



Université de Bourgogne

Ecole Doctorale E2S

THÈSE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

DISCIPLINE : PHARMACIE

SPÉCIALITÉ : PHARMACOGNOSIE-CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES

Présentée et soutenue publiquement le 8 Juin 2012 par :

Gaoussou TIMITE

TITRE :

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES SAPONOSIDES DE PLANTES DE
LA FAMILLE DES ALLIACEAE, CARYOPHYLLACEAE ET POLYGALACEAE
ET ÉVALUATION DE LEURS ACTIVITÉS CYTOTOXIQUES SUR CELLULES
TUMORALES**

devant le jury composé de :

Présidente :	Pr. Françoise BEVALOT	Université de Franche-Comté
Rapporteur :	Pr. Brigitte DEGUIN	Université Paris Descartes
Rapporteur :	Pr. Elisabeth SEGUIN	Université de Rouen
Examineur :	Dr. Corinne GIRARD-THERNIER	Université de Franche-Comté
Directeur :	Pr. Anne-Claire MITAINE-OFFER	Université de Bourgogne
Co-Encadrant :	Pr. Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS	Université de Bourgogne

Année 2011-2012

DÉDICACES

À ma famille

Je dédie spécialement cette thèse à ma regrettée mère, **Bakayoko Nohomoga**, disparue trop tôt. Cette thèse représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'elle m'a prodigués tout au long de ma scolarité. Qu'elle en soit remerciée par cette trop modeste dédicace.

Mention spéciale à mon père **Timité Sory** pour sa patience, son soutien, ses conseils et surtout l'espoir et la confiance qu'il place en moi.

À mes frères et sœurs et toute ma famille pour la patience et le dévouement dont ils ont fait preuve, je suis fière d'être de vous.

Dédicace spéciale à mon cousin **Timité Soualio** surnommé **VATIER**, ton soutien à tout point de vue et surtout financier a été déterminant dans la réalisation de cet objectif qui a toujours été le mien. Tu as participé à faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Cela restera gravé à jamais dans ma mémoire, Merci.

À mes amis et autres connaissances

À mes amis, **Bakayoko Fatouma** et **Bakayoko Nogosotié**, à la **famille Méité**, je n'oublierai jamais les bons moments que nous avons passés ensemble depuis mon arrivée en France. Vous avez su à votre manière constituer une famille autour de moi. Vous m'avez affranchi de cette lourde charge qui est de vivre loin des siens. Quel bonheur ! Merci infiniment.

Mention spéciale à **Monsieur Binaté Abou** ainsi que toute sa famille pour m'avoir hébergé et soutenu financièrement durant la période 2001-2007 à Abidjan. Si j'ai pu poursuivre mes études en France, c'est en grande partie grâce à vous, je vous remercie du fond du cœur.

Très sincères remerciements à messieurs **Soumahoro Karamoko**, **Bakayoko Losseni**, vos soutiens financiers, vos encouragements durant mon cursus universitaire à Cocody (Abidjan) ont sans aucun doute contribué à la réussite de ce rêve, je vous dédie cette thèse.

Enfin à toi **Soumahoro Mémon**, comment aurais-je pu terminer cette thèse sans tes efforts auprès du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique ivoirien pour le renouvellement de ma bourse ? je te dois cette thèse.

REMERCIEMENTS

Ce travail est le couronnement d'un processus ayant commencé en 2007/2008 grâce à l'appui des Professeurs **Marie-Aleth Lacaille-Dubois** (Directrice du laboratoire de Pharmacognosie et co-directeur de thèse) et **Anne-Claire Mitaine-Offer** (Directeur de thèse). Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir donné ainsi l'opportunité d'inscription à l'Université de Bourgogne (UB). Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience et de votre rigueur scientifique et professionnelle. Recevez ici mes sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous m'avez accordés tout au long de cette thèse. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Je n'oublie pas votre soutien moral qui m'a souvent aidé à remonter la pente dans les moments difficiles. J'exprime une grande admiration pour votre sens de travail bien fait. Je tiens enfin à remercier le laboratoire pour avoir financé en partie cette thèse, je suis reconnaissant de votre soutien durant toute la période qu'a duré la crise socio-politique dans mon pays la Côte d'Ivoire en 2010/2011. A vrai dire, je ne sais pas comment vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté, transmis et appris lors de cette thèse.

Je remercie aussi les Professeurs **Odile Chambin** et **Tan Kimny**, tous deux membres de mon comité de suivi de thèse. Ces derniers ont durant toute la durée de mon travail, établi chaque année un compte rendu exhaustif sur l'évolution de mes résultats. Ceci a permis de mettre en évidence les qualités scientifiques de mon travail.

À Messieurs **Jean-François Mirjolet** et **Olivier Duchamp** de la société Oncodisign Biotechnology, j'adresse mes sincères remerciements pour leur collaboration dans la réalisation des tests de cytotoxicité.

Aux Professeurs **Brigitte Deguin**, **Elisabeth Seguin**, **Françoise Bevalot** et au Docteur **Corinne Girard**, recevez mes remerciements pour avoir accepté d'être membre de ce jury. Je vous adresse ma profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire de pharmacognosie.

Aux docteurs **Nicolas Desbois** et **Marc Sautour**, je vous remercie pour votre soutien moral, vos encouragements et conseils.

À mes amis et collègues dudit laboratoire, je cite **Debabrata Acharya**, **Olivier Noté**, **Guy Kougan**, **Jabrane Aymen**, **Manase Mahenina**, **Jens Linnek**, **Abdelmalek Rezgui**, **Elier Galarraga**, **Alida Pérez Colmenares**, **Bencharif Betina Soumeya**, merci pour votre aide technique et scientifique et votre amitié. Au personnel technique, **David Pertuit**, **Sandrine Pacquelet** et **Stephanie Masselot**, merci pour votre chaleureuse collaboration et votre aide technique.

Mes remerciements vont à travers l'**Université de Bourgogne** au **gouvernement et au peuple français** qui contribuent ainsi au renforcement des capacités scientifiques et techniques des pays en développement.

Je tiens vivement à remercier le **gouvernement ivoirien** à travers le **Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique** qui nous a octroyé la plus grande partie des moyens financiers nécessaires à notre formation.

À tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse.

A mon père et à ma mère

A mes frères et sœurs,

et à tous mes amis

Publications

1. **G. Timité, A-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, M. Ramezani, A. Rustaiyan, J-F. Mirjolet, O. Duchamp, M-A. Lacaille-Dubois**
Structure elucidation of new oleanane-type glycosides from three species of Acanthophyllum,
Magnetic Resonance in Chemistry Volume 48, Issue 5, Page(s) :2237-2244 (2010).
2. **G. Timité, A-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, T. Paululat, C. De-laude, M-A. Lacaille-Dubois**
Presenegenin Glycosides from Securidaca welwitschii,
Helvetica Chimica Acta, Volume 93, Issue 11, Page(s) :370-374 (2010).
3. **G. Timité, A-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, J-F. Mirjolet, O. Duchamp, M-A. Lacaille-Dubois**
Unusual oleanane-type saponins from Arenaria montana,
Phytochemistry, Volume 72, Issue 6, Page(s) :503-507 (2011).
4. **G. Timité, A-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, J-F. Mirjolet, O. Duchamp, M-A. Lacaille-Dubois**
Structure and cytotoxicity of steroidal glycosides from Allium schoenoprasum,
soumise à Food Chemistry.

Posters et Communication oral

1. **15^e Forum des Jeunes Chercheurs, (Poster 1)**

Etude Phytochimique de deux espèces d'Acanthophyllum : Acanthophyllum sordidum et A. elatius, Dijon, 25-26 juin 2009, France

2. **4th International Conference on Saponins, (Poster 2)**

Phytochemical study of Two species of Acanthophyllum : Acanthophyllum sordidum and A. elatius, Nancy, July 9-11, 2009, France

3. **9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, (Poster 3)**

Chemotaxonomic study of the Caryophyllaceae family : Saponins from Acanthophyllum sordidum and A. elatius, Ankara, June 23-26, 2009, Turkey

4. **16^e forum des jeunes chercheurs, (Poster 4)**

Etude Chimiotaxonomique d'une espèce de Polygalaceae : Securidaca welwitschii, Besançon, 7-8 juin 2010, France

5. **58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, (Poster 5)**

Chemotaxonomic study of the Polygalaceae family : saponins from Securidaca welwitschii, Berlin, Aug 29 - Sep 2, 2010, Germany

6. **Colloque SAPONINA - utilisation des plantes à saponines dans l'agriculture et l'industrie, (Poster 6)**

Acylated saponins from Securidaca welwitschii, Chemillé, 13-14 Janvier 2011, France

7. **17^e Forum des Jeunes Chercheurs, (Communication orale)**

Plantes des familles de Caryophyllaceae et Polygalaceae : Chimie extractive, chimie structurale et étude cytotoxique des saponinosides triterpéniques, Dijon, 16-17 juin 2011, France

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APG	Angiosperm Phylogeny Group
CCM	Chromatographie sur couche mince
HPTLC	High performance thin layer chromatography
CHCl₃	Chloroforme
MeOH	Méthanol
AcOH	Acide Acétique
H₂O	Eau
UV	Ultraviolet
VLC	Chromatographie liquide sous vide
MPLC	Chromatographie liquide à moyenne pression
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
MS	Spectrométrie de masse
FAB	Ionisation par bombardement d'atomes rapides
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
ppm	Partie par million
COSY	COrrélation SpectroscopY
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
ROESY	Rotating-frame Overhauser SpectroscopY
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

TMS	Tétraméthylsilane
CG	Chromatographie en phase gazeuse
uma	Unité de masse atomique
nd	non déterminé
<i>s</i>	Singulet
<i>d</i>	Doublet
GlcA	Acide glucuronique
Xyl	Xylose
Gal	Galactose
Rha	Rhamose
Fuc	Fucose
Qui	Quinovose
Ara	Arabinose
Api	Apiose
Agly	Aglycone
MTT	3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
SVF	Sérum de veau foetal
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IC₅₀	Concentration de substance nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition
<i>δ</i>	Déplacement chimique exprimé en ppm
<i>J</i>	Constante de couplage s'exprime en Hertz
<i>δ</i>	Déplacement chimique exprimé en ppm
<i>J</i>	Constante de couplage s'exprime en Hertz
<i>δ</i>	Déplacement chimique exprimé en ppm
<i>J</i>	Constante de couplage s'exprime en Hertz

RÉSUMÉ : Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR Pharmacie, au sein de l'Université de Bourgogne. Elle vise essentiellement la recherche de molécules d'origine végétale issue de la biodiversité tropicale dotées d'une activité antitumorale, dont principalement les saponines. Ce sont des glycosides triterpéniques ou stéroïdiques connus pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques. L'étude de 6 espèces végétales appartenant à 3 familles à savoir *Acanthophyllum elatius*, *A. lilacinum*, *A. sordidum* et *Arenaria montana* (Caryophyllaceae), *Securidaca welwitschii* (Polygalaceae) et *Allium schoenoprasum* (Alliaceae) a conduit à l'isolement et à la caractérisation de 24 glycosides naturels. Il s'agit de 13 saponines triterpéniques parmi lesquelles 10 sont de structure nouvelle ainsi que 11 saponines stéroïdiques dont 7 nouvelles. Les structures ont été élucidées principalement par l'utilisation de la RMN 2D ainsi que la spectrométrie de masse. 10 des 24 molécules isolées ont été testées en vue d'évaluer leurs activités cytotoxiques sur deux lignées cellulaires cancéreuses coliques (HT-29 et HCT 116). Nos résultats montrent que 9 d'entre elles possèdent une activité cytotoxique significative. Des relations structure/activité ont été ainsi proposées.

Mots-clés : saponines ; triterpènes ; stéroïdes ; glycosides ; RMN ; cytotoxicité

ABSTRACT : This thesis was realized in the laboratory of Pharmacognosy, in the Pharmacy section of the Bourgogne University. The main theme of this laboratory is the research of natural saponins from the tropical biodiversity, with antitumoral activities. These molecules are triterpenic or steroidal glycosides, well known for their various pharmacological activities. The study of 6 species belonging to 3 different families : *Acanthophyllum elatius*, *A. lilacinum*, *A. sordidum* and *Arenaria montana* (Caryophyllaceae), *Securidaca welwitschii* (Polygalaceae) and *Allium schoenoprasum* (Alliaceae), led to the isolation and characterization of 24 natural glycosides. Among them, 13 were triterpenic saponins with 10 new structures and 11 were steroidal saponins with 7 new structures. The spectral analysis was achieved using mainly 2D NMR and mass spectrometry. The cytotoxic activities of 10 isolated compounds were evaluated on 2 strains of human colon cancer cells (HT-29 et HCT 116) and 9 were active ones. Structure/activity relationships were also proposed.

keywords : saponins ; triterpenes ; steroids ; glycosides ; NMR ; cytotoxicity

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1 ETUDE BOTANIQUE	5
1.1 Introduction	5
1.2 Ordre des Caryophyllales	5
1.2.1 La famille des Caryophyllaceae	6
1.2.1.1 Distribution géographique et écologie	7
1.2.1.2 Intérêt économique	7
1.2.1.3 Le genre <i>Acanthophyllum</i>	9
1.2.1.3.1 L'espèce <i>Acanthophyllum sordidum</i> Bunge ex Boiss.	9
1.2.1.3.2 L'espèce <i>Acanthophyllum lilacicum</i> Schischk.	10
1.2.1.3.3 L'espèce <i>Acanthophyllum elatius</i> Bunge	11
1.2.2 Le genre <i>Arenaria</i>	12
1.2.2.1 L'espèce <i>Arenaria montana</i>	12
1.3 Ordre des Fabales	13
1.3.1 La famille des Polygalaceae	13
1.3.1.1 Distribution géographique	14
1.3.1.2 Intérêt économique	14
1.3.1.3 Le genre <i>Securidaca</i> (synonyme : <i>Bonaveria</i> , <i>Securigera</i>)	14
1.3.1.4 L'espèce <i>Securidaca welwitschii</i> Oliv.	15

1.4	Ordre des Asparagales	16
1.4.1	La famille des Alliaceae	17
1.4.1.1	Distribution géographique et écologie	17
1.4.1.2	Intérêt économique	17
1.4.2	Le genre <i>Allium</i>	18
1.4.2.1	L'espèce <i>Allium schoenoprasum</i> L.	18
Chapitre 2 TRAVAUX ANTÉRIEURS		20
2.1	TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES ANTÉRIEURS	20
2.1.1	Généralités sur les saponines	20
2.1.2	Structure des saponines	21
2.1.2.1	Structure des génines	21
2.1.2.1.1	Génines triterpéniques	21
2.1.2.1.2	Génines stéroïdiques	22
2.1.2.2	Les sucres	23
2.1.2.3	Les acides organiques	23
2.1.3	Travaux phytochimiques antérieurs sur les familles étudiées	27
2.1.3.1	Les saponines isolées de la famille des Alliaceae	27
2.1.3.2	Les saponines isolées de la famille des Caryophyllaceae	33
2.1.3.3	Saponines à gypsogénine	35
2.1.3.4	Saponines à acide gypsogénique	37
2.1.3.5	Saponines à acide quillaïque	39
2.1.3.6	Saponines à acide 16 α -hydroxygypsogénique	41
2.1.3.7	Les saponines isolées de la famille des Polygalaceae	42
2.1.3.8	Saponines à Présénégénine	42
2.1.3.9	Saponines à bayogénine	49
2.1.3.10	Saponines à acide médicagénique	50
2.1.3.11	Saponines à polygalagénine	52
II ETUDE CHIMIQUE		53
Chapitre 1 MATÉRIELS ET MÉTHODES APPLIQUÉS À LA PHYTOCHIMIE		54

1.1	Matériel végétal et extraction	54
1.2	Méthodes chromatographiques analytiques	54
1.2.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	54
1.2.1.1	Conditions chromatographiques	55
1.2.1.1.1	Plaques utilisées	55
1.2.1.1.2	Solvants	55
1.2.1.1.3	Révélation	55
1.3	Méthodes chromatographiques préparatives	56
1.3.1	Chromatographie d'exclusion moléculaire	56
1.3.2	Chromatographie liquide sous vide (VLC)	56
1.3.3	Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC)	57
1.4	Détermination structurale	57
1.4.1	Méthodes chimiques	57
1.4.1.1	Hydrolyse acide	57
1.4.1.2	Hydrolyse alcaline forte	58
1.4.1.3	Hydrolyse alcaline douce	58
1.4.2	Méthodes spectroscopiques	58
1.4.2.1	Spectrométrie de masse (MS)	58
1.4.2.1.1	La source d'ions	59
1.4.2.1.2	L'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)	59
1.4.2.2	Spectres de masse	60
1.4.2.3	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	60
1.4.2.3.1	RMN bidimensionnelle Homonucléaire	62
1.4.2.3.1.1	COSY(CORrélation SpectroscopY)	62
1.4.2.3.1.2	TOCSY(TOTAL Correlation SpectroscopY)	62
1.4.2.3.1.3	ROESY (Rotating-frame Overhauser SpectroscopY)	63
1.4.2.3.1.4	NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)	63
1.4.2.3.2	RMN bidimensionnelle Hétéronucléaire	63
1.4.2.3.2.1	HSQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)	63

1.4.2.3.2	HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)	63
1.4.2.4	Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)	64
1.4.2.4.1	Configuration absolue des sucres	64
1.4.3	Application à l'étude des saponines	65
Chapitre 2	INVESTIGATIONS PHYTOCHIMIQUES	66
2.1	Etude phytochimique de trois plantes du genre <i>Acanthophyllum</i>	66
2.1.1	Extraction et isolement des composés ASa , ASb , ASc , AE 62-66 et AL66-74	66
2.1.2	Détermination structurale des composés purifiés	69
2.1.2.1	Détermination structurale du composé ASa	70
2.1.2.2	Détermination structurale du composé ASb	74
2.1.2.3	Détermination structurale du composé AE 62-66	85
2.1.2.4	Détermination structurale du composé AL66-74	87
2.1.2.5	Détermination structurale du composé ASc	90
2.1.3	Conclusion de l'étude chimique des 3 espèces du genre <i>Acanthophyllum</i>	92
2.2	Etude phytochimique de <i>Securidaca welwitschii</i> Oliv.	99
2.2.1	Extraction et isolement des 5 saponines	99
2.2.2	Détermination structurale des composés Sw264a/b , Sw21a/b et Sw231	101
2.2.2.1	Détermination structurale des composés Sw264a/b	101
2.2.2.2	Détermination structurale du composé Sw21a/b	114
2.2.2.3	Détermination structurale du composé Sw231	124
2.2.3	Conclusion de l'étude chimique du <i>Securidaca welwitschii</i>	130
2.3	Etude phytochimique de <i>Arenaria montana</i>	140
2.3.1	Extraction et isolement des composés AMA-1 , AMR et AMOG5	140
2.3.2	Détermination structurale des composés isolés de <i>Arenaria montana</i>	144
2.3.2.1	Détermination structurale du composé AMA-1	144
2.3.2.2	Détermination structurale du composé AMR	152
2.3.2.3	Détermination structurale du composé AMOG5	159
2.3.3	Conclusion de l'étude chimique du <i>Arenaria montana</i>	168
2.4	Etude phytochimique de <i>Allium schoenoprasum</i> L.	175

2.4.1	Extraction et isolement des composés des composés isolés de <i>Allium schoenoprasum</i> L.	175
2.4.2	Détermination structurale des composés isolés de <i>Allium schoenoprasum</i>	178
2.4.2.1	Détermination structurale du composé ASC12R5a/b	178
2.4.2.2	Détermination structurale du composé ASC23R2a/b	189
2.4.2.3	Détermination structurale du composé ASC24R9	199
2.4.2.4	Détermination structurale du composé ASC23R4a/b	207
2.4.2.5	Détermination structurale du composé ASC113	218
2.4.2.6	Détermination structurale du composé ASC1154	220
2.4.2.7	Détermination structurale du composé ASC23R6	223
2.4.2.8	Détermination structurale du composé ASCi-2	226
2.5	Conclusion de l'étude chimique de <i>Allium schoenoprasum</i>	229

III TRAVAUX BIOLOGIQUES 231

Chapitre 1 MATÉRIELS ET MÉTHODES APPLIQUÉS À L'ÉTUDE BIOLOGIQUE 232

1.1	Activité cytotoxique	232
1.1.1	Test au MTT	232
1.1.2	Protocole	233

Chapitre 2 TRAVAUX BIOLOGIQUES ANTÉRIEURS 234

2.1	Généralités	234
2.1.1	Saponines triterpéniques bioactives : exemple des Caryophyllaceae et Polygalaceae	234
2.1.1.1	Activités cytotoxique et immunomodulatrice	234
2.1.1.2	Autres activités	236
2.1.1.2.1	Activité hémolytique	236
2.1.1.2.2	Effet hypolipémiant et le transport intestinal	236
2.1.1.2.3	Effet sur la membrane	237
2.1.1.2.4	Effet sur la contraction utérine	237
2.1.1.2.5	Activités anti-inflammatoire	237
2.1.1.2.6	Activités anti-diabétique et anti-obésité	237

2.1.1.2.7	Activités anxiolytique et sédative/hypnotique	238
2.1.1.2.8	Activité anti-diarrhéique et anti-ulcérogène	238
2.1.1.2.9	Activité antipsychotique	238
2.1.1.2.10	Effet sur la maladie d'Alzheimer	238
2.1.2	Saponines stéroïdiques bioactives : exemple du genre <i>Allium</i>	239
2.1.2.1	Activités cytotoxique et immunomodulatrice	239
2.1.2.2	Autres activités	240
2.1.2.2.1	Inhibition de l'AMPc Phosphodiesterase et Na ⁺ /K ⁺ ATPase	240
2.1.2.2.2	Effet sur le métabolisme des phospholipides	240
2.1.2.2.3	Activité antifongique	241
2.1.2.2.4	Activité antispasmodique	241
2.1.2.2.5	Les anti-agrégants plaquettaires	241
2.1.2.2.6	Effet Hypocholestérolémiant	242
2.2	Relation structure-cytotoxicité des saponines	242
2.2.1	Généralité	242
2.2.1.1	Cas des triterpénoïdes	243
2.2.1.1.1	Cas des saponines stéroïdiques	244
2.3	Mécanisme d'action des saponines	245
2.4	Cytotoxicité du complexe saponine-toxine	247
Chapitre 3 TRAVAUX BIOLOGIQUES PERSONNELS		249
3.1	Le Cancer du Côlon	249
3.1.1	Rappel sur l'anatomie du gros intestin	249
3.1.1.1	Les éléments constitutifs (Sy Nguyen, 2008)	249
3.1.2	Incidence et mortalité par cancer colorectal	251
3.1.2.1	Introduction	251
3.1.2.2	Projection 2011 de l'incidence	251
3.1.2.3	Projections 2011 de la mortalité	252
3.2	Resultats et interpretations des tests cytotoxiques	254
3.2.1	Introduction	254
3.2.2	Résultats et interprétations des activités cytotoxiques	254

3.2.2.1	Etude cytotoxique des saponines de <i>Acanthophyllum</i> et <i>Arenaria montana</i> (Caryophyllaceae)	254
3.2.2.2	Interprétation des résultats	257
3.2.2.3	Conclusion	258
3.2.2.4	Etude cytotoxique des saponines de <i>Allium schoenoprasum</i> (Al- iaceae)	260
3.2.2.5	Interprétation des résultats	261
3.2.2.6	Conclusion	263

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	265
------------------------------------	------------

Références bibliographiques	269
------------------------------------	------------

Liste des tableaux	300
---------------------------	------------

Liste des figures	303
--------------------------	------------

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Très tôt au cours de l'évolution, les hommes, pour se soigner, utilisèrent les ressources présentes dans leur environnement naturel.

L'un des plus anciens traités médicaux est le "**Papyrus Ebers**", issu de la médecine égyptienne, qui date de 1500 ans avant notre ère. Il s'agit d'une volumineuse compilation de connaissances médicales, c'est-à-dire un répertoire de plus de 700 médicaments, tirés pour la plupart du règne végétal : safran, myrrhe, aloès, feuilles de ricin, lotus bleu, extrait de lys, suc du pavot somnifère, huile de baumier, résine, encens, jusquiame, chanvre, etc.

Dans leur récente publication, David J. Newman et Gordon M. Cragg du "**National Cancer Institute**", ont analysé l'importante place qu'occupent substances naturelles comme source de médicament durant les 30 dernières années. Selon ces auteurs la place des substances naturelles dans le développement de médicaments est irréprochable, ainsi pour des champs thérapeutiques comme celui du cancer, entre 1940 et 2010, sur les 175 petites molécules, 131 soit 74,8% ne sont pas des produits de synthèse, avec 85, soit 48,6% d'origine ou d'inspiration naturelle (Newman and Cragg, 2012).

En dépit de cette importance historique des plantes, et d'une recherche contemporaine considérable dans l'identification de nouveaux composés chimiques d'origine naturelle, de nombreuses inconnues persistent, tant au plan chimique que pharmacologique au regard de l'immensité du gisement biologique que nous offre la nature dans toutes ses manifestations.

Considérant que moins de 10% des centaines de milliers d'espèces végétales et 1% seulement des espèces vivantes dans le milieu marin ont été étudiées pour leur composition chimique, on peut raisonnablement penser qu'il existe encore une énorme mine de diversité moléculaire à exploiter (Lassaux and Mynard, 2007).

L'extraction, le fractionnement bioguidé, l'isolement, la purification et la détermination structurale de molécules d'origine naturelle et/ou leur modification par héli-synthèse organique, sont autant d'étapes nécessaires à la découverte de nouvelles substances bioactives.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme central.

Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV...).

D'un point de vue application, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales. L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante. Ainsi, de l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'est largement appuyée sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires des végétaux pour le développement de nouveaux médicaments.

Les saponines (glycosides triterpéniques ou stéroïdiques) constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leur large éventail d'applications pharmacologiques.

Dans ce contexte, le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Bourgogne dirigé par le Professeur Marie-Aleth Lacaille-Dubois apporte sa contribution à la recherche de saponines biologiquement actives dans le domaine de la cancérologie à partir de diverses familles végétales. Notre stratégie de recherche consiste à sélectionner des familles de plantes connues pour leur richesse principalement en saponines : il s'agit de l'approche chimiotaxonomique. Puis après l'extraction, isolement et analyse structurale, les molécules étudiées sont soumises à une évaluation de leur activité cytotoxique sur cellules cancéreuses *in vitro*.

Nous présentons dans cette thèse l'étude phytochimique de quatre espèces de la famille des Caryophyllaceae (*Acanthophyllum elatius* Bunge, *A. lilacinum* Schischk., *A. sordidum* Bunge ex Boiss. et *Arenaria montana*) et d'une espèce de la famille des Polygalaceae (*Securidaca welwitschii* Oliv.), riches en saponines de type triterpénique ainsi qu'une espèce de la famille des Alliaceae (*Allium schoenoprasum* L.) riche en saponines de type stéroïdique.

Ce travail présenté est composé de trois grandes parties :

- **Un premier volet** consacré à une **synthèse bibliographique** relative aux familles

et genres des plantes étudiées à savoir l'étude botanique et les travaux phytochimiques antérieurs.

- **Une seconde partie** qui concerne l'**étude chimique personnelle** c'est-à-dire les Investigations phytochimiques des espèces de plantes choisies.
- **Une troisième et dernière partie**, qui correspond à l'**étude biologique**, réalisée en collaboration avec la société de biotechnologie **Oncodesign**, société dont l'objectif est de découvrir des thérapies anticancéreuses efficaces.

Première partie

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BOTANIQUE

1.1 Introduction

Notre étude phytochimique a porté sur six espèces de plantes appartenant à trois familles distinctes, à savoir les Caryophyllaceae, Polygalaceae et Alliaceae. Ce premier chapitre sera consacré à une revue de l'aspect botanique de ces différentes espèces. Ainsi, nous ferons pour chacune d'elles une description succincte des **Ordres**, des **Familles** et des **Genres** auxquels elles appartiennent. Les différentes distributions géographiques, écologies et intérêts économiques seront développés, avant de décrire de façon détaillée les caractères botaniques des **Espèces**.

Nous décrirons d'abord *Acanthophyllum sordidum*, *A. lilacinum*, *A. elatius* et *Arenaria montana* appartenant à la famille des Caryophyllaceae, puis l'espèce *Securidaca welwitschii* de la famille des Polygalaceae en terminant par la description de *Allium schoenoprasum* de la famille des Alliaceae.

1.2 Ordre des Caryophyllales

Les *Caryophyllales* sont un ordre de plantes Dicotylédones. Elles sont nettement monophylétiques, comme le montrent de nombreuses synapomorphies caractéristiques, telles que les tiges à anneaux concentriques de xylème et de phloème ou à faisceaux ; les nœuds à une fenêtre ; les plastes des tubes criblés à anneau périphérique de filaments protéiques entourant souvent un cristal protéique central (alors que la plupart des tricolpées ont des plastes des tubes criblés à grains d'amidon) ; les bétalaines constituant des pigments rouge à jaune (mais des anthocyanes

chez les *Caryophyllaceae*) ; la perte de l'intron *rp/2* de l'ADN chloroplastique ; un seul verticille de tépales ; la placentation centrale libre ou basale ; l'embryon courbé autour de la graine ; et la présence d'un périsperme tandis que l'albumen est réduit ou absent (Behnke, 1976, Chase et al., 1993, Downie and Palmer, 1994a, Rettig et al., 1992, Rodman, 1990). Le monophylétisme du groupe est de plus nettement confirmé par les séquences *rbcL*, *atpB* et de l'ADN_r 18S (Judd et al., 2002). L'ordre selon la classification classique de Cronquist (1981) comprenait les familles suivantes : *Achatocarpaceae*, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae* (famille des cactus), ***Caryophyllaceae*** (famille des œillets véritables), *Chenopodiaceae* (famille de l'épinard), *Didiereaceae*, *Molluginaceae*, *Nyctaginaceae* (famille du bougainvilliers), *Phytolaccaceae*, *Portulacaceae*. La classification phylogénétique APG (1998)(APG, 1998) et la classification phylogénétique APG II (2003) (APGII, 2003) ont étendu cet ordre. Enfin, en classification phylogénétique APG III (2009) (APGIII, 2009), il comprend 34 familles, 692 genres et environ 11155 espèces.(Bruneton, 2009)

1.2.1 La famille des *Caryophyllaceae*

Plantes herbacées en général ; tiges parfois à anneaux concentriques de xylème et de phloème ; **présence d'anthocyanes** ; souvent à saponines triterpéniques. Poils variables. **Feuilles opposées**, simples, entières, souvent étroites, à nervation pennée, les nervures secondaires souvent fugaces et la nervation paraissant \pm parallèle, les paires de feuilles reliées par une crête transversale aux nœuds, **les nœuds généralement renflés** ; stipules absentes ou présentes. Inflorescences déterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales. Fleurs généralement hermaphrodites, actinomorphes, parfois munies d'un androgynophore. Tépales 4-5, libres à soudés, imbriqués, souvent sépaloïdes. Pétales véritables absents, mais un verticille externe de 4-5 étamines très souvent pétaloïdes et dénommées ici « pétales », ceux-ci fréquemment bilobés et parfois différenciés en une longue et mince partie basale (l'onglet) et une partie apicale élargie (le limbe) séparées par un appendice articulé. Etamines 4-10 ; à filets libres ou légèrement soudés, parfois adnés aux « pétales » ; grains de pollen tricolpés ou polyporés. Carpelles 2-5, soudés ; ovaire supère, à placentation centrale libre ou rarement basale ; stigmate réduit à linéaire. Ovules généralement nombreux, rarement en petit nombre ou solitaires, \pm campylotropes. Nectar produit par un disque ou à la base des étamines. Fruit généralement une capsule loculicide, s'ouvrant par des valves ou par des dents apicales, mais parfois une utricule ; embryon généralement courbe ; albumen \pm absent, remplacé par un périsperme figure 1.1(Judd

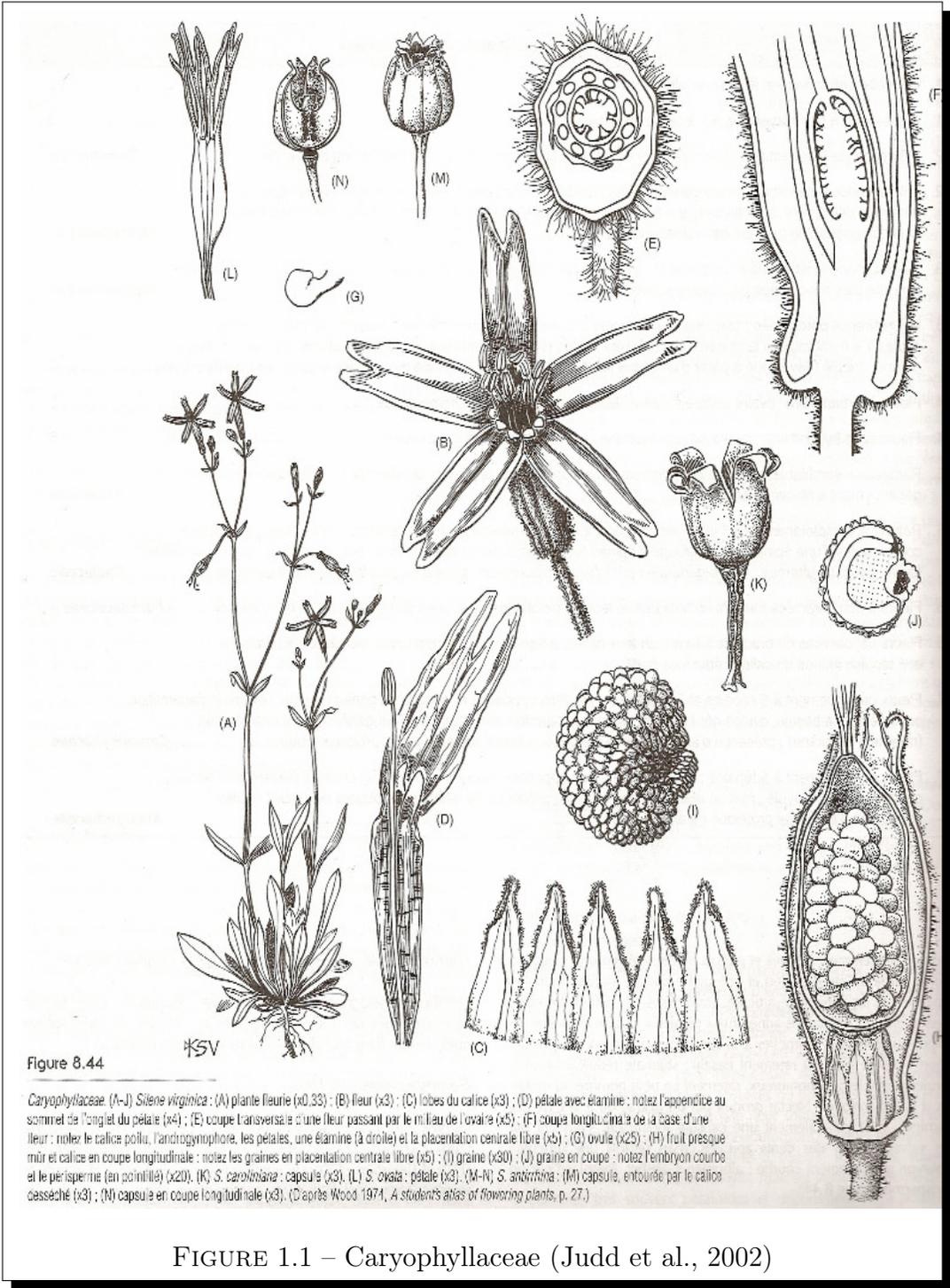
et al., 2002).

1.2.1.1 Distribution géographique et écologie

Répandues, mais surtout caractéristiques des régions tempérées et chaudes de l'hémisphère nord, surtout dans les habitats et les sites rudéraux (Judd et al., 2002).

1.2.1.2 Intérêt économique

La famille des *Caryophyllaceae* est renommée pour ses plantes ornementales : *Dianthus* (l'oeillet), *Gypsophila* (la gypsophile), *Saponaria* (la saponaire) et *Silene* (la silène) (Judd et al., 2002).



1.2.1.3 Le genre *Acanthophyllum*

Ce sont des arbrisseaux, plus ou moins de petite taille à tiges multiples, généralement à feuilles rigides couvertes d'épines, avec des tiges multiples et courtes. Les feuilles sont linéaires-subulées, généralement rigides, épineuses, la base étant souvent entourée d'une membrane hyaline. Les feuilles sont petites printanières, herbacées, épineuses, caduques, rarement persistantes. L'inflorescence est souvent caduque. Les fleurs possèdent des bractées, souvent sessiles, plus ou moins rapprochées ou regroupées en amas, rarement isolées. Le calice est généralement tubuleux, rarement conique à 5 dents, avec généralement 5 nervures. Le nombre des pétales est de 5, le limbe est entier ou à sommet sub-émarginé (légèrement échancré au sommet). L'ovaire est uniloculaire, contenant généralement 4-12 ovules. La graine est en forme de haricot. Le genre *Acanthophyllum* comporte 61 espèces à travers le monde, parmi lesquelles 33 poussent en Iran, dont 23 espèces sont endémiques. On distingue 7 sections dans ce genre : *Macrodongta*, *Macrotegia*, *Acanthophyllum*, *Pleiosperma*, *Pseudacanthophyllum*, *Scapiflora* (Ghaffari, 2004, of USSR, 1936, Rechinger et al., 1988). Selon la littérature (Ghaffari, 2004), le plus grand nombre d'espèces a été enregistré à l'est de l'Iran (province du Khorassan) et dans les zones environnantes comme le Turkménistan et l'Afghanistan.

1.2.1.3.1 L'espèce *Acanthophyllum sordidum* Bunge ex Boiss.

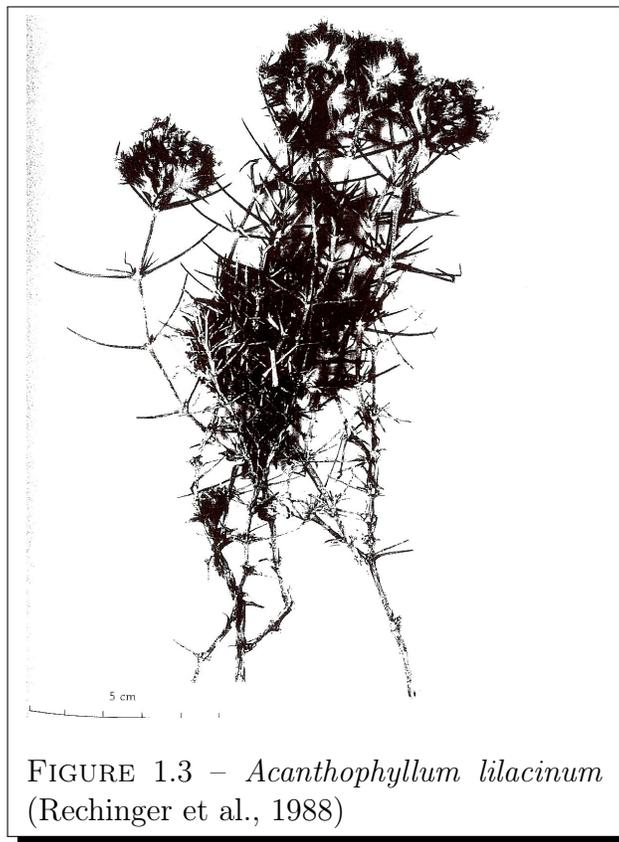
Cette espèce mesure entre 10 à 20 cm de haut, ramifiés à la base et densément couverts de poils courts et glandulaires. Ces plantes portent des branches fleuries de 5-10 cm de longueur, simples, à peine ramifiées. Les entre-nœuds ont pour la plupart une longueur entre 5-15 mm. Les feuilles sont subulées ou \pm aplaties, 10-15 (-20) x 1-2,5 (-3) mm, dressées étalées ou étalées, riches en matières grasses. Les feuilles printanières sont étroitement obovales (en forme d'œuf, le sommet étant la partie la plus large) \pm linéaire. Inflorescence de 10 x 7-15 (-20) mm, pour la plupart à fleurs multiples, terminale réunies en verticillastres (faux verticilles). Feuilles 8-12 x 2-4 mm, ovales \pm concaves, acuminées. Bractées 5-10 x 1,5-3, bractéoles 4,5-7x 1-1,5 mm \pm cartilagineuses, ovales ou linéaires-lancéolées, souvent carénées, hyaline obsolètes marginées, ciliées. Les Pétales du calice ont 5-6 mm de long, à dents de longueur inégales de 1-2 mm, ovales ou ovales-lancéolés, parfois obsolètes, hyalines marginées, ciliés. Les pétales sont à peine exsertes avec 2 mm de long et une largeur d'environ 5mm, étroitement linéaires \pm émarginés et parfois laciniés et de couleur blanche. Les filaments du calice sont exsertes (Rechinger et al., 1988).



1.2.1.3.2 L'espèce *Acanthophyllum lilacicum* Schischk.

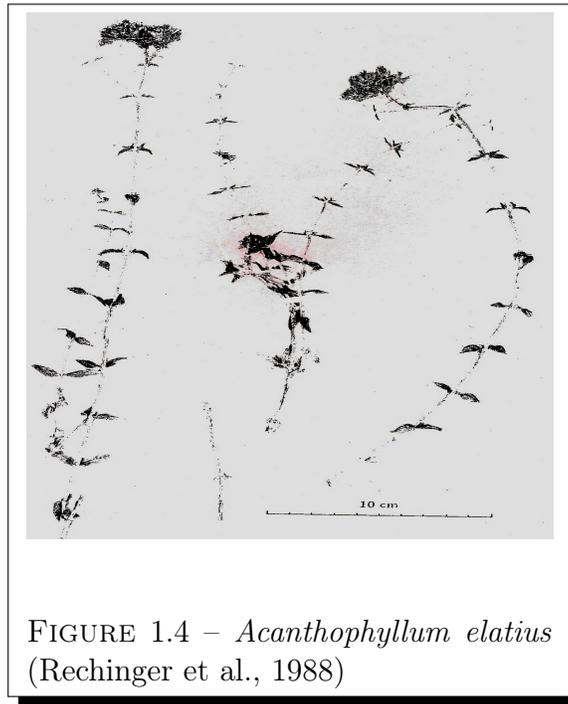
C'est une espèce pouvant mesurer 20-25 cm de haut, ramifiés, avec des poils très courts, glanduleux et des poils épars; cette plante porte de nombreux poils plus longs dans la région de l'inflorescence. Les branches sont fleuries de 6-18 cm de longueur, simple pour la majorité, de couleur violette, les entre-nœuds de 10-20 (-30) mm de long. Feuilles (20-) 25-35 (-40) mm de long, avec une forme \pm triangulaire, subulées vers le sommet, dressées-étalées. L'aisselle des branches est raccourcie, rarement dépouillées de leurs petites branches. Les feuilles à la base des branches sont persistantes. Inflorescences nombreuses, fragiles, 10-30 (-40) mm de diamètre, de nombreuses fleurs, dense, inflorescence partielle, paires, subégales, sessile ou à pédoncule mesurant 12 (-15) mm de long. Cyme partielle à (1 -) 3 (-7) fleurs, les fleurs sont toutes sessiles. Feuilles supérieures 10-13 x 2,5-3 mm, avec des feuilles similaires au niveau de la bractée inférieure; bractées 8-12 x 2,5-3 parfois plus long que le calice et des bractéoles 5-7 x 1,5-2 mm plus courtes que le calice, plus ou moins épais, ovales ou étroitement ovale à la base, souvent convexe, lancéolées, acuminées, recourbées à droites. Le calice à 7-8 mm de long, à cinq nervures, denté à 1,5-2 mm de long, étroitement triangulaires, très mince en certain point avec 1-1,5 mm de long. Des pétales à 5-7 mm de hauteur du calice exsertes, avec une largeur de \pm

1,5 mm, étroitement obovales, aigus ou obtus et lilas (Rechinger et al., 1988).



