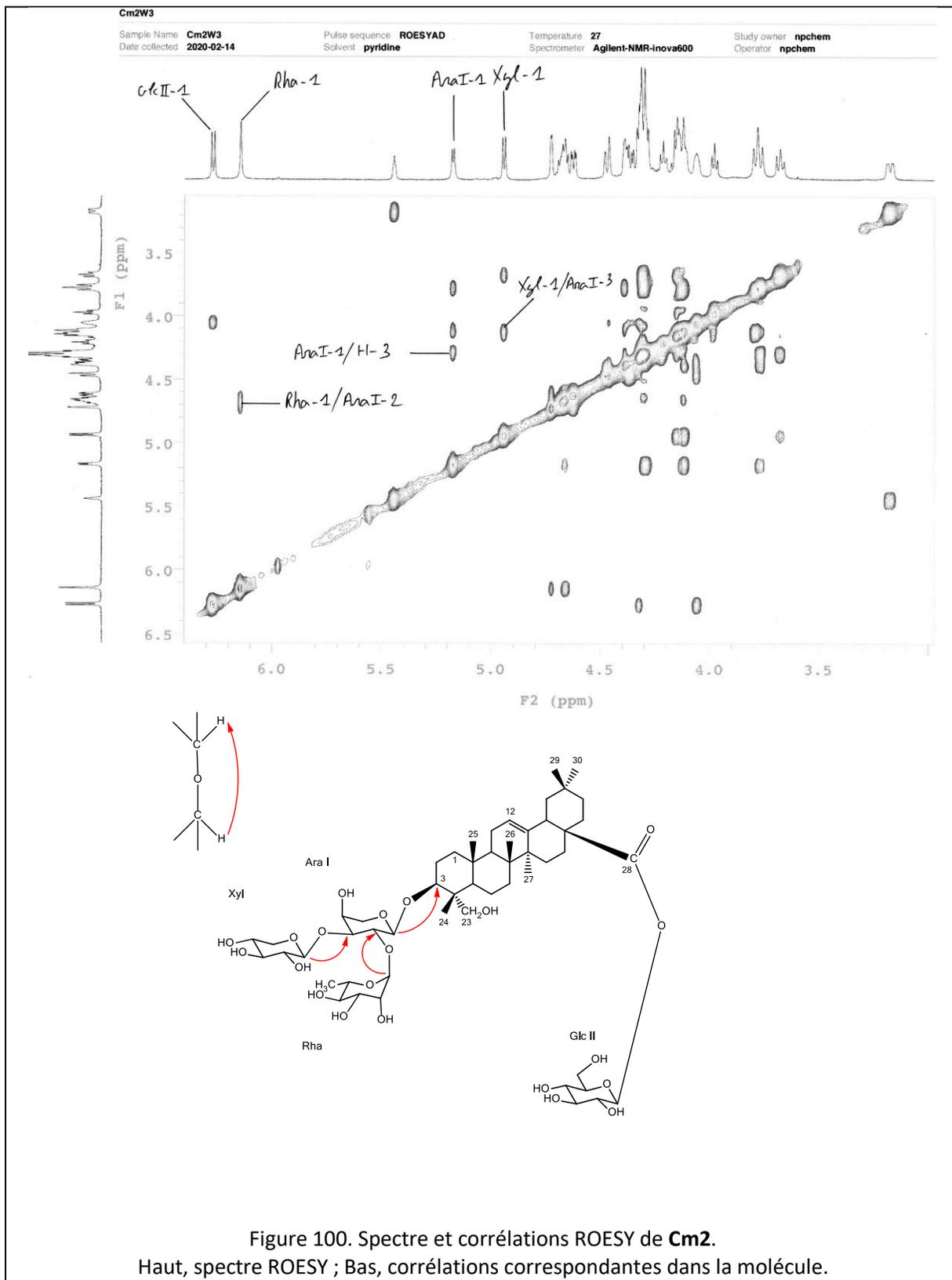
– Une seconde substitution de Ara I, sur sa position n°3 cette fois, établie par les corrélations HMBC et ROESY à δ_H/δ_C 4.94 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/82.0 (Ara I-3) et δ_H/δ_H 4.94 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/4.11 (Ara I-3).

– L'engagement du C-28 dans une liaison ester avec Glc II, conformément à la corrélation HMBC à δ_H/δ_C 6.27 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc II-1)/176.6 (C-28).

La structure de **Cm2** est déterminée ainsi : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1→3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- α -L-arabinopyranosylhédéragénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



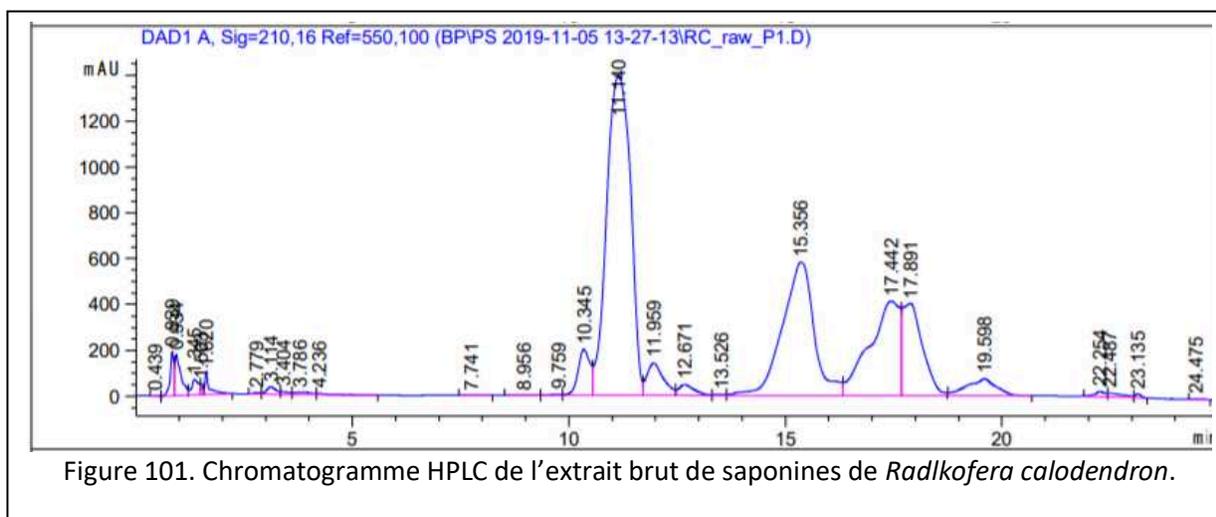




Chapitre 2.5 Exploration phytochimique de l'extrait de *Radlkofera calodendron*

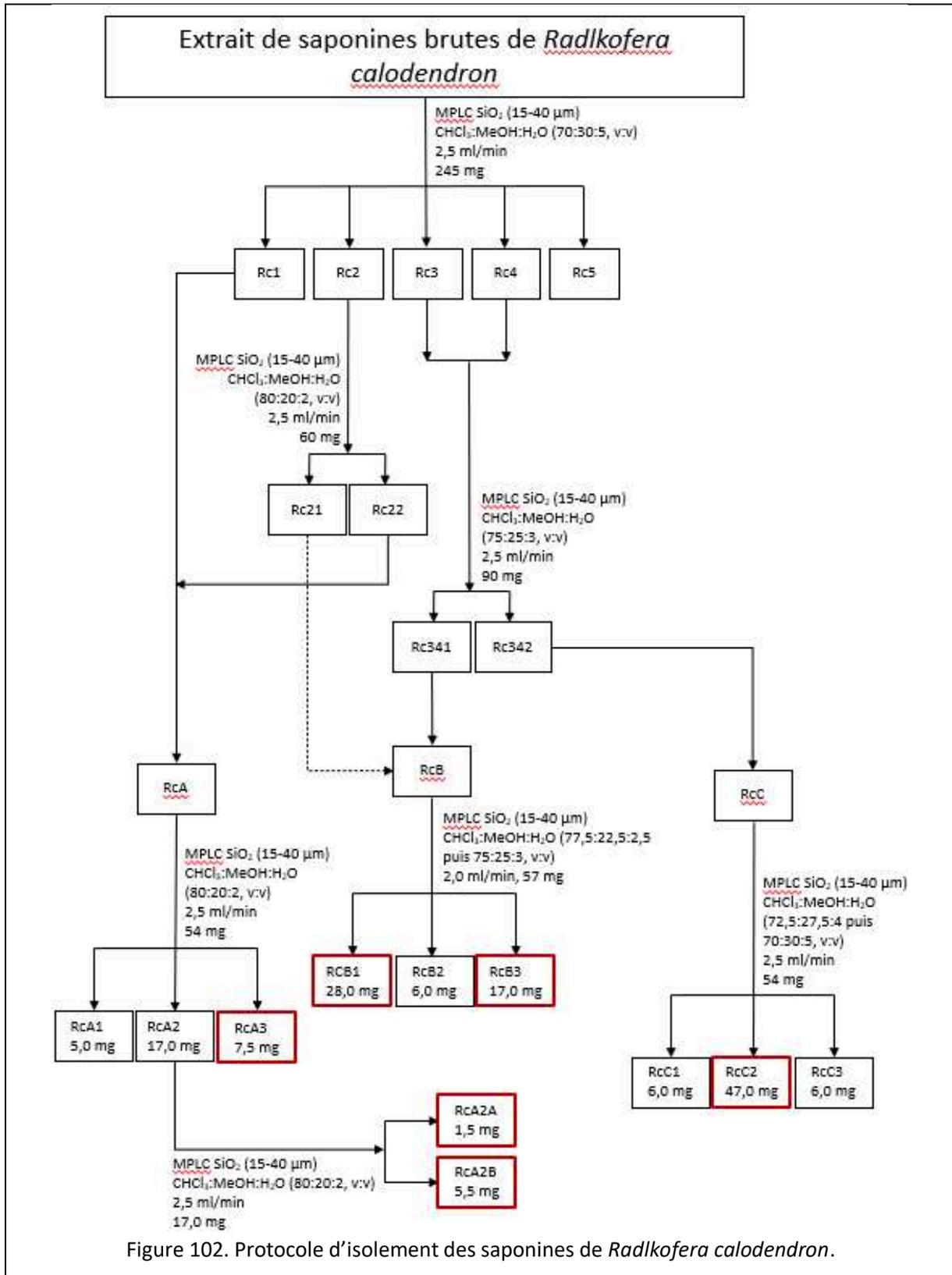
2.5.0 Analyse de l'extrait

Les analyses TLC et HPLC de l'extrait brut de *Radlkofera calodendron* révèle la présence de moins de dix métabolites dont cinq sont très majoritaires. Le faible nombre de composés, couplé aux quantités importantes d'extrait initial pouvant être mobilisées, offrent de bonnes perspectives en matière d'isolement.



2.5.1 Isolement des composés

Six isolats sont obtenus à partir de l'extrait brut de *Radlkofera calodendron*. Les méthodes employées pour les obtenir ainsi que les quantités de matière utilisées sont détaillées dans le schéma d'isolement suivant.



2.5.2 Détermination structurale

Les six isolats correspondent à six composés purs dont cinq d'entre eux verront leurs structures élucidées. Le composé **Rc6** (*RcA2A*) ne peut être caractérisé car les quantités isolées sont trop faibles pour permettre des analyses spectroscopiques. Ces dernières révéleront la nature des autres produits, correspondant à deux glycosides de structures nouvelles (**Rc1** et **Rc2**) et trois saponines précédemment décrites (**Rc3-Rc5**) : 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine (macranthoside A) (**Rc3**) (*RcA3*) (=Cm6), 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine (clemantoside C) (**Rc4**) (*RcA2B*) et 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine (**Rc5**) (*RcB3*) (=Cm1).

2.5.3 **Rc1** (*RcB1*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Rc1**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 1037$, correspondant à un poids moléculaire de 1014, compatible avec la formule brute $C_{51}H_{82}O_{20}$.

— Spectroscopie RMN

Comme pour *Chytranthus macrobotrys*, les tableaux de déplacements chimiques de *Radlkofera calodendron* sont disponibles dans l'article n°3.

La génine de **Rc1** présente un C-3 et un C-28 dont les δ_C résonnent à 81.0 et 180.5, respectivement, valeurs indicatives d'un monodesmoside de l'hédérágénine branché en C-3.

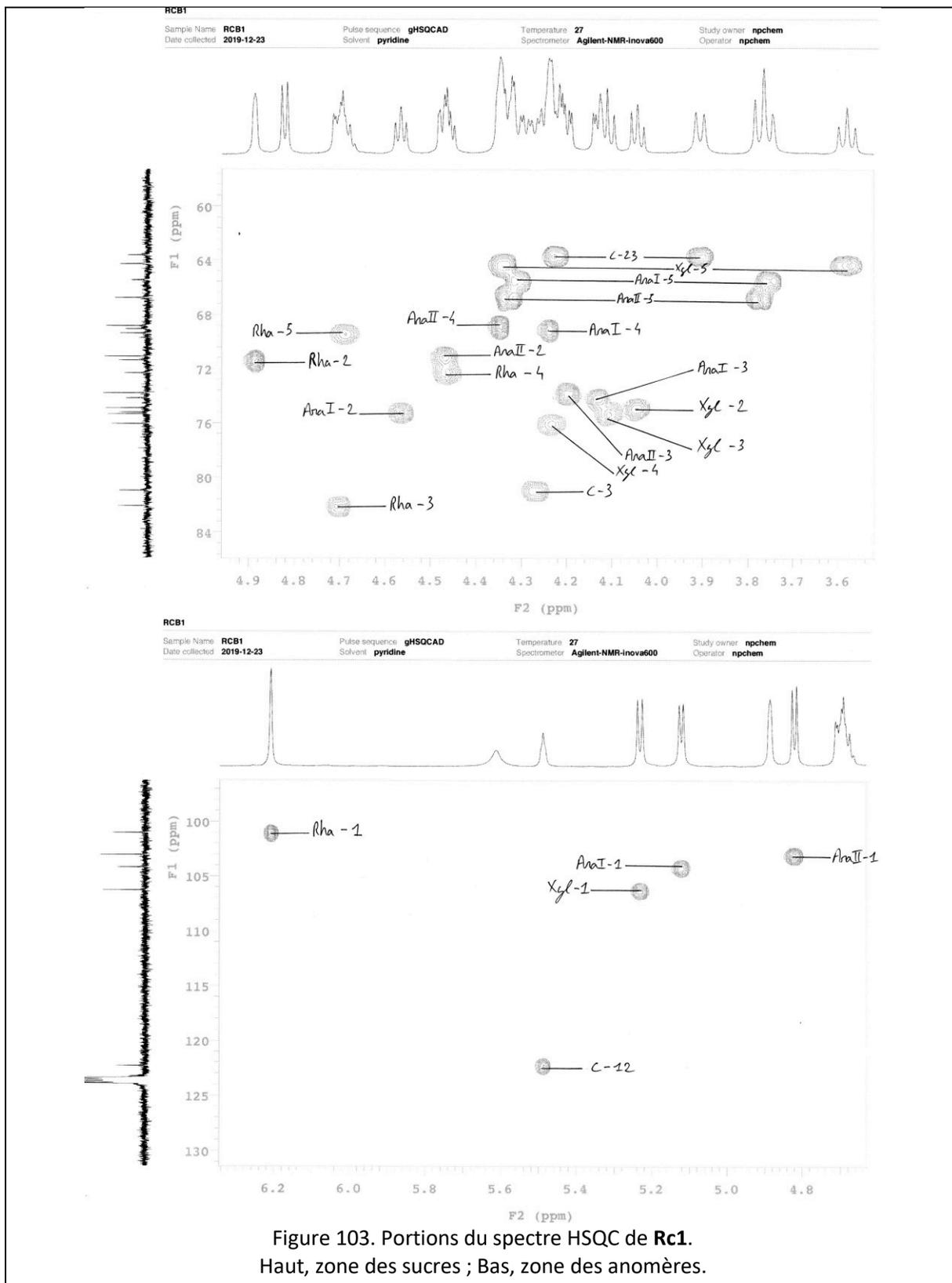
Le spectre HSQC de **Rc1** présente des corrélations à δ_H/δ_C 4.82 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/103.1, 5.12 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/104.2, 5.23 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl-1)/106.3, 6.21 (br s) (Rha-1)/101.0. Ceux-ci sont identifiés sur la base des spectres COSY, TOCSY et HSQC comme étant deux Ara (Ara I et Ara II), un Rha et un Xyl.

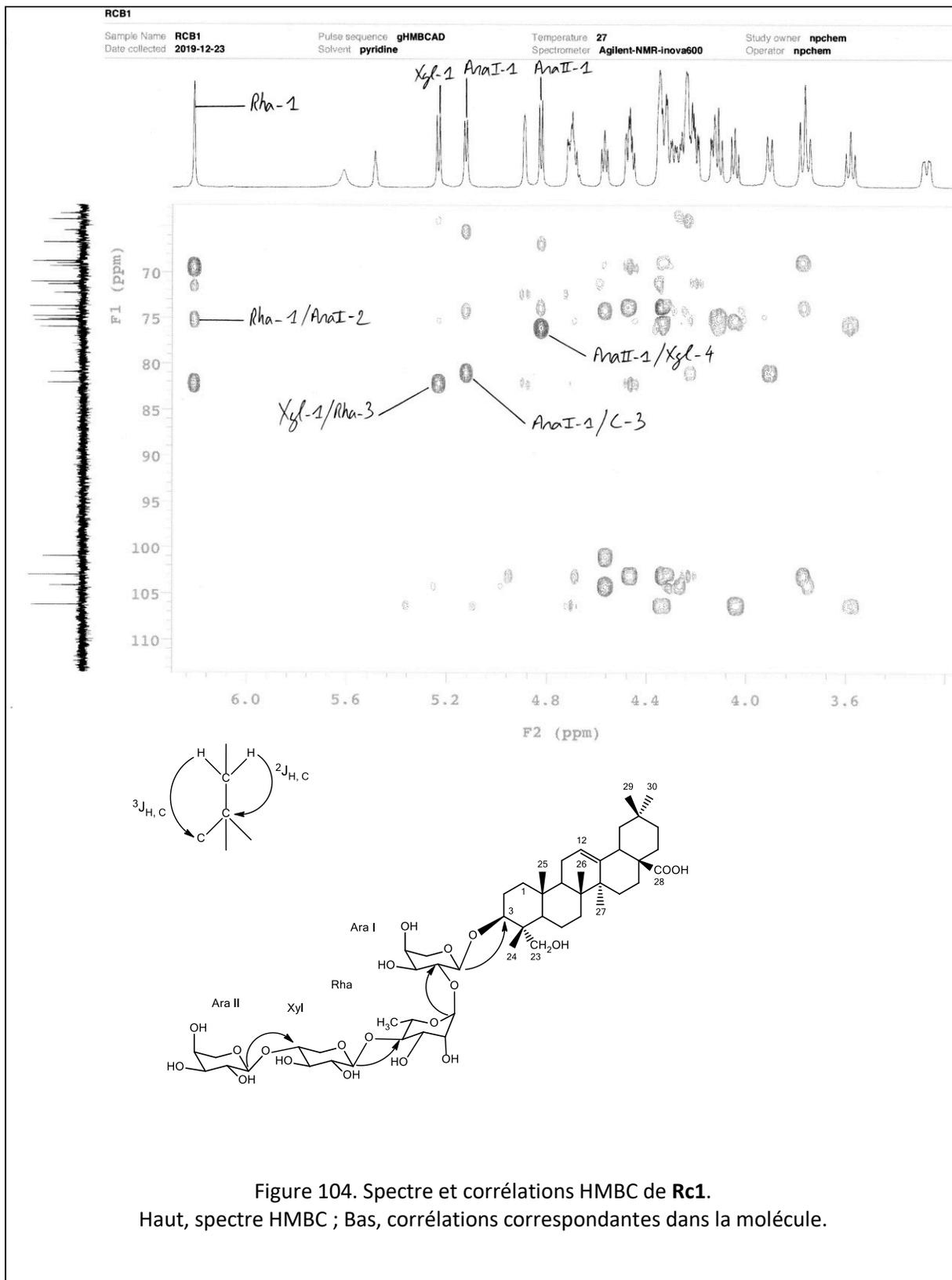
Une analyse détaillée des spectres HMBC et ROESY permet de mettre en évidence le motif Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara I en C-3 de l'hédérágénine, très conservé chez les saponines décrites précédemment. Ce disaccharide est retrouvé substitué par Xyl et Ara II sur la base des éléments suivants :

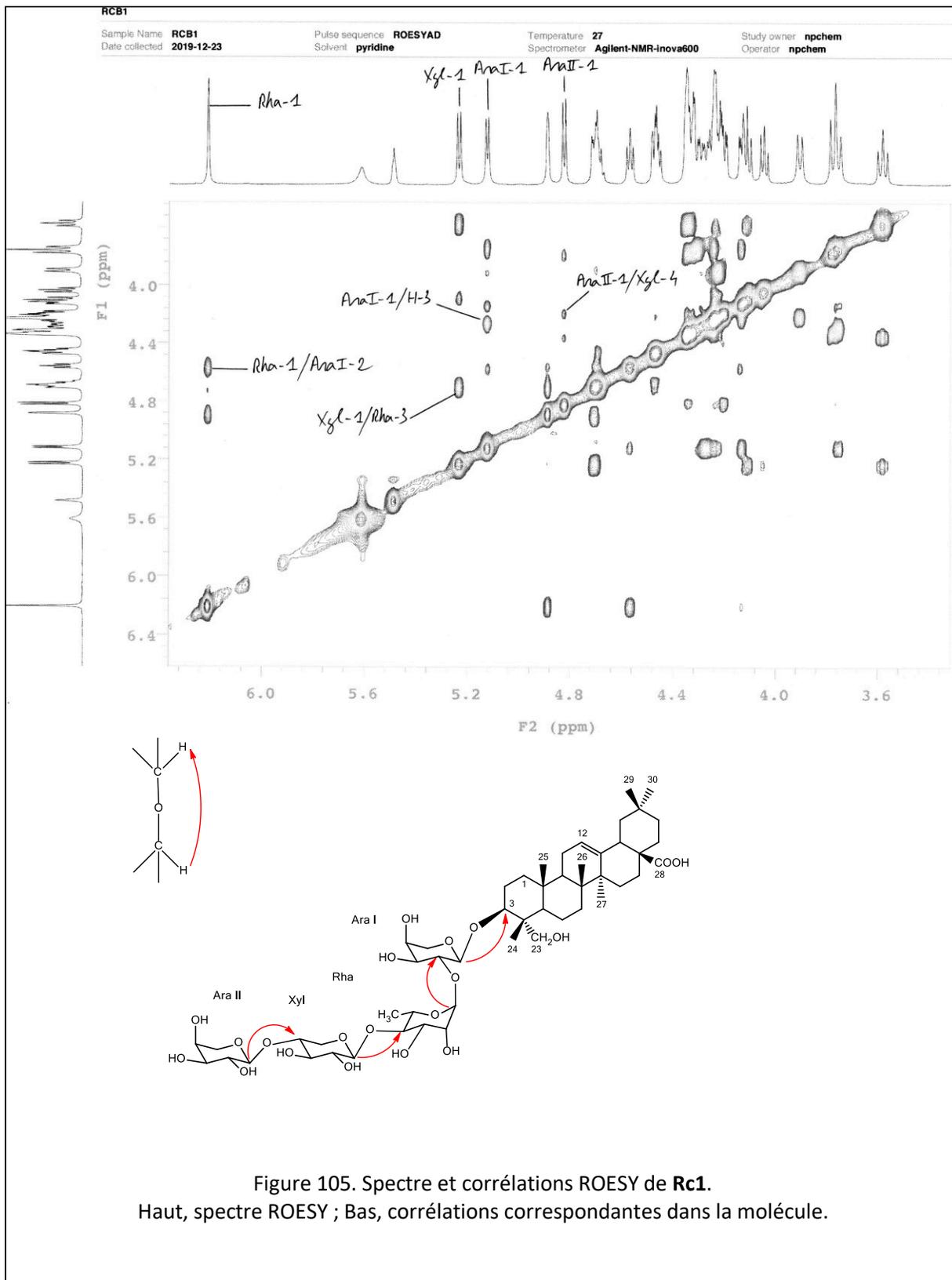
– Les corrélations HMBC et ROESY respectivement à δ_H/δ_C 5.23 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl-1)/82.1 (Rha-3) et 5.23 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl-1)/4.70 (Rha-3), mettant en évidence la liaison (1→3) *O*-glycosidique entre Xyl-1 et Rha-3.

– Les corrélations HMBC et ROESY respectivement à δ_H/δ_C 4.82 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/76.1 (Xyl-4) et 4.82 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/4.23 (Xyl-4), mettant en évidence la liaison (1→4) *O*-glycosidique entre Ara II-1 et Xyl-4.

La structure de **Rc1** est donc déterminée comme étant la suivante : 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1→4)- β -D-xylopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine.







2.5.4 **Rc2** (*RcC2*)

— Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de **Rc2**, en source ESI et mode positif, présente un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 993$, correspondant à un poids moléculaire de 970, compatible avec la formule brute $C_{44}H_{74}O_{23}$.

— Spectroscopie RMN

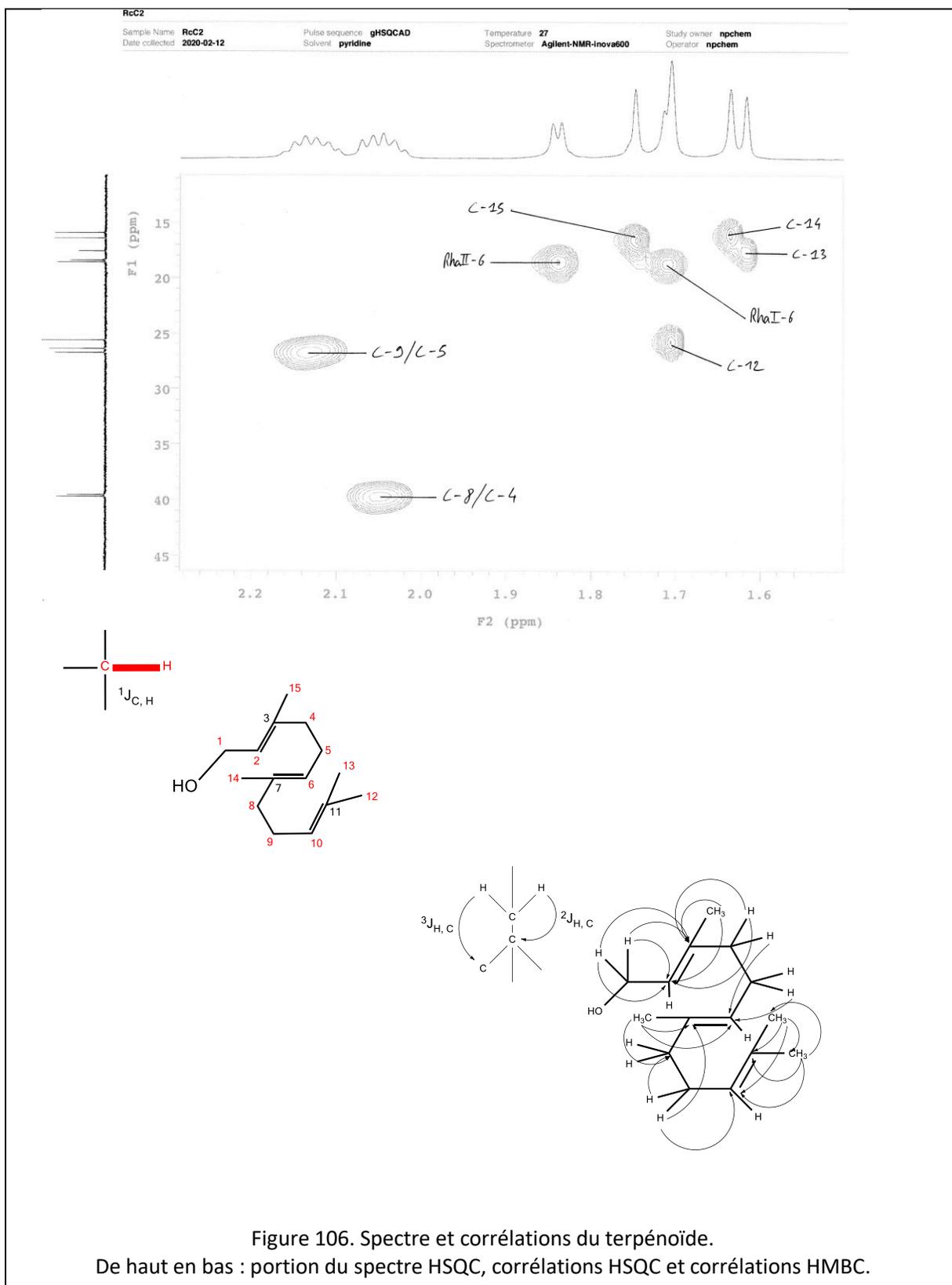
Le spectre HSQC de **Rc2** dans la région de l'aglycone permet de mettre en évidence la présence de quatre méthyles résonant à δ_H/δ_C 1.61 (s, 3H) (H-13)/17.6 (C-13), 1.63 (s, 3H) (H-14)/15.9 (C-14), 1.70 (s, 3H) (H-12)/25.6 (C-12) et 1.74 (s, 3H) (H-15)/16.4 (C-15). A cela s'ajoutent d'autres corrélations facilement attribuables telles que :

– Trois protons et carbones oléfiniques résonant à δ_H/δ_C 5.20 (H-6)/124.2 (C-6), 5.20 (H-10)/124.6 (C-10) et 5.59 (m) (H-3)/120.9 (C-3).

– Une fonction alcool primaire à δ_H/δ_C 4.45 (dd, $J = 11.4, 7.2$ Hz), 4.68 (H_a, H_b-1)/65.5 (C-1).

– Quatre groupements méthylènes à δ_H/δ_C 2.05 (m) (H-4)/39.4 (C-4), 2.05 (m) (H-8)/39.7 (C-8), 2.13 (m) (H-9)/26.4 (C-9) et 2.13 (m) (H-5)/26.7 (C-5).

Les couplages hétéronucléaires $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ émanant des méthyls identifiés précédemment (H3-12, 13, 14 et 15), permet d'identifier la plupart des atomes de la génine. Cette analyse approfondie des données RMN, couplée à leur comparaison aux données préexistantes trouvées dans la littérature, permet d'identifier la génine comme étant un sesquiterpénoïde acyclique de formule (2*E*,6*E*)-farnes-1-ol [(2*E*,6*E*)-3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriène-1-ol]. La configuration 2*E*,6*E* des doubles liaisons est également confirmée par comparaison des valeurs de déplacements chimiques avec celles de la littérature (Pertuit *et al.*, 2018a).



Concernant la région des anomères, **Rc2** génère cinq signaux dans le spectre du proton à δ_H 4.83 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.89 (d, $J = 7.2$ Hz), 5.49 (br s), 5.57 et 6.05 (br s). Ces derniers corrélient en HSQC avec cinq autres signaux à δ_C 104.8, 102.8, 101.6, 102.0 et 102.6, suggérant la présence de cinq sucres. Ces derniers seront identifiés sur la base de corrélations COSY, TOCSY et HMBC comme étant deux Rha (Rha I et Rha II), un Xyl et deux Glc (Glc I et Glc II).

Une analyse approfondie des données recueillies en modes HMBC et ROESY permet de mettre en évidence la séquence de la chaîne glycosidique ainsi que point d'attache sur la génine. Les corrélations suivantes permettent d'en établir la structure :

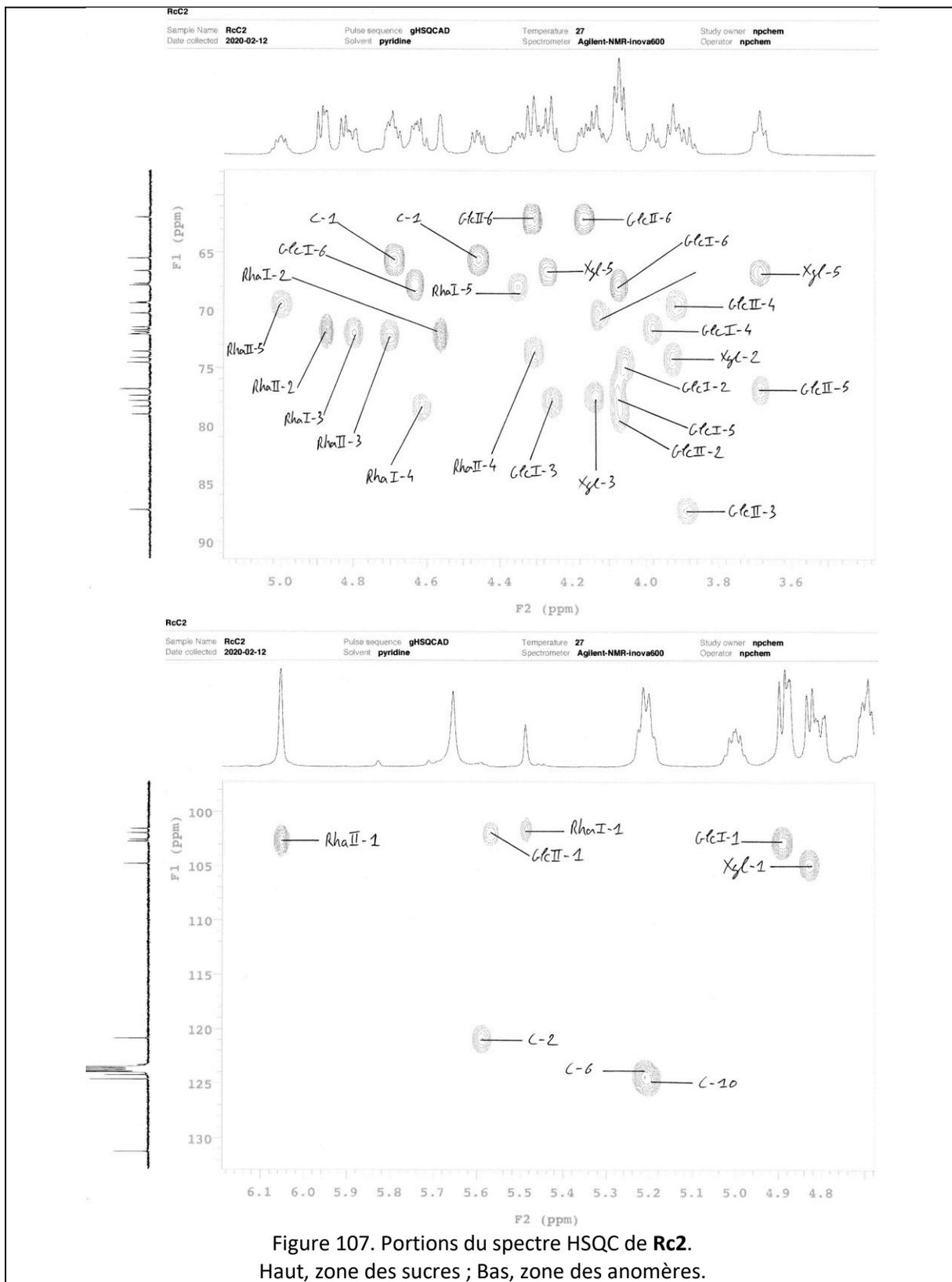
– Glc I est lié au C-1 de la génine par une liaison éther oxyde suivant les corrélations HMBC et ROESY à δ_H/δ_C 4.89 (d, $J = 7.2$ Hz) (Glc I-1)/65.5 (C-1) et δ_H/δ_H 4.89 (d, $J = 7.2$ Hz) (Glc I-1)/4.45 (dd, $J = 11.4, 7.2$ Hz), 4.68 (H_a, H_b-1), respectivement.

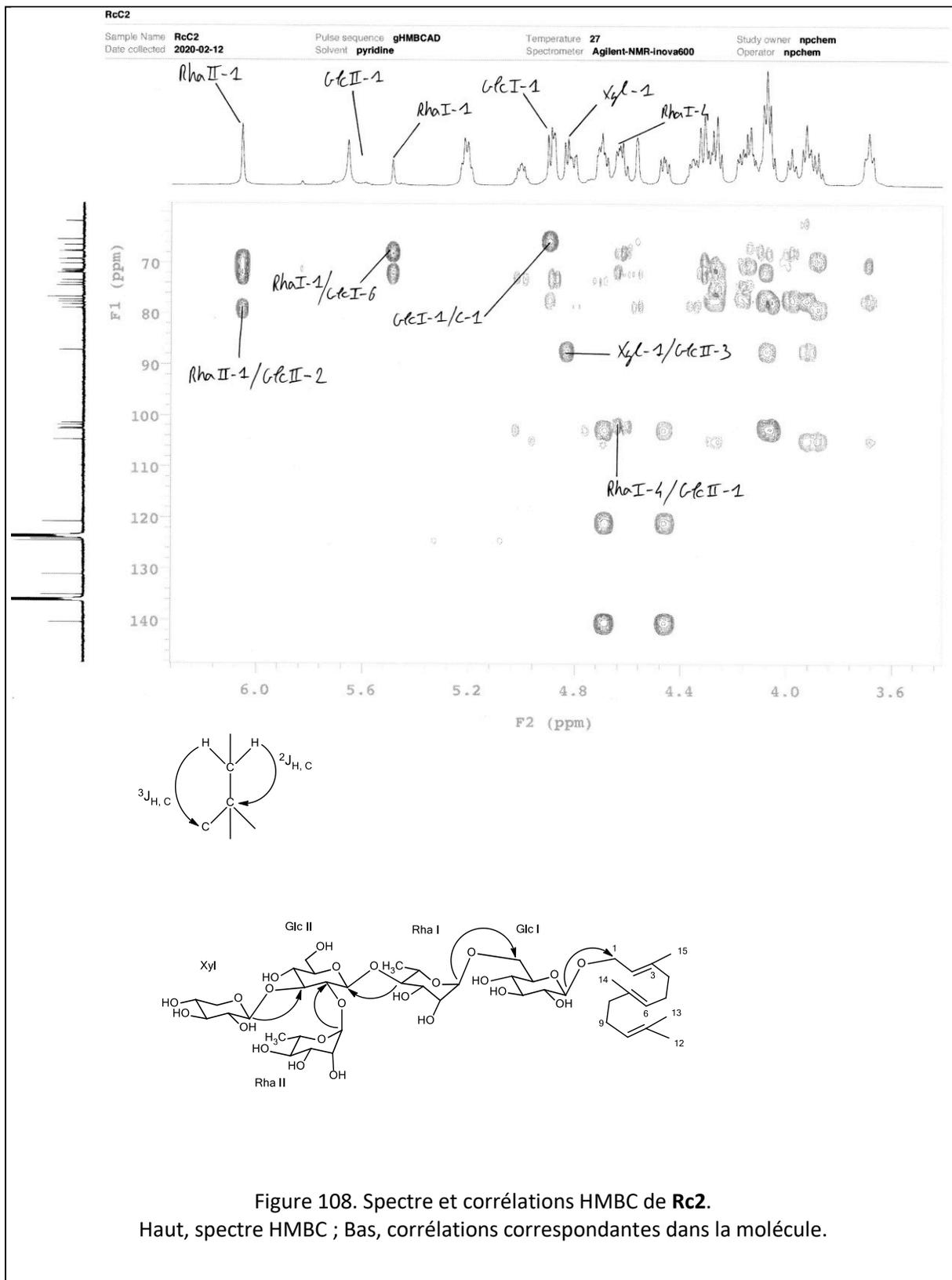
– Rha I est lié à Glc I par une liaison (1→6) *O*-glycosidique telle qu'attestée par les corrélations HMBC et ROESY, respectivement à δ_H/δ_C 5.49 (br s) (Rha I-1)/67.7 (Glc I-6) et δ_H/δ_H 5.49 (br s) (Rha I-1)/4.08, 4.63 (m) (Glc I-6).

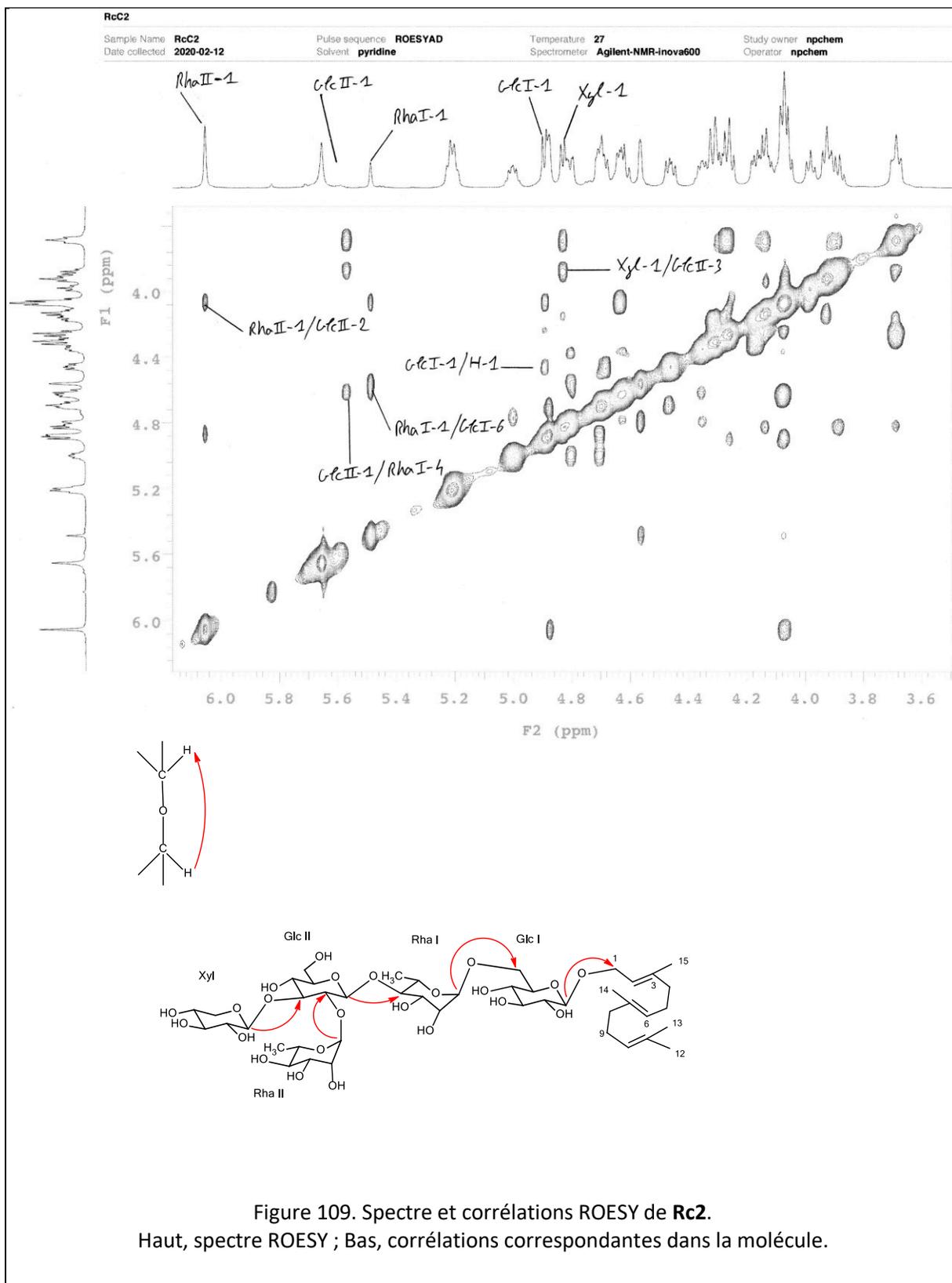
– La corrélation HMBC inverse et ROESY à δ_H/δ_C 4.62 (t, $J = 9.6$ Hz) (Rha I-4)/102.0 (Glc II-1) et δ_H/δ_H 5.57 (Glc II-1)/4.62 (t, $J = 9.6$ Hz) (Rha I-4), viennent appuyer la liaison (1→4) *O*-glycosidique entre Glc II-1 and Rha I-4.

– Glc II est doublement substitué au niveau des positions n°2 et n°3 par Rha II et Xyl, respectivement. Ces suppositions sont vérifiées par la présence de corrélations HMBC à δ_H/δ_C 6.05 (br s) (Rha II-1)/79.0 (Glc II-2) et δ_H/δ_C 4.83 (dd, $J = 7.8$ Hz) (Xyl-1)/87.3 (Glc II-3). Appuyées par les corrélations ROESY à δ_H/δ_H 6.05 (br s) (Rha II-1)/4.07 (Glc II-2) et δ_H/δ_H 4.83 (dd, $J = 7.8$ Hz) (Xyl-1)/3.88 (t, $J = 9.0$ Hz) (Glc II-3). Celles-ci confirment l'enchaînement Xyl-(1→3)-[Rha II (1→2)]-Glc II.

Sur la base de ces informations, la structure de **Rc2** est élucidée ainsi : 1-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1→3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- β -D-glucopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranosyl-(2*E*,6*E*)-farnes-1-ol.







Chapitre 2.6 Discussion des résultats de l'étude phytochimique

2.6.0 Présentation du chapitre

L'étude phytochimique des quatre espèces de Sapindaceae a permis d'isoler 30 composés différents dont 19 sont de structures nouvelles. Ces données s'ajouteront à celles préexistantes dans la littérature scientifique et permettront une meilleure caractérisation de ces espèces sur le plan phytochimique. Les composés isolés verront également leurs activités biologiques étudiées dans la prochaine partie afin de mettre en évidence les possibilités d'applications qui en résultent dans les domaines de l'environnement et de la santé (voir Partie 3 Etudes biologiques). Les deux aspects précédents -meilleure connaissance des plantes et utilisation des produits naturels d'origine végétale- ne seraient pas possibles sans les processus expérimentaux qui les supportent. En phytochimie, l'ensemble des matériels et méthodes utilisés peut être regroupé dans deux disciplines que sont les sciences séparatives et les sciences spectroscopiques. L'étude de ces deux disciplines est donc fondamentale dans le but d'assurer la performance des études phytochimiques, particulièrement riches en défis techniques de par la diversité et la complexité des molécules étudiées. S'ajoute aux informations générées par l'isolement et l'élucidation structurale des composés naturels, un niveau supplémentaire d'information révélé par l'étude de l'occurrence et de la distribution des produits naturels dans le vivant. Ce degré supplémentaire de connaissance relève de la chimiotaxonomie, une discipline intermédiaire à la phytochimie et la taxonomie classique, présentant un intérêt scientifique non négligeable ainsi que des applications concrètes. L'étude phytochimique développée dans ce travail de thèse resterait donc incomplète dans le cas où elle n'intégrerait pas une discussion critique portant sur les matériels et méthodes utilisés ainsi que sur la chimiotaxonomie des Sapindaceae. Cette discussion est l'objet de ce chapitre dont l'objectif est (i) de proposer des outils et des réflexions permettant de répondre aux défis expérimentaux posés par l'étude des glycosides naturels des plantes et en particulier les saponines des Sapindaceae ainsi que (ii) développer les aspects chimiotaxonomiques qui permettent de replacer les données structurales des molécules naturelles dans leur contexte taxonomique, biochimique et écologique.

En ce qui concerne les aspects expérimentaux, deux problématiques rencontrées durant ce travail, ainsi que les moyens mis en œuvre pour les résoudre, seront présentés. La première concerne l'isolement des saponines des Sapindaceae et propose un protocole type offrant de bonnes performances pour la purification de ce type de composés (voir 2.6.1 Résolution d'une problématique d'isolement des saponines des Sapindaceae). La seconde concerne la détermination structurale et étudie l'effet d'une modification du solvant de mesure RMN ainsi que l'effet des fonctions acétyles sur la lisibilité et l'interprétation des données RMN (voir 2.6.2 Résolution d'une problématique de détermination structurale des saponines des Sapindaceae).

En ce qui concerne les aspects chimiotaxonomiques, une définition de la chimiotaxonomie ainsi que son utilité en pharmacognosie sera présentée (voir 2.6.3 Chimiotaxonomie). Deux approches chimiotaxonomiques seront ensuite proposées dans ce sous-chapitre, une approche classique, utilisant les données qualitatives que sont les composés eux-mêmes, et une approche originale, utilisant comme données qualitatives les motifs structuraux (sous-structures ou fragments) implicitement présents au sein de chaque composé. Dans la première approche « classique », les composés connus isolés lors de ce travail seront recherchés dans les bases de données afin d'identifier d'autres taxons produisant des saponines de structures similaires, tandis que les composés nouveaux verront leur distribution et leur occurrence comparées entre les quatre espèces étudiées (voir 2.6.3.1 Approche chimiotaxonomique classique). Dans la deuxième approche « originale », les principaux motifs structuraux présents dans les saponines isolées seront définis et leur répartition entre les espèces étudiées sera analysée. Cela devrait permettre de mettre en évidence des marqueurs chimiotaxonomiques pour les Sapindaceae à l'échelle de la sous-famille, du genre et de l'espèce (voir 2.6.3.2 Approche chimiotaxonomique originale).

2.6.1 Résolution d'une problématique d'isolement des saponines des Sapindaceae

Les saponines sont connues pour être des produits naturels dont la purification est difficile. Cette caractéristique trouve son origine dans plusieurs facteurs dont les principaux sont : (i) l'existence des saponines dans le matériel végétal sous forme de mélange de composés de polarité et de taille similaire, rendant leur séparation difficile par des techniques chromatographiques d'adsorption et d'exclusion (qui pourtant sont parmi les seules techniques utilisables pour isoler

les saponines), (ii) leur occurrence en quantité variable dans le matériel végétal, posant problème quand ce dernier n'est pas disponible en grande quantité et rendant particulièrement difficile l'isolement des saponines minoritaires et (iii) l'absence de chromophores dans les UV, compliquant la détection des composés ciblés et donc le développement de protocoles de séparation optimisés (Oleszek et Bialy, 2006). Ces caractéristiques propres aux saponines se traduisent par des difficultés expérimentales en chromatographie, dans lesquelles les techniques employées sont souvent limitantes. C'est donc une combinaison de différentes techniques qui est utilisée dans le but de compenser les défaillances individuelles de chaque technique. Bien que fournissant de nombreux avantages, la combinaison de différentes techniques augmente considérablement la durée et la complexité des manipulations. Les saponines des Sapindaceae ne font pas exception à cette règle, et leur isolement est souvent un processus long, coûteux et complexe. Cela est particulièrement bien illustré par les figures d'isolement des composés pour les quatre plantes étudiées, présentés en amont dans ce travail (voir 2.2.1, 2.3.1, 2.4.1, 2.5.1 pour les protocoles d'isolement des composés de *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Chytranthus macrobotrys* et *Radlkofera calodendron*, respectivement).