1.2.1.3.3 L'espèce *Acanthophyllum elatius* Bunge

Ce sont des arbrisseaux pouvant mesurer jusqu'à 100 cm de hauteur, dressés, moyennement ramifiés, glabre. Cette plante portent des branches fleuries souvent très allongé, \pm cylindrique, pâle. Les entre-nœuds mesurent 30-40 mm de long. Ces plantes présentent des feuilles caulinaires de 10-15 x 3-6 mm, ovales-lancéolées ou lancéolées, étalées horizontalement. On n'observe pas de feuilles printanières, et la plante est constituée d'une inflorescence étendue, variables, souvent de 30 - 50 mm de diamètre, parfois plus, et à fleurs multiples réunies en verticillastres. L'inflorescence est partielle et subégales pour la plupart, à cymes partielles de 1(-3) fleurs, à pédoncules de 2-30 mm de long. Les fleurs sont sessiles ou à pédicelle de 1 mm de long. Calice d'environ 5-7 mm de long, à cinq nervures, denté de tailles inégales, 1-2 mm de long, étroitement triangulaires. Des pétales à 4-5 mm de hauteur du calice exsertes, avec une largeur de 1,5 mm, obovales, aiguës (Rechinger et al., 1988).



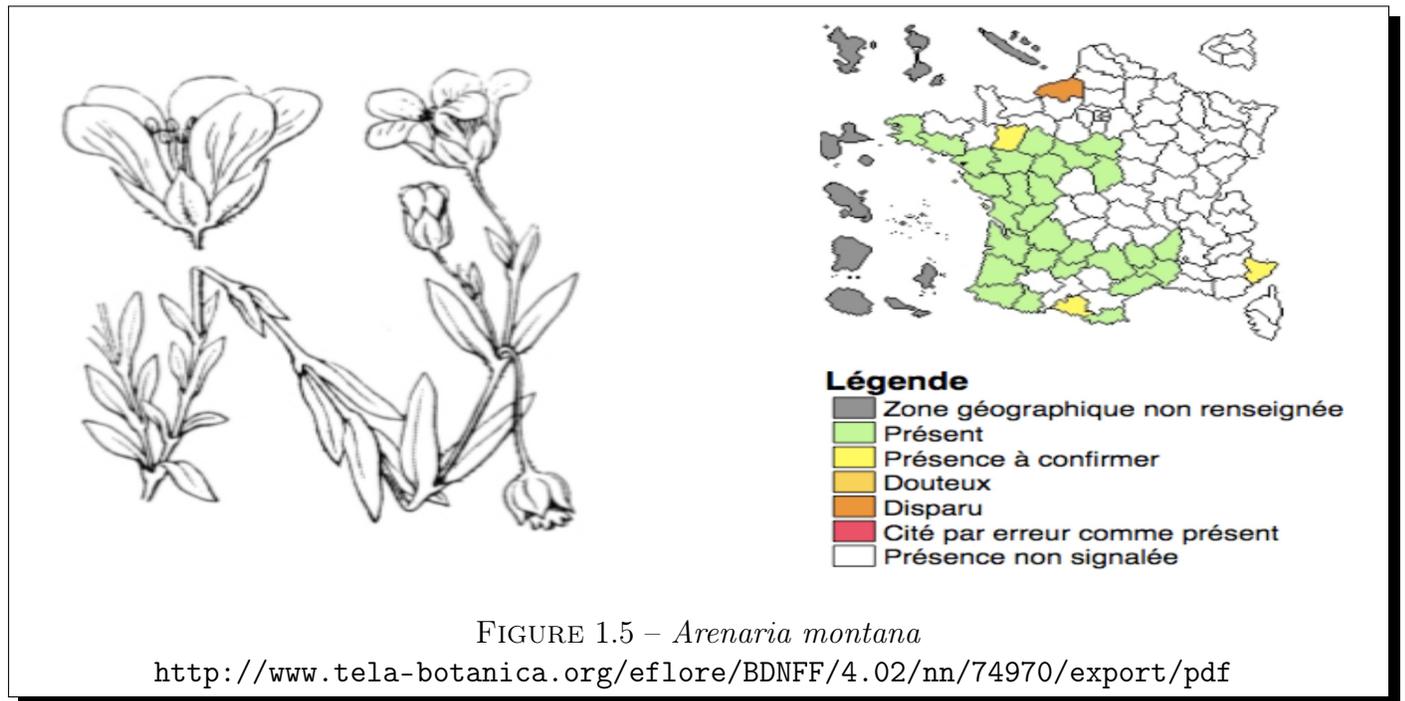
1.2.2 Le genre *Arenaria*

Le nom du genre dérive du mot latin : *arena* qui signifie sable. Les plantes de ce genre poussent dans le sable et ont des fleurs présentant 3 styles (très rarement 2,4 ou 5) et des fruits s'ouvrant par 3 à 6 valves (ou par 3 plus ou moins profondément divisées en 2 chacune au sommet, très rarement 4). Il y a 5 pétales et 5 sépales (parfois 4). Le fruit renferme de nombreuses graines. ce sont des plantes à feuilles sans stipules, entières (Bonnier, 1990).

1.2.2.1 L'espèce *Arenaria montana*

Arenaria montana, communément appelée Sabline des montagnes est une plante vivace, brièvement pubescente, d'un vert grisâtre, non glanduleuse, à souche stolonifère produisant de longs rejets stériles ; tiges de 10-30 cm., diffuses couchées, redressées au sommet ; feuilles pubérulentes, lancéolées, acuminées, à 1 nervure ; fleurs grandes, en cymes très appauvries ; pédicelles 1-3 fois plus longs que le calice, à la fin réfléchis ; sépales herbacées, ovales-lancéolés, à 1 nervure ; pétales larges, obovales, 2 fois plus longs que les sépales ; capsule ovoïde-subglobuleuse, égalant le calice, à 3 valves bidentées ; graines tuberculeuses.

Habitat : Landes et bois de l'Ouest et du Centre, des Basses-Pyrénées au Finistère, à la Sarthe et au Cher ; Pyrénées ; Cévennes granitiques. Espagne et Portugal. (Bock, 2005).



1.3 Ordre des Fabales

Les *Fabales* constituent un ordre de plantes Dicotylédones. Le monophylétisme de cet ordre est attesté par les séquences *rbcL* (Chase et al., 1993). Les synapomorphies morphologiques peuvent comprendre les ponctuations ornées, les éléments de vaisseaux à ponctuations simples, et un embryon chlorophyllien volumineux. En classification classique de Cronquist (Cronquist, 1981), les *Fabales* renferment les familles suivantes : *Caesalpiniciacées*, *Mimosacées* et *Fabacées* ou *Papilionacées* (famille du haricot). Dans la classification phylogénétique APG II (2003) (APGII, 2003) et classification phylogénétique APG III (2009) (APGIII, 2009), cet ordre a été modifié depuis et quatre familles lui sont maintenant rattachées : Les familles des *Fabaceae*, *Polygalaceae*, *Quillajaceae* et *Surianaceae*.

N.B. Ici les *Fabaceae* (= *Leguminosae*) incluent les plantes précédemment comprises dans les familles *Caesalpiniciaceae*, *Mimosaceae* et *Fabaceae* (ou *Papilionaceae*).

1.3.1 La famille des Polygalaceae

Plantes herbacées à arbres, ou lianes ; produisant souvent des saponines triterpéniques et du salicylate de méthyle. Poils simples. Feuilles généralement alternes, simple, entières, à nervation pennée ; stipules absentes, mais présence d'une paire de glandes ou d'épines. Inflorescences indéterminées, en racème ou en panicule, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou

auxiliaires. Fleurs hermaphrodites, \pm zygomorphes. Sépales généralement 5, libres ou diversement soudés, souvent les deux inférieurs soudés et les deux latéraux pétaloïdes et plus grands que les autres. Pétales (5-)3, les deux supérieurs et l'inférieur libres, mais tous adnés au tube staminal, le pétale inférieur souvent en carène et parfois appendiculé, imbriqués. Étamines (4-)8 (-10) ; à filets libres ou soudés, adnés à la corolle ; les anthères s'ouvrant par 1-2 pores apicaux, ou par des fentes longitudinales ; grains de pollen polycolporés. Carpelles 2 ou 3(-8), soudés, ovaire supère, à placentation axile, mais parfois pseudomonomère ; style souvent à une branche stigmatique, l'autre stérile et se terminant en une touffe de poils ; stigmate capité. Ovule 1 par loge. Disque nectarifère parfois présent. Fruit une capsule loculicide, une samare, une drupe, une baie ou nue noix ; graines souvent couvertes de poils raides, parfois arillées ; albumen présent ou absent figure 1.6(Judd et al., 2002).

1.3.1.1 Distribution géographique

Répandues, des régions tropicales aux régions tempérées (Judd et al., 2002).

1.3.1.2 Intérêt économique

Quelques espèces de *Polygala* et de *Securidaca* sont ornementales (Judd et al., 2002).

1.3.1.3 Le genre *Securidaca* (synonyme : *Bonaveria*, *Securigera*)

le terme de securigera dérive du latin *securis* qui signifie hache et *gerere* qui signifie porter ; la plante porte des fruits \pm en forme de hache. Ce genre est surtout caractérisé par des fruits divisés transversalement en articles qui ne sont ni creusés, ni échancrés, ni séparés les uns des autres par des parties plus resserrées, mais au contraire sont en continuité les uns avec les autres. le style persistant forme au sommet du fruit, un long bec courbé. Les fleurs ont une carène aiguë au sommet. Neuf étamines sont réunies entre elles par leurs filets, la deuxième étamine est libre. Ce sont des plantes annuelles, dont les feuilles ont 9 à 15 folioles comprenant une foliole terminale, à fleurs jaunes groupées en des sortes d'ombrelles simples (Bonnier, 1990).

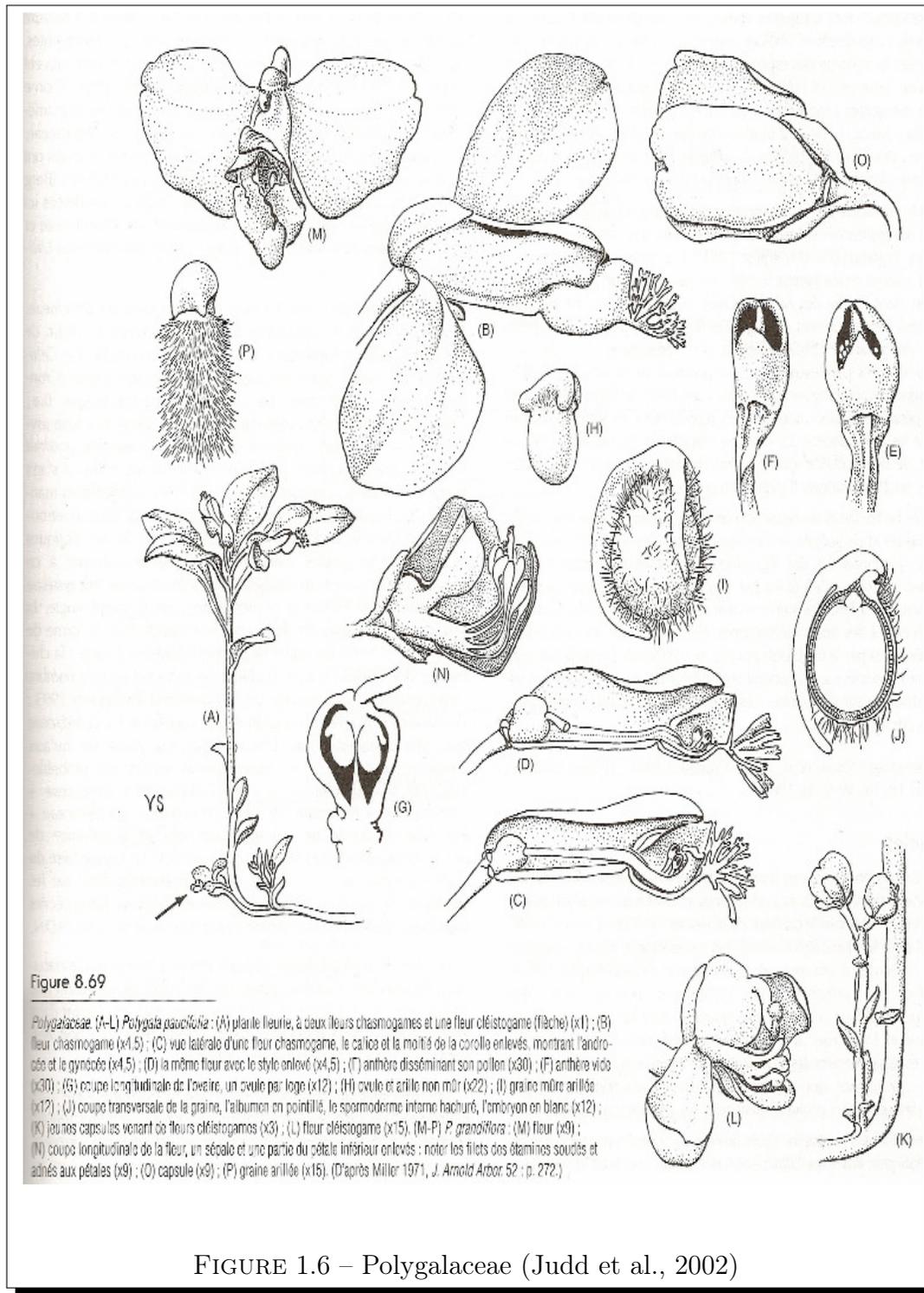
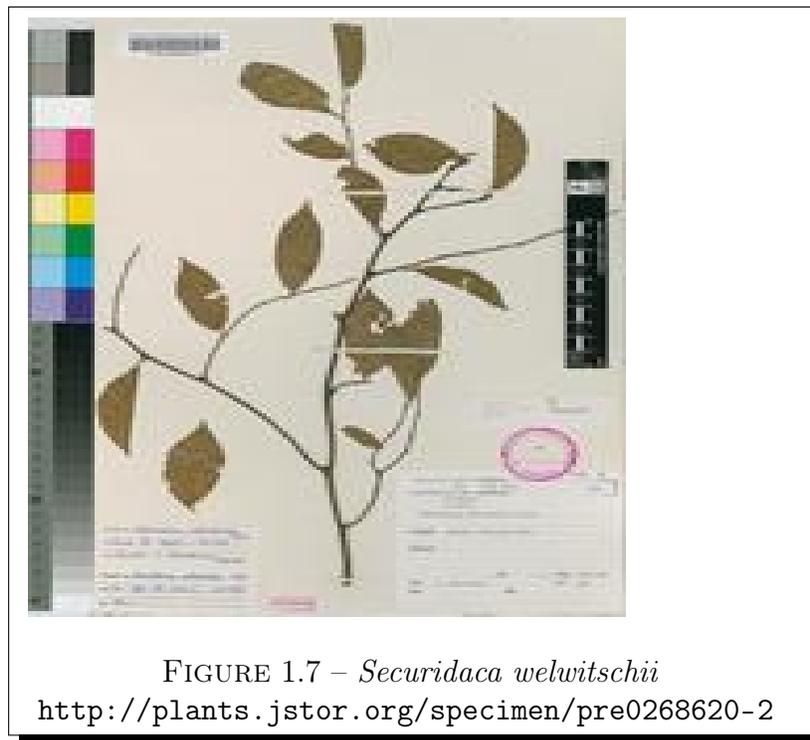


FIGURE 1.6 – Polygalaceae (Judd et al., 2002)

1.3.1.4 L'espèce *Securidaca welwitschii* Oliv.

Le *Securidaca welwitschii* est décrit au volume 7 de la Flore du Congo et du Ruanda-Urundi. C'est une liane qui peut atteindre 25 m et dont l'aire de dispersion est étendue, on la rencontre en Guinée, au Cameroun, au Congo, en Angola et en Ouganda. L'emploi de l'espèce en médecine

traditionnelle est rare. Seul, Irvine mentionne son utilisation pour traiter des affections oculaires (Davreux and Delaude, 1971)



1.4 Ordre des Asparagales

Le monophylétisme des *Asparagales* est étayé par des analyses cladistiques basées sur la morphologie et sur des séquences *rbcL* et *atpB*. Les caractères favorables sont surtout constitués par les graines caractéristiques, avec un spermoderme externe indistinct (chez la plupart des espèces à fruit charnu) ou présent, mais alors incrusté d'une couche de phytomélanine (noir charbon) chez de nombreuses espèces à fruit sec, et à partie interne de l'enveloppe de la graine habituellement complètement avortée. Au contraire, les graines des *Liliales* ont un spermoderme externe bien développé et dépourvu de phytomélanine; elles gardent une structure cellulaire dans la partie interne de l'enveloppe de la graine. On peut également distinguer les *Asparagales* des *Liliales* par leur tépales habituellement non maculés, leur nectaires situés sur les cloisons de l'ovaire (au lieu d'être à la base des tépales et des étamines), et parfois par un accroissement secondaire particulier (contre l'absence d'accroissement secondaire) (Judd et al., 2002).

Les *Asparagales* sont un ordre de plantes monocotylédones introduit par la classification phylogénétique des angiospermes. Il regroupe des familles dont beaucoup faisaient partie de

l'ordre des *Liliales* ou résultent de l'éclatement de la famille des *Liliaceae*. En classification phylogénétique APG III (2009), l'ordre des *Asparagales* comprend 14 familles principales dont celle des *Amaryllidaceae* qui inclue celle des *Agapanthaceae* et *Alliaceae* (APGIII, 2009).

1.4.1 La famille des *Alliaceae*

Ce sont des plantes herbacées à bulbes et à racines contractiles (ou à rhizomes chez *Tulbaghia*); tiges réduites; éléments de vaisseau à ponctuations simples; laticifères présents (latex \pm clair); saponines stéroïdiques; composés sulfurés à odeur d'oignon ou d'ail, comme des sulfures d'allyle, du propionaldéhyde, du propionthiol, et du sulfure de vinyle. Poils simples. Feuilles alternes, \pm basilaires, simples, cylindriques, angulaires, ou aplaties, entières, à nervation parallèle, en gaine à la base; stipules absentes. Inflorescences déterminées, composées d'une ou de plusieurs cymes hélicoïdales, paraissant en ombelle, sous-tendues par quelques bractées membraneuses spathiformes, terminales à l'extrémité d'un long scape. Fleurs hermaphrodites, actinomorphes ou zygomorphes, souvent grandes; fleurs individuelles non accompagnées de bractées. Tépales 6, libres ou soudés, et dans ce cas périanthe campanulé à tubulé, imbriqués, pétaloïdes, non maculés : parfois présence d'une couronne (appendice du périanthe).Étamines 6 (3); à filets libres ou soudés parfois adnés aux tépales, parfois appendiculés; grains de pollen monosulqués. Carpelles 3, soudés; ovaire supère, à placentation axile; stigmate 1, capité à trilobé. Ovules 2 à nombreux dans chaque loge, anatropes à campylotropes. Nectaires sur les cloisons de l'ovaire. Fruit une capsule loculicide; graines globuleuses à angulaires, spermodermes à phytomélanine, les assises internes de la paroi comprimées ou avortées; embryon \pm courbé (Judd et al., 2002).

1.4.1.1 Distribution géographique et écologie

Largement distribuées dans les régions tempérées à tropicales; communes dans les habitats semi-arides (Judd et al., 2002).

1.4.1.2 Intérêt économique

Plusieurs espèces du genre *Allium* sont largement utilisées comme légumes ou comme assaisonnement (l'ail, l'oignon, l'échalote, la ciboulette, le poireau, la ciboule). La sève est légèrement antiseptique et plusieurs espèces sont utilisées en médecine. Quelques genres, comme *Allium*, *Gillesia*, *Ipheion* et *Tulbaghia* sont cultivés pour l'ornement (Judd et al., 2002).

1.4.2 Le genre *Allium*

Le genre *Allium* est le plus grand et le plus important représentant de la famille des *Alliaceae*. Les espèces du genre *Allium* sont largement répandues dans les régions qui ont une saison sèche, notamment en Asie centrale, Asie orientale, Asie du Sud-Ouest, l'Amérique du Nord, l'Europe de l'Est et l'Afrique du Nord. le genre comporte environ 750 espèces (Hirschegger et al., 2010). Outre l'ail et l'oignon qui sont les espèces les mieux connues, plusieurs autres espèces sont largement cultivées pour usage culinaire, comme le poireau (*Allium porrum* L.), la ciboule (*Allium fistulosum* L.), l'échalote (*Allium ascalonicum* Hort.), l'ail des ours (*Allium ursinum* L.), l'ail éléphant (*Allium ampeloprasum* L. var. *ampeloprasum*), la ciboulette (*Allium schoenoprasum*) et la ciboulette chinoise (*Allium tuberosum* L.) (Lanzotti, 2006).

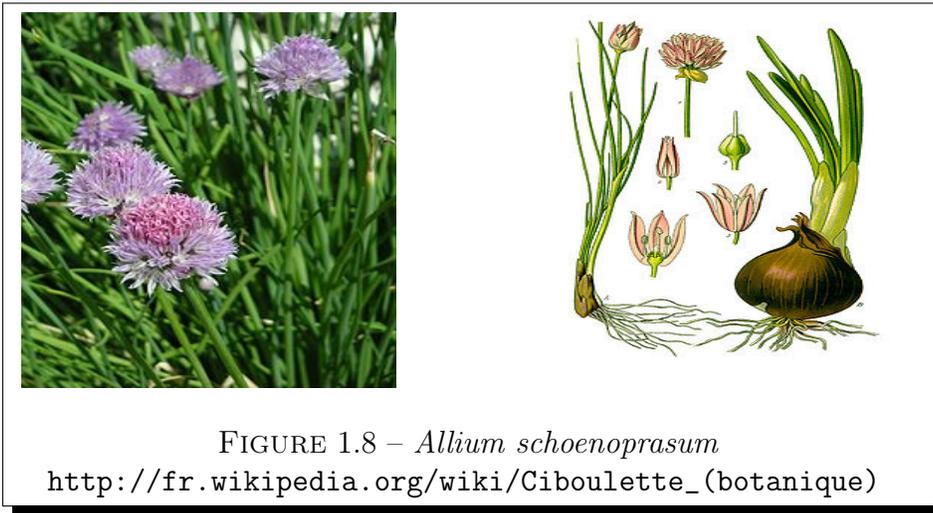
Il s'agit de plantes herbacées, vivaces, bulbeuses (les espèces cultivées le sont surtout pour leur bulbe), à feuilles simples radicales. Les fleurs forment en général une ombelle à l'extrémité d'une hampe nue. Avant l'éclosion, l'ombelle est entièrement recouverte d'une bractée membraneuse appelée spathe. Chaque fleur est constituée de six tépales (trois pétales et trois sépales pétaloïdes identiques). Elle comporte six étamines qui entourent un style émergeant de trois carpelles soudés. Ovaire supère à trois loges avec deux ovules par loge. Le fruit est une capsule. Beaucoup d'espèces ont une odeur d'ail (ou d'oignon) parfois très forte, mais certaines sont totalement inodores.

Auparavant, le genre *Allium* faisait partie de la famille des *Liliaceae* et plusieurs botanistes le rangent encore dans cette famille, mais d'après l'APG III (2009) de nombreux botanistes rangent ce genre dans la famille des *Alliaceae* (Judd et al., 2002).

1.4.2.1 L'espèce *Allium schoenoprasum* L.

Plante herbacée vivace de 15 à 30 cm de hauteur, formant de petites touffes grâce à la ramification de son pseudo-rhizome, d'où se développent des racines adventives souterraines. Les feuilles sont disposées en spirale, dressées (un peu comme des tuyaux), fines, creuses et charnues, tubuleuses et cylindriques (figure 1.8) ; chez *A. schoenoprasum* var. *sibiricum*, elles ne sont qu'à moitié cylindrique. Ces feuilles se terminent en gaine épaissie pour former dans leur partie inférieure des bulbes allongés et irréguliers. La hampe florale, fistuleuse, est aussi longue que la qui est feuillée uniquement au niveau du sol ou dans son tiers inférieur chez *A. schoenoprasum* var. *schoenoprasum*, voire plus en hauteur chez *A. schoenoprasum* var. *sibiricum*. L'inflorescence (figure 1.8) est une ombelle multiflore, globuleuse, entourée d'une spathe colorée à 2 ou

3 valves courtes. À ce stade, les bulbilles ne sont pas encore formées, contrairement à certains *Allium*. Les fleurs sont au nombre de 6 (périclype à 3 sépales + 3 pétales), de couleur bleutée à rose-rouge, parfois rouge pourpre ou blanche jaunâtre, et pourvues d'une ligne médiane plus foncée; les 6 étamines sont plus courtes que l'inflorescence; l'ovaire est tricarpellaire. Le fruit est une petite capsule sphérique, disposée autour du périclype à la manière d'un ballon. Les graines sont noires et triangulaires (Teuscher et al., 2005).



TRAVAUX ANTÉRIEURS

2.1 TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES ANTÉRIEURS

2.1.1 Généralités sur les saponines

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui en renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) qui tire son nom du latin *sapo*, *saponis* (le savon) a, pendant longtemps, constitué dans nos régions un détergent ménager d'usage courant tout comme l'on été, sous les tropiques, les fruits de divers « savon indien » (*sapo* + *India* →) : *S. saponaria* L., *S. marginatus* Wild. La plupart des saponines possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, principalement les poissons. Ces propriétés n'étant pas communes à toutes les saponines, elles ne peuvent pas être prises en compte dans une définition de ces composés : il est préférable d'en donner une description structurale, à défaut d'une définition chimique simple et non ambiguë.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle - certains sont des matières premières destinées à l'hémisynthèse de molécules médicamenteuses stéroïdiques - que pour leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie. L'industrie des cosmétiques exploite notamment leurs propriétés détergentes.

2.1.2 Structure des saponines

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine :

- Saponines à génine stéroïdique, presque exclusivement présentes chez les Angiospermae Monocotyledonae (Liliopsida) : Alliaceae (*Allium*), Agavaceae (*Agave*, *Yucca*), Asparagaceae, Dioscoreaceae (*Dioscorea*). On en connaît toutefois chez les Fabaceae (fenugrec), les Solanaceae (tabac) ou chez des Plantaginaceae (digitales) ;
- Saponines à génine triterpénique. De loin les plus nombreuses, elles existent chez quelques animaux marins et quelques Pteridophyta. Pratiquement inexistantes chez les Gymnospermae, on les rencontre, pour l'essentiel, chez les Angiospermae Dicotyledonae (Magnoliopsida) : Araliaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Fabales, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Sapindaceae, etc. On en connaît chez quelques Poaceae : avénacines des racines des *Avena*, dont les feuilles élaborent des saponines à génines stéroïdiques telles que les avénacosides.

Hostettmann et Marston 1995, distinguent une troisième catégorie de saponines, celle des hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) qui, pour d'autres auteurs, sont des alcaloïdes. Certes, ce ne sont biogénétiquement que des pseudo-alcaloïdes et, en matière de propriétés, leur comportement n'est pas sans rappeler celui des saponines. Il n'en demeure pas moins que l'origine de leur atome d'azote les rapproche d'autres dérivés azotés du métabolisme terpénique que l'on s'accorde à considérer comme des alcaloïdes (ex. : aconitine).

2.1.2.1 Structure des génines

2.1.2.1.1 Génines triterpéniques (figure 2.1)

Les sapogénines triterpéniques, comme la majorité des triterpénoïdes, sont issues de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène. Cette cyclisation conduit en premier lieu aux dammaranes, molécules tétracycliques qui existent à l'état d'hétérosides dans des plantes comme le ginseng, ou, lorsqu'elle implique une conformation différente du précurseur, aux cucurbitanes. Ceux-ci, également tétracycliques, ont une distribution restreinte (Cucurbitaceae principalement). Beaucoup plus fréquemment, le composé tétracyclique de type dammarane n'est qu'un intermédiaire qui évolue vers des squelettes pentacycliques : oléananes, ursanes et lupanes qui peuvent eux-mêmes subir quelques réarrangements. De fait, les sapogénines triterpéniques de loin les plus nombreuses sont des molécules pentacycliques : oléanane (on dit aussi dérivés de la β -amyrine), ursane (on dit aussi dérivés de la α -amyrine) et lupane sont les trois

squelettes les plus communs. Plus de 50% des saponines connues se rattachent à l'oléane, en particulier à l'acide oléanolique et à l'hédéragénine. Les éléments structuraux qui caractérisent ces séries sont :

- l'existence habituelle d'une insaturation en C-12(13) ;
- l'oxydation fréquente des carbones des méthyles en C-23 et C-28, mais aussi en C-30 (hydroxyméthyle, aldéhyde ou carboxyle) ;
- l'oxydation d'un plus ou moins grand nombre de carbones cycliques : C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21, C-22. L'oxydation de l'un de ces hydroxyles en cétone n'est pas rare (surtout au niveau de C-11) et la polyfonctionnalisation peut entraîner, par estérification interne ou lactonisation, la formation de cycles supplémentaires. C'est le cas des 13 β ,28-oxydes, souvent isolés sous la forme artéfactuelle d'un 12-én-28-ol ;
- il peut arriver que la génine soit partiellement estérifiée, généralement par des acides aliphatiques de faibles masses moléculaires (aescine de la graine du marronnier d'Inde, théasaponine, acide gymnémique). Parfois, la génine dérive du lanostane, du cycloartane (*Passiflora*, *Abrus*) ou d'un nortriterpène.

2.1.2.1.2 Génines stéroïdiques (figure 2.2)

Les génines stéroïdiques (c'est-à-dire les sapogénines) possèdent toutes un squelette à 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles : les deux cycles E (furanique) et F (pyranique) sont, la conséquence d'une cétylation intramoléculaire qui intervient après l'oxydation en C-16, C-22 et C-26 d'un précurseur cholestanique. Compte tenu de la nature spiro du carbone C-22, on désigne couramment ce squelette hexacyclique par le terme de *spirostane*. Dans les plantes fraîches, il n'est pas rare que l'hydroxyle en C-26 soit engagé dans une liaison avec un ose, la structure restant alors pentacyclique : on parle dans ce cas de *furostane*. Ce type de structure ne peut exister qu'à l'état hétérosidique : son hydrolyse conduit spontanément à un dérivé spirostanique. Les hétérosides spirostaniques sont principalement distribués dans les bulbes, racines et graines.

Les variations structurales sont limitées :

- si le squelette hexacyclique comporte de nombreux carbones asymétriques, seule la configuration du carbone C-25 peut varier, ce qui détermine l'existence de deux séries : néosapogénines (25-*S*, le méthyle est axial) ou isosapogénines (25-*R*, le méthyle est équatorial). La fusion des cycles B/C et C/D est toujours *trans*, celle des cycles D et E est toujours *cis* et la configuration

des carbones C-20 et C-22, respectivement *S* et *R*, est également constante chez les sapogénines naturelles ;

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

- l'hydroxyle porté par le C-3 est constant, mais l'oxydation peut aussi conserver d'autres carbones : possibilité d'hydroxylation en C-1, C-2, C-5, C-6 et, plus rarement en C-17 ou en C-24 chez les Asparagales (agigénines, convallagénine, chlorogénine, cépagénine), en C-2 et/ou en C-15 chez les Plantaginaceae (ou Scrophulariaceae : gitogénine, digitogénine), ou en C-12 dans le cas des Agavaceae chez lesquelles cette oxydation se traduit le plus souvent par l'existence d'un carbonyle (ex. : hécogénine, manogénine) ;

- très exceptionnellement, on peut avoir une lactone (spirostan-26-ones, *Solanum*), une déméthylation (18-*nor*pirostanols, *Trillium*) ou encore la sulfatation d'un hydroxyle de la génine.

2.1.2.2 Les sucres

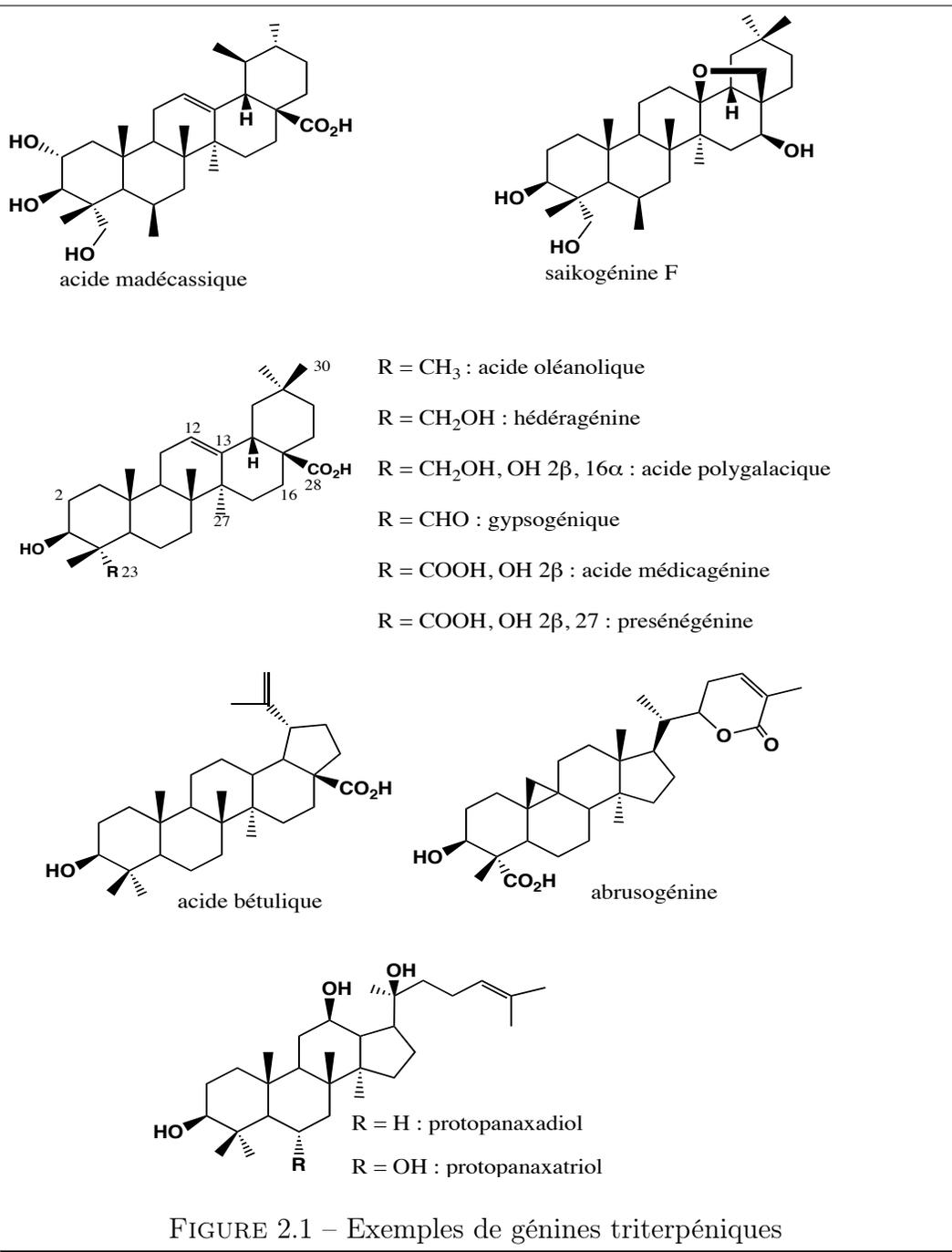
Une ou plusieurs chaînes osidiques peuvent substituer les génines triterpéniques ou stéroïdiques pour former les saponines. Celles-ci peuvent être constituées d'une à douze unités osidiques en chaîne linéaire ou ramifiée.

Les sucres les plus courants au niveau des saponines sont (figure 2.3) :

- des hexoses (D-glucofuranose, D-galactofuranose)
- des 6-désoxy-hexoses (L-rhamnopyranose, D-fucofuranose, D-quinovopyranose)
- des acides uroniques (acide D-glucuronique)
- des pentoses (L-arabinopyranose, D-xylofuranose, D-apiofuranose)

2.1.2.3 Les acides organiques

Divers acides peuvent estérifier les saponines au niveau de l'aglycone ou au niveau des sucres (Hostettmann and Marston, 1995). La figure 2.4 résume ceux qui sont les plus fréquemment rencontrés.



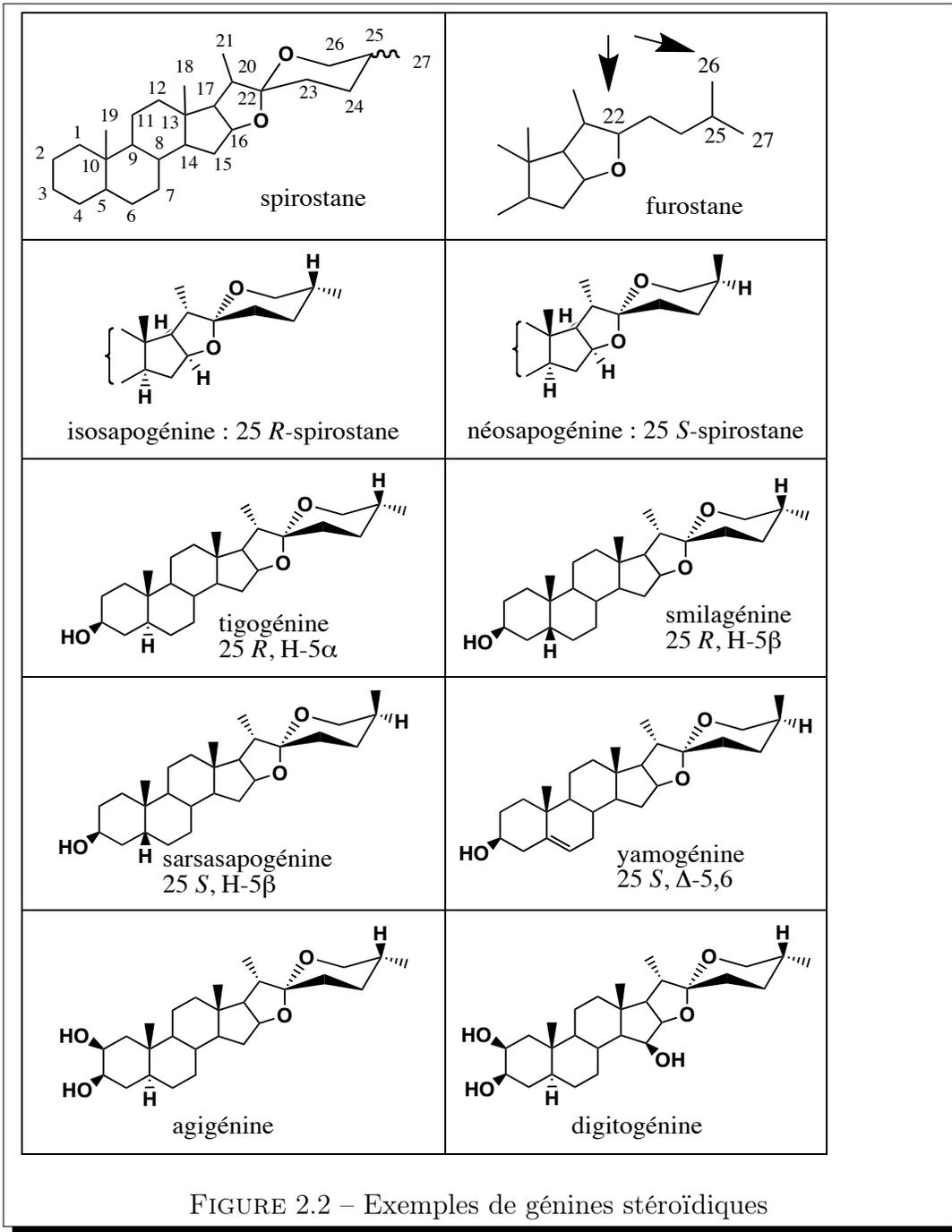


FIGURE 2.2 – Exemples de génines stéroïdiques

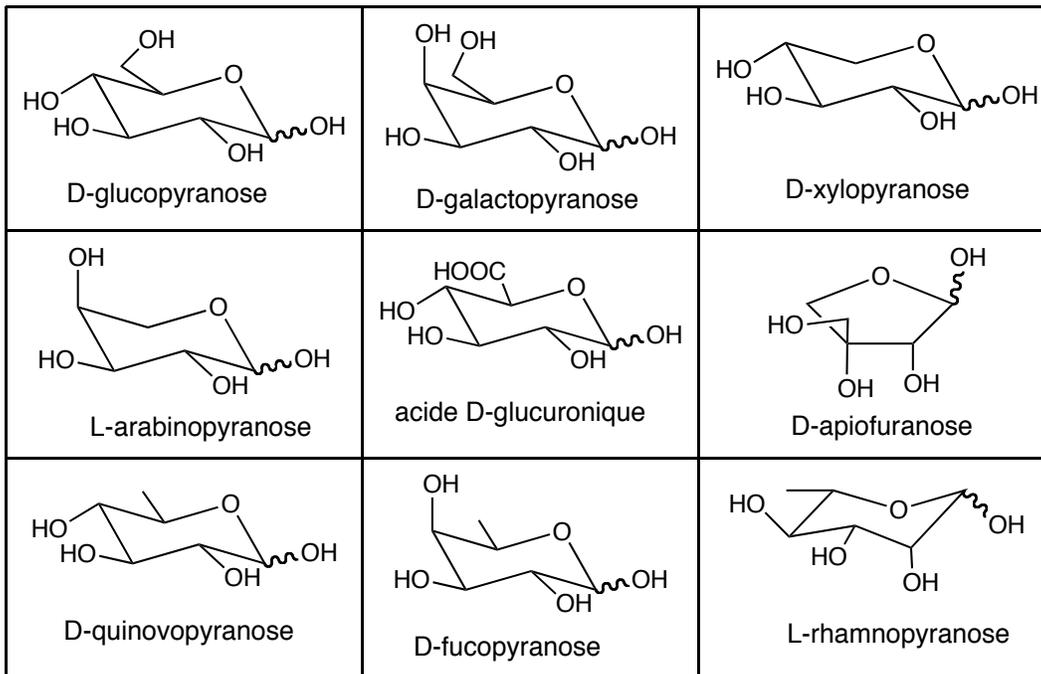


FIGURE 2.3 – Les différents sucres constitutifs des saponines

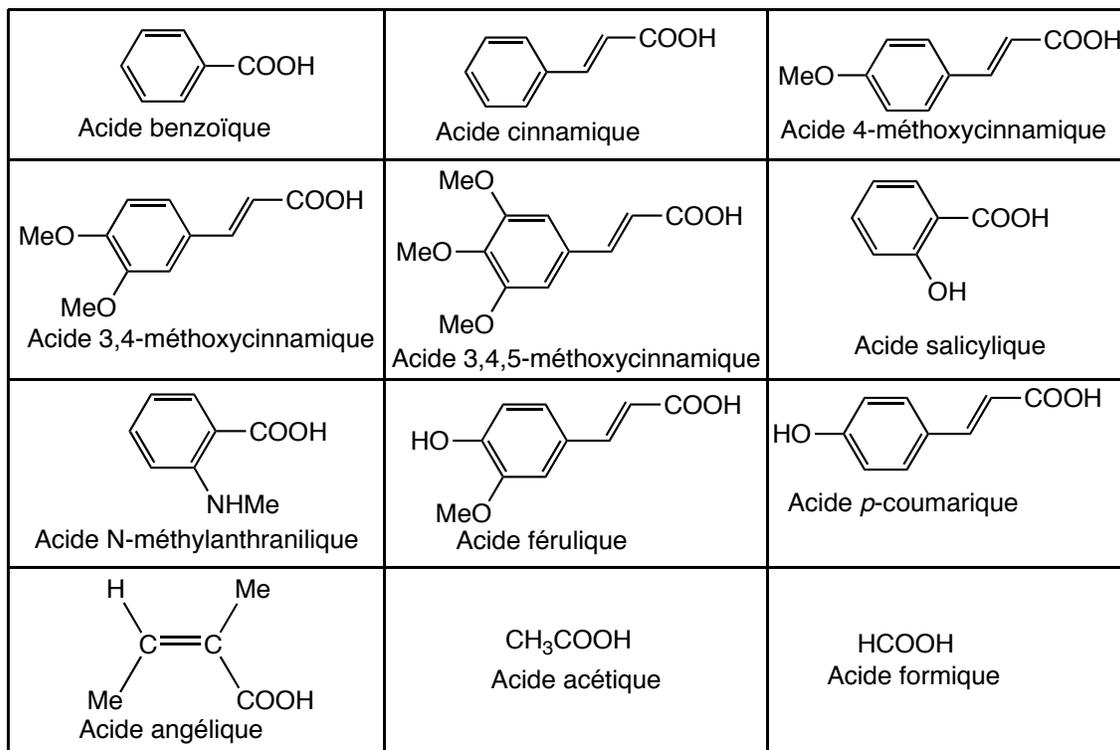


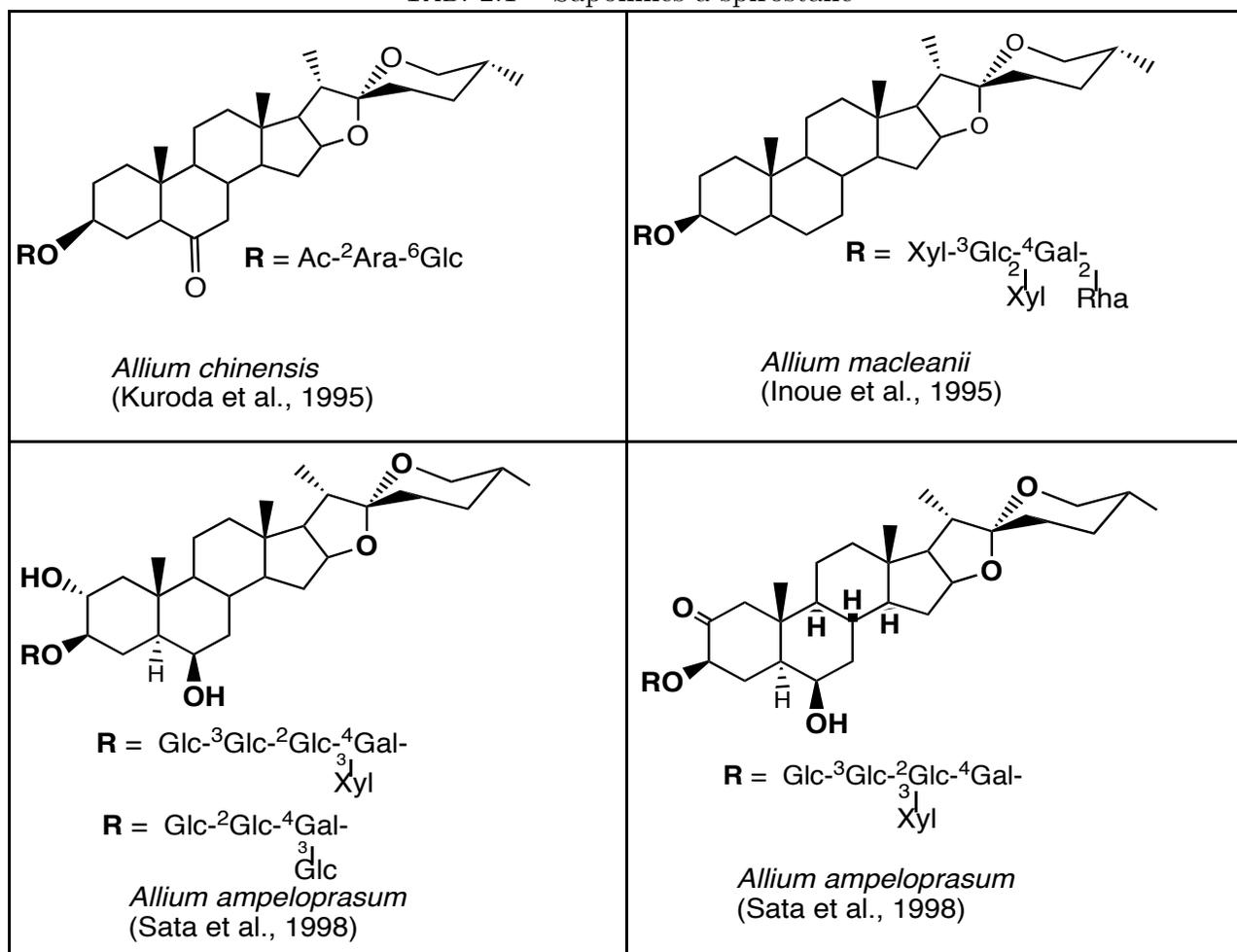
FIGURE 2.4 – Les différents acides organiques rencontrés dans les saponines