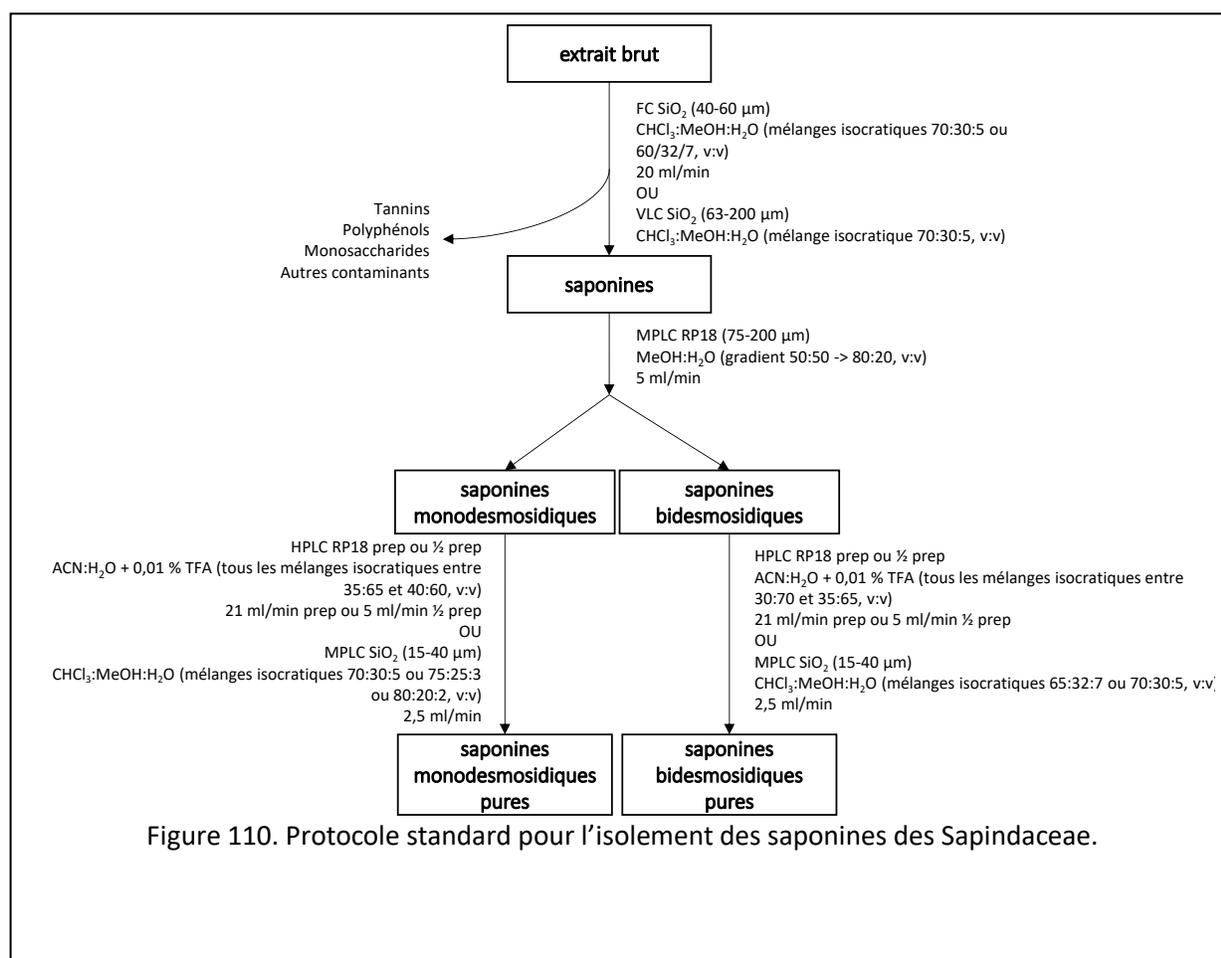
A partir des figures d'isolement précédentes, il est possible de proposer un protocole type offrant de bonnes performances pour la purification des saponines des Sapindaceae. Ce dernier est basé sur le constat empirique qu'il est difficile d'améliorer la performance individuelle des différentes techniques chromatographiques. Par conséquent, c'est la combinaison des techniques entre elles qui régit la performance globale du processus de purification plutôt que les performances individuelles de chaque technique, qui peuvent être considérées comme constantes. Le tableau suivant résume les capacités des différentes techniques chromatographiques utilisées dans ce travail en fonction de trois critères principaux. Ces critères sont la capacité de charge des colonnes ainsi que leur puissance séparative et leur récupération.

Technique chromatographique sur colonnes de silice (phase de la silice)	Capacité de charge des colonnes (unité par injection)	Puissance séparative (sélectivité α et efficacité W) des colonnes	Récupération en sortie de colonne (rendement moyen observé)	Application privilégiée
VLC (normale)	Élevée (1 g)	Faible	Intermédiaire (80 %)	Séparation préliminaire
FC (normale)	Élevée (1-10 g)	Faible	Intermédiaire (80 %)	Séparation préliminaire
MPLC (normale)	Intermédiaire (100 mg)	Intermédiaire, Élevée	Intermédiaire (80 %)	Pré-purification, Purification finale
MPLC (inverse)	Intermédiaire (100 mg)	Intermédiaire	Élevée (>90 %)	Pré-purification
HPLC ½ prep (inverse)	Faible (1 mg)	Élevée	Faible (50 %)	Purification finale
HPLC prep (inverse)	Faible (10 mg)	Élevée	Faible (50 %)	Purification finale

Tableau 21. Caractéristiques des techniques chromatographiques utilisées.

La capacité de charge des colonnes mesure la quantité de matière pouvant être traitée en une injection par une technique chromatographique donnée tandis que la puissance séparative mesure la difficulté des séparations pouvant être réalisées. La récupération, ou rendement, mesure la quantité de matière restituée après manipulation. Ces trois facteurs permettent à eux seuls de proposer une application privilégiée pour chacune des techniques utilisées. Cette application privilégiée correspond à une place particulière dans le processus global de purification, dans laquelle la technique peut être utilisée au maximum de ses capacités. Il est par exemple évident qu'il faut éviter d'utiliser des techniques à faible récupération en début de processus de purification sous peine de perdre la majorité du matériel végétal avant qu'aucun composé n'ait pu être isolé. Au contraire, les techniques à puissance séparative élevée devront être utilisées en fin de processus afin d'assurer l'isolement du composé d'intérêt. Cela permet généralement d'obtenir un composé pur en quantité suffisante en une seule manipulation alors qu'un résultat similaire aurait nécessité plusieurs manipulations avec une technique de puissance séparative moindre, occasionnant une perte de temps et de consommables.

En intégrant les données des figures d'isolement et les caractéristiques empiriques des différentes techniques chromatographiques, il est possible de proposer un protocole d'isolement type pour les saponines des Sapindaceae. Ce protocole est présenté dans la figure ci-dessous et résume les grandes étapes appliquées lors de l'isolement des saponines des quatre espèces étudiées. Ayant offert de bonnes performances dans le cas de ces quatre plantes, il est possible que ce protocole offre des résultats similaires pour d'autres espèces de la même sous-famille. En effet les saponines des Sapindoideae présentent des structures relativement conservées, ce qui laisse penser qu'elles pourraient être facilement isolées à l'aide de ce protocole (Delaude, 1993). Enfin, ce protocole pourra être amélioré ou adapté en fonction des préférences des opérateurs et des particularités des extraits.



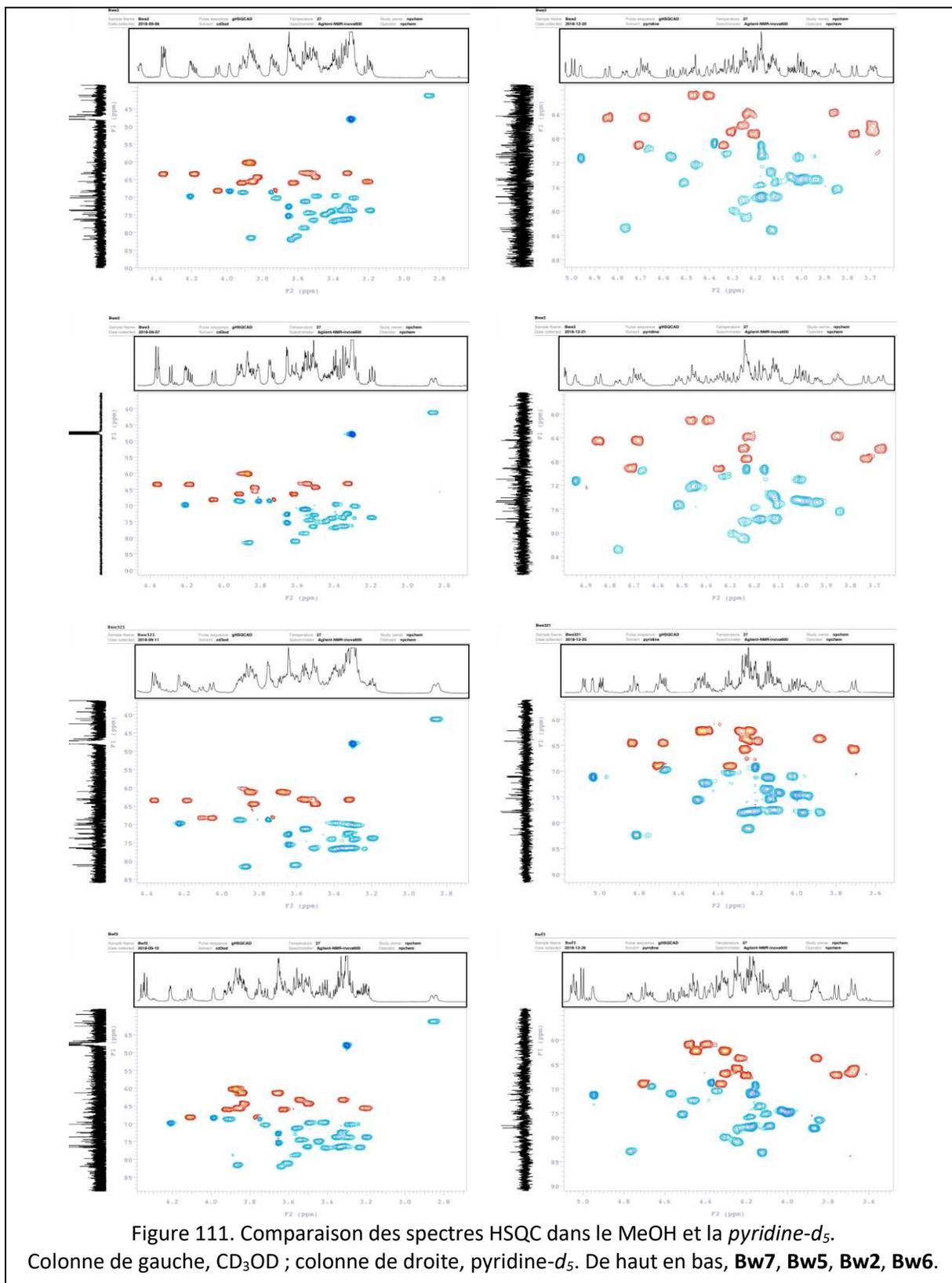
2.6.2 Résolution d'une problématique de détermination structurale des saponines des Sapindaceae

La détermination structurale des produits naturels est essentiellement basée sur des techniques spectroscopiques avancées telles que la RMN 2D du ^1H et du ^{13}C ainsi que la spectrométrie de masse haute résolution. Bien qu'offrant aujourd'hui des perspectives inégalées, ces techniques sont parfois poussées aux limites de leurs capacités en ce qui concerne l'élucidation structurale des saponines (Mazzola *et al.*, 2011). Ces contraintes trouvent leur origine dans des caractéristiques intrinsèques aux saponines telles que : (i) leur haut poids moléculaire, généralement compris autour 1000 uma, ce qui en fait de grosses molécules génératrices de nombreux signaux en RMN, (ii) leur stéréochimie, principalement due à la présence de chaînes glycosidiques composées de sous-unités dont les structures ne diffèrent que par l'agencement spatial d'une fonction hydroxyle, générant des signaux RMN proches et donc difficiles à discerner, (iii) la redondance de certains sucres produisant des phénomènes de superposition des signaux altérant la lisibilité des spectres et (iv) leur diversité structurale, nécessitant une connaissance très spécialisée des fonctions susceptibles de participer à la structure d'une saponine donnée. Il apparaît donc important de proposer des méthodes ou des outils permettant de faciliter la détermination structurale des saponines.

Au cours de ce travail, il a été étudié l'effet d'un changement de solvant de mesure RMN dans une perspective de faciliter la caractérisation structurale des saponines des Sapindaceae. L'effet des fonctions acétyles sur les déplacements chimiques des atomes composants les sucres a également été analysé dans le but de produire un outil d'aide à la détermination structurale des saponines acétylées, fréquemment isolées des Sapindaceae (Mazzola *et al.*, 2011 ; Montes *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2018).

2.6.2.1 Impact d'un changement de solvant sur les mesures RMN de quatre composés

Les données RMN des composés **Bw2** (*Bwe321*), **Bw5** (*Bwe3*), **Bw6** (*Bwf3*), **Bw7** (*Bwe2*) ont été mesurées dans le CD_3OD et la pyridine- d_5 . Toutes les autres conditions ont été conservées afin de permettre une comparaison des spectres obtenus. Les spectres HSQC dans la région des sucres sont présentés dans la figure suivante pour chacun des quatre composés.



On constate visuellement que les signaux du proton (encadrés sur la figure) ont moins tendance à la superposition dans la pyridine-*d*₅ que dans le CD₃OD. Cela est particulièrement visible pour les composés **Bw5** (*Bwe3*), **Bw6** (*Bwf3*) et **Bw7** (*Bwe2*) dont les spectres du proton présentent des signaux mieux répartis sur l'échelle de δ_H dans la pyridine-*d*₅, alors que ces derniers forment des groupes de signaux superposés dans le CD₃OD. Cette tendance est confirmée quantitativement par l'analyse des spectres au niveau du nombre de multiplicités et de constantes de couplage déterminées. Ces deux valeurs -nombre de multiplicités et nombre de constantes de couplage- sont comparées pour chaque composé dans le tableau suivant.

	CD ₃ OD		Pyridine- <i>d</i> ₅	
	Multiplicités déterminées	Constantes déterminées	Multiplicités déterminées	Constantes déterminées
Bw2 (<i>Bwe321</i>)	28	16	34	20
Bw5 (<i>Bwe3</i>)	30	17	35	34
Bw6 (<i>Bwf3</i>)	32	19	36	32
Bw7 (<i>Bwe2</i>)	33	20	42	41
Total	123	72	147	127
Moyenne/composé	31	18	37	32
Pyridine- <i>d</i> ₅ /CD ₃ OD	—	—	1,20	1,76

Tableau 22. Comparaison des éléments spectroscopiques déterminés dans le CD₃OD et la pyridine-*d*₅.

Ces résultats démontrent que le nombre de multiplicités ainsi que le nombre de constantes de couplage qu'il est possible de déterminer pour une saponine donnée, est supérieur dans la pyridine-*d*₅ que dans le CD₃OD. De manière intéressante, on constate que les deux éléments mesurés évoluent de manière indépendante, de +20 % pour les multiplicités et de +76 % pour les constantes de couplage, lors du passage d'un solvant à l'autre. Ce résultat est surprenant dans la mesure où les deux éléments caractéristiques de la spectroscopie RMN que sont la multiplicité des signaux et leurs constantes de couplage ne sont pas indépendants. Il faut en effet déterminer la multiplicité d'un signal avant d'en déterminer correctement les constantes de couplage. On peut donc en déduire qu'il y a, dans les spectres générés dans le CD₃OD, de nombreux signaux dont les multiplicités sont établies sans que les constantes de couplage associées ne puissent être déterminées. Ce constat permet d'établir que le CD₃OD n'est pas un solvant de mesure RMN optimal pour la caractérisation des saponines des Sapindaceae. En effet les constantes de couplage

constituent un élément descriptif important des signaux du proton permettant d'associer ces derniers à des éléments de structure, au même titre que les valeurs de déplacement chimique, la multiplicité et l'intensité.

Cette étude comparative MeOH/pyridine, bien que réalisée sur un faible nombre de molécules, a tendance à démontrer les avantages de la pyridine-*d*₅ sur le CD₃OD en ce qui concerne les mesures RMN. C'est pour ces raisons qu'il est important de rappeler que les données RMN de *Blighia unijugata*, premier extrait à avoir été étudié au cours de ce travail, sont présentées dans le CD₃OD alors que celles des autres espèces sont présentées dans la pyridine-*d*₅ (voir 3.2.3A.1, 3.2.3A.2, 3.2.3A.3 pour article n°1, 2 et 3, respectivement). L'utilisation de cette dernière n'est pas répandue dans la littérature pour les saponines des Sapindaceae, où le CD₃OD semble être préféré (Voutquenne *et al.*, 1998 ; Lavaud *et al.*, 2015 ; Pertuit *et al.*, 2019). L'analyse comparative précédente montre que la pyridine-*d*₅ pourrait offrir de meilleurs résultats.

2.6.2.2 Compréhension de l'effet des acétyles sur les déplacements chimiques des protons et des carbones des sucres acétylés

Comme mentionné précédemment, la présence de sucres acétylés est courante chez les saponines des Sapindaceae (Mazzola *et al.*, 2011 ; Montes *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2018). Cela est confirmée par la littérature et par les articles n°2 et n°3 sur *Blighia unijugata* et *Blighia welwitschii*. Les acétyles sont liés aux hydroxyles libres des sucres par des liaisons ester dont le carbonyle exerce un fort effet électronégatif sur les atomes environnant la fonction acétyle. Cela se traduit par un déblindage plus ou moins marqué du proton et du carbone géminés à l'hydroxyle acétylé (généralement marqué pour le proton et peu marqué pour le carbone). Cet effet déblindant est bien connu et peu permet de identifier la position des acétyles sur les chaînes oligosaccharidiques des glycosides naturels. En plus d'avoir un effet sur les déplacements chimiques des atomes géminés à l'hydroxyle acétylé, les acétyles affectent aussi les déplacements chimiques des atomes vicinaux. Cet effet, moins bien décrit dans la bibliographie, peut être blindant ou déblindant et perceptible sur tous les atomes d'hydrogène et de carbones d'un cycle osidique. Les acétyles peuvent donc perturber de manière significative les valeurs typiques de déplacements chimiques des atomes de sucres et ainsi nuire à l'élucidation structurale. Basée sur les cas d'acétylations rencontrés dans ce travail, une analyse compréhensive de l'effet des acétyles en différentes positions du Glc (C-3, C-4 et C-6) est proposée. Celle-ci a pour objectif de prédire les variations de valeurs typiques de déplacements chimiques des protons et carbones géminés et vicinaux à la fonction acétylée. Ces

données démontrent le caractère conservé des variations enregistrées, en effet, un acétyle en C-3 du Glc par exemple, aura toujours le même effet sur les atomes géminés et vicinaux. Elles peuvent surtout aider à l'élucidation structurale en proposant des valeurs standards de déplacements chimiques, permettant d'identifier les signaux dans des cas précis d'acétylation.

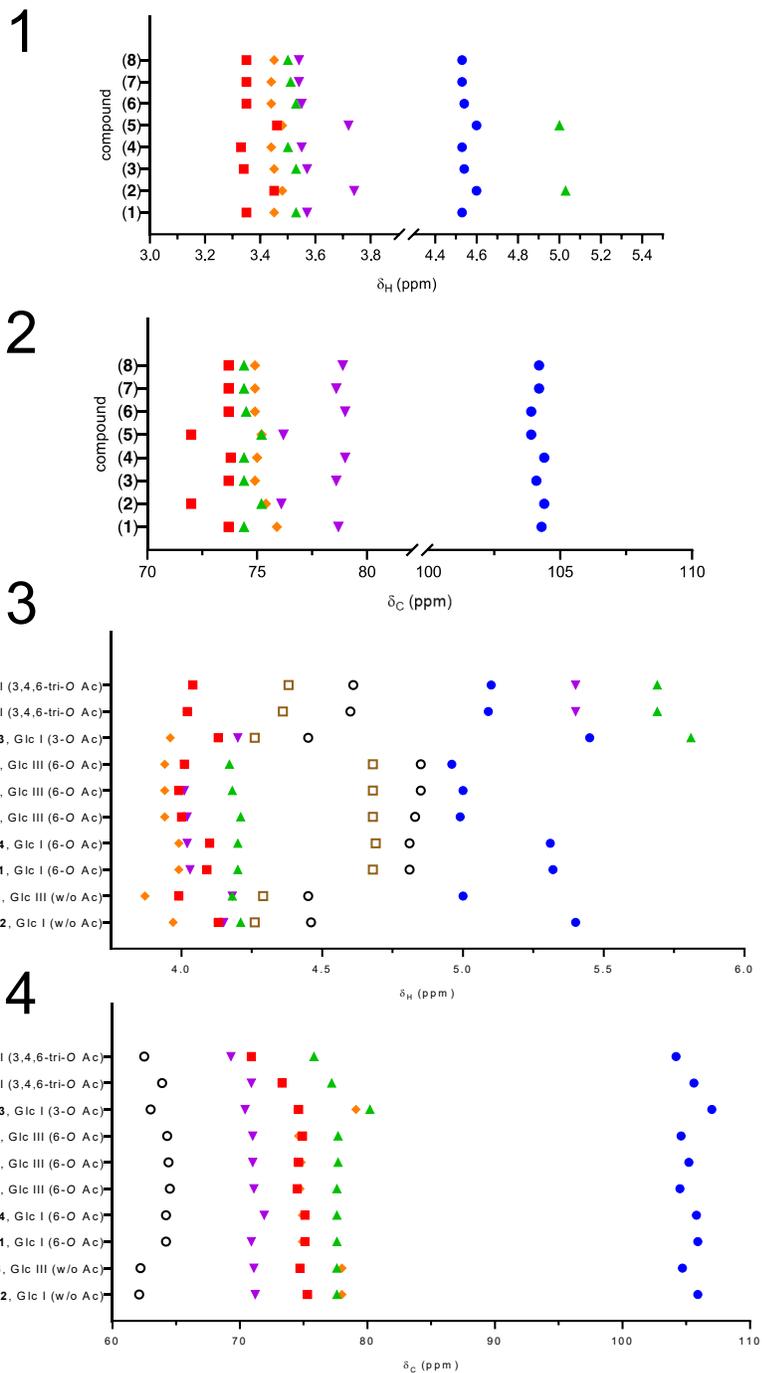


Figure 112. Effet des acétyles sur les δ_C et δ_H des sucres.

Figures publiées en annexes des articles n°1 et n°2. 1. δ_H du Glc I-3 des composés **Bu1** à **Bu8**, désignés de 1 à 8 sur la figure. 2. δ_C du Glc I-3 des composés **Bu1** à **Bu8**, désignés de 1 à 8 sur la figure. 3. δ_H de diverses positions précisées en ordonnés, pour les composés **Bw1** à **Bw7**, désignés de 1 à 7 sur la figure. 4. δ_C de diverses positions précisées en ordonnés, pour les composés **Bw1** à **Bw7**, désignés de 1 à 7 sur la figure (Petit *et al.*, 2019, 2020).

2.6.3 Chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie est une méthode de classification des organismes sur la base des différences et des ressemblances de leur biochimie. Celle-ci est divisée en deux approches principales qui peuvent être caractérisées de macro- et de micromoléculaire (Hristozov, 2007).

L'approche macromoléculaire est basée sur l'analyse comparative des séquences présentes dans les macromolécules telles que l'ADN et les protéines (Hristozov, 2007). Celle-ci a connu un essor important au cours des dernières années et permet d'appuyer ou d'infirmer les classifications taxonomiques préexistantes, classiquement basées sur des caractères phénotypiques.

L'approche micromoléculaire est quant à elle basée sur la comparaison des métabolites secondaires, aussi appelés métabolites spécialisés. Ces derniers ont une valeur taxonomique dans la mesure où leur répartition est inégale et parfois restreinte à certains types d'organismes. Les métabolites spécialisés des plantes qui présentent un intérêt particulier en chimiotaxonomie sont les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes et les glucosinolates. Similairement, les molécules de taille importante sont celles qui présentent le plus grand intérêt en chimiotaxonomie de par leur distribution limitée (Hristozov, 2007). Les saponines semblent donc être particulièrement indiquées pour la chimiotaxonomie du fait de leur nature terpénique et de leur grande taille.

La chimiotaxonomie joue un rôle important au sein de la pharmacognosie en raison des applications concrètes qu'elle permet. Celle-ci fait partie des rares méthodes pronostiques permettant d'orienter la sélection des plantes étudiées. Les autres méthodes disponibles sont basées sur des principes ethnobotaniques, aléatoires ou intuitifs difficilement quantifiables. Cette approche peut également être utilisée afin de trouver des sources biologiques alternatives pour un produit naturel d'intérêt médicinal ou industriel quelconque. Outre ces applications pratiques, la chimiotaxonomie représente pour certains auteurs une discipline d'intérêt scientifique. Elle permet en effet d'appréhender sous un angle nouveau les données générées par les études phytochimiques en les replaçant dans leur contexte taxonomique, biochimique et écologique. Cette approche autorise les recherches portant sur des classes de métabolites secondaires dont l'intérêt médicinal, industriel ou biotechnologique n'est *a priori* pas démontré, produisant de la connaissance et enrichissant les disciplines de la pharmacognosie et de la phytochimie.

Au-delà des activités biologiques des saponines qui seront présentées dans la partie suivante, il semble donc important de s'intéresser aux aspects chimiotaxonomiques de ce travail. Ces derniers sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.6.3.1 Approche chimiotaxonomique classique

— Occurrence des composés connus dans la littérature

Une analyse bibliographique a été entreprise afin de vérifier l'occurrence des composés connus chez d'autres plantes. Cette analyse a pour objectif de (i) vérifier si les composés connus présentent des structures en accord avec celles classiquement retrouvées chez les Sapindaceae et (ii) identifier les familles et les genres de plantes produisant des saponines de structures proches de celles isolées dans cette étude. Ce dernier point pourrait permettre de trouver des sources végétales alternatives pour les composés décrits. La recherche bibliographique a été conduite sur la base de données CAS SciFinder selon le protocole décrit en annexes (voir 3.2.3A.6 Recherche bibliographique sur l'occurrence des composés connus). Pour chaque composé correspond un tableau référençant les familles, les genres et le nombre d'espèces différentes (entre parenthèse) à partir desquels le composé en question a été isolé.

Bu9 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (dipsacosite B)

Bu9	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (9), <i>Lonicera</i> (5), <i>Dipsacus</i> (2), <i>Tremastelma</i> (1), <i>Weigela</i> (1)
	Lardizabalaceae	<i>Stauntonia</i> (2), <i>Akebia</i> (2), <i>Decaisnea</i> (1)
	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (3), <i>Pulsatilla</i> (2)
	Araliaceae	<i>Kalopanax</i> (1), <i>Hedera</i> (4), <i>Aralia</i> (1)
	Caryophyllaceae	<i>Phryna</i> (1)
	Fabaceae	<i>Medicago</i> (1)
	Asteraceae	<i>Aster</i> (1)
	Apiaceae	<i>Astrantia</i> (1)

Tableau 23. Occurrence du composé **Bu9** dans la littérature.

Bu10 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (blighoside A)

Bu10	Sapindaceae	<i>Blighia</i> (1)
-------------	-------------	--------------------

Tableau 24. Occurrence du composé **Bu10** dans la littérature.

Bu11 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester

Bu11	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (1), <i>Lonicera</i> (1), <i>Dipsacus</i> (1)
	Lardizabalaceae	<i>Akebia</i> (1)

	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (1)
	Araliaceae	<i>Kalopanax</i> (1), <i>Polyscias</i> (1)
	Fabaceae	<i>Medicago</i> (1)
	Aquifoliaceae	<i>Ilex</i> (1)
	Sapindaceae	<i>Smelophyllum</i> (1)

Tableau 25. Occurrence du composé **Bu11** dans la littérature.

Bw12 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (giganteaside J)

Bw12	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (6), <i>Lonicera</i> (5), <i>Dipsacus</i> (2)
	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (1), <i>Pulsatilla</i> (2)
	Araliaceae	<i>Aralia</i> (1)
	Apocynaceae	<i>Gymnema</i> (1)
	Sapindaceae	<i>Blighia</i> (1)

Tableau 26. Occurrence du composé **Bu12** dans la littérature.

Cm3 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (klaianoside C)

Cm3	Sapindaceae	<i>Chytranthus</i> (1)
------------	-------------	------------------------

Tableau 27. Occurrence du composé **Cm3** dans la littérature.

Cm4 hédéragnine

Cm4	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (5), <i>Lonicera</i> (3), <i>Dipsacus</i> (2), <i>Weigela</i> (2)
	Lardizabalaceae	<i>Stauntonia</i> (1), <i>Akebia</i> (2)
	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (1), <i>Pulsatilla</i> (1), <i>Clematis</i> (3), <i>Ficaria</i> (1)
	Araliaceae	<i>Kalopanax</i> (1), <i>Hedera</i> (1), <i>Aralia</i> (1), <i>Schefflera</i> (1), <i>Polyscias</i> (1), <i>Cussonia</i> (1), <i>Fatsia</i> (1)
	Fabaceae	<i>Medicago</i> (2), <i>Pterodon</i> (1), <i>Gliricidia</i> (1)
	Apocynaceae	<i>Periploca</i> (2), <i>Chonemorpha</i> (1)
	Lamiaceae	<i>Callicarpa</i> (1), <i>Anisomeles</i> (1), <i>Salvia</i> (1)
	Fagaceae	<i>Quercus</i> (1), <i>Castanea</i> (1)
	Rubiaceae	<i>Anthocephalus</i> (1), <i>Nauclea</i> (1), <i>Morinda</i> (1)
	Juglandaceae	<i>Juglans</i> (1), <i>Cyclocarya</i> (1)
	Urticaceae	<i>Gonostegia</i> (1), <i>Boehmeria</i> (1)
	Celastraceae	<i>Celastrus</i> (1)
	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> (1)
	Santalaceae	<i>Viscum</i> (1)
	Connaraceae	<i>Rourea</i> (1)

	Polygalaceae	<i>Polygala</i> (1)
	Amaranthaceae	<i>Chenopodium</i> (1)
	Apiaceae	<i>Angelica</i> (1)
	Staphyleaceae	<i>Euscaphis</i> (1)
	Araceae	<i>Arisaema</i> (1)
	Brassicaceae	<i>Barbarea</i> (1)
	Caryocaraceae	<i>Caryocar</i> (1)
	Asteraceae	<i>Centratherum</i> (1)
	Berberidaceae	<i>Leontice</i> (1)
	Paeoniaceae	<i>Paeonia</i> (3)
	Aquifoliaceae	<i>Ilex</i> (2)
	Sapindaceae	<i>Sapindus</i> (2), <i>Saponaria</i> (1), <i>Nephelium</i> (1), <i>Pometia</i> (1)

Tableau 28. Occurrence du composé **Cm4** dans la littérature.

Cm5 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (α -hederin)

Cm5	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (1), <i>Lonicera</i> (2), <i>Dipsacus</i> (1), <i>Patrinia</i> (1)
	Lardizabalaceae	<i>Stauntonia</i> (1), <i>Akebia</i> (2)
	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (3), <i>Pulsatilla</i> (2), <i>Clematis</i> (2)
	Araliaceae	<i>Kalopanax</i> (1), <i>Hedera</i> (1), <i>Aralia</i> (1), <i>Acanthopanax</i> (2)
	Fabaceae	<i>Medicago</i> (1)
	Oleaceae	<i>Jasminum</i> (1)
	Berberidaceae	<i>Caulophyllum</i> (1)
	Solanaceae	<i>Physalis</i> (1)
	Sapindaceae	<i>Sapindus</i> (1)

Tableau 29. Occurrence du composé **Cm5** dans la littérature.

Cm6 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (macranthoside A)

Cm6	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (5), <i>Lonicera</i> (3), <i>Dipsacus</i> (1), <i>Tremastelma</i> (1), <i>Patrinia</i> (1)
	Lardizabalaceae	<i>Akebia</i> (2)
	Ranunculaceae	<i>Pulsatilla</i> (3), <i>Clematis</i> (1)
	Araliaceae	<i>Kalopanax</i> (1), <i>Aralia</i> (1), <i>Trevesia</i> (1)
	Asteraceae	<i>Centratherum</i> (1)
	Juglandaceae	<i>Cyclocarya</i> (1)
	Sapindaceae	<i>Lepisanthes</i> (1)

Tableau 30. Occurrence du composé **Cm6** dans la littérature.

Cm7 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester

Cm7	Caprifoliaceae	<i>Cephalaria</i> (2), <i>Lonicera</i> (1)
	Ranunculaceae	<i>Nigella</i> (1)
	Araliaceae	<i>Schefflera</i> (1)
	Apocynaceae	<i>Gymnema</i> (1)

Tableau 31. Occurrence du composé **Cm7** dans la littérature.

Cm8 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucofuranosyl ester

Cm8	Sapindaceae	<i>Ellatostachys</i> (1)
------------	-------------	--------------------------

Tableau 32. Occurrence du composé **Cm8** dans la littérature.

Rc4 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine (clemantoside C)

Rc4	Ranunculaceae	<i>Clematis</i> (1), <i>Anemone</i> (1)
	Araliaceae	<i>Acanthopanax</i> (1)
	Apiaceae	<i>Bupleurum</i> (1)
	Cucurbitaceae	<i>Bolbostemma</i> (1)
	Acanthaceae	<i>Lepidagathis</i> (1)
	Sapindaceae	<i>Sapindus</i> (5), <i>Ellatostachys</i> (1), <i>Lepisanthes</i> (1), <i>Smelophyllum</i> (1), <i>Nephelium</i> (1), <i>Lecaniodiscus</i> (1)

Tableau 33. Occurrence du composé **Rc4** dans la littérature.

Cette analyse bibliographique révèle que les composés connus isolés dans cette étude sont principalement retrouvés dans six familles de plantes : Caprifoliaceae, Araliaceae, Ranunculaceae, Lardizabalaceae, Fabaceae et Sapindaceae. Le premier objectif de l'étude chimiotaxonomique des composés connus, consistant à vérifier si les composés isolés dans cette étude ont été précédemment obtenus à partir de Sapindaceae, semble être vérifié dans la mesure où la famille des Sapindaceae est retrouvée dans neuf cas sur onze. Seulement les composés **Bu9** et **Cm7** n'ont jamais été isolés d'une Sapindaceae. Ces derniers semblent donc être des saponines particulièrement rares chez cette famille, ce qui pourrait correspondre à leur nature bidesmosidique. En effet, il a été démontré dans l'analyse phytochimique précédente que les saponines bidesmosidiques sont généralement minoritaires dans les extraits de Sapindaceae (voir 2.2.0, 2.4.0 pour l'analyse des extraits de *Blighia welwitschii* et *Chytranthus macrobotrys*, respectivement). Ceci pourrait expliquer que ces produits n'aient jamais été isolés d'une Sapindaceae jusqu'à maintenant. Les composés **Bu10**, **Cm3** et **Cm8** sont des exemples contraires car l'analyse

bibliographique les attribuent spécifiquement aux Sapindaceae. De manière intéressante, une seule occurrence à partir de l'espèce *Blighia sapida* (Sapindaceae) est enregistrée par l'analyse bibliographique pour le composé **Bu10**. Ce dernier pourrait constituer un marqueur chimiotaxonomique spécifique du genre *Blighia* du fait de son isolement à partir de *Blighia unijugata* (**Bu10**) et de *Blighia welwitschii* (**Bw8**) dans notre étude, et uniquement rapporté de *Blighia sapida* par la littérature.

L'analyse chimiotaxonomique met aussi en valeur une tendance surprenante dans le fait que les Sapindaceae ne soient pas majoritairement représentées (en nombre d'occurrences d'espèces différentes) pour les composés recherchés dans la base de données. Cela est particulièrement vrai pour les composés **Bu11**, **Bw12**, **Cm5** et **Cm6** pour lesquels la majorité des occurrences concernent des espèces des familles Caprifoliaceae, Lardizabalaceae, Ranunculaceae et Araliaceae. Il est donc possible que ces composés soient relativement rares ou synthétisés en quantité faibles chez les Sapindaceae alors qu'ils sont plus abondants ou plus facilement isolés à partir des espèces des familles citées précédemment.

En ce qui concerne l'identification de sources végétales alternatives pour les composés connus -deuxième objectif de l'étude chimiotaxonomique- l'analyse bibliographique précédente permet de conclure que les espèces des familles Caprifoliaceae, Lardizabalaceae, Ranunculaceae et Araliaceae sont à privilégier à l'exception du composé **Rc4**, qui est majoritairement isolé à partir d'espèces de la famille des Sapindaceae.

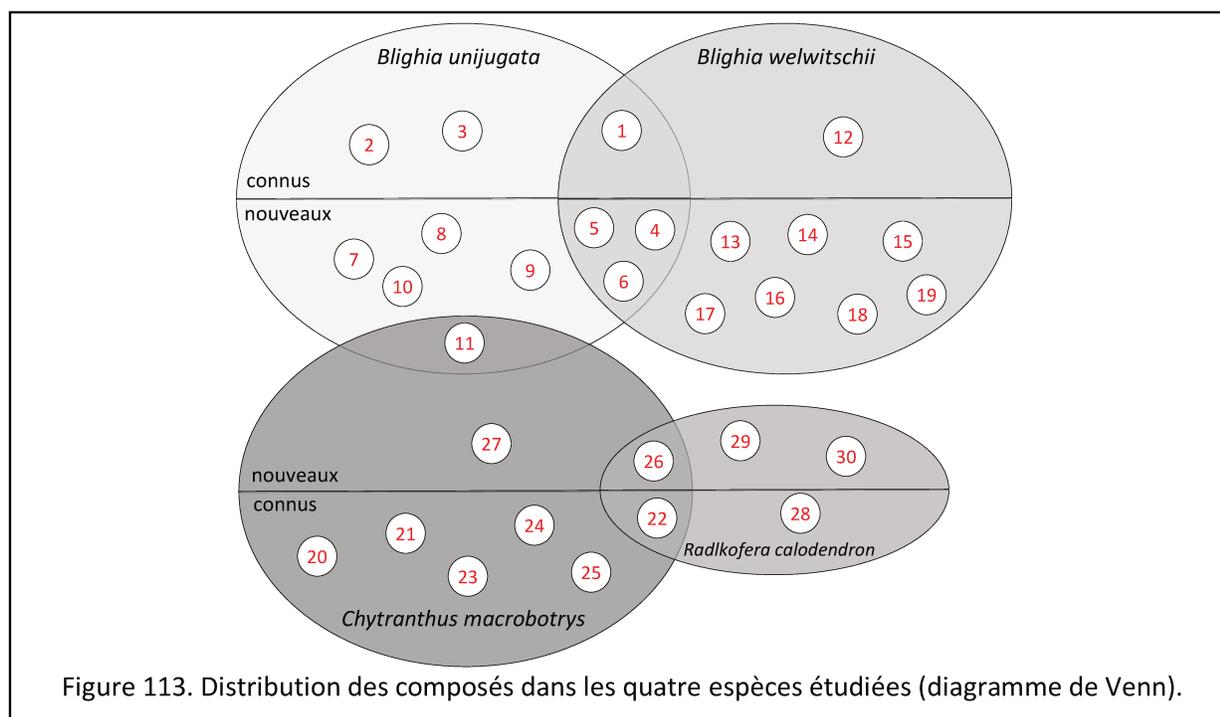
— Distribution des composés nouveaux entre les espèces étudiées

La distribution des composés nouveaux ne peut se faire qu'au sein des espèces étudiées dans ce travail pour la raison qu'il n'existe pas de bibliographie sur ces molécules. Bien que restreinte à un nombre limité de composés et d'espèces, cette analyse procure des données *a posteriori* pour l'amélioration des processus expérimentaux et l'orientation des études, notamment en ce qui concerne les thématiques de dérégulation et de choix des espèces étudiées. Tous les composés isolés verront leur répartition analysée en fonction de deux modalités de lecture. La première concerne (i) la répartition des composés selon les espèces à partir desquelles ils ont été isolés tandis la seconde s'intéresse à (ii) la répartition des composés selon leur caractère connu ou nouveau. Ces deux modalités de lecture permettront de répondre à deux questionnements importants pour améliorer les résultats des études phytochimiques futures. La première interrogation est liée au premier mode de répartition -selon les espèces- et questionne la mise en place d'une technique de dérégulation des composés isolés. Cette technique permettrait d'éviter

d'isoler plusieurs fois le même composé à partir d'espèces différentes, économisant ainsi du temps d'expérimentation et du matériel. La seconde interrogation est liée au deuxième mode de répartition -selon le caractère connu ou nouveau- et questionne la pertinence d'orienter ce travail sur les Sapindaceae dans l'objectif d'identifier de nouvelles structures de saponines. Même si l'objectif de ce travail n'est pas uniquement restreint à l'identification de nouvelles structures de saponines, il est indéniable que ce paramètre rentre en compte de manière importante dans l'évaluation de la qualité des études phytochimiques, et doit donc être considéré ici. Le tableau suivant classe les composés isolés en fonction des deux modalités de lecture présentées précédemment. A chaque structure est attribué un numéro unique afin d'évaluer la redondance éventuelle de certains composés entre les différentes espèces. Ces données sont ensuite présentées sous forme de diagramme de Venn, autorisant une lecture plus aisée.

<i>Blighia unijugata</i>		<i>Blighia welwitschii</i>	
connus	nouveaux	connus	nouveaux
Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu10) (1)	Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu1) (4)	Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bw8) (1)	Ac ⁶ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bw1) (13)
Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ⁶ -Glc ester (Bu9) (2)	Xyl ³ -Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu2) (5)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ⁶ -Glc ester (Bw12) (12)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw2) (14)
Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Bu11) (3)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ⁶ -Glc ester (Bu6) (6)	Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bw9) (4)	Ac ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Ac ^{6,4,3} -Glc ⁶ -Glc ester (Bw3) (15)
	Glc ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu3) (7)	Xyl ³ -Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bw10) (5)	Ac ⁶ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Ac ^{6,4,3} -Glc ⁶ -Glc ester (Bw4) (16)
	Xyl ³ -Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu4) (8)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ⁶ -Glc ester (Bw11) (6)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw5) (17)
	Xyl ³ -Xyl ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Bu5) (9)		Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ⁶ -Glc ester (Bw6) (18)
	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Bu7) (10)		Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw7) (19)
	Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Bu8) (11)		
n=3	n=8	n=5	n=7
n=11		n=12	
n=23			
<i>Chytranthus macrobotrys</i>			
connus	nouveaux	connus	nouveaux
Hédérágénine (Cm4) (20)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Cm1) (26)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Rc3) (22)	Ara ⁴ -Xyl ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Rc1) (29)
Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Cm5) (21)	Xyl ³ -[Rha ²]-Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Cm2) (27)	Ara ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Rc4) (28)	Xyl ³ -[Rha ²]-Glc ⁴ -Rha ⁶ -Glc ³ -(2E,6E)-farnes-1-ol (Rc2) (30)
Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Cm6) (22)		Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Rc5) (26)	
Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Cm7) (23)			
Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ² -Rha ester (Cm8) (24)			
Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine (Cm3) (25)			
Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ -Hédérágénine-Glc ester (Cm9) (11)			
n=7	n=2	n=3	n=2
n=9		n=5	
n=14			
Tableau 34. Distribution des composés dans les quatre espèces étudiées.			

Le diagramme de Venn permet de visualiser aisément que (i) 7 composés sur 30 (23 %) ont été isolés deux fois à partir d'espèces différentes et que (ii) 19 composés sur 30 (63 %) sont nouveaux (73 % pour *Blighia unijugata*, 83 % pour *Blighia welwitschii*, 33 % pour *Chytranthus macrobotrys* et 40 % pour *Radlkofera calodendron*).



L'analyse déréplicative montre qu'une proportion non négligeable de composés ont été isolés deux fois à partir d'espèces différentes (23 % des composés isolés). Il pourrait donc être efficace de mettre en place une stratégie de déréplication pour les études phytochimiques futures. Cela est particulièrement vrai lorsque plusieurs espèces proches phylogénétiquement sont étudiées, en raison de la plus grande probabilité qu'ont ces espèces de produire des composés proches structurellement. Néanmoins, la déréplication des saponines de structures proches est une activité difficile qui requiert des instruments d'analyse coûteux et de haute technicité (Xu *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2016). La mise en place de ces stratégies doit donc se faire sur la base d'une analyse risque/bénéfice dans le contexte d'une étude phytochimique ou d'un laboratoire donné.

L'analyse des composés selon leur caractère connu ou nouveau montre qu'une proportion importante de composés sont nouveaux (63 % des composés isolés). Cette proportion varie en fonction des espèces étudiées et peut trouver son origine dans plusieurs hypothèses. En effet, la

proportion de composés nouveaux isolés d'une espèce donnée peut être dépendante d'au moins trois paramètres :

– (a) le niveau de description de cette espèce sur le plan phytochimique, mieux une espèce est décrite et moindres sont les chances d'isoler des composés nouveaux

– (b) la richesse de l'espèce en ce qui concerne la famille de métabolites étudiée, plus l'espèce contient un grand nombre de molécules et plus il y a de chance que certaines de ces molécules n'aient pas été décrites auparavant

– (c) la complexité structurale des composés étudiés, dans le cas spécifique des glycosides, plus la chaîne de sucres est longue et plus elle a de chance d'être unique car à chaque ajout d'une unité glycosidique on augmente les probabilités de structures différentes (nature du sucre ajouté et position de la liaison sur le radical glycosidique précédent), or statistiquement, plus on a de structures différentes et plus il y a de chance que certaines de ces structures n'aient pas été décrites auparavant

Ces trois paramètres, (a) niveau de description phytochimique, (b) richesse de l'extrait et (c) complexité structurale, ont été mesurés pour les quatre espèces étudiées et présentés dans le tableau suivant.

Nom d'espèce	Nombre de résultats pour l'entrée « <i>nom d'espèce AND saponins</i> » dans Google Scholar [mesure critère (a)]	Nombre de saponines détectées par analyse HPLC et HPTLC des extraits bruts [mesure critère (b)]	Nombre moyen de résidus glycosidiques par saponine isolée [mesure critère (c)]	Taux de saponines de structure nouvelle
<i>Blighia unijugata</i>	90	15 (n=1)	5 (n=11)	73 %
<i>Blighia welwitschii</i>	51	25 (n=1)	5 (n=12)	83 %
<i>Chytranthus macrobotrys</i>	18	12 (n=1)	3 (n=9)	33 %
<i>Radlkofera calodendron</i>	6	10 (n=1)	3 (n=5)	40 %

Tableau 35. Taux de saponines de structure nouvelle.

On constate que les taux plus importants de saponines de structures nouvelles sont liés aux critères (b) et (c) c'est-à-dire la richesse de l'extrait et la taille moyenne des saponines isolées. Le niveau de description phytochimique ne semble pas affecter directement le taux de découverte de molécules nouvelles, de manière surprenante. Cela est mis en évidence par les taux de composés

nouveaux des espèces *Chytranthus macrobotrys* et *Radlkofera calodendron*, qui sont plus faibles que leurs voisines du genre *Blighia*, malgré un niveau de description phytochimique inférieur pour ces deux espèces.

Ces résultats pourraient permettre d'orienter la sélection des espèces végétales dans les études futures. Ils permettent en effet de conclure que, dans l'objectif de mettre en évidence des saponines de structures nouvelles, les espèces connues pour synthétiser de manière abondante des saponines de structures complexes sont à privilégier.

Ces données permettent de vérifier de manière quantifiable des principes appliqués intuitivement dans les laboratoires de pharmacognosie à l'exception du principe de sélection d'espèces peu étudiées, qui semble être réfuté ici. Il est également important de rappeler que ce résultat nécessite d'être interprété avec précaution dans la mesure où la taille de l'échantillon est limitée. En effet, seulement quatre espèces, un échantillon par espèce et un nombre variable de molécules par échantillon ont été utilisés pour générer ces résultats. Il est également à noter que la mesure du critère (a) -niveau de description phytochimique- est difficile à évaluer sur les espèces sélectionnées car ces dernières sont toutes relativement peu étudiées (moins de 100 résultats dans Google Scholar). L'élargissement de cette analyse à un plus grand nombre d'espèces dont certaines seraient bien décrites sur le plan phytochimique pourrait permettre de trancher le débat quant à l'influence du niveau de description biochimique sur la découverte de nouveaux métabolites spécialisés. Il est également possible que les critères (b) et (c) ne soient pas indépendants. En effet il est facile de concevoir par un raisonnement statistique qu'une espèce végétale abondante en saponines ait également plus de chance de produire des saponines de structures complexes. Dans ce cas de figure, il est possible que le critère (b) -richesse de l'extrait- soit l'unique facteur régulant la probabilité de découvrir des composés nouveaux. Ceci est en l'occurrence bien illustré par le tableau précédent car c'est de l'extrait le plus riche -*Blighia welwitschii*- qu'est isolé le plus grand nombre de saponines nouvelles.

2.6.3.2 Approche chimiotaxonomique originale

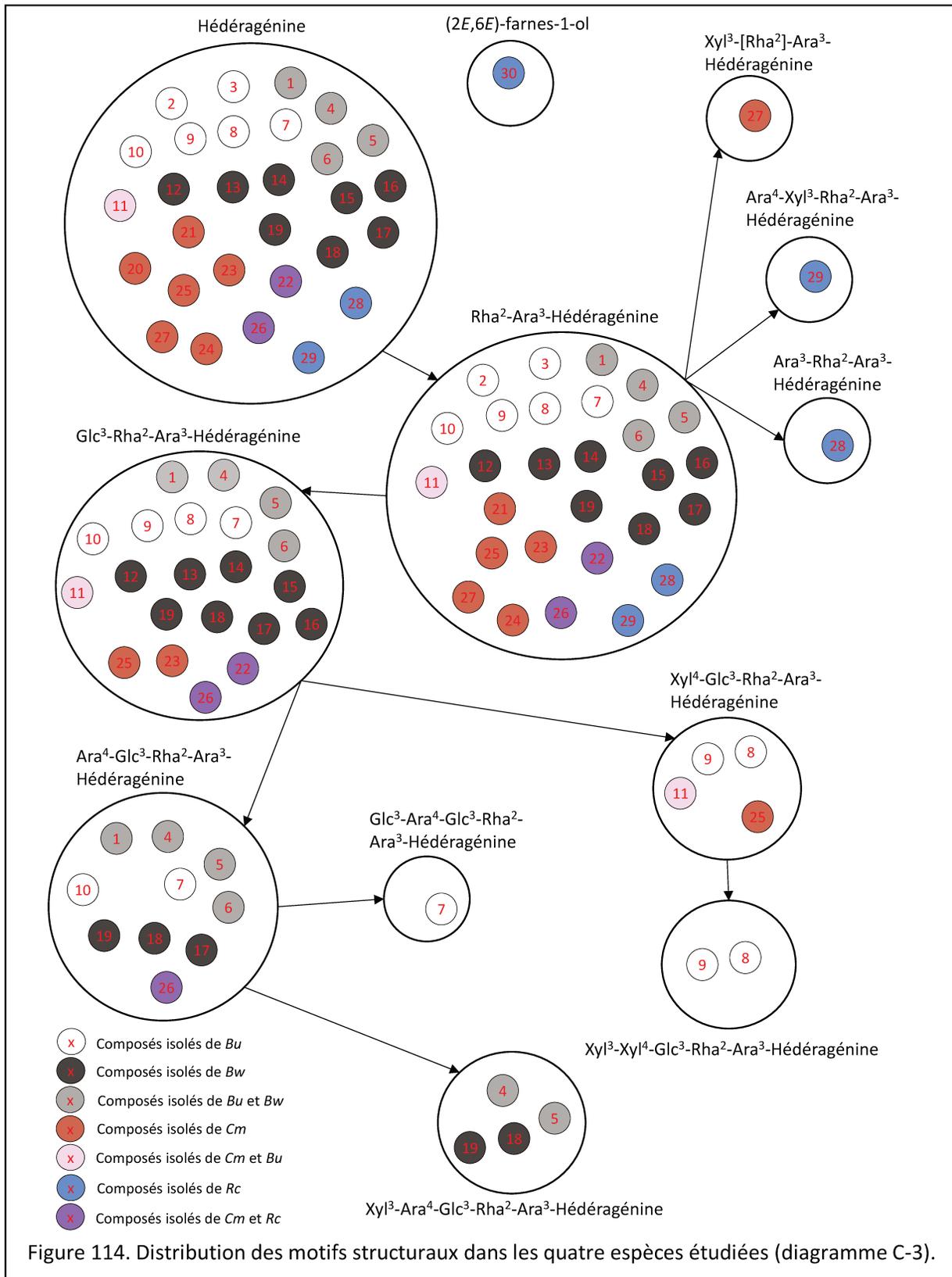
— Définition et distribution des motifs chimiotaxonomiques au sein des quatre espèces étudiées

Il a été vu précédemment que l'étude des produits naturels est un processus long et complexe, nécessitant de gros investissements expérimentaux en matière de compétences, de temps de manipulation et de matériel. Les résultats obtenus tiennent généralement en la description de

quelques structures de composés et il existe donc une fracture entre les ressources investies et la quantité de données produites. Ce constat nuit à l'établissement de liens chimiotaxonomiques entre les espèces faisant l'objet de ce travail, dans la mesure où la quantité d'information disponible ne permet pas d'établir des liens chimiotaxonomiques solides. Une solution consisterait à coupler ces informations avec celles de la littérature afin d'augmenter la robustesse du jeu de données. Cela n'est toutefois pas autorisé dans l'état actuel des connaissances car une proportion importante des glycosides décrits ici ne sont pas répertoriés dans les bases de données.