2.1.3 Travaux phytochimiques antérieurs sur les familles étudiées

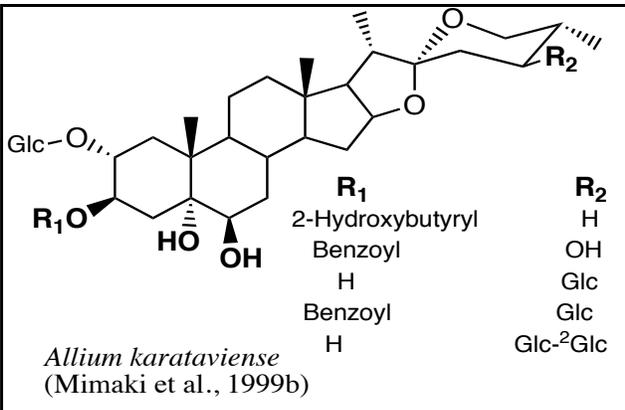
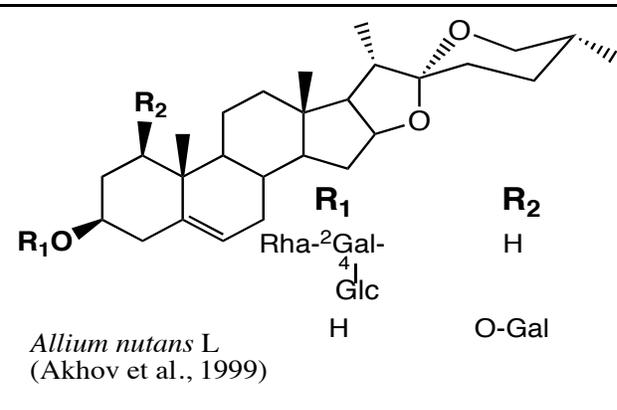
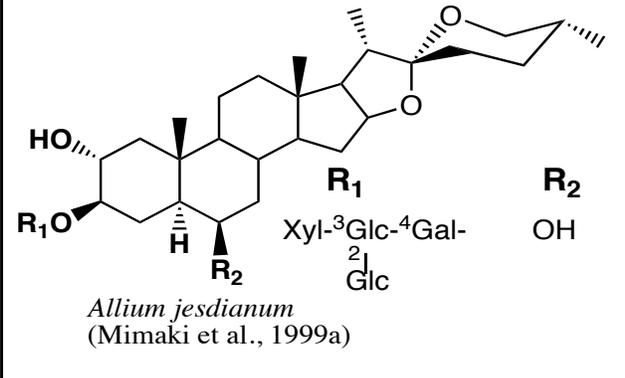
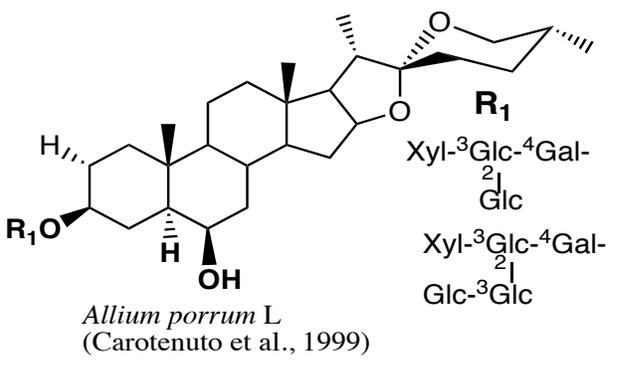
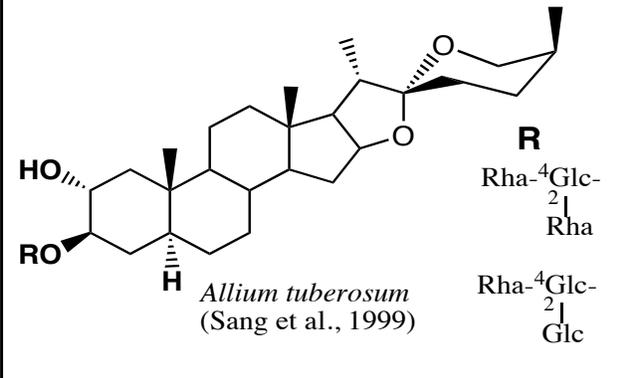
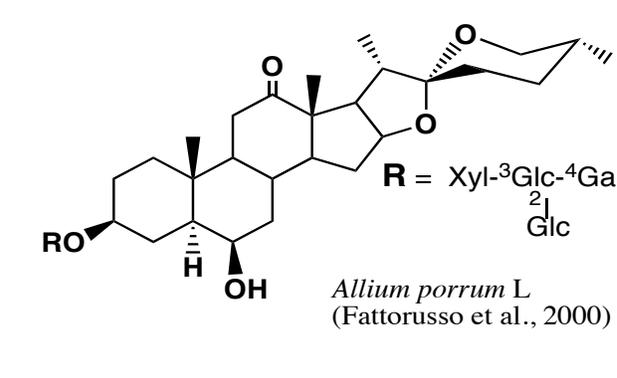
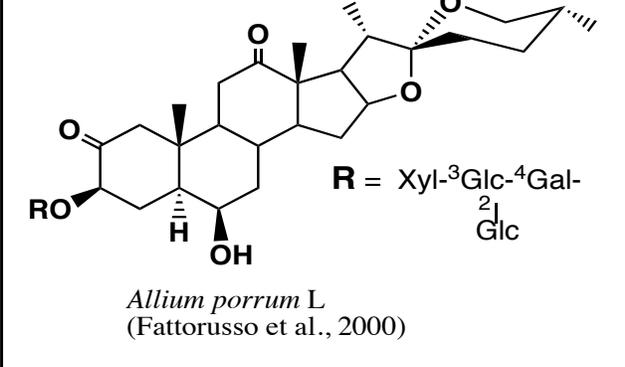
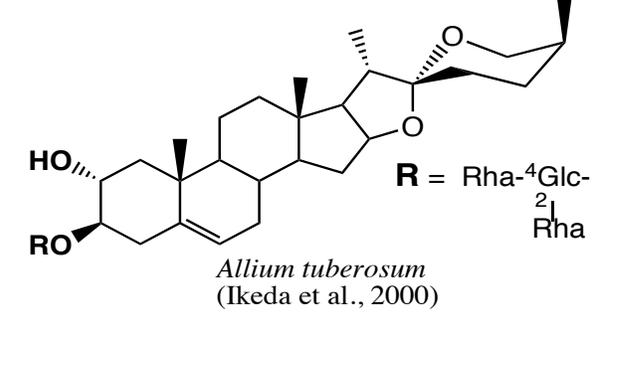
2.1.3.1 Les saponines isolées de la famille des Alliaceae

La chimie moderne des *Allium* a débuté en 1947 avec le chimiste Chester J. Cavallito, grâce à la découverte d'une substance antibactérienne (comparable dans certains cas à la pénicilline) appelée l'alicine. Ces plantes sont connues pour leur production de composés soufrés, cependant les investigations phytochimiques des *Allium* pour leur contenu en saponines abondent dans la littérature. Les tableaux suivants présentent quelques exemples de saponines isolées depuis quelques années dans diverses espèces d'*Allium*, utilisées dans l'alimentation et la médecine traditionnelle comme par exemple, *Allium porrum*, *A. triquetrum*, *A. chinensis*, *A. tuberosum*, *A. ascalonicum*, *A. nutan* etc. Les saponines isolées de cette famille de plantes sont presque entièrement à génines stéroïdiques notamment de type spirostane, furostane et cholestane.

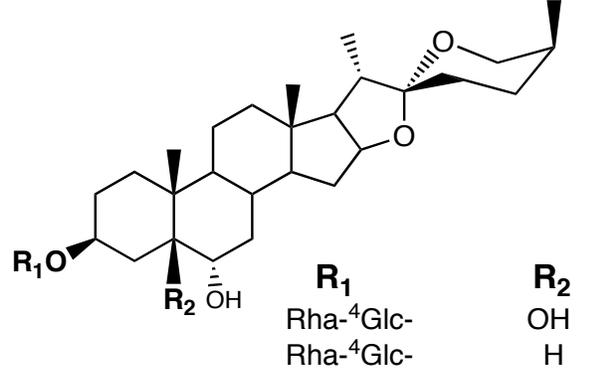
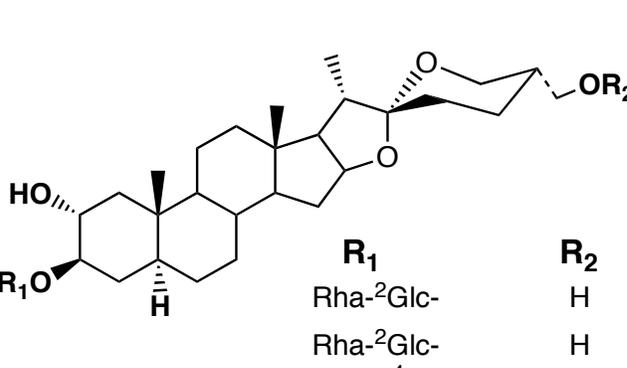
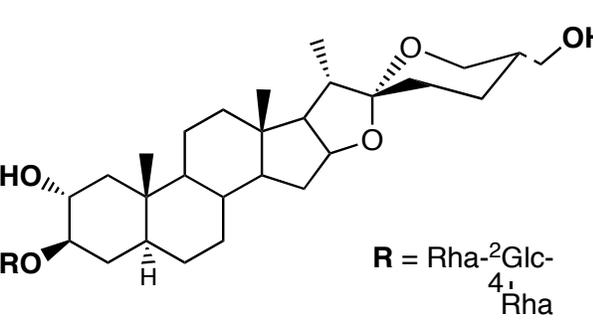
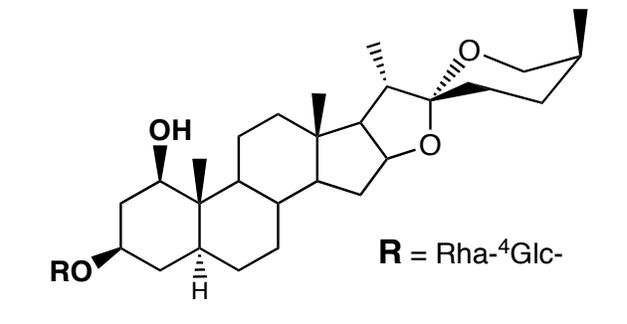
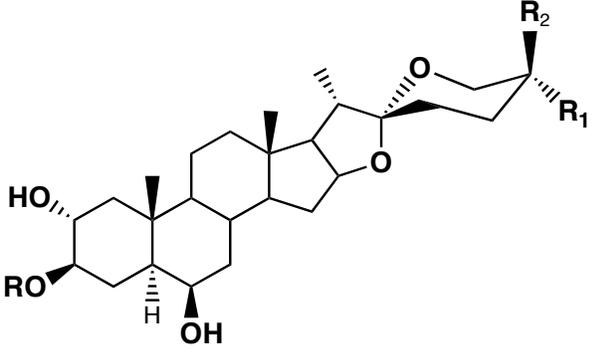
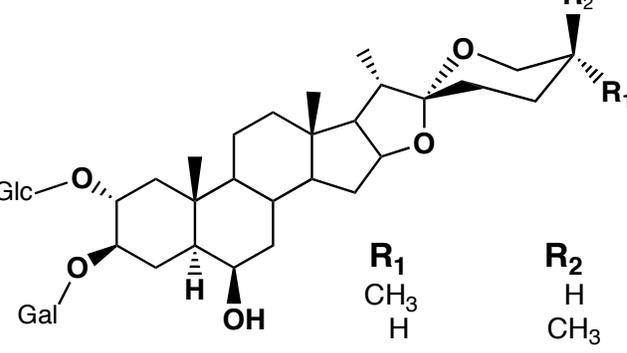
TAB. 2.1 – Saponines à spirostane



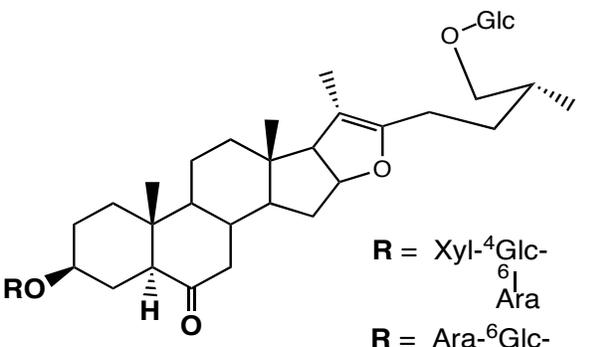
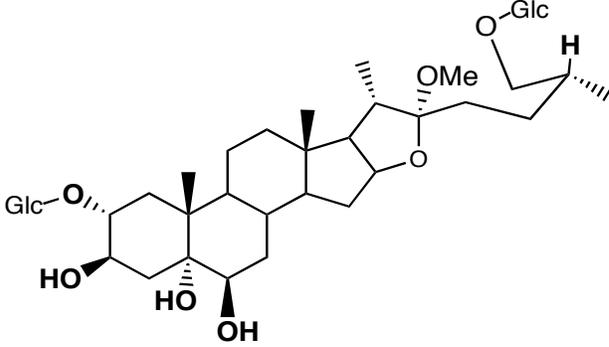
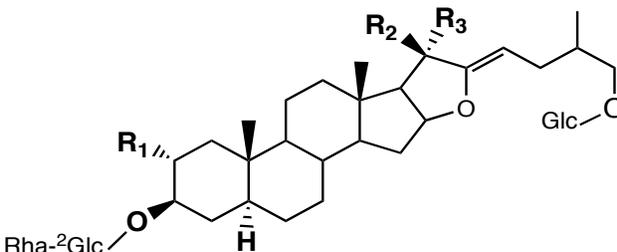
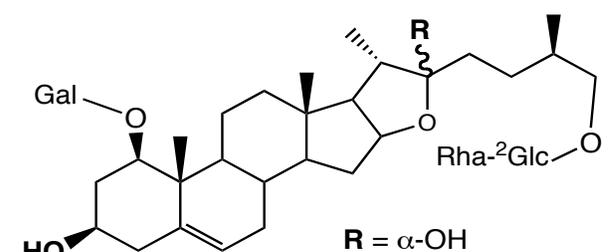
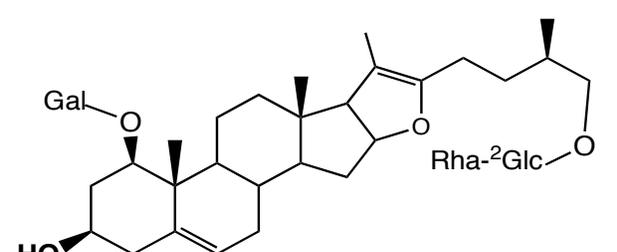
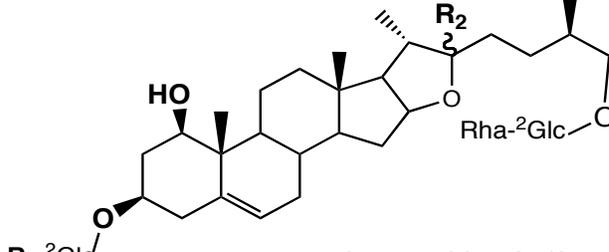
TAB. 2.2 – Saponines à spirostane (2)

 <p> R_1 2-Hydroxybutyryl Benzoyl H Benzoyl H </p> <p> R_2 H OH Glc Glc Glc-²Glc </p> <p><i>Allium karataviense</i> (Mimaki et al., 1999b)</p>	 <p> R_1 Rha-²Gal- 4 Glc </p> <p> R_2 H O-Gal </p> <p><i>Allium nutans</i> L (Akhov et al., 1999)</p>
 <p> R_1 Xyl-³Glc-⁴Gal- 2 Glc </p> <p> R_2 OH </p> <p><i>Allium jesdianum</i> (Mimaki et al., 1999a)</p>	 <p> R_1 Xyl-³Glc-⁴Gal- 2 Glc </p> <p> Xyl-³Glc-⁴Gal- 2 Glc-³Glc </p> <p><i>Allium porrum</i> L (Carotenuto et al., 1999)</p>
 <p> R Rha-⁴Glc- 2 Rha </p> <p> Rha-⁴Glc- 2 Glc </p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Sang et al., 1999)</p>	 <p> $R =$ Xyl-³Glc-⁴Gal- 2 Glc </p> <p><i>Allium porrum</i> L (Fattorusso et al., 2000)</p>
 <p> $R =$ Xyl-³Glc-⁴Gal- 2 Glc </p> <p><i>Allium porrum</i> L (Fattorusso et al., 2000)</p>	 <p> $R =$ Rha-⁴Glc- 2 Rha </p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Ikeda et al., 2000)</p>

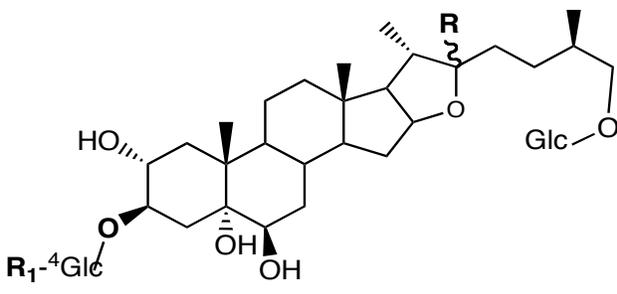
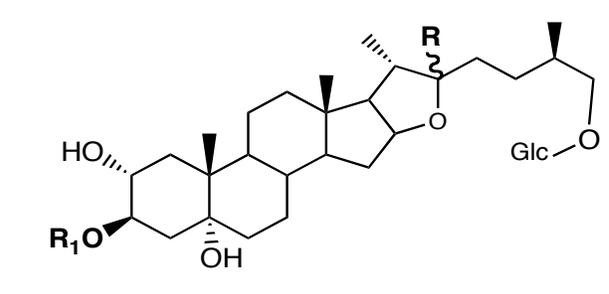
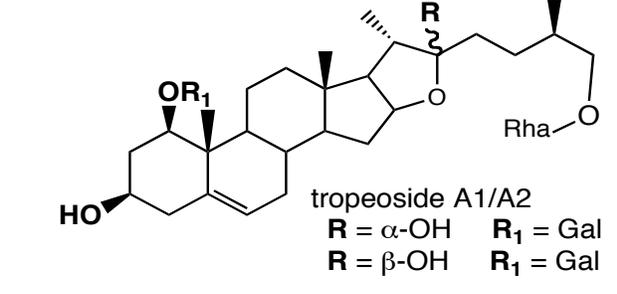
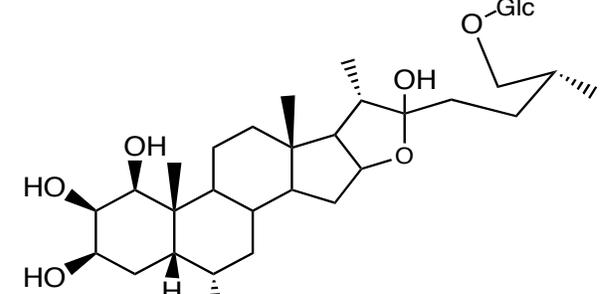
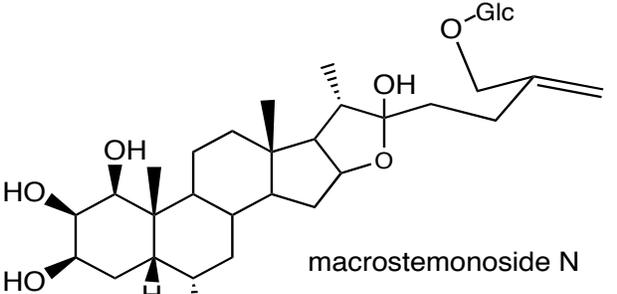
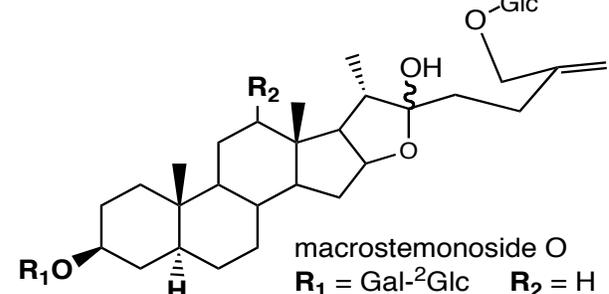
TAB. 2.3 – Saponines à spirostane (3)

 <p>R₁ Rha-⁴Glc- Rha-⁴Glc-</p> <p>R₂ OH H</p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Ikedia et al., 2000)</p>	 <p>R₁ Rha-²Glc- Rha-²Glc- 4 Rha Rha-²Glc- 4 Rha</p> <p>R₂ H H Glc</p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Sang et al., 2001)</p>
 <p>R = Rha-²Glc- 4 Rha</p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Zou et al., 2001)</p>	 <p>R = Rha-⁴Glc-</p> <p><i>Allium tuberosum</i> (Sang et al., 2002)</p>
 <p>R Rha-²Glc Rha-²Glc</p> <p>R₁ CH₃ H</p> <p>R₂ H CH₃</p> <p><i>Allium nigrum</i> L (Jabrane et al., 2011)</p>	 <p>R₁ CH₃ H</p> <p>R₂ H CH₃</p> <p><i>Allium nigrum</i> L (Jabrane et al., 2011)</p>

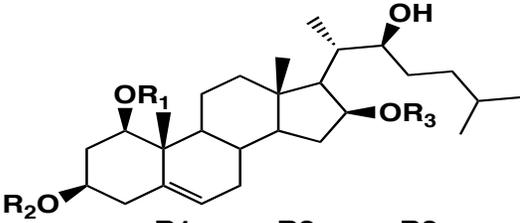
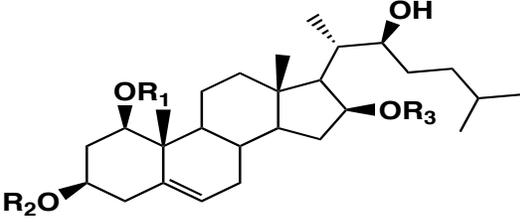
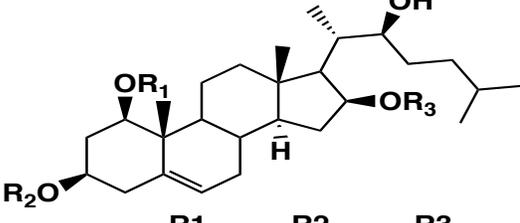
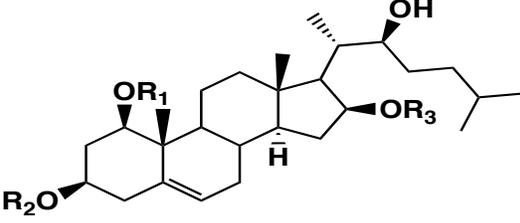
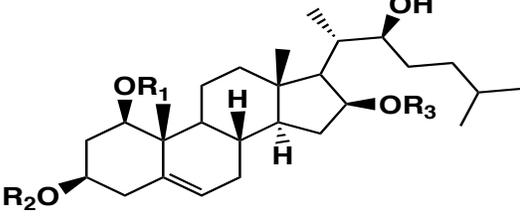
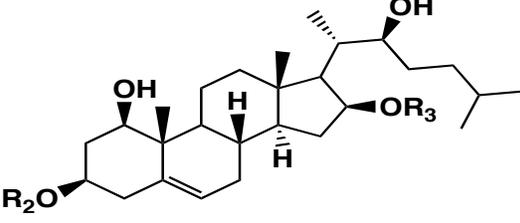
TAB. 2.4 – Saponines à Furostane (1)

 <p>R = Xyl-⁴Glc-⁶Ara R = Ara-⁶Glc-</p> <p><i>Allium chinensis</i> (Peng et al., 1996)</p>	 <p><i>Allium chinensis</i> (Peng et al., 1996)</p>															
 <table border="0"> <thead> <tr> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>OH</td> <td>Me</td> <td>OMe</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>Me</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>OH</td> <td>Me</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Allium tuberosum</i> (Sang et al., 2001)</p>	R1	R2	R3	OH	Me	OMe	OH	Me	OH	OH	OH	Me	H	OH	Me	 <p>R = α-OH R = β-OH</p> <p>ascalonicoside A1/A2</p> <p><i>Allium ascalonicum</i> Hort (Fattorusso et al., 2002)</p>
R1	R2	R3														
OH	Me	OMe														
OH	Me	OH														
OH	OH	Me														
H	OH	Me														
 <p>ascalonicoside B</p> <p><i>Allium ascalonicum</i> Hort (Fattorusso et al., 2002)</p>	 <p>triquetrosides A1/A2 R₁ = Rha R₂ = α-OH R₁ = Rha R₂ = β-OH</p> <p>triquetrosides C1/C2 R₁ = H R₂ = α-OH R₁ = H R₂ = β-OH</p> <p><i>Allium triquetrum</i> (Corea et al., 2003)</p>															

TAB. 2.5 – Saponines à Furostane (2)

 <p>elburzensosides A1/ A2 R = α-OH R₁ = H R = β-OH R₁ = H</p> <p>elburzensosides B1/ B2 R = α-OH R₁ = Glc R = β-OH R₁ = Glc</p> <p><i>Allium elburzense</i> (Barile et al., 2004)</p>	 <p>elburzensosides C1/ C2 R = α-OH R₁ = Glc R = β-OH R₁ = Glc</p> <p>elburzensosides D1/ D2 R = α-OH R₁ = Xyl-³Glc-⁴Gal R = β-OH R₁ = Xyl-³Glc-⁴Gal</p> <p><i>Allium elburzense</i> (Barile et al., 2004)</p>
 <p>tropeoside A1/A2 R = α-OH R₁ = Gal R = β-OH R₁ = Gal</p> <p>tropeoside B1/B2 R = α-OH R₁ = Xyl R = β-OH R₁ = Xyl</p> <p><i>Allium cepa</i> L. var. Tropea (Corea et al., 2005)</p>	 <p>macrostemonoside M</p> <p><i>Allium macrostemon</i> (Chen et al., 2006)</p>
 <p>macrostemonoside N</p> <p><i>Allium macrostemon</i> (Chen et al., 2006)</p>	 <p>macrostemonoside O R₁ = Gal-²Glc R₂ = H</p> <p><i>Allium macrostemon</i> Bunge (Chen et al., 2007)</p>

TAB. 2.7 – Saponines à Cholestane

 <p>(1) R1 Rha R2 Rha R3 Glc</p> <p><i>Allium macleanii</i> (Inoue et al., 1995)</p>	 <p>(2) R1 Rha R2 H R3 Glc</p> <p><i>Allium jesdianum</i> (Mimaki et al., 1999a)</p>
 <p>(3) R1 Rha R2 H R3 Gal</p> <p><i>Allium porrum L</i> (Fattorusso et al., 2000)</p>	 <p>(4) R1 Glc-⁴Rha R2 H R3 Gal</p> <p><i>Allium porrum L</i> (Fattorusso et al., 2000)</p>
 <p>(5) R1 Rha R2 H R3 Rha-³Gal</p> <p><i>Allium nigrum L</i> (Jabrane et al., 2011)</p>	 <p>(6) R1 H R2 H R3 Rha-³Gal</p> <p><i>Allium nigrum L</i> (Jabrane et al., 2011)</p>

2.1.3.2 Les saponines isolées de la famille des Caryophyllaceae

Les saponines de la famille des Caryophyllaceae sont presque entièrement basées sur le squelette β -amyrine avec un groupement hydroxyle en C-3 et un carboxyle en C-17. Les aglycones les plus répandus dans cette famille sont la gypsogénine, acide gypsogénique, et l'acide quillaïque. Des aglycones de type lupane ont également été rencontrés dans cette famille, mais ils sont rares (Jia et al., 2002).

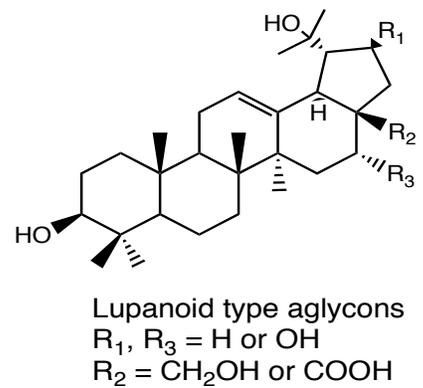
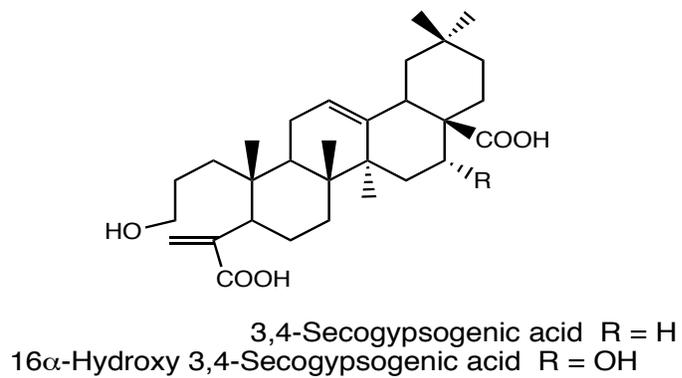
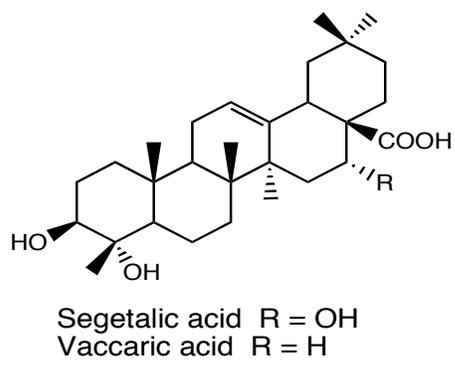
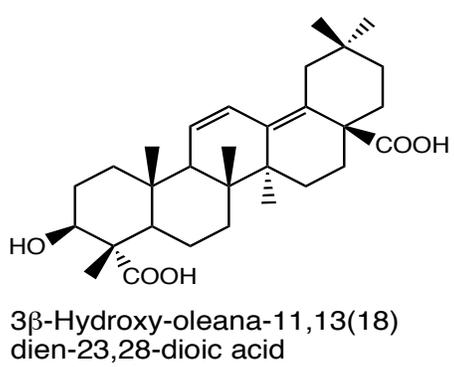
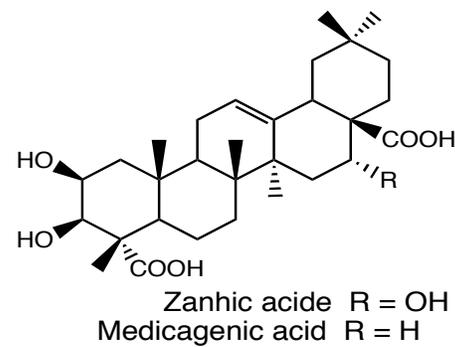
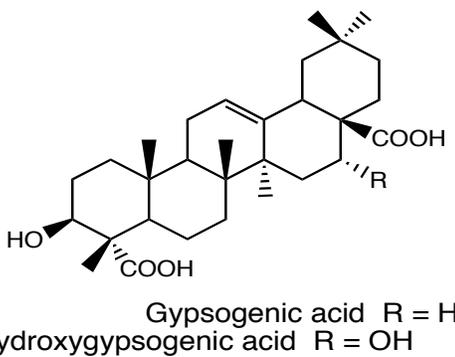
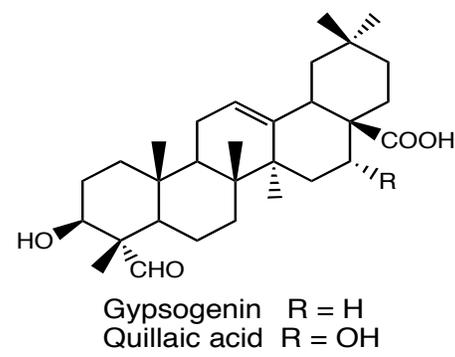
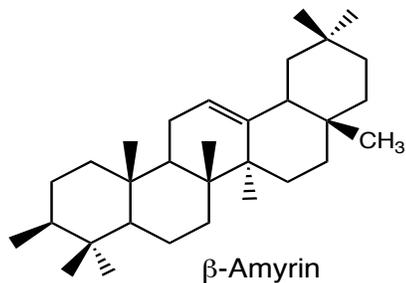
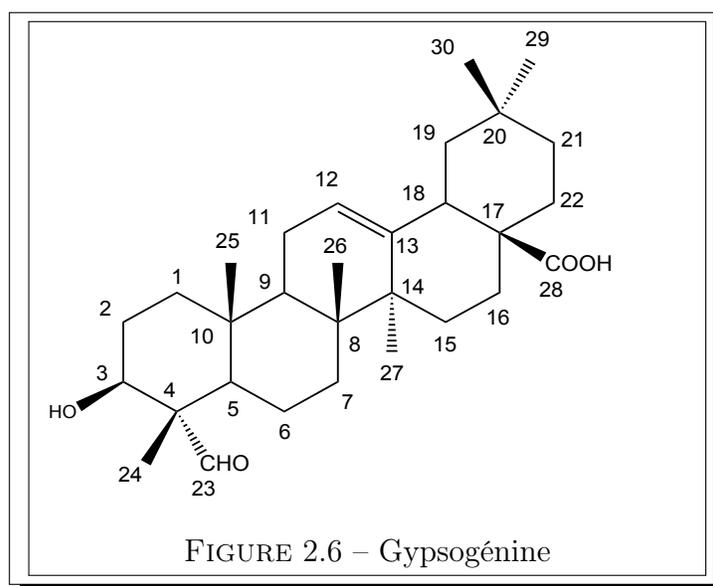


FIGURE 2.5 – Aglycones isolés des Caryophyllaceae

Les travaux antérieurs relatifs à la phytochimie des plantes de la famille des Caryophyllaceae ont permis de caractériser de nombreuses saponines. À travers les genres comme *Gypsophila*, *Acanthophyllum*, *Silene*, *Vaccaria* et *Dianthus*, cette famille demeure l'une des sources de saponines les plus importantes. Les tableaux suivants présentent quelques exemples de saponines isolées de la famille des Caryophyllaceae en fonction de leurs génines. Ainsi nous aurons respectivement les saponines à **gypsogénine**, **acide gypsogénique**, **acide quillaïque** et **acide 16 α -hydroxygypsogénique**.