Une autre solution permettant d'établir des liens chimiotaxonomiques en présence d'une petite quantité de donnée, consiste à extraire l'information présente dans chaque structure décrite en considérant les motifs structuraux (sous-structures ou fragments) plutôt que les composés eux-mêmes. Cette approche nait du constat que la majorité des composés décrits précédemment partagent de nombreux motifs structuraux, bien que leurs structures finales soient distinctes. Les motifs structuraux les plus répandus ainsi que leur répartition entre les différentes espèces ont été étudiés. Ces derniers sont généralement basés sur l'hédéragénine et la séquence des chaînes glycosidiques en C-3 et en C-28 car ces motifs sont les plus communément distribués parmi les saponines décrites.

<i>Blighia unijugata</i>		<i>Blighia welwitschii</i>	
connus	nouveaux	connus	nouveaux
Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu10) (1)	Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu1) (4)	Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bw8) (1)	Ac ⁶ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bw1) (13)
Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ⁶ -Glc ester (Bu9) (2)	Xyl ³ -Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu2) (5)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ⁶ -Glc ester (Bw12) (12)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw2) (14)
Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ester (Bu11) (3)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ⁶ -Glc ester (Bu6) (6)	Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bw9) (4)	Ac ⁶ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Ac ^{6,4,3} -Glc ⁶ -Glc ester (Bw3) (15)
	Glc ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu3) (7)	Xyl ³ -Ara ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bw10) (5)	Ac ⁶ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Ac ^{6,4,3} -Glc ⁶ -Glc ester (Bw4) (16)
	Xyl ³ -Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu4) (8)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ⁶ -Glc ester (Bw11) (6)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw5) (17)
	Xyl ³ -Xyl ⁴ -[Ac] ³ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Bu5) (9)		Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ⁶ -Glc ester (Bw6) (18)
	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ester (Bu7) (10)		Xyl ³ -Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Ac ⁶ -Glc ⁶ -Glc ester (Bw7) (19)
	Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ester (Bu8) (11)		
n=3	n=8	n=5	n=7
n=11		n=12	
n=23			
<i>Chytranthus macrobotrys</i>			
connus	nouveaux	connus	nouveaux
Hédéragénine (Cm4) (20)	Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Cm1) (26)	Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Rc3) (22)	Ara ⁴ -Xyl ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Rc1) (29)
Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Cm5) (21)	Xyl ³ -[Rha ²]-Ara ³ - Hédéragénine -Glc ester (Cm2) (27)	Ara ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Rc4) (28)	Xyl ³ -[Rha ²]-Glc ⁴ -Rha ⁶ -Glc ³ -(2E,6E)-farnes-1-ol (Rc2) (30)
Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Cm6) (22)		Ara ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Rc5) (26)	
Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine -Glc ester (Cm7) (23)			
Rha ² -Ara ³ - Hederagenin -Glc ² -Rha ester (Cm8) (24)			
Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hédéragénine (Cm3) (25)			
Xyl ⁴ -Glc ³ -Rha ² -Ara ³ - Hederagenin -Glc ester (Cm9) (11)			
n=7	n=2	n=3	n=2
n=9		n=5	
n=14			
Tableau 36. Distribution des motifs structuraux dans les quatre espèces étudiées.			



La figure en C-3 permet de mettre en évidence la forte redondance des motifs Hédéragénine, Rha²-Ara³-Hédéragénine et Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine retrouvés dans 97 %, 93 % et 73 % des saponines décrites, respectivement. Ces motifs structuraux sont communément retrouvés chez les plantes comme souligné par l'analyse chimiotaxonomique des composés connus et ne constituent donc pas des marqueurs chimiotaxonomiques des espèces étudiées (voir 2.6.3.1 Approche chimiotaxonomique classique – Occurrence des composés connus dans la littérature). En revanche, la présence d'hédéragénine branchée en C-3 par le glycoside α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosyl a précédemment été reconnu comme un marqueur chimiotaxonomique des saponines des Sapindoideae, sous-famille dont font partie les quatre espèces étudiées. L'occurrence de ce motif dans 93 % des saponines isolées est cohérente avec la littérature en ce sens (Lavaud *et al.*, 2001 ; Voutquenne *et al.*, 2003).

Un autre motif commun est Ara⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine, trouvé dans 33 % des saponines décrites et présent chez les quatre espèces. Ce motif est uniquement retrouvé dans des saponines isolées de *Blighia sapida* (Mazzola *et al.*, 2011). Il est donc restreint à cinq espèces dont trois *Blighia* dans l'état actuel des connaissances. N'étant par conséquent pas retrouvé dans les saponines d'autres Sapindaceae ni même d'autres Sapindoideae, il est possible de spéculer que les espèces des genres *Blighia*, *Chytranthus* et *Radlkofera* soient apparentées. La classification des Sapindaceae les attribue cependant dans des tribus différentes ce qui ne semble pas en accord avec la phytochimie de ces espèces, du moins en ce qui concerne les saponines (Buerki *et al.*, 2009). Ce point souligne les difficultés de faire coïncider classifications phylogénétiques et chimiotaxonomiques. Des études phytochimiques supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si le motif structural Ara⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine est plus distribué au sein des Sapindoideae que l'état actuel des connaissances ne le laisse percevoir ou bien s'il est effectivement restreint à un petit nombre de Sapindoideae, parmi lesquelles les espèces des genres *Blighia*, *Chytranthus* et *Radlkofera*.

Un autre motif d'intérêt est Xyl³-Ara⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine, spécifique des deux *Blighia* et absent de la littérature. Ceci pourrait en faire un marqueur chimiotaxonomique spécifique du genre *Blighia*.

Au niveau de l'espèce, les marqueurs Xyl³-Xyl⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine et Glc³-Ara⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine ne sont retrouvés que dans l'espèce *Blighia unijugata* et pourraient ainsi être spécifiques de cette espèce.

Cette approche chimiotaxonomique originale basée sur les motifs structuraux contenus dans les composés plutôt que les composés eux-mêmes permet d'extraire une grande quantité d'information à partir des structures décrites. Cela permet de mettre en valeur des liens chimiotaxonomiques entre espèces qui n'auraient pas été identifiées par une approche classique. Elle permet aussi de mettre en évidence la spécificité biochimique de chaque espèce et ainsi définir des marqueurs chimiotaxonomiques. Ces derniers peuvent trouver un intérêt dans l'analyse qualité et traçabilité des produits à base de plantes. Ceux-ci représentent un marché important en Asie et en Afrique où les médecines traditionnelles sont extrêmement répandues au sein des populations (Zhang, 2004). L'approche par marqueurs chimiotaxonomiques pourrait donc permettre de contrôler la traçabilité et la sécurité des substances médicamenteuses utilisées.

La discussion des résultats de l'étude phytochimique, enrichie par des données sur les processus expérimentaux et l'analyse chimiotaxonomique, a permis de mettre en évidence des éléments divers comprenant :

- un protocole type pouvant servir de base expérimentale à qui voudrait entreprendre l'isolement des saponines des Sapindaceae
- l'utilisation préférentielle de la pyridine-*d*₅ en tant que solvant de mesure RMN pour ces mêmes composés
- un outil d'aide à l'élucidation structurale des saponines acétylées, fréquentes chez les Sapindaceae
- l'intérêt des familles des Caprifoliaceae, Lardizabalaceae, Ranunculaceae et Araliaceae comme sources alternatives des saponines rapportées dans cette étude
- l'intérêt de mettre en place une stratégie de déréplication pour les études phytochimiques portant sur plusieurs espèces apparentées
- la richesse de l'extrait comme facteur principal influençant la probabilité de découverte de saponines de structures nouvelles
- la mise en évidence de motifs structuraux spécifiques des taxons étudiés, pouvant potentiellement servir de marqueurs chimiotaxonomiques

Après avoir extensivement caractérisé les glycosides des Sapindaceae ainsi que les méthodes permettant de les obtenir, il est temps de s'intéresser à leurs éventuelles activités biologiques en rapport à la santé et à l'environnement. Ces aspects feront l'objet de la prochaine partie dans laquelle seront testées les propriétés de ces composés à (i) reconnaître des anticorps

dans des sérums de patients atteints de la sclérose en plaque ou à (ii) exercer une activité antifongique sur des champignons pathogènes des grandes cultures.

Partie 3 Etudes biologiques

Chapitre 3.1 Tests de reconnaissance d'anticorps dans des sérums de patients atteints de sclérose en plaque

3.1.0 Présentation du chapitre

Comme suggéré en Partie I, il a été entrepris d'utiliser les saponines en tant que sondes antigéniques en ELISA dans le but de reconnaître des anticorps. Si ces derniers sont spécifiques d'une pathologie donnée, cette approche pourrait permettre de reconnaître des biomarqueurs directement dans les sérums de patients. C'est par exemple le cas dans la SEP, où des hypothèses ont été émises concernant l'existence d'autoanticorps associés à la pathologie (Karussis, 2014 ; Garg et Smith, 2015). Ces autoanticorps pourraient représenter des biomarqueurs de grand intérêt diagnostique si bien que leur détection dans les sérums de patients représente un enjeu majeur. Pour une description détaillée des sondes antigéniques utilisées en ELISA, y compris des produits naturels glycosylés, il faut se référer à la Partie I (voir Partie I Synthèse bibliographique).

Toutefois, de nombreuses limites et problématiques sont posées par l'utilisation de ces composés comme sondes antigéniques pour la reconnaissance d'anticorps *in vitro*. Celles-ci concernent (i) la mise au point d'un système ELISA reproductible et optimisé pour l'utilisation de produits naturels, (ii) la comparaison des performances des glycosides naturels et des peptides synthétiques, (iii) la détermination des motifs structuraux préférentiellement reconnus et (iv) la spécificité de cette reconnaissance à certaines pathologies comme la SEP.

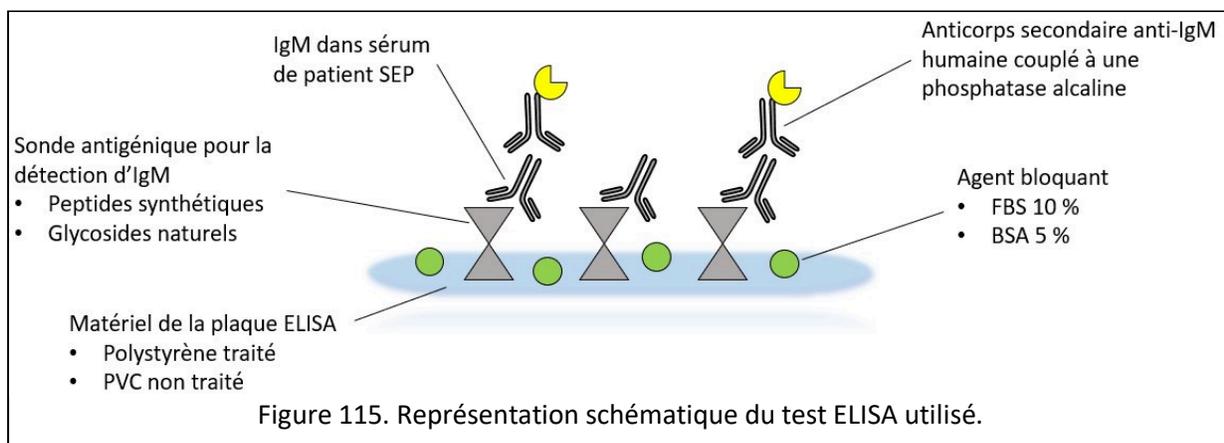
L'objectif de ce projet est d'apporter des éléments de réponses à ces quatre problématiques principales. L'enrichissement des données de la littérature, quasi-inexistantes sur cette thématique, représente également un objectif majeur.

3.1.1 Partie expérimentale

3.1.1.1 Principe de l'ELISA

L'ELISA (de l'acronyme anglais *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) désigne un test biochimique permettant de détecter ou de quantifier un antigène ou un anticorps dans un échantillon. Le principe de base du test repose sur la liaison covalente d'un anticorps et d'une

enzyme. La sonde ainsi créée par la liaison de ces deux protéines permet en théorie de détecter ou de doser n'importe quels types de composés à conditions que (i) l'anticorps soit spécifique de l'antigène d'intérêt, et que (ii) l'enzyme produise un signal détectable, par émission d'un produit coloré par exemple. Pour les applications quantitatives, il est important que (iii) la réaction de détection soit proportionnelle à la quantité d'interactions anticorps/antigène. Bien qu'il existe différentes variantes d'ELISA, tous les tests réalisés dans ce travail répondent à la technique de l'ELISA indirect (*indirect SP-ELISA* en anglais). Cette méthode est décrite dans la figure ci-dessous.



3.1.1.2 ELISA avec peptides

— Synthèse des peptides

Le peptide CSF114 et son analogue glycosylé CSF114(Glc) ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur de peptides par micro-onde automatisé selon le protocole décrit par Rizzolo *et al.* (Rizzolo *et al.*, 2007). Ces derniers ont ensuite été purifiés par chromatographie liquide d'adsorption et HPLC prep. Une analyse HPLC-MS a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de CSF114 et CSF114(Glc) sur la base de leurs Tr et leurs spectres de masse, préalablement déterminés par l'expérience.

— Sélection des sérums de patients SEP

Les sérums de 14 patients atteints de SEP et de 8 patients contrôles (maladie cœliaque) ont été obtenus à des fins de diagnostics et stockés à -20 °C jusqu'à utilisation. Les sérums de patients SEP ont été collectés au Multiple Sclerosis Clinical Care and Research Center du département de neurosciences, biologie de la reproduction et d'odonto-stomatologie de l'Université Federico II (Naples, Italie) ainsi qu'au service de neurologie clinique de l'hôpital

universitaire Careggi, Université de Florence (Florence, Italie). Tous les patients donnèrent leurs consentements éclairés. Ces derniers ont été diagnostiqués par analyse du LCR combinés à des examens IRM du SNC. Les échantillons ont été présélectionnés en fonction de leur réactivité au glycopeptide CSF114(Glc). Chaque sérum a été testé en triplicat afin d'en déterminer la réponse des anticorps en ELISA indirect. Les différentes étapes de l'ELISA sont détaillées ci-dessous.

— Protocole ELISA

Les peptides ont été solubilisés à raison de 10 µg/ml dans une solution de tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6. Cette dernière a été appliquée sur des plaques ELISA 96 puits en polystyrène activé (NUNC Maxisorb, Sigma-Aldrich) à raison de 100 µl/puit. Les plaques ont été laissées une nuit à +4 °C afin de permettre l'enrobage des puits par les peptides (*coating*). Après trois lavages avec un tampon de lavage (150 mM de NaCl supplémentée par 0,05 % de Tween®20), les sites non-spécifiques ont été saturés par 100 µl/puit de tampon de blocage (10 % de FBS dans tampon de lavage) à température ambiante pendant 60 min. Les sérums de patients dilués au centième dans du tampon de blocage ont alors été incubés une nuit à +4 °C à raison de 100 µl/puit. Après trois lavages au tampon de lavage, la solution d'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgM humaine couplé à une phosphatase alcaline, Sigma-Aldrich) diluée au 1:1200 dans du tampon de blocage a été ajoutée à raison de 100 µl/puit. Après 3 h d'incubation à température ambiante et trois lavages au tampon de lavage, 100 µl/puit de solution de révélation ont été ajoutés (1 mg/ml p-nitrophenylphosphate, Sigma-Aldrich, dans tampon carbonate pH 9,6 supplémenté par 10 mM MgCl₂). Après 30 min environ, la réaction de révélation est stoppée par 1 M NaOH (50 µl/puit) et l'absorbance est lue par un spectrophotomètre pour plaque ELISA à 405 nm (Tecan Sunrise). Les niveaux d'anticorps sont exprimés en unités arbitraires à 405 nm. L'absorbance liée aux interactions non-spécifiques entre les sérums et le matériel des plaques ELISA est éliminée (même protocole qu'au-dessus sans l'étape de *coating* des peptides).

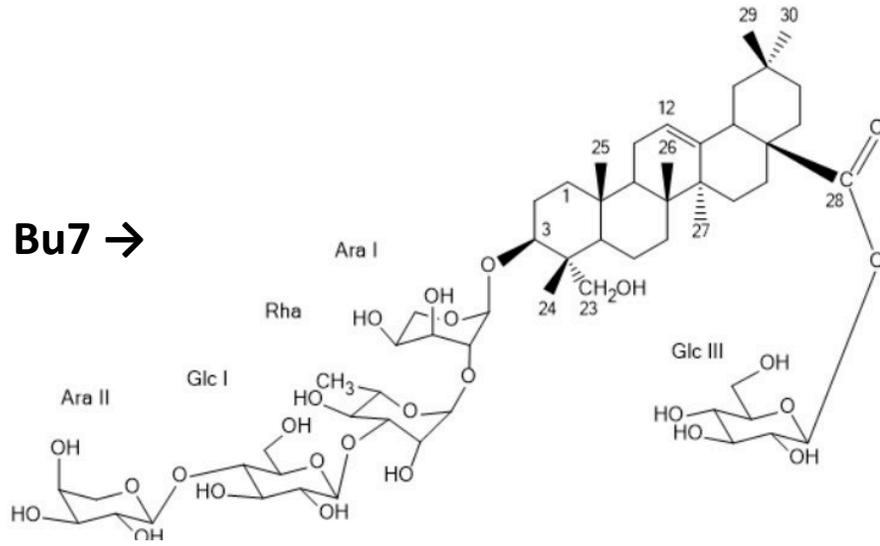
3.1.1.3 ELISA avec glycosides naturels

— Choix des glycosides naturels

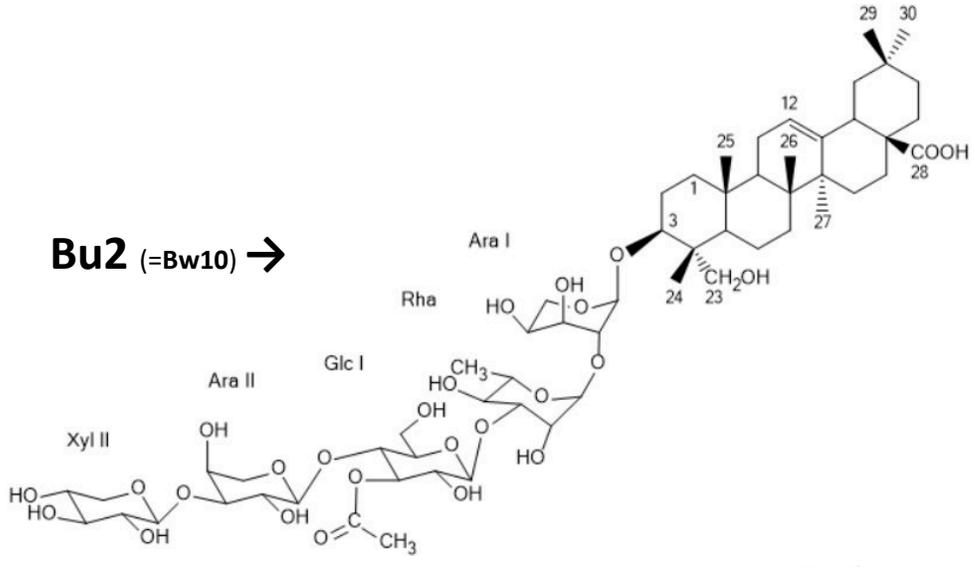
Le projet de mobilité impliquant l'utilisation de saponines pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP a été planifié relativement tôt dans la thèse (septembre-novembre 2018, début de deuxième année). Des glycosides isolés de *Blighia unijugata* et de *Blighia welwitschii* étaient déjà disponibles à ce niveau d'avancement du doctorat. C'est parmi ces derniers que furent sélectionnées les molécules à tester.

Les composés **Bu2** (=Bw10), **Bu7**, **Bw2**, **Bw6**, **Bw7**, **Bw12** ont été choisis sur la base de différents critères tels que la quantité de produit disponible, la pureté ainsi que la structure. Les caractéristiques structurales les plus intéressantes à tester étaient la taille des chaînes glycosylées ainsi que le nombre et la position des résidus Glc. En effet des études précédentes suggéraient que les saponines à longues chaînes de sucres présentaient une faible capacité de reconnaissance d'anticorps tandis que les résidus Glc étaient associés à une capacité de reconnaissance élevée. Ces pistes de RSA ont été proposées par deux études uniquement (Peroni *et al.*, 2016 ; Champy-Tixier *et al.*, 2018). Il semblait donc important d'obtenir des données complémentaires afin de les confirmer, ou le cas échéant, de les nuancer. Les saponines isolées des *Blighia* spp. présentaient des résidus Glc en nombre et position variable et semblaient par conséquent particulièrement indiquées pour tester ce paramètre. Toutefois, ces dernières ne présentaient que peu de variabilité au niveau de la longueur des chaînes de sucre. Il fallait donc trouver une autre saponine dont la structure serait proche de celles précédemment citées mais dont la ou les chaînes glycosidiques seraient de petite taille, idéalement un ou deux résidus Glc. Un glycoside isolé au Laboratoire de Pharmacognosie correspondait à ce profil et fut sélectionné pour les tests. Ce dernier avait été isolé à partir de *Olex obtusifolia* et présentait un acide oléanolique comme génine substituée en C-28 par un unique résidu Glc (acide oléanolique 28-O-β-D-glucopyranosyl ester, **Oo1**) (Pertuit *et al.*, 2018b). Cette courte chaîne de sucre contrastait avec celle des saponines de *Blighia* spp., généralement constituées de trois à cinq résidus. De plus, l'acide oléanolique est de structure très proche de l'hédéragénine des *Blighia*, permettant de réduire les différences d'activité liées à la génine. Ce composé offrait donc la possibilité de tester le paramètre longueur de la chaîne glycosidique de façon quasi-indépendante. Un autre élément structural caractéristique des saponines de *Blighia* spp. consistait en la présence récurrente de fonctions acétyles au niveau des résidus Glc. L'effet des acétyles sur l'activité de reconnaissance d'anticorps n'ayant jamais été testé auparavant, des composés acétylés et leurs analogues non-acétylés furent sélectionnés. Les structures des glycosides naturels testés en ELISA sont décrites en détail dans l'étude phytochimique (voir Partie 2 Etude phytochimique). Un rappel de ces dernières est proposé ci-dessous.

Bu7 →



Bu2 (=Bw10) →



Oo1 →

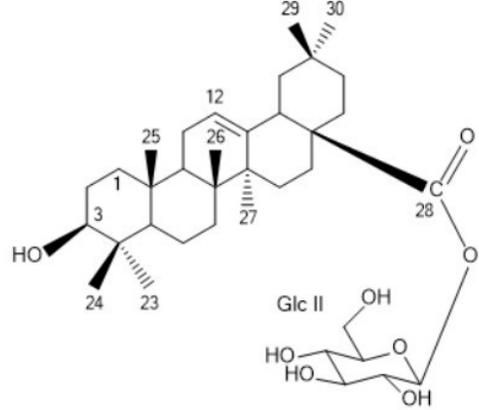


Figure 116. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP.

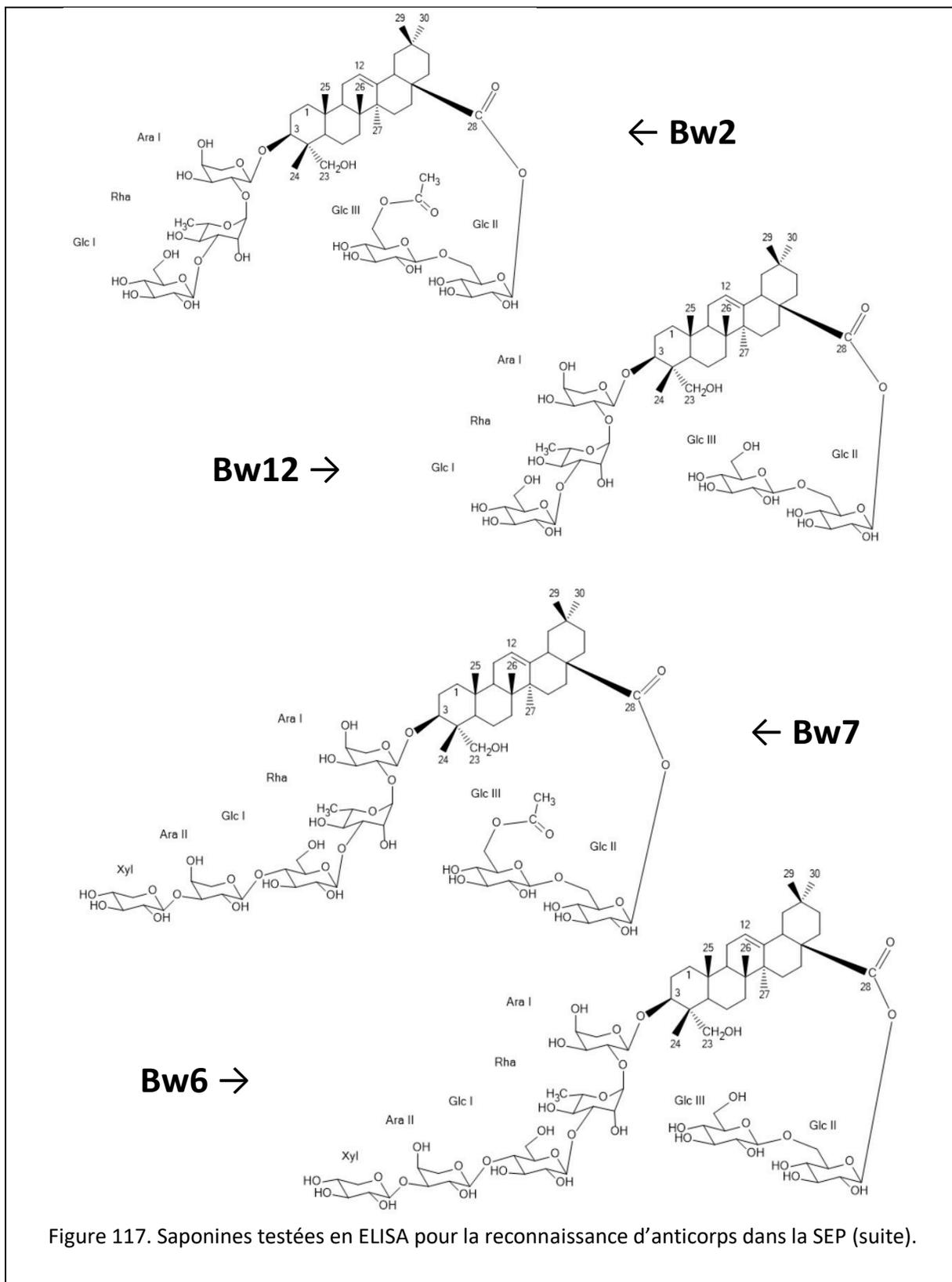


Figure 117. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP (suite).

— Protocole ELISA

Les glycosides naturels ont été solubilisés à raison de 10 µg/ml dans une solution d'éthanol pur. Cette dernière a été appliquée sur des plaques ELISA 96 puits en polychlorure de vinyle (Costar™ 2595) à raison de 100 µl/puit. Les plaques ont été laissées une nuit à température ambiante afin de permettre l'évaporation de l'éthanol et l'enrobage des puits par les glycosides naturels (*coating*). Les sites non-spécifiques ont été saturés par 100 µl/puit de tampon de blocage (5 % de BSA dans 150 mM de NaCl) à température ambiante pendant 60 min. Les sérums de patients dilués au centième dans du tampon de blocage ont alors été incubés une nuit à +4 °C à raison de 100 µl/puit. Après trois lavages au tampon de lavage (150 mM NaCl, sans détergent), la solution d'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgM humaine couplé à une phosphatase alcaline, Sigma-Aldrich) dilué au 1:1200 dans du tampon de blocage a été ajoutée à raison de 100 µl/puit. Après 3 h d'incubation à température ambiante et trois lavages au tampon de lavage, 100 µl/puit de solution de révélation ont été ajoutés (1 mg/ml p-nitrophenylphosphate, Sigma-Aldrich, dans tampon carbonate pH 9.6 supplémenté par 10 mM MgCl₂). Après 30 min environ, la réaction de révélation est stoppée par 1 M NaOH (50 µl/puit) et l'absorbance est lue par un spectrophotomètre pour plaque ELISA à 405 nm (Tecan Sunrise). Le choix des plaques ELISA, les conditions de *coating* et de lavage, les dilutions et les temps d'incubation ont été préalablement optimisés. Les niveaux d'anticorps sont exprimés en unités arbitraires à 405 nm. L'absorbance liée aux interactions non-spécifiques entre les sérums et le matériel des plaques ELISA est éliminée (même protocole qu'au-dessus sans l'étape de *coating* des glycosides naturels).

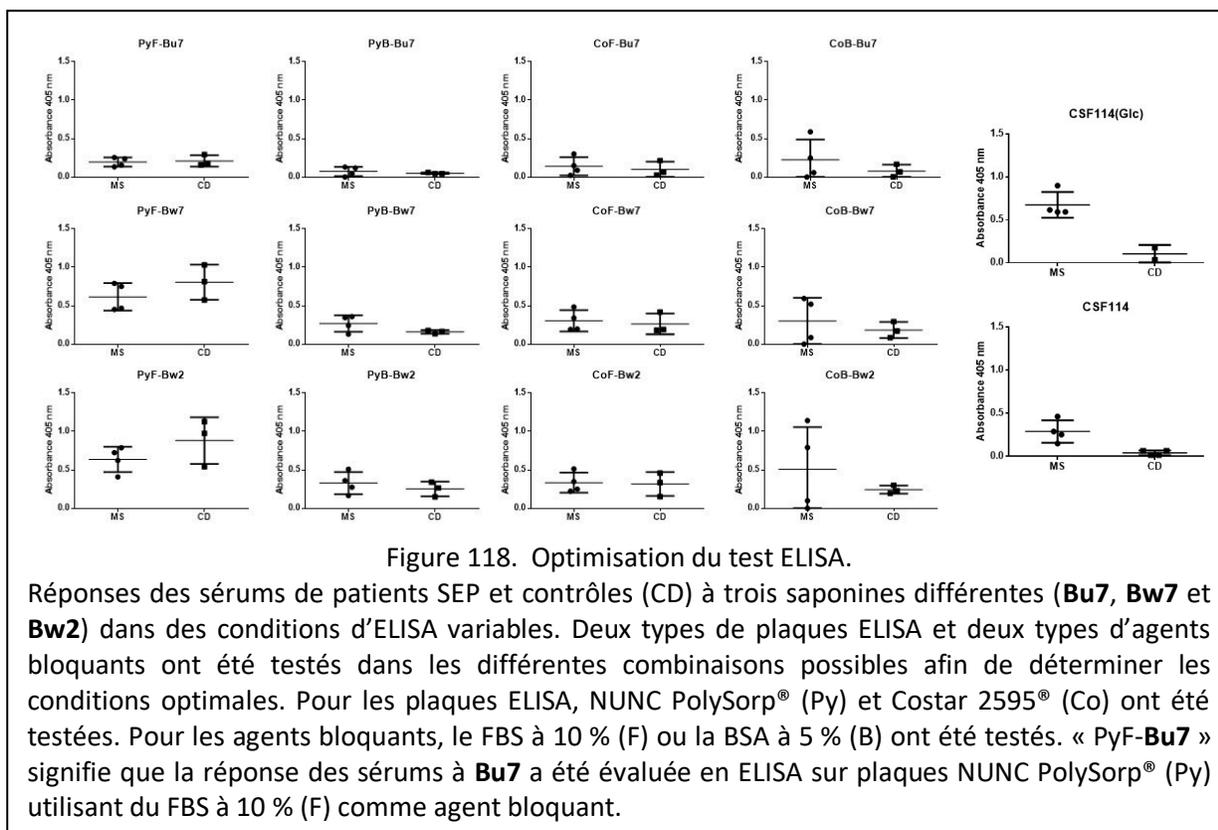
3.1.1.4 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6. Le test de normalité de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) a été utilisé en première instance afin d'évaluer si les données respectaient une distribution gaussienne. Ce critère n'étant pas satisfait, des tests non-paramétriques ont été employés. Le test *U* de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux distributions tandis que le test *H* de Kruskal-Wallis (ANOVA), couplé à la méthode de comparaison multiple de Dunn, a été choisi pour comparer plusieurs distributions simultanément. Une analyse de la courbe de la fonction d'efficacité du récepteur (en anglais *Receiver Operating Characteristic curve analysis*, abrégé par ROC) a été opérée dans le but d'estimer les valeurs de sensibilité (*sensitivity*) et de spécificité (*specificity*) pour chacun des composés testés.

3.1.2 Résultats et discussion

3.1.2.1 Optimisation du test

L'évaluation des capacités de reconnaissance d'anticorps des glycosides naturels en ELISA n'est pas un procédé commun. Il semblait donc important d'en optimiser les paramètres avant de tester largement les différents composés et sérums. Un protocole ELISA basé sur celui utilisé pour tester les peptides CSF114 et CSF114(Glc) a été développé. Ce dernier n'offrait que de faibles performances lorsque des glycosides naturels étaient utilisés à la place des peptides et fut donc modifié afin de maximiser la réponse des sérums aux saponines. Deux paramètres furent identifiés comme ayant une forte influence sur la finalité du test. Ces derniers étaient le type de plaque ELISA et le type d'agent bloquant utilisés. Deux types de plaques et deux types d'agents bloquants ont ainsi été testés dans différentes combinaisons afin de déterminer les conditions optimales de la réponse des anticorps. Un petit nombre de composés et de sérums a été sélectionné afin d'économiser ces ressources précieuses. Ces derniers comprenaient les saponines **Bu7**, **Bw2** et **Bw7** testées contre quatre sérums SEP et trois sérums contrôles, testés en duplicat. Les résultats de ces tests préliminaires sont présentés ci-dessous. Les peptides CSF114 et CSF114(Glc) ont été testés comme contrôles négatifs et positifs, respectivement.



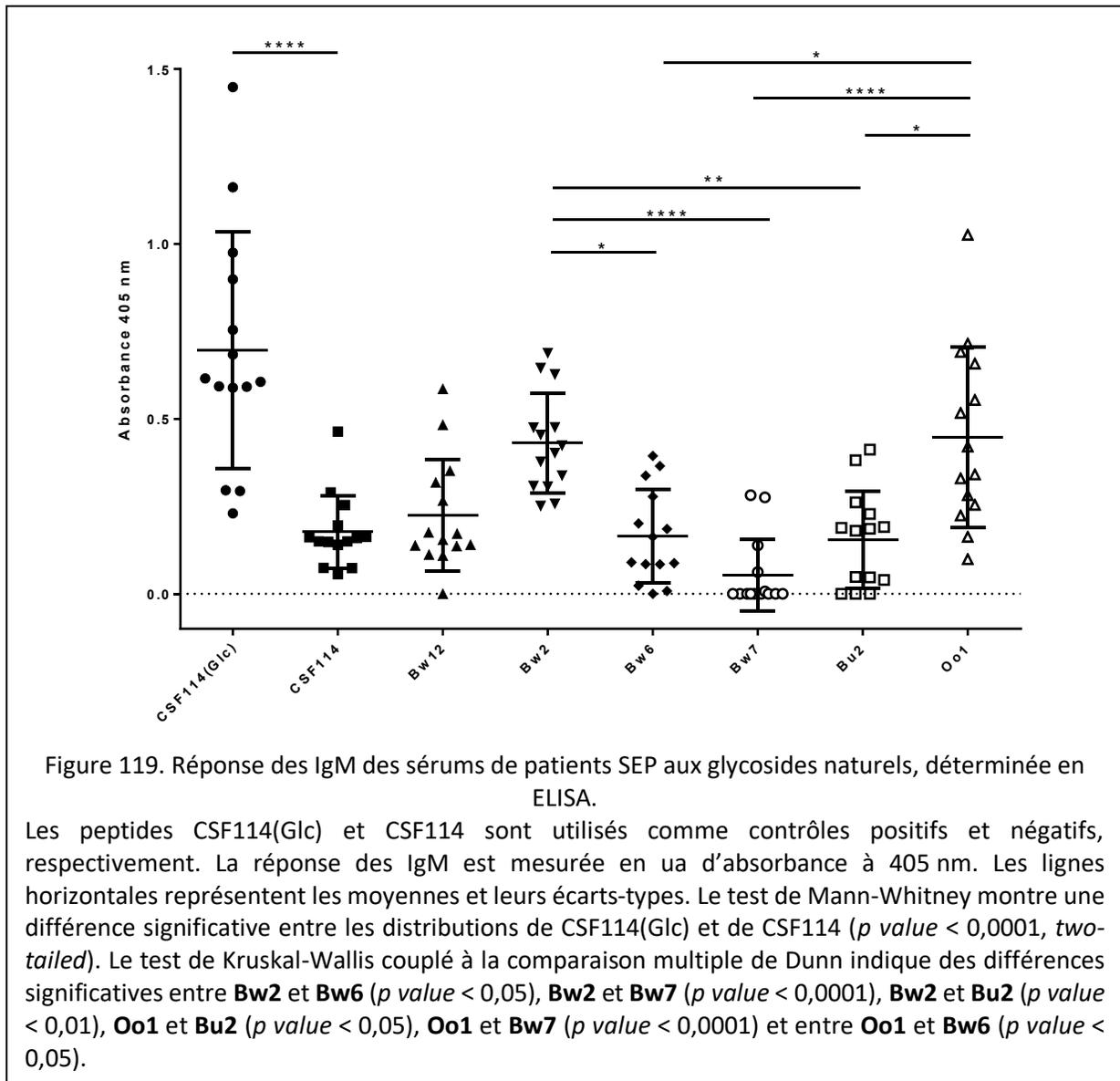
Les résultats sont assez hétérogènes et tendent à montrer l'effet important des conditions de l'ELISA sur les intensités de reconnaissance d'anticorps. L'utilisation de BSA à 5 % semble diminuer l'absorbance moyenne observée pour chacun des trois composés testés (voir Figure 118). Cette caractéristique pourrait être attribuée à de meilleures performances dans le blocage des interactions non spécifiques entre les anticorps des sérums et le matériel des plaques ELISA. Ce type d'interactions, commun lorsque des sérums sont employés en ELISA, doit être évité afin d'assurer un rapport signal sur bruit satisfaisant ainsi que la spécificité du signal mesuré. Dans le cas du test précédent, la BSA à 5 % semble donc être un meilleur agent bloquant que le FBS à 10 %.

Concernant les plaques, deux types de matériaux différents ont été sélectionnés. La NUNC Polysorp™ est en polystyrène traité pour maximiser l'adsorption des composés hydrophobes tandis que la Costar 2595® est en polychlorure de vinyle non traité. Les deux matériaux sont hydrophobes et sont théoriquement capables de former des interactions avec les aglycones des saponines par le biais de liaisons hydrophobes. Il est difficile de dire quel matériel est le plus performant pour

adsorber les glycosides naturels car ce mécanisme n'est pas directement observable. Il semble en revanche que l'utilisation de plaques Costar 2595® en combinaison avec la BSA offre la meilleure différence de distribution de la réponse des anticorps entre les deux échantillons de sérums (voir Figure 118). C'est en effet dans ces conditions que les saponines sont le plus en mesure de différencier les deux populations de sérums. Ces conditions sont donc retenues pour des investigations de plus grandes ampleurs, impliquant un nombre plus important de sérums et de glycosides.

3.1.2.2 Comparaison des capacités de reconnaissance d'anticorps des différents glycosides dans les sérums de patients SEP et relations structure-activité

Après détermination des conditions du test ELISA, un screening de plus large ampleur a été réalisé. Celui-ci comprenait six saponines parmi lesquelles **Bu2** (=Bw10), **Bw2**, **Bw6**, **Bw7**, **Bw12** et **Oo1** testées contre quatorze sérums de patients SEP et huit sérums contrôles. Ces derniers ont été testés lors d'une expérience réalisée en triplicats. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure suivante.



— Réponse des sérums aux peptides contrôles

Les sérums de patients SEP sont très réactifs au CSF114(Glc). Ces mêmes sérums sont peu réactifs au CSF114 et une différence significative est calculée entre les deux distributions (p value < 0,0001, *two-tailed*) (voir Figure 119). Bien que prévisibles, ces résultats démontrent le rôle des fonctions glycosylées, et plus particulièrement du Glc, pour une reconnaissance effective d'anticorps dans la SEP (Lolli *et al.*, 2005a, b ; Real Fernández *et al.*, 2015).

— Réponse des sérums aux glycosides naturels

La réactivité des sérums de patients SEP aux différents glycosides naturels est évaluée. Une majorité de composés présente de faibles capacités de reconnaissance d'anticorps. C'est le cas des saponines **Bu2** (=Bw10), **Bw6**, **Bw7**, **Bw12** pour lesquelles les réactions des sérums sont faibles et avoisinent les 0,2 ua d'absorbance à 405 nm. Par opposition, les composés **Bw2** et **Oo1** présentent des capacités de reconnaissance d'anticorps significativement plus élevées, situées aux alentours des 0,5 ua. Les analyses statistiques permettent de mettre en valeur des différences significatives de distribution de la réponse des sérums entre **Bw2** et **Bu2** (=Bw10), **Bw6**, **Bw7** ainsi qu'entre **Oo1** et **Bu2** (=Bw10), **Bw6**, **Bw7** (voir Figure 119). Ces comparaisons entre glycosides montrent qu'il existe des composés dotés de meilleures capacités de reconnaissance d'anticorps que d'autres. Les éléments structuraux associés à de bonnes performances en reconnaissance d'anticorps et ceux, au contraire, qui semblent l'empêcher, seront discutés dans les prochains paragraphes, centrés sur les RSA.

— RSA : les petits glycosides sont préférentiellement reconnus. Rôle des résidus Glc.

Les deux saponines présentant les meilleures performances ELISA sont **Bw2** et **Oo1**. Ces dernières sont caractérisées par la présence de courtes chaînes de sucres, composées d'un à trois résidus, terminées par des unités Glc. Ces résultats supportent les études précédentes, dans lesquelles les sérums de patients SEP étaient plus réactifs aux glycosides de petites tailles (Peroni *et al.*, 2016 ; Champy-Tixier *et al.*, 2018).

Concernant l'effet du Glc, il semble que le facteur important ne soit pas le nombre de résidus mais plutôt la position de ce dernier. Ce constat est illustré par les composés **Bw2** et **Oo1**, dont les performances de reconnaissance d'anticorps sont similaires mais les structures très différentes. En effet **Bw2** présente deux unités Glc terminales liées par des liaisons *O*-hétérosidique tandis que **Oo1** présente une seule unité Glc liée par une liaison ester. L'unité Glc liée par un ester montre la même performance que deux unités Glc liées par un pont *O*-hétérosidique (voir Figure 116. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP., Figure 117. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP (suite). Figure 119. Réponse des IgM des sérums de patients SEP aux glycosides naturels, déterminée en ELISA. La liaison de l'épitope à son aglycone joue donc un rôle fondamental dans la reconnaissance d'anticorps dans la SEP. En effet des études similaires ont montré que la nature de la liaison

modulait la performance de reconnaissance de l'épitope par des mécanismes de géométrie et d'exposition spatial de ce dernier (Nuti *et al.*, 2010).

— RSA : les longues chaînes empêchent la reconnaissance

Les composés montrant les plus faibles performances sont ceux présentant les plus longues chaînes de sucres. C'est le cas de **Bw6**, **Bw7** et **Bu2** (=Bw10), tous caractérisés par un oligosaccharide à cinq monomères en C-3 (voir Figure 116. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP., Figure 117. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP (suite). Figure 119. Réponse des IgM des sérums de patients SEP aux glycosides naturels, déterminée en ELISA. Ces fonctions glycosylées de grande taille sont généralement associées à de faibles performances par les études passées (Peroni *et al.*, 2016 ; Champy-Tixier *et al.*, 2018). Il est également intéressant de noter que ce type de structure pourrait empêcher la liaison d'autres fonctions glycosylées, normalement associées à de bonnes performances, lorsque les deux types de groupements sont présents sur la même molécule. C'est par exemple le cas des composés **Bw6** et **Bw7** qui présentent de faibles capacités en reconnaissance d'anticorps malgré la présence d'un petit polymère de Glc en C-28, un motif généralement associé à de bonnes performances, pour ces deux composés. Il est possible que la longue chaîne de sucres en C-3 empêche les interactions des anticorps avec d'autres antigènes glycosylés, normalement plus aptes à être reconnus. La présence de longues chaînes glycosylées est donc inversement corrélée à la performance en reconnaissance d'anticorps dans la SEP. Cette hypothèse est importante car elle est supportée par des collègues chercheurs utilisant un tout autre système ELISA que celui décrit dans ce travail. Ces derniers, utilisant différentes fonctions sucrées liées à la BSA en tant que sondes antigéniques pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP, ont émis un postulat très similaire au notre, selon lequel les longues chaînes de sucres seraient inefficaces (Braganza *et al.*, 2018). Cela supporte la pertinence du système ELISA précédemment utilisé pour les glycosides naturels dans sa capacité à reproduire des résultats de la littérature.

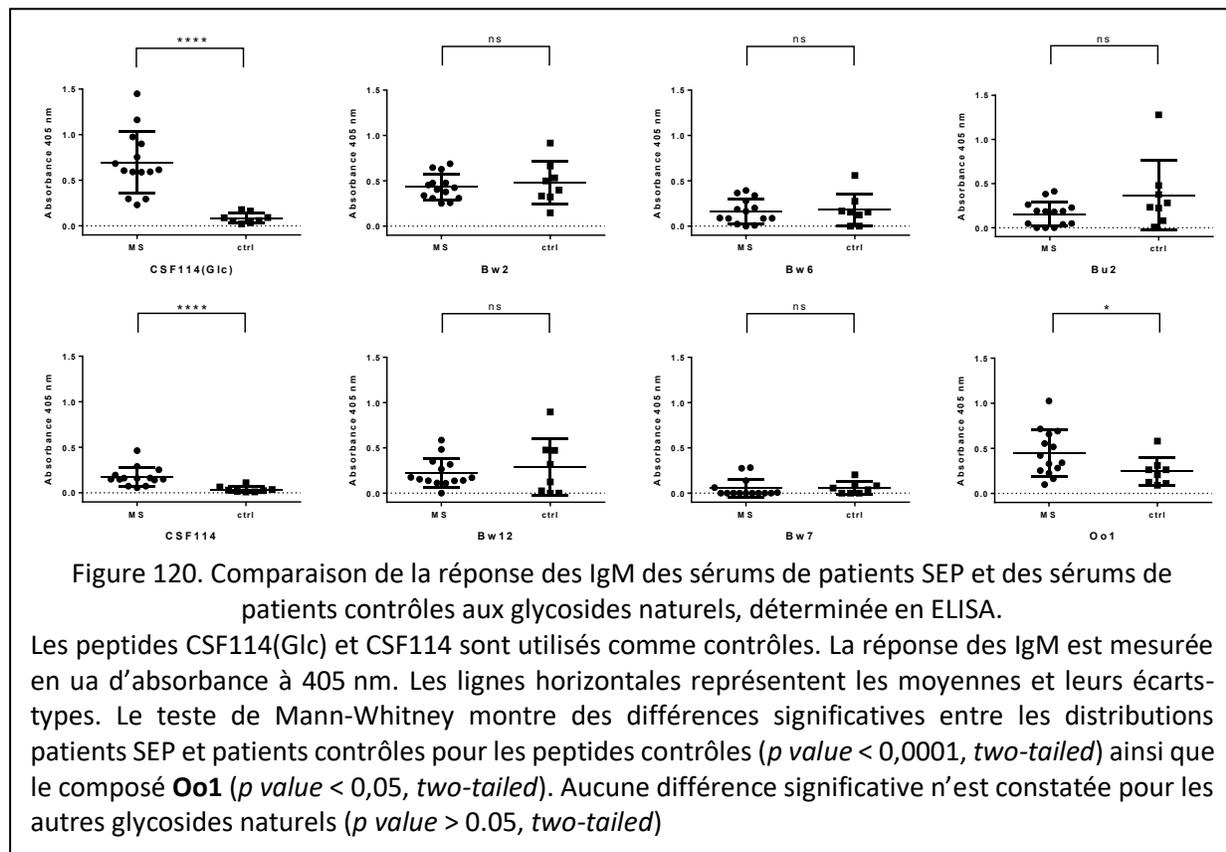
— RSA : rôle incertain des acétyles

Le rôle des fonctions acétyles sur la reconnaissance d'anticorps a pu être évalué pour la première fois. Cela était permis par une sélection de glycosides dont les structures ne différaient que par la présence d'un acétyle. C'est par exemple le cas des composés **Bw2** et **Bw12** ainsi que de **Bw6** et **Bw7** qui diffèrent deux à deux par la présence ou l'absence d'une fonction acétyle localisée en Glc-6 (voir Figure 116. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP. et Figure 117. Saponines testées en ELISA pour la reconnaissance d'anticorps dans

la SEP (suite).). La distribution de **Bw12** diffère de celle de **Bw2**, son analogue acétylé, tandis que celle de **Bw6** diffère de celle de **Bw7**, son analogue acétylé, suggérant un effet non nul des acétyles (voir Figure 119. Réponse des IgM des sérums de patients SEP aux glycosides naturels, déterminée en ELISA. Toutefois, ces différences ne sont pas statistiquement significatives et correspondent plutôt à des tendances. D'autres mesures pourraient être réalisées afin de déterminer si les acétyles exercent un effet sur les performances de reconnaissance d'anticorps dans la SEP.

3.1.2.3 Comparaison de la réactivité des sérums de patients SEP et des sérums contrôles aux glycosides naturels

La réponse de huit sérums contrôles aux différents antigènes testés précédemment est mesurée et comparée à celle des patients SEP. Cette expérience s'inscrit dans une approche diagnostique dont le but est de mettre en évidence d'éventuelles différences de réponse entre les sérums de patients SEP et contrôles. Les résultats de ces tests sont présentés dans la figure suivante.



— Spécificité de la reconnaissance : sérums patients SEP contre sérums patients contrôles

Les peptides CSF114(Glc) et CSF114 sont capables de différencier les deux populations de sérums sur la base d'un test statistique ($p\text{ value} < 0,0001$, *two-tailed*). Cela confirme la spécificité de ces sondes antigéniques peptidiques pour la reconnaissance d'IgM dans la SEP. Il est intéressant de noter que le CSF114 assure la même efficacité statistique que son analogue glycosylé CSF114(Glc), bien que ce dernier soit quatre fois plus fortement reconnu par les anticorps SEP que le CSF114 (voir Figure 120. Comparaison de la réponse des IgM des sérums de patients SEP et des sérums de patients contrôles aux glycosides naturels, déterminée en ELISA.). Ceci démontre le rôle des fonctions glycosylées dans la réponse des sérums SEP mais pas forcément dans la spécificité de cette réponse.

Les saponines de *Blighia* spp. sont plus ou moins reconnues par les anticorps des différents sérums mais ne permettent pas d'établir de différences statistiques significatives quant à la nature pathologique de ces derniers ($p\text{ value} > 0,05$, *two-tailed*). Seul le composé **Oo1** est capable de différencier les deux populations de sérums concernant leur niveau d'IgM ($p\text{ value} < 0,05$, *two-tailed*). En effet, une sensibilité jusqu'à 50,00 % est calculée pour une spécificité fixée à 85,71 % par analyse ROC (cutoff $< 0,216$, likelihood ratio 3,50). Cette bonne sensibilité à valeur élevée de spécificité tend à confirmer le comportement surprenant des sondes antigéniques basées sur le Glc pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP.

— Quels antigènes pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP ?