2.1.3.3 Saponines à gypsogénine



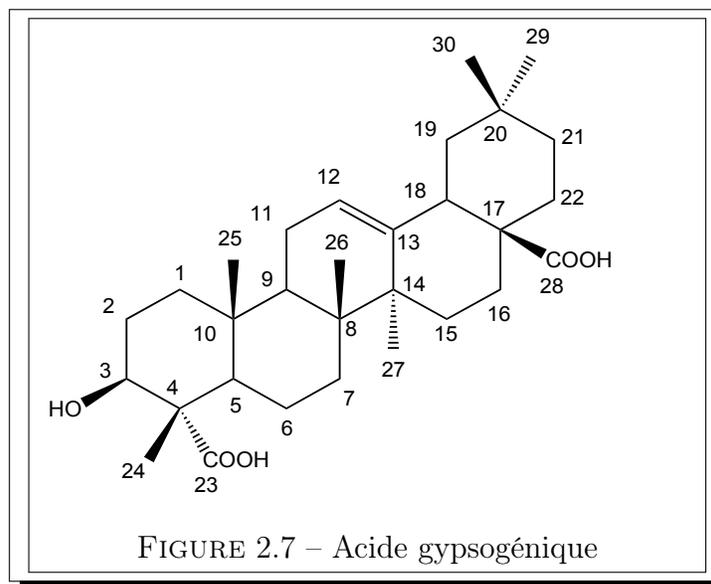
Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Plantes	Références
Acanthophylloside B	Gal- ⁴ Ara- ⁴ GlcA- ² Gal	Xyl- ³ Xyl- ³ Xyl- ³ Rha- ⁴ Fuc- ² Qui	<i>Acanthophyllum gypsophyloides</i>	(Putieva et al., 1975)
	Xyl- ³ GlcA- ² Gal	Glc- ³ Rha- ² Fuc- ⁴ Xyl	<i>Gypsophila paniculata, arrostii</i>	(Frechet et al., 1991)
Squarroside A	Gal- ² GlcA- ³ Xyl	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ¹⁴ Ac ² Ara (f)	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Lacaille-Dubois et al., 1993)

TAB. 2.8 – Saponines à gypsogénine

	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Méthyle ester	<i>Gypsophila oldhamania</i>	(Liu et al., 1995)
	Gal- ² GlcA- 3 Ara	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ⁴ Fuc- 2 Qui	<i>Gypsophila paniculata</i>	(Delay et al., 1997)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Glc Ac 14	<i>Agrostema githago</i>	(Siepman et al., 1998)
Snatzkein F		Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Ara (f) Ac 14	<i>Arenaria filicaulis</i>	(Soliman et al., 1999)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ³ Fuc- 4 Rha	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Gaidi et al., 2000)
	Glc	Rha- ² Ara- ² Glc- 6 Glc	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Gaidi et al., 2000)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Ac 3,4 diAc	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Gaidi et al., 2001a)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Ara(f) ⁵ -Ac Ac 14	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Gaidi et al., 2001a)
Junceoside A	Gal- ³ GlcA- 2 Ara	Glc- ³ Rha- ² Fuc- 4 Xyl	<i>Arenaria juncea</i>	(Gaidi et al., 2001)
Junceoside B	Gal- ³ GlcA- 2 Ara	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Arenaria juncea</i>	(Gaidi et al., 2001)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl		<i>Silene cucubalus</i>	(Larhsini et al., 2003)
Glanduloside B	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 13 Ac	<i>Acanthophyllum glandulosum</i>	(Gaidi et al., 2004)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 4 Qui ^{3,4} -diAc	<i>Silene rubicunda</i>	(Fu et al., 2005)

TAB. 2.9 – Saponines à gypsogénine

2.1.3.4 Saponines à acide gypsogénique



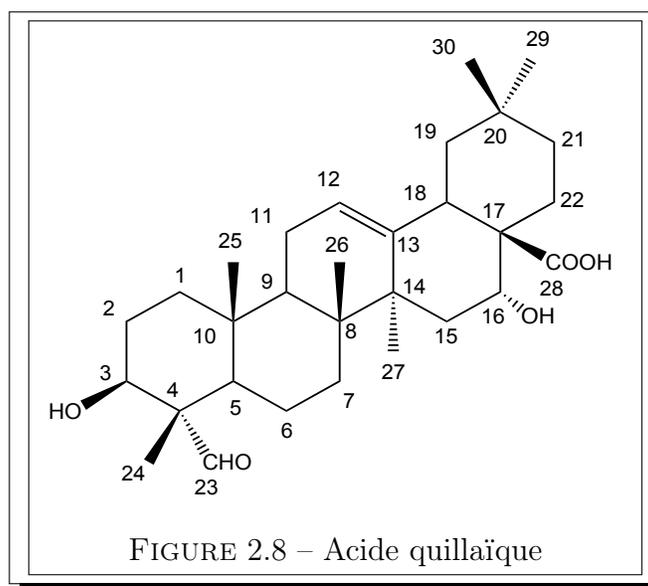
Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Plantes	Références
Dianchenoside H	libre en 3 23-O-S- 1,2propanediol	Glc- ³ Glc- 6 Glc	<i>Dianthus chinensis</i>	(Koike et al., 1994)
	libre en 3 23-O-Glc	Glc- ² Gal- ³ Gal- 6 Glc	<i>Gypsophila capillaris</i>	(Elgamal et al., 1995)
Vaccaroid A		Glc- ³ Glc- ⁶ Glc- 2 Glc	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Morita et al., 1997)
Vaccaroside A		Glc- ² Glc- ⁶ Glc- 3 Glc	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Koike et al., 1998)
Vaccaroside C	libre en 3 23-O-Glc	Glc- ² Glc- ⁶ Glc- 3 Glc	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Koike et al., 1998)
Saponarioside L	Xyl	Glc- ⁶ Glc- 3 Glc	<i>Saponaria officinalis</i>	(Koike et al., 1999)
Saponarioside C	Xyl	Gal- ⁶ Glc- ⁶ Glc- 3 Glc	<i>Saponaria officinalis</i>	(Jia et al., 1999)

TAB. 2.10 – Saponines à acide gypsogénique

Saponarioside D	Xyl	Glc- ² Glc- ⁶ Glc- ₃ Glc	<i>Saponaria officinalis</i>	(Jia et al., 1999)
Glanduloside A	libre en 3 23-O-Gal	Glc- ³ Gal- 6 Gal	<i>Acanthophyllum glandulosum</i>	(Gaidi et al., 2004)
Pachystegioside D		Glc- ² Glc- ⁶ Glc- ³ Gal-	<i>Acanthophyllum pachystegium</i>	(Haddad et al., 2004)
Junceoside D	3-O-SO ₃ 23-O-Glc 4 SO ₃		<i>Arenaria juncea</i>	(Gaidi et al., 2005)
Gypsosaponin C	libre en 3 23-O-Glc	Glc- ³ Glc- 6 Glc	<i>Gypsophila oldhamiana</i>	(Zheng et al., 2007)
		Glc- ³ Gal- 6 Glc	<i>Acanthophyllum elatius</i> , <i>A. lilacinum</i>	(Timité et al., 2010)
	libre en 3 23-O-Gal	Glc- ³ Gal- 6 Glc	<i>Acanthophyllum lilacinum</i> , <i>A. sordidum</i>	(Timité et al., 2010)

TAB. 2.11 – Saponines à acide gypsogénique

2.1.3.5 Saponines à acide quillaïque



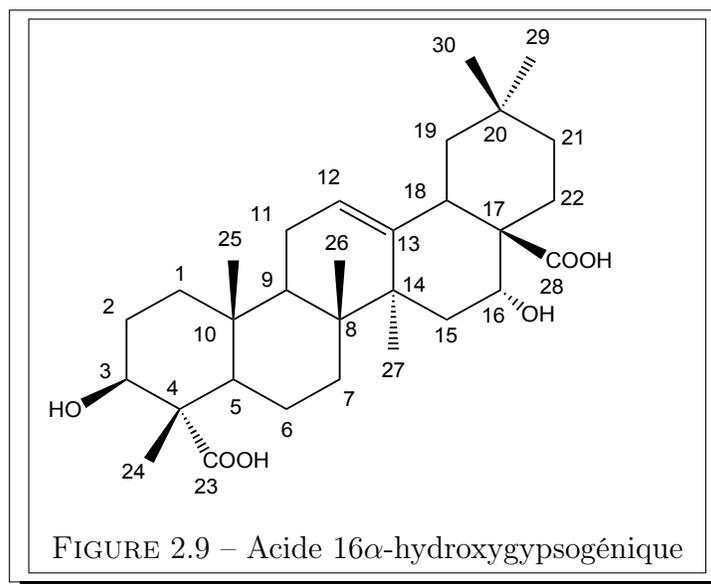
Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Plantes	Références
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Glc- ³ Rha- ² Fuc- 4 Xyl	<i>Gypsophyla paniculata, arrostii</i>	(Frechet et al., 1991)
		Glc- ² Glc- 6 Gal	<i>Gypsophyla capillaris</i>	(Elgamal et al., 1994)
Jenissensisoside A	Gal- ² GlcA-	Glc- ⁴ Rha- ² Fuc- 4 cis-Me-cinnamoyl	<i>Silene jenissensis</i>	(Lacaille-Dubois et al., 1995)
Rubicunoside A	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ³ Fuc 3-OAc- 2 Fuc 4-OAc	<i>Silene rubicunda</i>	(Tan et al., 1995)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Me	<i>Gypsophyla oldhamania</i>	(Liu et al., 1995)
Jenissensisoside C	Gal- ² GlcA-	Rha- ² Fuc- 4 cis-Me-cinnamoyl	<i>Silene jenissensis</i>	(Lacaille-Dubois et al., 1997)
	Gal- ² GlcA- 3 Ara	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ⁴ Fuc- 2 Qui	<i>Gypsophyla paniculata</i>	(Delay et al., 1997)

TAB. 2.12 – Saponines à acide quillaïque

Vaccarioside E	Gal- ² GlcA-	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ⁴ OAc 3 Ara (f)	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Jia et al., 1998a)
Saponarioside A	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Qui- ⁴ -OAc- ³ Xyl	<i>Saponaria officinalis</i>	(Jia et al., 1998b)
	Glc- ³ GlcA-	Glc- ³ Rha- ² Ara 4 3 Xyl Xyl	<i>Spergularia ramosa</i>	(De Tomasi et al., 1998)
	Gal- ² GlcA-	Ara- ² Ara- ² Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Glc	<i>Silene fortunei</i>	(Lacaille-Dubois et al., 1999)
Silenoside B	Gal- ² GlcA-	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 2 Glc	<i>Silene vulgaris</i>	(Glensk et al., 1999)
segetoside I	Gal- ² GlcA-	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ⁴ Ac 3 Ara- ⁵ Ac	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Sang et al., 2000)
	Glc	Rha- ³ Ara- ² Glc- 6 Glc	<i>Acanthophyllum squarrosum</i>	(Gaidi et al., 2000)
	Gal- ² GlcA-	Ara- ² Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ⁴ Ac 2 3 Ara Glc- ⁶ Ac	<i>Silene fortunei</i>	(Gaidi et al., 2002a)
	Gal- ² GlcA-	Rha- ² Fuc- ³ Ac 4 cis-Me-cinnamoyl-	<i>Silene fortunei</i>	(Gaidi et al., 2002a)
pachystegiosideA	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Qui- ^{3,4} diAc	<i>Acanthophyllum pachystegium</i>	(Haddad et al., 2004)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Qui- ⁴ Ac	<i>Acanthophyllum pachystegium</i>	(Haddad et al., 2004)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Qui- ⁴ Ac	<i>Acanthophyllum pachystegium</i>	(Haddad et al., 2004)
		Ara- ⁴ Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Gypsophila oldhamiana</i>	(Luo et al., 2006)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Ara- ² Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Gypsophila oldhamiana</i>	(Bai et al., 2007)
	Gal- ² GlcA-	Glc- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 4 Fuc	<i>Vaccaria segetalis</i>	(Ma et al., 2008)
	Xyl- ³ GlcA-		<i>Gypsophila altissima</i>	(Chen et al., 2010)
	Gal- ² GlcA- 3 Xyl	Glc- ³ Rha- ² Fuc- 6 4 Ac Xyl	<i>Gypsophila altissima</i>	(Chen et al., 2010)

TAB. 2.13 – Saponines à acide quillaïque (suite)

2.1.3.6 Saponines à acide 16 α -hydroxygypsogénique



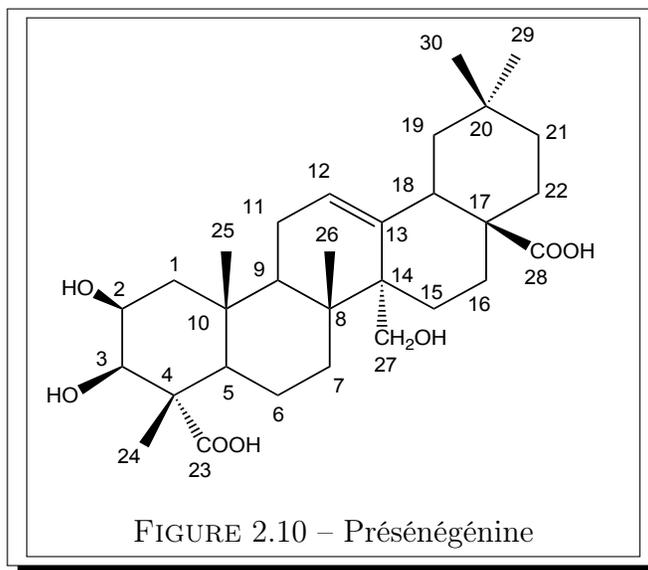
Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Plantes	Références
Dianchenoside A	Ara	Glc	<i>Dianthus chinensis</i>	(Li et al., 1993)
Dianchenoside B	Xyl	Glc	<i>Dianthus chinensis</i>	(Li et al., 1993)
Saponarioside F	Xyl	Glc- ² Glc- ⁶ Glc- ³ Glc	<i>Saponaria officinalis</i>	(Jia et al., 1999)
Saponarioside I	Xyl	Gal- ⁶ Glc- ⁶ Glc- ³ Glc	<i>Saponaria officinalis</i>	(Koike et al., 1999)

TAB. 2.14 – Saponines à acide 16 α -hydroxygypsogénique

2.1.3.7 Les saponines isolées de la famille des Polygalaceae

Les aglycones des saponines isolées des Polygalaceae sont des triterpénoïdes pentacycliques fortement oxygénés dont les différentes structures sont étroitement liées. Parmi ces saponines, une cinquantaine de glycosides de présénégénine ont été caractérisés dans plusieurs espèces comme par exemple *Polygala senega*, *P. tenuifolia*, *P. glomerata*, *P. fallax*, *P. reinii*, *P. japonica*, *P. arillata*, *Bredemeyera floribunda*, *Securidaca inappendiculata*. Les saponines ayant la **bayogénine**, **polygalagénine**, **acide médicagénique**, **hédéragénine** comme aglycones ont principalement été trouvées chez *P. japonica* (Lacaille-Dubois and Mitaine-Offer, 2005). D'autres espèces comme *Polygala micranta* (Tabopda et al., 2011b) et *Muraltia ononidifolia* (Elbandy et al., 2002b), ont permis d'isoler des saponines à **acide médicagénique**. Enfin une rare sapogénine comme la **préatroxigénine** a été isolée chez l'espèce *Atroxima congolana* (Elbandy et al., 2003). Comme dans le cas des Caryophyllaceae, nous donnerons dans les tableaux suivants, quelques exemples de saponines fréquemment rencontrées dans la famille des Polygalaceae. Ainsi nous présenterons respectivement les saponines à **présénégénine**, **bayogénine**, **acide médicagénique** et **Polygalagénine**.

2.1.3.8 Saponines à Présénégénine



Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Espèce	Réf
Onjisaponine A	Glc-	<i>E-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Rha-Fuc-} \\ 2 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^3\text{Api} \end{array}$	<i>Polygala tenuifolia</i>	(Sakuma et Shoji, 1981b)
Onjisaponine B	Glc-	<i>E-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \\ 3 \\ \text{Rha} \end{array}$	<i>Polygala tenuifolia</i>	(Sakuma et Shoji, 1981b)
Onjisaponine E	Glc-	<i>E-tri</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \end{array}$	<i>Polygala tenuifolia</i>	(Sakuma et al., 1981b)
Onjisaponine F	Glc-	<i>E-tri</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Ara-}^3\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \\ 3 \\ \text{Api} \end{array}$	<i>Polygala willdenow</i>	(Sakuma et al, 1981a)
Onjisaponine G	Glc-	<i>E-tri</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \\ 3 \\ \text{Api} \end{array}$	<i>Polygala tenuifolia</i>	(Sakuma et Shoji, 1981a)
E-Sénégasaponine a	Glc-	<i>E-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \\ 3 \\ \text{Api} \end{array}$	<i>Polygala senega var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
Z-Sénégasaponine a	Glc-	<i>Z-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc-} \\ 3 \\ \text{Api} \end{array}$	<i>Polygala senega var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
E-Sénégasaponine b	Glc-	<i>E-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc} \end{array}$	<i>Polygala senega var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
Z-Sénégasaponine b	Glc-	<i>Z-p</i> -métoxycinnamoyle $\begin{array}{c} 4 \\ \text{Gal-}^4\text{Xyl-}^4\text{Rha-}^2\text{Fuc} \end{array}$	<i>Polygala senega var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)

TAB. 2.15 – Saponines à présénégénine (1)

Sénégénine II	Glc-	E - <i>di</i> -méthoxycinnamoyle 4 Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i> <i>Polygala</i> <i>glomerata</i> Lour	(Yoshikawa et al., 1995a; Zhang et al., 1998)
Sénégénine III	Glc-	E - <i>p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Rha- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i> <i>Polygala fallax</i>	(Yoshikawa et al., 1995a; Zhang et al., 1996c)
Sénégénine IV	Glc-	E - <i>p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Rha- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ³ Api	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
Z-Sénégénine II	Glc-	Z - <i>di</i> -méthoxycinnamoyle 4 Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i> <i>Polygala</i> <i>glomerata</i>	(Yoshikawa et al., 1995a; Zhang et al., 1998b)
Z-Sénégénine III	Glc-	Z - <i>p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Rha- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
Z-Sénégénine IV	Glc-	Z - <i>p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Rha- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ³ Api	<i>Polygala senega</i> <i>var. latifolia</i>	(Yoshikawa et al., 1995a)
Reinoside A	Glc- ² Glc-		<i>Polygala reinii</i>	Miyase et al., 1995)
Reinoside B	Glc- ² Glc-	Ac- ⁴ Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala reinii</i> <i>P. fallax</i>	Miyase et al., 1995; Zhang et al., 1996c)
Reinoside C	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala reinii</i> <i>P. fallax</i>	Miyase et al., 1995; Zhang et al., 1996c)
Reinoside D	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha- ³ Api	<i>Polygala reinii</i> <i>P. fallax</i>	Miyase et al., 1995; Zhang et al., 1996c)
Reinoside E	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha- ³ Api- ⁵ Ac	<i>Polygala reinii</i> <i>P. fallax</i>	Miyase et al., 1995; Zhang et al., 1996c)
Reinoside F	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala reinii</i> <i>P. fallax</i>	Miyase et al., 1995; Zhang et al., 1996c)

TAB. 2.16 – Saponines à présénégénine (2)

Polygalasaponine XL	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ³ Api	<i>Polygala fallax</i>	(Zhang et al., 1996c)
Polygalasaponine XLI	Glc- ² Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ³ Api- ⁵ Ac	<i>Polygala fallax</i>	(Zhang et al., 1996c)
	Glc- ² Glc-	Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala fallax</i>	(Zhang et al., 1996c)
Polygalasaponine XLII	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala glomerata</i>	(Zhang et al., 1998b)
Polygalasaponine XLIII	Glc-	<i>E-p-méthoxycinnamoyl</i> 4 Ara- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala glomerata</i>	(Zhang et al., 1998b)
Polygalasaponine XLIV	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Glc- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala glomerata</i>	(Zhang et al., 1998b)
Polygalasaponine XLV	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Ac- ⁶ Glc- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala glomerata</i>	(Zhang et al., 1998b)
Polygalasaponine XLVI	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Ac- ⁶ Glc- ³ Fuc- 2 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala glomerata</i>	(Zhang et al., 1998b)
	Glc-	Glc- ³ Fuc- 2 Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala amarella</i>	(Desbene et al., 1999)
Sécuridiose A	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Ac- ⁶ Glc- ³ Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Securidaca inappendiculata</i>	(Kuroda et al., 2001)
Sécuridiose B	Glc-	<i>E-di-méthoxycinnamoyl</i> 4 Ac- ⁶ Glc- ³ Fuc- 2 Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha 4 Gal	<i>Securidaca inappendiculata</i>	(Kuroda et al., 2001)

TAB. 2.17 – Saponines à présénégénine (3)

	Glc-	diAc- ^{3,4} Fuc- 2 Xyl- ⁴ Rha ³ -Api	<i>Carpoloba lutea</i>	(Mitaine-Offer et al., 2002)
	Glc-	<i>E/Z-tri</i> -méthoxycinnamoyle 4 Xyl- ⁴ Ara- ⁴ Rha ² Fuc- 3 3 Glc Api	<i>Muraltia heisteria</i>	(Elbandy et al., 2002a)
	Glc-	<i>E/Z-tri</i> -méthoxycinnamoyle 4 Ara- ⁴ Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha ² Fuc-	<i>Muraltia heisteria</i>	(Elbandy et al., 2002a)
	Glc-	<i>E/Z-di</i> -méthoxycinnamoyle 4 Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha ² Fuc- 3 Glc	<i>Polygala arenaria</i>	(Mitaine-Offer et al., 2003)
	Glc-	<i>E/Z-p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Glc- ³ Xyl- ⁴ Rha ² Fuc-	<i>Polygala arenaria</i>	(Mitaine-Offer et al., 2003)
	Glc-	<i>E/Z-di</i> -méthoxycinnamoyle 4 Glc- ³ Ara- ⁴ Rha ² Fuc- 3 Glc	<i>Polygala arenaria</i>	(Mitaine-Offer et al., 2003)
Myristifolioside A ₁ /A ₂	Glc-	<i>E/Z-p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha ² Fuc- 3 3 Api Ara	<i>Polygala myrtifolia</i>	(Haddad et al., 2003)
Myristifolioside B ₁ /B ₂	Glc-	<i>E/Z-p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha ² Fuc- 3 Api	<i>Polygala myrtifolia</i>	(Haddad et al., 2003)
Myristifolioside C ₁ /C ₂	Glc-	<i>E/Z-p</i> -méthoxycinnamoyle 4 Fuc 2 Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala myrtifolia</i>	(Haddad et al., 2003)

TAB. 2.18 – Saponines à présénégénine (4)

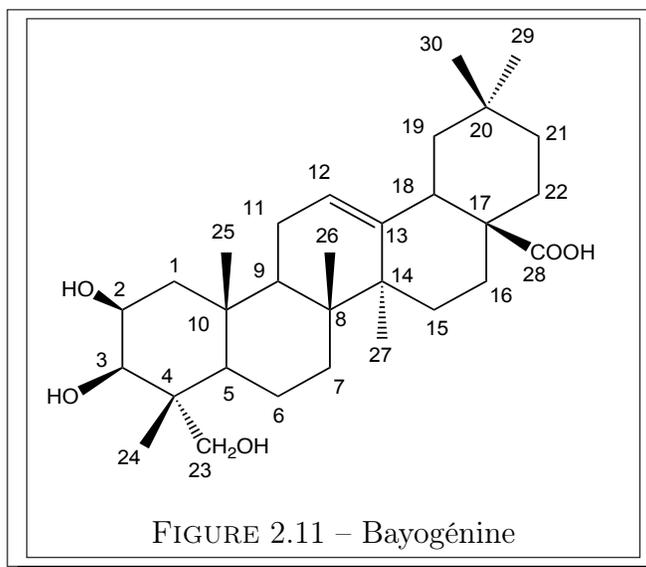
Myristifolioside D ₁ /D ₂	Glc-	<i>E-p</i> -méthoxycinnamoyl Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ Api	<i>Polygala myrtifolia</i>	(Haddad et al., 2003)
Myristifolioside E ₁ /E ₂	Glc-	<i>E-p</i> -méthoxycinnamoyl Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ Ara	<i>Polygala myrtifolia</i>	(Haddad et al., 2003)
	Glc-	<i>E/Z-tri</i> -méthoxycinnamoyl Api- ³ Rha- ² Fuc- ⁴ Xyl Gal- ⁶ Ac	<i>Muraltia heisteria M. satureioides</i>	(Elbandy et al., 2004)
	Glc-	<i>E/Z-tri</i> -méthoxycinnamoyl Ac- ³ Rha- ² Fuc- ⁴ Gal- ⁶ Ac	<i>Muraltia heisteria</i>	(Elbandy et al., 2004)
	Glc-	<i>E/Z-tri</i> -méthoxycinnamoyl Ac- ³ Rha- ² Fuc- ⁴ Xyl	<i>Muraltia heisteria</i>	(Elbandy et al., 2004)
Onjisaponin H	Glc-	<i>E/Z-p</i> -méthoxycinnamoyl Api- ³ Rha- ² Fuc- ⁴ Xyl	<i>Polygala tenuifolia willd</i>	(Li et al., 2006)
	Glc-	Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ Ara Api	<i>Nylandtia spinosa</i>	(Diome et al., 2007)
	Glc-	Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ Ara	<i>Nylandtia spinosa</i>	(Diome et al., 2007)
	Glc-	Api- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ² Gal	<i>Nylandtia spinosa</i>	(Diome et al., 2007)
	Glc-	Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Nylandtia spinosa</i>	(Diome et al., 2007)

TAB. 2.19 – Saponines à présénégénine (5)

tenuifoside A	Glc-	Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ ³ Api Rha	<i>Polygala tenuifolia</i> willd	(Xu et al., 2008)
	Glc-	<i>E-tri-méthoxycinnamoyle</i> Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ ⁴ Api Rha	<i>Securidaca</i> <i>longepedunculata</i>	(Mitaine- Offer et al., 2010)
	Glc-	<i>E-tri-méthoxycinnamoyle</i> Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ ⁴ ³ Api Rha Glc- ⁶ Ac	<i>Securidaca</i> <i>longepedunculata</i>	(Mitaine- Offer et al., 2010)
	Glc-	<i>E-tri-méthoxycinnamoyle</i> Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ ⁴ ³ Api Rha Gal	<i>Securidaca</i> <i>longepedunculata</i>	(Mitaine- Offer et al., 2010)
	Glc-	<i>E-tri-méthoxycinnamoyle</i> Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ⁴ ³ ⁴ Ara Api Rha	<i>Securidaca</i> <i>longepedunculata</i>	(Mitaine- Offer et al., 2010)
	Glc-	<i>E/Z-di-méthoxycinnamoyle</i> Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ⁴ ³ Glc	<i>Securidaca</i> <i>welwitschii</i>	(Timité et al., 2010b)
	Glc-	<i>E/Z-di-méthoxycinnamoyle</i> Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- ³ ⁴ ³ Ac Glc Rha	<i>Securidaca</i> <i>welwitschii</i>	(Timité et al., 2010b)
	Glc-	Gal- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Securidaca</i> <i>welwitschii</i>	(Timité et al., 2010b)

TAB. 2.20 – Saponines à présénégénine (6)

2.1.3.9 Saponines à bayogénine



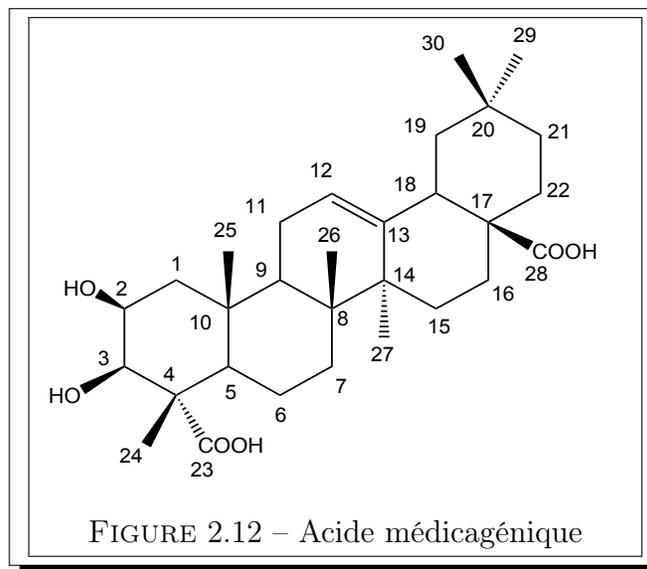
Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Espèce	Réf
Polygalasaponine I	Glc	Glc-	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine II	Glc-	Glc- 2 Rha	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine III	Glc-	Api- ³ Glc- 2 Rha-	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine IV	Glc-	Api- ³ Glc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine V	Glc-	Glc- 2 Xyl- ⁴ Rha ³ -Api	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine VI	Glc- ² Glc-	Glc-	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)

TAB. 2.21 – Saponines bayogénine 1

Polygalasaponine VII	Glc- ² Glc-	Glc- ₂ ¹ Rha	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine VIII	Glc- ² Glc-	Api- ³ Glc- ₂ ¹ Rha-	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine IX	Glc- ² Glc-	Glc- ₂ ¹ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine X	Glc- ² Glc-	Api- ³ Glc- ₂ ¹ Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Polygalasaponine XI	Glc- ² Glc-	Glc- ₂ ¹ Rha	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
Lobatoside B	Glc- ² Glc-		<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)
	Glc-		<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995)

TAB. 2.22 – Saponines à bayogénine 2

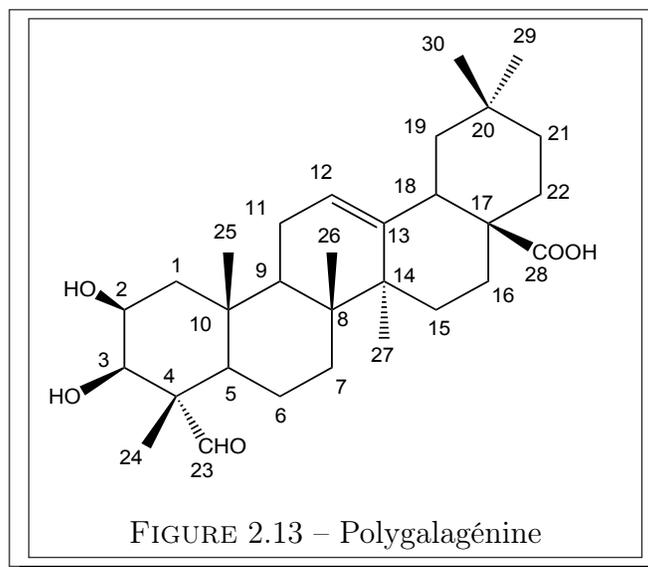
2.1.3.10 Saponines à acide médicagénique



Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Espèce	Réf
Polygalasaponine XXI	Glc-	Glc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1996a)
Polygalasaponine XXII	Glc-	Api- ³ Glc- 2 Xyl- ⁴ Rha	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1996a)
	Glc-	Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Ara-	<i>Muraltia ononidifolia</i>	(Elbandy et al., 2002b)
	Glc-	Xyl- ⁴ Rha- ² Ara- 3 Api	<i>Muraltia ononidifolia</i>	(Elbandy et al., 2002b)
	Glc- ² Glc-	Xyl- ⁴ Rha- ² Ara 3 Api	<i>Muraltia ononidifolia</i>	(Elbandy et al., 2002b)
	Glc- ² Glc-	Rha- ² Ara-	<i>Muraltia ononidifolia</i>	(Elbandy et al., 2002b)
	Glc- ² Glc-		<i>Muraltia ononidifolia</i>	(Elbandy et al., 2002b)
		Xyl- ⁴ Rha- ² Glc- 3 Api	<i>Polygala japonica</i>	Wang et al., 2006
Securidacaside A	Glc-	<i>E/Z</i> -méthoxycinnamoyl Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Api	<i>Securidaca longepedunculata</i>	Stevenson et al., 2009
Securidacaside B	Glc-	<i>E</i> -tri-méthoxycinnamoyl Ara- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Api	<i>Securidaca longepedunculata</i>	Stevenson et al., 2009
Micranthoside A	Glc-	Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Polygala micrantha</i>	(Tabopda et al., 2011a)
Micranthoside B	Glc-	Ac- ⁶ Gal- ⁴ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc-	<i>Polygala micrantha</i>	(Tabopda et al., 2011a)
Micranthoside C	Glc- ³ Glc- 6 Glc	Api- ³ Xyl- ⁴ Rha- ² Fuc- 3 Api	<i>Polygala micrantha</i>	(Tabopda et al., 2011a)

TAB. 2.23 – Saponines à acide médicagénique

2.1.3.11 Saponines à polygalagénine



Nom	Chaîne osidique en 3	Chaîne osidique en 28	Plantes	Références
Polygalasaponine XII	Glc-	Glc-	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XIII	Glc- ² Glc-		<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XIV	Glc- ² Glc-	Glc-	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XV	Glc- ² Glc-	Glc- ² Glc-	<i>Polygala japonica</i> Houtt	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XVI	Glc- ² Glc-	$\begin{matrix} \text{Glc} \\ \\ \text{Xyl-}^4\text{Glc-} \end{matrix}$	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XVII	Glc- ² Glc-	Rha- ² Glc-	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XVIII	Glc- ² Glc-	Xyl- ⁴ Rha- ² Glc-	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995b)
Polygalasaponine XIX	Glc- ² Glc-	$\begin{matrix} \text{Api-}^3\text{Glc-} \\ \\ \text{Xyl-}^4\text{Rha} \end{matrix}$	<i>Polygala japonica</i> Hout	(Zhang et al., 1995b)

TAB. 2.24 – Saponines à polygalagénine

Deuxième partie

ETUDE CHIMIQUE

MATÉRIELS ET MÉTHODES APPLIQUÉS À LA PHYTOCHIMIE

1.1 Matériel végétal et extraction

Pour les espèces du genre *Acanthophyllum*, l'espèce *Securidaca welwitschi* et l'espèce *Arenaria montana*, les détails sur les supports végétaux ainsi que les protocoles d'extraction sont exposés respectivement dans les publications N°1, N°2 et N°3 appuyés respectivement par les figures 2.1, 2.18 et 2.42. En revanche le matériel végétal de *Allium schoenoprasum* est constitué de la plante entière (bulbe, tige, feuilles et fleurs), et pour l'extraction, 240 g de plante entière ont été coupés en petits fragments et broyés avec un broyeur électrique. Le broyât ainsi obtenu est soumis à trois extractions successives à reflux pour une durée d'une heure chacune, avec un mélange méthanol/eau (70 :30 v/v) pour 2 litres de solvant par extraction. La solution extractive obtenue est concentrée par évaporation pour donner 32g d'extraits bruts de saponines. La figure 2.66 résume cette extraction.

1.2 Méthodes chromatographiques analytiques

1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince, CCM (TLC, pour *thin-layer chromatography*), est une application de la chromatographie en général. Elle est schématiquement basée sur le fait que les constituants d'un mélange peuvent avoir des affinités différentes pour un adsorbant

donné. Pour exploiter cette différence, on utilise, un adsorbant réparti en couche mince (0,25 mm) sur un support inerte (verre, aluminium, polyéthylène...).

Le produit est déposé sous forme de spot en bas de la plaque à l'aide d'une micropipette (quelques microlitres). Puis la plaque est placée verticalement dans une cuve contenant un peu de solvant de façon à ce que la plaque trempe sur une hauteur de 0,5 à 1 cm environ. On laisse alors le solvant monter le long de la plaque par capillarité.

Au cours de son ascension, le solvant va entraîner les différents constituants du mélange déposé en bas de la plaque, les constituants les moins retenus par l'adsorbant étant entraînés les plus facilement. On laisse le solvant migrer sur une distance de 10 cm, en général, puis la plaque est séchée. Se pose alors le problème de la visualisation du chromatogramme, dans le cas de produits incolores (ce qui est généralement le cas). Pour ce faire, on vaporise sur la plaque un produit donnant une réaction colorée avec les composés que l'on cherche à identifier.

1.2.1.1 Conditions chromatographiques

1.2.1.1.1 Plaques utilisées Nous avons utilisé des plaques de gel de silice prêtes à l'emploi, du commerce (silice 60 F₂₅₄, Merck et Silicycle) pour les contrôles. Les composés purs isolés font l'objet d'un contrôle de pureté, pour cela, on fait une CCM haute performance (HPTLC, pour High performance thin layer chromatography).

1.2.1.1.2 Solvants Pour la migration des composés, nous avons utilisé divers systèmes de solvants qui sont les suivants :

- CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O, 60-32-12-8
- CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O, 60-32-0,5-10 phase inférieure
- CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O, 60-32-1-7
- CHCl₃-MeOH-H₂O, 8-5-1

Les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm avant révélation.

1.2.1.1.3 Révélation

Nous avons utilisé les révélateurs suivants :

Komarowsky : Préparé comme suit

- Solution A = p-hydroxybenzaldéhyde à 2% dans le méthanol
- Solution B = H₂SO₄ à 50% dans l'éthanol

- Mélange Solution A-Solution B (5 :1)

Vanilline sulfurique : Préparé comme suit

- Solution A = Vanilline à 1% dans l'éthanol
- Solution B = H₂SO₄ (98%)
- Mélange Solution A-Solution B (50 :1)

1.3 Méthodes chromatographiques préparatives

1.3.1 Chromatographie d'exclusion moléculaire

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure spatiale (Hostettmann et al., 1997).

Le gel de dextrane Sephadex est un polymère linéaire de glucoses liés en 1→6. Ce gel semi-rigide est soumis à une réaction d'hydroxypropylation pour donner le gel Sephadex LH-20. Il est constitué de billes de porosité variable. Il permet la réalisation de chromatographies d'exclusion-diffusion et ainsi la séparation de molécules de masses moléculaires différentes en retenant à l'intérieur des billes les molécules dont la masse molaire est inférieure à la limite d'exclusion alors que les molécules de masse molaire supérieure traversent le gel et en sont ainsi exclues.

Dans notre étude, nous avons utilisé le Sephadex® LH-20. les systèmes de solvants employés durant notre travail expérimental sont le MeOH et/ou le mélange binaire MeOH-H₂O (1 :1).

1.3.2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique peut être considérée comme une CCM préparative réalisée en colonne, avec un vide permettant d'accélérer le débit d'élution. C'est une méthode alternative à la chromatographie flash pour le fractionnement des extraits de plantes. C'est une étape qui précède toutes les autres étapes de séparation sophistiquées comme la MPLC, HPLC etc. (Hostettmann et al., 1997). En pratique, elle permet l'élimination des sucres et des tanins contenus dans les extraits. Dans notre étude nous avons utilisé le filtre en verre fritté, qui est un entonnoir en verre contenant un disque fritté, de porosité fixe. La hauteur du filtre est variable et dépend de la masse d'extraits. La phase stationnaire est le gel de silice 60 en phase normale (Merck, 15-40 μm ou 63-200 μm) ou en phase inverse RP-18 (Silicycle, 75-200 μm). L'élution est réalisée comme

suit : RP-18 : gradient MeOH-H₂O (0-1, 1-1, 1-0)(v/v), cela permet d'éliminer les sucres dans l'eau et de recueillir les saponines dans les deux autres fractions. Silice 60 normale : gradient CHCl₃-MeOH-H₂O (80-20-2 ; 70-30-5 ; 60-32-7) (v/v), les tanins, au regard de leur taille ne passent pas à travers le gel de silice et sont ainsi éliminés. On obtient ainsi trois principales fractions de saponines en fonction de leur polarité.

1.3.3 Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC)

Cette technique de séparation, à mi-chemin entre la LPLC et la HPLC, permet de fractionner et purifier en une ou plusieurs analyses les composants d'un mélange complexe. Les MPLC sont réalisées sur des colonnes Büchi de tailles différentes : 460 x 15 mm ; 460 x 25 mm ; 230 x 15 mm.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé deux principaux appareils :
le premier constitué de :

- Pompe Gilson M 305
- Colonne Büchi remplie de gel de silice 60 (Merck, 15-40 μm) ou de silice en phase inverse RP-18 (Silicycle, 75-200 μm) surmontée d'une pré-colonne Büchi (110 x 15 mm) contenant le même gel que celui de la colonne principale.

le second étant un appareil Büchi Manager C-605 à deux pompes (2x Büchi Pump Module C-601) et un collecteur de fractions C-660, cet appareil est relié à une colonne remplie de silice en phase inverse RP-18 (Silicycle, 75-200 μm)

1.4 Détermination structurale

1.4.1 Méthodes chimiques

1.4.1.1 Hydrolyse acide

Cette hydrolyse permet de libérer tous les sucres engagés par des liaisons O-glycosidiques en position 3 et 28 de l'aglycone. Les sucres sont identifiés par CCM sur silice en comparaison avec des témoins. La génine est identifiée par CCM en comparaison avec des échantillons authentiques et par des méthodes spectrales (Schöpke, 2000).

1.4.1.2 Hydrolyse alcaline forte

L'hydrolyse alcaline permet de libérer la prosapogénine et les sucres étant liés à l'aglycone par une liaison ester en position 28 (Gaidi et al., 2000a, Haddad et al., 2003).

1.4.1.3 Hydrolyse alcaline douce

Cette hydrolyse permet de libérer l'acide organique et la saponine déacylée (Haddad et al., 2002, Hostettmann and Marston, 1995).

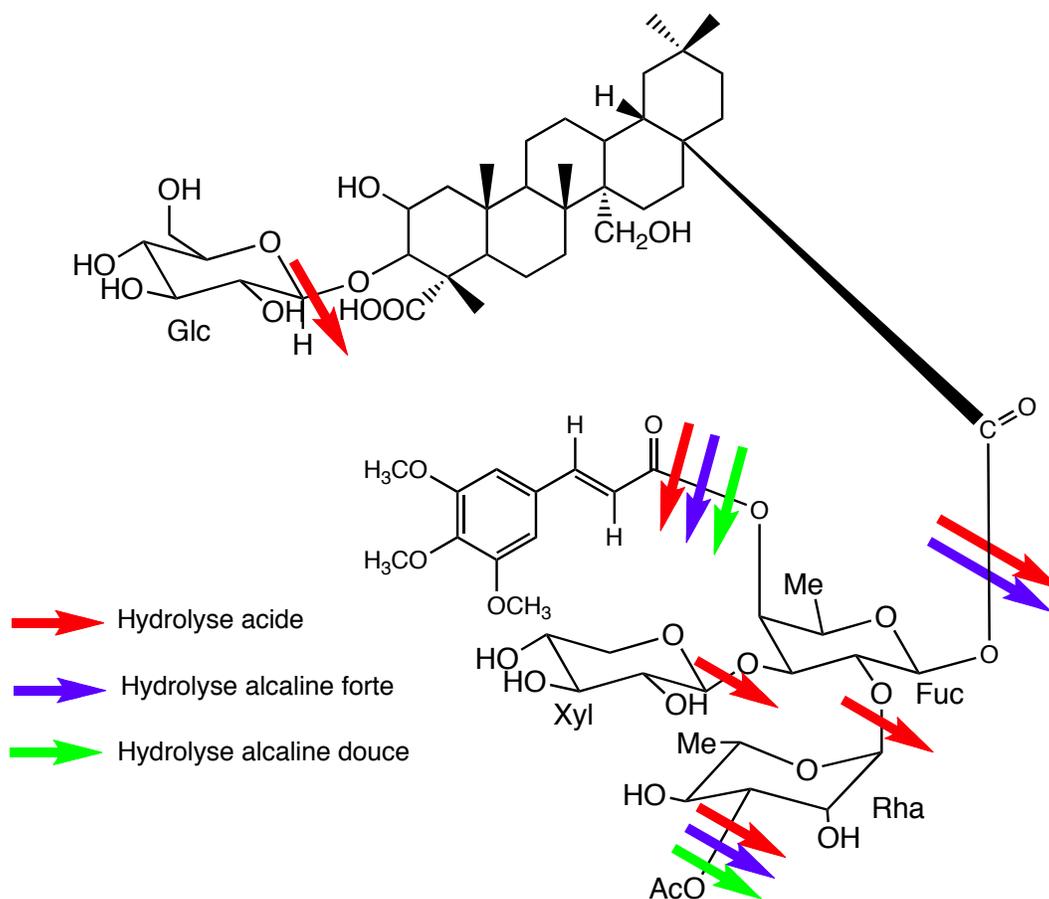


FIGURE 1.1 – Exemples d'hydrolyse chimique

1.4.2 Méthodes spectroscopiques

1.4.2.1 Spectrométrie de masse (MS)

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : sensibilité et limite de détection inégalées, variété des applications :

physique atomique, cinétique des réactions, géochronologie, toutes formes d'analyse chimique quantitative et qualitative (en particulier en biomédecine, en contrôle de l'environnement et pour les réactions ion-molécule) et détermination des paramètres thermodynamiques (ΔG°_f , K_a , etc.).

1.4.2.1.1 La source d'ions

La source d'ions est le dispositif qui permet d'ioniser les substances à analyser dans le spectromètre. Quelle que soit la source, les ions sont produits principalement selon l'une des méthodes d'ionisation suivantes : soit en utilisant une molécule neutre par l'éjection d'un électron, par la capture d'un électron, par la protonation, par la déprotonation ou par la formation d'adduits, ou soit par le transfert en phase gazeuse d'une espèce chargée présente dans la phase condensée. La production d'ions implique souvent des réactions ion-molécule dans la phase condensée (de Hoffmann and Stroobant, 2005). Les principales sources utilisées sont répertoriées dans le tableau suivant :

TAB. 1.1 – Les sources d'ions

La source à impact électronique (EI)
La source par ionisation chimique (CI)
L'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)
La désorption de champs (FD)
La désorption par plasma (PD)
La désorption laser (LD)
La désorption/ ionisation laser assistée par matrice (MALDI)
Le thermospray (TSP)
L'électrospray (ESI)
L'ionisation à pression atmosphérique (API)
L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

1.4.2.1.2 L'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)

Désignées respectivement par LSIMS (*Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*) et FAB (*Fast Atom Bombardment*), ces techniques consistent à focaliser sur un échantillon un faisceau d'ions ou de molécules neutres, respectivement. Une caractéristique essentielle de ces deux

techniques d'ionisation est que l'échantillon doit être dissous dans une matrice liquide non volatile. En pratique, on utilise le plus souvent la glycérine.

Ces techniques emploient des faisceaux de particules suffisamment énergétiques, comme dans la SIMS dynamique, pour endommager la surface. Mais elles produisent des ions de l'espèce moléculaire à partir de la surface, comme dans le SIMS statique, parce que la convection et la diffusion à l'intérieur de la matrice créent sans interruption une nouvelle couche à la surface pour produire de nouveaux ions. Les particules énergétiques viennent frapper la solution de l'échantillon, y provoquant une onde de choc qui va expulser de la solution des ions et des molécules. Les ions sont accélérés par différence de potentiel vers l'analyseur. L'intérêt d'utiliser des neutres plutôt que des ions est d'éviter l'accumulation de charges dans les échantillons non conducteurs. Cette technique provoque peu d'ionisation ou n'en provoque pas du tout : elle se contente d'expulser en phase gazeuse des ions préexistant en solution.

Le faisceau d'atomes neutres d'environ 5 keV est obtenu en ionisant une substance, le plus souvent de l'argon, parfois du xénon. Les ions sont accélérés et focalisés vers la substance à analyser sous plusieurs kilovolts. Ils passent ensuite dans une chambre de collision, où ils sont neutralisés par échange de charge entre molécules et ions. Leur quantité de mouvement est suffisante pour conserver la focalisation. Les ions restants sont ensuite éliminés du faisceau par passage entre des électrodes.

Ces deux techniques sont très efficaces pour produire des ions de hauts poids moléculaires de substances polaires. Elle a en outre l'avantage de fournir dans beaucoup de cas des faisceaux d'ions qui peuvent être maintenus pendant des temps longs, parfois plusieurs dizaines de minutes, permettant d'effectuer divers types d'analyses.

1.4.2.2 Spectres de masse

Dans ce travail les spectres de masse ont été enregistrés avec un spectromètre de masse en mode FAB⁻ et FAB⁺ (JEOL SX 102). La masse haute résolution (HR-ESIMS) (mode positif) a été effectuée sur un spectromètre (Q-TOF-1-Micromass spectrometer).

1.4.2.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est, fondamentalement, une autre forme de spectrométrie d'absorption apparentée à la spectroscopie IR ou UV. Dans des

conditions appropriées, *sous un champ magnétique*, un échantillon peut absorber une radiation électromagnétique dans la gamme des radiofréquences (rf) à des fréquences régies par les caractéristiques de l'échantillon. L'absorption est fonction de certains des noyaux présents dans la molécule. Un spectre RMN est la représentation de l'intensité des pics en fonction de leur fréquence d'absorption (Silverstein et al., 2007). Pour l'élucidation structurale, lorsqu'une quantité très limitée d'échantillon est disponible, les méthodes de spectrométrie de résonance magnétique nucléaire sont les plus indiquées. Ce sont des méthodes qui fournissent des informations complètes concernant la structure covalente, par exemple pour un fragment d'oligosaccharide sans avoir recours à toute autre méthode (Agrawal and Pathak, 1996). C'est la méthode la plus efficace pour l'étude structurale des saponines et nous renseigne sur :

- La nature de l'aglycone,
- La conformation et la configuration des sucres,
- Les liaisons interglycosidiques et les points de fixation des sucres sur l'aglycone.

Le spectre de RMN ^1H d'une saponine permet de distinguer trois zones de résonance (Massiot and Lavaud, 1995) :

- de 0.5 à 3 ppm : les protons de la génine, en particulier les méthyles situés en jonction de cycle se présentant sous forme de singulets fins ou de doublets.
- de 3 à 4.5 ppm : les protons osidiques, hormis les protons anomériques, et quelques protons de la génine situés sur des carbones hydroxylés,
- de 4.5 à 6 ppm : les protons anomères osidiques sous la forme de doublets ou singulets élargis, et les protons éthyléniques de la génine.

Le spectre de RMN ^{13}C présente sensiblement le même découpage :

- de 10 à 60 ppm : les carbones de la génine,
- de 60 à 90 ppm : les carbones des fonctions alcooliques secondaires et primaires des sucres et de la génine,
- au-delà de 90 ppm : les carbones anomériques des sucres entre 90 et 110 ppm, le plus blindé étant celui du sucre lié par une liaison ester, et des carbones quaternaires de la génine.

Les différentes expériences de RMN bidimensionnelle utilisées sont les suivants :

1.4.2.3.1 RMN bidimensionnelle Homonucléaire

1.4.2.3.1.1 COSY(CORrélation SpectroscopY)

Ces spectres mettent en évidence le couplage scalaire entre protons géminaux $^2J_{H-H}$ et vicinaux $^3J_{H-H}$ d'un même système de spins, et permettent donc de retrouver l'enchaînement des protons voisins sur le squelette de la molécule. L'analyse de cette expérience permet de connaître les déplacements chimiques des protons osidiques et l'ordre de grandeur des constantes de couplage entre protons (Günther, 1996, Massiot and Lavaud, 1995).

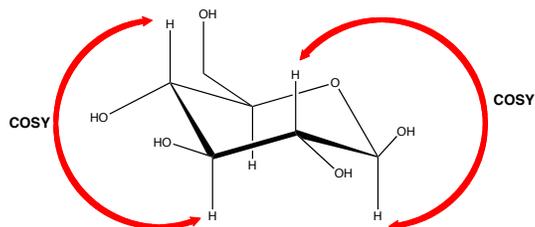


FIGURE 1.2 – Exemples de corrélations COSY dans un glucopyranose

1.4.2.3.1.2 TOCSY(TOTAL CORRELATION SpectroscopY)

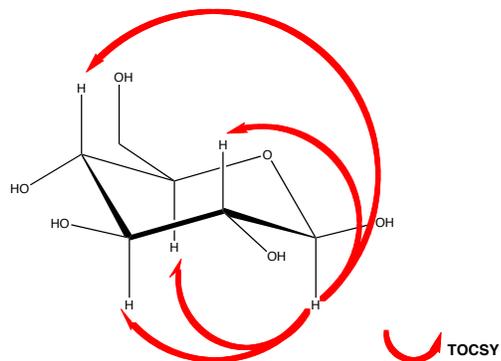


FIGURE 1.3 – Exemples de corrélations TOCSY dans un glucopyranose

Cette expérience dénommée également HOHAHA (Homonuclear HARTmann-HAHn Spectroscopy) permet de relier tous les protons couplés mutuellement dans un même système de spins. Elle se caractérise par le fait que pendant le spinlock ou le temps de mixage, il se produit un transfert de magnétisation (mixage Hartmann-Hahn ou mixage isotrope). Le point important est que ce transfert s'étend des noyaux immédiatement voisins vers des noyaux plus éloignés et gagne finalement la totalité du réseau de noyaux. C'est ainsi que sont également touchés des noyaux qui ne sont pas directement couplés avec le noyau étudié (Günther, 1996). De façon pratique, pour un sucre, il suffit de pouvoir observer une résonance pour identifier les autres protons de cette unité osidique. Cette recherche s'effectue à partir de protons isolés et caractéristiques tels que les protons anomériques ou les méthyles des désoxy-6-hexoses. Le profil de taches de corrélation permet d'attribuer certains protons et donne des informations sur la valeur des constantes de couplage (Agrawal, 1992, Bax and Davis, 1985, Massiot and Lavaud, 1995)

1.4.2.3.1.3 ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy)

Cette expérience est utilisée pour déterminer l'enchaînement des sucres et leurs points de fixation sur la génine. Elle consiste à déterminer la configuration spatiale de certains groupements par la mise en évidence des effets Overhauser entre protons proches dans l'espace. Les corrélations intra sucres permettent de confirmer la structure des unités osidiques (protons axiaux ou équatoriaux) et d'établir leur conformation (Massiot and Lavaud, 1995). Son avantage majeur par rapport l'expérience NOESY est que les effets observés sont toujours positifs et jamais nuls, car indépendants du champ magnétique appliqué. La technique utilisée est proche de celle du TOCSY sauf que l'aimantation transversale est maintenue sur un axe horizontal pendant un temps de mixage et que le transfert de de magnétisation a lieu par couplage dipolaire (Günther, 1996).

1.4.2.3.1.4 NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Cette expérience est très semblable à celle du ROESY. La seule différence est que l'expérience NOESY est utilisée pour les molécules de haut poids moléculaire telles que les protéines. L'expérience NOESY consiste à mesurer les effets Overhauser entre protons dans l'espace. Elle permet d'établir la séquence des sucres dans une chaîne osidique, et de fixer ces chaînes sur les fonctions alcool de la génine (O-hétérosidique) (Günther, 1996).

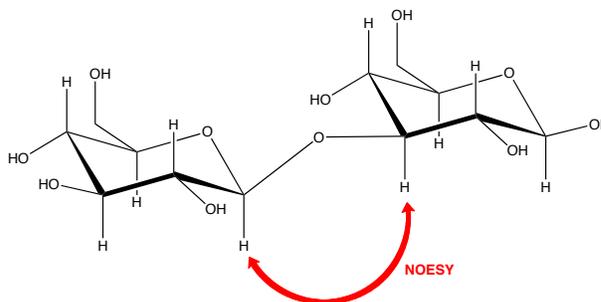


FIGURE 1.4 – Exemples d'une corrélation NOESY entre deux glucopyranoses

1.4.2.3.2 RMN bidimensionnelle Hétéronucléaire

1.4.2.3.2.1 HSQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

Cette expérience met en évidence les couplages directs $^1J_{C-H}$ entre carbones et protons liés (figure 1.5). Elle permet, à partir du spectre proton, d'attribuer la majorité des carbones protonés de la saponine (Massiot and Lavaud, 1995).

1.4.2.3.2.2 HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)

Cette expérience est très importante, car elle permet de détecter les couplages hétéronucléaires à longue distance $^2J_{C-H}$ et $^3J_{C-H}$ à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire

(figure 1.5). Grâce à cette expérience, on peut attribuer pratiquement la totalité des carbones de la génine, ainsi que le séquençage des chaînes osidiques et les points de fixation de ces chaînes sur la génine. L'expérience HMBC est le seul moyen pour déterminer la fixation des chaînes osidiques sur les fonctions acides de la génine, de l'acide glucuronique ou des acides organiques (Massiot and Lavaud, 1995).

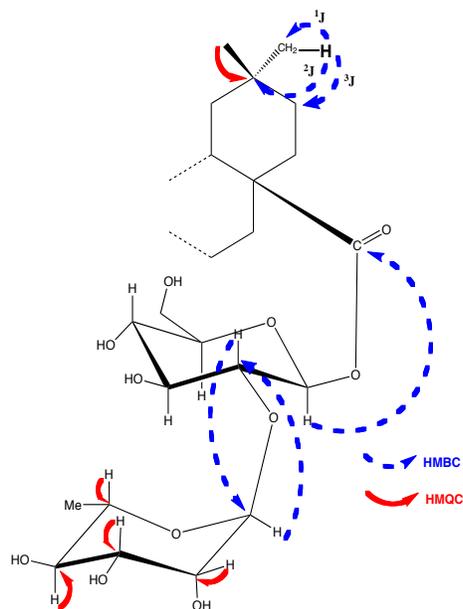


FIGURE 1.5 – Exemples de corrélations HSQC et HMBC

1.4.2.4 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés à des fréquences de 600 MHz (^1H) et 150 MHz (^{13}C) avec un spectromètre de type Varian INOVA 600 équipé d'un système SUN 4 L-X . Les spectres des expériences bidimensionnelles COSY, TOCSY, NOESY, HSQC et HMBC, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionnelles spécifiques fournies par Varian. Les échantillons ont été dissous dans de la pyridine deutérée. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.

1.4.2.4.1 Configuration absolue des sucres

Enfin, la configuration absolue **D** ou **L** des sucres peut être déterminée par la chromatographie en phase gazeuse de dérivés chiraux des sucres issus de l'hydrolysate acide par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux observés pour des dérivés d'échantillons témoins (Hara et al., 1987). Une autre méthode de détermination des configurations absolues des sucres

consiste en la détermination du pouvoir rotatoire de ceux-ci après hydrolyse de molécule et séparation par CCM préparative des sucres. Dans ce cas il faut des quantités importantes de saponines et la manipulation est longue et particulièrement laborieuse. Cependant, généralement la configuration absolue **D** pour le glucose, le xylose, le fucose et le quinovose et la configuration absolue **L** pour le rhamnose et arabinose ont été admises puisqu'il s'agit des sucres les plus fréquemment rencontrés dans la nature. Cette affirmation a pu être vérifiée dans le cas des sucres analysés par CG. L'hydrolyse acide de l'extrait brut afin d'en isoler les sucres et préciser leur configuration absolue par détermination du pouvoir rotatoire est une alternative pratique (Lavaud et al., 1998). Dans ce cas, le problème de quantité ne se pose plus.

1.4.3 Application à l'étude des saponines

L'analyse du spectre de masse, par l'observation de l'ion quasi-moléculaire $[M - H]^-$, apporte une première indication concernant la masse moléculaire de la saponine. L'observation de la fragmentation de la saponine permettra de mettre en évidence la présence d'un hexose (départ d'un fragment 162 uma), d'un 6-désoxyhexose (départ d'un fragment 146 uma) ou encore d'un pentose (départ d'un fragment de 132 uma). Il est possible parfois d'observer l'ion fragment correspondant à l'aglycone.

Les expériences de RMN-2D utilisées dans ce travail sont résumées dans le tableau suivant :

Détermination de la nature de l'aglycone	
COSY, HMBC, HSQC	Analyse des corrélations à partir des méthyles angulaires, corrélations entre protons et autres carbones et corrélations entre protons voisins sur les spectres COSY
Détermination de la nature des sucres et de leur configuration	
COSY, TOCSY, HSQC	-L'analyse de spectre $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY et TOCSY permet d'identifier les sucres à partir des protons anomériques. -L'attribution des déplacements chimiques des carbones à partir des protons déjà identifiés se fait à l'aide des spectres HSQC. -Les constantes de couplage $J_{1,2}$ de 7 à 8 Hz indique que les protons anomériques ont une configuration β , celle de 1 à 3 Hz (constante de couplage faible) mettent en évidence des protons anomériques de configuration α .
NOESY, HMBC	Séquençage des sucres
NOESY, HMBC	Fixation des chaînes oligosaccharides sur l'aglycone

TAB. 1.2 – Informations apportées par les spectres de RMN 2D

INVESTIGATIONS PHYTOCHIMIQUES

Après les travaux phytochimiques antérieurs, l'étude phytochimique des six plantes est détaillée dans les paragraphes suivants. Nous présenterons pour chaque famille de plantes étudiée, les schémas de purification des composés isolés, suivi de leurs descriptions structurales.

2.1 Etude phytochimique de trois plantes du genre *Acanthophyllum*

2.1.1 Extraction et isolement des composés ASa, ASb, ASc, AE 62-66 et AL66-74

Le protocole d'obtention de l'extrait brut ainsi que la purification des différents composés sont détaillés dans la section "**Extraction and isolation**" de la **Publication N°1**. Toutefois nous présentons de façon synthétique ces étapes à travers les figures 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4 suivantes. Nous présenterons le schéma pour l'obtention de 9g d'extraits bruts de *Acanthophyllum sordidum*, mais le protocole est le même pour les deux autres espèces à savoir *A. elatius* et *A. lilacinum*.

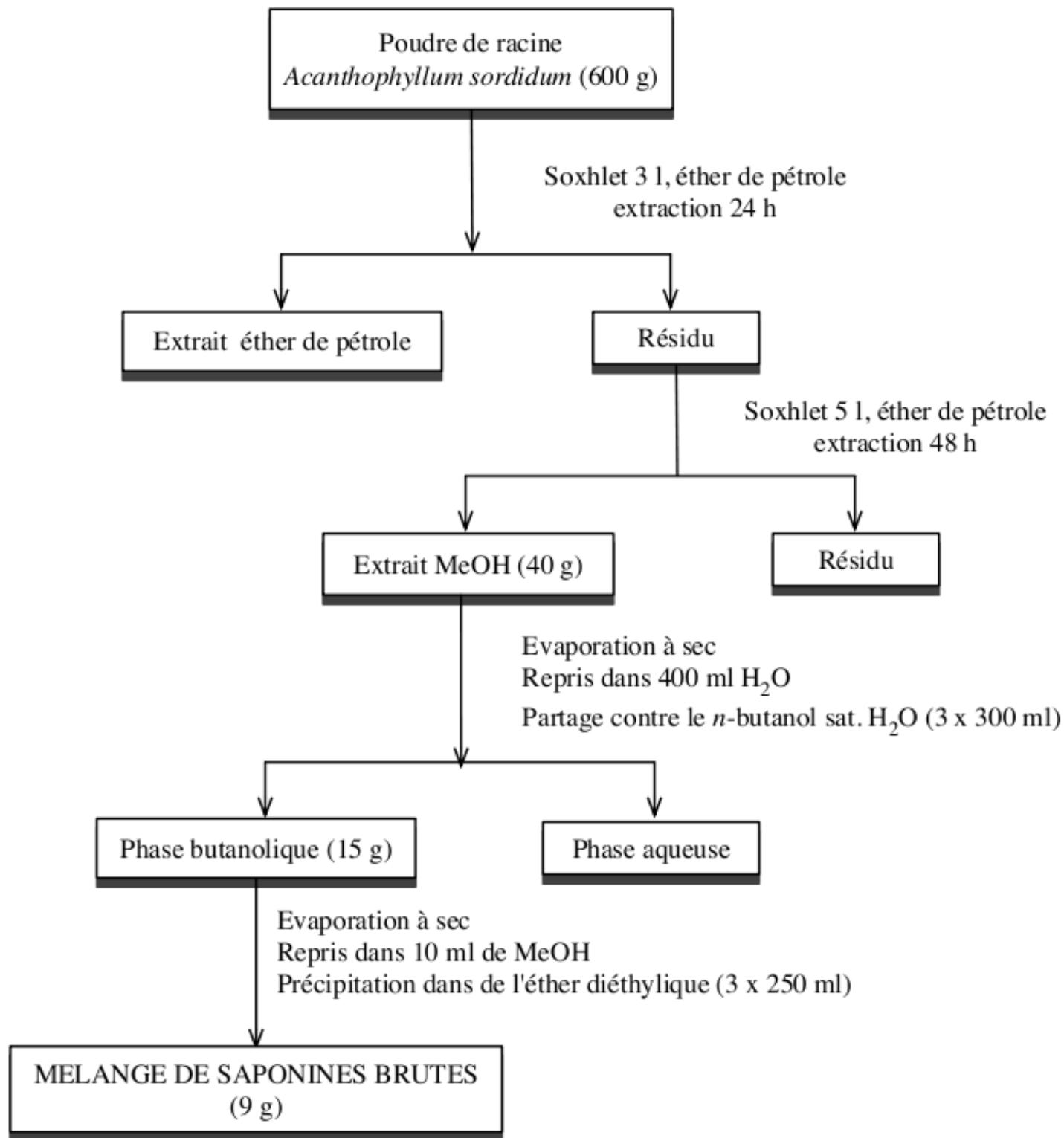


FIGURE 2.1 – Schéma d'extraction des saponines des racines de *Acanthophyllum sordidum*

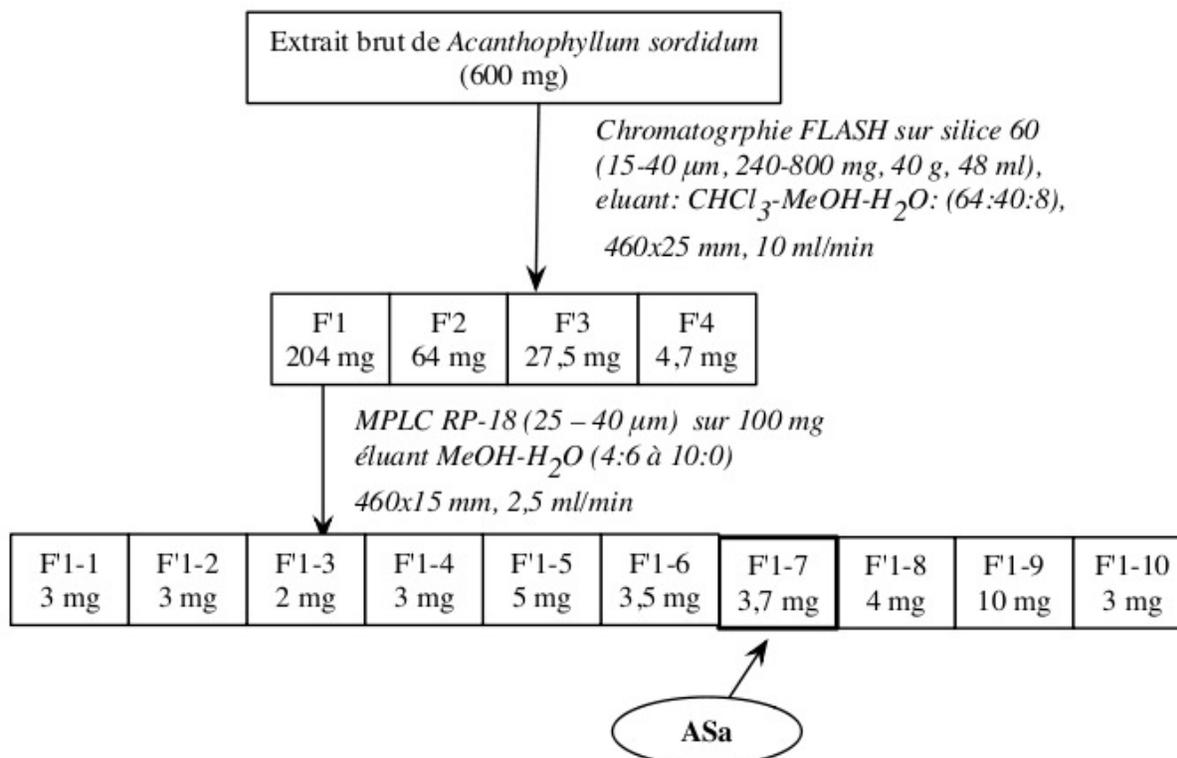


FIGURE 2.2 – Schéma de purification du composé ASa

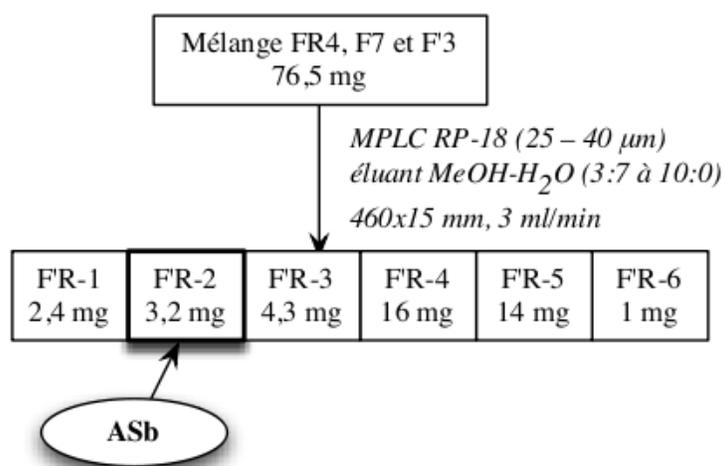


FIGURE 2.3 – Schéma de purification du composé ASb

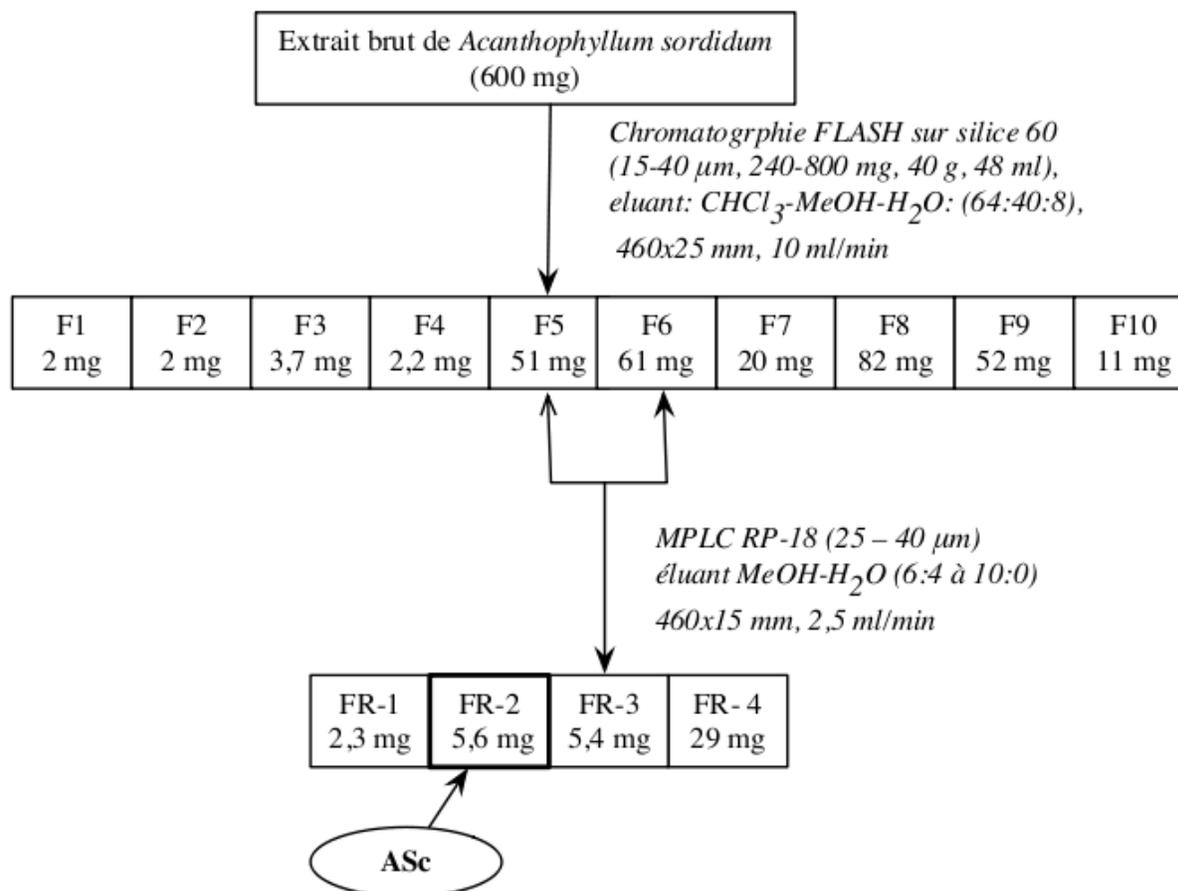


FIGURE 2.4 – Schéma de purification du composé ASc

2.1.2 Détermination structurale des composés purifiés

Les composés ASa, ASb, ASc, AE 62-66 et AL66-74, comme tous les autres composés isolés des autres familles de plantes ont été obtenus sous forme de poudre blanche amorphe. Leur analyse structurale a été réalisée en utilisant la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Dans cette description, nous analyserons dans un premier temps la spectrométrie de masse. Celle-ci nous donne des informations sur les masses moléculaires, et permet d'établir la formule brute de chacune des molécules isolées. Cette première étape sera suivie par l'analyse des spectres RMN. Cette dernière analyse permet tout d'abord de déterminer la nature des aglycones et des sucres, ensuite d'établir les séquences oligosaccharidiques et enfin les liaisons oligosaccharides/aglycone. Les tables de déplacements chimiques des composés nouveaux se trouvent dans la **Publication N°1** tandis que celles des composés connus sont reportées dans les tableaux 2.1, 2.2 et 2.3.

2.1.2.1 Détermination structurale du composé ASa

Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) d'ASa permet d'observer un ion quasi-moléculaire à $m/z = 1641 [M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 1642 unité de masse atomique (uma), en accord avec la formule brute $C_{75} H_{118} O_{39}$. D'autres fragments importants sont observés à $m/z = 1509[(M-H) - 132]^-$, $1363 [(M-H) - 132 - 146]^-$, $1231[(M-H) - 132 - 146 - 132]^-$, $939 [(M-H) - 132 - 146 - 132 - 146]^-$ et $469 [(M-H) - 132 - 146 - 132 - 146 - 146 - 132 - 162 - 176]^-$ correspondant globalement de la perte d'un hexosyle, trois pentoses, trois 6-désoxyhexoses et d'un acide glucuronique.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

L'analyse du spectre de RMN 1H de ASa, nous révèle la présence de :

- 6 singulets entre δ_H 0.80 et 1.50 ppm (0.84, 0.88, 0.95, 1.02, 1.32, 1.48) correspondant à 6 méthyles tertiaires angulaires, permettant de confirmer la présence d'un triterpène.
- 1 proton oléfinique résonnant à δ 5.45 ppm (m) correspond au proton H-12.
- 1 proton aldéhydique résonnant à δ 9.86 (s) correspond au proton H-23.

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

- 5 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH_2), 6 groupements méthyles (CH_3), et par déduction 8 carbones quaternaires (C).
- 2 signaux à δ_C 122.0 et 143.2 ppm correspondent aux carbones de la double liaison $\Delta^{12,13}$.
- 1 signal à δ_C 210.2 correspond à l'aldéhyde.

Tous les protons et les carbones ont été attribués d'après l'analyse des spectres HMBC et HSQC. L'expérience hétéronucléaire H/C HMBC permet par exemple de visualiser les couplages $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ à partir des protons des méthyles de l'aglycone (Me 24, 25, 26, 27, 29 et 30).

L'analyse des spectres RMN 1H , ^{13}C , HSQC et HMBC de **ASa** a permis d'attribuer les signaux de la génine en comparaison avec ceux décrits dans la littérature et d'identifier celle-ci à la gypsogénine (Frechet et al., 1991). Ceci est confirmé par le spectre de masse de ASa (mode FAB négatif) qui présente un ion fragment à m/z 469 correspondant à la gypsogénine.

Le carbone C-28 observé à δ 176.5 ppm est blindé par rapport à l'acide libre (\approx 180 ppm), il est donc engagé dans une liaison ester. Le carbone C-3 déblindé à δ 84.0 ppm par rapport

au signal de la génine libre (≈ 75 ppm) est engagé dans une liaison glycosidique. Il s'agit donc d'une saponine bidesmosidique.

TAB. 2.1 – Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé **ASa** dans la pyridine- d_5

	Aglycone		Sucres					
			3-O-			28-O-		
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	37.4	1.48, nd	GlcA-1	102.7	4.84 ($d, J=7.1$)	Fuc-1	93.8	5.93 ($d, J=8.1$)
2	20.0	1.98, 2.38	2	77.2	4.35	2	73.5	4.59
3	84.0	4.13	3	85.0	4.29	3	75.8	4.30
4	55.0	-	4	72.3	4.57	4	82.8	4.15
5	47.6	1.19	5	75.5	3.66	5	71.0	4.10
6	17.6	1.54, 1.68	6	nd	nd	6	16.3	1.59 ($d, J=5.9$)
7	32.5	0.92, nd	Xyl-1	103.6	5.29 ($d, J=7.3$)	Rha-1	100.5	6.28 (s)
8	39.9	-	2	74.2	3.94	2	70.5	4.10
9	47.3	1.49	3	76.9	4.15	3	71.3	4.77
10	35.8	-	4	69.8	4.16	4	83.9	4.30
11	24.0	1.55, 1.98	5	66.1	3.73, 4.34	5	67.6	4.40
12	122.0	5.45	Gal-1	102.8	5.45 ($d, J=7.6$)	6	17.6	1.71 ($d, J=5.4$)
13	143.2	-	2	75.8	4.32	Xyl II-1	105.5	5.09 ($d, J=8.0$)
14	41.8	-	3	76.9	4.12	2	74.2	3.98
15	28.0	1.94, nd	4	69.7	4.36	3	86.2	4.06
16	22.7	1.90, 2.10	5	76.0	3.96	4	71.0	4.29
17	46.6	-	6	61.2	4.27, 4.44	5	65.8	3.60, 4.22
18	41.2	3.10				Xyl III-1	104.6	5.11($d, J=7.3$)
19	45.9	1.22, 1.74				2	74.0	4.04
20	30.1	-				3	77.0	4.16
21	33.3	nd, nd				4	71.8	4.16
22	31.5	1.60, 1.68				5	66.1	3.71, 4.30
23	210.2	9.86 (s)				Qui-1	105.4	4.99 ($d, J=7.8$)
24	10.2	1.48 (s)				2	75.0	3.96
25	15.1	0.84 (s)				3	74.0	4.12
26	16.5	1.02 (s)				4	75.5	3.96
27	25.0	1.32 (s)				5	72.2	3.72
28	176.5	-				6	17.6	1.55 ($d, J=5.7$)
29	32.5	0.95 (s)						
30	23.1	0.88 (s)						

Déplacement chimique exprimé en ppm (δ), Constante de couplage s'exprime en Hertz (J)

Nature des sucres

Le spectre RMN ^1H montre les signaux de 8 protons anomériques à δ 4.84 (d, $J = 7.1$ Hz), 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.09 (d, $J = 8.0$ Hz), 5.11 (d, $J = 7.3$ Hz), 5.29 (d, $J = 7.3$ Hz), 5.45 (d, $J = 7.6$ Hz), 5.93 (d, $J = 8.1$ Hz), 6.28 (s), qui corrélerent sur le spectre HSQC avec 8 carbones à δ 102.7, 105.4, 105.5, 104.5, 103.6, 102.8, 93.8, 100.5 ppm respectivement. Après l'analyse des spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC, les 8 sucres ont été identifiés comme suit :

- 1 β -glucuronopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 4.84 (d, $J = 7.1$ Hz, GlcA),
- 1 β -galactopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 5.45 (d, $J = 7.6$ Hz, Gal),
- 3 β -xylopyranosyles à partir des protons résonnant à δ 5.29 (d, $J = 7.3$ Hz, Xyl I), 5.09 (d, $J = 8.0$ Hz, Xyl II) et 5.11 (d, $J = 7.3$ Hz, Xyl III),
- 1 β -fucopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 5.93 (d, $J = 8.1$ Hz, Fuc),
- 1 α -rhamnopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 6.28 (s, Rha)
- 1 β -quinovopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz, Qui)

Séquençage osidique en C-3

La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC et NOESY.

On observe :

- La corrélation HMBC entre le proton à δ 4.84 (GlcA-1) et le carbone à δ 84.0 (Agly-3), ce qui suggère que le Glc A est fixé en position 3 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 4.84 et δ_H 4.13 (Agly-3).
- Les corrélations HMBC δ_H 4.35 (Glc A-2)/ δ_C 102.8 (Gal-1) et NOESY δ_H 4.35 (GlcA-2)/ δ_H 5.45 (Gal-1), prouvent que le galactose est lié à l'acide glucuronique par une liaison (1 \rightarrow 2).
- Enfin les corrélations HMBC δ_H 5.29 (Xyl I-1) et δ_C 85.0 (Glc A-3) et NOESY δ_H 5.29 (Xyl I-1)/ δ_H 4.29 (GlcA-3) montrent que le xylose I est lié à l'acide glucuronique par une liaison (1 \rightarrow 3).

La séquence du trisaccharide en C-3 est donc la suivante : β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-((1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl.

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des trois sucres liés en position 3 de la gypsogénine, il reste le séquençage du pentasaccharide en position C-28.

- Le carbone déblindé à δ_C 93.8 (Fuc-1) montre que le fucose est fixé au carboxyle de l'aglycone par une liaison ester.
- les corrélations NOESY δ_H 6.28 (s, Rha-1)/ δ_H 4.59 (Fuc-2), HMBC δ_H 4.99 (Qui-1)/ δ_C 82.8 (Fuc-4) et NOESY δ_H 4.99 (Qui-1)/ δ_H 4.15 (Fuc-4), montrent que le rhamnose et le quinovose sont liés au fucose par des liaisons (1→2) et (1→4) respectivement.
- Les corrélations HMBC entre le proton à δ 5.09 (Xyl II-1) et carbone à δ 83.9 ppm (Rha-4) et NOESY entre les protons à δ 5.09 (Xyl II-1) et à δ 4.30 (Rha-4), montrent que le xylose II est lié au rhamnose par une liaison (1→4).
- Les corrélations HMBC entre le proton à δ 5.11 (Xyl III-1) et le carbone à δ 86.2 (Xyl II-3) et NOESY entre les protons à δ 5.11 (Xyl III-1) et à δ 4.06 (Xyl II-3), montrent enfin que le xylose III est lié au xylose II par une liaison (1→3).

La séquence du pentasaccharide en C-28 est donc : β -D-xylopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-quinovopyranosyl-(1→4)]- β -D-fucopyranosyl.

Conclusion

La structure de **ASa** est donc établie comme étant le **3-O- β -D-galactopyranosyl-(1→2)-[β -D-xylopyranosyl-((1→3)]- β -D-glucuronopyranosyl-gypsogénine-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-quinovopyranosyl-(1→4)]- β -D-fucopyranoside**, un composé déjà isolé de la saponine commerciale **Merck** sous le nom de **SAPO50** (Delay et al., 1997).

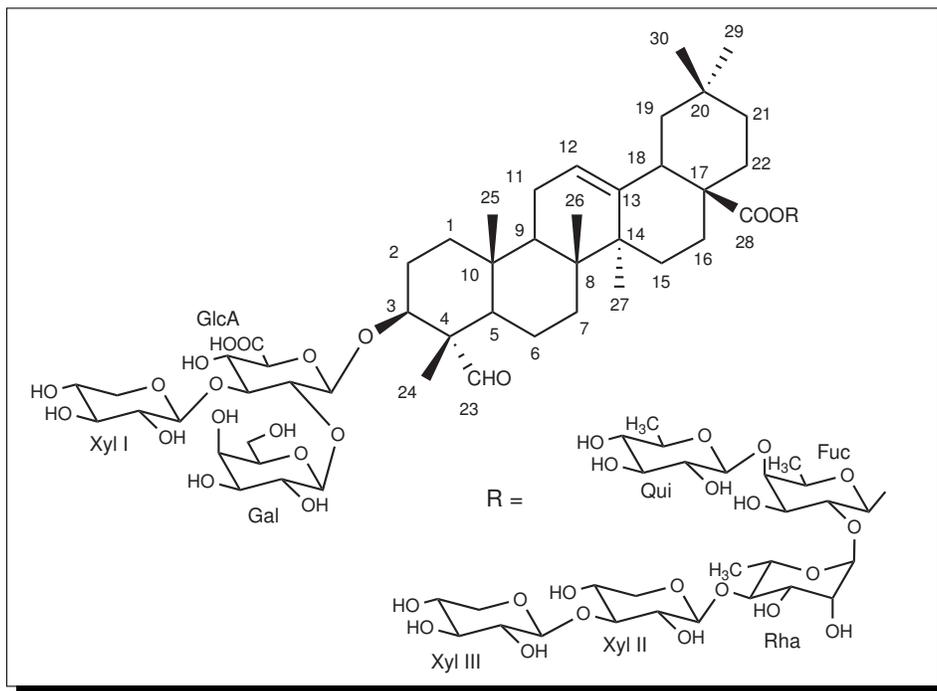


FIGURE 2.5 – Structure du composé **ASa**

2.1.2.2 Détermination structurale du composé **ASb**

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1133 [M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire égale à 1134 uma, suggérant une formule brute $C_{54} H_{86} O_{25}$. En plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons la présence d'autres fragments importants à $m/z = 971[(M-H) - 162]^-$, 809 $[(M-H) - 162 - 162]^-$, 647 $[(M-H) - 162 - 162 - 162]^-$ et 485 $[(M-H) - 162 - 162 - 162 - 162]^-$, caractéristiques de la perte successive de quatre unités hexosyles. Le fragment à m/z 485 correspond à l'aglycone.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

Nous retrouvons sur les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé **ASb** la quasi totalité des signaux de l'aglycone du composé **ASa**. Deux différences majeures sont à noter :

- Le carbone C-3 blindé à δ 74.8, montre que cette position est libre.
- Le carbone C-23 observé à δ 177.8 ppm, ce qui correspond à un groupement carboxyle.

La génine est donc identifiée comme étant l'acide gypsogénique ((Gaidi et al., 2005, Haddad et al., 2004, Koike et al., 1999, Zheng et al., 2007)). Les carboxyles C-23 et C-28 respectivement à δ 177.8 et à 176.2 ppm sont blindés indiquant que ces deux fonctions sont engagées dans des liaisons glycosyl esters.

Nature des sucres

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 4 protons anomériques résonnant à δ 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz), 6.07 (d, $J = 8.3$ Hz), 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz) et 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 4 carbones anomériques à δ 95.8, 94.5, 104.7, 104.5 respectivement.

A partir des protons anomériques, la nature des quatre systèmes de spins a été déterminée grâce au spectre COSY et confirmée par le spectre TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser les sucres suivants :

- Deux β -galactopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 6.07 (d, $J = 8.3$ Hz, Gal-I) et δ 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz, Gal-II) respectivement,
- Deux β -glucopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc-I) et δ 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc-II) respectivement.

Séquençage osidique en C-23

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique à δ 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz, Gal-II-1) et le carbone C-23 à δ 177.8 indique que le β -galactopyranose est lié à la fonction carboxyle en C-23 de l'aglycone par une liaison ester.

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des signaux correspondant au β -galactopyranose II en position 23 de l'aglycone, les déplacements chimiques et la séquence de l'oligosaccharide en position 28 de l'aglycone ont été déterminés par l'analyse des corrélations observées sur les spectres NOESY, HSQC et HMBC.

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre δ_H 6.07 (d, $J = 8.3$ Hz, Gal-I-1) et le carbone C-28 à δ 176.2 indique que le β -galactopyranose I est lié à la fonction carboxyle en C-28 de l'aglycone par une liaison ester.

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre δ_H 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc-I-1) et le

carbone C-3 à δ 87.0 (Gal-I-3), indique que le Glc-I est lié en C-3 du Gal-I, ce qui est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc-I-1) et δ_H 4.23 (dd, $J = 8.1, 3.1$ Hz, Gal-I-3).

Une corrélation NOESY entre δ_H 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc-II-1) et δ_H 4.19 (Gal-I-6) ainsi que le déblindage observé au niveau de la position C-6 du Gal-I à δ_C 68.9/ δ_H 4.19, 4.53 (dd, $J = 11.2, 4.0$ Hz), indique que le Glc-II est lié au Gal I par une liaison (1→6).