L'approche chimique inverse, théorisée par Papini et dont le principe consiste à tester des sondes antigéniques de structures diverses pour la reconnaissance d'anticorps associés à diverses maladies auto-immunes dont la SEP, permet d'émettre des hypothèses quant à la pathogénèse de ces affections (Papini, 2009). Celle-ci est basée sur le postulat selon lequel les sondes antigéniques testées pourraient être des mimétiques, c.-à-d. des analogues structuraux des antigènes natifs (autoantigènes) à l'origine de la pathologie *in vivo*. Pour être considérés ainsi, les sondes antigéniques testées doivent cependant satisfaire à deux critères qui sont (i) une forte réactivité des sérums d'intérêt à leur égard et (ii) la spécificité de cette réactivité aux sérums d'une pathologie donnée. C'est par exemple le cas du CSF114(Glc), considéré comme mimétique d'autoantigènes natifs impliqués dans la SEP. Cette approche chimique inverse se dissocie donc de l'approche initiale, visant à établir un outil diagnostique, et s'oriente plutôt vers la compréhension des mécanismes à l'œuvre dans la pathogénèse. L'objectif étant de déterminer la nature des

autoantigènes à l'œuvre *in vivo*, sur la base de tests *in vitro*, plus faciles à appréhender et à manipuler que les systèmes biologiques entiers.

Les résultats précédents semblent donc indiquer un rôle prépondérant du Glc (β -glucopyranose) dans la reconnaissance d'anticorps dans les sérums de patients SEP. Cela est particulièrement bien illustré par les résultats obtenus sur le peptide CSF114(Glc) ainsi que le glycoside naturel **Oo1**, tous deux porteurs d'un résidu Glc. Selon le postulat de base de l'approche chimique inverse, il est possible que les sondes antigéniques basées sur le motif Glc soient mimétiques d'autoantigènes impliquées dans la SEP *in vivo* (voir 1.3.4.2 Les antigènes synthétiques glycosylés). Cette hypothèse est toutefois fortement contrastée dans la mesure où les fonctions Glc semblent être aberrantes dans le contexte physiologique de la SEP, ces dernières n'étant d'ailleurs pas retrouvées dans le CNS humain (Walvoort *et al.*, 2016). Ce constat a conduit certains auteurs à considérer les antigènes basés sur l' α -glucopyranose comme de meilleurs candidats auto-antigéniques. Ces derniers étant retrouvés dans la matrice de collagène de la BHE, ils apparaissaient pour certains auteurs comme une explication rationnelle de la pathogénèse de la SEP (Menge *et al.*, 2005 ; Brettschneider *et al.*, 2009). Ces hypothèses sont toutefois contrastées par d'autres études. Celles-ci montrent que des taux élevés d'IgM contre des antigènes basés sur l' α -glucopyranose sont aussi bien retrouvés chez les patients SEP que les donneurs sains, altérant son statut de candidat antigénique endogène à l'origine de la pathologie (Huflejt *et al.*, 2009 ; Braganza *et al.*, 2018). Actuellement, les meilleures performances de reconnaissance d'anticorps dans les sérums de patients SEP sont assurées par le CSF114(Glc). Ce dernier présente un résidu Glc lié à un aglycone peptidique par une liaison N-glycosidique, un motif structural considéré comme exogène au CNS humain et parfois qualifié d'aberrant (Lolli *et al.*, 2005a, b; Walvoort *et al.*, 2016). Bien qu'offrant des performances moindres, le composé **Oo1** présente des capacités de reconnaissance élevées pour un glycoside naturel. Il est possible que ces dernières soient basées sur l'épitope composé d'un Glc lié à son aglycone triterpénique par une liaison ester. Ces résultats tendent à confirmer la robustesse des antigènes basés sur le Glc pour la reconnaissance d'anticorps dans la SEP. Bien que des recherches soient en cours, il n'existe actuellement aucun consensus quant aux mécanismes qui pourraient expliquer le rôle de structures aberrantes dans la pathogénèse. Les détails structuraux impliqués dans les interactions antigène/anticorps ne sont également pas élucidés, si bien qu'il est impossible de dire si c'est la nature de la liaison, la conformation

anomérique ou la nature même du sucre qui assure la reconnaissance spécifique de ces antigènes par les sérums de patients atteints de SEP.

3.1.3 Conclusion

Oo1, le composé offrant les meilleures performances parmi les glycosides naturels testés, a vérifié les hypothèses de RSA émises par les études précédentes. Ces dernières spécifiaient que les saponines présentant des fonctions glycosylées de petites tailles, composées de Glc préférentiellement lié à l'aglycone par une liaison ester, seraient préférentiellement reconnues par les sérums SEP (Peroni *et al.*, 2016 ; Champy-Tixier *et al.*, 2018). Des dérivés basés sur ce motif peuvent désormais être proposés dans le but poursuivre l'optimisation structurale de la sonde antigénique. Les résultats ambivalents des acétyles, dont l'effet sur la reconnaissance d'anticorps n'a pas pu être clairement explicité, pourraient représenter une thématique de recherche future.

Les données générées lors de ce travail, suggèrent que dans le cas de la SEP, les saponines présentent des capacités de reconnaissance d'anticorps inférieures à celles des peptides synthétiques. Les saponines des Sapindaceae ne permettent pas de fournir de résultats satisfaisant sur ce modèle d'activité biologique. Ce constat semble être lié à certaines de leurs caractéristiques structurales, notamment la grande taille de leurs chaînes glycosidiques, dont l'effet négatif sur la reconnaissance d'anticorps est désormais connu. L'utilisation de glycosides naturels issus des plantes comme sondes antigéniques dans le but de développer un outil diagnostique pour la SEP ne représente pas un objectif souhaitable dans l'état actuel des connaissances. Cela est en grande partie dû au fait que les peptides synthétiques offrent de meilleures performances et semblent ainsi mieux indiquer pour cette utilisation.

Néanmoins, les glycosides naturels pourraient jouer un rôle majeur dans la compréhension de la pathogénèse de la SEP. En effet, ces derniers présentent des structures glycosylées rares, stables et complexes, qu'il est extrêmement difficile de synthétiser et de manipuler si ce n'est par une maîtrise avancée de la synthèse organique (Adamo *et al.*, 2014 ; Braganza *et al.*, 2018). En ce sens, les glycosides naturels pourraient permettre de tester des sondes antigéniques qui n'ont jamais été testées jusqu'à présent et pour lesquelles il n'existe pas d'alternatives synthétiques dans l'état actuel des connaissances. Couplée à du screening haut débit, cette approche pourrait offrir des perspectives plus larges au sujet des motifs glycosylées spécifiques, ou du moins préférentiellement

reconnus par les sérums de patients SEP. En fonction de la quantité de données produites et de la robustesse de ces dernières, il est envisageable qu'une telle entreprise puisse fournir des informations significatives quant à l'origine antigénique de la SEP.

Chapitre 3.2 Tests d'activité antimicrobienne sur divers micro-organismes pathogènes des grandes cultures

3.2.0 Présentation du chapitre

Comme introduit précédemment, les glycosides naturels présentent de nombreuses activités biologiques parmi lesquelles des activités antimicrobiennes à l'égard des bactéries, des champignons et des virus (voir Partie 1 Synthèse bibliographique). Les glycosides des Sapindaceae, et notamment les saponines, sont connus pour leur activité antifongique. Une littérature abondante et variée est disponible sur ce sujet dont certains éléments sont cités en amont (voir Partie 1 Synthèse bibliographique). Sur la base de ces données, il a été entrepris d'évaluer l'activité antifongique des extraits bruts et des composés purs contre quinze phytopathogènes dont quatorze champignons responsables de maladies cryptogamiques des grandes cultures.

Les objectifs principaux sont (i) la mesure de l'activité antifongique des saponines des Sapindaceae. (ii) La production de données d'activité antimicrobienne concernant des phytopathogènes contre lesquels les saponines n'ont jamais été testées auparavant. (iii) La détermination des éléments structuraux responsables de l'activité (RSA). (iv) La proposition de pistes de réflexion sur les interactions plantes-microbes, le rôle des saponines en tant que métabolites spécialisés de défense des plantes et les stratagèmes utilisés par les phytopathogènes pour les contourner.

Si les études publiées sont nombreuses au sujet de l'activité antifongique des saponines dérivées des Sapindaceae contre des dermatophytes (pathogènes des animaux), elles le sont beaucoup moins concernant les phytopathogènes (pathogènes des plantes). La production de données publiables sur cette dernière thématique représente donc un objectif important.

3.2.1 Partie expérimentale

3.2.1.1 Souches sélectionnées

Les souches sélectionnées comprenaient quinze espèces de phytopathogènes dont quatorze champignons et une bactérie. Celles-ci ont été choisies en fonction de leur importance en

pathologie végétale et constituent des ravageurs connus des grandes cultures. Elles peuvent être classées en quatre groupes principaux qui sont les suivants. Le numéro de souche permettant son identification est indiqué entre parenthèses.

Groupe 1 — Pathogènes généralistes capables d'infecter de nombreuses espèces de plantes : *Pythium ultimum* (*Pt. ultimum*) (DSM62987), *Pythium irregulare* (*Pt. irregulare*) (DSM62956), *Fusarium oxysporum* (*Fu. oxysporum*) (CBS149.5), *Botrytis cinerea* (*Bo. cinerea*) (IBWF strain), *Rhizoctonia solani* (*Ri. solani*) (DSM63010).

Groupe 2 — Pathogènes spécialisés associés aux cultures de céréales (Gramineae ou Poaceae) : *Pyricularia oryzae* (*Py. oryzae*) (strain 70-15), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ga. graminis* var. *tritici*) (CBS247.29), *Zymoseptoria tritici* (*Zy. tritici*) (CBS115943).

Groupe 3 — Pathogènes lignicoles associés aux maladies du bois : *Fomitiporia mediterranea* (*Fo. mediterranea*) (MF3/22#3), *Phaeoacremonium minimum* (*Ph. minimum*) (CBS100397), *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pa. chlamydospora*) (CBS101359), *Eutypa lata* (*Eu. lata*) (IBWF strain E16012), *Xylella fastidiosa* (*Xy. fastidiosa*) (DSM10026).

Groupe 4 — Champignons utilisés comme phytosanitaires biologiques (non-pathogènes) : *Trichoderma* sp. IBWF 034-05 (*Tr. 034-05*) (IBWF strain #034-05), *Trichoderma atroviride* (Vintec®) (*Tr. atroviride*) (DLRT28).

La majorité des souches a été achetée chez les banques de souches CBS et DSM. Les autres proviennent de la banque de micro-organismes de l'IBWF.

3.2.1.2 Culture des souches

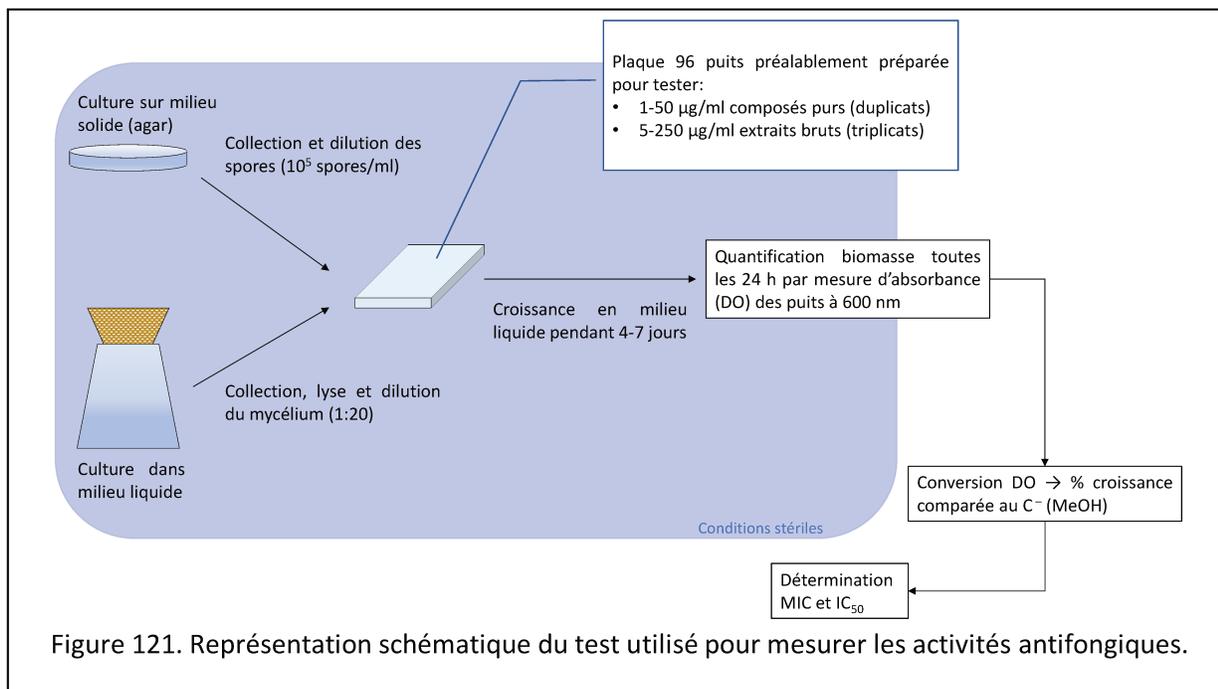
Tous les champignons ont été cultivés sur YMG agar (pour 1 litre : 4 g extrait de levure, 10 g extrait de malt, 10 g glucose, 2 % agar, pH 6,5), à l'exception de *Py. oryzae*, cultivé sur CM agar (pour 1 litre: 10 g glucose, 1 g extrait de levure, 2 g peptone, 1 g acides casaminés, 50 ml solution de sels de nitrate [contenant pour 1 litre: 120 g NaNO₃, 10,4 g KCl, 30,4 g KH₂PO₄, 10,4 g MgSO₄×7H₂O], 1 ml solution d'oligo-éléments [contenant pour 1 litre: 22 g ZnSO₄×7H₂O, 11 g H₃BO₃, 5 g MnCl₂×4H₂O, 5 g FeSO₄×7H₂O, 1,7 g CoCl₂×6H₂O, 1,6 g CuSO₄×5H₂O, 1,5 g Na₂MoO₄×2H₂O et 50 g Na₂EDTA, pH 6,5], 2 % agar, pH 6,5), *Zy. tritici*, cultivé sur YEG agar (pour 1 litre: 10 g glucose, 10 g extrait de levure, 2 % agar, pH 6,5) et *Eu. lata*, cultivé sur BAF agar (pour 1 litre: 1 g extrait de levure, 10 g glucose, 20 g maltose, 2 g peptone, 0,5 g KH₂PO₄,

0,4 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 70 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg ZnSO_4 , 2 % agar, pH 5,5). La bactérie *Xy. fastidiosa* a été cultivée sur Boses agar (pour 1 litre : 10 g extrait de levure, 10 g ACES, 2 g charbon activé, 2 % agar, pH 6,9) ou sur Lb agar (pour 1 litre : 10 g tryptone, 5 g extrait de levure, 10 g NaCl, 2 % agar, pH 7,0). Tous les organismes ont été maintenus à température ambiante pour 3-6 semaines, exceptés *Zy. tritici* et *Xy. fastidiosa*, cultivés à 18 °C et 27 °C, respectivement.

3.2.1.3 Protocole du test antifongique

— Principe du test sélectionné

Le test d'activité antifongique utilisé repose sur un principe simple de mesure d'absorbance (densité optique) en plaque 96 puits. Brièvement, les micro-organismes à tester sont cultivés en milieu solide ou liquide puis les cellules qu'ils produisent (généralement des spores ou du mycélium pour les champignons) sont re-suspendues et diluées en milieu liquide à hauteur de 10^5 cellules/ml. Ces dernières sont transférées en plaques 96 puits préalablement préparées pour contenir différentes concentrations de composés à tester. Les plaques ainsi produites sont mises à incuber à une température donnée sous agitation pendant plusieurs jours. L'absorbance est mesurée toutes les 24 heures à 600 nm afin de suivre la croissance des cellules en présence des composés d'intérêt. La longueur d'onde de mesure est fixée à 600 nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption de la biomasse. Il est estimé qu'il existe une corrélation linéaire entre absorbance et biomasse entre 600 et 700 nm.



— Protocole utilisé et variantes

Les extraits et les composés purs ont été solubilisés dans du MeOH et testés dans les limites de concentrations suivantes : 5-250 µg/ml pour les extraits et 1-50 µg/ml pour les composés purs. Ces derniers ont été transférés en plaques 96 puits sous conditions stériles jusqu'à ce que le MeOH soit totalement évaporé. Le MeOH a été utilisé comme contrôle négatif tandis que la ciclopirox olamine ou le glufosinate d'ammonium ont été utilisés en contrôles positifs. Les spores ont été obtenues par ajout de milieu de culture liquide frais sur les plaques d'agar contenant le micro-organisme, suivi d'un grattage de la surface de l'agar avec une spatule de Drigalski stérile, afin de les re-suspendre. Cette technique a été employée pour *Py. oryzae*, *Tr. atroviride*, *Ph. minimum*, *Pa. chlamydospora*, *Fu. oxysporum*, *Bo. cinerea* et *Tr. 034-05*. La solution de spores a été filtrée, ajustée à 10^5 spores/ml puis transférée dans les plaques 96 puits.

Comme *Ga. graminis* var. *tritici*, *Fo. mediterranea*, *Eu. lata*, *Pt. ultimum*, *Pt. irregulare* and *Ri. solani* ne produisent pas ou peu de spores en culture, les cellules de mycélium ont été utilisées. Brièvement, des précultures liquides ont été sélectionnées à maturité pour chaque organisme puis transférées en tubes de 2 ml. Ceux-ci ont été secoués par ribolyse (TissueLyser II, Qiagen, 30 Hz, 15 s) et leur contenu rapidement transféré dans du milieu frais suivant une dilution

au 1/20. Les dilutions ont été homogénéisées jusqu'à ce qu'une solution uniforme de mycélium en milieu liquide soit obtenue puis transférée en plaques 96 puits.

Pour tous les champignons, les plaques 96 puits ont été inoculées avec 100 µl/puit de suspension cellulaire et incubées à température ambiante pour 4 jours à 120 rpm. La viabilité cellulaire a été évaluée macroscopiquement et par mesure de l'absorbance à 600 nm (Benchmark Plus Microplate Reader #1706930, Bio-Rad, 600 nm) à raison d'une mesure toutes les 24 h.

Xy. fastidiosa a été cultivée dans du Bosa agar pendant 7 jours (60 rpm, 27 °C). La densité optique a été ajustée à 0,1 ua par dilution dans du milieu Lb liquide. La solution résultante a été transférée en plaques 96 puits à hauteur de 100 µl/puit et celles-ci ont été incubées pendant 7 jours (60 rpm, 27 °C). L'absorbance a été mesurée toutes les 24 h à 600 nm comme décrit précédemment.

3.2.1.4 Traitements des données et détermination des MIC et IC₅₀

Les valeurs d'absorbance ont été transformées en pourcentage de croissance comparée au contrôle négatif (MeOH) suivant l'équation suivante :

$$\% \text{ croissance comparée au contrôle négatif} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{substance testée}} - \text{Abs}_{\text{contrôle positif}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle négatif}} - \text{Abs}_{\text{contrôle positif}}} \right) \times 100$$

Les pourcentages ainsi obtenus ont été représentés graphiquement contre leurs valeurs de concentration respectives en utilisant le logiciel Excel (Microsoft corporation). Les IC₅₀ ont été déterminés comme la concentration pour laquelle la croissance atteint 50 % ± 3 % de la croissance du contrôle négatif. Similairement, les MIC ont été déterminées comme la concentration pour laquelle la croissance atteint 0 % ± 3 % de la croissance du contrôle négatif. Les tests ont été réalisés en duplicats pour les composés purs et en triplicats pour les extraits. Au moins deux expériences indépendantes ont été conduites. D'une expérience à l'autre, les cultures solides ou les précultures utilisées pour incuber les plaques 96 puits ont été sélectionnées au même niveau d'avancement de croissance, généralement 1-2 semaines pour les plaques et 6-7 jours pour les précultures.

3.2.1.5 Choix des extraits et des composés purs testés

Les extraits bruts de *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Radlkofera calodendron* et *Chytranthus macrobotrys* ont été testés afin de comparer le potentiel antifongique de ces quatre Sapindaceae.

Les composés **Bu2 (=Bw10)**, **Bu7**, **Bu11**, **Bw6**, **Bw9 (=Bu1)**, **Bw12**, **Rc1**, **Rc2**, **Rc4**, **Rc5 (=Cm1)**, **Cm3**, **Cm4**, **Cm5**, **Cm6 (=Rc3)**, **Cm7** ont été sélectionnés dans le but de tester des composés purs issus des quatre plantes. Les autres facteurs ayant motivé cette sélection étaient la diversité structurale des composés, la pureté et la quantité de produit disponible.

3.2.2 Résultats et discussion

3.2.2.1 Activité des extraits bruts

extraits	<i>Py. oryzae</i>		<i>Ga. graminis</i> var. <i>tritici</i>		<i>Fo. mediterranea</i>		<i>Zy. tritici</i>		<i>Tr. atroviride</i> (Vintec®)		<i>Ph. minimum</i>		<i>Pa. chlamydospora</i>		<i>Ri. solani</i>		<i>Pt. ultimum</i> <i>Pt. irregulare</i> <i>Fu. oxysporum</i> <i>Bo. cinerea</i> <i>Tr. 034-05</i> <i>Eu. lata</i>		<i>Xy. fastidiosa</i>	
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀
<i>R. calodendron</i>	25 ± 0	15 ± 4	50 ± 1	20 ± 2	250 ± 32	35 ± 2	>250	70 ± 31	>250	70 ± 27	>250	50 ± nd	>250	50 ± nd	>250	70 ± 17	>250	>250*	>250	75 ± 0
<i>B. unijugata</i>	50 ± 1	30 ± 2	100 ± 8	45 ± 6	>250	175 ± 54	>250	120 ± 29	>250	100 ± 40	>250	100 ± nd	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	150 ± 0
<i>B. welwitschii</i>	100 ± 0	40 ± 13	100 ± 13	70 ± 10	>250	200 ± 71	>250	>250	>250	100 ± 40	>250	100 ± nd	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100 ± 0
<i>C. macrobotrys</i>	150 ± 2	70 ± 23	250 ± 12	140 ± 20	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Tableau 37. Activité antifongique des extraits bruts exprimée en tant que MIC et IC₅₀ en µg/ml.

Les valeurs sont les moyennes de deux expériences indépendantes réalisées en triplicats ± l'écart type. Cases gris sombre, MIC ≤ 100 µg/ml ; cases gris clair, IC₅₀ ≤ 100 µg/ml ; nd, non déterminé ; *160 ± 34 pour *Eu. lata*.

— Effet des extraits sur les différentes souches

Une activité antifongique dose dépendante entre 5 et 250 µg/ml est observée pour dix micro-organismes sur quinze. Les organismes les plus susceptibles aux extraits de saponines étaient *Py. oryzae* et *Ga. graminis* var. *tritici*, pour lesquels des MIC < 50 µg/ml sont obtenues. D'un autre côté, *Fo. mediterranea*, *Zy. tritici*, *Tr. atroviride*, *Ph. minimum*, *Pa. chlamydospora*, *Ri. solani* et la bactérie *Xy. fastidiosa* étaient modérément susceptibles. Aucune MIC < 250 µg/ml n'a été obtenue mais des IC₅₀ < 100 µg/ml étaient satisfaits. Cela démontre la capacité des extraits à altérer la croissance de ces organismes et pourrait être attribué à un effet fongistatique. Au contraire, *Pt. ultimum*, *Pt. irregulare*, *Fu. oxysporum*, *Bo. cinerea*, *Tr. 034-05* et *Eu. lata* semblaient

inaffectés par les extraits et peuvent être qualifiés de résistants. En effet, aucun indicateur d'activité n'a été satisfait en dessous de 250 µg/ml pour ces pathogènes (voir Tableau 37).

— Lien entre l'activité antifongique et la composition des extraits

L'activité des extraits est dépendante du microorganisme testé mais elle est également dépendante de l'extrait. Les quatre extraits présentent en effet des capacités antifongiques hétérogènes. En ce sens, l'extrait de *R. calodendron* est systématiquement le plus actif suivi des extraits de *B. unijugata* and *B. welwitschii*, dont les activités sont proches. L'extrait de *C. macrobotrys*, en revanche, est toujours le moins actif. Dans un objectif de compréhension des inégalités d'activité antifongique entre les extraits et d'identification des substances à l'origine de celle-ci, des analyses phytochimiques ont été conduites. Ces dernières ont été réalisées par HPLC qui, couplée aux résultats d'isolement et de détermination structurale, ont permis de mettre en évidence les grandes classes de composés constitutives de chaque extrait. Ces analyses semblent montrer une corrélation entre la présence de monodesmosides triterpéniques et l'activité antifongique (voir Tableau 37 et Tableau 38). Parmi les saponines triterpéniques, les monodesmosides sont souvent décrits comme étant de plus puissants antifongiques que les bidesmosides (Abbruscato *et al.*, 2014 ; Njateng *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2018). Des variations dans la teneur en monodesmosides des extraits pourraient donc expliquer les variations d'activité antifongique. Concernant l'activité antibactérienne, les saponines sont considérées comme des agents antibiotiques modérés à puissants, selon les études (Mandal *et al.*, 2005 ; Avato *et al.*, 2006 ; Lunga *et al.*, 2014). Dans ce cas, l'activité antibiotique ne semble pas être liée au type de composé comme c'est le cas avec l'activité antifongique (c.-à-d. monodesmoside, bidesmoside, aglycone etc.) mais plutôt à des facteurs physicochimiques tels que la polarité ou la balance hydrophile-lipophile (Dong *et al.*, 2020 ; Xue *et al.*, 2020). Dans le but de clarifier ces hypothèses, une sélection de composés purs a été testée.

	Tannins, polyphénols et autres composés polaires	Bidesmosides triterpéniques	Sesquiterpènes	Monodesmosides triterpéniques	Aglycones
<i>C. macrobotrys</i>	53.2 %	23.4 %	4.9 %	15.7 %	2.8 %
<i>R. calodendron</i>	3.8 %	–	46.6 %	49.2 %	0.3 %
<i>B. unijugata</i>	14.8 %	31.4 %	–	53.2 %	0.5 %
<i>B. welwitschii</i>	2.9 %	29.9 %	13.2 %	53.6 %	0.3 %

Tableau 38. Composition des extraits bruts.

Les valeurs désignent des proportions relatives d'extrait brut, exprimées en pourcentage et approximées par HPLC selon le protocole décrit dans l'article n°3.

3.2.2.2 Activité des composés purs

composé (type)	<i>Py. oryzae</i>		<i>Ga. graminis</i> var. <i>tritici</i>		<i>Fo. mediterranea</i>		<i>Zy. tritici</i>		<i>Tr. atroviride</i> (Vindec®)		<i>Ph. minimum</i>		<i>Pa. chlamydospora</i>		<i>Pt. ultimum</i> ^a <i>Pt. irregulare</i> ^a <i>Fu. oxysporum</i> ^c <i>Bo. cinerea</i> ^b <i>Ri. solani</i> ^f <i>Tr. 034-05</i> ^c <i>Eu. lata</i> ^o		<i>Xy. fastidiosa</i>		
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	
Rc1 (mod)	25 ± 0.0	15 ± 0.6	30 ± 1.6	15 ± 0.9	25 ± 2.2	20 ± 1.8	>50	35 ± 6.3	>50	15 ± 2.4	>50	25 ± 0.2	>50	25 ± 0.7	>50	>50	>50	>50	5 ± 0.0
Rc2 (sqt)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Rc4 (mod)	25 ± 0.0	15 ± 0.9	25 ± 0.2	15 ± 0.3	25 ± 1.2	10 ± 3.5	50 ± 1.0	25 ± 12.5	>50	15 ± 3.7	>50	>50	>50	25 ± 9.5	>50	>50*	>50	>50	15 ± 2.6
Rc5 (=Cm1) (mod)	30 ± 2.4	15 ± 0.9	50 ± 1.0	15 ± 1.5	50 ± 2.0	20 ± 3.0	>50	>50	>50	30 ± 1.8	>50	45 ± 0.9	>50	25 ± 5.0	>50	>50	>50	>50	10 ± 0.5
Cm3 (mod)	50 ± 0.0	20 ± 3.0	>50	30 ± 5.1	>50	>50	>50	>50	>50	40 ± 4.0	>50	25 ± 6.7	>50	25 ± 7.5	>50	>50	>50	>50	10 ± 0.9
Cm4 (agy)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Cm5 (mod)	50 ± 0.0	15 ± 2.1	50 ± 1.5	30 ± 3.0	>50	45 ± 19.0	>50	45 ± 12.4	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Cm6 (=Rc3) (mod)	50 ± 0.0	20 ± 3.7	50 ± 0.5	20 ± 0.4	35 ± 5.6	20 ± 3.2	>50	45 ± 10.3	>50	15 ± 4.2	>50	50 ± 4.0	>50	25 ± 6.5	>50	>50	>50	>50	>50
Cm7 (bid)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Bu2 (=Bw10) (mod)	50 ± 0.5	25 ± 0.7	50 ± 4.5	30 ± 2.4	>50	>50	>50	>50	>50	30 ± 6.0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Bu7 (bid)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	50 ± 15.0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Bu11 (bid)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	15 ± 3.0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	10 ± 0.3
Bw6 (bid)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	40 ± 2.0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
Bw9 (=Bu1) (mod)	>50	30 ± 3.4	>50	40 ± 2.8	>50	25 ± 3.7	>50	50 ± 19.0	>50	30 ± 6.0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	10 ± 0.0
Bw12 (bid)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1 ± 0.0
ciclopirox olamine	10	5	5	2	nd	5	nd	nd	10	5	10	5	10	5	5 ^a , 10 ^b , nd ^c	2 ^a , 5 ^b , nd ^c	nd	nd	

Tableau 39. Activité antifongique des composés purs exprimée en tant que MIC et IC₅₀ en µg/ml.

Les valeurs sont les moyennes de deux expériences indépendantes réalisées en duplicats ± l'écart type. Cases gris sombre, MIC ≤ 50 µg/ml ; cases gris clair, IC₅₀ ≤ 50 µg/ml ; nd, non déterminé ; *35 ± 7,0 pour *Eu. lata*. Le type de composé est donné entre parenthèse dans la colonne de gauche, mod = monodesmosides ; bid = bidesmosides ; agy = aglycones et sqt = sesquiterpénoïdes.

— Comparaison de l'activité des extraits et des composés purs

Les micro-organismes qui étaient susceptibles, modérément susceptibles ou résistants aux extraits bruts étaient également répartis concernant les composés purs. Seulement *Fo. mediterranea* et *Xy. fastidiosa* affichaient des niveaux de susceptibilité aux composés purs supérieurs aux prédictions basées sur leur susceptibilité aux extraits bruts. En revanche, *Ri. solani* semblait plus susceptible à l'extrait brut de *R. calodendron* qu'aux composés purs qui y sont associés. Conformément aux prédictions issues de l'analyse phytochimique des extraits et de la littérature, les monodesmosides étaient systématiquement responsables de l'activité antifongique tandis que les aglycones, sesquiterpénoïdes et bidesmosides étaient inactifs (voir Tableau 39).

— Souches susceptibles aux saponines

Py. oryzae, *Ga. graminis* var. *tritici*, *Fo. mediterranea* and *Zy. tritici* comptaient parmi les plus sensibles aux saponines pures comme indiqué par les valeurs de MIC/IC₅₀ comprises entre 25/10 et 50/50 µg/ml pour ces pathogènes (voir Tableau 39). Ces résultats semblent cohérents avec la littérature, où des valeurs d'inhibition de croissance du même ordre de grandeur sont retrouvées pour *Py. oryzae* et *Ga. graminis* var. *tritici* (Turner, 1953 ; Abbruscato *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018). Ces phytopathogènes sont associés à des pertes majeures dans les grandes cultures de céréales et ce à l'échelle planétaire (Dean *et al.*, 2012). Leur sensibilité aux saponines pourrait provenir du fait que les céréales sont connues pour être déficientes en saponines (Osbourn, 2003). Cette particularité a été associée à une plus grande susceptibilité aux saponines des pathogènes spécifiques des céréales, dans la mesure où ces derniers ne rencontrent pas ces composés dans leurs hôtes naturels (Osbourn *et al.*, 1994).

— Souches modérément susceptibles aux saponines

Aucune MIC n'était satisfaite pour les organismes *Tr. atroviride*, *Ph. minimum*, *Pa. chlamydospora* et *Eu. lata* mais des IC₅₀, au plus faible à 15 µg/ml, 25 µg/ml, 25 µg/ml et 35 µg/ml, ont été obtenus (voir Tableau 39). Cette absence de MIC mais présence d'IC₅₀ semble être indicative d'une activité fongistatique. Le fait que des pathogènes lignicoles tels que *Ph. minimum*, *Pa. chlamydospora*, *Eu. lata* et *Fo. mediterranea* soient sensibles aux saponines est surprenant au premier abord. En effet, ces organismes évoluent dans des tissus ligneux de la plante, dont la teneur en saponines est généralement supérieure aux autres parties du végétal (Yu *et al.*, 2007). Au meilleur de notre connaissance, cette étude était la première à tester des saponines pures contre des pathogènes impliqués dans des maladies du bois de plantes à haute valeur économique telles que la vigne. Cela pourrait provenir du fait que les métabolites spécialisés impliqués dans la

défense de la vigne sont considérés comme étant des polyphénols et des terpènes plutôt que des saponines (Lucini *et al.*, 2018 ; Kedrina-Okutan *et al.*, 2019). Toutefois, le rôle potentiel des saponines dans les défenses de la vigne a été formulé à quelques reprises par des pairs. Ces hypothèses ont conduit à une approche similaire à la nôtre, dans laquelle des extraits de saponines ont été testés contre on *Diplodia seriata* et *Neofusicoccum parvum*, deux autres pathogènes du bois de la vigne (Pensec, 2013). D'autres produits naturels tels que la cystéine, l'acide salicylique, le resvératrol, les oligosaccharides du chitosan et la vanilline ont été testés contre *Ph. minimum* et *Pa. chlamydospora*, montrant une activité antifongique (EC₈₀₋₁₀₀) à hauteur de 15 mM, 1 mM, 876 µM, 1 mg/ml et 1 mg/ml, respectivement (Santos *et al.*, 2006; Cobos *et al.*, 2015; Roblin *et al.*, 2019). Traduit en µg/ml pour assurer la comparaison avec cette étude, ces valeurs atteignent 3600 µg/ml pour la cystéine, 138 µg/ml pour l'acide salicylique, 200 µg/ml pour le resvératrol et 1000 µg/ml pour les oligosaccharides du chitosan et la vanilline. Les saponines triterpéniques des Sapindaceae semblent donc démontrer une activité antifongique comparable à celle du resvératrol et de l'acide salicylique, comme indiqué par les valeurs d'IC₅₀ aux alentours des 50 µg/ml (voir Tableau 39). Dans le cas de notre étude, le caractère fongicide ou fongistatique de l'activité observée n'a pas pu être clairement déterminé pour *Ph. minimum*, *Pa. chlamydospora* and *Eu. lata*. Il est en revanche probable que les saponines exercent un effet fongicide sur *Fo. mediterranea*, le plus sensible des pathogènes lignicoles, comme indiqué par l'obtention de MIC < 50 µg/ml pour ce pathogène. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux caractériser l'activité antifongique des saponines triterpéniques à l'encontre des pathogènes lignicoles. Cette ligne de recherche pourrait permettre de mieux comprendre les interactions plantes microbes à l'œuvre dans les maladies du bois, complexes et souvent mal comprises.

— Souches résistantes aux saponines

Les autres champignons se sont montrés résistants à tous les composés purs dans les limites de concentrations testées. C'était le cas des *Pythium* spp., de *Fu. oxysporum*, *Bo. cinerea* et *Ri. solani*, dont la résistance aux saponines avait été décrite par des études précédentes (Barile *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2010; Porsche *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018). Celles-ci ont démontré que ces pathogènes sont rarement inhibés à des concentrations inférieures à 500 µg/ml *in vitro*, suggérant une résistance généralisée aux saponines de nombreuses plantes. Dans ce travail, il a été démontré que *Pythium* spp., *Fu. oxysporum*, *Bo. cinerea*, and *Ri. solani* étaient résistants à des saponines qui se sont révélées être antifongiques pour d'autres champignons. C'était le cas de **Rc5 (=Cm1)**, **Rc1**, **Cm3**, **Cm5**, **Cm6 (=Rc3)**, **Rc4**, **Bu2 (=Bw10)** and **Bw9 (=Bu1)**, actives contre *Py. oryzae* et

Ga. graminis var. *tritici* mais totalement inactives contre les champignons résistants mentionnés précédemment. Cela indique l'existence de stratégies actives ou passives de suppression du potentiel antifongique des saponines chez les phytopathogènes résistants (Bouarab *et al.*, 2002 ; Barile *et al.*, 2007 ; Amaral *et al.*, 2008). De ce point de vue, la résistance de l'espèce de *Trichoderma* nommée *Tr.* 034-05 est assez surprenante. En effet, les *Trichoderma* spp. sont utilisés en agriculture comme phytosanitaires biologiques et sont associés à des effets bénéfiques pour la plante hôte. Ces espèces sont généralement incapables d'envahir profondément les tissus végétaux et sont considérées comme sensibles aux défenses des plantes (Harman *et al.*, 2004). Le fait que *Tr.* 034-05 soit résistant aux saponines des Sapindaceae pourrait indiquer l'existence de mécanismes de résistance à ces métabolites spécialisés de défense, une caractéristique inattendue chez un *Trichoderma* sp..

— Cas de la bactérie *Xy. fastidiosa*

Les données recueillies sur *Xy. fastidiosa* sont surprenantes et doivent être considérées avec précaution. En effet, une grande majorité des glycosides testés démontraient des MIC supérieures à 50 µg/ml mais des IC₅₀ allant de 1 à 15 µg/ml, suggérant une activité bactériostatique à de faibles de concentrations. A l'égard des bactéries, les saponines triterpéniques ont montré des activités entre 700 et 0,78 µg/ml (Mandal *et al.*, 2005 ; Avato *et al.*, 2006 ; Lunga *et al.*, 2014 ; Saboora *et al.*, 2019 ; Dong *et al.*, 2020). Celles-ci ont majoritairement été mesurées sur des bactéries impliquées dans des pathologies humaines ou une contamination de la nourriture et rarement des bactéries phytopathogènes. Ce constat rend la comparaison avec cette étude difficile d'autant plus que peu de données sont disponibles au sujet de l'activité des produits naturels sur *Xy. fastidiosa*. Du chitosan, des huiles essentielles et des polyphénols ont été testés en tant qu'antibiotiques dans divers travaux de recherche mais aucun ne semble avoir testé des saponines contre cette bactérie auparavant (Maddox *et al.*, 2009 ; Hernández-Montelongo *et al.*, 2016 ; Santiago *et al.*, 2018). Il semble donc que d'autres études soient nécessaires afin de mieux caractériser l'activité des produits naturels et notamment des saponines triterpéniques contre *Xy. fastidiosa*.

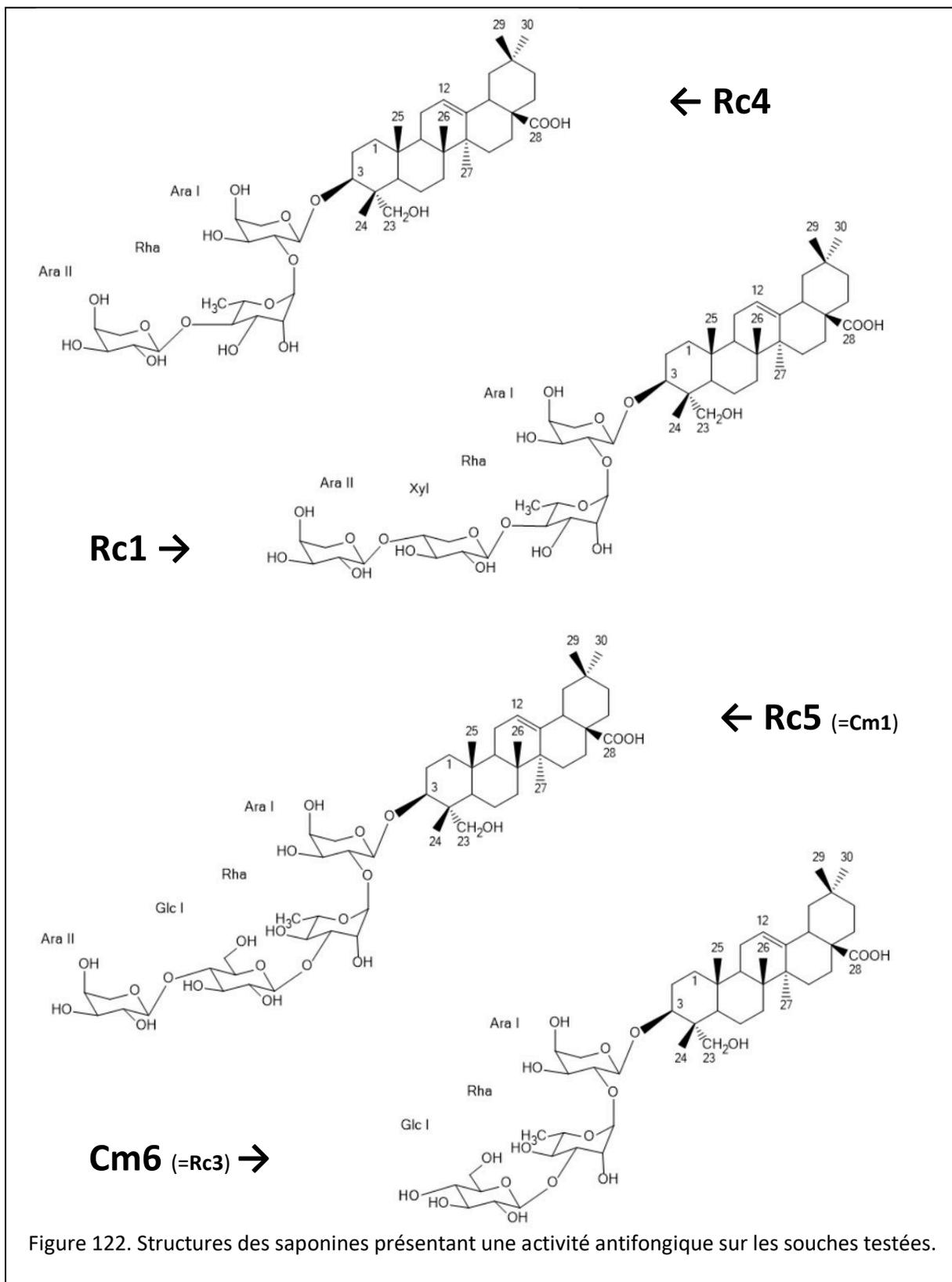
3.2.2.3 Relations structure-activité

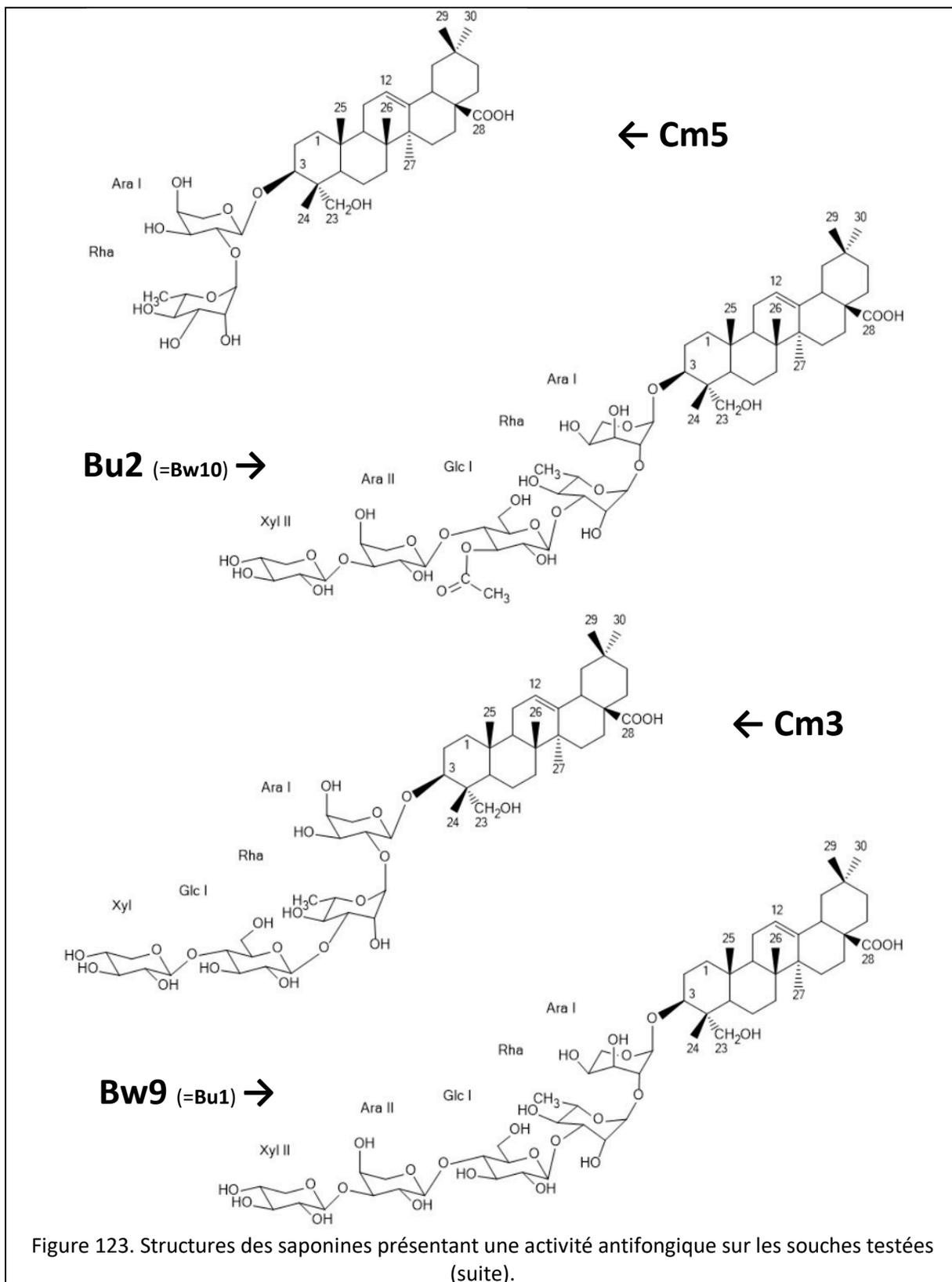
— Classement des composés actifs et RSA

Les RSA ont été déterminées par comparaison des MIC et des IC₅₀ obtenus sur les organismes les plus susceptibles aux saponines. Comme mentionné précédemment, les phytopathogènes étaient uniquement sensibles aux monodesmosides triterpéniques **Rc5** (=Cm1),

Rc1, Cm3, Cm5, Cm6 (=Rc3), Rc4, Bu2 (=Bw10) and Bw9 (=Bu1) (voir Tableau 39). Ces composés étaient tous basés sur le même motif structural, constitué d'hédéragénine comme aglycone et d'une unique chaîne de sucres en C-3 (voir Figure 122 et Figure 123). Comme l'hédéragénine seule n'a pas montré d'activité antifongique, il peut être déduit que la chaîne oligosaccharidique en C-3 est nécessaire pour l'activité. S'ajoute à cela l'effet de la fonction acide carboxylique en C-28, dont le rôle dans l'activité est important. Lorsque celle-ci est engagée dans une liaison ester avec un sucre ou une chaîne de sucres, l'activité de la molécule est nulle, y compris quand cette dernière présente une chaîne en C-3. Cette hypothèse est illustrée par les bidesmosides présentant une chaîne de sucre en C-3 et C-28 ainsi qu'une absence d'activité antifongique. Partant de ce constat, il est possible d'imaginer au moins deux mécanismes par lesquels un champignon pathogène pourrait supprimer l'activité d'une saponine : (i) hydrolyse de la chaîne en C-3 ou (ii) neutralisation de l'acide carboxylique en C-28 par établissement d'une liaison ester quelconque. Ces deux mécanismes ont été proposés dans la littérature avec une prépondérance d'études concernant le premier procédé (i) (Bouarab *et al.*, 2002 ; Amaral *et al.*, 2008).

Les monodesmosides ont été classés du plus actif au moins actif selon l'ordre suivant : **Rc4 > Rc1 > Rc5 (=Cm1) > Cm6 (=Rc3) > Cm5 > Bu2 (=Bw10) > Cm3 > Bw9 (=Bu1)** (voir Tableau 39). Ces différences d'activité ne peuvent être expliquées que par la nature de la chaîne en C-3, seule fonction présentant des variations structurales entre les composés précédents (voir Figure 122 et Figure 123). Les oligosaccharides des saponines peuvent varier de nombreuses manières telles que la nature des résidus de sucres, le type de liaison entre les résidus et le nombre de résidus (c.-à-d. la taille de la chaîne). Comme le type de liaison est extrêmement conservé dans les composés testés dans ce travail, seulement l'effet de la nature des sucres ainsi que la longueur de la chaîne sera discuté.





— RSA : taille de la chaîne de sucres

Premièrement, il n'existe pas de corrélation directe entre la taille de la chaîne de sucre et l'activité antifongique des saponines. En effet **Rc4** et **Cm6** (=Rc3) présentaient un oligosaccharide à trois résidus tandis que **Rc1**, **Rc5** (=Cm1) et **Cm3** étaient composés de quatre résidus, **Bu2** (=Bw10) et **Bw9** (=Bu1) cinq résidus, et **Cm5** deux résidus (voir Figure 122 et Figure 123). Les saponines exhibant de grandes chaînes de sucres sont rarement considérées en tests d'activité biologique. Cela conduit à une surreprésentation des saponines composés de trois résidus ou moins dans ce genre d'études (Njateng *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2018 ; Hu *et al.*, 2018). Nos résultats montrent que les glycosides triterpéniques composés de quatre à cinq résidus peuvent également présenter un intérêt en test d'activité biologique, notamment les essais d'activité antimicrobienne.

— RSA : effet des résidus Ara terminaux

Deuxièmement, la nature des résidus constitutifs des oligosaccharides semble jouer un rôle important dans l'activité antifongique, notamment les résidus Ara. Cette hypothèse est bien illustrée par le fait que les trois composés les plus actifs de cette étude, c.-à-d. **Rc4**, **Rc1** et **Rc5** (=Cm1), présentent un Ara terminal en C-3. D'autres éléments appuyant cette hypothèse peuvent être formulés en comparant **Rc4** et **Cm6** (=Rc3). Ces derniers ne diffèrent que par leurs résidus terminaux, un Ara pour **Rc4** et un Glc pour **Cm6** (=Rc3), ce qui a un effet majeur sur leurs activités tel que **Rc4** et deux fois plus puissant que **Cm6** (=Rc3) contre *Py. oryzae*. Le même constat est établi par comparaison de **Rc5** (=Cm1) et **Cm3**. En effet, lorsque le Xyl terminal de **Cm3** est remplacé par un Ara, donnant ainsi **Rc5** (=Cm1), l'activité antifongique est améliorée (voir Figure 122, Figure 123 et Tableau 39).

— RSA : effet de l'avant dernier résidu

En plus de l'effet du résidu terminal, il semble que l'avant dernier résidu (terminal -1) pourrait jouer un rôle. Cela est illustré par les RSA entre **Rc1** et **Rc5** (=Cm1), qui ne diffèrent que par leur avant dernier résidu composé d'un Xyl pour **Rc1** et d'un Glc pour **Rc5** (=Cm1). Malgré cette petite différence structurale, **Rc1** est plus actif que **Rc5** (=Cm1) (voir Figure 122, Figure 123 et Tableau 39). Cela indique que les RSA des saponines ne peuvent être liées à un unique résidu de sucre mais plutôt à un motif composé de deux sucres ou plus. Ceci complexifie significativement l'établissement de RSA claires pour les saponines dans la mesure où les sucres sont extrêmement variables dans leur nature et leur conformation en plus d'être liés entre eux à de nombreuses positions.

3.2.3 Conclusion

Cette étude est une des quelques recherches évaluant l'activité antibiotique des saponines triterpéniques contre une sélection de micro-organismes phytopathogènes (Saha *et al.*, 2010 ; Abbruscato *et al.*, 2014 ; Porsche *et al.*, 2018 ; Kim *et al.*, 2018). Elle pourrait aider à mieux décrire l'activité biologique des glycosides des Sapindaceae dont certains n'étaient pas décrits jusqu'à présent. C'est le cas du composé **Rc1** par exemple, qui démontre une bonne activité antifongique contre *Py. oryzae*, *Ga. graminis* var. *tritici* et *Fo. mediterranea* comme indiqué par les valeurs de MIC/IC₅₀ équivalentes à 25/15, 30/15 and 25/20 µg/ml, respectivement (voir Tableau 39). Cela confirme que des molécules naturelles prometteuses peuvent être identifiées sur la base d'explorations phytochimiques de plantes peu étudiées (Kim *et al.*, 2018). De plus, cette étude supporte la position des Sapindaceae pour la recherche sur les antifongiques naturels d'origine végétale, une thématique déjà mise en avant par des screening passés contre des champignons dermatophytes (Ekabo *et al.*, 1996 ; Lunga *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2018).

Outre un intérêt certain en protection chimique des cultures, les tests *in vitro* étudiant l'effet des saponines sur les phytopathogènes pourraient fournir des informations importantes quant aux maladies des plantes (Osborn, 1996). Les résultats précédents suggèrent un lien corrélatif entre l'écologie des phytopathogènes et leur susceptibilité aux saponines. En effet, les pathogènes généralistes capables d'infecter des centaines de plantes différentes tels que les *Pythium* ou *Fusarium* spp. étaient largement résistants aux saponines des Sapindaceae. Au contraire, les pathogènes dont le spectre d'hôtes est plus restrictif et spécialisé comme *Py. oryzae* et *Ga. graminis* var. *tritici* étaient plus souvent susceptibles. Cela pourrait indiquer que la capacité d'un phytopathogène donné à gérer les saponines semble être un facteur déterminant qui affecte son spectre d'hôte et donc sa niche écologique. Le fait que certains pathogènes lignicoles tels que *Fo. mediterranea* et *Xy. fastidiosa* soient sensibles aux saponines constitue un élément surprenant. En effet, les pathogènes du bois évoluent dans des tissus ligneux, connus pour être riches en saponines. Des études complémentaires, s'intéressant aux mécanismes par lesquels ces micro-organismes maintiennent leur pathogénicité et détournent les défenses des plantes dans un environnement riche en saponines, alors qu'ils semblent sensibles à ces mêmes composés *in vitro*, pourraient permettre de mieux comprendre les maladies qu'ils causent.

Conclusion générale et perspectives

Les Sapindaceae sont connus pour leur richesse en saponines. Au cours de ce travail, nous avons exploré la composition phytochimique de quatre espèces d'arbres originaires d'Afrique équatoriale : *Blighia unijugata*, *Blighia welwitschii*, *Chytranthus macrobotrys* et *Radlkofera calodendron*. Ces taxons étaient jusqu'à présent peu étudiés, ce qui a aussi participé à motiver cette étude.

Cette approche a permis l'isolement de 30 glycosides naturels dont 19 de structures nouvelles. A titre de comparaison, l'étude bibliographique des Sapindaceae et de leurs saponines révélait la description de 160 saponines dont 120 de structures nouvelles entre 1991 et 2020. L'étude phytochimique relatée dans cette thèse a donc apporté une contribution significative à la description phytochimique de la famille.

Sur les glycosides isolés, 97 % sont des saponines triterpéniques basée sur l'hédéragénine comme aglycone. De plus, 93 % présentent le motif structural Rha²-Ara³-Hédéragénine, connu comme marqueur chimiotaxonomique de la sous-famille des Sapindoideae, dont font partie les quatre espèces étudiées. Les résultats obtenus sont donc cohérents avec les études chimiotaxonomiques précédentes. Toujours sur cette thématique, la découverte du motif structural Ara⁴-Glc³-Rha²-Ara³-Hédéragénine chez les quatre espèces étudiées pourrait appuyer leur proximité taxonomique. En effet, ce motif n'a été retrouvé que chez une autre *Blighia* sp. dans la littérature et semble donc être retraits à tout petit nombre de Sapindaceae potentiellement apparentées. Cette hypothèse doit toutefois être confirmée par des approches cladistiques classiques.

Dans l'ensemble, ce travail confirme la richesse des Sapindaceae en glycosides et plus particulièrement en saponines triterpéniques. Rappelons que seulement 22 espèces sur les 2000 que compte la famille (1 %) ont été étudiées entre 1991 et 2020. Sur la même période, la couverture des genres est plus satisfaisante car 16 genres sur environ 140 (11 %) ont été étudiés. Il est ainsi fort probable que cette famille renferme un gisement de saponines non encore décrites.

Les tests d'activité immunologique réalisés avec les partenaires italiens ont conduit à des résultats mitigés. Le postulat de base selon lequel les résidus Glc terminaux seraient préférentiellement reconnus par les sérums de patients SEP s'est révélé en grande partie erroné. En effet les saponines de *Blighia welwitschii* testées à cet égard n'ont pas répondu favorablement dans le modèle ELISA optimisé. Cela serait dû à la trop grande taille de leurs chaînes de sucres, empêchant la reconnaissance d'anticorps malgré la présence de Glc terminaux. La petite saponine de *Olax obtusifolia* (Olacaceae) a offert de meilleurs résultats bien que ces derniers soient en deçà de ceux obtenus avec les peptides synthétiques. S'ajoute à cela des difficultés techniques importantes, notamment en ce qui concerne l'optimisation du système ELISA. Les peptides et les glycosides naturels semblent d'une nature chimique trop différente pour être testés dans des conditions communes. Devant ces difficultés techniques, il serait intéressant d'avoir recours à des simulations *in silico*. Les conformations spatiales des glycosides naturels pourraient être calculées et comparées à celles des peptides et autres sondes antigéniques utilisées comme contrôles positifs. Leurs similitudes ou leurs disparités structurales pourraient ainsi être mise en évidence avec plus de justesse. Cette approche pourrait offrir de nouveaux éléments de réponse quant à la pertinence d'utiliser les glycosides naturels des plantes comme sondes antigéniques pour la reconnaissance d'anticorps dans la sclérose en plaque.

Les tests d'activité antimicrobienne réalisés en Allemagne constituaient une approche moins explorative que le sujet précédent, du fait que les propriétés antimicrobiennes des saponines soient bien connues de la littérature. L'originalité de cette démarche réside plutôt dans la sélection des micro-organismes choisis pour les tests *in vitro*. Nombreux étaient ceux qui n'avaient jamais été testés pour leur susceptibilité aux saponines. C'est par exemple le cas des champignons lignicoles *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeoconiella chlamydospora* et *Eutypa lata* impliqués dans des maladies destructrices des vignobles partout où la vigne est cultivée. Les saponines pures des Sapindaceae ont fait preuve d'une activité antifongique modérée sur ces souches, caractérisée par des $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ et parfois des $MIC < 50 \mu\text{g/ml}$. Malgré le fait

que les structures ligneuses des végétaux soient plus enclines à contenir des saponines, aucune structure complète de saponine n'a été identifiée à ce jour à partir de la vigne (*Vitis vinifera*). Ceci pourrait expliquer pourquoi les pathogènes du bois de la vigne seraient relativement susceptibles aux saponines. Ces composés pourraient ainsi constituer un moyen de contrôle naturel des maladies du bois de la vigne à condition de résoudre les problèmes d'administration. Ces derniers posent généralement problème car les tissus ligneux sont difficilement accessibles et donc difficiles à traiter par des moyens chimiques.

Sur d'autres champignons, notamment les pathogènes des céréales *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Zymoseptoria tritici*, des valeurs d'inhibition de croissance satisfaisantes de l'ordre de MIC égales à 25 µg/ml furent enregistrées. Bien qu'en moyenne 5 à 10 fois moins efficace que la ciclopirox olamine utilisée en contrôle positif, les saponines pourraient constituer des fongicides naturels prometteurs. Des tests *in vivo* sur plante ou au champ pourraient permettre de tester cette hypothèse. Le cas échéant, leur structure pourrait servir de leads pour les nouvelles générations d'antifongiques. En effet, les saponines triterpéniques sont structurellement éloignées de toutes les classes d'antifongiques connus à ce jour. Ce constat les rend d'autant plus intéressantes dans la gestion des résistances aux agents antimicrobiens, problématique qui pèse lourdement en santé humaine comme en agriculture. De plus, les perspectives d'optimisation de ces composés par la synthèse ou l'hémisynthèse sont énormes. Ceux-ci ont rarement fait l'objet d'approches organiciennes du fait de leur taille et de leur complexité structurale.

L'étude des RSA a permis de confirmer des hypothèses précédentes et d'en proposer de nouvelles. L'importance de la chaîne de sucre en C-3 et de la fonction acide carboxylique en C-28 pour l'activité antifongique a été confirmée. Le rôle déterminant des deux sucres terminaux semble avoir été mis en avant pour la première fois. En ce sens, la présence d'un Ara terminal semble être positivement associé à l'activité antifongique des saponines triterpéniques. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des études complémentaires.

Pour conclure, les Sapindaceae et leurs saponines semblent prometteurs dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes et en particulier les champignons. Ce constat fait écho au fait qu'aucun agent antimicrobien d'origine végétale n'a encore fait l'objet d'une étude clinique avancée, quand bien même les pathogènes des plantes sont très souvent des micro-organismes

(Cragg *et al.*, 2014). Dans la mesure où cette piste ne semble pas avoir été suffisamment explorée, il est possible que toute tentative en ce sens puisse s'avérer fructueuse.

Références bibliographiques et webographiques

Abbruscato, P., Tosi, S., Crispino, L., Biazzi, E., Menin, B., Picco, A.M., Pecetti, L., Avato, P., Tava, A., 2014. Triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* as antifungal agents against *Pyricularia oryzae*. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11030–11036.

Adamo, R., Hu, Q.-Y., Torosantucci, A., Crotti, S., Brogioni, G., Allan, M., Chiani, P., Bromuro, C., Quinn, D., Tontini, M., Berti, F., 2014. Deciphering the structure–immunogenicity relationship of anti-*Candida* glycoconjugate vaccines. *Chem. Sci.* 5, 4302–4311.

Adesegun, S.A., Coker, H.A.B., Hamann, M.T., 2008. Antifungal triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Res. J. Phytochem.* 2, 93–99.

Adeyemi, T.O., Ogundipe, O.T., 2012. Biodiversity of Sapindaceae in West Africa: a checklist. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 4, 326–331.

Adeyemi, T.O., Ogundipe, O.T., Olowokudejo, J.D., 2012. Distribution and DNA conservation of Sapindaceae Juss. in Western Africa. *Int. J. Botany* 8, 31–37.

Alexander, J.S., Zivadinov, R., Maghzi, A.-H., Ganta, V.C., Harris, M.K., Minagar, A., 2011. Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: mechanisms. *Pathophysiology* 18, 3–12.

Amaral, L.S., Murgu, M., Rodrigues-Fo, E., de Souza, A.Q.L., de Moura Sarquis, M.I., 2008. A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1341–1348.

Arrambide, G., Espejo, C., Yarden, J., Fire, E., Spector, L., Dotan, N., Dukler, A., Rovira, A., Montalban, X., Tintore, M., 2013. Serum biomarker gMS-Classifer2: predicting conversion to clinically definite multiple sclerosis. *PLoS One* 8, e59953.

Asamoah, A., Antwi-Bosiako, C., Frimpong-Mensah, K., Atta-Boateng, A., Montes, C.S., Louppe, D., 2010. *Blighia sapida* K.D.Koenig [WWW Document]. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale).

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015.

Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582–1614.

Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z., Jurzysta, M., 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. *Phyther. Res.* 20, 454–7.

Avery, S.V., Singleton, I., Magan, N., Goldman, G.H., 2019. The fungal threat to global food security. *Fungal Biol.* 123, 555–557.

Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Sajjadi, S.E., Scala, F., Lanzotti, V., 2007. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry* 68, 596–603.

Beesley, T., 2010. Evolution of chromatography: one scientist's 51-year journey [WWW Document]. *Chromatography Online*.

Beutler, J.A., 2009. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 46, 9.11.1-9.11.21.

Biang, A.E.M., Kamto, E.L.D., Simo, L.M., Antheaume, C., Lavedan, P., Vedrenne, M., Noté, O.P., Pegnyemb, D.E., Mbing, J.N., Haddad, M., 2020. Triterpenoid saponins from the stem barks of *Chytranthus klaineanus* Radlk. ex Engl. *Phytochem. Lett.* 37, 37–41.

Blehert, D.S., Hicks, A.C., Behr, M., Meteyer, C.U., Berlowski-Zier, B.M., Buckles, E.L., Coleman, J.T.H., Darling, S.R., Gargas, A., Niver, R., Okoniewski, J.C., Rudd, R.J., Stone, W.B., 2009. Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science* 323, 227.

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O., Denning, D.W., 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J. Fungi* 3, 57.

Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., Osbourn, A., 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418, 889–892.

Bouquet, A., 1966. *Inventaire des plantes médicinales et toxiques du Congo-Brazzaville*. ORSTOM, Paris.

Braganza, C.D., Santoso, K.T., Dangerfield, E.M., Flamme, A.C.L., Timmer, M.S.M., Stocker, B.L., 2018. Evaluation of anti α -D-Glcp-(1→4)- α -D-Glcp (GAGA4) IgM antibodies as a biomarker for multiple sclerosis. *RSC Adv.* 8, 28086–28093.

Brettschneider, J., Jaskowski, T.D., Tumani, H., Abdul, S., Husebye, D., Seraj, H., Hill, H.R., Fire, E., Spector, L., Yarden, J., Dotan, N., Rose, J.W., 2009. Serum anti-GAGA4 IgM

antibodies differentiate relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis from primary progressive multiple sclerosis and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 217, 95–101.

Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* (4e ed.). Tec&Doc. (Ed.). Lavoisier, Paris.

Bruno, A., Scrima, M., Novellino, E., D’Errico, G., D’Ursi, A.M., Limongelli, V., 2015. The glycan role in the glycopeptide immunogenicity revealed by atomistic simulations and spectroscopic experiments on the multiple sclerosis biomarker CSF114(Glc). *Sci. Rep.* 5, 9200.

Buerki, S., Forest, F., Acevedo-Rodríguez, P., Callmander, M.W., Nylander, J.A.A., Harrington, M., Sanmartín, I., Kúpfer, P., Alvarez, N., 2009. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 238–258.

Carotenuto, A., D’Ursi, A.M., Nardi, E., Papini, A.M., Rovero, P., 2001. Conformational analysis of a glycosylated human myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide epitope able to detect antibody response in multiple sclerosis. *J. Med. Chem.* 44, 2378–2381.

Carotenuto, A., D’Ursi, A.M., Mulinacci, B., Paolini, I., Lolli, F., Papini, A.M., Novellino, E., Rovero, P., 2006. Conformation-activity relationship of designed glycopeptides as synthetic probes for the detection of autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis. *J. Med. Chem.* 49, 5072–5079.

Champy-Tixier, A.-S., 2018. Extraction, purification, and structural analysis of glycosylated natural products, mimetics of native antigens involved in an immune response (These de doctorat). Université de Bourgogne Franche-Comté, UFR des Sciences de Santé. Dijon.

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.

Clements, C.S., Reid, H.H., Beddoe, T., Tynan, F.E., Perugini, M.A., Johns, T.G., Bernard, C.C.A., Rossjohn, J., 2003. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *PNAS* 100, 11059–11064.

Cobos, R., Mateos, R.M., Álvarez-Pérez, J.M., Olego, M.A., Sevillano, S., González-García, S., Garzón-Jimeno, E., Coque, J.J.R., 2015. Effectiveness of natural antifungal compounds

in controlling infection by grapevine trunk disease pathogens through pruning wounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6474–6483.

Cogne, A.-L., 2002. Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae) (These de doctorat). Université de Lausanne, Faculté des Sciences. Lausanne.

Coleman, J.J., Okoli, I., Tegos, G.P., Holson, E.B., Wagner, F.F., Hamblin, M.R., Mylonakis, E., 2010. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem. Biol.* 5, 321–332.

Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2014. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* 77, 703–723.

D’Addabbo, T., Laquale, S., Lovelli, S., Candido, V., Avato, P., 2014. Biocide plants as a sustainable tool for the control of pests and pathogens in vegetable cropping systems. *It. J. Agron.* 9, 137–145.

Dean, R., Kan, J. a. L.V., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A.D., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.

Delaude, C., 1974. Chemical study of the saponins of Sapindaceae. Identification of the saponin of *Radlkofera calodendra*. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* 43, 693–696.

Delaude, C., 1993. Les Sapindaceae et leurs saponines. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* 62, 93–120.

Delaude, C., Breyne, H., Welter, A., 1976. Contribution to the study of the saponins in the Sapindaceae: saponoside of *Chytranthus macrobotrys* and *Lecaniodiscus cupanoides*. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* 45, 458–461.

Delaude, C., Welter, A., 1975. Contribution to the chemical study of Sapindaceae saponins. Identification of the saponin of *Blighia unijugata* Bak.. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* 44, 683–686.

DeMarshall, C., Goldwaser, E.L., Sarkar, A., Godsey, G.A., Acharya, N.K., Thayasivam, U., Belinka, B.A., Nagele, R.G., 2017. Autoantibodies as diagnostic biomarkers for the detection and subtyping of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 309, 51–57.

Dong, S., Yang, X., Zhao, L., Zhang, F., Hou, Z., Xue, P., 2020. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Ind. Crop. Prod.* 149, 112350.

Efferth, T., Zacchino, S., Georgiev, M., Liu, L., Wagner, H., Panossian, A., 2015. Nobel Prize for artemisinin brings phytotherapy into the spotlight. *Phytomedicine* 22, A1-A3.

Ekabo, O.A., Farnsworth, N.R., Henderson, T.O., Mao, G., Mukherjee, R., 1996. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *J. Nat. Prod.* 59, 431–435.

Emanuel, M.A., 2017. *Ackee Blighia sapida* Koenig, in: *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Yahia, E.M. (Ed.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 857–868.

Escalante, A.M., Santecchia, C.B., López, S.N., Gattuso, M.A., Gutiérrez Ravelo, A., Delle Monache, F., Gonzalez Sierra, M., Zacchino, S.A., 2002. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk. *J. Ethnopharmacol.* 82, 29–34.

Faleye, F.J., Ajayi, C.B., Akinwumi, O.A., Popoola, O.K., 2019. Evaluation of methanolic extract of *Chytranthus macrobotrys* seed (CMS) for antimicrobial, α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 10, 678–85.

Fernández-Tejada, A., Chea, E.K., George, C., Pillarsetty, N., Gardner, J.R., Livingston, P.O., Ragupathi, G., Lewis, J.S., Tan, D.S., Gin, D.Y., 2014. Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21. *Nat. Chem.* 6, 635–643.

Fernández-Tejada, A., Tan, D.S., Gin, D.Y., 2016. Development of improved vaccine adjuvants based on the saponin natural product QS-21 through chemical synthesis. *Acc. Chem. Res.* 49, 1741–1756.

Fernández-Tejada, A., 2017. Design, synthesis and evaluation of optimized saponin variants derived from the vaccine adjuvant QS-21. *Pure Appl. Chem.* 89, 1359–1378.

Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.

Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., Gurr, S.J., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360, 739–742.

Freedman, M., Laks, J., Dotan, N., Altstock, R., Dukler, A., Sindic, C., 2009. Anti- α -glucose-based glycan IgM antibodies predict relapse activity in multiple sclerosis after the first neurological event. *Mult. Scler.* 15, 422–430.

Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D.A., Després, V.R., Pöschl, U., 2009. High diversity of fungi in air particulate matter. *PNAS* 106, 12814–12819.

Gale, E.M., Atanasova, I.P., Blasi, F., Ay, I., Caravan, P., 2015. A manganese alternative to gadolinium for MRI contrast. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15548–15557.

Gao, S., Basu, S., Yang, Z., Deb, A., Hu, M., 2012. Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents. *Curr. Drug Targets* 13, 1885–1899.

Garg, H., Mitra, C., 1967. *Blighia sapida* constituents of the fresh fruit. *Planta Med.* 15, 74–80.

Garg, N., Smith, T.W., 2015. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 5, e00362.

Gillet, J.-F., Doucet, J.-L., 2012. A commented checklist of woody plants in the Northern Republic of Congo. *Plant Ecol. Evol.* 145, 258–271.

Gojavey, A.S., Bankeu, J.J.K., Awantu, A.F., Nkanwen, E.R.S., Ali, M.S., Lenta, B.N., Guliyev, A.A., Nougoué, D.T., Ngouela, S.A., Tsamo, E., 2013. Xanthine oxidase inhibitory activity of compounds from *Chytrantus claneianus*. *Bangladesh J. Pharmacol.* 8, 78–83.

Gow, N.A.R., Netea, M.G., 2016. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. *Philos. T. R. Soc. B.* 371, 20150462.

Günther, H., 2013. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3e édition. John Wiley & Sons, Weinheim.

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.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.

Harrington, M.G., Edwards, K.J., Johnson, S.A., Chase, M.W., Gadek, P.A., 2005. Phylogenetic inference in Sapindaceae *sensu lato* using plastid matK and rbcL DNA sequences. *Syst. Bot.* 30, 366–382.

Hassall, C.H., Reyle, K., 1954. Hypoglycin A,B: biologically active polypeptides from *Blighia sapida*. *Nature* 173, 356–357.

Hernández-Montelongo, J., Nascimento, V.F., Murillo, D., Taketa, T.B., Sahoo, P., de Souza, A.A., Beppu, M.M., Cotta, M.A., 2016. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: an antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. *Carbohydr. Polym.* 136, 1–11.

Hostettmann, K., Marston, A., 1995. *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, Cambridge.

Hristozov P., D., 2007. *Machine learning techniques applied to chemotaxonomy and ligand-based virtual screening (These de doctorat)*. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen.

Hu, Q., Chen, Y.-Y., Jiao, Q.-Y., Khan, A., Li, F., Han, D.-F., Cao, G.-D., Lou, H.-X., 2018. Triterpenoid saponins from the pulp of *Sapindus mukorossi* and their antifungal activities. *Phytochemistry* 147, 1–8.

Huang, H.-C., Liao, S.-C., Chang, F.-R., Kuo, Y.-H., Wu, Y.-C., 2003. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4916–4919.

Huflejt, M.E., Vuskovic, M., Vasiliu, D., Xu, H., Obukhova, P., Shilova, N., Tuzikov, A., Galanina, O., Arun, B., Lu, K., Bovin, N., 2009. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol. Immunol.* 46, 3037–3049.

Jæger, D., Ndi, C.P., Crocoll, C., Simpson, B.S., Khakimov, B., Guzman-Genuino, R.M., Hayball, J.D., Xing, X., Bulone, V., Weinstein, P., Møller, B.L., Semple, S.J., 2017. Isolation and structural characterization of echinocystic acid triterpenoid saponins from the Australian medicinal and food plant *Acacia ligulata*. *J. Nat. Prod.* 80, 2692–2698.

Jiang, X., Cao, Y., Jørgensen, L. von G., Strobel, B.W., Hansen, H.C.B., Cedergreen, N., 2018. Where does the toxicity come from in saponin extract? *Chemosphere* 204, 243–250.

Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K., 2001. Acetylated triterpene saponins from the Thai medicinal plant, *Sapindus emarginatus*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1195–1197.

Karussis, D., 2014. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J. Autoimmun.* 48–49, 134–142.

Kedrina-Okutan, O., Novello, V., Hoffmann, T., Hadersdorfer, J., Schneider, A., Schwab, W., Ferrandino, A., 2019. Polyphenolic diversity in *Vitis* sp. leaves. *Sci. Hortic.* 256, 108569.

Kettles, G.J., Luna, E., 2019. Food security in 2044: how do we control the fungal threat? *Fungal Biol.* 123, 558–564.

Kim, B., Han, J.W., Thi Ngo, M., Le Dang, Q., Kim, J.-C., Kim, H., Choi, G.J., 2018. Identification of novel compounds, oleanane- and ursane-type triterpene glycosides, from *Trevesia palmata*: their biocontrol activity against phytopathogenic fungi. *Sci. Rep.* 8, 14522.

Klaassen, R., 1999. Wood anatomy of the Sapindaceae. *IAWA journal / International Association of Wood Anatomists*, supplement 2.

Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206–220.

Lacaille-Dubois, M.-A., 2019. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: a review. *Phytomedicine* 60, 152905.

Lavaud, C., Crublet, M.-L., Pouny, I., Litaudon, M., Sévenet, T., 2001. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elattostachys apetala*. *Phytochemistry* 57, 469–478.

Lavaud, C., Sayagh, C., Humbert, F., Pouny, I., Delaude, C., 2015. Triterpenoid saponins from root bark of *Zanha golungensis* (Sapindaceae). *Carbohydr. Res.* 402, 225–231.

Letouzey, R., 1966. Recherches sur la nomenclature botanique des Pygmées. *JATBA* 13, 479–543.

Li, Y., Li, H., Martin, R., Mariuzza, R.A., 2000. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. *Journal of Molecular Biology* 304, 177–188.

Li, J.W.-H., Vederas, J.C., 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161–165.

Liu, J., Henkel, T., 2002. Traditional chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* 9, 1483–1485.

Liu, Z., Li, Z., Zhong, H., Zeng, G., Liang, Y., Chen, M., Wu, Z., Zhou, Y., Yu, M., Shao, B., 2017. Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: a review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 6030–6038.

Lolli, F., Mazzanti, B., Pazzagli, M., Peroni, E., Alcaro, M.C., Sabatino, G., Lanzillo, R., Brescia Morra, V., Santoro, L., Gasperini, C., Galgani, S., D’Elios, M.M., Zipoli, V., Sotgiu, S., Pugliatti, M., Rovero, P., Chelli, M., Papini, A.M., 2005a. The glycopeptide CSF114(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 167, 131–137.

Lolli, F., Mulinacci, B., Carotenuto, A., Bonetti, B., Sabatino, G., Mazzanti, B., D’Ursi, A.M., Novellino, E., Pazzagli, M., Lovato, L., Alcaro, M.C., Peroni, E., Pozo-Carrero, M.C., Nuti,

F., Battistini, L., Borsellino, G., Chelli, M., Rovero, P., Papini, A.M., 2005b. An N-glucosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis. *PNAS* 102, 10273–10278.

Lucini, L., Baccolo, G., Roupael, Y., Colla, G., Bavaresco, L., Trevisan, M., 2018. Chitosan treatment elicited defence mechanisms, pentacyclic triterpenoids and stilbene accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. *Phytochemistry* 156, 1–8.

Lunga, P.K., Qin, X.-J., Yang, X.W., Kuate, J.-R., Du, Z.Z., Gatsing, D., 2014. Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. *BMC Complem. Altern. M.* 14, 369.

Maddox, C.E., Laur, L.M., Tian, L., 2009. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 60, 53–58.

Mair, C.E., Grienke, U., Wilhelm, A., Urban, E., Zehl, M., Schmidtke, M., Rollinger, J.M., 2018. Anti-influenza triterpene saponins from the bark of *Burkea africana*. *J. Nat. Prod.* 81, 515–523.

Majors, R.E., 2015. Historical developments in HPLC and UHPLC column technology: the past 25 years [WWW Document]. *Chromatography Online*.

Manase, M.J., 2013. Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae (These de doctorat). Université de Bourgogne, Faculté de Pharmacie. Dijon.

Mandal, P., Sinha Babu, S.P., Mandal, N.C., 2005. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia* 76, 462–465.

Mani Chandrika, K.V.S., Sharma, S., 2020. Promising antifungal agents: a minireview. *Bioorg. Med. Chem.* 28, 115398.

Marciani, D.J., 2018. Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 573–585.

Marta, C.B., Oliver, A.R., Sweet, R.A., Pfeiffer, S.E., Ruddle, N.H., 2005. Pathogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies recognize glycosylated epitopes and perturb oligodendrocyte physiology. *PNAS* 102, 13992–13997.

Mazzola, E.P., Parkinson, A., Kennelly, E.J., Coxon, B., Einbond, L.S., Freedberg, D.I., 2011. Utility of coupled-HSQC experiments in the intact structural elucidation of three complex saponins from *Blighia sapida*. *Carbohydr. Res.* 346, 759–768.

Menge, T., Lalive, P.H., von Büdingen, H.-C., Cree, B., Hauser, S.L., Genain, C.P., 2005. Antibody responses against galactocerebroside are potential stage-specific biomarkers in multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 453–459.

Montes, E.G., Mitaine-Offer, A.-C., Amaro-Luis, J.M., Paululat, T., Delaude, C., Pouységu, L., Quideau, S., Rojas, L.B., Delemeasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2014. Acylated oleanane-type saponins from *Ganophyllum giganteum*. *Phytochemistry* 98, 236–242.

Moses, T., Papadopoulou, K.K., Osbourn, A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 49, 439–462.

Mostafa, A., Sudisha, J., El-Sayed, M., Ito, S., Ikeda, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., 2013. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochem. Lett.* 6, 274–280.

Mostafa, A.E., El-Hela, A.A., Mohammad, A.-E.I., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2016. New triterpenoidal saponins from *Koelreuteria paniculata*. *Phytochem. Lett.* 17, 213–218.

Muller, J., Leenhouts, P.W., 1976. A general survey of pollen types in Sapindaceae in relation to taxonomy, in: *The Evolutionary Significance of the Exine*. Ferguson, I.K. and Muller, J. (Eds.). Academic Press, London, pp. 407–445.

Murgu, M., Rodrigues-Filho, E., 2006. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 1281–1290.

Nguenang, G.M., Fongnzossie Fedoung, E., Nkongmeneck, B.A., 2010. Importance des forêts secondaires pour la collecte des plantes utiles chez les Badjoué de l'Est Cameroun. *Tropicultura* 28, 238–245.

Nguyen, D.H., Mitaine-Offer, A.-C., Maroso, S., Papini, A.-M., Paululat, T., Bellaye, P.-S., Collin, B., Chambin, O., Lacaille-Dubois, M.-A., 2019. Cytotoxic glycosides from the roots of *Weigela* x “Bristol Ruby.” *Fitoterapia* 137, 104242.

Njateng, G.S.S., Du, Z., Gatsing, D., Nanfack Donfack, A.R., Feussi Talla, M., Kamdem Wabo, H., Tane, P., Mouokeu, R.S., Luo, X., Kuate, J.-R., 2015. Antifungal properties of a new terpenoid saponin and other compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). *BMC Complement Altern. Med.* 15 :25.

Nuti, F., Peroni, E., Real-Fernández, F., Bonache, M.A., Chevalier-Isaad, A.L., Chelli, M., Lubin-Germain, N., Uziel, J., Rovero, P., Lolli, F., Papini, A.M., 2010. Posttranslationally modified peptides efficiently mimicking neoantigens: a challenge for theragnostics of autoimmune diseases. *Biopolymers* 94, 791–799.

Obeng, E.A., 2010a. *Blighia unijugata* Baker. [WWW Document]. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale).

Obeng, E.A., 2010b. *Blighia welwitschii* (Hiern) Radlk. [WWW Document]. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale).

Oleszek, W., Bialy, Z., 2006. Chromatographic determination of plant saponins—an update (2002–2005). *J. Chromatogr. A* 1112, 78–91.

Ongarora, D., Thoithi, G., Abuga, K., Kamau, F., Mwangi, J., Kibwage, I., 2009. Triterpenoids from the stem bark of *Blighia unijugata* Bak. (Sapindaceae). *Ethiop. Pharm. J.* 27.

Onuminya, T.O., Ogundipe, O.T., 2014. Diversity of life-forms within Sapindaceae Juss. in West Africa and Western Cameroon: a field guide. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 6, 624–636.

Onuminya, T.O., Ogundipe, O.T., Olowokudejo, J.D., 2017. The infra-familial taxonomy of African Sapindaceae. *J. Sci. Res. Dev.* 17, 34–39.

Osbourn, A., 1996. Saponins and plant defence — a soap story. *Trends Plant Sci.* 1, 4–9.

Osbourn, A.E., 2003. Saponins in cereals. *Phytochemistry* 62, 1–4.

Osbourn, A.E., Clarke, B.R., Lunness, P., Scott, P.R., Daniels, M.J., 1994. An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant P.* 45, 457–467.

Oyelaran, O., Li, Q., Farnsworth, D., Gildersleeve, J.C., 2009a. Microarrays with varying carbohydrate density reveal distinct subpopulations of serum antibodies. *J. Proteome Res.* 8, 3529–3538.

Oyelaran, O., McShane, L.M., Dodd, L., Gildersleeve, J.C., 2009b. Profiling human serum antibodies with a carbohydrate antigen microarray. *J. Proteome Res.* 8, 4301–4310.

Papini, A.M., 2009. The use of post-translationally modified peptides for detection of biomarkers of immune-mediated diseases. *J. Pept. Sci.* 15, 621–628.

Paul, T.J., Taylor, T.A., Rajendra Santosh, A.B., 2020. The potential of saponin from Jamaica’s *Blighia sapida* (*ackee*) as a substitute for sodium lauryl sulphate in toothpaste. *Med. Hypotheses* 137, 109555.

Penders, A., Delaude, C., 1994. Structure elucidation of an acetylated saponin of *Blighia welwitschii* by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 79–88.

Penders, A., Delaude, C., Pepermans, H., van Binst, G., 1989. Identification and sequencing of sugars in an acetylated saponin of *Blighia welwitschii* by n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 190, 109–120.

Pensec, F., 2013. Les triterpénoïdes chez la vigne : quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs (These de doctorat). Université de Haute Alsace. Mulhouse.

Peroni, E., Real Fernández, F., Gheri, C., Nuti, F., Mitaine-Offer, A.-C., Lolli, F., Lacaille-Dubois, M.-A., Papini, A.-M., 2016. Natural triterpene glycosides for antibody recognition. *Planta Med. Lett.* 3, e2–e7.

Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018a. Terpenoid glycosides from the root's barks of *Eriocoelum microspermum* Radlk. ex Engl. *Phytochemistry* 152, 182–190.

Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018b. Triterpene saponins of the root bark of *Olax obtusifolia* De Wild. *Phytochem. Lett.* 28, 174–178.

Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Tran, D.K., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.A., 2019. Triterpenoid saponins from the root bark of *Haplocoelum congolanum*. *Nat. Prod. Commun.* 14, 1–6.

Planas, R., Santos, R., Tomas-Ojer, P., Cruciani, C., Lutterotti, A., Faigle, W., Schaeren-Wiemers, N., Espejo, C., Eixarch, H., Pinilla, C., Martin, R., Sospedra, M., 2018. GDP-L-fucose synthase is a CD4+ T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 10, eaat4301.

Porsche, F.M., Molitor, D., Beyer, M., Charton, S., André, C., Kollar, A., 2017. Antifungal activity of saponins from the fruit pericarp of *Sapindus mukorossi* against *Venturia inaequalis* and *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 102, 991–1000.

Radlkofer, L., 1933. Sapindaceae, in: *Das Pflanzenreich IV*, 165 (Heft 98a-h). Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Rashford, J., 2001. Those that do not smile will kill me: the ethnobotany of the *ackee* in Jamaica. *Econ. Bot.* 55, 190–211.

Real-Fernández, F., Passalacqua, I., Peroni, E., Chelli, M., Lolli, F., Papini, A.M., Rovero, P., 2012. Glycopeptide-based antibody detection in multiple sclerosis by surface plasmon resonance. *Sensors* 12, 5596–5607.

Real-Fernández, F.R., Pisa, M.D., Rossi, G., Auberger, N., Lequin, O., Larregola, M., Benchohra, A., Mansuy, C., Chassaing, G., Lolli, F., Hayek, J., Lavielle, S., Rovero, P., Mallet, J.-M., Papini, A.M., 2015. Antibody recognition in multiple sclerosis and rett syndrome using a collection of linear and cyclic N-glycosylated antigenic probes. *Biopolymers* 104, 560–576.

Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, W., Berger, T., 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122, 2047–2056.

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.

Rizzolo, F., Sabatino, G., Chelli, M., Rovero, P., Papini, A.M., 2007. A convenient microwave-enhanced solid-phase synthesis of difficult peptide sequences: case study of gramicidin A and CSF114(Glc). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 13, 203–208.

Roblin, G., Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Larignon, P., Berjeaud, J.-M., 2019. Towards a preventive and/or curative treatment of esca in grapevine trunk disease: general basis in the elaboration of treatments to control plant pathogen attacks. *Crop Prot.* 116, 156–169.

Saboora, A., Sajjadi, S.-T., Mohammadi, P., Fallahi, Z., 2019. Antibacterial activity of different composition of aglycone and glycosidic saponins from tuber of *Cyclamen coum* Miller. *Ind. Crop. Prod.* 140, 111662.

Safir, O., Fkih-Tetouani, S., De Tommasi, N., Aquino, R., 1998. Saponins from *Zygophyllum gaetulum*. *J. Nat. Prod.* 61, 130–134.

Saha, S., Walia, S., Kumar, J., Parmar, B.S., 2010. Structure-biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. *Pest Manag. Sci.* 66, 825–831.

Salou, M., Ngono, A.E., García, A.G., Michel, L.C., Laplaud, D.-A., 2013. Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques. *Rev. Med. Interne* 34, 479–486.

Santiago, M.B., Moraes, T. da S., Massuco, J.E., Silva, L.O., Lucarini, R., Silva, D.F. da, Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G., 2018. *In vitro* evaluation of essential oils for potential antibacterial effects against *Xylella fastidiosa*. J. Phytopathol. 166, 790–798.

Santos, C., Fragoeiro, S., Oliveira, H., Phillips, A., 2006. Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. Sci. Hortic. 107, 131–136.

Sautour, M., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Dongmo, A., Lacaille-Dubois, M.A., 2004. A new steroidal saponin from *Dioscorea cayenensis*. Chem. Pharm. Bull. 52, 1353–1355.

Schmid, C., Dawid, C., Peters, V., Hofmann, T., 2018. Saponins from European licorice roots (*Glycyrrhiza glabra*). J. Nat. Prod. 81, 1734–1744.

Schwarz, M., Spector, L., Gargir, A., Shtevi, A., Gortler, M., Altstock, R.T., Dukler, A.A., Dotan, N., 2003. A new kind of carbohydrate array, its use for profiling antiglycan antibodies, and the discovery of a novel human cellulose-binding antibody. Glycobiology 13, 749–754.

Schwarz, M., Spector, L., Gortler, M., Weisshaus, O., Glass-Marmor, L., Karni, A., Dotan, N., Miller, A., 2006. Serum anti-Glc(α 1,4)Glc(α) antibodies as a biomarker for relapsing–remitting multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 244, 59–68.

Seyedmousavi, S., Guillot, J., Toloee, A., Verweij, P.E., de Hoog, G.S., 2015. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. Clin. Microbiol. Infect. 21, 416–425.

Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., Bryce, D.L., 2016. Identification spectrométrique de composés organiques, 3e édition. De Boeck Supérieur s.a., Louvain-la-Neuve.

Singh, T., Singh, A.P., 2012. A review on natural products as wood protectant. Wood Sci. Technol. 46, 851–870.

Sinmisola, A., Oluwasesan, B.M., Chukwuemeka, A.P., 2019. *Blighia sapida* K.D. Koenig: a review on its phytochemistry, pharmacological and nutritional properties. J. Ethnopharmacol. 235, 446–459.

Somers, W.S., Stahl, M.L., Sullivan, F.X., 1998. GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. Structure 6, 1601–1612.

Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. Annu. Rev. Immunol. 23, 683–747.

Steentoft, M. (Ed.), 1988. Sapindaceae – akee apple family, in: Flowering Plants in West Africa. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 178–184.

Sternberg, S., 1994. The emerging fungal threat. *Science* 266, 1632–1634.

Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, 214–216.

Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M., 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142, 435–440.

Sun, H.-X., Xie, Y., Ye, Y.-P., 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27, 1787–1796.

The Angiosperm Phylogeny Group, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot.* 85, 531.

The Angiosperm Phylogeny Group, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141, 399–436.

The Angiosperm Phylogeny Group, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105–121.

The Angiosperm Phylogeny Group, 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20.

Thomas, D.W., Harris, D.J., 1999. New Sapindaceae from Cameroon and Nigeria. *Kew Bull.* 54, 951–957.

Thomson, L.A.J., Thaman, R.R., 2006. *Pometia pinnata* (tava) [WWW Document]. Traditional Tree Initiative - species profiles for pacific island agroforestry.

Timite, G., 2012. Isolement et caractérisation des saponosides de plantes de la famille des Alliaceae, Caryophyllaceae et Polygalaceae, et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales (These de doctorat). Université de Bourgogne, Faculté de Pharmacie. Dijon.

Tribe, H.T., 1998. The discovery and development of cyclosporin. *Mycologist* 12, 20–22.

Tsuzuki, J.K., Svidzinski, T.I.E., Shinobu, C.S., Silva, L.F.A., Rodrigues-Filho, E., Cortez, D.A.G., Ferreira, I.C.P., 2007. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. An. Acad. Bras. Ciênc. 79, 577–583.

Turner, E.M., 1953. The nature of the resistance of oats to the take-all fungus. J. Exp. Bot. 4, 264–271.

Valerino-Díaz, A.B., Gamiotea-Turro, D., Zanatta, A.C., Vilegas, W., Gomes Martins, C.H., de Souza Silva, T., Rastrelli, L., Campaner dos Santos, L., 2018. New polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaf alcohol tincture with antibacterial activity against oral pathogens. J. Agric. Food Chem. 66, 8703–8713.

Von Holt, C., Von Holt, M., Böhm, H., 1966. Metabolic effects of hypoglycin and methylenecyclopropaneacetic acid. Biochim. Biophys. Acta 125, 11–21.

Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Delaude, C., 1998. Saponins from *Harpullia cupanioides*. Phytochemistry 49, 2081–2085.

Voutquenne, L., 2001. Saponines et activités hémolytiques. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae. Ann. Pharm. Fr. 59, 407–414.

Voutquenne, L., Guinot, P., Thoison, O., Sevenet, T., Lavaud, C., 2003. Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. Phytochemistry 64, 781–789.

Walia, S., Saha, S., Tripathi, V., Sharma, K.K., 2017. Phytochemical biopesticides: some recent developments. Phytochem. Rev. 16, 989–1007.

Walvoort, M.T.C., Testa, C., Eilam, R., Aharoni, R., Nuti, F., Rossi, G., Real-Fernandez, F., Lanzillo, R., Brescia Morra, V., Lolli, F., Rovero, P., Imperiali, B., Papini, A.M., 2016. Antibodies from multiple sclerosis patients preferentially recognize hyperglucosylated adhesin of non-typeable *Haemophilus influenzae*. Sci. Rep. 6, 39430.

Wang, Z.-J., Zhu, Y.-Y., Yi, X., Zhou, Z.-S., He, Y.-J., Zhou, Y., Qi, Z.-H., Jin, D.-N., Zhao, L.-X., Luo, X.-D., 2020. Bioguided isolation, identification and activity evaluation of antifungal compounds from *Acorus tatarinowii* Schott. J. Ethnopharmacol. 261, 113119.

Weiner, H.L., 2009. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? Ann. Neurol. 65, 239–248.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.-O., 2009. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochim. Biophys. Acta 1788, 842–857.

Xu, H., Shi, X., Ji, X., Du, Y., Zhu, H., Zhang, L., 2012. A rapid method for simultaneous determination of triterpenoid saponins in *Pulsatilla turczaninovi* using microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 135, 251–258.

Xu, Z., Deng, M. (Eds.), 2017. Sapindaceae, in: *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 683–686.

Xue, P., Yang, X., Zhao, L., Hou, Z., Zhang, R., Zhang, F., Ren, G., 2020. Relationship between antimicrobial activity and amphipathic structure of ginsenosides. *Ind. Crop. Prod.* 143, 111929.

Yu, Q.-T., Qi, L.-W., Li, P., Yi, L., Zhao, J., Bi, Z., 2007. Determination of seventeen main flavonoids and saponins in the medicinal plant huang-qi (*Radix astragali*) by HPLC-DAD-ELSD. *J. Sep. Sci.* 30, 1292–1299.

Zhang, J.-D., Xu, Z., Cao, Y.-B., Chen, H.-S., Yan, L., An, M.-M., Gao, P.-H., Wang, Y., Jia, X.-M., Jiang, Y.-Y., 2006. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *J. Ethnopharmacol.* 103, 76–84.

Zhang, X., 2004. Traditional Medicine: Its Importance and Protection, in: *Protecting and Promoting Traditional Knowledge: Systems, National Experiences and International Dimensions*, United Nations Conference on Trade and Development. Twarog, S. and Kapoor, P. (Eds.). United Nations Publication, Geneva, pp. 23–26.

Zhang, X., Li, Z., Liu, G., Wang, X., Kwon, O., Lee, H., Whang, W., Liu, X., 2016. Quantitative determination of 15 bioactive triterpenoid saponins in different parts of *Acanthopanax henryi* by HPLC with charged aerosol detection and confirmation by LC–ESI-TOF-MS. *J. Sep. Sci.* 39, 2252–2262.

tropicos.org, lien 1 : <https://www.tropicos.org/name/42000256>, dernier accès : 31 août 2020

botany.hawaii.edu, lien 2 : <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/sapind.htm>, dernier accès : 31 août 2020

gobotany.nativeplanttrust.org, lien 3 : <https://gobotany.nativeplanttrust.org/family/sapindaceae/>, dernier accès : 31 août 2020

fao.org, lien 4 : <http://www.fao.org/3/ac681e/ac681e04.htm>, dernier accès : 31 août 2020

vidal.fr, lien 5 : <https://www.vidal.fr/substances/185/aescine/>, dernier accès : 31 août 2020

theplantlist.org, lien 6 : <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=blighia>, dernier accès : 31 août

tropicos.org, lien 7 : <http://legacy.tropicos.org/Name/28600828?tab=specimens>, dernier accès : 31 août

ville-ge.ch, lien 8 : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=90833>, dernier accès : 31 août

tropicos.org, lien 9 : <http://legacy.tropicos.org/Name/28601308?tab=specimens>, dernier accès : 31 août

theplantlist.org, lien 10 : <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Sapindaceae/Chytranthus/>, dernier accès : 31 août

plantsoftheworldonline.org, lien 11 : <http://www.plantsoftheworldonline.org/>, dernier accès : 31 août

agroneo.com, lien 12 : <https://fr.agroneo.com/search?q=chytranthus>, dernier accès : 31 août

ville-ge.ch, lien 13 : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=91131>, dernier accès : 31 août

tropicos.org, lien 14 : <http://legacy.tropicos.org/Name/28601327?tab=specimens>, dernier accès : 31 août

theplantlist.org, lien 15 : <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Sapindaceae/Radlkofera/>, dernier accès : 31 août

gbif.org, lien 16 : https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=3785493, dernier accès : 31 août

tropicos.org, lien 17 : <http://legacy.tropicos.org/Name/28601455?tab=specimens>, dernier accès : 31 août

ville-ge.ch, lien 18 : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=91258>, dernier accès : 31 août

vidal.fr, lien 19 : <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-ohexsp01-HEXASPRAY.html>, dernier accès : 31 août

vidal.fr, lien 20 : <https://www.vidal.fr/substances/3750/digoxine/>, dernier accès : 31 août

Annexes

A.1 Article n°1

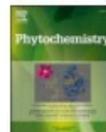
Phytochemistry 162 (2019) 260–269



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem



Hederagenin glycosides from the fruits of *Blighia unijugata*

Bastien Petit^a, Anne-Claire Mitaine-Offier^a, Clément Delaude^b, Tomofumi Miyamoto^c,
Chiaki Tanaka^c, Marie-Aleth Lacaille-Dubois^{a,*}



^a PEPITE EA 4267, Laboratoire de Pharmacognosie, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, BP 87900, 21079, Dijon Cedex, France

^b Centre de Recherche Phytochimique, Université de Liège, Institut de Chimie-B6, Sart Tilman, S-4000, Liège 1, Belgium

^c Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Blighia unijugata
Sapindaceae
Hederagenin
Triterpene saponins
Chemotaxonomy
2D NMR

ABSTRACT

A phytochemical investigation of *Blighia unijugata* led to the isolation of eleven hederagenin glycosides. Among these compounds, six are previously undescribed, two are described in their native forms for the first time and three are known whereas firstly isolated from *Blighia unijugata*. The structure of the undescribed compounds was elucidated on the basis of 2D NMR and mass spectrometry analyses as 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, 28-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl ester, 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester and 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester. These results revealed the existence of several conserved structural features that could be used as chemotaxonomic markers for the *Blighia* genus such as the glycosidic sequence 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosyl, the occurrence of 3-O-acetylated β-D-glucopyranosyl units and the systematic presence of hederagenin as aglycone.

1. Introduction

The *Blighia* genus, Sapindaceae, includes around seven species of tropical trees (Buerki et al., 2009). Native to equatorial Africa, *Blighia* species have been used for ornamental and agricultural purposes as well as traditional medicine, including the treatment of fever and conjunctivitis (Morton and Dowling, 1987). The fruits of *Blighia sapida* K.D. Koenig (Sapindaceae) are a major food source in Jamaica and might exert health benefits through consumption. These nutritional characteristics could be due to their content in various metabolites thought to positively affect human health such as phenolics, tannins, saponins, glycosides, vitamins and unsaturated fatty acids (Emanuel, 2018). Previous phytochemical studies focusing on *Blighia* saponins are particularly rare as only three investigations, carried out on *B. sapida* and *Blighia welwitschii* (Hiern) Radlk. (Sapindaceae), reported the isolation

and structure determination of five hederagenin saponins (Mazzola et al., 2011; Penders and Delaude, 1989, 1994). Like its congeners, *Blighia unijugata* Baker (Sapindaceae) was poorly studied and no fully elucidated saponins are described so far (Bienfait, 1961; Delaude and Welter, 1975).

Hederagenin glycosides belong to a well-known plant specialized metabolite class called triterpene saponins. These natural products have been studied for their various biological activities such as antimicrobial, cytotoxic, immunomodulatory, expectorant as well as piscicidal and molluscicidal activities (Lacaille-Dubois et al., 2013). Due to their acute toxicity against mammal blood cells and their poor intestinal absorption, the use of triterpene saponins as drugs is limited to some phytotherapeutic preparations despite their interesting pharmacological properties. Current studies focus on alternative uses of these molecules such as the development of diagnosis tools for autoimmune diseases

* Corresponding author.

E-mail address: m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr (M.-A. Lacaille-Dubois).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.020>

Received 6 December 2018; Received in revised form 20 March 2019; Accepted 22 March 2019
0031-9422/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Peroni et al., 2016).

This current lack of phytochemical data, in the light of possible traditional medicine and nutritional applications, have led us to consider *B. unijugata* as a possible source of undescribed and interesting glycosylated compounds (Bienfait, 1961; Delaude and Welter, 1975; Emanuel, 2018). Therefore, the aim of the present study is to isolate and characterize triterpene saponins from the fruits of *B. unijugata* in order to complete our phytochemical investigations on African plants (Mitaine-Offier et al., 2010; Pertuit et al., 2018).

2. Results and discussion

An aqueous ethanolic extract of the fruits of *B. unijugata* was subjected to successive chromatographic techniques, including Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) as well as semi-preparative and preparative High Performance Liquid Chromatography (½ prep HPLC and prep HPLC), on normal and reversed phase silica gel, to yield eleven compounds including eight undescribed and three known ones. Their structure elucidation was carried out by 600 MHz 2D NMR analysis (¹H-¹H COSY, TOCSY, ROESY and ¹H-¹³C HSQC, HMBC) as well as ESI and HRESITOFMS (positive-ion mode). The known compounds were identified by comparison of their spectral data to literature values as 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl ester (Dipsacoside B), previously isolated from *Dipsacus aureus* (Mukhamediev et al., 1971), 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (Blighoside A) purified from *Blighia sapida* (Mazzola et al., 2011) and 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester from *Lonicera japonica* (Kawai et al., 1988) and are reported for the first time from *B. unijugata*.