Conclusion

L'ensemble des données précédentes nous permet ainsi d'établir la structure de **ASb** comme étant le **23-O- β -D-galactopyranosyl acide gypsogénique 28-O- β -D-glucoopyranosyl-(1→3)-[β -D-glucoopyranosyl-(1→6)]- β -D-galactopyranoside (Publication 1).**

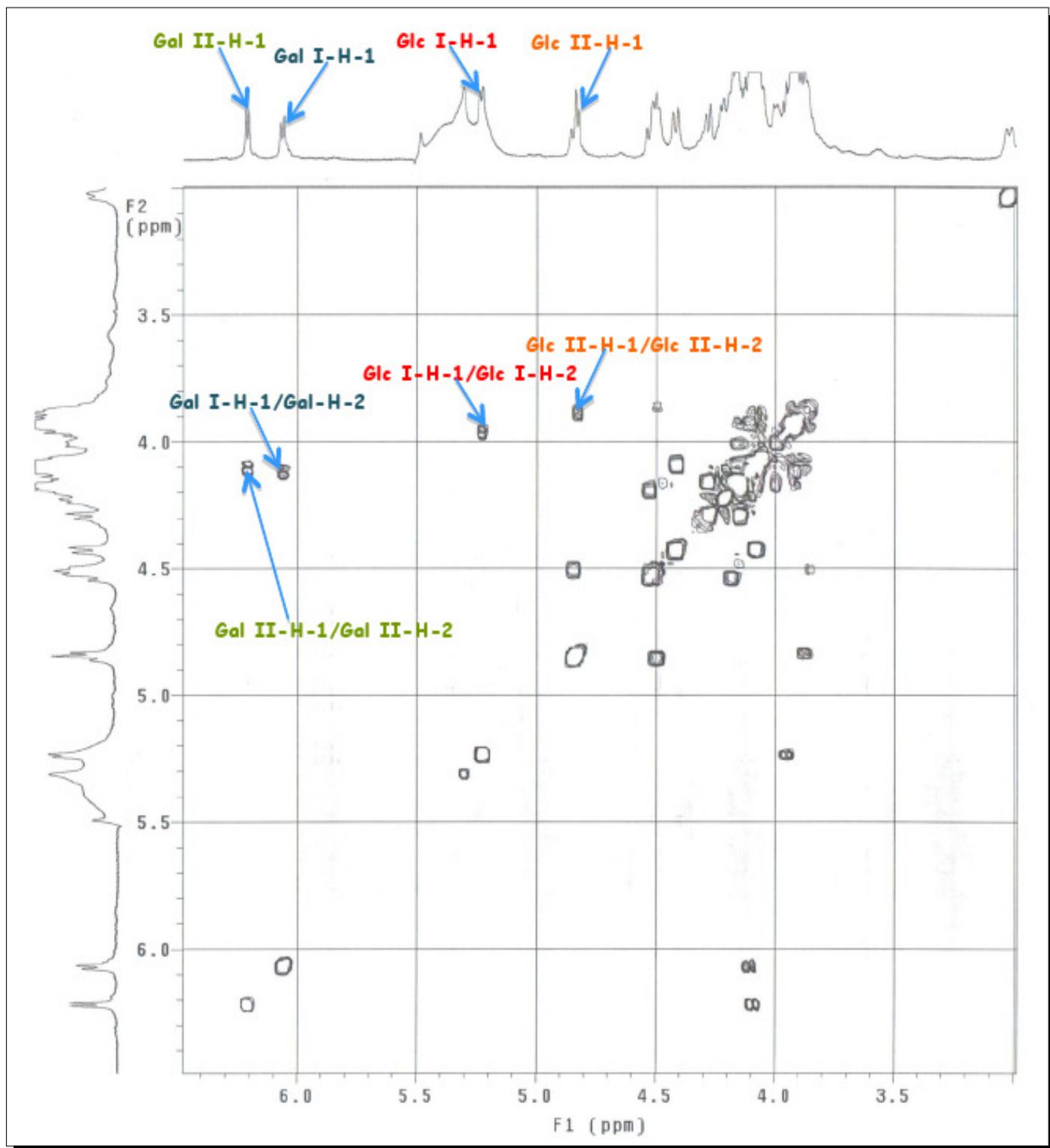


FIGURE 2.6 – Spectre COSY de la partie osidique de la saponine ASb

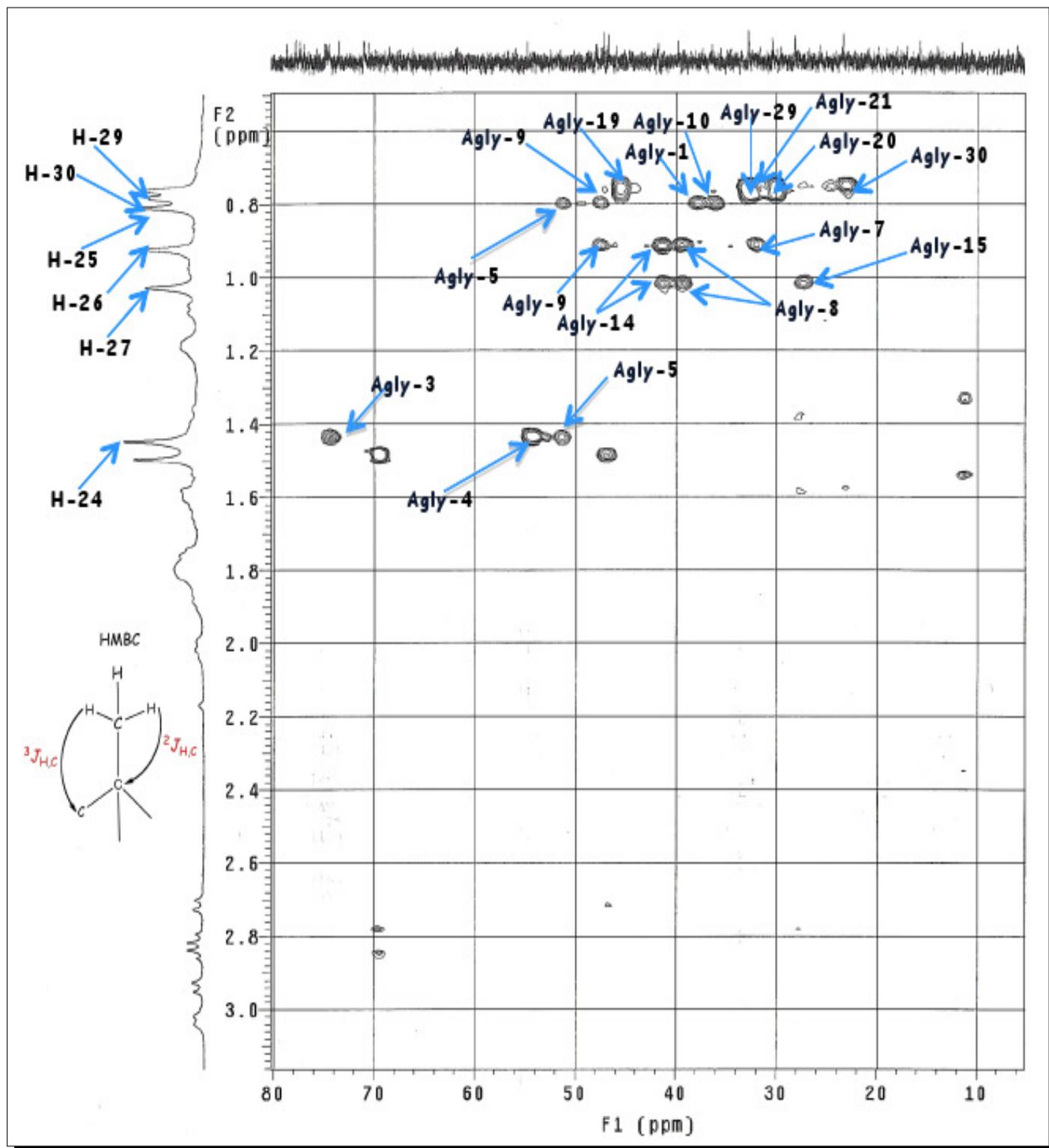


FIGURE 2.7 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASb

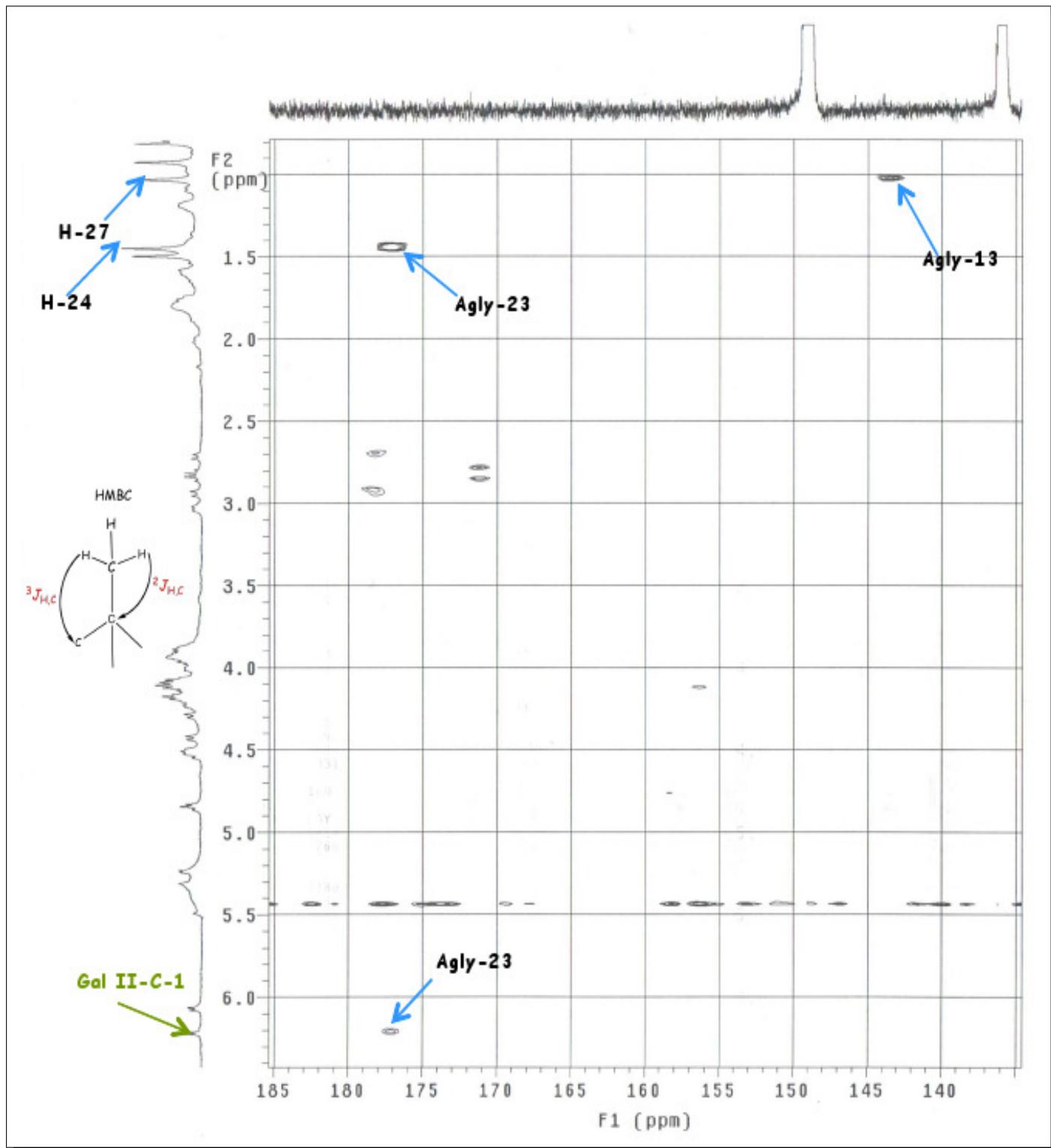


FIGURE 2.8 – Spectre **HMBC** de la partie 2 aglycone de la saponine **ASb**

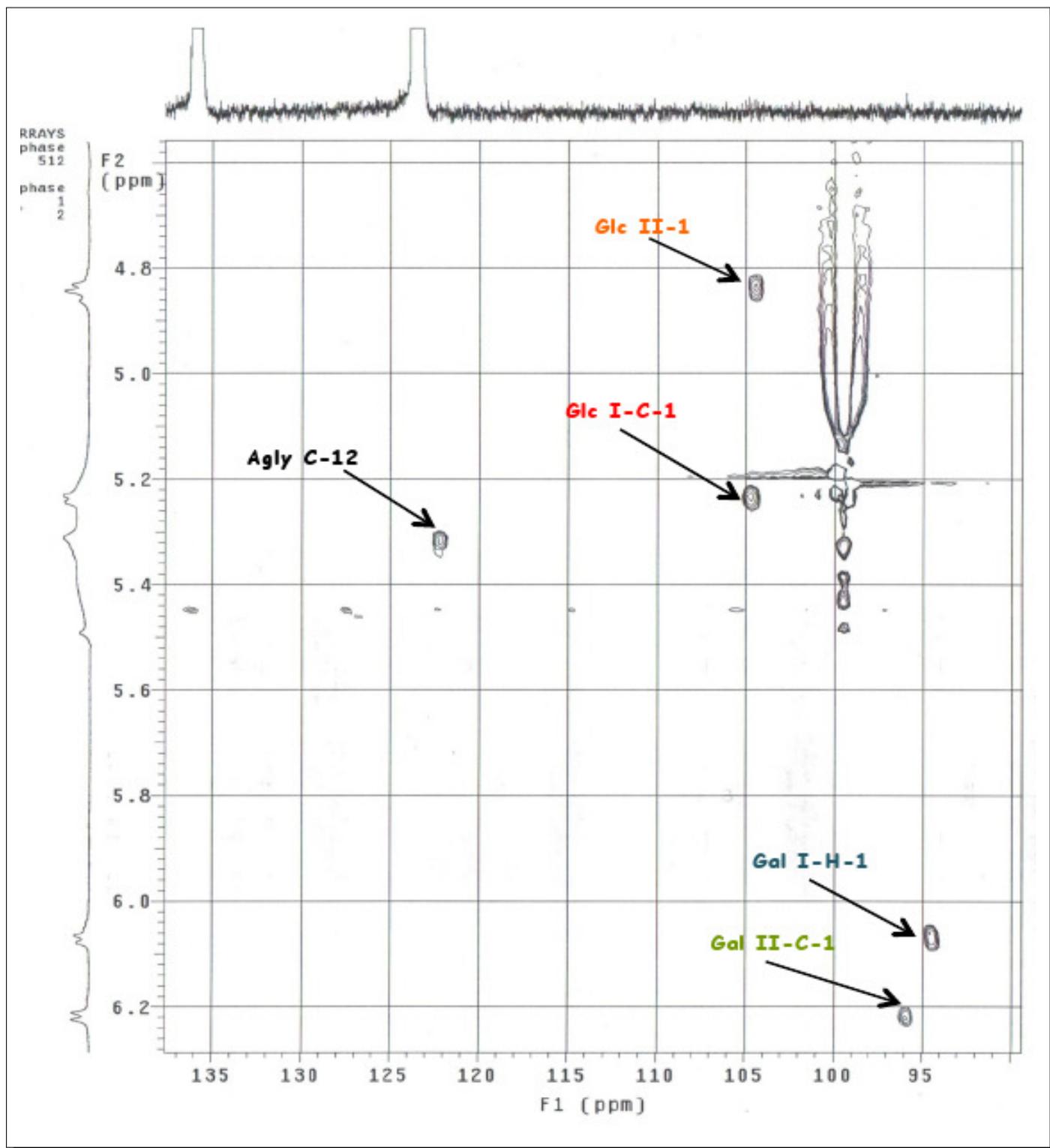


FIGURE 2.9 – Spectre **HSQC** de la partie osidique (anomères) de la saponine **ASb**

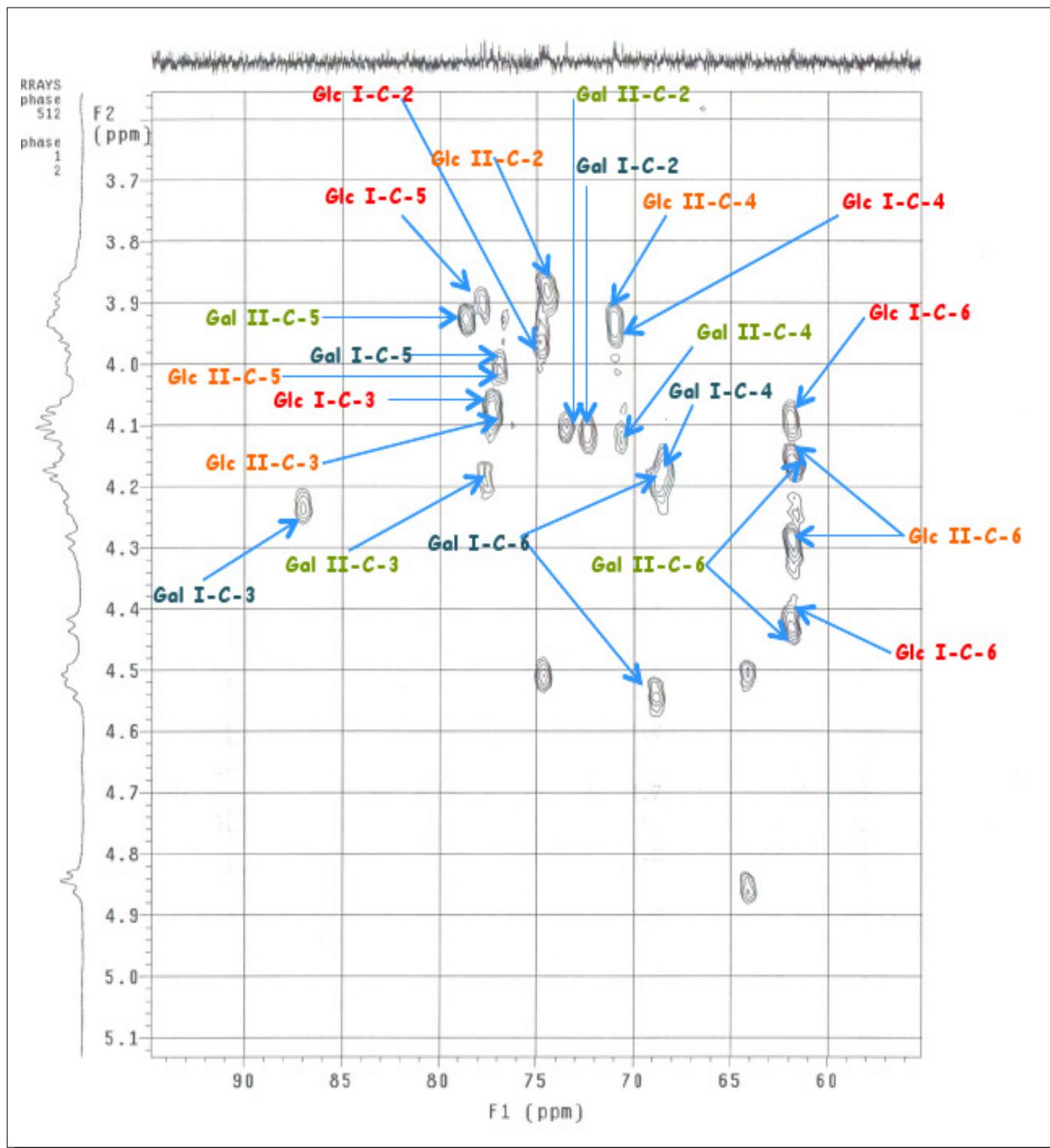


FIGURE 2.10 – Spectre **HSQC** de la partie osidique de la saponine **ASb**

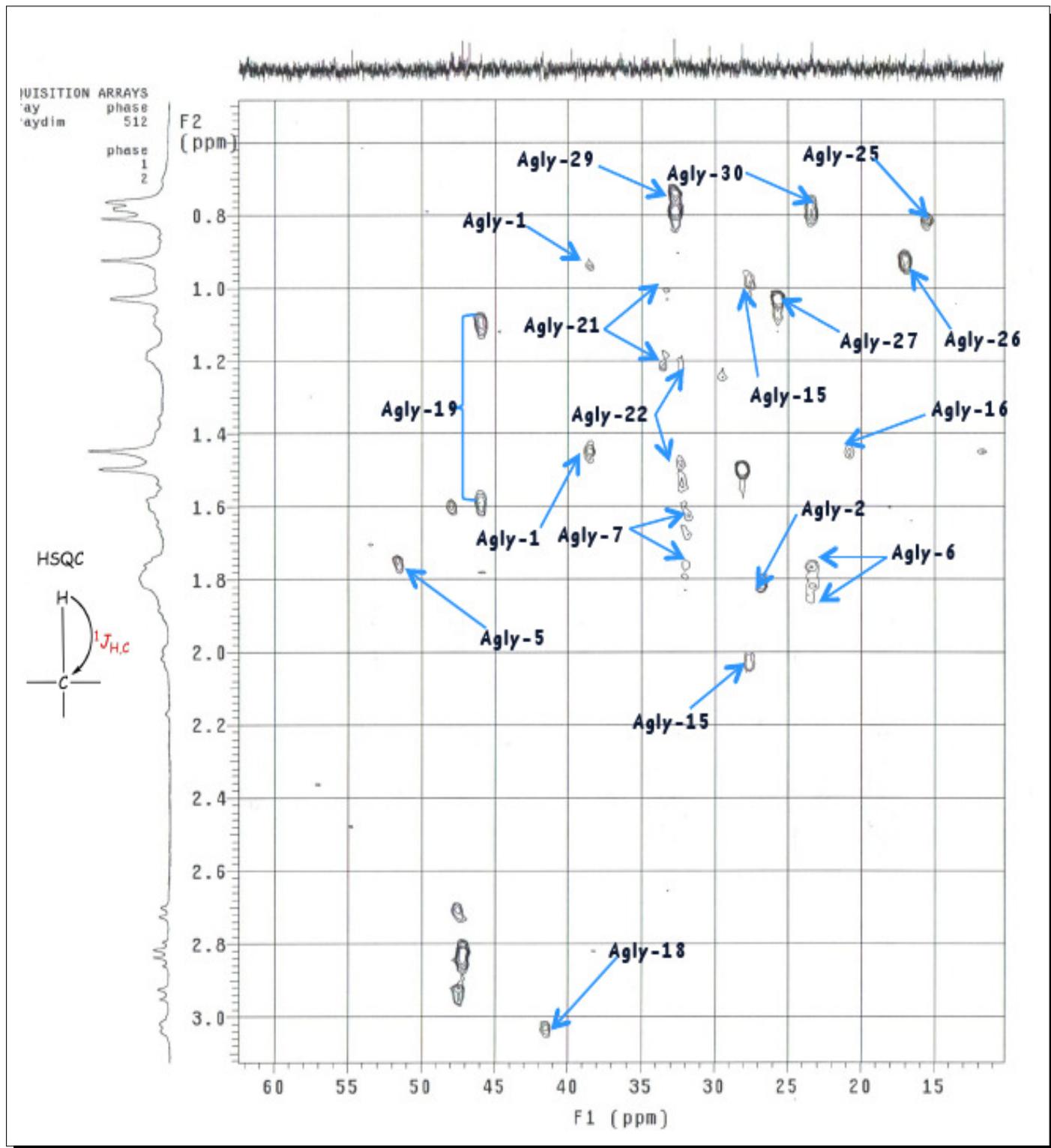


FIGURE 2.11 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASb

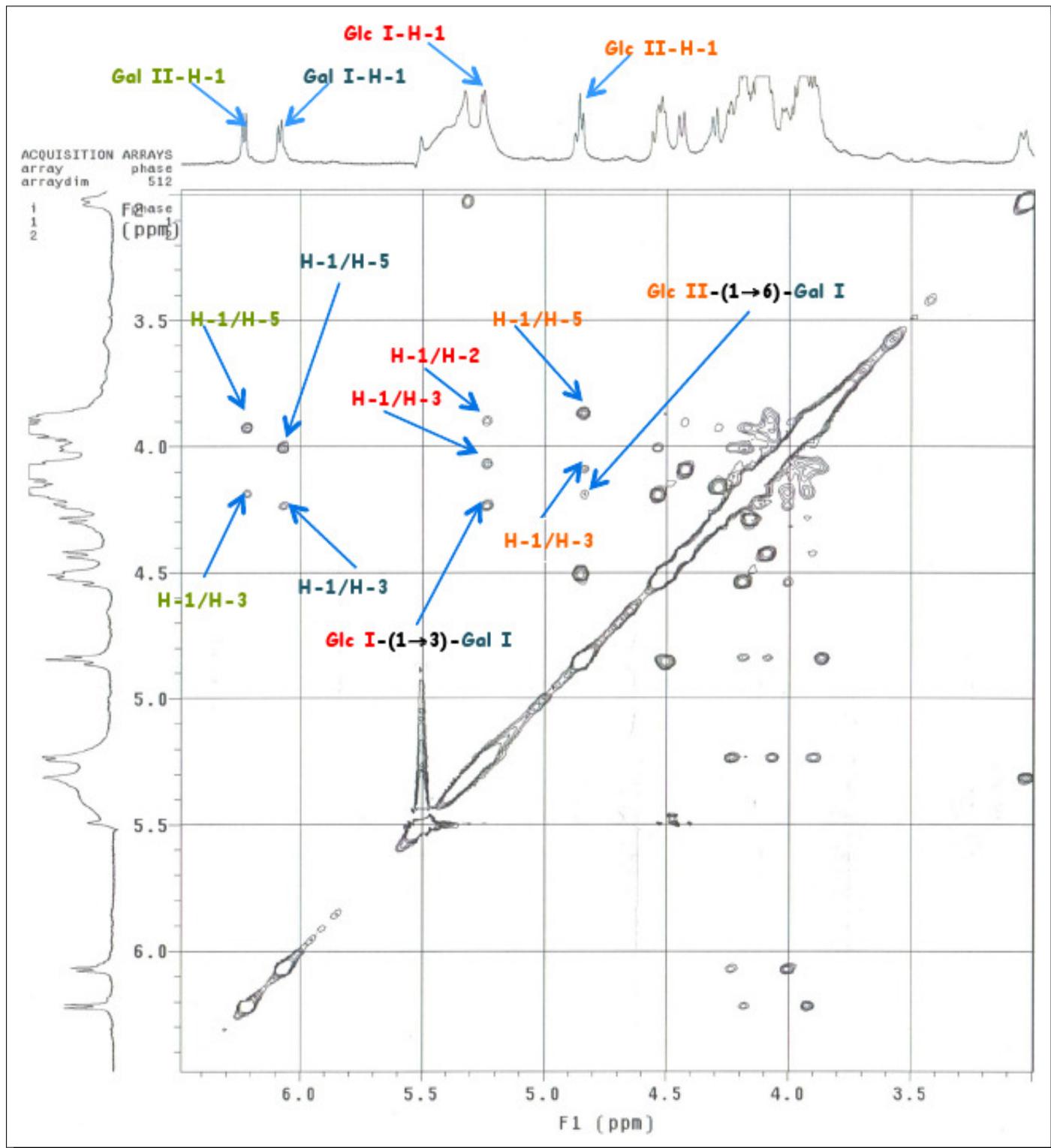


FIGURE 2.12 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASb

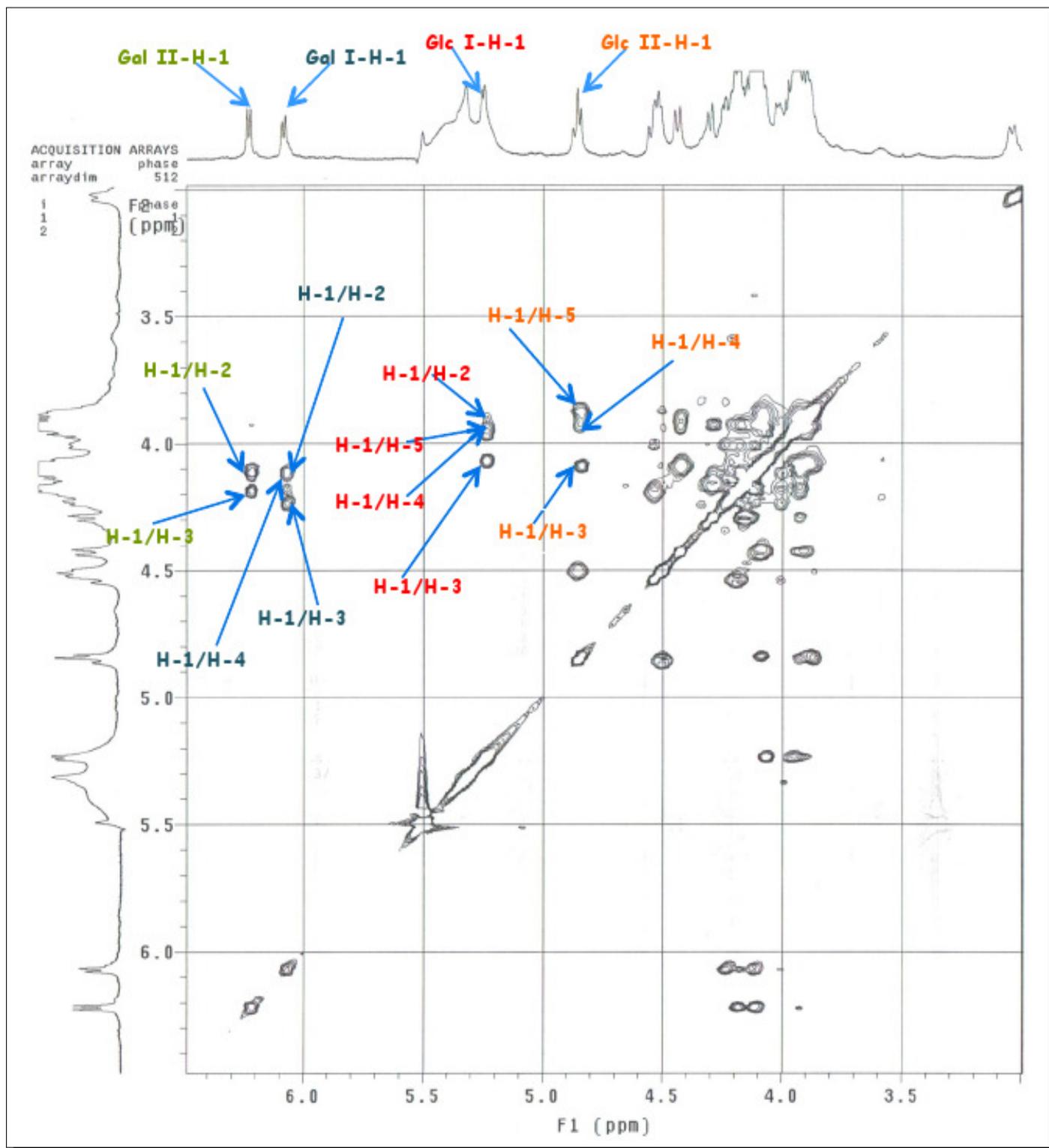


FIGURE 2.13 – Spectre TOCSY de la partie osidique de la saponine ASb

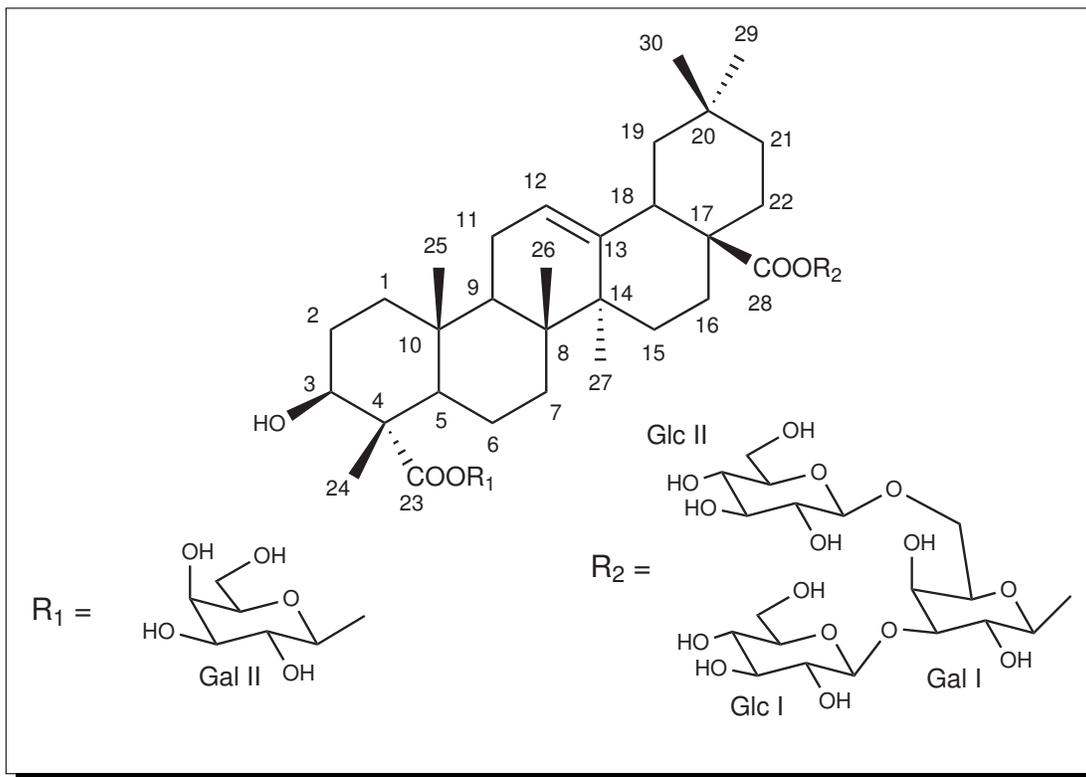


FIGURE 2.14 – Structure du composé **Asb**

2.1.2.3 Détermination structurale du composé **AE 62-66**

Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) de **AE 62-66** permet d'observer un ion quasi-moléculaire à $m/z = 971$ $[M-H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 972 uma, en accord avec la formule $C_{48}H_{76}O_{20}$. Cette masse moléculaire de 972 uma, en comparaison avec celle du composé **ASb** qui est de 1134 uma, correspond à une différence de masse de 162 uma, suggérant la perte d'un fragment hexosyle.

Spectroscopie RMN

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 3 protons anomériques résonnant à δ 6.01 (*d*, $J = 8.3$ Hz), 5.18 (*d*, $J = 7.1$ Hz) et 4.78 (*d*, $J = 7.6$ Hz) qui donnent des corrélations sur le spectre HSQC avec 3 carbones anomériques à δ 94.3, 104.1 et 103.9 respectivement. L'analyse des spectres COSY 1H - 1H et NOESY, conjointement avec les spectres HSQC et HMBC de **AE 62-66** permettent de caractériser 3 sucres :

- Un β -galactopyranose dont le proton anomère résonne à δ 6.01 (d, $J = 8.3$ Hz, Gal).
- Deux β -glucopyranoses dont les protons anomères résonnent à δ 5.18 (d, $J = 7.1$, Hz, Glc-I) et 4.78 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc-II) respectivement.

La comparaison des spectres de RMN 1D et 2D de **AE 62-66** avec ceux de **ASb** montre que ces deux composés possèdent des structures voisines à l'exception de la substitution du carboxyle en C-23 : son déplacement chimique à δ 183.8 ppm est déblindé comparé à celui du composé **ASb** qui est à 177.8, ce qui suggère que cette position de l'aglycone est libre. Ce résultat est confirmé par la différence de 162 uma observée dans le spectre de masse.

Conclusion

L'ensemble de ces données nous permet ainsi d'établir la structure de **AE 62-66** comme étant l'acide gypsogénique 28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside (**Publication 1**).

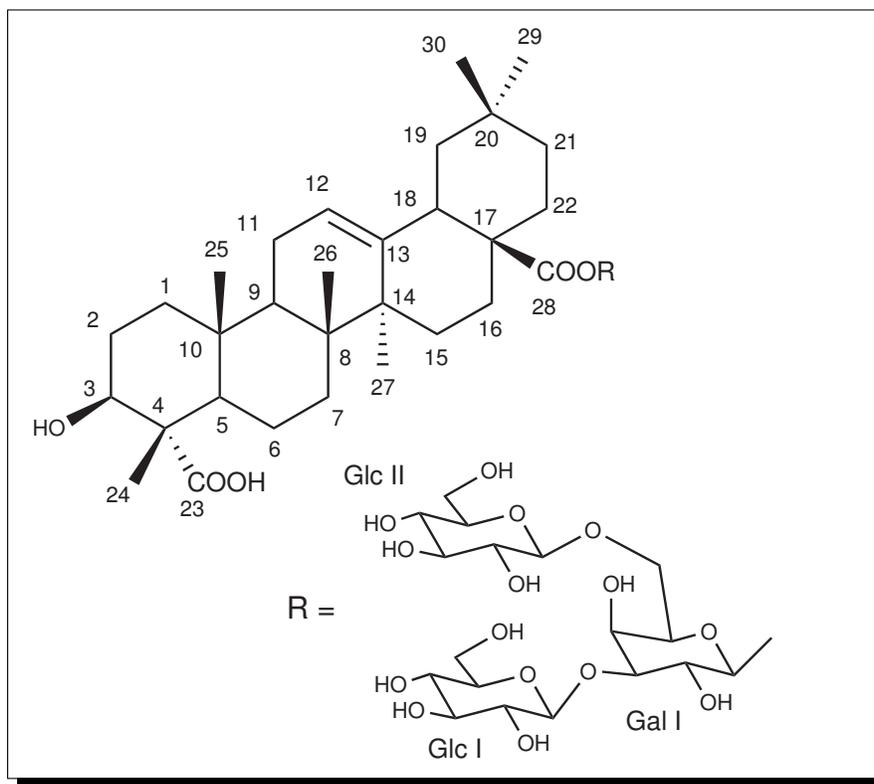


FIGURE 2.15 – Structure du composé **AE 62-66**

2.1.2.4 Détermination structurale du composé AL66-74

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, un pic d'ion pseudo-moléculaire est observé à $m/z = 1537 [M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 1538 uma et une formule brute $C_{72} H_{114} O_{35}$.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

L'aglycone a été identifié comme étant la gypsogénine car les signaux observés sont entièrement identiques à ceux du composé **ASa**.

Nature des sucres

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 7 protons anomériques résonnant à δ 6.25 (s), 5.91(d, $J = 7.8$ Hz), 5.34 (d, $J = 6.1$ Hz), 5.22 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.01 (d, $J = 7.1$ Hz), 4.95 (d, $J = 5.2$ Hz), 4.64 (d, $J = 7.1$ Hz) qui donnent des corrélations dans le spectre HSQC avec sept carbones anomériques à δ 100.9, 94.1, 103.6, 104.8, 105.0, 106.2 et 103.1 respectivement. Le proton résonnant à δ 1.98 (s) traduit la présence d'un groupement acétyle. A partir des protons anomériques, l'interprétation des différents spectres COSY, TOCSY, HSQC et HMBC a permis d'identifier la nature des sucres :

- 1 β -glucuronopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 4.64 (d, $J = 7.1$ Hz, GlcA)
- 1 β -galactopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 5.34 (d, $J = 6.1$ Hz, Gal)
- 3 β -xylopyranosyles à partir des protons résonnant à δ 5.22 (d, $J = 7.8$ Hz, Xyl I), 4.95 (d, $J = 5.2$ Hz, Xyl II) et 5.01 (d, $J = 7.1$ Hz, Xyl III),
- 1 β -fucopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 5.91 (d, $J = 7.8$ Hz, Fuc),
- 1 α -rhamnopyranosyle à partir du proton résonnant à δ 6.24 (s, Rha)

Séquençage osidique en C-3

On observe comme dans la molécule **ASa**, tous les signaux correspondant à la prosapogénine β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-((1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl- gypsogénine qui constitue un marqueur chimiotaxonomique chez les Caryophyllaceae.

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des signaux du trisaccharide fixé en C-3 de l'aglycone, il reste la séquence du tétrasaccharide en C-28 à déterminer.

- Le proton H-3 du fucose déblindé à δ 5.50 ppm traduit une acylation de cette position.
- La corrélation HMBC entre δ_H 5.01 (Xyl III-1) et δ_C 86.6 (Xyl II-3) montre que le xylose III est lié au xylose II par une liaison (1→3), ceci est confirmé par le NOESY entre δ_H 5.01 (Xyl III-1) et δ_H 3.89 (Xyl II-3).
- La corrélation HMBC entre δ_H 4.20 (Rha-4) et δ_C 106.2 (Xyl-II-1) prouve que le xylose II est lié au rhamnose par une liaison (1→4), confirmé par le NOESY entre δ_H 4.95 (Xyl II-1) et δ_H 4.20 (Rha-4)
- La corrélation NOESY entre δ_H 6.24 (Rha-1) et δ_H 4.51 (Fuc-2) montre que le rhamnose est lié au fucose par une liaison (1→2).

Conclusion

La structure de **AL66-74** est donc établie comme étant le **3-O- β -D-galactopyranosyl-(1→2)-[β -D-xylopyranosyl-((1→3)]- β -D-glucuronopyranosyl-gypsogénine-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-3-O-acétyl- β -D-fucopyranoside**, un composé naturel isolé auparavant de *Acanthophyllum glandulosum* sous le nom de **glanduloside B** (Gaidi et al., 2004).

TAB. 2.2 – Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé **AL 66-74** dans la pyridine- d_5

	Aglycone		Sucres					
			3-O-			28-O-		
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	37.8	0.78, 1.31	GlcA-1	103.1	4.64 (d, $J=7.1$)	Fuc-1	94.1	5.91 (d, $J=7.8$)
2	24.9	1.83, 2.23	2	77.8	4.21	2	73.6	4.49
3	84.5	3.95	3	85.4	4.13	3	74.2	5.50
4	55.4	-	4	71.4	4.14	4	73.0	4.27
5	47.6	1.60	5	77.4	3.98	5	69.8	4.10
6	20.4	1.08, 1.33	6	nd	nd	6	15.7	1.13 (d, $J=5.9$)
7	32.0	1.47, 1.60	Xyl-1	104.8	5.22 (d, $J=7.8$)	COOCH ₃	20.1	2.02 (s)
8	39.9	-	2	74.4	3.86	COOCH ₃	170.5	-
9	47.8	1.60	3	76.3	4.14	Rha-1	100.9	6.25 (s)
10	35.9	-	4	70.3	4.03	2	71.0	4.67
11	23.7	0.83, 1.84	5	66.3	3.55, 4.34	3	71.9	4.51
12	122.1	5.34	Gal-1	103.6	5.34 (d, $J=6.1$)	4	84.3	4.20
13	143.1	-	2	72.4	4.28	5	67.9	4.32
14	41.4	-	3	76.9	4.12	6	17.6	1.67 (d, $J=5.9$)
15	27.8	1.83; nd	4	69.8	4.34	Xyl II-1	106.2	4.95 (d, $J=5.2$)
16	23.5	0.79, 1.80	5	76.0	3.84	2	74.6	3.95
17	47.7	-	6	61.4	4.27, 4.34	3	86.6	3.89
18	41.8	3.02				4	68.3	3.96
19	46.1	1.12, 1.68				5	66.6	3.42, 4.11
20	30.2	-				Xyl III-1	105.0	5.01 (d, $J=7.1$)
21	33.7	1.08, 1.23				2	74.6	3.96
22	32.3	1.56, 1.76				3	77.5	4.03
23	210.0	nd				4	71.4	4.06
24	11.0	1.36 (s)				5	66.6	3.56, 4.17
25	15.9	0.70 (s)						
26	17.5	0.92 (s)						
27	25.9	1.18 (s)						
28	177.0	-						
29	33.0	0.78 (s)						
30	23.7	0.80 (s)						

Déplacement chimique exprimé en ppm (δ), Constante de couplage s'exprime en Hertz (J)

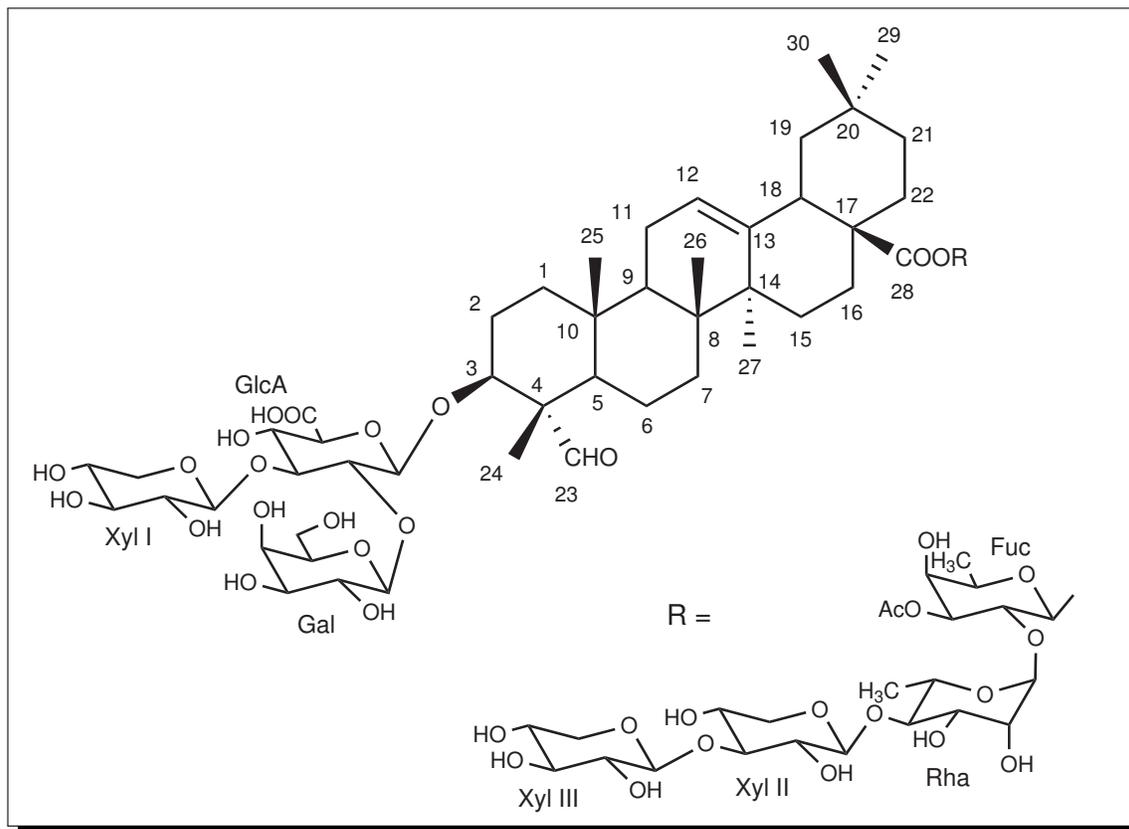


FIGURE 2.16 – Structure du composé **AL 66-74**

2.1.2.5 Détermination structurale du composé **ASc**

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1579 [M-H]^-$ est observé, correspondant à une masse moléculaire de 1580 uma, suggérant une formule brute de $C_{73}H_{112}O_{37}$. Cette molécule possède donc 42 uma de plus par rapport à la molécule **AL66-74**, ce qui correspond à un groupement acétyle supplémentaire.