Compounds 1–8 were isolated as white amorphous powders. Acid hydrolysis, GC analyses (Hara et al., 1987; see 3. Experimental) and extensive 1D and 2D NMR spectroscopy of each compound allowed the identification of the sugar units as β-D-glucopyranosyl (Glc), β-D-xylopyranosyl (Xyl), α-L-arabinopyranosyl (Ara) and α-L-rhamnopyranosyl (Rha) for 1, 2, 4, 5 and 8 and Glc, Ara and Rha for 3, 6 and 7. The relatively large anomeric coupling constant values of Glc, Xyl and Ara II (6.4–8.4 Hz) in their pyranose form indicated a β-anomeric orientation for Glc and Xyl, and an α-anomeric orientation for Ara II in ⁴C₁ conformation (Ishii et al., 1981). Ara I, however, exhibited an uncommon anomeric multiplicity that can be described as a broad singlet (br s). This multiplicity could be the sign of an α-anomeric orientation for Ara I in ¹C₄ conformation, instead of the classically described ⁴C₁ conformation (Ishii et al., 1981). The large ¹J_{H1,C-1} value of the rhamnose (167 Hz) confirmed that the anomeric proton was equatorial in its α-pyranose form.

The HRESIMS of compound 1 established its molecular formula as C₅₇H₉₂O₂₆. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak [M + Na]⁺ at m/z 1199 indicating a molecular weight of 1176. The HSQC spectrum of the aglycone part of 1 displayed correlations assignable to six methyl groups at δ_H/δ_C: 0.70/12.3 (C-24), 0.83/16.7 (C-26), 0.90/32.1 (C-29), 0.93/22.6 (C-30), 0.96/15.0 (C-25) and 1.17/25.1 (C-27) (3H s, each) among which C-25, C-26 and C-27 are angular methyl groups, one olefinic proton and carbon at δ_H/δ_C: 5.22/121.8 (H-12), one oxygen-bearing methine proton and carbon at δ_H/δ_C: 3.60/81.0 (H-3) and one primary alcohol function at δ_H/δ_C: 3.54, 3.32/63.2 (H_a, H_b, 23). An HMBC cross-peak at δ_H/δ_C: 0.70 (s) (H_a, 24)/63.2 (C-23) and a ROESY cross-peak at δ_H/δ_H: 1.48 (m) (H-6)/3.31 (H_b, 23), suggested the location of the primary alcohol function at the C-23 position. The HMBC spectrum showed ³J_{H,C} and ⁴J_{H,C} couplings from the methyl protons (H_a, 24, 25, 26, 27, 29 and 30), which allowed the assignments of most carbons and protons of this aglycone. The deshielded chemical shift of C-28 observed at δ_C: 179.2 is a typical value for a free carboxylic acid function suggesting compound 1 to be a monodesmosidic

triterpene saponin. These data, together with extensive 2D NMR analyses, allowed the identification of the aglycone as hederagenin ((3β)-3,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid) whose NMR signals are in good agreement with those of the literature (Pertuit et al., 2018; see Table 1).

The ¹H NMR spectrum of 1 in the sugar region displayed the signals of five anomeric protons at δ_H: 4.36 (d, J = 7.5 Hz), 4.49 (br s), 4.51 (d, J = 7.5 Hz), 4.53 (d, J = 7.9 Hz), 5.19 (br s), which gave correlations in the HSQC spectrum, with five anomeric carbon signals at δ_C: 103.6, 103.6, 104.9, 104.3 and 100.2, respectively, indicating the presence of five sugars. They were identified by extensive 2D NMR analysis as one Glc (Glc I), one Xyl (Xyl II), two Ara (Ara I and II) and one Rha.

The linkages between these five sugars were established using HMBC and ROESY spectra. The main arguments supporting the proposed glycosidic sequence of compound 1 are listed as follows: the HMBC correlation between the anomeric proton at δ_H: 4.49 (br s) (Ara I-1) and the aglycone carbon at δ_C: 81.0 (C-3) together with the ROESY correlation at δ_H/δ_H: 4.49 (br s) (Ara I-1)/3.60 (aglycone H-3) confirmed the glycosidic linkage of Ara I at the C-3 position of the aglycone. Furthermore, the HMBC cross-peak at δ_H/δ_C: 3.65 (Ara I-2)/100.2 (Rha-1) suggested the (1 → 2) linkage between Rha and Ara I which was confirmed by the ROESY cross-peak at δ_H/δ_H: 3.65 (Ara I-2)/5.19 (br s) (Rha-1). The correlations in the HMBC and ROESY spectra at δ_H/δ_C: 3.87 (Rha-3)/104.3 (Glc I-1) and at δ_H/δ_H: 3.87 (Rha-3)/4.53 (d, J = 7.9 Hz) (Glc I-1) proved the (1 → 3) linkage between Glc I and Rha. The HMBC cross-peak at δ_H/δ_C: 3.57 (Glc I-4)/103.6 (Ara II-1) suggested the (1 → 4) linkage between Ara II-1 and Glc I-4, which was proved by the ROESY cross-peak at δ_H/δ_H: 3.57 (Glc I-4)/4.36 (d, J = 7.5 Hz) (Ara II-1). Finally, the structure analysis of the terminal sequence 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl was based upon the HMBC cross-peak at δ_H/δ_C: 3.64 (Ara II-3)/104.9 (Xyl II-1) and the ROESY correlation at δ_H/δ_H: 3.64 (Ara II-3)/4.51 (d, J = 7.5 Hz) (Xyl II-1). On the basis of the above results, the structure of compound 1 was determined as 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin. This compound is the native form of a previously reported synthetic acetylated derivative (Penders and Delaude, 1989).

Extensive 2D NMR analysis of 2–8 allowed the identification of their aglycones as hederagenin (Pertuit et al., 2018; see Table 1).

According to its HRESIMS, the molecular formula of compound 2 was established as C₅₉H₉₄O₂₆. Indeed, its ESIMS (positive-ion mode) spectrum showed a quasi-molecular ion peak [M + Na]⁺ at m/z 1241 indicating a molecular weight of 1218. Compound 2 molecular weight was 42 mass units higher than 1 suggesting the presence of an acetyl function. This was confirmed by observation of a cross-peak at δ_H/δ_C: 2.09/20.0 in the HSQC spectrum. In addition, the HSQC cross-peak at δ_H/δ_C: 5.03 (t, J = 9.3 Hz)/75.2, showing a considerable proton downfield shift, suggested the acetyl moiety to be located at C-3 of a Glc residue (Mazzola et al., 2011). This hypothesis was confirmed by HMBC cross-peaks between δ_H: 5.03 (t, J = 9.3 Hz) (Glc I-3) and the carbonyl group of the acetyl moiety at δ_C: 171.5. Interestingly, the acetylation of Glc I residue in compound 2 caused slight variations in its inner ring H and C chemical shifts. This was further described in figures S1 and S2 (supplementary data), which provide a comprehensive approach regarding the impact of a 3-O-acetylation on Glc I chemical shifts. Apart the acetyl moiety linked at Glc I-3, compounds 1 and 2 NMR signals are almost superimposable (see Tables 1 and 2). The structure of compound 2 was thus established as 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin, the native form of a previously reported synthetic acetylated derivative. Interestingly, the natural acetylation at Glc I-3 was hidden by the synthetic acetylation of every free carbohydrate alcohol functions, performed in the last 80's/early 90's for NMR resolution purposes (Penders and Delaude, 1989).

The HRESIMS of compound 3 established its molecular formula as

Table 1
NMR spectroscopic data of the aglycone moieties for compounds 1–8 in CD₃OD (δ in ppm, J in Hz)^a.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
1	38.2, 1.60, 0.96	38.2, 1.50, 0.97	38.3, 1.60, 0.96	38.0, 1.60, 0.95	38.2, 1.60, 0.96	38.0, 1.60, 0.95	38.2, 1.60, 0.96	38.3, 1.60, 0.96
2	25.2, 1.87, 1.74	25.0, 1.87 ^m , 1.75	25.1, 1.85, 1.74	25.0, 1.87 ^m , 1.74	25.2, 1.87 ^m , 1.74	25.5, 1.86, 1.74	25.1, 1.85, 1.74	25.2, 1.86, 1.74
3	81.0, 3.60, 42.6	81.0, 3.60, 42.5	81.0, 3.60, 42.6	81.0, 3.60, 42.6	80.9, 3.60, 42.6	81.0, 3.60, 42.6	81.0, 3.60, 42.6	81.0, 3.61, 42.6 (D3.0, 4.2)
4	46.7, 1.27, 1.74	46.7, 1.25, 1.49	46.7, 1.26, 1.46	46.7, 1.27, 1.49	46.7, 1.26, 1.46	46.6, 1.26, 1.46	46.6, 1.25, 1.46	46.6, 1.24, 1.47 ^m
5	17.4, 1.40, 1.36	17.4, 1.40 ^m , 1.36 ^m	17.1, 1.46, 1.35	17.4, 1.40 ^m , 1.35 ^m	17.4, 1.40 ^m , 1.35 ^m	17.4, 1.40 ^m , 1.37	17.4, 1.46 ^m , 1.34 ^m	17.4, 1.40 ^m , 1.35 ^m
6	32.1, 1.62, 1.27	32.0, 1.62, 1.24	32.2, 1.62, 1.26	32.0, 1.62, 1.27	32.0, 1.62, 1.26	32.1, 1.59, 1.27	31.9, 1.58, 1.26	31.9, 1.60, 1.26
7	39.1, 1.63, 1.63	39.1, 1.63, 1.63	39.1, 1.63, 1.63	39.1, 1.63, 1.63	39.1, 1.63, 1.63	39.1, 1.63, 1.63	39.2, 1.62, 1.62	39.1, 1.62, 1.62
8	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.63, 1.63	47.5, 1.62, 1.62	47.5, 1.62, 1.62
9	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89	36.2, 1.89, 1.89
10	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.89, 1.89	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.88, 1.88	23.1, 1.88, 1.88
11	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.89, 1.89	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.90, 1.90	23.1, 1.88, 1.88	23.1, 1.88, 1.88
12	121.8, 5.21, 5.21	122.0, 5.21, 5.21	122.0, 5.20, 5.20	122.2, 5.23, 5.23	122.2, 5.24, 5.24	122.3, 5.24, 5.24	122.4, 5.24, 5.24	122.4, 5.24, 5.24
13	145.0, 41.3	144.0, 41.3	145.0, 41.3	144.0, 41.3	143.8, 41.3	143.5, 41.3	143.5, 41.3	143.5, 41.3
14	41.5, 1.80, 1.08	41.3, 1.76, 1.09	42.0, 1.76, 1.08	41.3, 1.76, 1.08	41.3, 1.77, 1.07	41.2, 1.75, 1.07	41.2, 1.77, 1.07	41.2, 1.79, 1.07
15	27.5, 1.97, 1.38	27.5, 1.97, 1.38	27.8, 1.86, 1.38	27.4, 1.76, 1.38	27.4, 1.77, 1.38	27.5, 1.75, 1.38	27.5, 1.77, 1.38	27.5, 1.79, 1.38
16	22.8, 1.97, 1.38	22.5, 2.00, 1.39	22.9, 1.88, 1.38	22.5, 2.00, 1.39	22.6, 2.00, 1.39	22.6, 2.04, 1.39	22.5, 2.04, 1.39	22.5, 2.04, 1.39
17	46.7, 1.11, 1.11	46.7, 1.11, 1.11	46.7, 1.11, 1.11	46.7, 1.11, 1.11	46.7, 1.11, 1.11	46.6, 1.11, 1.11	46.7, 1.11, 1.11	46.6, 1.11, 1.11
18	41.6, 1.09, 1.09	41.6, 1.09, 1.09	41.7, 1.09, 1.09	41.6, 1.09, 1.09	41.6, 1.09, 1.09	41.6, 1.09, 1.09	41.2, 1.09, 1.09	41.6, 1.09, 1.09
19	45.8, 1.11, 1.11	45.8, 1.11, 1.11	45.7, 1.08, 1.08	45.9, 1.09, 1.09	45.8, 1.09, 1.09	45.8, 1.09, 1.09	45.8, 1.09, 1.09	45.8, 1.09, 1.09
20	30.2, 1.38, 1.38	30.2, 1.38, 1.38	30.4, 1.34, 1.34	30.2, 1.38, 1.38	30.2, 1.38, 1.38	30.1, 1.38, 1.38	30.1, 1.38, 1.38	30.1, 1.38, 1.38
21	31.2, 1.38, 1.38	31.2, 1.38, 1.38	31.1, 1.37, 1.37	31.2, 1.38, 1.38	31.2, 1.38, 1.38	31.2, 1.38, 1.38	31.2, 1.38, 1.38	31.2, 1.38, 1.38
22	32.3, 1.73, 1.73	32.1, 1.73, 1.73	33.0, 1.72, 1.72	32.1, 1.73, 1.73	32.4, 1.74, 1.74	32.0, 1.73, 1.73	31.7, 1.72, 1.72	31.7, 1.73, 1.73
23	63.2, 3.54, 3.54	62.9, 3.55, 3.55	63.2, 3.54, 3.54	63.0, 3.52, 3.52	63.2, 3.54, 3.54	63.0, 3.54, 3.54	63.1, 3.54, 3.54	63.0, 3.54, 3.54
24	12.3, 0.70, 0.70	12.3, 0.70, 0.70	12.3, 0.69, 0.69	12.3, 0.69, 0.69	12.3, 0.70, 0.70	12.8, 0.69, 0.69	12.3, 0.69, 0.69	12.3, 0.69, 0.69
25	15.0, 0.97, 0.97	14.9, 0.97, 0.97	15.0, 0.96, 0.96	14.9, 0.97, 0.97	15.0, 0.97, 0.97	15.1, 0.97, 0.97	15.0, 0.97, 0.97	15.0, 0.97, 0.97
26	16.7, 0.81, 0.81	16.7, 0.81, 0.81	16.7, 0.81, 0.81	16.3, 0.81, 0.81	16.3, 0.81, 0.81	16.6, 0.79, 0.79	16.3, 0.79, 0.79	16.4, 0.79, 0.79
27	25.1, 1.17, 1.17	25.0, 1.17, 1.17	25.1, 1.14, 1.14	25.0, 1.17, 1.17	25.0, 1.17, 1.17	25.0, 1.16, 1.16	24.9, 1.16, 1.16	24.9, 1.16, 1.16
28	178.2, 32.5, 0.91	181.6, 32.5, 0.91	181.6, 32.5, 0.87	181.6, 32.5, 0.87	181.6, 32.5, 0.87	176.7, 32.1, 0.91	176.7, 32.0, 0.91	176.7, 32.0, 0.91
29	32.1, 0.91, 0.91	32.0, 0.91, 0.91	32.5, 0.91, 0.91	32.0, 0.91, 0.91	32.1, 0.91, 0.91	32.1, 0.91, 0.91	32.0, 0.91, 0.91	32.0, 0.91, 0.91
30	22.6, 0.93, 0.93	22.5, 0.93, 0.93	22.5, 0.94, 0.94	22.5, 0.93, 0.93	22.6, 0.93, 0.93	22.6, 0.93, 0.93	22.5, 0.93, 0.93	22.5, 0.93, 0.93

nd: not determined.
^a Overlapped peaks NMR signals are reported without designated multiplicity.

Table 2
NMR spectroscopic data of the glycosidic moieties for compounds 1-8 in CD₃OD (δ in ppm, J in Hz).

No.	1		2		3		4		5		6		7		8		
	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h	
An 1	1	103.6	4.49 br s	103.6	4.48	102.5	4.49 br s	103.6	4.49 br s	103.6	4.49	102.5	4.49 br s	103.5	4.49 br s	103.5	4.49 br s
	2	75.3	3.65	75.4	3.65	75.2	3.65	75.3	3.65	75.3	3.65	74.9	3.65	75.3	3.65	75.3	3.65
	3	72.7	3.65	72.7	3.65	72.2	3.65	72.0	3.65	72.0	3.65	72.0	3.65	72.5	3.66	72.5	3.66
	4	68.3	3.75	68.2	3.75	68.3	3.75	68.3	3.75	68.4	3.75	69.0	3.75	68.3	3.75	68.3	3.75
	5	64.4	3.84	65.5	3.82	64.0	3.93 d d (12.2, 2.4)	64.0	3.82 d d (11.5, 4.2)	64.2	3.83 d d (12.3, 3.5)	64.0	3.83	64.0	3.83 d d (13.0)	64.0	3.83 d d (13.0)
Rho	1	100.2	5.19 br s	100.4	5.19 br s	100.2	5.19 br s	100.2	5.18 br s	100.2	5.20 br s	100.0	5.19 br s	100.2	5.18 br s	100.2	5.18 br s
	2	69.7	4.21 br s	69.6	4.21 br s	69.7	4.21 br s	69.7	4.22 br s	69.5	4.21 br s	69.7	4.21 br s	69.7	4.21 br s	69.7	4.20 br s
	3	81.6	3.87	81.5	3.88	81.5	3.86	81.5	3.86	81.5	3.89	82.0	3.87	81.5	3.86	81.5	3.86
	4	71.2	3.65	71.2	3.65	71.1	3.53	71.1	3.55	71.1	3.56	71.1	3.55	71.1	3.54	71.5	3.56
	5	68.7	3.91	68.2	3.92	68.6	3.90	68.6	3.91	68.6	3.90	69.0	3.93	68.6	3.90	68.6	3.92
	6	16.7	1.25 d (6.1)	16.6	1.24 d (6.4)	16.8	1.25 d (6.4)	16.7	1.25 d (6.4)	16.6	1.25 d (6.6)	16.7	1.24 d (6.6)	16.7	1.25 d (6.0)	16.7	1.24 d (6.0)
Glc 1	1	104.3	4.53 d (7.9)	104.4	4.60 d (7.6)	104.1	4.54 d (7.6)	104.4	4.53 d (7.6)	103.9	4.60 d (7.2)	103.9	4.54 d (7.8)	104.2	4.53 d (7.8)	104.2	4.53 d (7.8)
	2	73.7	3.35	72.0	3.45 d d (9.8, 8.2)	73.7	3.34	73.8	3.33	72.0	3.46 r (9.9)	73.7	3.35	73.7	3.35	73.7	3.35
	3	74.4	3.53	75.2	3.53 r (9.3)	74.4	3.53	74.4	3.50	75.2	3.50 r (9.7)	74.5	3.53	74.4	3.53	74.4	3.50
	4	78.7	3.57	76.1	3.74 r (11.6)	78.6	3.57	79.0	3.55	76.2	3.72 r (9.6)	79.0	3.55	78.6	3.54	78.9	3.54
	5	25.9	3.46	25.4	3.46	24.9	3.45 m	25.0	3.44 m	25.2	3.48	24.9	3.44	24.9	3.44 m	24.9	3.44 m
	6	60.9	3.87 nd	60.0	3.89 nd	58.7	3.90 nd	60.1	3.87 nd	58.7	3.90 nd	60.0	3.87 nd	60.0	3.87 nd	60.1	3.87 nd
3-OA	1	171.5		171.5		171.5		171.5		171.5		171.5		171.5		171.5	
	2	101.9		101.9		101.9		101.9		101.9		101.9		101.9		101.9	
	3	73.4		73.4		73.4		73.4		73.4		73.4		73.4		73.4	
	4	69.5		69.5		69.5		69.5		69.5		69.5		69.5		69.5	
	5	65.7		65.7		65.7		65.7		65.7		65.7		65.7		65.7	
An 2	1	103.6	4.36 d (7.5)	104.0	4.26 d (6.4)	102.5	4.36 d (7.6)	103.5	4.36 d (7.6)	103.5	4.36 d (7.6)	104.0	4.26 d (6.4)	103.9	4.26 d (7.8)	103.9	4.26 d (7.8)
	2	70.2	3.72 r (7.6)	71.1	3.60	70.1	3.71 d d (9.9, 7.6)	70.1	3.71 d d (9.9, 7.6)	70.1	3.71 d d (9.9, 7.6)	71.1	3.54	71.1	3.52	71.1	3.52
	3	82.0	3.64	82.0	3.60	82.4	3.66	82.4	3.66	82.4	3.66	82.4	3.66	82.4	3.66	82.4	3.66
	4	68.3	3.99 br s	68.6	3.90	67.9	4.08 br s	67.9	4.08 br s	67.9	4.08 br s	69.0	3.82	68.5	3.80	68.5	3.80
	5	65.8	3.82	64.4	3.82	64.0	3.82	64.0	3.82	64.0	3.82	66.0	3.93	66.4	3.90	66.4	3.90
3-O-2	1	104.9	4.51 d (7.5)	104.8	4.47 d (7.6)	104.4	4.51 d (7.6)	104.4	4.51 d (7.6)	104.4	4.46 d (7.2)	104.0	4.29 d (7.8)	103.9	4.26 d (7.8)	103.9	4.26 d (7.8)
	2	73.7	3.30	73.7	3.28	73.8	3.27	73.8	3.27	73.8	3.25 d d (8.8, 7.6)	73.8	3.27	73.8	3.25 d d (8.8, 7.6)	73.8	3.25 d d (8.8, 7.6)
	3	76.1	3.33	76.1	3.30	76.2	3.33	76.5	3.34	76.5	3.34	76.5	3.34	76.5	3.34	76.5	3.34
	4	68.7	3.49	69.6	3.48	69.5	3.50	69.5	3.50	69.5	3.50	69.5	3.50	69.5	3.50	69.5	3.50

(continue d on next page)

Table 2 (continued)

No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
5	65.6	3.98	65.5	3.81	65.7	3.89	65.7	3.89	65.7	3.89	65.7	3.89	65.7	3.89	65.7	3.89
	3.30 t (9.8)		3.20 dd (12.0, 11.6)		3.20 dd (12.6, 10.8)		3.20 dd (12.6, 10.8)		3.20 dd (12.6, 10.8)		3.20 dd (12.6, 10.8)		3.20 dd (12.6, 10.8)		3.20 dd (12.6, 10.8)	
GC-8																
1			104.2	4.54 d (7.6)												
2			72.9	3.28												
3			76.4	3.36												
4			69.7	3.34												
5			76.4	3.27												
6			60.9	3.82												
GC-III				3.67												
1			94.5	5.34 d (8.4)												
2			72.5	3.32												
3			76.6	3.49												
4			69.5	3.42												
5			76.6	3.41												
6			67.0	4.10 dd (11.7, 2.1)												
GC-IV				nd												
1			101.2	4.33 d (7.8)												
2			73.7	3.19 t (8.4)												
3			76.6	3.34												
4			70.1	3.27 t (8.0)												
5			76.6	3.23 m												
6			61.2	3.85												

nd: not determined.
 * Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity

$C_{20}H_{34}O_{26}$. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1229 indicating a molecular weight of 1206. Compound **3** was in a greater extent similar to compound **1**. A structural pattern, identified as 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin was similar in both compounds according to superimposable NMR signals in this region (see Tables 1 and 2). The only difference between the two isolates was located in the terminal part of the oligosaccharide chain, which was characterized as a Glc (Glc II) in **3** instead of a Xyl (Xyl II) in **1**. In the HMBC spectrum, a correlation at δ_{H1}/δ_C 4.54 (d, $J = 7.6$ Hz) (Glc II-1)/82.4 (Ara II-3) showed a substitution of Ara II-3 by a Glc moiety (Glc II) instead of a Xyl moiety (Xyl II) in compound **1**. However, this argument was not considered sufficient to distinguish a Glc from a Xyl because these two sugar residues exhibited close anomeric NMR signals (δ_{H1}/δ_C 4.54/104.2 for Glc II in compound **3** and δ_{H1}/δ_C 4.51/104.9 for Xyl II in compound **1**). Therefore, further analysis of the NMR spectrum of compound **3** showed that the anomeric signal at δ_{H1}/δ_C 4.54/104.2, putatively assigned to a Glc moiety (Glc II), was linked in 1H - 1H TOCSY and ROESY correlation modes to δ_{H1} 3.67, a typical signal for a terminal Glc moiety (δ_{H1}/δ_C 3.67, 3.82/60.9) (H_{1a} , H_{1b} , Glc II-6) (Lavaud et al., 2001). The above assumption was supported by MS data. Indeed, the ESIMS of compound **3** was 30 mass units higher than the ESIMS of compound **1**, a typical molecular weight difference between a hexose (Glc) and a pentose (Xyl). The structure of compound **3** was thus determined as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin.

The HRESIMS of compound **4** established its molecular formula as $C_{27}H_{52}O_{25}$. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1199 indicating a molecular weight of 1176. The 1H NMR spectrum of **4** displayed the signals of five anomeric protons at δ_{H1} 4.39 (d, $J = 6.6$ Hz), 4.49 (br s), 4.51 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.53 (d, $J = 7.8$ Hz) and 5.18 (br s), whose HSQC spectrum correlations were observed at δ_C 103.6, 103.6, 104.4, 104.4 and 100.2, respectively. An extensive 2D NMR analysis allowed the identification of one Glc (Glc I), two Xyl (Xyl I and II), one Ara (Ara I) and one Rha. The glycosidic sequence determined by HMBC and ROESY experiments was partially similar to that of compounds **1** and **3**. Indeed, a conserved structural pattern, identified according to superimposable NMR signals as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin was found in compounds **1**, **3** and **4** (see Tables 1 and 2). The two previously identified Xyl, as yet unassigned, were placed according to the following data: the HMBC cross-peak at δ_{H1}/δ_C 3.55 (Glc I-4)/103.6 (Xyl I-1) and the ROESY cross-peak at δ_{H1}/δ_{H1} 3.55 (Glc I-4)/4.39 (d, $J = 6.6$ Hz) (Xyl I-1) proved the (1 \rightarrow 4) linkage between Xyl I and Glc I while the HMBC cross-peak at δ_{H1}/δ_C 3.48 (Xyl I-3)/104.4 (Xyl II-1) and the ROESY cross-peak at δ_{H1}/δ_{H1} 3.48 (Xyl I-3)/4.51 (d, $J = 7.8$ Hz) (Xyl II-1) proved the (1 \rightarrow 3) linkage between Xyl II and Xyl I. According to the above results, the structure of compound **4** was established as 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin.

According to its HRESIMS, compound **5** molecular formula was established to be $C_{20}H_{34}O_{26}$. Indeed, its ESIMS (positive-ion mode) spectrum showed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1241 indicating a molecular weight of 1218. Compound **5** molecular weight was 42 mass units higher than **4** suggesting the presence of an acetyl function. The structural similarities between compounds **5** and **4** are thus reminiscent of those observed between compounds **2** and **1**. All the NMR signals, previously depicted in compound **2** and imputable to an acetylation at C-3 of a Glc residue, were found in compound **5**. Indeed, Glc I inner ring H and C chemical shifts of compounds **5** and **2** are clearly superimposable, thereby demonstrating the presence of an acetyl moiety at Glc I-3 of compound **5** (see figures S1 and S2, supplementary data). According to these considerations, the structure of

compound **5** was elucidated as 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin.

HRESIMS of compound **6** established its molecular formula to be $C_{26}H_{46}O_{21}$. Its ESIMS showed a positive quasi-molecular ion peak $[M + H]^+$ at m/z 1369, indicating a molecular weight of 1368. However, the C-28 position exhibited a shielded chemical shift at δ_C 176.7, suggesting an esterification with an osidic part at this position (Rengifo Carrillo et al., 2017). The 1H NMR spectrum of **6** displayed six anomeric proton signals at δ_{H1} 4.29 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.49 (br s), 4.54 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.19 (br s) and 5.34 (d, $J = 8.4$ Hz) correlating in the HSQC spectrum with signals at δ_C 104.0, 103.2, 103.5, 103.9, 100.0 and 94.5, respectively. An extensive 2D NMR analysis allowed the identification of three Glc (Glc I, III and IV), two Ara (Ara I and II) and one Rha units. The signals of the oligosaccharide sequence at C-3 of the alycone were almost superimposable with those of **1** identified as Ara-(1 \rightarrow 4)-Glc-(1 \rightarrow 3)-Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara. The only difference was the absence of the signals due to a xylose unit for the oligosaccharide chain attached at C-3 in **6**. The two remaining Glc III and Glc IV were identified as a gentiobiosyl (β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl) unit linked to C-28 of the aglycone. This assumption was verified according to the chemical shift at δ_C 94.5 (Glc III-1), a typical value suggesting an ester linkage with C-28 of the aglycone (Rezgui et al., 2016). This linkage was further confirmed with the HMBC correlation between δ_{H1} 5.34 (d, $J = 8.4$ Hz) (Glc III-1) and δ_C 176.7 (C-28). Finally, the HMBC correlation at δ_{H1}/δ_C 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc IV-1)/67.0 (Glc III-6) and the ROESY cross-peak at δ_{H1}/δ_{H1} 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc IV-1)/4.10 (dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz) (Glc III-6) confirmed the (1 \rightarrow 6) linkage between Glc IV and Glc III. The structure of compound **6** was thus determined as 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

Compound **7** positive-ion mode ESIMS showed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1229 indicating a molecular weight of 1206. According to this HRESIMS spectrum, its molecular formula was proposed as $C_{20}H_{34}O_{26}$. Compound **7** was in a greater extent similar to compound **6** (see Tables 1 and 2). Their molecular weights only differ by 162 mass units, corresponding to a hexose moiety. A first examination of these HRESIMS data suggests that compound **7**, when compared to compound **6**, is lacking one Glc residue. This hypothesis was supported by the 1H NMR spectrum of **7**, displaying signals of five anomeric protons, instead of six for compound **6**, showing HSQC cross-peaks at δ_{H1}/δ_C 4.28 (d, $J = 7.8$ Hz)/103.9, δ_{H1}/δ_C 4.49 (br s)/103.5, δ_{H1}/δ_C 4.53 (d, $J = 8.4$ Hz)/104.2, δ_{H1}/δ_C 5.18 (br s)/100.2 and δ_{H1}/δ_C 5.37 (d, $J = 7.8$ Hz)/94.3. Thus, an extensive 2D NMR comparative analysis of compounds **7** and **6** showed that the former exhibited a 28-O- β -D-glucopyranosyl ester moiety instead of the previously described gentiobiosyl ester moiety for the latter. The structure of compound **7** was thus determined as 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Compound **8** positive-ion mode ESIMS showed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1229 indicating a molecular weight of 1206. According to this HRESIMS spectrum, its molecular formula was proposed as $C_{20}H_{34}O_{26}$. Compound **8** was in a greater extent similar to compound **7**. A structural pattern, identified as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl ester was similar in compounds **8** and **7** according to superimposable NMR signals in this region (see Tables 1 and 2). The only difference between the two compounds was located in the terminal part of the oligosaccharide chain, which was characterized by extensive 2D NMR analyses as the Xyl unit in **8** instead of the Ara unit in **7**. Finally, the structure of compound **8** was determined as 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-

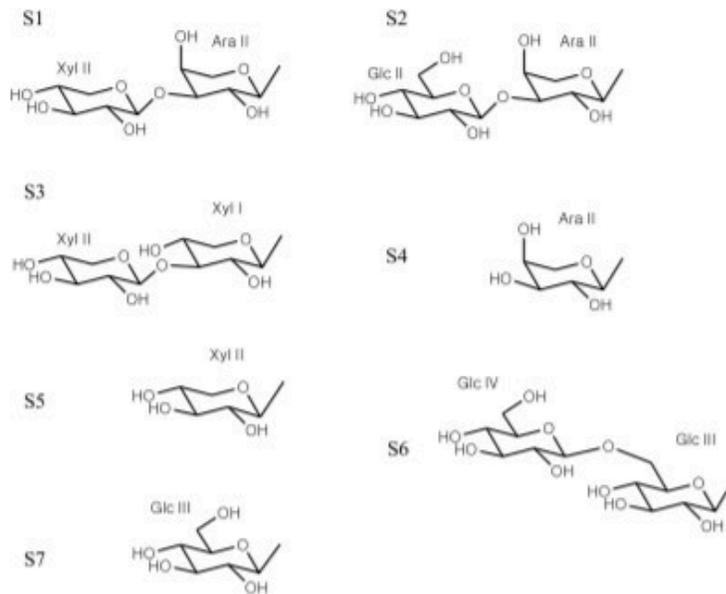
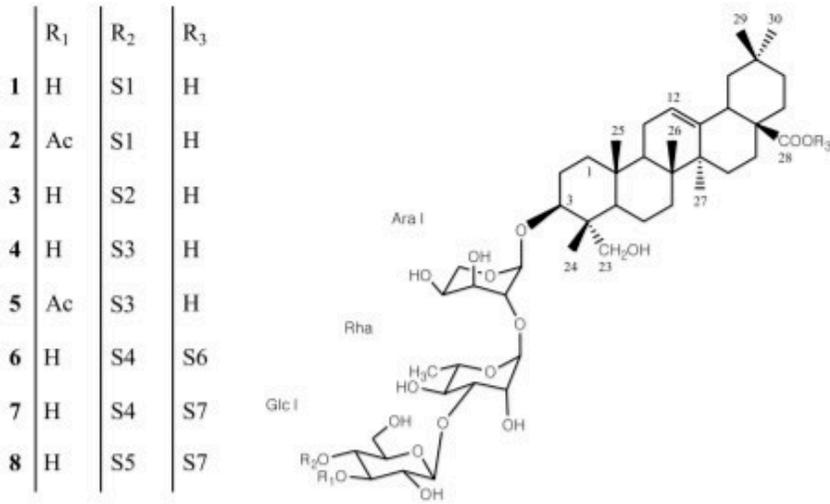


Fig. 1. Structures of previously undescribed triterpene saponins 1–8.

arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

The Sapindaceae family, comprising about 2000 species and 140 genera, mainly includes trees and shrubs growing in tropical areas of the world. Its phylogeny, proposed for the first time by Radikofer in 1933 and reviewed by Harrington in 2005, has been debated for a long time (Baerki et al., 2009). The circumscription of the family as well as the relationships between subfamilial entities have been recently discussed in an update of the Angiosperm Phylogeny Group, suggesting the debate to be still current (APG IV, 2016). Regarding these ongoing discussions, further chemotaxonomic considerations will focus on two long-recognized Sapindaceae subfamilies called Sapindoideae and Dodonaeoideae.

The Sapindoideae and Dodonaeoideae subfamilies, known for their saponin richness, have been quite well described from a chemotaxonomic point of view. A first postulate, proposed by Delaude in 1993, hypothesized that triterpene glycoside aglycones, differ in their structure from a subfamily to another. It was confirmed that saponins found in the Sapindoideae subfamily exhibited poorly hydroxylated aglycones, such as hederagenin and oleanolic acid, whereas Dodonaeoideae aglycones were polyhydroxylated or even polyoxygenated, such as barrigenol, medicagenic acid, zanhic acid and their derivatives (Delaude, 1993). This first chemotaxonomic marker was later completed by the glycosidic sequence Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara at C-3 of hederagenin, which was commonly found in the Sapindoideae, while a glucuronic acid monomer was characteristic of the Dodonaeoideae (Lavaud et al., 2001; Voutquenne et al., 2003). Above structures (compounds 1–8), together with the three already known saponins, isolated from *B. unijugata*, Sapindoideae, are in full accordance with literature data in terms of chemotaxonomy. Indeed, all the compounds reported in this article exhibited the common structural pattern 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin, typical of Sapindoideae-derived saponins according to precedent studies (Lavaud et al., 2001; Voutquenne et al., 2003; Pertuit et al., 2018). These results support the previously described structural pattern to be a relevant chemotaxonomic marker for the Sapindoideae subfamily.

However, a more pertinent, extended chemotaxonomic marker, can be proposed for the *Blighia* genus regarding the high level of superimposition of NMR data described in this study (see Tables 1 and 2). The structural pattern Glc-(1 \rightarrow 3)-Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara linked at C-3 of hederagenin can be proposed in first instance as it was found in all the compounds described above (see Fig. 1) as well as in *B. sapida* and *B. wehweitschii* saponins in previous studies (Mazzola et al., 2011; Penders and Delaude, 1989, 1994). However, a literature investigation demonstrated that this oligosaccharide chain is commonly found in saponins from many different plant families such as the Dipsacaceae (*Cephalaria* sp.), Ranunculaceae (*Pulsatilla* sp.) and Lardizabalaceae (*Akebia* sp.), therefore discrediting its role as a chemotaxonomic marker for *Blighia* sp. (Kayce and Kirmizigul, 2017; Li et al., 2013).

Other conserved structural features, apparently widely distributed in *Blighia* sp. and specific to the genus could be proposed as chemotaxonomic markers. This is not an easy task considering the limited number of fully elucidated saponins which have been described in the genus so far. Here the glycosidic sequence Ara-(1 \rightarrow 4)-Glc-(1 \rightarrow 3)-Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara, linked at C-3 of hederagenin, deserves a particular attention. This oligosaccharide moiety has been found in five out of the eight compounds described above in *B. unijugata* (compounds 1–3, 6 and 7). Furthermore, this structural pattern has been reported in *B. wehweitschii* and in *B. sapida*, suggesting its validity at the genus scale (Mazzola et al., 2011; Penders and Delaude, 1989). To the best of our knowledge, such glycosidic chain has never been described before in other genera, and could be considered as a chemotaxonomic marker for the *Blighia* genus.

3. Concluding remark

The phytochemical investigation related in this article reports a series of undescribed isolates whose structures are highly consistent with previous work carried out on *Blighia* sp. This allowed us to hypothesize that triterpene saponins slightly vary across the genus and afforded us to define a minimal conserved structural pattern that might be used as a chemotaxonomic marker at the genus scale. These assumptions could be further tested in investigating the phytochemistry of other species of the genus *Blighia*.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Optical rotations values were recorded on an AA-10R automatic polarimeter. NMR spectra were generated using a Varian INOVA 600 (Agilent Technologies) at the operating frequency of 600 MHz. The operating conditions were as follows: ^1H : frequency, 600 MHz; sweep width, 8 kHz; sampling point, 66 k; spectral width, 7804 Hz, accumulation, 32 pulses; temperature, 304 K. ^{13}C : frequency, 150 MHz; sweep width, 32 kHz; sampling point, 160 k; spectral width, 30,000 Hz, accumulation, 8000 pulses; temperature, 304 K. Each sample was dissolved in CD_3OD (200 μl) using 5 mm micro-sample tube (SHIGEMI Co., Ltd., Japan). Chemical shifts were referenced to solvent signal (δ_{H} : 3.30, δ_{C} : 49.0). Conventional pulse sequences were used for gMQF-COSY, TOCSY, NOESY, gHSQC, and gHMBC. The mixing time in the NOESY experiment was set to 500 ms. TOCSY spectra were acquired using the standard MLEV17 spin-locking sequence and 60 ms mixing time. TOCSY, NOESY and HSQC spectra were recorded using phase-sensitive mode. The size of the acquisition data matrix was 2048 \times 256 words in f_2 and f_1 , respectively, and zero filling up to 2 k in f_1 was made prior to Fourier transformation. Sine-bell or Shifted sine-bell window functions, with the corresponding shift optimized for every spectrum, were used for resolution enhancement and baseline correction was applied in both dimensions. HRESIMS (positive-ion mode) and ESIMS (positive-ion mode) were carried out on a Bruker micrOTOF II mass spectrometer.

Compound isolation was carried out using MPLC on reversed-phase RP-18 silica gel (Silicycle, 75–200 μm) and normal-phase silica gel 60 (Merck, 15–40 μm), with a Büchi device (C-615 pump manager and C-601 pump modules) or an Alltech Model 426 pump, a Büchi glass column (230 mm \times 15 mm and 460 mm \times 15 mm) and a Büchi pre-column (110 mm \times 15 mm). Analytical and $\frac{1}{2}$ prep HPLC were carried out on an Agilent 1260 Infinity series device equipped with a RP-18 Phenomenex LUNA column (5 μm , 100 Å, 250 mm \times 4.60 mm) and a RP-18 Phenomenex LUNA column (5 μm , 100 Å, 250 mm \times 10.00 mm), respectively. Prep HPLC was performed on a Gilson apparatus (305 and 306 pumps, 25 SC head pump, 805 manometric module, 811C dynamic mixer and UV/VIS-151 detector) equipped with a RP-18 Phenomenex LUNA column (10 μm , 100 Å, 250 mm \times 21.20 mm). Thin-layer chromatography (TLC, Silicycle) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC, Merck) were carried out on precoated silica gel plates 60F $_{254}$. The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, 50:1).

4.2. Plant material

Fruits of *Blighia unijugata* Baker (Sapindaceae) were collected during the wet season 2011 in Kisantu, Democratic Republic of Congo, in conformity with the voucher specimen (4707) collected by Luc Pauwels, and deposited in the botanical garden of Meise (Belgium).

4.3. Extraction and isolation

Dried fruit pericarps of *B. imjigata* (350 g) were extracted in an ethanolic solution and enriched in crude saponins according to the protocol previously described by Delaude and Welter (1975). Briefly, after evaporation of the ethanolic solvent under vacuum, the obtained residue was treated by successive protocols as dissolution in methanol, precipitation into diethyl ether, dialysis, and activated charcoal discoloration to give 5.4 g of a crude saponin mixture. The resulting crude extract was successively chromatographed by MPLC on normal-phase silica gel (CHCl₃–MeOH–H₂O, 80:20:2, 70:30:5, 60:32:7, gradient) to give 16 fractions (Fr1–Fr16). Fr1–Fr3 (28, 20 and 5 mg) were directly subjected to ½ prep HPLC on a RP-18 Phenomenex LUNA column (ACN–0.01% TFA in H₂O, 38:62, isocratic) and provided compound 1 (4.9 mg), the known Bilghoside A (5.0 mg) and compound 2 (3.5 mg), respectively. Fr4 and Fr9 (18 and 70 mg) constituents were separated by MPLC on RP-18 silica gel (MeOH–H₂O, 50:50 to 80:20, gradient) to afford compound 3 (2.7 mg) and the known 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (12 mg). Fr9.3 (48 mg), resulting from the precedent chromatographic step, was subjected to prep HPLC on a RP-18 Phenomenex LUNA column (ACN–0.01% TFA in H₂O, 37:63, isocratic) to give compound 4 (2.5 mg). Compound 5 (8.5 mg) was purified from Fr8 (36 mg) using a very similar prep HPLC method (RP-18 Phenomenex LUNA column, ACN–0.01% TFA in H₂O, 38:62, isocratic). An MPLC on RP-18 silica gel (MeOH–H₂O, 50:50 to 80:20, gradient) performed on Fr11 (36 mg), yielded three fractions called Fr11.1–Fr11.3 (22.6, 6, and 7 mg). When subjected to prep HPLC on a RP-18 Phenomenex LUNA column (ACN–0.01% TFA in H₂O, 32:68, isocratic), Fr11.1 and Fr11.3 gave compounds 7 (5.7 mg) and the known Dipsacside B (2 mg). Using the same technique, compound 6 (8.8 mg) was isolated from Fr15 (30 mg). Finally, compound 8 (6 mg) was obtained from Fr16 (22 mg) by MPLC on silica gel (CHCl₃–MeOH–H₂O, 75:25:3, isocratic).

4.4. Compound characterization

4.4.1. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (1)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –23.5 (c 0.20, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1199 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1199.5830 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₇H₈₂O₂₅Na, 1199.5825).

4.4.2. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (2)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –19.0 (c 0.16, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1241 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1241.5935 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₉H₈₄O₂₆Na, 1241.5931).

4.4.3. 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (3)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –27.7 (c 0.06, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229.5927 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₈H₈₄O₂₆Na, 1229.5931).

4.4.4. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (4)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ +40.0 (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1199 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1199.5820 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₇H₈₂O₂₅Na, 1199.5825).

4.4.5. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin (5)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ +10.0 (c 0.07, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1241 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1241.5927 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₉H₈₄O₂₆Na, 1241.5931).

4.4.6. 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (6)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –68.9 (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1369 [M+H]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1369.6646 [M+H]⁺ (calcd. for C₆₄H₁₀₆O₃₃, 1369.6640).

4.4.7. 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (7)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –43.7 (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229.5926 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₈H₈₄O₂₆Na, 1229.5931).

4.4.8. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (8)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –53.0 (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1229.5937 [M+Na]⁺ (calcd. for C₅₈H₈₄O₂₆Na, 1229.5931).

4.5. Acid hydrolysis and GC analysis

Each compound (2 mg) was hydrolyzed with 2M aq. CF₃COOH (5 ml) at 95 °C for 3 h. After extraction with CH₂Cl₂ (3 × 5 ml), the aq. layer was repeatedly evaporated to dryness with MeOH until neutral, and then analyzed by TLC over silica gel (CHCl₃–MeOH–H₂O, 8.5:1) by comparison with authentic samples. Furthermore, the residue of sugars was dissolved in anhydrous pyridine (100 μl), and L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.06 M) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 1 h, then 150 μl of HMDS-TMCS (hexamethyldisilazane–trimethylchlorosilane 3:1) was added, and the mixture was stirred at 60 °C for another 30 min. The precipitate was centrifuged off, and the supernatant was concentrated under a N₂ stream. The residue was partitioned between hexane and H₂O (0.1 ml each), and the hexane layer (1 μl) was analyzed by GC (Hara et al., 1987). The absolute configurations were determined by comparing the retention times with thiazolidine derivatives prepared in a similar way from standard sugars (Sigma-Aldrich). Identification of L-arabinose, L-rhamnose, and D-glucose and D-xylose was carried out for 1, 2, 4, 5 and 8 giving peaks at 11.9, 13.1, 18.6 and 13.4 min, respectively. Identification of L-arabinose, L-rhamnose, and D-glucose was carried out for 3, 6 and 7 giving a

peak at 11.9, 13.1 and 18.6 min respectively.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This research work was financially supported by a grant from the French Government (French Ministry of Higher Education, Research and Innovation).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.020>.

References

- Bienfait, A., 1961. Occurrence of a saponin in the capsules of *Alghia ussugata*. *J. Pharm. Belg.* 16, 220–228.
- Buzeki, S., Forest, F., Acevedo-Rodriguez, P., Callmander, M.W., Nylander, J.A.A., Harrington, M., Sotomartin, I., Küpfer, F., Alvarez, N., 2009. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 238–258.
- Delaude, C., 1993. Les Sapindaceae et leurs saponines. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège* 62, 62–100.
- Delaude, C., Welter, A., 1975. Contribution to the chemical study of Sapindaceae saponins. Identification of the saponin of *Alghia ussugata* Suk. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège* 44, 683–686.
- Emmanuel, M.A., 2018. *Acacia (Alghia ussugata koenig)*. In: *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, second ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 857–868.
- 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.
- Harrington, M.G., Edwards, K.J., Johnson, S.A., Chase, M.W., Gadek, P.A., 2005. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid *matK* and *rbcL* DNA sequences. *Syst. Bot.* 30, 366–382.
- Ishii, H., Kitagawa, I., Minoshima, K., Shirakawa, K., Tori, K., Toriya, T., Yoshikawa, M., Yoshimura, Y., 1981. The configuration and conformation of the arabinose moiety in galactosyl saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*, and *mi-saponins* from *Medicago lupulina* based on carbon-13 and hydrogen-1 NMR spectroscopic evidence: the total structures of the saponins. *Tetrahedron Lett.* 22, 1529–1532.
- Kawai, H., Kuroyanagi, M., Umehara, K., Ueda, A., Satake, M., 1988. Studies on the saponins of *Lonicera japonica* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4769–4775.
- Kayou, P., Kirinjalal, S., 2017. Isolation and identification of a new saponin from *Cephaelis aytaichi*. *Nat. Prod. Res.* 31, 50–57.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Delaude, C., Mitaine-Offer, A.-C., 2013. Triterpenoid saponins: a focus on Polygalaceae. In: *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3205–3223.
- Lavaud, C., Grubiet, M.-L., Pouzy, I., Litauon, M., Sevonet, T., 2001. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elatostemys apiculata*. *Phytochemistry* 57, 469–478.
- Li, W., Ding, Y., Sun, Y.H., Yan, X.T., Yang, S.Y., Choi, C.W., Kim, E.-J., Kang, J.K., Kim, Y.H., 2013. Oleane-type triterpenoid saponins from the roots of *Pidaulida korarua* and their apoptosis-inducing effects on HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Arch. Pharm. Res. (Seoul)* 36, 768–774.
- Mazuela, E.F., Parkkinen, A., Kennedy, E.J., Cronin, B., Einbond, L.S., Freedberg, D.J., 2011. Utility of coupled-MSQC experiments in the intact structural elucidation of three complex saponins from *Alghia ussugata*. *Carbohydr. Res.* 346, 759–768.
- Mitaine-Offer, A.-C., Wérez, N., Miyamoto, T., Delaude, C., Mirjolat, J.-F., Duchamp, O., Lacaille-Dubois, M.-A., 2010. Acylated triterpene saponins from the roots of *Securidaca longepedunculata*. *Phytochemistry* 71, 90–94.
- Morton, J.F., Dowling, C.P., 1987. *Fruits of Warm Climates*. J.F. Morton; Distributed by Creative Resources Systems. (Miami, FL: Winterville, N.C.).
- Mukhamadiev, M.M., Alimkhanova, P.K., Gorovin, T.T., Abubakirov, N.K., 1971. Structure of the triterpenoid glycoside from *Dipsacus anatum*. *dipasoside* B. *Khim. Prir. Soedin.* 7, 153–158.
- Penders, A., Delaude, C., 1989. Identification and sequencing of sugars in an acetylated saponin of *Alghia ussugata* by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 190, 109–120.
- Penders, A., Delaude, C., 1994. Structure elucidation of an acetylated saponin of *Alghia ussugata* by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 79–88.
- Peroni, E., Fernández, F.H., Ghri, C., Nusi, F., Mitaine-Offer, A.-C., Lelli, F., Lacaille-Dubois, M.-A., Papini, A.-M., 2016. Natural triterpene glycosides for antibody recognition. *Planta Med. Lett.* 3, e2–e7.
- Perrault, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018. Terpenoid glycosides from the root barks of *Friococcidae macrosporum* Radlk. ex Engl. *Phytochemistry* 152, 183–190.
- Radlkofer, L., 1933. Sapindaceae. In: *Das Pflanzenreich IV*. Adolf Engler, Leipzig.
- Rengifo Carrillo, M., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Provença, L., Quidou, S., Rojas, L.B., Rosquete Purcar, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2017. Oleane-type glycosides from *Pittosporum tenuifolium* "variegatum" and *P. tenuifolium* "gold star". *Phytochemistry* 140, 166–173.
- Rergat, A., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutarte, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2016. Oleanoic acid and hederagenin glycosides from *Weigela alabaster*. *Phytochemistry* 123, 40–47.
- The Angiosperm Phylogeny Group, 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Thuison, O., Sevonet, T., Lavaud, C., 2003. Oleanoic glycosides from *Panzeria ridleyi*. *Phytochemistry* 64, 781–789.

A.2 Article n°2

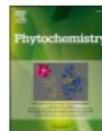
Phytochemistry 176 (2020) 112392



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem



Triterpene glycosides from *Blighia welwitschii* and evaluation of their antibody recognition capacity in multiple sclerosis

Bastien Petit^a, Anne-Claire Mitaine-Offer^{a,*}, Feliciano Real Fernández^{b,c}, Anna Maria Papini^{b,d,e}, Clément Delaude^f, Tomofumi Miyamoto^g, Chiaki Tanaka^g, Paolo Rovero^{b,c}, Marie-Aleth Lacaille-Dubois^h

^a PEPITE EA 4267, Laboratoire de Pharmacognosie, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, BP 87900, 21079, Dijon, Cedex, France

^b Interdepartmental Laboratory of Peptide and Protein Chemistry and Biology, University of Florence, 50019, Sesto Fiorentino, Italy

^c Department of Neurosciences, Psychology, Drug Research and Child Health, NeuroFARba Section of Pharmaceutical Sciences and Nutraceutics, University of Florence, 50019, Sesto Fiorentino, Italy

^d Department of Chemistry "Ugo Schiff", University of Florence, 50019, Sesto Fiorentino, Italy

^e Laboratory of Chemical Biology, EA 4505 PeptiLab@UCP, University of Cergy Pontoise, 95031, Cergy, Pontoise Cedex, France

^f Centre de Recherche Phytochimique, Université de Liège, Institut de Chimie-B6, Sart Tilman, B-4000, Liège 1, Belgium

^g Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Blighia welwitschii
Sapindaceae
Triterpene saponins
Antibody recognition
Multiple sclerosis
ELISA

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial autoimmune disease in which reliable biomarkers are needed for therapeutic monitoring and diagnosis. Autoantibodies (autoAbs) are known biomarker candidates although their detection in biological fluids requires a thorough characterization of their associated antigens. Over the past twenty years, a reverse chemical-based approach aiming to screen putative autoantigens has underlined the role of glycans, in particular glucose, in MS. Despite the progress achieved, a lack of consensus regarding the nature of innate antigens as well as difficulties proposing new synthetic glucose-based structures have proved to be obstacles. Here is proposed a strategy to extend the current methodology in the field of natural glycosides, in order to dramatically increase the diversity of glycans that could be tested. Triterpene saponins from the Sapindaceae family represent an optimal starting material as their abundant description in the literature has revealed a prevalence of glucose-based oligosaccharides. *Blighia welwitschii* (Sapindaceae) was thus selected as a case study and twelve triterpene saponins were isolated and characterized. Their structures were elucidated on the basis of 1D and 2D NMR as well as mass spectrometry, revealing seven undescribed compounds. A selection of natural glycosides exhibiting various oligosaccharide moieties were then tested as antigens in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to recognize IgM antibodies (Abs) in MS patients' sera. Immunoassay results indicated a correlation between the glycan structures and their antibody recognition capacity, allowing the determination of structure-activity relationships that were coherent with previous studies. This approach might help to identify sugar epitopes putatively involved in MS pathogenesis, which remains poorly understood.

1. Introduction

Affecting more than two million people worldwide, MS is an autoimmune disorder characterized by variable loss of motor and sensory functions, often resulting in disability and cognitive decline. Most of these symptoms are thought to be due to an immune-mediated demyelination in the central nervous system (CNS), in which T cells and autoAbs are believed to be directly involved (Karussis, 2014; Garg and Smith, 2015). AutoAbs might recognize specific autoimmune epitopes (autoepitopes) in the CNS and may therefore represent biomarkers of

great diagnostic and therapeutic value (DeMarshall et al., 2017).

In order to determine the chemical nature of these autoepitopes, a series of reverse chemical-based investigations, i.e. involving various candidate antigens as probes to detect autoAbs, have been conducted (Papini, 2009). These studies first focused on putative innate antigens thought to be involved in MS pathogenesis such as myelin glycoproteins and glycolipids (Reindl et al., 1999; Menge et al., 2005). Later, it was demonstrated that Abs against aberrant glycosylated compounds were found in the sera of patients with MS, reorienting screening strategies towards the use of glycan microarrays and structurally optimized

* Corresponding author.

E-mail address: anne-claire.offer@u-bourgogne.fr (A.-C. Mitaine-Offer).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112392>

Received 4 February 2020; Received in revised form 11 April 2020; Accepted 15 April 2020
0031-9422/ © 2020 Published by Elsevier Ltd.

synthetic products (Schwarz et al., 2003; Nuti et al., 2010; Real Fernández et al., 2015; Walvoort et al., 2016). In this regard, a particular glycosylated peptide, CSF114(Glc), has shown good performances in recognizing MS associated autoAbs, suggesting the fundamental role of glycosylated moieties, especially glucose, in MS (Lolli et al., 2005a, b). This finding was supported by studies on (GAGA4), another glucosyl antigen thought to play a critical role in MS (Schwarz et al., 2006; Brettschneider et al., 2009; Freedman et al., 2009). The possibility that aberrant glycan-based compounds such as CSF114(Glc) and GAGA4, could be derivatives or mimetics of the sought-after autoepitopes at the origin of MS pathogenesis, has already been discussed (Braganza et al., 2018). To investigate this hypothesis would require further exploration of glucose-based antigen capacity to recognize MS associated autoAbs. This is however impaired by technical challenges in carbohydrate chemistry, especially in regard to conformation-selective and binding synthesis.

In this context, saponins represent a well described class of glycosylated natural products that could be used as antigenic probes as they exhibit complex, rare and stable glycans. A few triterpene glycosides have already been screened for their capacity to recognize IgM Abs in MS patients' sera (Peroni et al., 2016; Champy-Tixier et al., 2018).

In order to determine whether our Abs recognition model using natural glycosides might offer a suitable alternative to the reverse chemical approach, classically based on synthetic libraries, we decided to extend the range of molecules tested to triterpene saponins from the Sapindaceae family. The saponin-rich, poorly studied species *Blighia welwitschii* (Hiern) Radlk., was thus selected as potentially containing numerous and original triterpene glycosides. Moreover, previous studies on the *Blighia* genus have demonstrated the occurrence of oligosaccharides including terminal glucose units, a structure often associated with autoAbs recognition in MS. Therefore, if terminal glucose units of *Blighia* saponins are as well recognized as glucose in CSF114(Glc) or GAGA4, the transfer of the reverse chemical approach to natural glycosides could be validated, thus paving the way to test structures that have never been tested before. If extended to a large number of glycans, this strategy would help identify patterns which are specific or more often recognized in MS patients' sera, providing valuable insights regarding its pathogenesis.

2. Results and discussion

A crude saponin extract obtained from the fruit pericarp of *B. welwitschii* was subjected to successive chromatographic techniques such as Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) affording twelve pure compounds (see 4.3. Extraction and isolation). Their structure elucidation was carried out using spectroscopic techniques including 600 MHz 2D NMR (^1H - ^1H COSY, TOCSY, ROESY and ^1H - ^{13}C HSQC, HMBC) as well as ESI and HRESIMS (positive-ion mode), revealing seven previously undescribed compounds (1-7). The five remaining compounds, were identified by comparison of their spectral data to literature values, as 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin (bighoside A) purified from *Blighia sapida* (Mazzola et al., 2011), 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin, 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester isolated from *Blighia unijugata* (Petit et al., 2019) and 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (giganteaside J) from *Cephalaria gigantea* (Zvidadze et al., 1980).

Compounds 1-7 were isolated as white amorphous powders. GC

analysis (Hara et al., 1987; see 4.5 Acid hydrolysis and GC analysis) and extensive 1D and 2D NMR spectroscopy of each compound allowed the identification of the sugar units as β -D-glucopyranosyl (Glc), β -D-xylopyranosyl (Xyl), α -L-arabinopyranosyl (Ara) and α -L-rhamnopyranosyl (Rha) for 6 and 7 and Glc, Ara and Rha for 1-5. The relatively large anomeric coupling constant values of glucose, xylose and arabinose (6.0-9.0 Hz) in their pyranose form indicated a β -anomeric orientation for glucose (Ono et al., 2006) and xylose (Yoshimitsu et al., 2006), and an α -anomeric orientation for arabinose (Ishii et al., 1981). The large $^1J_{\text{H}1-\text{C}1}$ value of rhamnose (167 Hz) confirmed that the anomeric proton was equatorial in its α -pyranoid form (Mimaki et al., 2004).

The HRESIMS of compound 1 established its molecular formula as $\text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{O}_{18}$. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at m/z 977 indicating a molecular weight of 954. The aglycone part of 1 was characterized as hederagenin ((3 β)-3,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid) (Rezgui et al., 2016). The chemical shift observed at δ_{C} 180.2 (C-28), a typical value for a free carboxylic acid function, and the deshielded signal at δ_{C} 80.9 (C-3) suggested compound 1 to be a monodesmosidic triterpene saponin.

Downfield cross-peaks in the HSQC spectrum of 1 at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz)/104.2, 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz)/105.9 and 6.19 (br s)/101.0 were attributed to three anomeric protons and carbons, suggesting the presence of three sugar monomers (see Table 2). Typical TOCSY and HSQC cross-peaks led to the identification of one Ara (Ara I), one Rha and one Glc (Glc I). The presence of an acetyl moiety was also confirmed by the signal at δ_{H} 2.05 (s, 3H), corresponding to methyl protons, and linked on the HMBC spectra to δ_{C} 171.1, a typical signal for an acetyl carbonyl function (Ac C=O).

The linkages between these three sugars and the position of the acetyl function were established using HMBC and ROESY spectra. The HMBC correlation between the anomeric proton at δ_{H} 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1) and the aglycone carbon at δ_{C} 80.9 (C-3) together with the ROESY correlation at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ 5.14 (d, $J = 6.6$ Hz) (Ara I-1)/4.26 (H-3) confirmed the glycoside linkage of Ara I at the C-3 position of the aglycone. Furthermore, the HMBC cross-peak at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.56 (t, $J = 7.2$ Hz) (Ara I-2)/101.0 (Rha-1) suggested the (1 \rightarrow 2) linkage between Rha and Ara I, which was confirmed by the ROESY cross-peak at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ 4.56 (t, $J = 7.2$ Hz) (Ara I-2)/6.19 (br s) (Rha-1). The correlations in the HMBC and ROESY spectra at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/82.9 (Rha-3) and at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc I-1)/4.73 (dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz) (Rha-3) proved the (1 \rightarrow 3) linkage between Glc I and Rha. Finally, the acetyl moiety was found to be linked at Glc I-6, as it was confirmed by the deshielded signals at δ_{H} 4.81 (dd, $J = 10.8, 2.6$ Hz) and δ_{H} 4.68 for H_a, H_b -Glc I-6. On the basis of above results, the structure of 1 was established as 3-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin.

Extensive analyses of 2-7 NMR data allowed the characterization of their aglycone as hederagenin (see Table 1).

Based on its HRESIMS, the molecular formula of compound 2 was established as $\text{C}_{61}\text{H}_{98}\text{O}_{28}$. The ESIMS (positive-ion mode) spectrum showed a quasi-molecular ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at m/z 1301 indicating a molecular weight of 1278. The ^1H NMR spectrum of 2 displayed the signals of five anomeric protons at δ_{H} 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.08 (d, $J = 6.6$ Hz), 5.40 (d, $J = 7.8$ Hz), 6.15 (br s) and 6.22 (d, $J = 8.4$ Hz), whose HSQC spectrum correlations were observed at δ_{C} 104.5, 104.5, 105.9, 101.2 and 95.3, respectively. After further investigation of 2D NMR data of 2, these anomeric signals were attributed to three Glc (Glc I, Glc II and Glc III), one Ara (Ara I) and one Rha. An acetyl moiety was also identified, as ascertained by the HMBC cross-peak at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1.99 (s, 3H)/171.2. In depth 2D NMR analyses of 2 demonstrated that a great part of the molecule was similar to 1. In fact, a common structural pattern identified as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin was shared by both compounds as demonstrated by superimposable NMR signals (Tables 1

Table 1

NMR spectroscopic data of the aglycone moieties of compounds 1–7 in pyridine- d_5 (δ in ppm, J in Hz). Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity, nd: not determined.

No.	1		2		3		4		5		6		7	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38.7	1.53 m 1.04 m	38.5	1.53 m 1.04 m	40.2	1.54 m 1.04 m	38.8	1.54 m 1.04 m	39.7	1.53 1.03 m	39.1	1.52 m 1.03 m	38.2	1.53 m 1.02
2	26.1	2.20 m 1.96	26.2	2.20 m 1.97	27.3	2.20 m 1.99	26.1	2.20 m 1.99	25.9	2.19 m 1.99	26.0	2.19 m 1.96	26.0	2.20 m 1.96
3	80.9	4.26	81.1	4.23	82.5	4.24	81.0	4.26	81.0	4.24	80.9	4.24	81.5	4.23
4	43.3		43.3		43.4		43.3		43.3		43.3		43.3	
5	47.4	1.73	47.3	1.72	49.4	1.71	47.4	1.72	47.3	1.70	47.2	1.71	47.5	1.72
6	18.2	1.75	17.9	1.74	19.3	1.71	18.2	1.70	18.0	1.70	17.9	1.68	18.0	1.69
7	32.6	1.66 ddd (13.4, 12.6, 5.5)	32.5	1.66 m	33.7	1.66 ddd (13.6, 10.2, 6.0)	32.5	1.65	32.5	1.61 m	32.6	1.60 m	32.5	1.62 td (13.8, 3.4)
		1.24		1.31		1.31		1.31		1.26		1.26		1.27
8	39.5		39.7		41.1		39.5		39.7		39.7		39.9	
9	47.9	1.77	47.9	1.76	49.8	1.76	47.9	1.76	47.9	1.73	48.0	1.74	47.9	1.75
10	36.6		36.6		38.1		36.7		36.6		36.6		36.6	
11	23.4	2.06	23.7	1.94	24.9	1.96	23.6	1.96	23.6	1.93	23.4	1.94	23.5	1.94
		1.92		1.91		1.91		1.90		1.89		1.87		1.88
12	122.5	5.47	122.6	5.42 t-like	124.0	5.44	122.8	5.44 t-like	122.5	5.40	123.1	5.41	122.0	5.40 t-like
13	144.0		nd		145.4		nd		144.0		144.0		nd	
14	41.9		41.9		42.9		41.9		41.9		41.9		41.9	
15	28.1	nd	28.0	2.27 m	29.5	2.27 ddd (13.6, 12.9, 6.2)	28.0	2.26 td (14.3, 6.4)	28.0	2.26 td (14.5, 4.3)	28.1	2.26 m	28.0	2.26 td (13.8, 3.4)
		1.12 m		1.14 m		1.14 m		1.13		1.07		1.09		1.09
16	23.6	nd	23.1	2.04 m	24.5	2.02	23.5	2.04	23.4	2.01 m	23.2	2.01	23.4	2.02 m
		1.92		1.94		1.94		1.93		1.91		1.92		1.92
17	46.5		46.9		nd				46.8		46.8		46.8	
18	41.7	3.26 dd (15.0, 4.7)	41.7	3.16	42.9	3.18 dd (13.6, 6.1)	41.7	3.18 dd (14.3, 4.3)	41.4	3.16 dd (14.4, 5.7)	41.5	3.16 dd (14.1, 4.9)	40.5	3.16 dd (13.8, 4.8)
19	46.2	1.76	46.0	1.71	47.5	1.73	46.0	1.72	46.0	1.70	46.0	1.68	46.0	1.69
		1.25		1.20		1.23		1.22		1.20		1.20		1.20
20	30.7		30.5		31.9		30.5		30.5		30.5		30.5	
21	34.0	1.40 td (15.0, 5.5)	33.9	1.30	34.3	1.33	33.7	1.34	34.0	1.30	33.8	1.28	34.0	1.31
		1.18 m		1.11		1.14		1.15		1.10		1.08		1.12
22	33.0	1.99 m	32.2	1.88 td (15.6, 5.2)	33.7	1.89 td (13.6, 5.4)	32.3	1.88 td (13.6, 5.0)	32.4	1.87 td (14.5, 3.6)	32.5	1.86 td (14.1, 4.9)	32.2	1.88 ddd (13.8, 12.4, 3.4)
		1.79		1.76		1.76		1.75		1.75		1.74		1.75
23	63.7	4.21 3.89 d (11.4)	63.6	4.25 3.88 d (11.4)	65.0	4.24 3.87 d (10.8)	63.7	4.20 3.88 d (10.8)	63.7	4.22 3.85	63.6	4.23 3.85	63.9	4.23 3.86 d (11.4)
24	13.8	1.07 s	13.8	1.08 s	15.2	1.08 s	13.8	1.09 s	13.8	1.09 s	13.8	1.09 s	13.8	1.08 s
25	15.8	0.92 s	16.0	0.97 s	17.4	0.98 s	16.0	0.98 s	16.0	0.96 s	16.0	0.96 s	16.0	0.96 s
26	17.3	1.00 s	17.3	1.11 s	18.8	1.11 s	17.3	1.10 s	17.3	1.10 s	17.3	1.10 s	17.3	1.09 s
27	26.0	1.24 s	25.9	1.21 s	27.0	1.22 s	25.9	1.21 s	25.9	1.18 s	25.9	1.18 s	25.9	1.18 s
28	180.2		176.7		176.7		176.6		176.4		176.5		nd	
29	33.0	0.92 s	32.9	0.87 s	34.3	0.90 s	32.9	0.90 s	32.9	0.85 s	32.9	0.85 s	32.9	0.86 s
30	23.6	0.99 s	23.5	0.89 s	24.9	0.92 s	23.5	0.92 s	23.5	0.87 s	23.4	0.86 s	23.5	0.88 s

and 2). The two Glc monomers (Glc II and Glc III), as yet unassigned, were found to form a gentiobiosyl unit (Glc-(1 → 6)-Glc) linked at C-28 of the aglycone by an ester bond. This assumption was confirmed by several spectral evidence such as the HMBC and ROESY cross-peaks at δ_H/δ_C 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc III-1)/69.2 (Glc II-6) and at δ_H/δ_H 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz) (Glc III-1)/4.34 (Glc II-6), as well as the shielded C-28 at δ_C 176.7, in agreement with an esterification at this position. Finally, the acetyl function was found to be linked to Glc III-6 as confirmed by the HMBC correlation at δ_H/δ_C 4.68 (Glc III-6)/171.2 (Ac C=O). The structure of compound 2 was thus characterized as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 → 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 → 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound 3 established its molecular formula as $C_{57}H_{104}O_{21}$. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1427 indicating a molecular weight of 1404. Compound 3 was in a greater extent similar to compound 2. A structural pattern, identified as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 → 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-

glucopyranosyl-(1 → 6)- β -D-glucopyranosyl ester was similar in both compounds according to a comparative analysis of their NMR data (see Tables 1 and 2). A thorough analysis of 3 and 2 spectra suggested that the two isolates differed by the number and the position of acetyl moieties. Indeed, spectroscopic data of 3 indicated the presence of four acetyls. This postulate was first supported by ESIMS data showing that the molecular weight of 3 was 126 mass units higher than 2, corresponding to three additional acetyl moieties. 2D NMR data confirmed this assumption as four HMBC cross-peaks at δ_H/δ_C 2.01 (s)/172.2, 2.06 (s)/172.1, 2.09 (s)/172.4 and 2.10 (s)/171.7 (3H each) were observed. Acetylated Glc were quite often reported in *Bignonia* saponins which led us to focus our investigations on the three Glc units of compound 3. A first acetylation occurring on Glc I was confirmed by the HMBC cross-peak at δ_H/δ_C 5.81 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz) (Glc I-3)/172.2 (Ac C=O). The deshielded signal at δ_H 5.81 was clearly attributed to Glc I-3 from the COSY and TOCSY cross peaks starting from the anomeric proton of Glc I at δ_H 5.45 (d, $J = 7.8$ Hz). A second acetyl moiety was located at Glc III-4 on the basis of a HMBC cross-peak at δ_H/δ_C 5.40 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz) (Glc III-4)/171.7 (Ac C=O). Like above, this attribution was

Table 2

No.	1		2		3		4		5		6		7	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
Ara I														
1	104.2	5.14 d (6.6)	104.5	5.08 d (6.6)	105.6	5.08 d (6.6)	104.2	5.15 d (6.0)	104.7	5.05 d (6.0)	104.4	5.05 d (6.6)	104.5	5.06 d (6.6)
2	75.3	4.56 t (7.2)	75.6	4.50	77.0	4.50 dd (8.7, 6.6)	75.1	4.56 t (7.2)	75.1	4.51 dd (8.4, 6.0)	75.2	4.52 dd (8.4, 6.6)	74.9	4.51 dd (8.4, 6.6)
3	74.0	4.13 dd (8.1, 3.9)	74.1	4.09 dd (7.8, 3.6)	75.5	4.09 dd (8.7, 3.9)	74.0	4.14	74.1	4.02 dd (8.4, 3.0)	74.4	4.03 dd (8.4, 3.9)	74.2	4.04 dd (8.4, 3.6)
4	69.0	4.23	69.3	4.21	70.4	4.20	69.0	4.24	69.1	4.16	69.0	4.17	69.5	4.17
5	65.4	4.30	65.9	4.25	67.2	4.26	65.0	4.31 dd (12.3, 3.9)	65.7	4.24	65.7	4.24	65.8	4.25
		3.75 br d (10.8)		3.71 br d (10.2)		3.70 br d (10.2)		3.76 br d (10.2)		3.67 br d (10.8)		3.67 br d (10.8)		3.70
Rha														
1	101.0	6.19 br s	101.2	6.15 br s	102.6	6.16 br s	100.9	6.19 br s	101.4	6.19 br s	101.1	6.20 br s	101.1	6.18 br s
2	71.0	4.92 br s	71.2	5.04 br s	72.5	5.03 br s	71.0	4.92 br s	71.1	4.94 br s	71.2	4.95 br s	71.0	4.96 br s
3	82.9	4.73 dd (9.6, 3.0)	82.3	4.81 dd (9.6, 3.6)	83.6	4.81 dd (9.0, 2.8)	82.8	4.73 dd (9.6, 3.0)	83.8	4.76 dd (9.6, 3.8)	83.1	4.77 dd (10.2, 3.7)	82.8	4.77 dd (9.6, 3.6)
4	72.3	4.45 dd (9.6, 9.0)	72.3	4.47	73.5	4.45	72.1	4.45 dd (9.6, 9.0)	72.4	4.44	72.4	4.46	72.2	4.46 dd (9.6, 9.0)
5	69.3	4.68	69.6	4.66 m	70.9	4.66 m	69.5	4.67	69.3	4.66 dq (10.8, 5.4)	69.4	4.67	69.8	4.67 dq (11.4, 6.0)
6	18.2	1.58 d (6.6)	18.2	1.58 d (6.0)	19.6	1.56 d (6.6)	18.2	1.58 d (6.6)	18.2	1.55 d (6.0)	18.2	1.55 d (6.0)	18.2	1.56 d (5.4)
Glc I														
1	105.9	5.32 d (7.8)	105.9	5.40 d (7.8)	107.0	5.45 d (7.8)	105.8	5.31 d (7.8)	106.0	5.37	106.0	5.26 d (7.4)	105.8	5.36 d (8.4)
2	75.1	4.09 dd (9.0, 7.8)	75.3	4.13	74.6	4.13 dd (10.2, 7.8)	75.1	4.10 dd (9.0, 7.8)	75.1	4.10	75.0	4.09	74.9	4.10
3	77.6	4.20	77.6	4.21	80.2	5.81 dd (10.2, 9.6)	77.6	4.20	75.8	4.20 dd (10.8, 9.0)	75.5	4.19	75.5	4.17
4	70.9	4.03 dd (9.6, 9.0)	71.2	4.15	70.4	4.20	71.9	4.02	80.0	4.29 dd (9.6, 9.0)	79.9	4.29	80.5	4.30 t (8.4)
5	74.9	3.99 m	78.0	3.97	79.1	3.96 m	74.9	3.99 m	76.4	3.84	76.4	3.84	76.8	3.84 m
6	64.2	4.81 dd (10.8, 2.6)	62.1	4.46	63.0	4.45 br d (9.6)	64.2	4.81 br d (10.2)	61.3	4.46	60.8	4.48	61.3	4.47
		4.68		4.26		4.26		4.69		4.39 br d (10.8)		4.40		4.40 br d (10.2)
3-OAc														
					22.5	2.01 s								
					172.2									
6-OAc														
	20.6	2.05 s					20.5	2.07 s						
	171.1						171.2							
Ara II														
1								106.0	4.99 d (7.2)	104.7	5.04 d (7.8)	104.6	5.03 d (7.8)	
2								72.4	4.44	71.1	4.57 dd (9.6, 7.8)	71.0	4.57 dd (9.6, 7.8)	
3								73.6	4.12	83.1	4.12	83.3	4.12	
4								69.1	4.22	68.7	4.37 br s	69.0	4.38 br s	
5								67.4	4.22	67.2	4.20	67.0	4.21	
									3.73 br d (11.4)		3.76 br d (11.4)		3.77 br d (12.0)	
Xyl														
1										106.3	5.18 d (7.2)	106.2	5.18 d (7.2)	
2										74.7	4.01 dd (7.8, 7.2)	74.6	3.98 t (7.2)	
3										77.6	4.18	77.7	4.17	
4										71.1	4.18	70.8	4.17	
5										66.8	4.29	66.8	4.31	
											3.69 dd (11.4, 10.8)		3.70 dd (14.3, 10.7)	
Glc II														
1		95.3	6.22 d (8.4)	96.7	6.20 d (8.4)	95.3	6.21 d (9.0)	95.3	6.22 d (7.8)	95.4	6.22 d (8.4)	95.3	6.22 d (8.4)	
2		73.5	4.15	74.8	4.14	73.4	4.14	73.6	4.12	73.5	4.13 dd (9.0, 8.4)	73.5	4.12	
3		78.0	4.25	79.6	4.26	78.1	4.25	78.1	4.24	78.0	4.23	78.7	4.25	
4		70.3	4.34 dd (9.6, 9.0)	71.7	4.26	70.3	4.25	70.5	4.33	70.3	4.35 dd (9.6, 9.0)	70.6	4.32	
5		77.6	4.11	78.9	4.14	77.6	4.13	77.7	4.12	77.6	4.08	77.6	4.10	
6		69.2	4.71 br d (12.6)	70.5	4.70 br d (9.6)	69.3	4.70	69.0	4.71 br d (10.2)	68.8	4.70 br d (10.2)	69.0	4.71 br d (10.2)	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

No.	1		2		3		4		5		6		7	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
			4.34		4.35		4.35		4.34		4.33		4.34 br d (10.2)	
Glc III														
1			104.5	4.99 d (7.8)	105.6	5.09 d (8.4)	104.2	5.10 d (7.8)	105.2	5.00 d (7.8)	104.7	5.00 d (8.4)	104.6	4.96 d (8.4)
2			74.5	4.00	73.3	4.02 dd (9.0, 8.4)	70.9	4.04	74.6	3.99 dd (9.0, 7.8)	74.7	3.99	74.9	4.01 dd (10.2, 8.4)
3			77.6	4.21	77.2	5.69 dd (9.6, 9.0)	75.8	5.69 dd (10.2, 9.0)	77.7	4.18 dd (9.6, 9.0)	77.6	4.18	77.7	4.17
4			71.1	4.02	70.9	5.40 dd (10.2, 9.6)	69.3	5.40 dd (10.2, 9.6)	71.0	4.01 dd (9.6, 9.0)	71.1	4.18	71.0	4.01
5			74.7	3.94 m	73.3	4.02 m	70.9	4.04 m	74.8	3.94 m	78.0	3.87 m	74.6	3.94 m
6			64.5	4.83 br d (10.8)	63.9	4.60 dd (12.0, 4.8)	62.5	4.61 dd (12.6, 4.8)	64.4	4.85 br d (9.6, 4.8)	62.2	4.45	64.3	4.85 dd (9.6, 2.8)
				4.68		4.36		4.38		4.68		4.29		4.68
3-OAc					21.9	2.09 s		20.5	2.08 s					
					172.4			170.6						
4-OAc					21.9	2.10 s		20.5	2.09 s					
					171.7			170.2						
6-OAc			20.6	1.99 s	22.1	2.06 s	20.5	2.06 s	20.5	1.96 s			20.6	1.97 s
			171.2		172.1		170.8		170.9			171.0		

confirmed by TOCSY cross-peaks between Glc III-4 and Glc III-1, 2, 3 and 5. The deshielded signal at δ_{H1} 5.69 (dd, $J = 9.6, 9.0$ Hz) (Glc III-3) was the sign of a third acetyl function, despite the HMBC correlation between Glc III-3 and 3-O Ac could not be seen. The location of this acetylation on Glc III-3 was also confirmed by TOCSY cross-peaks to Glc III-1, 2, 4 and 5 as demonstrated earlier for Glc I-3 and Glc III-4. Finally, the fourth acetyl moiety was established at Glc III-6 by the HMBC correlation at δ_{H1}/δ_{C1} 4.60 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz) (Glc III-6)/172.1 (Ac C=O). The attribution of Glc III-6 at δ_{H1} 4.60, and therefore the position of the acetyl, was allowed by a TOCSY cross-peak at δ_{H1}/δ_{H1} 4.60 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz) (Glc III-6)/4.02 (m) (Glc III-5). In addition to these spectral evidences, the δ_{H1} values proposed for Glc III-3,4 and 6 are in accordance with literature values for Glc units in a similar chemical environment and experimental conditions (Kitagawa et al., 1988). The structure of compound 3 was thus determined as 3-O-(3-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-(3,4,6-tri-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound 4 established its molecular formula as $C_{27}H_{104}O_{31}$. Its ESIMS (positive-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1427 indicating a molecular weight of 1404. After a first examination of its spectral data, it appeared evident that the structure of 4 was very close to 3. First, their similar ESIMS values suggested an identical number of sugar and acetyl units. Second, their 2D NMR data are almost superimposable and suggested a difference in acetyl position on Glc monomers (see Table 2). This difference was easily identified in the 1H NMR spectrum as 4 lacked a downfield signal at δ_{H1} 5.81 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz), previously attributed to Glc I-3 in 3. In contrast, Glc I-6 was clearly deshielded in 4 when compared to its analogue in 3 (see S1, supporting information). This suggests the acetyl moiety linked at Glc I-3 in 3 to be located at Glc I-6 in 4. This hypothesis was confirmed by observation of a HMBC cross-peak at δ_{H1}/δ_{C1} 4.69 (Glc I-6)/171.2 (Ac C=O). According to the above results, the structure of compound 4 was established as 3-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-(3,4,6-tri-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

HRESIMS of compound 5 established its molecular formula to be $C_{26}H_{106}O_{32}$. Its ESIMS showed a positive quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1433, indicating a molecular weight of 1410. The 1H

NMR spectrum of 5 displayed six anomeric proton signals at δ_{H1} 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 5.00 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.05 (d, $J = 6.0$ Hz), 5.37, 6.19 (br s) and 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz) correlating in the HSQC spectrum with signals at δ_C 106.0, 105.2, 104.7, 106.0, 101.4 and 95.3, respectively. From these anomeric signals, three Glc (Glc I, II and III), two Ara (Ara I and II) and one Rha units were identified using TOCSY and HSQC spectra. A typical acetyl signal was also observed at δ_{H1}/δ_{C1} 1.96 (s, 3H)/170.9 on the HMBC spectrum. After comparison of spectral data of 5 and 2, the two isolates were shown to differ regarding the terminal part of their oligosaccharide chains at C-3 of the aglycone. Indeed, 5 exhibited an additional Ara unit, named Ara II, and linked to Glc I-4, as demonstrated by HMBC and ROESY cross-peaks at δ_{H1}/δ_{C1} 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/80.0 (Glc I-4) and δ_{H1}/δ_{H1} 4.99 (d, $J = 7.2$ Hz) (Ara II-1)/4.29 (dd, $J = 9.6, 9.0$ Hz) (Glc I-4). The structure of compound 5 was thus determined as 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

According to its HRESIMS, compound 6 molecular formula was established to be $C_{26}H_{112}O_{32}$. The ESIMS (positive-ion mode) spectrum showed a quasi-molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 1523 indicating a molecular weight of 1500. Its HSQC spectrum in the anomeric region, was characterized by seven cross-peaks at δ_{H1}/δ_{C1} 5.00 (d, $J = 8.4$ Hz)/104.7, 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz)/104.7, 5.05 (d, $J = 6.6$ Hz)/104.4, 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz)/106.3, 5.26 (d, $J = 7.4$ Hz)/106.0, 6.20 (br s)/101.1 and 6.22 (d, $J = 8.4$ Hz)/95.4, suggesting the presence of seven sugar monomers identified as three Glc (Glc I, II and III), two Ara (Ara I and II), one Rha and one Xyl. An extensive 2D NMR comparative analysis showed that 6 differed from 5 in which it exhibited an additional Xyl unit and lacked an acetyl moiety. This assumption is coherent with ESIMS data, as 6 assumed 90 additional mass units corresponding to a pentose (+132) minus an acetyl moiety (-42). The Xyl unit was finally located at the terminal position of the C-3 oligosaccharide using HMBC and ROESY correlations at δ_{H1}/δ_{C1} 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/83.1 (Ara II-3) and at δ_{H1}/δ_{H1} 5.18 (d, $J = 7.2$ Hz) (Xyl-1)/4.12 (Ara II-3). Accordingly, the structure of compound 6 was elucidated as 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

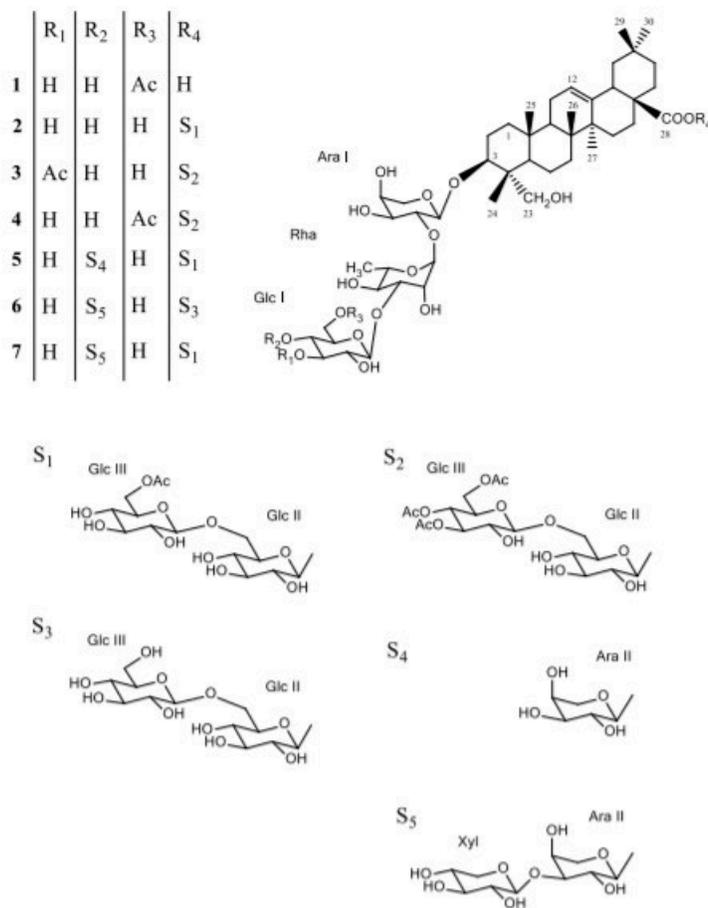


Fig. 1. Structures of new triterpene saponins 1–7 isolated from the fruits of *B. welwitschii*.

The HRESIMS of compound 7 established its molecular formula as $C_{71}H_{114}O_{36}$. Its ESIMS (positive-ion mode) spectrum showed a quasi-molecular ion peak $[M+Na]^+$ at m/z 1565 indicating a molecular weight of 1542. Compound 7 molecular weight was 42 mass units higher than 6 suggesting the presence of an acetyl moiety. This was confirmed by observation of a cross-peak at δ_H/δ_C 1.97 (s, 3H)/171.0 in the HMBC spectrum. In addition, HSQC cross-peaks at δ_H/δ_C 4.85 (dd, $J = 9.6, 2.8$ Hz)/64.3 and at 4.68/64.3, showing proton and carbon downfield shifts, suggested the acetyl moiety to be located at Glc III-6 (see S1 and S2, supporting information). This hypothesis was confirmed by a HMBC correlation between δ_H 4.68 (Glc III-6) and δ_C 171.0 (Ac C=O). Apart the acetyl moiety linked at Glc III-6, the NMR signals of compounds 7 and 6 are almost superimposable (see Tables 1 and 2). The structure of compound 7 was thus established as 3-O- β -D-

xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-(6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

From a phytochemical point of view, the aforementioned compounds 1–7 exhibited structures that are highly consistent with previous work carried out on *Blighia* species. The occurrence of the glycoside sequence Ara-(1 \rightarrow 4)-Glc-(1 \rightarrow 3)-Rha-(1 \rightarrow 2)-Ara at C-3 of hederagenin, previously found in other *Blighia* species, and apparently specific to this genus, was found again in compounds 5–7. Similarly, the gentiobiosyl at C-28 appeared to be a very conserved pattern in *Blighia* bidesmoside saponins considering its prevalence in former studies and in 2–7 (Penders and Delaude, 1989, 1994; Mazzola et al., 2011; Petit et al., 2019). These data confirmed the chemotaxonomic coherence of

the genus as well as its classification in the Sapindoideae subfamily as mentioned in our former study on *B. unijugata*. In addition, two surprising polyacetylated oligosaccharide chains were found in **3** and **4**. These two products exhibited a 3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl unit, an extremely rare sugar monomer in triterpene saponins. Triacetylated sugars have long been restricted to steroidal saponins, in which 3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl, 2,3,4-tri-*O*-acetyl-Rha and recently, 3,4,6-tri-*O*-acetyl-Glc were found from *Ruscus*, *Dracaena* and *Solanum* genera (Mimaki et al., 1998; Tang et al., 2014; Tchoupan et al., 2017). Regarding triterpene saponins, polyacetylated sugar monomers such as 2,3,4-tri-*O*-acetyl-Xyl and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-Glc, were so far limited to soyasaponins A of *Glycine max* (Kitagawa et al., 1988). The occurrence of such structures in *B. welwitschii* was therefore unexpected and led us to consider the possible artifact origin of **3** and **4**. Particular attention was given to their purification process, which includes a combination of extraction, MPLC and HPLC techniques. The extraction and MPLC steps involve conditions that are not linked with any acetylated artifact formation, and are therefore excluded (Zeng et al., 2015). Further concerns can be expressed regarding the HPLC step, as ACN-derived acetylation of sugars could theoretically occur in the aqueous acidic conditions allowed by TFA supplementation of the mobile phase. This reaction would involve the formation of protonated acetamides which are not easily formed in the conditions of low temperature (room temperature, < 20 °C) and low TFA concentration (0.01%) used in this study (Lei et al., 2016). Furthermore, there are other studies in which similar conditions were used and no acetylated glycosides were isolated, demonstrating the small likelihood of the latter reaction to take place in our experimental conditions (Pertuit et al., 2018a, b). This suggests that **3** and **4** are most probably native, especially as naturally acetylated triterpene glycosides are common in the Sapindaceae family, to which *Blighia* species belong (Montes et al., 2014). In addition, mono- and di-acetylated Glc units have been found in *Blighia* saponins at C-3, C-4 and C-6 positions so that the occurrence of a tri-acetylated Glc at the same positions is plausible (Mazzola et al., 2011; Petit et al., 2019).

After isolation and structure determination, compounds **2**, **6**, **7**, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (giganteaside J) and 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin (abbreviated as hederagenin monodesmoside for clarity in Figs. 2 and 3) from *B. welwitschii*, were tested for their capacity to recognize IgM Abs in the sera of MS and control patients by ELISA. Another saponin from *Olea obtusifolia* (Oleaceae), isolated and characterized in our laboratory as oleanolate 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (abbreviated as Glc oleanolate for clarity in Figs. 2 and 3), was used as a reference compound due to the simplicity of its glycoside part, in comparison to *Blighia* saponins (Pertuit et al., 2018b). This would address structure-activity issues raised by previous studies, regarding the effect of the size of the oligosaccharides tested (Peroni et al., 2016; Champy-Tixier et al., 2018). Therefore, this set of compounds was selected to screen the effect of various structural features such as the length of the sugar chain, the number and position of Glc monomers as well as acetyl moieties (see Fig. 1). In parallel, the synthetic peptides CSF114(Glc) and CSF114 were used as positive and negative control antigens, respectively. IgM measurements and statistical analyses were performed separately for saponins and peptides due to the slightly different ELISA conditions, optimized for each compound class. Data distributions of CSF114(Glc) and CSF114 were compared using a Mann-Whitney *U* test whereas natural glycoside distributions were analyzed using a Kruskal Wallis *H* test, including Dunn's multiple comparisons, after normality of the overall data set was rejected by Shapiro-Wilk normality test ($\alpha = 0.05$).

Antibody levels in the sera of patients with MS, against the two peptide probes, and the natural glycosides presented above, are displayed in Fig. 2. First, the graphical representation reveals the

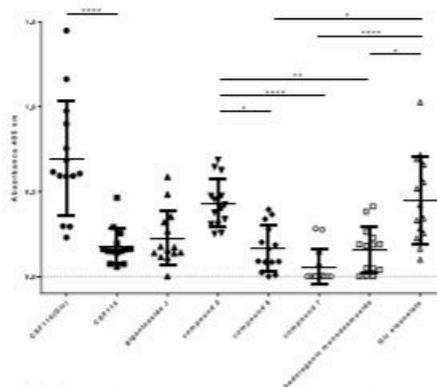


Fig. 2. Data distribution of IgM antibody responses to saponins **2**, **6**, **7**, hederagenin monodesmoside and giganteaside J from *B. welwitschii*, in MS patients' sera, determined by ELISA. CSF114(Glc) and its unglycosylated analogue, CSF114, were tested as positive and negative controls, respectively. Glc oleanolate from *O. obtusifolia*, whose glycoside part is significantly different from *B. welwitschii* saponins, was tested as a reference compound. Data are reported as absorbance at 405 nm of sera diluted 1:100. Horizontal lines represent mean values with their SD. Mann-Whitney *U* test showed that the CSF114(Glc) distribution significantly differs from that of CSF114 (p value < 0.0001, two-tailed). Kruskal-Wallis test including multiple comparison of natural glycosides distributions showed statistical differences between compound **2** and **6** (p value < 0.05), **2** and **7** (p value < 0.0001), **2** and hederagenin monodesmoside (p value < 0.01), Glc oleanolate and hederagenin monodesmoside (p value < 0.05), Glc oleanolate and **7** (p value < 0.0001) and Glc oleanolate and **6** (p value < 0.05).

significant difference between CSF114(Glc) and CSF114 distributions (p value < 0.0001, two-tailed), demonstrating the high reactivity of selected MS patients' sera to the glycosylated peptide CSF114(Glc). This result is not surprising as CSF114 glycopeptides have been structurally optimized for epitope exposition, but it highlights the fundamental role of aberrant glycosylations, especially the Glc moiety, for efficient antibody detection in MS (Lolli et al., 2005a, b; Real Fernández et al., 2015).

Natural glycosides were then compared with each other for their antibody recognition capacity in the sera of patients with MS (Fig. 2). In an initial assessment of the scatter graph, it appeared that a first group of compounds, composed of giganteaside J, **6**, **7** and hederagenin monodesmoside exhibited a low antibody recognition capacity. Compound **2** and Glc oleanolate, on the other hand, formed a second group of compounds demonstrating a significantly higher capacity to recognize IgM according to the multiple comparison analysis (see Fig. 2).

From a structural point of view, compounds **6**, **7** and hederagenin monodesmoside exhibited a similar five-residue oligosaccharide at C-3 of their aglycone, as well as an additional Glc disaccharide at C-28 for **6** and **7** (see Fig. 1). Despite the occurrence of a terminal Glc, a high antibody recognition pattern, for **6** and **7**, their antibody recognition capacity was comparable to hederagenin monodesmoside, exhibiting no terminal Glc, suggesting that long sugar chains at C-3 of **6** and **7** might impair antibody binding (see Fig. 2). This result tends to corroborate hypotheses formulated in previous studies, in which saponins exhibiting long sugar chains, demonstrated a poor capacity to recognize Abs in MS (Peroni et al., 2016; Champy-Tixier et al., 2018). More importantly, similar findings have been reached by peers using a totally different ELISA system, characterized by various glycan antigens

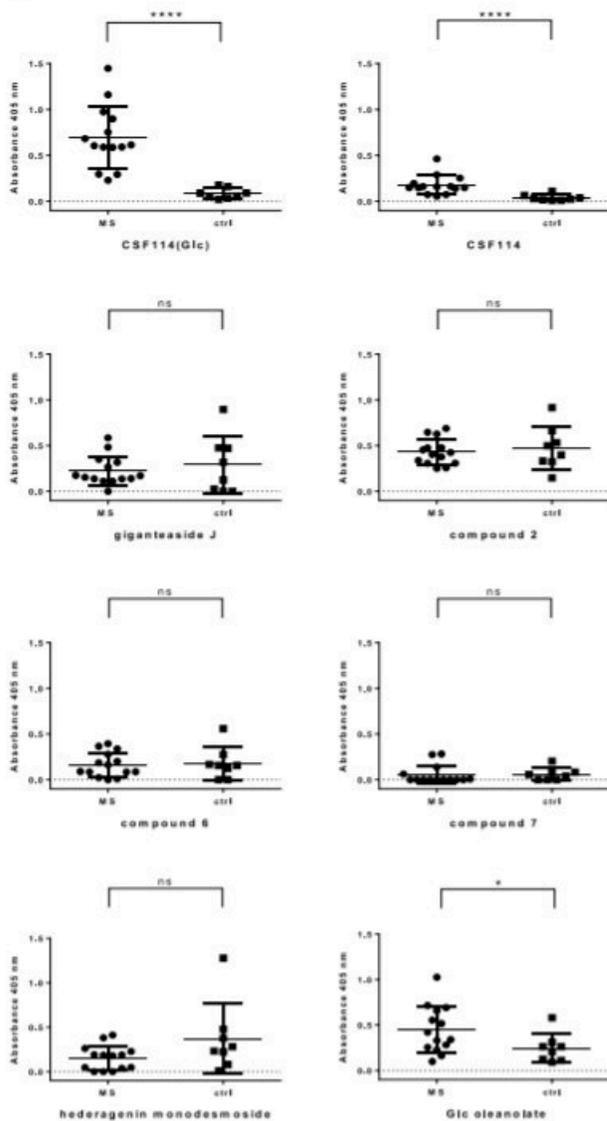


Fig. 3. Data distribution of IgM antibody responses to saponins 2, 6, 7, hederagenin monodesmoside and giganteaside J from *R. wulfschii* as well as Glic oleolate from *O. obtusifolia*, in the sera of multiple sclerosis (MS) and ctrl patients, determined by ELISA. CSF114(Glc) and the unglycosylated peptide CSF114 were tested as controls. Data are reported as absorbance at 405 nm of sera diluted 1:100. Horizontal lines represent mean values with their SD. Mann-Whitney U test showed that MS and ctrl distributions significantly differ for CSF114(Glc), CSF114 (p value < 0.0001, two-tailed) and for Glic oleolate (p value < 0.05, two-tailed). In contrast, saponins 2, 6, 7, hederagenin monodesmoside and giganteaside J did not show any statistical differences between the two sera distributions (p value > 0.05, two-tailed).

covalently linked to BSA, which tend to support our ELISA model using natural glycosides (Braganza et al., 2018).

Compound 2 and giganteaside J, on the contrary, presented a smaller three-residue oligosaccharide in C-3, ending by a Glic monomer.

The Glic disaccharide in C-28 was also conserved in those two products, increasing the number of terminal Glic units putatively exposed for antibody recognition (see Fig. 1). Despite their very close structures, 2 demonstrated a higher potency in recognizing Abs than giganteaside J

(see Fig. 2). The only difference between the two isolates being an acetyl function located at C-6 of the terminal Glc at C-28, it could be hypothesized that acetyls on Glc units might affect the antibody recognition potential of natural glycosides in MS. This possibility should be treated with caution, however, as acetylated glycosides have never been tested in previous studies and compounds 6 and 7, which also differed in a single acetyl moiety, showed the opposite tendency (see Figs. 1 and 2). In this context, it would have been interesting to test polyacetylated products such as compounds 3 and 4 to further study the role of acetyls in our antibody recognition model. This was unfortunately not possible because of the rarity of those compounds and the very small amounts that were isolated from the crude extract (see 4.3. Extraction and isolation).

On the other hand, antibody titers against Glc oleanolate were comparable to those of compound 2 and substantially higher than the other *Blighia* glycosides (see Fig. 2). This appears to corroborate the findings of previous studies in which the key role of small glycosides for antibody detection in MS was demonstrated (Peroni et al., 2016; Champy-Tixier et al., 2018). It is not clear if the higher antibody recognition capacity of Glc oleanolate is entirely due to the small size of its sugar moiety and/or the type of bond that linked it to the aglycone. Indeed, Glc oleanolate, exhibiting a single terminal Glc residue linked by an ester bond, displayed a similar antibody recognition capacity to 2, exhibiting a pair of terminal Glc units linked by *O*-glycosidic bonds (see Figs. 1 and 2). This might suggest that a single glucopitope, properly exposed by the means of a suitable linkage, might have a better performance than several epitopes improperly exposed. This reflects structure activity conclusions drawn by other studies using glycopeptide probes, demonstrating that the nature of the linkage that attaches the glycan to its backbone dramatically affects the activity in MS antibody recognition (Nuti et al., 2010).

These results were then compared to antibody levels of control sera (ctrl), for each antigen described above, in order to assess whether the antibody responses discussed above were specific to MS (see Fig. 3). Here, antibody titers between MS patients' sera and ctrl were evaluated using a Mann-Whitney *U* test. A first examination of these data showed that sera antibody responses to both CSF114 peptides were significantly higher in MS patients than in ctrl (*p* value < 0.0001, two-tailed). This clearly confirms the specificity of CSF114(Glc) and CSF114 for IgM recognition in MS. Surprisingly, CSF114 was able to significantly differentiate between the two groups of sera despite the lack of glycoside moiety, but with a 4-fold lower potency, however.

In contrast, no significant differences in antibody titers against *B. welwitschii* saponins were found between MS and ctrl sera (*p* value > 0.05, two-tailed). Antibody responses directed against *B. welwitschii* glycosides, isolated and tested in this study, do not seem to be restricted to MS. This observation tends to limit the use of triterpene saponins as specific mimetic probes for antibody recognition in MS, although their performances differ among compounds tested, and structure activity relationships can be drawn as discussed earlier (see Fig. 2). Glc oleanolate, on the other hand, was capable of distinguishing the two sera populations regarding their levels of IgM Abs (*p* value < 0.05, two-tailed; see Fig. 3). In fact, a sensitivity up to 50.00% at 85.71% specificity (cutoff < 0.216, likelihood ratio 3.50) was calculated using a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. This relatively good sensitivity at a high specificity confirms the surprising behavior of Glc based antigens for Abs recognition in MS.

Glc moieties appeared to be aberrant glycosylations that could not be rationally linked to any CNS native antigens putatively involved in MS such as myelin oligodendrocyte glycoproteins and galactocerebroside, for example (Menge et al., 2005; Brettschneider et al., 2009). Antigens exhibiting α -glucopyranosyl moieties, in contrast, appeared to be much better mimetic probes for the detection of biomarkers in MS as α -glucopyranose is found in the collagen matrix of the blood brain barrier which might constitute, for some authors, a relevant explanation of MS pathogenesis (Freedman et al., 2009; Brettschneider et al., 2009). These

postulates conflicted with other studies demonstrating that high IgM titers against α -glucopyranosyl antigens were found in both MS patients and healthy donors, hampering their use as disease-specific probes for Abs recognition (Huflejt et al., 2009; Braganza et al., 2018). Moreover, the good performances of CSF114(Glc), exhibiting a β -glucopyranose moiety linked to its peptide backbone by an *N*-glycosidic bond, tend to demonstrate the surprising behavior of aberrant glycosylated antigens in MS antibody detection (Lolli et al., 2005a, b; Walvoort et al., 2016). These studies, as well as our results using natural glycosides, have clearly indicated the robustness of β -glucopyranosyl-based antigens for antibody detection in MS, although they do not allow, to the best of our knowledge, to determine whether it is the anomeric conformation and/or the type of linkage that play the critical role.

3. Conclusion

Oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (Glc oleanolate) from *Olea obtusifolia* represents a good example of a structure activity-based selection of natural glycosides for antibody recognition in MS. Its behavior in ELISA strongly supports preliminary hypotheses stating that small glycoside moieties composed of one or two sugars, preferentially Glc monomers, linked to their aglycone by an ester bond are preferentially recognized (Peroni et al., 2016; Champy-Tixier et al., 2018). Variations can now be searched for around this structural pattern with the aim of continuing the structure-based optimization of the antigen. In this regard, the ambiguous effect of acetylated sugars could represent a future line of research, as suggested earlier in this discussion. Despite the efforts made to potentiate natural glycosides for antibody recognition in MS, their performances appeared lower in comparison with synthetic peptides that have been rationally designed and optimized such as CSF114(Glc) (see Fig. 3). Nevertheless, the role of natural glycosides as mimetic probes in antibody detection is not to be underestimated as they might provide complex, rare and stable glycans that would otherwise require advanced chemistry to be synthesized and linked in the desired conformation (Adamo et al., 2014; Braganza et al., 2018). It is undeniable that further research in this area is needed, specifically in the homogenization of the conditions in which synthetic probes and natural products are evaluated. This would allow both types of compounds to be tested and compared uniformly, thus paving the way for more efficient techniques such as microarrays and high-throughput screening.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Optical rotations values, NMR and ESI/HRESIMS spectra were generated and processed as previously described in Petit et al. (2019).