Spectroscopie RMN

La quasi totalité des signaux du composé **AL66-74** est retrouvée sur les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé **ASc**. La seule différence concerne le proton H-4 du fucose, déblindé à δ 5.52 ppm, traduisant une acétylation de cette position.

TAB. 2.3 – Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé **A**Sc dans la pyridine- d_5

	Aglycone		Sucres					
			3-O-			28-O-		
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	37.8	0.80, 1.30	GlcA-1	102.8	4.65 (d, $J=7.1$)	Fuc-1	93.5	6.01 (d, $J=8.0$)
2	24.9	1.82, 2.20	2	77.4	4.20	2	71.8	4.48
3	84.4	3.92	3	85.2	4.12	3	74.2	5.50
4	55.2	-	4	71.4	4.14	4	71.2	5.52
5	47.6	1.58	5	77.4	3.98	5	69.8	4.10
6	20.1	0.98, 1.32	6	nd	nd	6	15.7	1.13 (d, $J=5.9$)
7	32.0	1.45, 1.50	Xyl I-1	103.9	5.20 (d, $J=7.6$)	COOCH ₃	20.1	2.02 (s)
8	40.0	-	2	74.4	3.86	COOCH ₃	170.5	-
9	47.6	1.61	3	76.3	4.14	COOCH ₃	20.3	2.07 (s)
10	35.8	-	4	70.3	4.03	COOCH ₃	170.2	-
11	23.4	0.81, 1.79	5	66.3	3.55, 4.16	Rha-1	101.2	5.61 (d, $J=5.0$)
12	122.3	5.36	Gal-1	103.2	5.35 (d, $J=7.6$)	2	70.5	4.47
13	143.2	-	2	72.4	4.28	3	71.6	4.34
14	41.4	-	3	76.9	4.12	4	83.4	4.20
15	27.8	1.32, 1.86	4	69.8	4.34	5	68.4	4.21
16	23.5	0.79, 1.79	5	76.0	3.84	6	18.2	1.64 (d, $J=5.4$)
17	47.7	-	6	61.4	4.27, 4.34	Xyl II-1	106.2	4.94 (d, $J=7.6$)
18	41.6	3.00				2	74.4	3.88
19	45.9	1.15, 1.66				3	83.8	3.98
20	30.2	-				4	68.4	3.96
21	33.6	1.03, 1.21				5	66.2	3.42, 4.12
22	32.0	1.45, 1.51				Xyl III-1	104.8	5.03 (d, $J=7.6$)
23	210.3	nd				2	74.4	3.96
24	10.8	1.37 (s)				3	77.3	4.04
25	15.4	0.72 (s)				4	70.0	4.07
26	17.0	0.92 (s)				5	66.3	3.57, 4.23
27	25.7	1.18 (s)						
28	176.0	-						
29	32.8	0.78 (s)						
30	23.4	0.82 (s)						

Déplacement chimique exprimé en ppm (δ), Constante de couplage s'exprime en Hertz (J)

Conclusion

La structure de **ASc** est donc établie comme étant le **3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-((1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl-gypsogénine-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-O-acétyl- β -D-fucopyranoside**, Il s'agit du **glanduloside C** également isolé de *Acanthophyllum glandulosum* (Gaidi et al., 2004).

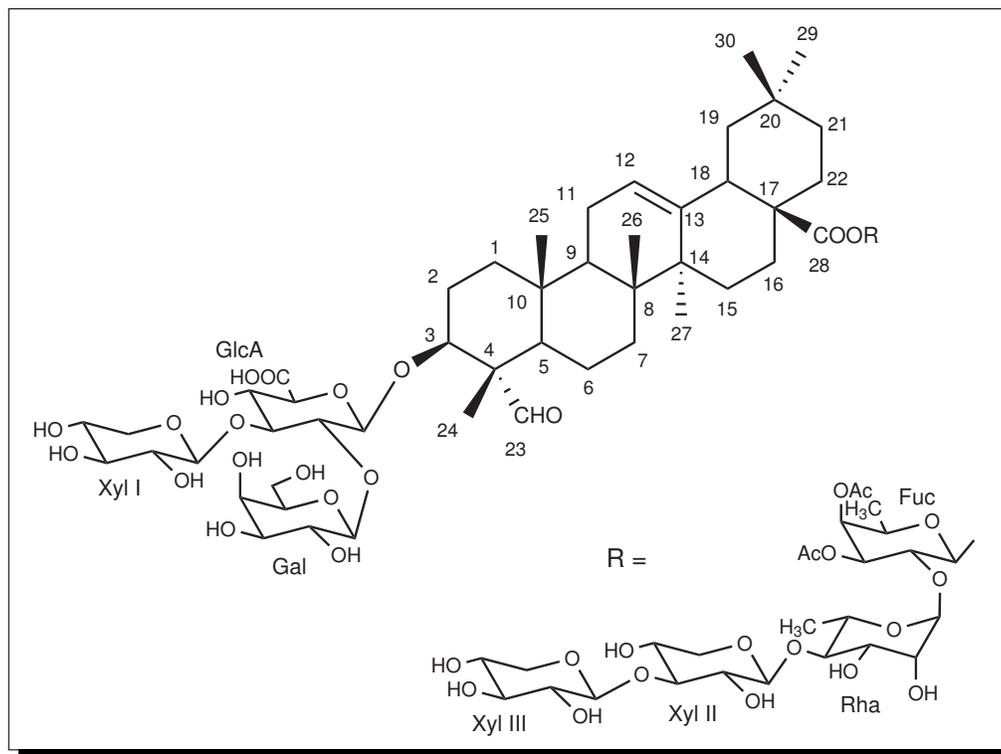


FIGURE 2.17 – Structure du composé **ASc**

2.1.3 Conclusion de l'étude chimique des 3 espèces du genre *Acanthophyllum*

Cette étude a conduit à l'isolement de 5 saponines dont 2 sont nouvelles. L'espèce *Acanthophyllum sordidum* a permis d'obtenir les composés **ASa**, **ASb** et **ASc**. *A. elatius* a conduit à l'isolement de **AE62-66**, **ASc** de **ASa**. Enfin, l'espèce *A. lilacinum* a permis l'isolement des 5 composés c'est-à-dire **ASa**, **ASb**, **ASc**, **AE62-66** et **AL66-74** (cf. **Publication1**).

D'un point de vue chimiotaxonomique, on peut faire les constats suivants :

- Les 5 molécules comportent des sapogénines connues typiques aux Caryophyllaceae. Il

s'agit de la **gypsogénine** pour les composés **ASa**, **AL66-74** et **ASc** et l'**acide gypsogénique** pour les composés **ASb** et **AE 62-66**.

- On note également pour les composés **ASa**, **AL66-74** et **ASc** comportant la gypsogénine, la présence de **marqueurs chimiotaxonomiques**, à savoir la séquence trisaccharidique **3-O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-[β-D-xylopyranosyl-((1→3))-β-D-glucuronopyranoside** en position 3 et le disaccharide **α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-fucopyranoside** en position 28. On peut donc conclure que ces oligosaccharides sont caractéristiques des saponines à gypsogénine. La présence d'acide glucuronique en C-3 et du fucose en C-28 dans les glycosides de gypsogénine et d'acide quillaïque comme étant une caractéristique chimique commune aux plantes de la famille des **Caryophyllaceae** a déjà été rapporté dans la littérature (Glensk et al., 1999). Ceci est confirmé par plusieurs autres études chimiques (cf. Tableaux 2.8, 2.9, 2.12 et 2.13).
- Pour les composés **ASb** et **AE 62-66** comportant l'**acide gypsogénique**, on note que la position 3 de l'aglycone est libre. En revanche les positions 23 et 28 sont estérifiées pour le composé **ASb** et seulement la position 28 pour le composé **AE 62-66**.
- La nature des sucres constituant ces deux dernières saponines (glucose et galactose) doit être un élément caractéristique des saponines à acide gypsogénique. Plusieurs études chimiques relativement récentes sur les Caryophyllaceae (cf. Tableau 2.10 et 2.11) confirment ce constat, sauf dans le cas où la position 3 est occupée (généralement par le xylose).

Il est important de souligner que les saponines isolées des plantes de la famille de Caryophyllaceae en général et les glycosides de gypsogénine en particulier on fait l'objet de plusieurs études biologiques. De l'amélioration de l'activité phagocytaire des granulocytes (Lacaille-Dubois et al., 1999a) à la cytotoxicité (Ma et al., 2008a), (Ma et al., 2009) ainsi que l'immunomodulation et la potentialisation (Gaidi et al., 2002a,b, 2000b), des résultats satisfaisants ont été obtenus. C'est pourquoi, dans la poursuite de notre étude de saponines cytotoxiques isolées de la famille des Caryophyllaceae, les composés **ASa**, **ASb** et **ASc** ont été testés sur deux lignées de cellules cancéreuses coliques (lignées **HCT 116** et **HT-29**). Les résultats de ces tests biologiques sont développés dans la partie suivante (Etude Biologique).

Structure elucidation of new oleanane-type glycosides from three species of *Acanthophyllum*

Gaoussou Timité,^a Anne-Claire Mitaine-Offer,^a Tomofumi Miyamoto,^b Mohammad Ramezani,^c Abdolhossein Rustaiyan,^d Jean-François Mirjolet,^e Olivier Duchamp^e and Marie-Aleth Lacaille-Dubois^{a*}

From the roots of three species of *Acanthophyllum* (Caryophyllaceae), two new gypsogenic acid glycosides, **1** and **2**, were isolated, **1** from *A. sordidum* and *A. lilacinum*, **2** from *A. elatius* and *A. lilacinum*, together with three known saponins, glandulosides B and C, and SAPO50. The structures of **1** and **2** were established mainly by 2D NMR techniques as 23-O- β -D-galactopyranosylgypsogenic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside (**1**) and gypsogenic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside (**2**). The cytotoxicity of several of these saponins was evaluated against two human colon cancer cell lines (HT-29 and HCT 116). Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: NMR; ¹H; ¹³C; 2D NMR; triterpene saponins; gypsogenic acid; Caryophyllaceae; *Acanthophyllum*

Introduction

In a continuation of our studies of the chemotaxonomy of the Caryophyllaceae family, especially the *Acanthophyllum* species,^[1–4] and saponin constituents thereof, we have examined the saponin fraction of the roots of three species of *Acanthophyllum*, *A. sordidum* Bunge ex Boiss, *A. elatius* Bunge, and *A. lilacinum* Schischk (Caryophyllaceae). All species of *Acanthophyllum* are used as soup in Khorasan province, and the aqueous extract of their roots are added to make a special type of candy.^[4] No previous phytochemical study has been reported on saponins of these plants. In this article, we describe the isolation and structure elucidation of two new triterpene saponins, **1** and **2**, from these species, along with three known saponins. Compound **1**, 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosylgypsogenin-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-O-acetyl- β -D-fucopyranoside (glanduloside C),^[3] and 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosylgypsogenin-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-fucopyranoside (SAPO50),^[5] was isolated from *A. sordidum*. Compound **2**, glanduloside C^[3] and SAPO50,^[5] was isolated from *A. elatius*, whereas **1**, **2**, 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosylgypsogenin-28-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetyl- β -D-fucopyranoside (glanduloside B),^[3] glanduloside C,^[3] and SAPO50^[5] were obtained from *A. lilacinum*. The structures of these five saponins were elucidated mainly by 600 MHz NMR analysis, including 1D and 2D NMR (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, and NOESY) spectroscopy and mass spectrometry, and compared with literature data for the known compounds. The

cytotoxicity of several of these saponins was evaluated against two human colon cancer cell lines (HT-29 and HCT 116).

Results and Discussion

Compound **1**, a white amorphous powder, exhibited in high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESIMS) (positive-ion mode) a pseudo-molecular ion peak at $m/z = 1157.5350$ [$M + Na$]⁺ (calculated 1157.5356), consistent with a molecular formula of C₅₄H₈₆O₂₅Na. Its fast-atom bombardment mass spectrum (FABMS) (negative-ion mode) showed a quasi-molecular ion peak at $m/z = 1133$ [$M - H$]⁻, indicating a molecular weight of 1134. Other significant fragment ion peaks were observed at $m/z = 971$ [($M - H$) - 162]⁻, 809 [($M - H$) - 162 - 162]⁻, 647 [($M - H$) - 162 - 162 - 162]⁻, and 485 [($M - H$) - 162 - 162 - 162 - 162]⁻, corresponding to the successive

* Correspondence to: Marie-Aleth Lacaille-Dubois, Laboratoire de Pharmacognosie, UMIB, UPRES EA 3660, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 bd. Jeanne D'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France. E-mail: m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr

a Laboratoire de Pharmacognosie, UMIB, UPRES EA 3660, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 bd. Jeanne D'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812 8582, Japan

c Department of Pharmacognosy and Biotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, PO Box 91775 1365 Mashhad, Iran

d Department of Chemistry, Shahid Beheshti University, Eveen, Tehran, Iran

e Oncodesign, 20 rue Jean Mazen, BP 27627, 21076 Dijon Cedex, France

Table 1. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of the aglycons of **1** and **2** in pyridine- d_5 (δ in ppm, J in Hz)

No.	1		2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	38.5	0.94, 1.44	39.0	nd
2	26.8	1.82, nd	26.8	1.46, nd
3	74.8	4.51	75.7	4.14
4	54.7	–	54.8	–
5	51.4	1.75	51.2	1.68
6	23.3	1.76, 1.82	23.0	1.76, 1.80
7	32.0	1.64, 1.77	32.0	1.60, 1.70
8	39.7	–	39.2	–
9	48.0	1.60	47.3	1.57
10	36.3	–	36.2	–
11	24.0	1.79, 1.85	24.0	1.85, 1.79
12	122.1	5.31 br t (2.9)	123.1	5.32 br t (3.0)
13	143.8	–	143.6	–
14	41.7	–	42.2	–
15	27.8	0.98, 2.03	27.6	1.08, 2.02
16	20.9	1.45, nd	20.3	nd
17	46.7	–	46.7	–
18	41.7	3.03 dd (12.6, 3.0)	41.2	3.01 dd (12.6, 3.0)
19	46.0	1.08, 1.61	45.8	1.06, 1.57
20	30.3	–	30.1	–
21	33.5	1.01, 1.21	33.4	1.01, 1.17
22	32.3	1.21, 1.50	31.8	1.17, 1.48
23	177.8	–	183.8	–
24	11.5	1.45 s	11.6	nd
25	15.6	0.81 s	15.6	0.81 s
26	16.9	0.92 s	17.1	1.02 s
27	25.8	1.03 s	25.5	1.05 s
28	176.2	–	176.6	–
29	32.5	0.76 s	32.6	0.76 s
30	23.1	0.78 s	23.1	0.78 s

Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.
nd, not determined.

loss of four hexosyl moieties. The fragment ion peak at m/z 485 corresponded to the aglycon.

The ^1H NMR spectrum of **1**, in pyridine- d_5 , showed signals of an aglycon part and an oligosaccharidic part characteristic of a saponin structure. For the aglycon moiety, the ^1H NMR spectrum displayed signals for six angular methyl groups as singlets at δ_{H} 0.76, 0.78, 0.81, 0.92, 1.03, and 1.45, one olefinic proton at δ_{H} 5.31 (br t, $J = 2.9$ Hz, H-12), and one oxygen-bearing methine proton at δ_{H} 4.51 (H-3). In the ^{13}C NMR spectrum, the chemical shifts at δ_{C} 74.8 (C-3), δ_{C} 177.8 (C-23), and δ_{C} 176.2 (C-28) suggested one free hydroxyl group at C-3 and two ester functions at C-23 and C-28, respectively. The structure of the aglycon of **1** was thus recognized to be the triterpene gypsogenic acid using the correlations observed mainly in the 2D NMR spectra (NOESY, HSQC, and HMBC) (Table 1) and was in full agreement with literature data.^[3,4] For the structure of the oligosaccharidic chain of **1**, the ^1H NMR spectrum showed four anomeric signals at δ_{H} 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz), 6.07 (d, $J = 8.3$ Hz), 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz), and 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz). In the HSQC spectrum, these four anomeric protons correlated with four anomeric carbon signals at δ_{C} 95.8, 94.5, 104.7 and 104.5, respectively. The ring protons of the monosaccharide

Table 2. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of the sugar moieties of **1** and **2** in pyridine- d_5 (δ in ppm, J in Hz)

No.	1		2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
28-O-				
Gal I-1	94.5	6.07 d (8.3)	94.3	6.01 d (8.3)
2	72.4	4.11	72.2	4.07
3	87.0	4.23 dd (8.1, 3.1)	86.4	4.19 dd (9.0, 3.3)
4	68.5	4.17	68.1	4.10
5	76.9	4.01	76.5	3.95
6	68.9	4.19, 4.53 dd (11.2, 4.0)	68.1	4.10, 4.44 br d (11.4)
Glc I-1	104.7	5.23 d (7.3)	104.1	5.18 d (7.1)
2	74.8	3.95	74.5	3.89 t (8.1)
3	77.3	4.07	77.0	4.02
4	70.8	3.94	70.7	3.86
5	77.8	3.90	77.5	3.83
6	62.0	4.09, 4.44 br d (11.7)	61.6	4.02, 4.35 br d (11.7)
Glc II-1	104.5	4.84 d (7.6)	103.9	4.78 d (7.6)
2	74.7	3.88 t (8.1)	74.1	3.80 t (7.8)
3	77.3	4.09	77.0	4.05
4	70.8	3.92	70.6	3.93 t (9.0)
5	77.8	3.91	77.2	3.72 m
6	62.0	4.15, 4.28 br d (11.7)	61.6	4.07, 4.26 br d (11.7)
23-O-				
Gal II-1	95.8	6.22 d (7.8)		
2	73.4	4.10		
3	77.6	4.18		
4	70.8	4.12		
5	78.8	3.92		
6	61.9	4.17, 4.29 br d (11.7)		

Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.

residues were assigned starting from the anomeric proton by means of the ^1H - ^1H -COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC experiments (Table 2), and the sequence of the oligosaccharide chains was obtained from the HMBC and NOESY experiments. Units of two β -galactopyranosyl (Gal I and II) and two β -glucopyranosyl (Glc I and II) were identified. The relatively large $^3J_{\text{H}-1, \text{H}-2}$ values of Gal I and II (8.3 and 7.8 Hz, respectively) and Glc I and II (7.3 and 7.6 Hz, respectively) indicated a β -anomeric orientation for these four sugars.^[6] The D configuration of Gal I and II, and Glc I and II was determined by GC analysis.^[7] A correlation observed in a HMBC spectrum between an anomeric signal at δ_{H} 6.22 (d, $J = 7.8$ Hz, Gal II-1) and δ_{C} 177.8 (C-23) revealed an ester linkage between C-23 position and Gal II. Moreover, a correlation between another anomeric signal at δ_{H} 6.07 (d, $J = 8.3$ Hz, Gal I-1) and δ_{C} 176.2 (C-28) showed a second ester linkage between C-28 position and Gal I. The ^1H and ^{13}C NMR data of Gal I obtained from 2D NMR data (Table 2) suggested a 1, 3, 6 trisubstituted galactopyranosyl moiety. The sequence of the 28-O-oligosaccharidic moiety was assigned by analysis of the HMBC and NOESY spectra. The HMBC correlation between δ_{H} 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc I-1) and δ_{C} 87.0 (Gal I-3) indicated that Glc I was linked to C-3 of Gal I, which was confirmed by a NOESY cross-peak between δ_{H} 5.23 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc I-1) and δ_{H} 4.23 (dd, $J = 8.1, 3.1$ Hz, Gal I-3). The NOESY cross-peak between δ_{H} 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc II-1) and δ_{H} 4.19 (Gal I-6), and the deshielded signal of Gal I-6 at δ_{C} 68.9/ δ_{H} 4.19, 4.53 (dd,

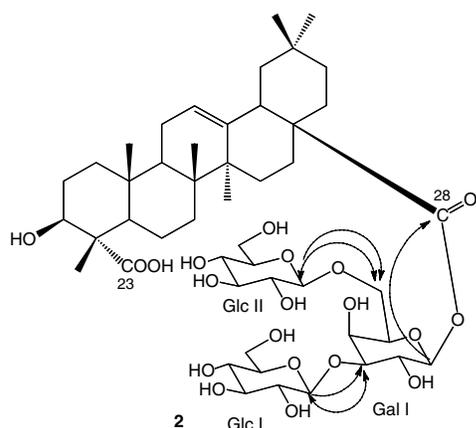
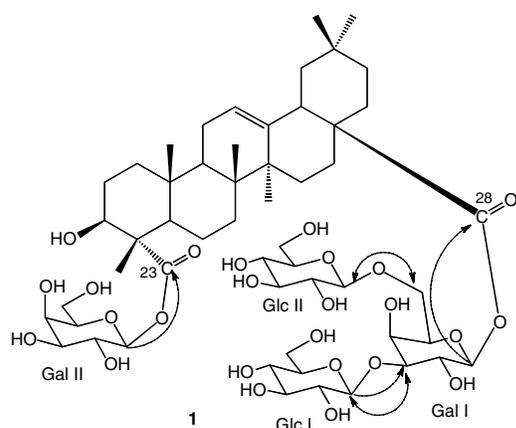


Figure 1. Important HMBC (↷) and NOESY (↔) correlations for **1** and **2**.

$J = 11.2, 4.0$ Hz), indicated that Glc II was linked to Gal I by a (1→6) linkage (Fig. 1).

Based on the above results, the structure of **1** was concluded to be 23-*O*- β -D-galactopyranosylgypsogenic acid-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-[β -D-glucopyranosyl-(1→6)]- β -D-galactopyranoside (Fig. 2).

Compound **2**, a white amorphous powder, exhibited in high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI/MS) (positive-ion mode) a pseudo-molecular ion peak at $m/z = 995.4824$ [$M + Na$]⁺ (calculated for 995.4828), consistent with a molecular formula of C₄₈H₇₆O₂₀Na. Its FAB/MS (negative-ion mode) showed a quasi-molecular ion peak at $m/z = 971$ [$M - H$]⁻, indicating a molecular weight of 972, 162 mass units lower than that of **1**. All the ¹H and ¹³C NMR signals corresponding to the aglycon part of **2** (Table 1) were in accordance with signals of gypsogenic acid with a free carboxylic function at C-23 at δ_C 183.8.^[4] For the position of the oligosaccharidic chain, a correlation in the HMBC spectrum between δ_H 6.01 (d, $J = 8.3$ Hz, Gal I-1) and δ_C 176.6 (Agly C-28) proved that the Gal I residue was linked to the carboxyl group of the aglycon at C-28 by an ester linkage. Moreover, as in compound **1**, ¹H and ¹³C NMR signals of a 1, 3, 6 trisubstituted galactopyranosyl moiety remained. The substitution of this sugar by two glucopyranosyl moieties was confirmed by HMBC correlations between δ_H 5.18 (d, $J = 7.1$ Hz, Glc I-1) and δ_C 86.4 (Gal I-3), and between δ_H 4.78 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc II-1) and δ_C 68.1 (Gal I-6), together with NOESY cross-peaks between δ_H 5.18 (d, $J = 7.1$ Hz, Glc I-1) and δ_H 4.19 (dd, $J = 9.0, 3.3$ Hz, Gal I-3), and between δ_H 4.78 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc II-1)

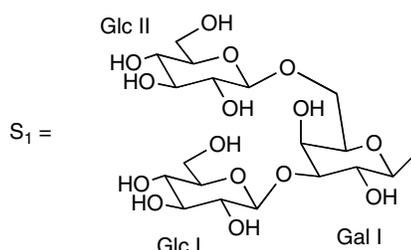
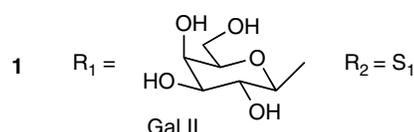
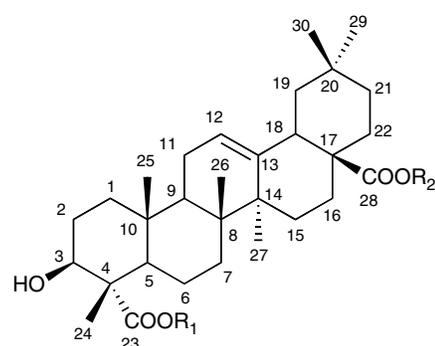


Figure 2. Structures of **1** and **2**.

and δ_H 4.10 (Gal I-6) (Fig. 1). The absolute configuration of Glc and Gal was determined to be D as described above. On the basis of the above results, the structure of compound **2** was established as gypsogenic acid-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-[β -D-glucopyranosyl-(1→6)]- β -D-galactopyranoside (Fig. 2).

In a previous publication of our laboratory, saponins isolated from *Acanthophyllum squarrosum* (Caryophyllaceae) were tested for their concentration-dependent immunomodulatory effect in an *in vitro* lymphocyte proliferation assay.^[1] Only one gypsogenin glycoside displayed immunostimulant activity at low concentrations and a cytotoxic activity at higher concentrations. That is why three saponins were selected, compound **1**, glanduloside C, and SAPO50 (Fig. 3), and tested for their cytotoxicity against two human colon cancer cell lines (HT-29 and HCT 116) by a colorimetric [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) assay.^[8] The choice was based on their structure: the aglycon is gypsogenic acid for **1**, and gypsogenin for glanduloside C and SAPO50. Moreover, the hydroxyl function at C-3 of the aglycon is free in the case of **1**, and substituted by a branched oligosaccharidic chain in the case of SAPO50 and glanduloside C. The latter two structures are very close, and their IC₅₀ are comparable with values at 6.5 (HCT 116) and 12.0 μ M (HT-29) for SAPO50, and 4.8 (HCT 116) and 11.9 μ M (HT-29) for glanduloside C. These values are better than those of compound **1** (IC₅₀ = 15.0 and 17.1 μ M for HCT 116 and HT-29, respectively), but showed a moderate cytotoxicity when compared with paclitaxel used as a positive control (1.1 and 3.6 nM for HCT 116 and HT-29, respectively). These results suggested the importance of the formyl group at the C-23

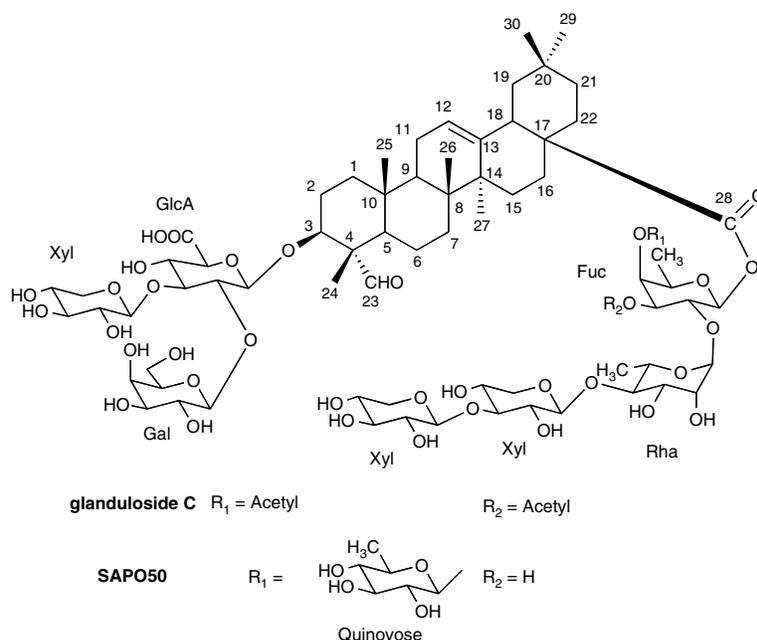


Figure 3. Structures of glanduloside C and SAPO50.

position of gypsogenin and/or the substitution of the C-3 position, for the cytotoxic activity.

Experimental

General

Optical rotations values were recorded on an AA-OR automatic polarimeter. HR-ESIMS (positive-ion mode) was carried out on a Q-TOF 1-micromass spectrometer. FABMS were conducted in the negative-ion mode on a JEOL SX-102 mass spectrometer. Medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was performed on a Gilson pump M 305, with Büchi glass column (460 × 15 mm and 250 × 15 mm), a Büchi precolumn (110 × 15 mm), using silica gel 60 (Merck, 15–40 μm), and reversed-phase RP-18 silica gel (Silicycle, 75–200 μm). Vacuum liquid chromatography (VLC) was carried out using reversed-phase RP-18 silica gel (Silicycle, 75–200 μm). Flash chromatography was performed using a CombiFlash RETRIEVE instrument (column silica gel 15–40 μm, 40 g, Teledyne Isco). TLC (Silicycle) and HPTLC (Merck) were achieved on precoated silica gel plates 60F₂₅₄ and the solvent system CHCl₃–MeOH–AcOH–H₂O (15:8:3:2) were used. The spray reagent used for saponins was Komarowsky reagent, which is a mixture (5:1) of *p*-hydroxybenzaldehyde (2% in MeOH) and ethanolic H₂SO₄ (50%).

NMR spectroscopy

The NMR spectra were recorded on a Varian UNITY Inova 600 spectrometer equipped with 5-mm probes. Samples were dissolved in C₅D₅N-D₂O (8:1) and transferred into 5-mm NMR tubes (Shigemi). The ¹H and ¹³C NMR spectra (at 600 and 150 MHz, respectively) were measured at 303 K. Chemical shifts are given on the δ scale and referenced to the residual solvent signals (δ_H = 7.19, δ_C = 123.5). Coupling constants (*J*) are in Hz. For two-dimensional experiments, Varian software using pulse field gradient was applied. The pulse conditions in C₅D₅N were as

follows: for the ¹H NMR spectrum, observation frequency (OF) = 599.88 MHz, acquisition time (AQ) = 4.202 s, relaxation delay (RD) = 5.0 s, 90 pulse width = 10.0 ms, spectral width (SW) = 7798.8 Hz, Fourier transform (FT) size = 65536; for the ¹³C NMR spectrum, OF = 150.854 MHz, AQ = 0.453 s, RD = 1.547 s, 90 pulse = 15.8 ms, SW = 36182.7 Hz, line broadening (LB) = 1.0 Hz, FT size = 65536; for the COSY spectrum, AQ = 0.131, F₂ = 2048, F₁ = 256, RD = 0.369, SW = 7798.8 Hz; for the NOESY spectrum, AQ = 0.131, F₂ = 2048, F₁ = 256, RD = 0.369, SW = 7798.8 Hz, mixing time = 500 ms; for the TOCSY spectrum, AQ = 0.131, F₂ = 2048, F₁ = 256, RD = 0.369, SW = 7798.8 Hz, mixing time = 60 ms; for the HSQC spectrum, AQ = 0.131, RD = 0.369, F₁ = 36182.7 Hz, F₂ = 7798.8 Hz; and for the HMBC spectrum, AQ = 0.131, SF = 599.880 MHz, RD = 0.369, DE = 50 ms, F₁ = 36182.7 Hz, F₂ = 7798.8 Hz.

Plant material

The roots of *A. sordidum* Bunge ex Boiss, *A. elatius* Bunge and *A. lilacinum* Schischk were collected from the northeastern part of Iran, Khorasan province, and identified by Mr Joharchi. Voucher specimens under the reference nos 220309, 230309, and 240309, respectively, were deposited in the Herbarium of the Laboratory of the school of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Extraction and isolation

The dried, powered roots of *A. sordidum* (600 g) were defatted with 3 l of petroleum ether for 24 h. The air-dried plant was extracted with 5 l of MeOH for 48 h yielding, after evaporation, a brown residue (40 g). The MeOH extract was dissolved in 400 ml of H₂O and partitioned with H₂O-saturated *n*-BuOH (3 × 300 ml) to give, after evaporation, the *n*-BuOH fraction (15 g). The latter was solubilized in MeOH (10 ml) and precipitated in Et₂O (3 × 250 ml) yielding 9 g of crude saponin mixture (CSM). An aliquot of 600 mg of CSM was then submitted to Flash chromatography on silica gel

(CHCl₃–MeOH–H₂O, 8 : 5 : 1), followed by successive MPLC on RP-18 silica gel (MeOH–H₂O linear gradient 40 : 60 → 70 : 30) to give compound **1** (3.2 mg). Final purification was carried out by MPLC on silica gel (CHCl₃–MeOH–H₂O, 8 : 5 : 1) yielding glanduloside C (5.6 mg) and SAPO50 (3.7 mg).

For *A. elatius* and *A. lilacinum*, a CSM was obtained according to the method described above. For *A. elatius*, 2 g of the CSM was submitted to VLC on RP-18 silica gel (H₂O containing increasing amounts of MeOH) yielding seven fractions. The fractions 3, 4, and 5, rich in saponins, eluted with MeOH–H₂O 3 : 7, 5 : 5, and 7 : 3, were fractionated by successive MPLC on silica gel (CHCl₃–MeOH–H₂O, 8 : 5 : 1 and 65 : 40 : 8), giving compound **2** (7.0 mg), glanduloside C (10.0 mg), and SAPO50 (10.0 mg). For *A. lilacinum*, the same protocol was applied, starting from 2 g of CSM. Further separations were performed by successive MPLC on silica gel using only CHCl₃–MeOH–H₂O (8 : 5 : 1), to give compounds **1** and **2**, together with glanduloside B (9.0 mg), glanduloside C (6.0 mg), and SAPO50 (7.9 mg).

Compound 1: White amorphous powder. $[\alpha]_D^{25} - 7.1$ ($c = 0.10$, MeOH). For ¹H NMR and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2. HR-ESIMS $m/z = 1157.5350$ [M + Na]⁺ (calculated 1157.5356). FABMS m/z 1133 [M – H][–], 971 [(M – H) – 162][–], 809 [(M – H) – 162 – 162][–], 647 [(M – H) – 162 – 162 – 162][–], 485 [(M – H) – 162 – 162 – 162][–].

Compound 2: White amorphous powder. $[\alpha]_D^{25} - 15.6$ ($c = 0.05$, MeOH). For ¹H NMR and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2. HR-ESIMS m/z 995.4824 [M + Na]⁺ (calculated 995.4828). FABMS m/z 971 [M – H][–].

Acid hydrolysis

Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2N aq. CF₃COOH (5 ml) for 3 h at 95 °C. After extraction with CH₂Cl₂ (3 × 5 ml), the aqueous 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. The D configuration of glucose and galactose was determined by GC analysis using a method described earlier.^[7]

MTT cytotoxicity assay

The bioassay was carried out according to the method described in ref. [8] with two human colorectal cancer cell lines HCT 116 and HT-29. Paclitaxel was used as a positive control, and exhibited IC₅₀ values of 1.1 and 3.6 nM against HCT 116 and HT-29, respectively.

Acknowledgement

The authors are thankful to the Government of Ivory Coast for financial support.

References

- [1] G. Gaidi, T. Miyamoto, A. Rustaiyan, V. Laurens, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1497.
- [2] G. Gaidi, T. Miyamoto, A. Rustaiyan, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 920.
- [3] G. Gaidi, T. Miyamoto, M. Ramezani, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1114.
- [4] M. Haddad, T. Miyamoto, M. Ramezani, M.-A. Lacaille-Dubois, *Helv. Chim. Acta.* **2004**, *87*, 73.
- [5] C. Delay, J. A. Gavin, A. Aumelas, P.-A. Bonnet, C. Roumestand, *Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 67.
- [6] Y. Mimaki, A. Yokosuka, M. Hamanaka, C. Sakuma, T. Yamori, Y. Sashida, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1511.
- [7] M. Haddad, T. Miyamoto, V. Laurens, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 372.
- [8] J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, J. B. Mitchell, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936.

2.2 Etude phytochimique de *Securidaca welwitschii* Oliv.

Comme dans le cas des Caryophyllaceae, nous présenterons dans un premier temps les schémas d'extraction et d'isolement ayant permis l'obtention de 5 saponines nouvelles, dont 4 sous forme d'isomère *E* et *Z* à savoir **Sw264a/b** , **Sw 21a/b** et **Sw 231** . Ensuite nous détaillerons l'analyse structurale de ces composés.

2.2.1 Extraction et isolement des 5 saponines

Cette étape a été menée par une succession d'étapes de chromatographie. La première étape a consisté en plusieurs fractionnements réalisés par chromatographie sous vide (VLC sur silice 60 en phase normale et en phase inverse RP-18). La purification finale des composés **Sw264a/Sw264b** , **Sw 21a/ Sw 21b** et **Sw 231** a été réalisée par Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (MPLC sur silice 60 en phase normale et en phase inverse RP-18) (cf. Figure 2.19)

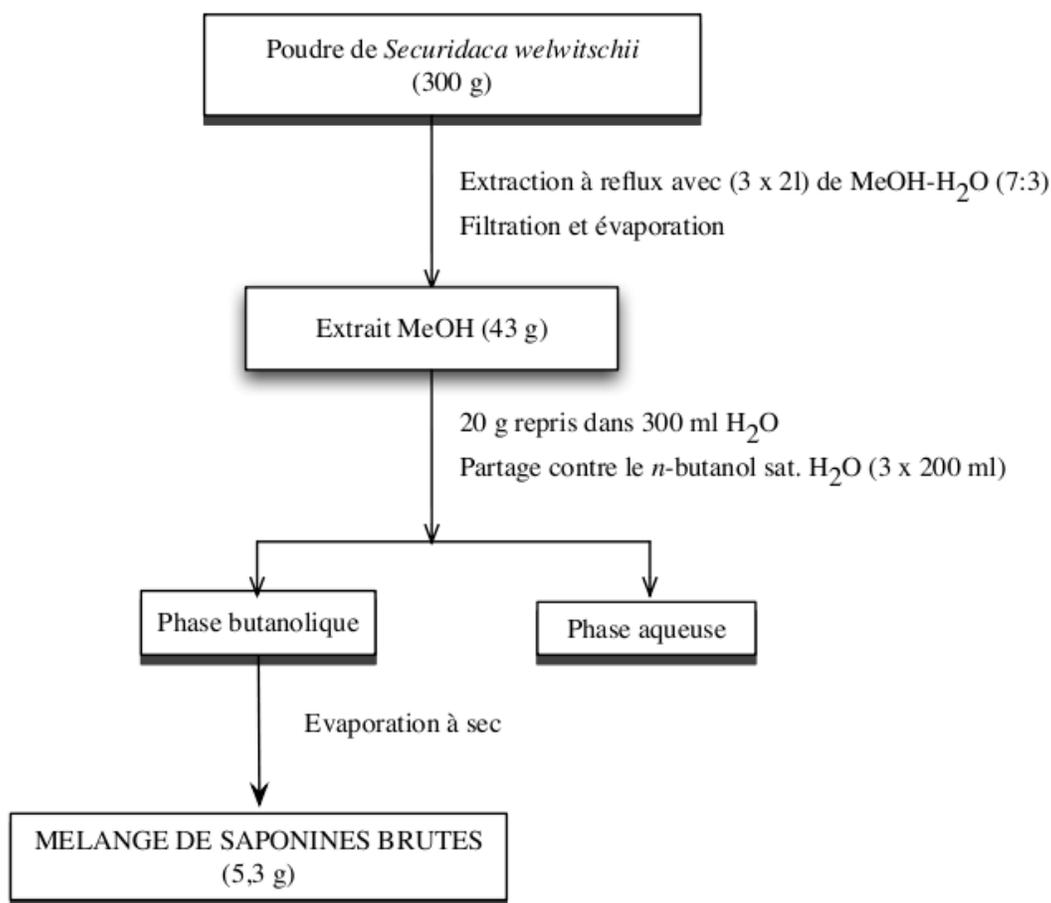


FIGURE 2.18 – Schéma d'extraction des saponines de *Securidaca welwitschii*

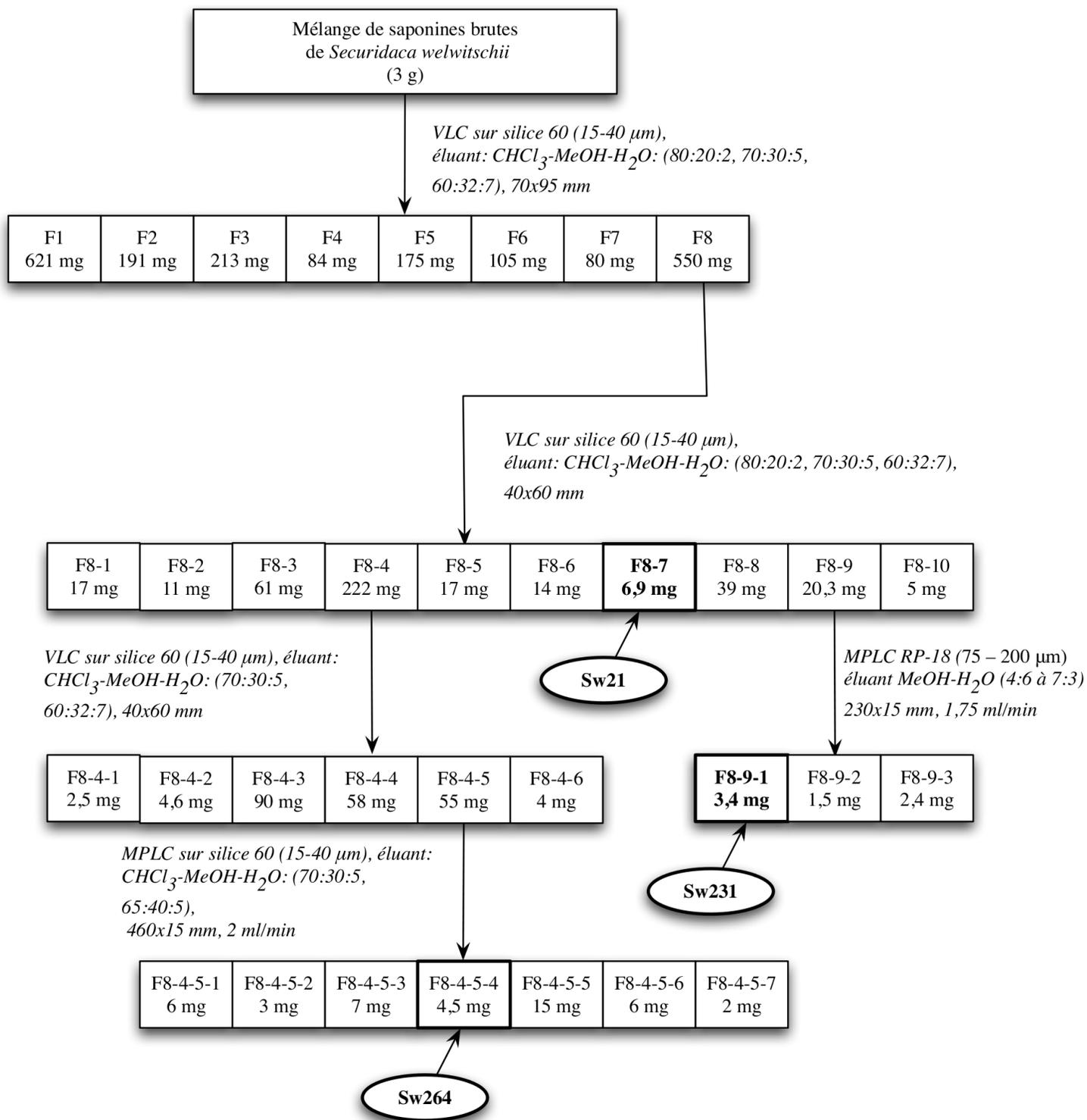


FIGURE 2.19 – Purification des composés Sw21, Sw231 et Sw64

2.2.2 Détermination structurale des composés Sw264a/b, Sw21a/b et Sw231

Comme dans le cas des saponines isolées du genre *Acanthophyllum*, nous présenterons dans un premier temps la spectrométrie de masse des composés isolés, suivi de la spectroscopie RMN. Pour ce dernier, les tables de déplacements chimiques des composés **Sw264a/b**, **Sw 21a/b** et **Sw 231** se trouvent dans la **Publication N°2**.