Compound isolation was carried out using MPLC on reversed-phase RP-18 silica gel (Silicycle, 75–200 μ m) and normal-phase silica gel 60 (Merck, 15–40 μ m), with a Büchi device (C-615 pump manager and C-601 pump modules) or an Alltech Model 426 pump, a Büchi glass column (230 mm \times 15 mm or 460 mm \times 15 mm) and a Büchi pre-column (110 mm \times 15 mm). Analytical and semi-preparative HPLC (½ prep HPLC) were carried out on an Agilent 1260 Infinity series device equipped with a RP-18 Phenomenex LUNA column (5 μ m, 100 Å, 250 mm \times 4.60 mm) and a RP-18 Phenomenex LUNA column (5 μ m, 100 Å, 250 mm \times 10.00 mm), respectively. Preparative HPLC (prep HPLC) was performed on a Gilson apparatus (305 and 306 pumps, 25 SC head pump, 805 manometric module, 811C dynamic mixer and UV/VIS-151 detector) equipped with a RP-18 Phenomenex LUNA column (10 μ m, 100 Å, 250 mm \times 21.20 mm). Thin-layer chromatography (TLC, Silicycle) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC, Merck) were carried out on precoated silica gel plates 60F₂₅₄. The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH/H₂SO₄, 50:1).

4.2. Plant material

Fruits of *Blighia welwitschii* (Hiern) Radlk. (Sapindaceae) were collected in 2011 in the botanical garden of Kisantu, Democratic Republic of Congo in conformity with the voucher specimen n° 832, Herbarium L. Pauwels that has been deposited in the botanical garden of Meise (Belgium).

4.3. Extraction and isolation

Dried fruit pericarps of *B. welwitschii* were extracted using the protocol previously reported in Petit et al. (2019). The resulting crude extract was successively chromatographed by MPLC on reversed-phase silica gel (MeOH-H₂O, 60:40 to 70:30, gradient) to give eleven fractions (Fr1-Fr11). Fr5 and Fr9 (38 and 36 mg) were directly subjected to prep HPLC on a RP-18 Phenomenex LUNA column (ACN-0.01% TFA in H₂O, 30:70, isocratic) and provided giganteaside J (12.0 mg), compounds 7 (7.0 mg), 5 (4.0 mg) and 2 (10.0 mg). Fr6 (38 mg) and Fr12 (35 mg) constituents were separated by MPLC on normal-phase silica gel (CHCl₃-MeOH-H₂O, 70:30:5 and 80:20:2, isocratic, respectively) to afford the known 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (3.5 mg), compounds 6 (9.0 mg) and 1 (2.0 mg). Fr7 and Fr8 were pooled together on the basis of similar HPLC and TLC profiles to give fraction Fr78 (88 mg). The latter was first subjected to normal-phase silica gel MPLC (CHCl₃-MeOH-H₂O, 70:30:5, isocratic), followed by the same method in slightly different conditions (CHCl₃-MeOH-H₂O, 80:20:2, isocratic), providing the known 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin (11.0 mg) and its acetylated counterpart 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-3-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin (5.0 mg). The less polar products were then targeted as they remained unpurified. A series of normal-phase silica gel MPLC on the crude extract (CHCl₃-MeOH-H₂O, 85:15:1, isocratic) led to eleven fractions called FrA to FrK. Fractions FrB, FrH and FrI were pooled (8.8 mg) and then subjected to 1/2 prep HPLC on a RP-18 Phenomenex LUNA column (ACN-0.01% TFA in H₂O, 36:64, isocratic) to give compounds 3 (2.5 mg) and 4 (3.5 mg). The known blighoside A (3.8 mg) was finally obtained from FrK (8.8 mg) using the same technique that yielded FrA to FrK from the crude extract.

4.4. Compound characterization

4.4.1. 3-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin (1)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} + 9.0$ (c 0.20, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 977 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 977.5082 [M+Na]⁺ (calcd. for C₆₀H₇₈O₁₃Na, 977.5086).

4.4.2. 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (2)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -100.0$ (c 0.03, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1301 [M+Na]⁺, *m/z* 1323 [M+H+2Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1301.6140 [M+Na]⁺ (calcd. for C₆₁H₇₆O₂₈Na, 1301.6142).

4.4.3. 3-O-(3-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-(3,4,6-tri-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (3)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} + 30.4$ (c 0.01, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1427 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1427.6468 [M+Na]⁺ (calcd. for C₆₇H₁₀₄O₃₁Na, 1427.6459).

4.4.4. 3-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-(3,4,6-tri-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (4)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} + 29.5$ (c 0.01, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1427 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1427.6437 [M+Na]⁺ (calcd. for C₆₇H₁₀₄O₃₁Na, 1427.6459).

4.4.5. 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (5)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} + 44.0$ (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1433 [M+Na]⁺, *m/z* 1455 [M+H+2Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1433.6568 [M+Na]⁺ (calcd. for C₆₆H₁₀₆O₃₂Na, 1433.6565).

4.4.6. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (6)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -2.3$ (c 0.43, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1523 [M+H]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1523.6876 [M+H]⁺ (calcd. for C₆₈H₁₁₂O₃₂Na, 1523.6882).

4.4.7. 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin 28-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester (7)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} + 17.4$ (c 0.23, MeOH); ¹H NMR (pyridine-d₅, 600 MHz) and ¹³C NMR (pyridine-d₅, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1565 [M+Na]⁺; HRESIMS (positive-ion mode) *m/z* 1565.6999 [M+Na]⁺ (calcd. for C₇₁H₁₁₄O₃₂Na, 1565.6987).

4.5. Acid hydrolysis and GC analysis

Acid hydrolysis and GC analyses were carried out as previously described in Petit et al. (2019).

4.6. Peptides and β-D-Glucopyranosyl oleanolate

The *N*-glucosylated peptide, CSF114(Glc), and its analogue, CSF114, were synthesized using microwave-assisted solid-phase peptide synthesis as described by Rizzolo et al., 2007. Both compounds were purified by solid-phase extraction followed by reversed-phase prep HPLC and then characterized by analytical HPLC-ESIMS. Oleoanolic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (Glc oleanolate) was isolated from *Olea obtusifolia* in our laboratory (Pertuit et al., 2018b).

4.7. Immunoenzymatic assays of CSF114 and CSF114(Glc)

Sera of 14 MS patients collected at diagnosis and 8 control patients (celiac disease) were obtained for diagnostic purposes and stored

at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. MS patient sera samples were collected in The Multiple Sclerosis Clinical Care and Research Center, Department of Neurosciences, Reproductive Sciences and Odontostomatology, Federico II University (Naples, Italy) and the Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Clinica Neurologica, University of Florence (Florence, Italy). All patients gave their informed consent. MS patients were previously diagnosed after a lumbar puncture, magnetic resonance imaging examinations and cerebrospinal fluid analyses. Samples were pre-selected depending on their reactivity to CSF114(Glc). Antibody response of each serum, tested in triplicates, were determined by SP-ELISA as described below.

The peptides were coated on 96-well activated polystyrene ELISA plates (NUNC Maxisorb, Sigma-Aldrich) using a solution $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ in pure carbonate buffer 0.05 M at $\text{pH } 9.6$ ($100\text{ }\mu\text{l/well}$) and incubated at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. After three washes with 150 mM NaCl solution containing 0.05% Tween 20 (washing buffer), non-specific binding sites were blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) in washing buffer (blocking buffer, $100\text{ }\mu\text{l/well}$) at room temperature for 60 min . Sera samples were diluted $1:100$ in blocking buffer and were incubated at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. After three washes, goat antihuman IgM conjugated with alkaline phosphatase (diluted $1:200$ in blocking buffer, Sigma-Aldrich) were added to each well ($100\text{ }\mu\text{l}$). Subsequent to 3 h incubation at room temperature and three washes in washing buffer, $100\text{ }\mu\text{l/well}$ of 1 mg/ml p-nitrophenylphosphate (Sigma-Aldrich) in carbonate buffer ($\text{pH } 9.6$) containing 10 mM MgCl_2 were added. After 30 min approximately, the reaction was stopped with 1 M NaOH ($50\text{ }\mu\text{l/well}$), and the absorbance was read in a multichannel ELISA reader (Tecan Sunrise) at 405 nm . Antibody levels are expressed as absorbance in arbitrary units at 405 nm . Absorbance due to non-specific interactions between the sera and the plate material was removed (same protocol as above without peptide coating).

4.8. Immunoenzymatic assays of natural glycosides 2, 6, 7, gigantaside J, hederagenin monodesmoside and Glc oleonolate

Antibody response of each serum, tested in triplicates, were determined by SP-ELISA as described below. Natural glycosides were coated on 96-well polyvinyl chloride ELISA plates (Costar 2595) using a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ solution in pure ethanol ($100\text{ }\mu\text{l/well}$). The plates were then incubated at room temperature overnight. Non-specific binding sites were blocked with 5% BSA in 150 mM NaCl solution without surfactant (blocking buffer) at room temperature for 60 min . Sera diluted $1:100$ in blocking buffer were incubated at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight ($100\text{ }\mu\text{l/well}$). After three washes with 150 mM NaCl solution, $100\text{ }\mu\text{l}$ of alkaline phosphatase conjugated anti-human IgM (Sigma-Aldrich) (diluted $1:200$ in blocking buffer) were added to each well. Subsequent to a 3 h incubation at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and three washes, $100\text{ }\mu\text{l/well}$ of 1 mg/ml p-nitrophenylphosphate (Sigma-Aldrich) in carbonate buffer ($\text{pH } 9.6$) containing 10 mM MgCl_2 were added. After approximately 30 min , the reaction was stopped with 1 M NaOH ($50\text{ }\mu\text{l/well}$), and the absorbance was read at 405 nm . ELISA plates, coating conditions, reagent dilutions, buffers, and incubation times were preliminary optimized. Antibody levels are expressed as absorbance in arbitrary units at 405 nm . Absorbance due to non-specific interactions between the sera and the plate material was removed (same protocol as above without natural glycoside coating).

4.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graph Pad prism 6. Shapiro-Wilk normality test ($\alpha = 0.05$) was employed to evaluate if data assumed a Gaussian distribution. As normality was not respected by the overall antibody response distribution, non-parametric tests were chosen. Mann-Whitney U test was used to compare two groups whereas Kruskal Wallis H test coupled to Dunn's multiple comparisons was computed in order to compare more than two groups

simultaneously. A Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis (95% confidence interval) was performed in order to estimate sensitivity and specificity values for each of the compounds tested.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This research work was financially supported by grants from the French Government (French Ministry of Higher Education, Research and Innovation), the doctoral school n°554 "Environnements-Santé" of the University of Burgundy and Franche-Comté and the AromaPro association. Dominic Batt, English teacher at the University of Burgundy and Franche-Comté, is gratefully acknowledged for his revision of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112392>.

References

- Adamo, R., Hu, Q.-Y., Torosantucci, A., Crotti, S., Brogioni, G., Allan, M., Chiani, P., Benvenuto, C., Quain, D., Tontini, M., Berti, F., 2014. Deciphering the structure-immunogenicity relationship of anti-Candida glycoconjugate vaccines. *Chem. Sci.* **5**, 4302–4311.
- Braganza, C.D., Santos, K.T., Dangerfield, E.M., Flammé, A.C.L., Timmer, M.S.M., Stocker, B.L., 2018. Evaluation of anti α -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcP (GAGA4) IgM antibodies as a biomarker for multiple sclerosis. *BMC Adv. Sci.* **20096**–20093.
- Bretschneider, J., Jankowski, T.D., Tumas, H., Abold, S., Hasebye, D., Seraj, H., Hill, H.R., Floe, E., Spector, L., Yarden, J., Dotan, N., Rose, J.W., 2009. Serum anti-GAGA4 IgM antibodies differentiate relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis from primary progressive multiple sclerosis and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* **217**, 95–101.
- Changy-Tixer, A.-S., Minaise-Offier, A.-C., Real Fernández, F., Miyamoto, T., Tanaka, C., Pagini, A.-M., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018. Glucanase-type glycosidases from the roots of *Walgia florida* "rumba" and evaluation of their antibody recognition. *Fitoterapia* **128**, 198–205.
- DeMarshall, C., Goldwasser, E.L., Sarkar, A., Godsey, G.A., Acharya, N.K., Thejssivan, U., Belzika, B.A., Nagle, R.G., 2017. Autoantibodies as diagnostic biomarkers for the detection and subtyping of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **309**, 51–57.
- Freedman, M.S., Laks, J., Dotan, N., Altrock, R.T., Dukler, A., Siedle, C.J.M., 2009. Anti-alpha-glucanase-based glycan IgM antibodies predict relapse activity in multiple sclerosis after the first neurological event. *Mult. Scler.* **15**, 422–430.
- Garg, N., Smith, T., 2015. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav* **5** (9), e0082.
- Hara, S., Okabe, H., Mitsuhashi, K., 1987. Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4 (3 α)-carboxylates. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 501–506.
- Hufeljt, M.E., Vukovic, M., Vasilis, D., Xu, H., Obukhova, P., Shilova, N., Tuzikov, A., Galantina, O., Arun, B., Lu, K., Bovin, N., 2009. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol. Immunol.* **46**, 3037–3049.
- Ishii, H., Kitagawa, I., Matsumoto, K., Shirakawa, K., Tori, K., Tsubo, T., Yoshikawa, M., Yuhimura, Y., 1981. The configuration and conformation of the arabinose moiety in platycodins, saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*, and its saponins from *Madhaca longifolia* based on carbon-13 and hydrogen-1 NMR spectroscopic evidence: the total structures of the saponins. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1529–1532.
- Karuss, D., 2014. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J. Autoimmun.* **48–49**, 134–142.
- Kitagawa, I., Taniyama, T., Nagahama, Y., Okubo, K., Yamauchi, F., Yoshikawa, M., 1988. Saponin and sapogenin. XLII. Structures of acetyl-soyasapogenin A₁, A₂ and A₃, astringent partially acetylated isokomonomers of soyasapogenin A, from American soybean, the seeds of *Glycine max* MILLER. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2819–2828.
- Lei, X.-R., Gong, C., Zhang, Y.-L., Xu, X., 2016. Influence of the acetamide from acetyl-oxirine hydrolysis in acid-contained mobile phase on the ultraviolet detection in high performance liquid chromatography. *Chromatographia* **79**, 1257–1262.
- Lofli, F., Mazzanti, B., Pazzagli, M., Peroni, E., Akaro, M.C., Sabatino, G., Lanzillo, R., Brescia Mora, V., Santoro, L., Gasperini, C., Galgani, S., D'Elia, M.M., Zupoli, V., Sergio, S., Poglietti, M., Rovero, P., Chelli, M., Papioti, A.M., 2005a. The glycopeptide CSF114(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **167**, 131–137.
- Lofli, F., Mulcinetti, B., Carotenuto, A., Butenti, B., Sabatino, G., Mazzanti, B., D'Elia, A.M., Novellino, E., Pazzagli, M., Lovato, L., Akaro, M.C., Peroni, E., Pisto-Carrozzi,

- M.C. Nuti, F. Battistini, L. Borrellino, G. Chelli, M. Rovero, P. Papini, A.M., 2005b. An N-glycosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10273–10278.
- Mazzola, E.P., Parkinson, A., Kennelly, E.J., Coxon, B., Elmbond, L.S., Friedberg, D.I., 2011. Utility of coupled-HSQC experiments in the intact structural elucidation of three complex saponins from *Bilghia aquida*. *Carbohydr. Res.* 346, 759–768.
- Menge, T., Lalve, P.H., von Bidingen, H.-C., Cree, B., Hauser, S.L., Genain, C.P., 2005. Antibody responses against galactocerebroside are potential stage-specific biomarkers in multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 453–459.
- Mimaki, Y., Kusuda, M., Kameyama, A., Yokosuka, A., Sashida, Y., 1998. Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus androsa* and their cytotoxic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry* 48, 485–493.
- Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., Sashida, Y., 2004. Triterpene saponins from the roots of *Clematis chinensis*. *J. Nat. Prod.* 67, 1511–1516.
- Montes, E.G., Mitaine-Offer, A.-C., Amaro-Luis, J.M., Paululat, T., Delaude, C., Pouyssegur, L., Quidoua, S., Rojas, I.B., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2014. Acylated oleanane-type saponins from *Gnaphalium giganteum*. *Phytochemistry* 98, 236–242.
- Nuti, F., Peroni, E., Real Fernández, F., Bonache, M.A., Le Chevalier-Isard, A., Chelli, M., Lubin-Germain, N., Uziel, J., Rovero, P., Loffi, F., Papini, A.M., 2010. Posttranslationally modified peptides efficiently mimicking neoantigens: a challenge for therapeutics of autoimmune diseases. *Biopolymers* 94, 791–799.
- Ono, M., Oishi, K., Abe, H., Masuoka, C., Okawa, M., Ikeda, T., Nohara, T., 2006. New iridoid glycosides from the aerial parts of *Verbena brasiliensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1421–1424.
- Papini, A.M., 2009. The use of post-translationally modified peptides for detection of biomarkers of immune-mediated diseases. *J. Pept. Sci.* 15, 621–628.
- Penders, A., Delaude, C., 1994. Structure elucidation of an acetylated saponin of *Bilghia walteri* by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 79–88.
- Penders, A., Delaude, C., 1989. Identification and sequencing of sugars in an acetylated saponin of *Bilghia walteri* by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 190, 109–120.
- Peroni, E., Fernández, F.R., Ghori, C., Nuti, F., Mitaine-Offer, A.-C., Loffi, F., Lacaille-Dubois, M.-A., Papini, A.M., 2016. Natural triterpene glycosides for antibody recognition. *Planta Med.* Lett. 3, e2–e7.
- Perruti, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018a. Terpenoid glycosides from the roots/barks of *Eriocaulon microperum* Radlk. *Ex Engl. Phytochemistry* 152, 182–190.
- Perruti, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018b. Triterpene saponins of the root bark of *Olea obtusifolia* De Wild. *Phytochem. Lett.* 28, 174–178.
- Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2019. Hederagenin glycosides from the fruits of *Bilghia unijugata*. *Phytochemistry* 162, 260–269.
- Real Fernández, F., De Pisa, M., Rossi, G., Auberger, N., Lequin, O., Larregola, M., Benchohra, A., Manay, C., Chassaing, G., Loffi, F., Hayek, J., Lovelle, S., Rovero, P., Muller, J.-M., Papini, A.M., 2015. Antibody recognition in multiple sclerosis and rett syndrome using a collection of linear and cyclic N-glycosylated antigenic probes. *Biopolymers* 104, 560–576.
- Reinold, M., Livingston, C., Berhan, U., Egg, R., Dillitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, W., Berger, T., 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122 (Pt 11), 2047–2056.
- 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 andromeda*. *Phytochemistry* 123, 40–47.
- Rizozo, F., Sabatino, G., Chelli, M., Rovero, P., Papini, A.M., 2007. A convenient microwave-enhanced solid-phase synthesis of difficult peptide sequences: case study of gramicidin A and CSF114(Glc). *Int. J. Pept. Res. Therapeut.* 13, 203–208.
- Schwarz, M., Spector, L., Gargic, A., Shivers, A., Gortler, M., Altmock, R.T., Dukler, A.A., Dotan, N., 2003. A new kind of carbohydrate array, its use for profiling antiglycan antibodies, and the discovery of a novel human cellulose-binding antibody. *Glycobiology* 13, 749–754.
- Schwarz, M., Spector, L., Gortler, M., Weisshaus, O., Glas-Marmor, L., Karni, A., Dotan, N., Miller, A., 2006. Serum anti-glc(ol),glc(α) antibodies as a biomarker for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 244, 59–68.
- Tang, L., Wang, Z., Wu, H., Yokosuka, A., Mimaki, Y., 2014. Steroidal glycosides from the underground parts of *Dicranum thalictroides* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 107, 102–110.
- Tchoupaang, E.N., Feder, C., Ateba, S.B., Zehl, M., Kählig, H., Njamen, D., Höller, F., Glud-Tanzler, S., Kraus, L., 2017. Acetylated furanose glycosides from *Solanum glaberrimum*. *Planta Med.* 83, 1227–1232.
- Walvoort, M.T.C., Testa, C., Eilam, R., Aharoni, R., Nuti, F., Rossi, G., Real Fernández, F., Lanzillo, R., Brescia Morra, V., Loffi, F., Rovero, P., Imperiali, B., Papini, A.M., 2016. Antibodies from multiple sclerosis patients preferentially recognize hyperglycosylated adhesion of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Sci. Rep.* 6, 39430.
- Yoshimoto, H., Nishida, M., Sakaguchi, M., Nohara, T., 2006. Two new 15-deoxy-yuccinonol-type and three new 24-epi-cisignonol-type glycosides from *Cniciflaga rhizomat*. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1323–1325.
- Zeng, L., Zhu, M., Zhong, J., Yao, W., 2015. Structural stability of acetyl saponins in different solvents and separation materials. *Phytochem. Lett.* 11, 368–372.
- Zviadadze, L.D., Dekanostidze, G.E., Kemertlidze, E.P., 1980. Triterpene glycosides of *Cephaelis gigantea*. *Khim. Prir. Soedin.* 3, 423.

A.3 Manuscrit soumis à *Pest Management Science* (Wiley)

Antimicrobial terpenoid glycosides from the root bark of *Chytranthus macrobotrys* and *Radlkofera calodendron* against phytopathogens

Short running title: Antimicrobial activity of Sapindaceae-derived glycosides

Bastien Petit,^a Anne-Claire Mitaine-Offer,^{a,*} Jochen Fischer,^b Anja Schöffler,^b Clément Delaude,^c Tomofumi Miyamoto,^d Chiaki Tanaka,^d Eckhard Thines^b and Marie-Aleth Lacaille-Dubois^a

^a PEPITE EA 4267, Laboratoire de Pharmacognosie, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, BP 87900, 21079 Dijon cedex, France

^b Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH (IBWF), Kaiserslautern, Germany

^c Centre de Recherche Phytochimique, Université de Liège, Institut de Chimie-B6, Sart Tilman, B-4000-Liège I, Belgique

^d Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80393274; fax: + 33 3 80393300. E-mail address: acoffer@u-bourgogne.fr (A.-C. Mitaine-Offer)

ABSTRACT

BACKGROUND: Microbial phytopathogens, especially fungi, are responsible for major crop spoilage impacting food security, economy and human health worldwide. Plant-derived natural products represent a large source of antimicrobials with limited health and environmental impact. The soapberry family (Sapindaceae) is known to be rich in triterpene glycosides exhibiting antifungal properties. A significant number of Sapindaceae species have never been investigated phytochemically and might harbor undescribed metabolites of industrial interest. In this study, we carried out a phytochemical exploration of *Chytranthus macrobotrys* and *Radlkofera calodendron*, two poorly studied Sapindaceae. Extracts and pure compounds were screened for antimicrobial activity against economically important phytopathogens including rarely tested wood-inhabiting microorganisms.

RESULTS: Four previously undescribed compounds including three triterpene and one farnesyl glycosides were characterized. Extracts demonstrated a dose dependent antimicrobial activity between 5 and 250 µg/ml on eight fungi as well as the bacterium *Xylella fastidiosa*. Pure compounds exhibited different levels of activity depending upon the assayed organisms. Significant growth inhibitions were obtained on *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Fomitiporia mediterranea* as assessed by MIC/IC₅₀ reaching 25/10 µg/ml at the lowest.

CONCLUSION: Pure triterpene saponins demonstrated significant growth inhibition on pathogenic wood-inhabiting microorganisms for the first time. The role of terminal arabinose moieties in enhancing the antifungal activity of saponins was highlighted. Previous studies considering Sapindaceae spp. as a source of plant-derived antifungals are consolidated.

Keywords: *Chytranthus macrobotrys*, *Radlkofera calodendron*, Sapindaceae, Triterpene saponins, Farnesyl glycosides, Antifungals

No.	1		2		3		4	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	38.9	1.54 <i>m</i> 1.02 <i>m</i>	38.7	1.56 <i>m</i> 1.06 <i>m</i>	38.7	1.55 <i>m</i> 1.05 <i>m</i>	65.5	4.68 4.45 <i>dd</i> (11.4, 7.2)
2	26.1	2.17 <i>m</i> 1.99	26.1	2.22 1.98	26.1	2.21 <i>m</i> 1.99	120.9	5.59 <i>m</i>
3	80.5	4.29	81.2	4.22	81.0	4.27 <i>dd</i> (12.6, 4.8)	140.5	
4	43.3		43.3		43.3		39.4	2.05 <i>m</i>
5	47.5	1.70	47.2	1.71 <i>br d</i> (11.6)	47.3	1.74 <i>br d</i> (11.3)	26.7	2.13 <i>m</i>
6	18.0	1.70 1.36	18.1	1.78 1.37 <i>m</i>	17.9	1.79 1.34 <i>m</i>	124.2	5.20
7	32.4	1.68 1.36	32.9	1.75 1.30	32.6	1.70 <i>m</i> 1.26	135.2	
8	39.7		39.5		39.5		39.7	2.05 <i>m</i>
9	48.0	1.75	47.9	1.78	47.9	1.79	26.4	2.13 <i>m</i>
10	36.7		36.6		36.7		124.6	5.20
11	23.2	2.05 <i>ddd</i> (13.8, 13.8, 4.1) 1.94	23.7	2.08 <i>ddd</i> (14.5, 14.5, 4.6) 1.95	23.4	2.09 <i>ddd</i> (13.5, 13.5, 4.9) 1.93	131.2	
12	123.2	5.44 <i>t-like</i>	122.3	5.52 <i>t-like</i>	122.3	5.49 <i>t-like</i>	25.6	1.70 <i>s</i>
13	nd		144.8		144.7		17.6	1.61 <i>s</i>
14	41.9		42.0		42.0		15.9	1.63 <i>s</i>
15	28.0	2.29 <i>ddd</i> (13.8, 13.8, 4.8) 1.15 <i>m</i>	28.1	2.15 <i>ddd</i> (14.5, 14.5, 4.6) 1.17 <i>m</i>	28.1	2.13 <i>ddd</i> (13.5, 13.5, 4.9) 1.13 <i>m</i>	16.4	1.74 <i>s</i>
16	23.2	1.94 nd	23.7	1.95 nd	23.6	1.93 nd		
17	46.9		46.7		46.5			
18	41.5	3.17 <i>dd</i> (13.8, 5.5)	42.0	3.29 <i>dd</i> (11.0, 5.2)	41.7	3.27 <i>dd</i> (13.8, 3.6)		
19	45.6	1.72 1.22	46.7	1.78 1.26	46.3	1.76 1.26		
20	30.5		30.7		30.7			
21	33.7	1.34 1.08	33.9	1.43 <i>ddd</i> (14.5, 13.3, 5.2) 1.22 <i>m</i>	34.0	1.42 <i>ddd</i> (15.1, 13.5, 5.4) 1.19 <i>m</i>		
22	32.2	1.84 <i>ddd</i> (13.8, 13.8, 4.1) 1.74	33.0	2.00 1.78	33.0	2.00 <i>ddd</i> (12.8, 12.8, 4.3) 1.79		
23	63.6	4.12 3.79 <i>br d</i> (11.4)	63.7	4.19 3.89 <i>br d</i> (12.0)	63.6	4.23 3.90 <i>br d</i> (10.8)		
24	13.8	1.10 <i>s</i>	13.7	1.07 <i>s</i>	13.8	1.09 <i>s</i>		
25	16.0	0.95 <i>s</i>	15.8	0.95 <i>s</i>	15.9	0.94 <i>s</i>		
26	17.3	1.12 <i>s</i>	17.3	1.03 <i>s</i>	17.3	1.01 <i>s</i>		
27	25.9	1.22 <i>s</i>	26.0	1.30 <i>s</i>	26.0	1.26 <i>s</i>		
28	176.6		181.1		180.5			
29	32.9	0.89 <i>s</i>	33.1	0.97 <i>s</i>	33.1	0.94 <i>s</i>		
30	23.4	0.88 <i>s</i>	23.4	1.03 <i>s</i>	23.6	1.01 <i>s</i>		

Table 2. NMR spectroscopic data of the aglycon moieties of compounds **1–4** in pyridine-*d*₅ (δ in ppm, *J* in Hz). Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity. nd, not determined.

Lien thèse manuscrit soumis : **1 = Cm2, 2 = Cm1, 3 = Rc1, 4 = Rc2**

No.	1		2		3		4	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
	Ara I		Ara I		Ara I		Glc I	
1	104.9	5.17 <i>d</i> (6.0)	104.3	5.12 <i>d</i> (6.6)	104.2	5.12 <i>d</i> (6.6)	102.8	4.89 <i>d</i> (7.2)
2	74.1	4.66	76.1	4.49 <i>dd</i> (7.8, 6.6)	75.2	4.56 <i>dd</i> (7.8, 6.6)	74.6	4.06
3	82.0	4.11	73.8	4.18	74.2	4.14 <i>dd</i> (9.0, 3.6)	77.9	4.25 <i>dd</i> (9.6, 8.4)
4	68.5	4.39	69.1	4.27	69.1	4.23	71.5	3.98 <i>dd</i> (9.0, 8.4)
5	65.0	4.30, 3.77 <i>br d</i> (12.6)	65.5	4.29, 3.79 <i>br d</i> (10.2)	65.5	4.31, 3.75 <i>br d</i> (11.4)	76.8	4.08
6							67.7	4.63 <i>m</i> , 4.08
	Rha		Rha		Rha		Rha I	
1	101.3	6.14 <i>br s</i>	101.1	6.09 <i>br s</i>	101.0	6.21 <i>br s</i>	101.6	5.49 <i>br s</i>
2	71.8	4.73 <i>br s</i>	70.9	5.00 <i>br s</i>	71.4	4.89 <i>br s</i>	72.1	4.56 <i>br s</i>
3	72.0	4.61 <i>dd</i> (9.6, 3.0)	82.2	4.75 <i>dd</i> (9.3, 2.7)	82.1	4.70	71.9	4.80 <i>dd</i> (9.6, 3.3)
4	73.5	4.29	72.1	4.44	72.3	4.46	78.4	4.62 <i>t</i> (9.6)
5	69.6	4.68	69.6	4.65 <i>m</i>	69.4	4.69	67.9	4.35 <i>m</i>
6	18.3	1.65 <i>d</i> (6.0)	18.2	1.63 <i>d</i> (6.0)	18.2	1.59 <i>d</i> (6.6)	18.6	1.71 <i>d</i> (5.4)
	Xyl		Glc		Xyl		Glc II	
1	106.0	4.94 <i>d</i> (7.2)	105.4	5.33 <i>d</i> (7.8)	106.3	5.23 <i>d</i> (7.8)	102.0	5.57
2	74.1	3.98 <i>dd</i> (7.8, 7.2)	74.8	4.15	74.9	4.05 <i>dd</i> (8.4, 7.8)	79.0	4.07
3	77.1	4.16	76.0	4.18	75.3	4.11 <i>dd</i> (9.0, 8.4)	87.3	3.88 <i>t</i> (9.0)
4	70.5	4.14	79.8	4.19	76.1	4.23	69.3	3.91
5	66.5	4.30, 3.68 <i>t</i> (10.2)	76.0	3.88	64.3	4.34, 3.58 <i>t</i> (10.8)	76.8	3.67 <i>m</i>
6			60.9	4.43, nd			61.9	4.30, 4.16 <i>dd</i> (11.7, 5.1)
	Glc		Ara II		Ara II		Rha II	
1	95.5	6.27 <i>d</i> (7.8)	105.0	4.95 <i>d</i> (7.8)	103.1	4.82 <i>d</i> (7.2)	102.6	6.05 <i>br s</i>
2	73.6	4.21 <i>dd</i> (8.4, 7.8)	71.9	4.46	71.1	4.46	71.7	4.87 <i>br s</i>
3	78.2	4.32	74.8	4.17	73.8	4.19 <i>dd</i> (9.0, 3.6)	72.1	4.70
4	70.7	4.32	69.1	4.26	68.8	4.34	72.6	4.29
5	78.9	4.06 <i>m</i>	67.3	4.25, 3.81 <i>br d</i> (10.8)	66.8	4.33, 3.77 <i>br d</i> (12.0)	69.4	5.00 <i>m</i>
6	61.8	4.46 <i>br d</i> (11.4) 4.36 <i>dd</i> (12.3, 5.1)					18.4	1.83 <i>d</i> (6.0)
							Xyl	
1							104.8	4.83 <i>d</i> (7.8)
2							74.1	3.92
3							77.4	4.13
4							70.3	4.12
5							66.6	4.26, 3.69 <i>t</i> (10.2)

Table 3. NMR spectroscopic data of the glycoside moieties of compounds **1–4** in pyridine-*d*₅ (δ in ppm, *J* in Hz). Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity. nd, not determined.

Lien thèse manuscrit soumis : **1 = Cm2, 2 = Cm1, 3 = Rc1, 4 = Rc2**

A.4 Liste des publications, posters et communications orales

– Publications

1. Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2019. Hederagenin glycosides from the fruits of *Blighia unijugata*. *Phytochemistry* 162, 260–269.
2. Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Real Fernandez, F., Papini, A.M., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Rovero, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2020. Triterpene glycosides from *Blighia welwitschii* and evaluation of their antibody recognition capacity in multiple sclerosis. *Phytochemistry* 176, 112392.

– Manuscrit soumis

3. Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Fischer, J., Schüffler, A., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Thines, E., Lacaille-Dubois, M.-A. Antimicrobial terpenoid glycosides from the root bark of *Chytranthus macrobotrys* and *Radlkofera calodendron* against phytopathogens. Soumis à Pest Management Science, 21 septembre 2020.

– Posters et communications orales

1. Réunion d'équipe de l'EA4267, 9 février 2018, Besançon. Présentation orale « Outils Diagnostiques de Maladies Auto-Immunes: Utilisation de Composés Naturels Glycosylés »
2. Réunion avec la direction scientifique de l'IBWF gGmbH, 17 mai 2018, Kaiserslautern, Allemagne. Présentation orale « Saponins as antifungals: literature survey and perspectives »
3. 24^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 14-15 juin 2018, Besançon. Poster n°P11 « Isolation and structure determination of new triterpene saponins from the fruits of *Blighia unijugata* »
4. Réunion avec les scientifiques italiens du Peptlab@UNIFI et du CHIM Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff', 9 novembre 2018, Florence, Italie. Présentation orale « Triterpene saponins and their derivatives for antibody recognition in multiple sclerosis and Rett syndrome sera »
5. DU AromaPro, 29 mars 2019, Dijon. Conférence « Introduction à l'HPLC : principe, histoire et utilisations actuelles »
6. 25^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 13-14 juin 2019, Dijon. Poster session poster 3 « Natural triterpene glycosides for antibody recognition in multiple sclerosis: an immunoassay development »
7. Réunion d'équipe de l'EA4267, 31 janvier 2020, Dijon. Présentation orale « Phytochemical exploration of “forgotten plants” within the family Sapindaceae: focus on saponins »

– A venir

8. DU AromaPro, initialement prévu en mars 2020, reporté en novembre 2020 (Covid-19), Dijon. Conférence « Soigner les plantes par les plantes - Huiles essentielles et propriétés antifongiques »

9. PSE Young Scientists' Meeting: Trends in Natural Products Research, initialement prévu les 12-15 juillet 2020, reporté aux 13-16 juillet 2021 (Covid-19), Kolymbari, Grèce. Présentation orale « Saponins from “forgotten plants” of the soapberry family (Sapindaceae) ». Abstract accepté.

A.5 Références de la recherche bibliographique sur les saponines des Sapindaceae

- Adesegun, S.A., Coker, H.A.B., Hamann, M.T., 2008. Antifungal triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. Res. J. Phytochemistry 2, 93–99.
- Biang, A.E.M., Kamto, E.L.D., Simo, L.M., Antheaume, C., Lavedan, P., Vedrenne, M., Noté, O.P., Pegnyemb, D.E., Mbing, J.N., Haddad, M., 2020. Triterpenoid saponins from the stem barks of *Chytranthus klaineanus* Radlk. ex Engl. Phytochemistry Letters 37, 37–41.
- Cao, S., Brodie, P., Callmander, M., Randrianaivo, R., Razafitsalama, J., Rakotobe, E., Rasamison, V.E., Ten Dyke, K., Shen, Y., Suh, E.M., Kingston, D.G.I., 2009. Antiproliferative triterpenoid saponins of *Dodonaea viscosa* from the Madagascar dry forest. J. Nat. Prod. 72, 1705–1707.
- Chan, P.-K., Zhao, M., Che, C.-T., Mak, E., 2008. Cytotoxic acylated triterpene saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia*. J. Nat. Prod. 71, 1247–1250.
- Chen, G., Xie, Y., Zhou, D., Yang, Y., Liu, J., Hou, Y., Cheng, M., Liu, Y., Li, N., 2020. Chemical constituents from shells of *Xanthoceras sorbifolium*. Phytochemistry 172, 112288.
- Cui, H., Xiao, H., Ran, X.-K., Li, Y.-Y., Dou, D.-Q., Kang, T.-G., 2012. Two new oleanane-type pentacyclic triterpenoid saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. J. Asian Nat. Prod. Res. 14, 216–223.
- De Freitas, L., Jimenez, D., Pimentel, S., Mitaine-Offer, A.-C., Pouységu, L., Quideau, S., Paululat, T., Gonzalez-Mujica, F., Rojas, L.B., Rodríguez, M., Lacaille-Dubois, M.-A., 2017. Triterpene saponins from *Billia rosea*. Phytochemistry 141, 105–113.
- Fu, H., Guo, Y., Li, W., Dou, D., Kang, T., Koike, K., 2010. A new angeloylated triterpenoid saponin from the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. J. Nat. Med. 64, 80–84.
- Guo, Y., Dou, D.-Q., Kang, T.-G., Wang, S.-C., Kuang, H.-X., 2009. Structure elucidation and complete NMR spectral assignments of two new oleanane-type pentacyclic triterpenoid saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. Magn. Reson. Chem. 47, 982–988.
- Hamburger, M., Slacanin, I., Hostettmann, K., Dyatmiko, W., Sutarjadi, 1992. Acetylated saponins with molluscicidal activity from *Sapindus rarak*: unambiguous structure determination by proton nuclear magnetic resonance and quantitative analysis. Phytochem. Analysis 3, 231–237.
- Heredia-Vieira, S.C., Simonet, A.M., Vilegas, W., Macías, F.A., 2015. Unusual C,O-fused glycosylapigenins from *Serjania marginata* leaves. J. Nat. Prod. 78, 77–84.
- Hu, Q., Chen, Y.-Y., Jiao, Q.-Y., Khan, A., Li, F., Han, D.-F., Cao, G.-D., Lou, H.-X., 2018. Triterpenoid saponins from the pulp of *Sapindus mukorossi* and their antifungal activities. Phytochemistry 147, 1–8.
- Huang, H.-C., Liao, S.-C., Chang, F.-R., Kuo, Y.-H., Wu, Y.-C., 2003. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. J. Agric. Food Chem. 51, 4916–4919.

- Huang, H.-C., Tsai, W.-J., Morris-Natschke, S.L., Tokuda, H., Lee, K.-H., Wu, Y.-C., Kuo, Y.-H., 2006. Sapinmusaponins F–J, bioactive tirucallane-type saponins from the galls of *Sapindus mukorossi*. J. Nat. Prod. 69, 763–767.
- Ito, A., Chai, H.-B., Kardono, L.B.S., Setowati, F.M., Afriastini, J.J., Riswan, S., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D., 2004. Saponins from the bark of *Nephelium maingayi*. J. Nat. Prod. 67, 201–205.
- Jayasinghe, U.L.B., Fujimoto, Y., Hostettmann, K., 2006. Molluscicidal saponins from *Pometia eximia*. Nat. Prod. Lett. 12, 135–138.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K., 2001. Acetylated triterpene saponins from the thai medicinal plant, *Sapindus emarginatus*. Chem. Pharm. Bull. 49, 1195–1197.
- Lavaud, C., Sayagh, C., Humbert, F., Pouny, I., Delaude, C., 2015. Triterpenoid saponins from root bark of *Zanha golungensis* (Sapindaceae). Carbohydr. Res. 402, 225–231.
- Lavaud, C., Voutquenne, L., Massiot, G., Le Men-Olivier, L., Delaude, C., 1995. Triterpenoid saponins from *Smelophyllum capense* (Sapindaceae). Bull. Soc. Roy. Sci. Liège 63, 455–463.
- Lei, H., Li, Q., Bi, W., Bai, D., Lin, W., 2007. A new saponin from *Koelreuteria paniculata*. Acta Pharm. Sin. 42, 171–173.
- Li, W., Li, X., Yang, J., Meng, D.-L., Li, N., 2008. Two new triterpenoid saponins from the carpophore of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. J. Asian Nat. Prod. Res. 10, 260–264.
- Li, Z.-L., Li, D.-Y., He, X.-M., Hua, H.-M., 2013. Two new triterpenoid saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia*. Nat. Prod. Res. 27, 232–237.
- Li, Z.-L., Li, X., Li, D.-Y., Li, D., Meng, D.-L., Li, W., SHA, Y., 2007. Triterpenoid prosapogenols and prosapogenins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia*. J. Asian Nat. Prod. Res. 9, 387–392.
- Li, Z.-L., Yang, B.-Z., Li, X., Wang, S.-J., Li, N., Wang, Y., 2006. Triterpenoids from the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. J. Asian Nat. Prod. Res. 8, 361–366.
- Lunga, P.K., Qin, X.-J., Yang, X.W., Kuate, J.-R., Du, Z.Z., Gatsing, D., 2014. Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. BMC Complement. Altern. Med. 14, 369.
- Mohammad, F.V., Ahmad, V.U., Noorwala, M., Lajis, N.H.J., 2010. A new triterpenoid saponin from the stem bark of *Pometia pinnata*. Nat. Prod. Commun. 5, 191–195.
- Mohammad, F.V., Noorwala, M., Ahmad, V.U., Zahoor, A., Lajis, N.H.J., 2012. A new monodesmosidic triterpenoid saponin from the leaves of *Pometia pinnata*. Nat. Prod. Commun. 7, 1423–1426.
- Montes, E.G., Mitaine-Offer, A.-C., Amaro-Luis, J.M., Paululat, T., Delaude, C., Pouységu, L., Quideau, S., Rojas, L.B., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2014. Acylated oleanane-type saponins from *Ganophyllum giganteum*. Phytochemistry 98, 236–242.
- Mostafa, A.E., El-Hela, A.A., Mohammad, A.-E.I., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2016. New triterpenoidal saponins from *Koelreuteria paniculata*. Phytochem. Lett. 17, 213–218.

- Nabil, M., S. Ghaly, N., A. Kassem, I.A., Grace, M.H., Melek, F.R., 2019. Two triterpenoid saponins with alpha-glucosidase inhibitory activity from *Harpullia pendula* seed extract. *Phcog. J.* 11, 1386–1390.
- Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C., Lacaille-Dubois, M.-A., 2018. Terpenoid glycosides from the root's barks of *Eriocoelum microspermum* Radlk. ex Engl. *Phytochemistry* 152, 182–190.
- Schenkel, E.P., Werner, W., Schulte, K.E., 1991. Saponins from *Thinouia coriaceae*. *Planta Med.* 57, 463–467.
- Tsuzuki, J.K., Svidzinski, T.I.E., Shinobu, C.S., Silva, L.F.A., Rodrigues-Filho, E., Cortez, D.A.G., Ferreira, I.C.P., 2007. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 577–583.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Froissard, C., Thoison, O., Litaudon, M., Lavaud, C., 2005. Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia austro-caledonica*. *Phytochemistry* 66, 825–835.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Thoison, O., Sevenet, T., Lavaud, C., 2003. Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. *Phytochemistry* 64, 781–789.
- Voutquenne, L., Kokougan, C., Lavaud, C., Pouny, I., Litaudon, M., 2002. Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austro-caledonica*. *Phytochemistry* 59, 825–832.
- Wang, D., Yu, B., Chen, C., Duan, J., Di, D., Xiong, X., Yang, Y., Gao, H., 2018. New natural barrigenol-like triterpenoid isolated from the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Nat. Prod. Res.* 32, 997–1003.
- Yu, L., Tang, X., Chen, L., Wang, M., Jian, J., Cao, S., Wang, X., Kang, N., Qiu, F., 2012a. Oleanane-type triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Fitoterapia* 83, 1636–1642.
- Yu, L., Wang, X., Wei, X., Wang, M., Chen, L., Cao, S., Kang, N., Qiu, F., 2012b. Triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and their inhibitory activity on human cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 5232–5238.

A.6 Recherche bibliographique sur l'occurrence des composés connus

Bu9 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérageénine 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (dipsacosite B)

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Cephalaria tuteliana*, *Lonicera japonica*, *Stauntonia chinensis*, *Aralia elata*, *Cephalaria hirsuta*, *Cephalaria procera*, *Lonicera similis*, *Dipsacus asper*, *Cephalaria balansae*, *Lonicera macranthoides*, *Akebia quinata*, *Cephalaria aytachii*, *Lonicera confusa*, *Phryna ortegioides*, *Stauntonia obovatifoliola*, *Cephalaria aristata*, *Akebia trifoliata*, *Tremastelma palaestinum*, *Lonicera dasystyla*, *Pulsatilla chinensis*, *Cephalaria elmaliensis*, *Kalopanax septemlobus*, *Medicago polymorpha*, *Nigella sativa*, *Cephalaria ambrosioides*, *Aster souliei*, *Nigella glandulifera*, *Nigella damascena*, *Cephalaria pastricensis*, *Weigela hortensis*, *Hedera taurica*, *Pulsatilla cernua*, *Hedera canariensis*, *Hedera helix*, *Aralia elata*, *Decaisnea fargesii*, *Astrantia major*, *Hedera rhombea*, *Dipsacus azureus*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé dipsacosite B (CAS Registry Number 33289-85-9). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Bu10 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérageénine (blighoside A)

Aussi trouvé dans (espèces*) : *Blighia sapida*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé blighoside A (CAS RN 1308252-35-8). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Bu11 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérageénine 28-O- β -D-glucopyranosyl ester

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Akebia trifoliata*, *Cephalaria elmaliensis*, *Ilex pernyi*, *Nigella glandulifera*, *Kalopanax septemlobum*, *Dipsacus azureus*, *Smelophyllum capense*, *Medicago polymorpha*, *Polyscias dichroostachya*, *Lonicera japonica*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé **Bu11** (CAS RN 120481-39-2). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Bw12 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérageénine 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester (giganteaside J)

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Cephalaria tuteliana*, *Lonicera japonica*,
Aralia elata, *Cephalaria hirsuta*, *Cephalaria procera*, *Lonicera macranthoides*,
Gymnema sylvestre, *Dipsacus asper*, *Pulsatilla chinensis*, *Cephalaria elmaliensis*,
Pulsatilla cernua, *Lonicera dasystyla*, *Nigella damascena*, *Cephalaria gigantea*,
Lonicera hypoglauca, *Cephalaria pastricensis*, *Lonicera confusa*, *Blighia welwitschii*,
Dipsacus asperoides.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé giganteaside J (CAS RN 140360-29-8). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Cm3 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragnine (klaïneanoside C)

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Chytranthus klaïneanus*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé klaïneanoside C (CAS RN xxxxxxxxxx). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Cm4 hédéragnine

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Juglans sp.*, *Ilex rotunda*,
Eucalyptus sideroxylon, *Saponaria officinalis*, *Medicago sativa*, *Dipsacus asperoides*,
Gonostegia hirta, *Quercus pannosa*, *Lonicera macranthoides*, *Chonemorpha griffithii*,
Callicarpa integerrima, *Celastrus orbiculatus*, *Kalopanax pictus*, *Nephelium lappaceum*,
Anthocephalus chinensis, *Paeonia rockii*, *Ilex cornuta*, *Viscum ovalifolium*,
Cephalaria paphlagonica, *Paeonia sp.*, *Sapindus mukorossi*, *Cephalaria velutina*, *Aralia cordata*,
Dipsacus asper, *Rourea microphylla*, *Anisomeles indica*, *Stauntonia obovatifoliola*,
Paeonia anomala, *Salvia sclareoides*, *Periploca forrestii*, *Morinda citrifolia*, *Periploca omeiensis*,
Akebia trifoliata, *Clematis ligusticifolia*, *Lonicera syringantha*, *Pulsatilla davurica*,
Schefflera abyssinica, *Lonicera japonica*, *Polygala japonica*, *Paeonia delavayi*, *Nigella sativa*,
Nauclea officinalis, *Cephalaria ambrosioides*, *Castanea mollissima*, *Akebia quinata*,
Medicago truncatula, *Sapindus trifoliatus*, *Weigela hortensis*, *Cussonia holstii*, *Medicago sativa*,
Chenopodium quinoa, *Angelica keiskei*, *Weigela stelzneri*, *Fatsia japonica*, *Clematis mandshurica*,
Cyclocarya paliurus, *Polyscias fulva*, *Pterodon emarginatus*, *Cephalaria elmaliensis*,
Euscaphis japonica, *Arisaema franchetianum*, *Clematis chinensis*, *Boehmeria nivea*,
Barbarea vulgaris, *Caryocar villosum*, *Centratherum anthelminticum*, *Hedera helix*,
Gliricidia sepium, *Cephalaria transsylvanica*, *Leontice kiangnanensis*, *Pometia eximia*,
Ficaria ranunculoides.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé hédéragnine (CAS RN 465-99-6). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche ; dû à un nombre trop

important de références (924 résultats) seulement la catégorie « occurrence » est sélectionnée lors du téléchargement des références à partir de l'outil *Substance Identifier*).

Cm5 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (α -hederin)

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Stauntonia obovatifoliola*, *Caulophyllum robustum*, *Akebia trifoliata*, *Lonicera macranthoides*, *Physalis pubescens*, *Pulsatilla koreana*, *Pulsatilla chinensis*, *Kalopanax pictus*, *Medicago polymorpha*, *Hedera helix*, *Clematis ganpiniana*, *Acanthopanax sieboldianus*, *Sapindus mukorossi*, *Jasminum officinale*, *Nigella sativa*, *Akebia quinata*, *Patrinia scabiosaefolia*, *Nigella glandulifera*, *Nigella damascena*, *Clematis ligusticifolia*, *Dipsacus asper*, *Cephalaria ambrosioides*, *Aralia elata*, *Acanthopanax senticosus*, *Lonicera fulvotomentosa*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé α -hederin (CAS RN 27013-91-8). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche ; dû à un nombre trop important de références (525 résultats) seulement la catégorie « occurrence » est sélectionnée lors du téléchargement des références à partir de l'outil *Substance Identifier*).

Cm6 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine (macranthoside A)

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Lonicera japonica*, *Trevesia palmata*, *Aralia elata*, *Cephalaria hirsuta*, *Cephalaria elazigensis*, *Cephalaria procera*, *Patrinia scabiosaefolia*, *Cephalaria aytachii*, *Pulsatilla koreana*, *Centratherum anthelminticum*, *Akebia trifoliata*, *Tremastelma palaestinum*, *Lonicera macranthoides*, *Pulsatilla chinensis*, *Cephalaria elmaliensis*, *Kalopanax septemlobus*, *Cyclocarya paliurus*, *Kalopanax pictus*, *Clematis ligusticifolia*, *Akebia quinata*, *Dipsacus asper*, *Lonicera confusa*, *Pulsatilla cernua*, *Trevesia palmata*, *Lepisanthes rubiginosa*, *Patrinia scabiosaefolia*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé macranthoside A (CAS RN 128730-82-5). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Cm7 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28-O- β -D-glucopyranosyl ester

Aussi trouvé dans (espèces dans ordre d'apparition*) : *Cephalaria aytachii*, *Gymnema sylvestre*, *Lonicera macranthoides*, *Cephalaria elmaliensis*, *Nigella damascena*, *Schefflera rotundifolia*.

* noms d'espèces extraits manuellement à partir de la liste de références générée par l'outil *Substance Identifier* de la base de données CAS SciFinder pour le composé **Cm7** (CAS RN 848047-52-9). Seulement la première occurrence de chaque espèce est retenue dans la recherche.

Cm8 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl ester