2.2.2.1 Détermination structurale des composés Sw264a/b

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) donne un ion quasi-moléculaire à $m/z = 1455 [M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 1455 uma en accord avec la formule brute $C_{70} H_{104} O_{32}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 1265 [M-H-190]^-$ et $825 [M-H - 190 - 162 - 146 - 132]^-$ correspondant à la perte d'un groupement diméthoxycinnamoyle, d'un hexose, d'un 6-déoxyhexose et d'un pentose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées sur les spectres HSQC et HMBC des molécules natives **Sw264a/b**.

Sur le spectre RMN 1H de **Sw264a/Sw264b** nous observons 5 singulets entre δ_H 0.71 et 1.84 ppm correspondant à 5 méthyles tertiaires. Un proton oléfinique résonnant à δ 5.72 ppm correspond au proton H-12. Les protons à δ 4.74 et δ 4.59 (d, $J = 2.5$) correspondent aux protons H-2 et H-3 respectivement. Le spectre RMN ^{13}C enregistré en mode DEPT nous permet de distinguer dans la zone de l'aglycone, 6 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH₂), 5 groupements méthyles (CH₃) et par déduction, 9 carbones quaternaires (C). Le spectre RMN 1H révèle la présence de 5 méthyles à δ_H 1.84, 1.40, 1.00, 0.74 et 0,71ppm qui donnent des corrélations dans le spectre HSQC avec les signaux à δ_C 14.6, 17.0, 18.5, 23.3 et 32.6 ppm respectivement. Les signaux à δ_C 127.1 et δ_C 139.9 correspondent à ceux des carbones éthyléniques de la double liaison $\Delta^{12,13}$.

Tous les protons et carbones ont été attribués d'après l'analyse des spectres HSQC et HMBC. L'expérience hétéronucléaire HMBC permet de visualiser les couplages $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ à partir des protons des méthyles de l'aglycone (Me 24, 25, 26, 29 et 30) (Publication 2). Des signaux de carbones caractéristiques sont observés :

- Un carboxyle (C-23) à δ 183.4 ppm, déblindé, qui suggère que cette position de l'aglycone est libre.
- Un carboxyle (C-28), blindé à δ 176.4, qui est engagé dans une liaison glycosyl ester.
- Deux méthines porteurs d'hydroxyle que sont les positions C-2 à δ 71.3 ppm et C-3 à δ 86.7 ppm. Ce dernier étant déblindé par rapport au C-3 de la génine libre, doit donc être engagé dans une liaison glycosidique.

Nous sommes donc en présence d'une saponine bidesmosidique. Toutes ces informations nous ont permis d'attribuer et de comparer les signaux de l'aglycone avec ceux décrits dans la littérature et de l'identifier comme étant la présénégénine (Elbandy et al., 2002a, Haddad et al., 2003, Mitaine-Offer et al., 2010, Zhang et al., 1996a, 1998b). La détermination structurale des aglycones des autres molécules **Sw21a/Sw21b** et **Sw231** a permis d'identifier les signaux caractéristiques de la même génine (présénégénine), d'après l'analyse des spectres de masse, et de la RMN des molécules natives.

Nature des sucres

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 5 protons anomériques résonnant à δ 6.44 (d, $J = 1.2$ Hz), 6.04 (d, $J = 8.5$ Hz), 5.06 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.01 (d, $J = 7.6$ Hz), et 4.85 (d, $J = 7.4$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 5 carbones anomériques à δ 101.0, 94.1, 105.2, 104.3, et 106.9 respectivement. On note également les signaux des protons de 2 méthyles à δ 1.23 (d, $J = 6.1$ Hz) et à 1.68 (d, $J = 6.1$ Hz), qui appartiennent à 2 unités de 6-déoxyhexose. L'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC à partir des protons anomériques nous a permis d'identifier 2 β -glucopyranosyles (Glc I et Glc II), un β -fucopyranosyle (Fuc), un β -xylopyranosyle (Xyl) et un α -rhamnopyranosyle.

Séquençage osidique en C-3

L'analyse des spectres RMN nous a permis de caractériser un glucopyranosyle à partir du proton anomère résonnant à δ 5.01 (d, $J = 7.6$ Hz). Les déplacements chimiques des carbones indiquent qu'il s'agit d'un glucose terminale. La liaison du Glc en position 3 de l'aglycone est

déduite de la corrélation observée dans le spectre HMBC entre δ_H 5.01 ($d, J = 7.6$ Hz, Glc-I) et δ_C 86.7 (Agly-3), ce qui est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 5.01 ($d, J = 7.6$ Hz, Glc-I) et δ_H 4.59 ($d, J = 2.5$ Hz, Agly-3). La prosapogénine 3-O- β -D-glucopyranosyl-présénégénine correspond à la tenuifoline (Mitaine-Offer et al., 2002, Teng et al., 2002, Zhang et al., 1996b), glycoside très fréquent chez les Polygalaceae.

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des signaux du glucopyranosyle en position 3, il reste ceux des 4 sucres liés en position C-28 de la présénégénine. Il s'agit de :

- Un fucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.04 ($d, J = 8.5$ Hz) identifié grâce à ses signaux en RMN. Les déplacements chimiques observés vers les champs faibles sur le spectre HSQC pour la position 4 du fucose à δ_H 6.05 ($d, J = 3.5$ Hz, Fuc-4) et δ_C 74.0 (Fuc-4) évoquent une acylation de cette position.
- Un rhamnopyranosyle déterminé à partir du proton anomère résonnant à δ 6.44 ($d, J = 1.2$ Hz), identifiable grâce à son méthyle résonnant à δ 1.68 ($d, J = 6.1$ Hz). L'expérience HMBC montre deux importantes corrélations, entre δ_H 1.68 ($d, J = 6.1$ Hz, Rha-6) et δ_C 84.4 (Fuc-4) et δ_C 68.0 (Fuc-5), ce qui prouve que ce rhamnose est substitué en position 4.
- Un xylopyranosyle terminale dont le proton anomère résonne à δ 4.85 ($d, J = 7.4$ Hz)
- Un glucopyranosyle terminale dont le proton anomère résonne à δ 5.06 ($d, J = 7.8$ Hz, Glc-II).

Les liaisons entre ces 4 sucres sont ensuite déterminées :

- Sur le spectre NOESY, la corrélation entre les protons à δ 4.77 ($t, J = 8.8$ Hz, Fuc-2) et δ 6.44 ($d, J = 1.2$ Hz, Rha-1), montre que le rhamnose est lié au fucose par une liaison (1 \rightarrow 2), ce qui confirmée par la corrélation HMBC entre δ_H 6.44 ($d, J = 1.2$ Hz, Rha-1) et le carbone à δ 72.1(Fuc-2).
- La corrélation NOESY entre δ_H 4.55 ($dd, J = 9.8, 3.5$ Hz, Fuc-3) et δ_H 5.06 ($d, J = 7.8$ Hz, Glc-II-1), montre que le Glc-II est lié au fucose par une liaison (1 \rightarrow 3).
- Egalement sur le spectre NOESY, une corrélation entre δ_H 4.84 ($d, J = 7.4$ Hz, Xyl-1) et δ_H 4.17 (Rha-4) montre que le xylose est lié au rhamnose par une liaison (1 \rightarrow 4), ce qui confirmée par la corrélation HMBC entre δ_H 4.17 (Rha-4) et le carbone à δ 106.9 (Xyl-1).

Identification de l'acide organique

Après la spectrométrie de masse, qui a permis d'observer une perte de masse de 190 uma, correspondant au diméthoxycinnamoyle, les spectres RMN ont permis de repérer les signaux caractéristiques de ce dernier :

Dérivé *E*

- Signaux des protons aromatiques δ 6.98 (s, H-5'), 6.94 (d, $J = 8.1$ Hz, H-8'), 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, H-9')
- signaux des protons oléfiniques selon les constantes de couplages à δ 6.48 (d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 7.83 (d, $J = 15.9$ Hz, H-3').
- signaux des groupements méthoxyles à δ_H 3.82 (s, CH₃O-C-6') et δ_H 3.78 (s, CH₃O-C-7').

L'expérience HMBC permet d'observer les corrélations suivantes :

- Entre le proton oléfinique δ 6.48 (d, $J = 15.9$ Hz, H-2') et le carbone quaternaire à δ 127.7 (C-4').
- Entre le proton oléfinique à δ 7.83 (d, $J = 15.9$ Hz, H-3') et le carbone quaternaire à δ 168.0 (C-1').
- Entre le proton à δ 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, H-9') et le carbone quaternaire à δ 152.0 (C-7') et le carbone à δ 111.8 (C-8').
- Entre le proton à δ 6.98 (s, H-5') et le carbone quaternaire à δ 152.0 (C-7') et le carbone à δ 123.0 (C-9').
- Entre le proton à δ 6.94 (d, $J = 8.1$ Hz, H-8') et le carbone quaternaire à δ 127.7 (C-4').
- Entre le proton du groupement méthoxyle δ 3.82 (s, CH₃O-C-6') et le carbone quaternaire à δ 148.9 (C-6').
- Entre le proton du groupement méthoxyle à δ 3.78 (s, CH₃O-C-7') et le carbone quaternaire à δ 152.0 (C-7').

Dérivé *Z*

- Signaux des protons aromatiques à δ 7.83 (s, H-5''), 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, H-8''), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, H-9'').
- signaux des protons oléfiniques selon les constantes de couplages à δ 5.82 (d, $J = 13.2$ Hz, H-2''), 6.84 (d, $J = 13.2$ Hz, H-3'').
- signaux des groupements méthoxyles à δ_H 3.78 (s, CH₃O-C-6'') et δ_H 3.71 (s, CH₃O-C-7'').

Corrélations HMBC :

- Entre le proton oléfinique δ 5.82 (d, $J = 13.2$ Hz, H-2'') et le carbone quaternaire à δ 128.0 (C-4'').
- Entre le proton oléfinique δ 6.84 (d, $J = 13.2$ Hz, H-3'') et le carbone quaternaire à δ 167.4 (C-1'').
- Entre le proton δ 7.83 (s, H-5'') et le carbone quaternaire à δ 144.7 (C-3'') et à δ 125.7 (C-9'').
- Entre le proton δ 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, H-8'') et le carbone quaternaire à δ 149.7 (C-6'') et à δ 128.0 (C-4'').
- Entre le proton δ 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, H-9'') et le carbone quaternaire à δ 150.5 (C-7''), δ 144.7 (C-3'') et à δ 114.4 (C-5'').
- Entre le proton du groupement méthoxy à δ 3.78 (s, CH₃O-C-6'') et le carbone quaternaire à δ 149.7 (C-6'').
- Entre le proton du groupement méthoxy à δ 3.71 (s, CH₃O-C-7'') et le carbone quaternaire à δ 150.5 (C-7'').

L'attribution complète des déplacements chimiques des carbones et protons de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique est en parfait accord avec celles déjà décrites dans la littérature (Mitaine-Offier et al., 2003, 2005). Il est très connu qu'en solution méthanolique et à la lumière, les 2 formes *E* et *Z* s'isomérisent, donc on a le mélange des deux.

Site de fixation du groupement méthoxycinnamoyle

A partir des protons du méthyle à δ 1.23 (d, $J = 6.1$ Hz, Fuc-6), le spectre HMBC a permis de déterminer les déplacements chimiques des carbones C-4 et C-5 du fucose à δ 74.0 et δ 70.5 respectivement. Le carbone à δ 74.0 (Fuc-4) corrèle sur le spectre HSQC avec le proton à δ 6.05 (d, $J = 3.5$ Hz, Fuc-4). Cette valeur du proton H-4 est déblindée, caractéristique d'une acylation. Le groupement diméthoxycinnamoyle est donc fixé en position 4 du fucose.

Toutes ces données précédentes indiquent que **Sw264a**/**Sw264b** est un mélange de *trans* et *cis* glycosides présénégénines-3,4-diméthoxycinnamoylés.

Conclusion

Sur la base des observations précédentes, la molécule est la suivante 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-présénégénine 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-

(1→3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranoside (**Sw264a**) et son isomère *cis* (*Z*), (**Sw264b**) respectivement (Timité et al., 2010b).

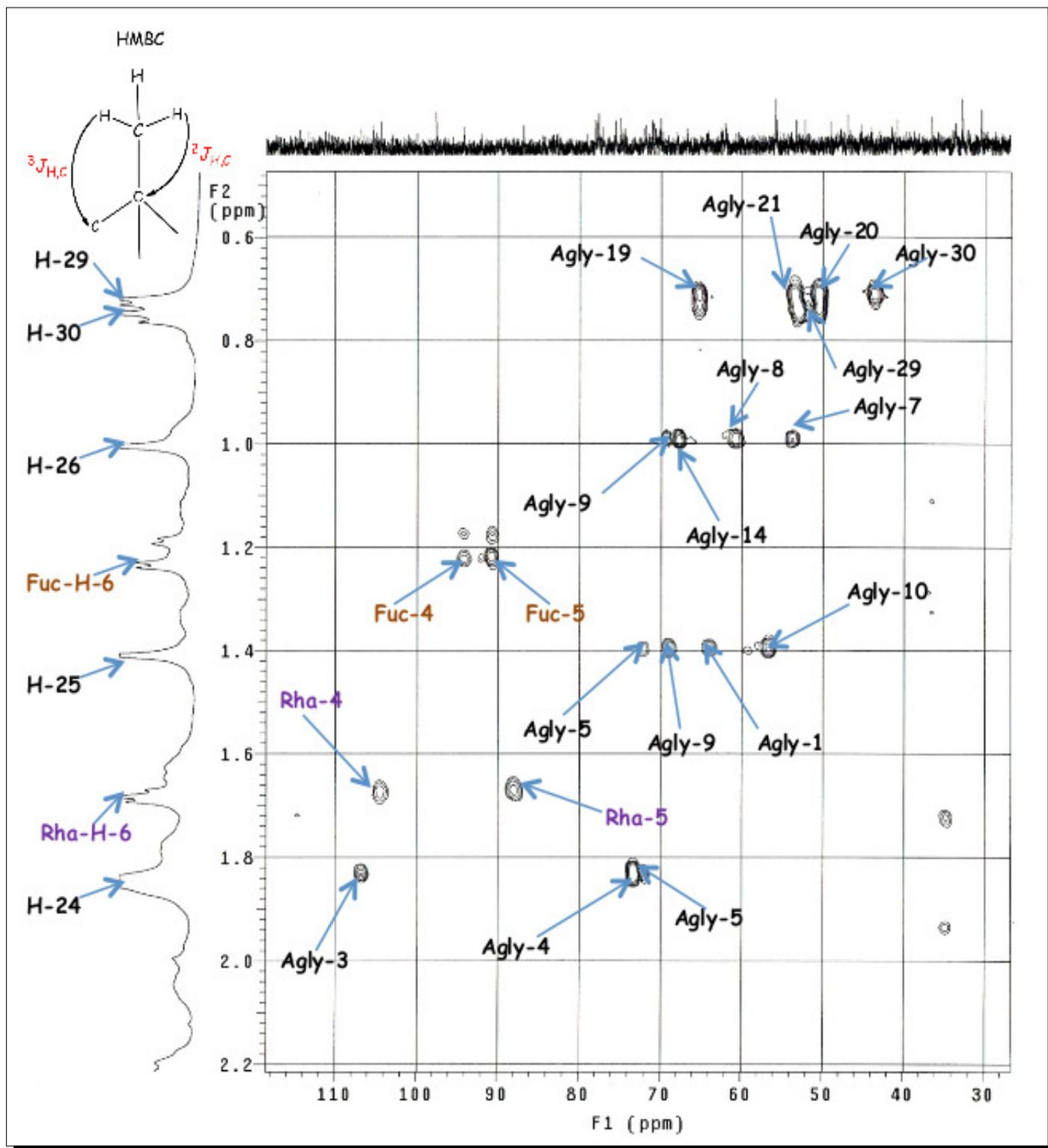


FIGURE 2.20 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine SW264

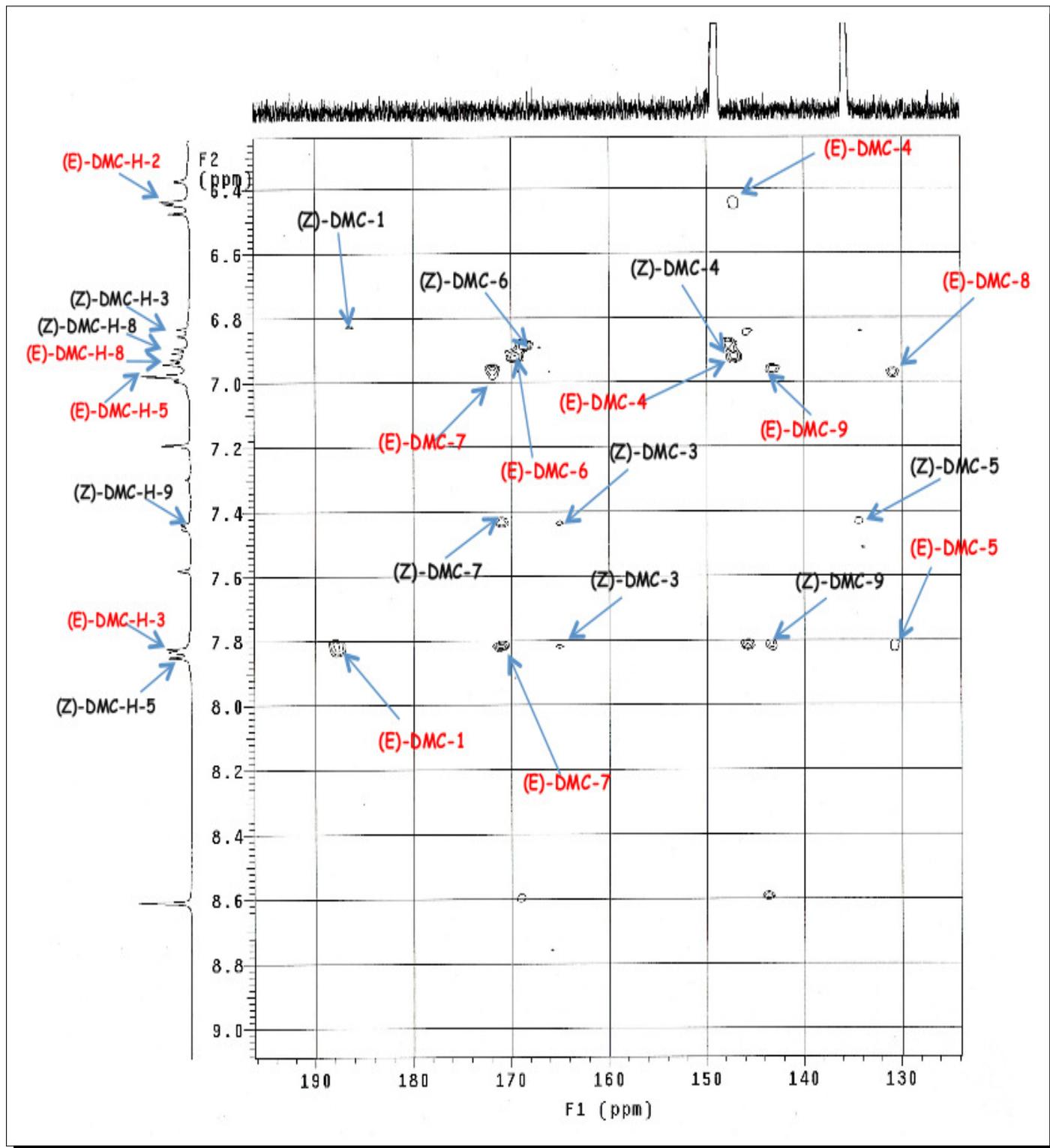


FIGURE 2.21 – Spectre **HMBC** de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine **SW264**

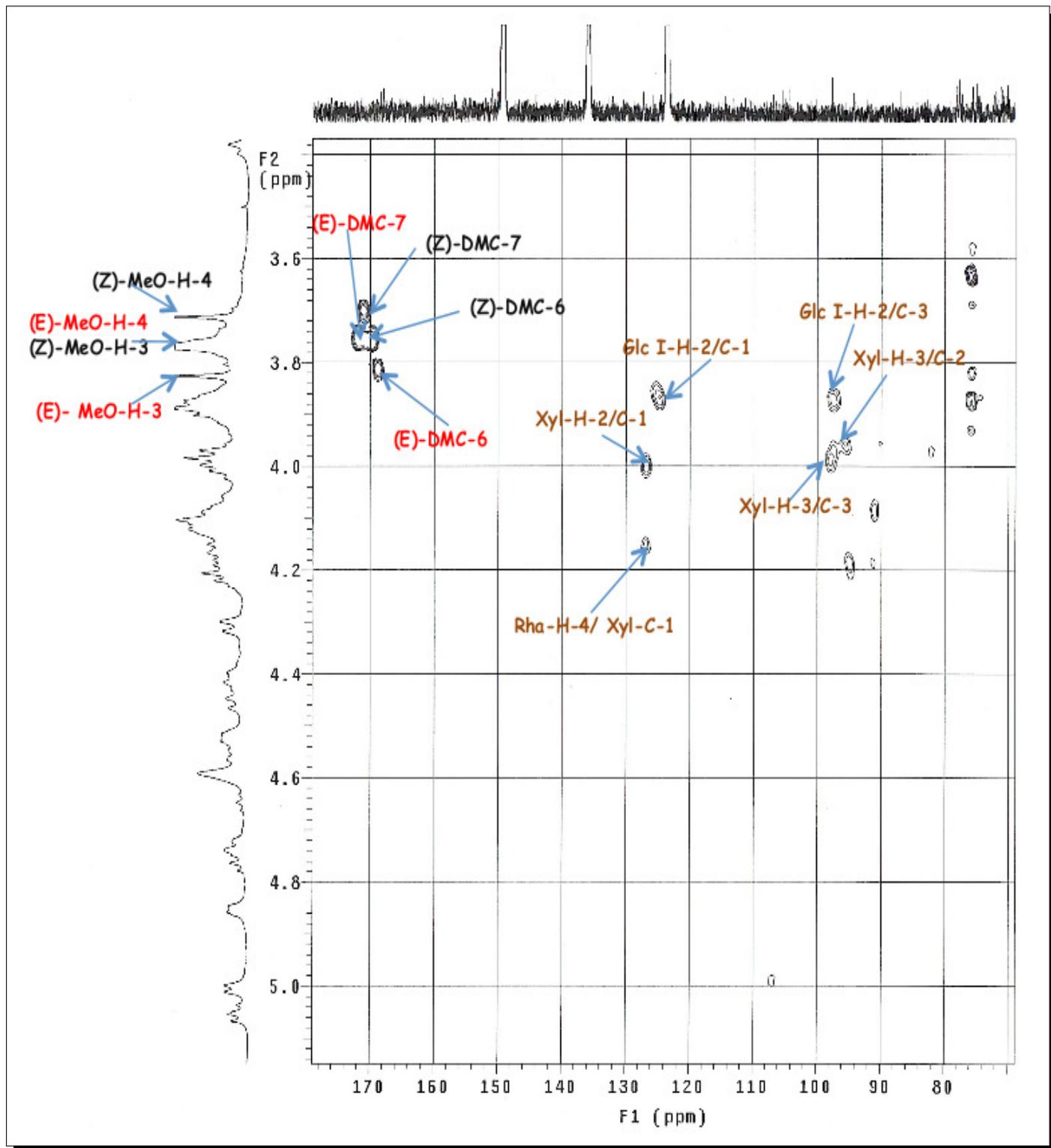


FIGURE 2.22 – Spectre **HMBC** de la partie acide diméthoxycinnamique/osidique de la saponine SW264

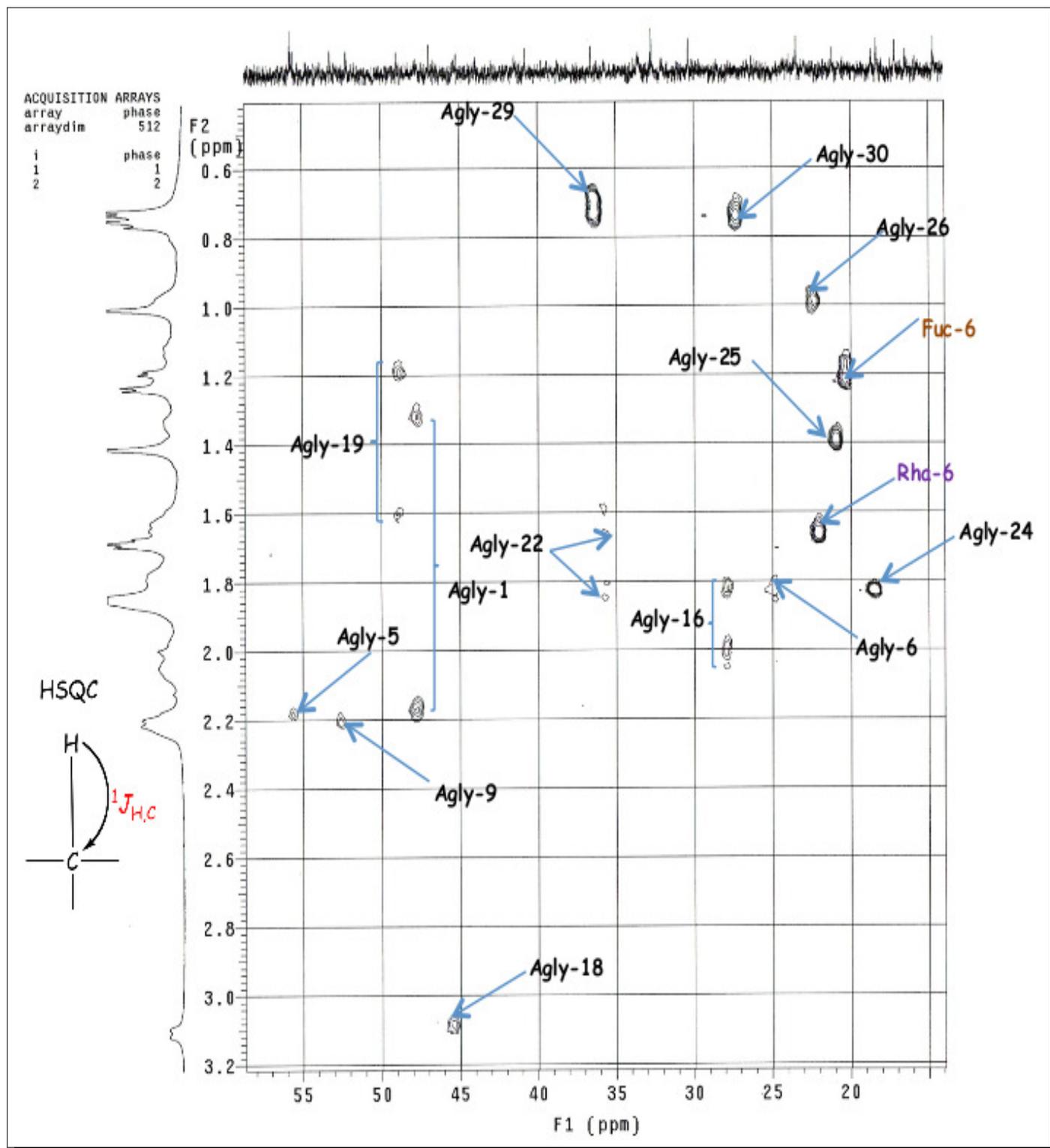


FIGURE 2.23 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW264

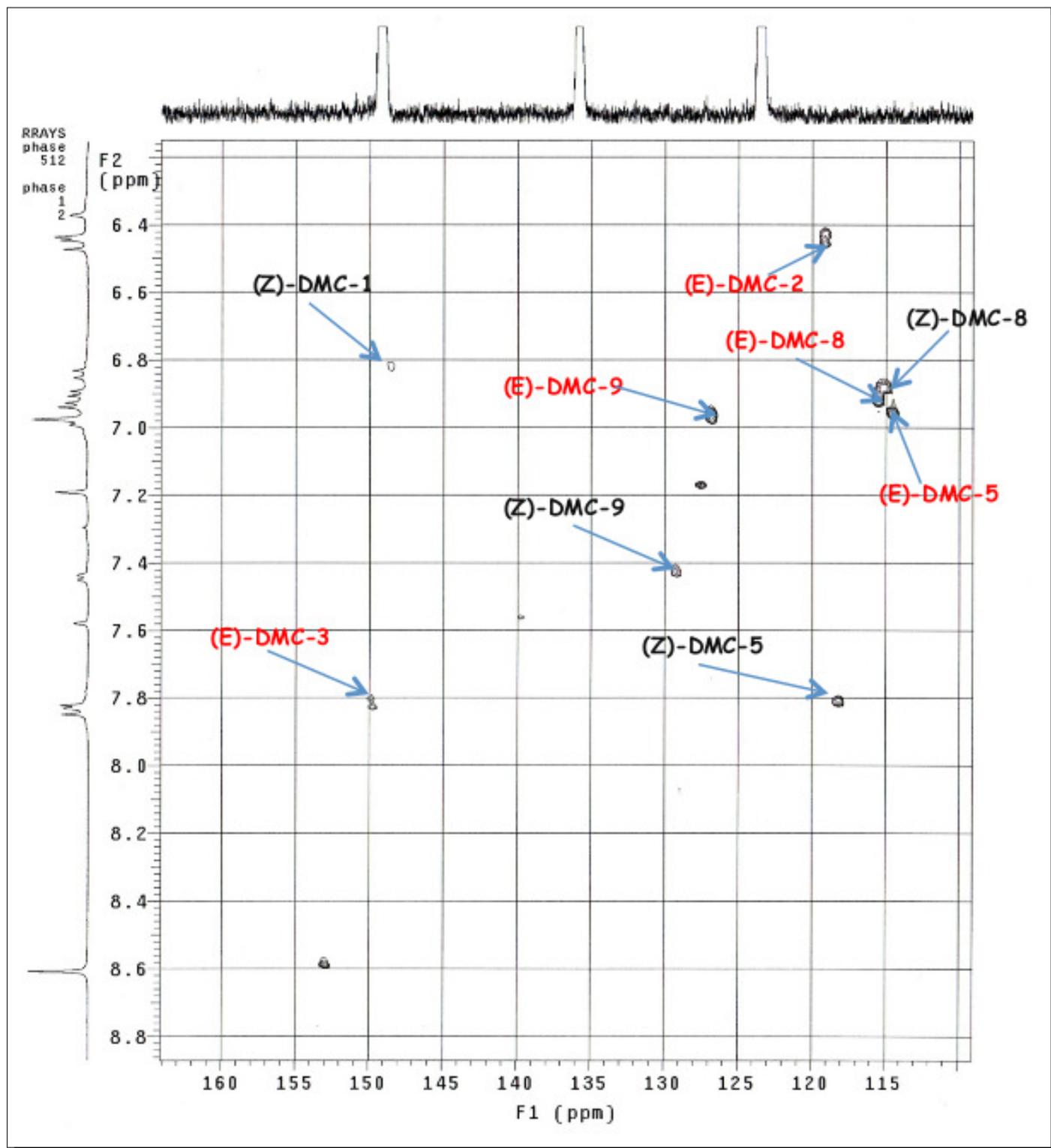


FIGURE 2.24 – Spectre **HSQC** de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine **SW264**

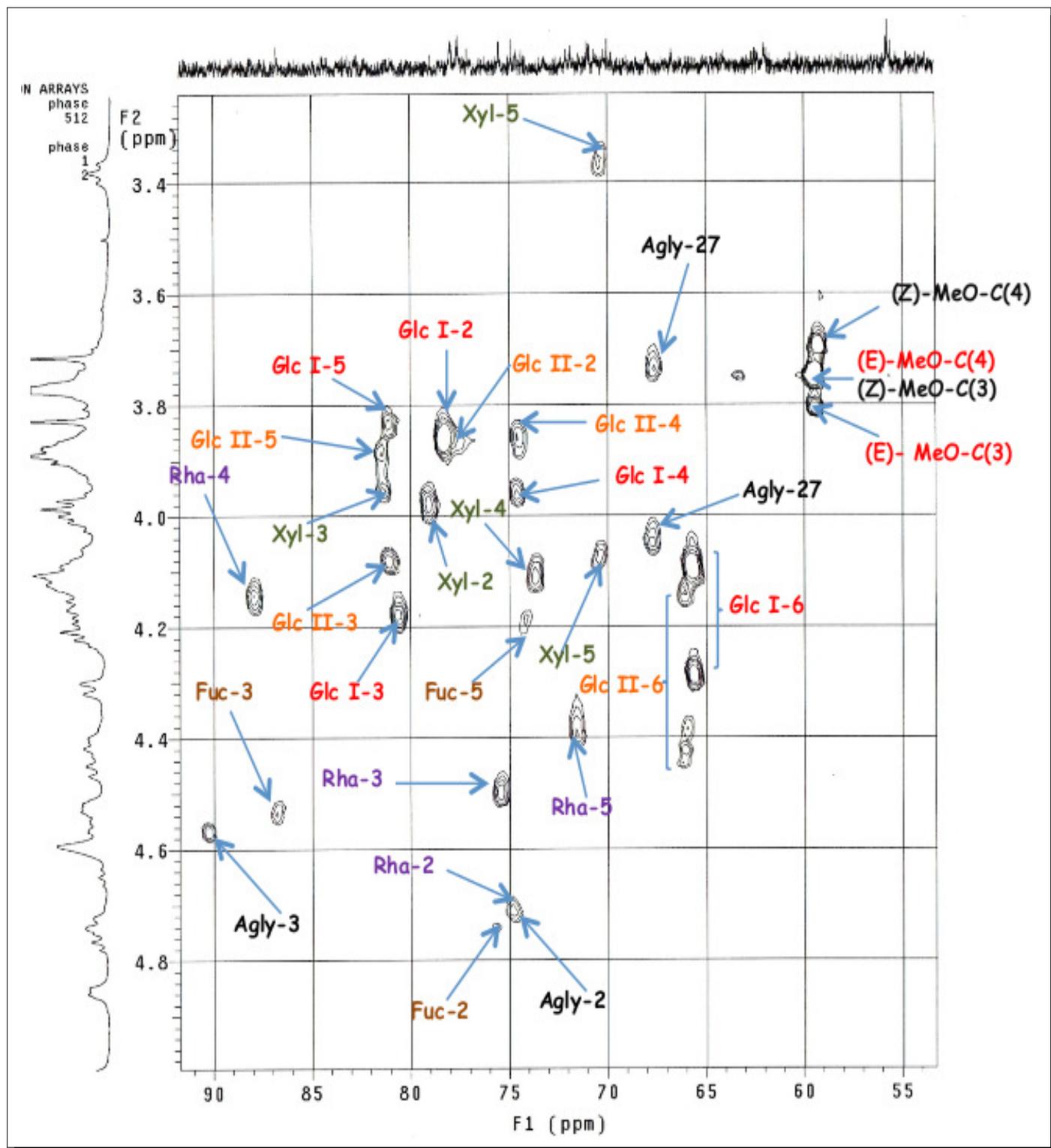


FIGURE 2.25 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW264

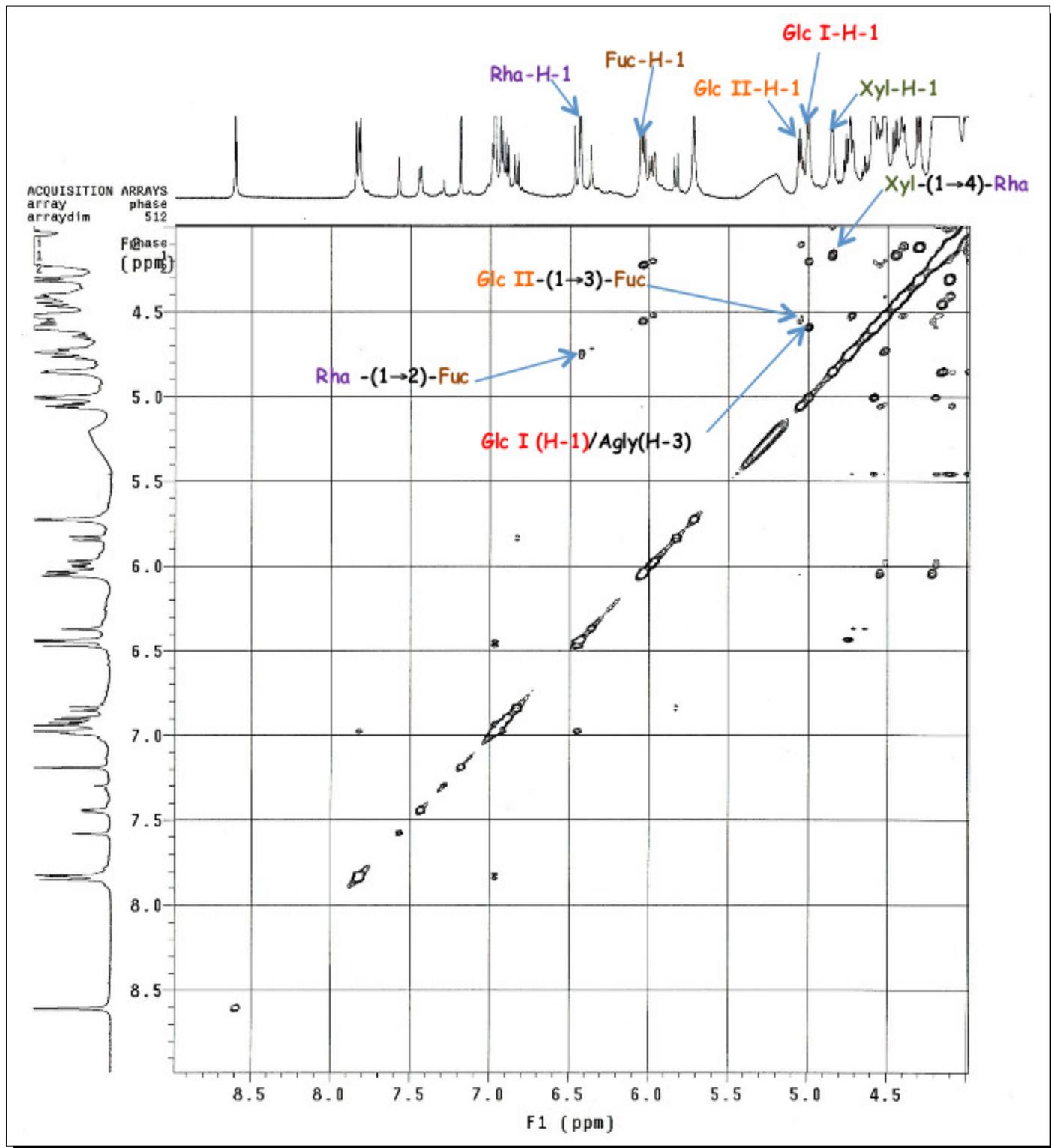


FIGURE 2.26 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW264

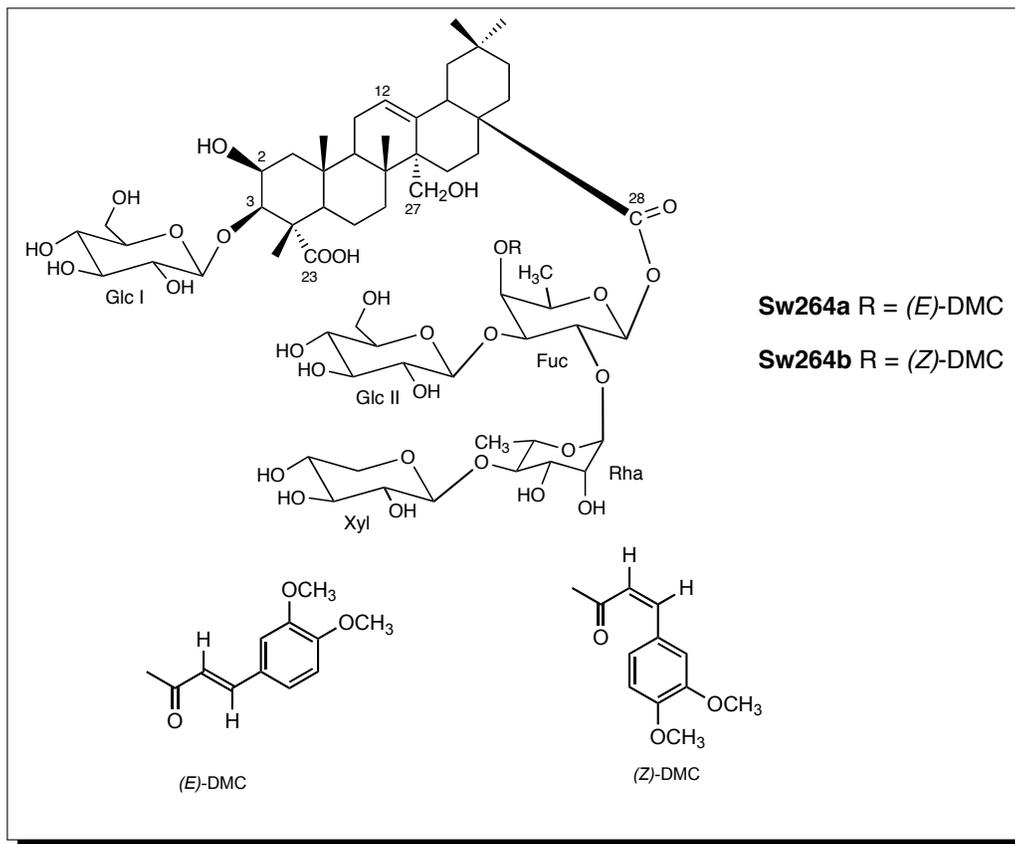


FIGURE 2.27 – Structure du composé **Sw264**

2.2.2.2 Détermination structurale du composé Sw21a/b

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) donne un ion quasi-moléculaire à $m/z = 1659 [M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 1660, c'est à dire $162 + 42$ uma de plus que les isomères Sw264a/Sw264b. Cette masse est en accord avec la formule brute $C_{78}H_{116}O_{38}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 1497 [M-H-162]^-$, $1103 [M-H-162-162-190-42]^-$ et $795 [M-H-162-162-190-42-162-146]^-$ correspondant à la perte successive de 3 hexoses, d'un groupement diméthoxycinnamoyle, d'une fonction acétyle et d'un 6-déoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 6 protons anomériques résonnant à δ 6.32 (d, $J = 1.1$ Hz), 6.02 (d, $J = 8.3$ Hz), 4.97 (d, $J = 7.6$ Hz), 4.86 (d, $J = 7.3$ Hz), 4.78 (d, $J =$

7.4 Hz) et 4.74 (d, $J = 7.3$ Hz), qui corrélient sur le spectre HSQC avec 6 carbones anomériques à δ 101.1, 94.2, 104.8, 103.9, 106.5, 104.0, respectivement. Les spectres RMN 1D et 2D ont permis de caractériser 6 sucres :

- Deux β -glucopyranosyle dont les protons anomères résonnent à δ 4.97 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc-I) et à δ 4.74 (d, $J = 7.3$ Hz, Glc-II)
- Un β -galactopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.86 (d, $J = 7.6$ Hz)
- Un β -xylopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.78 (d, $J = 7.4$ Hz)
- Un β -fucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.02 (d, $J = 8.3$ Hz)
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.32 (d, $J = 1.1$ Hz).

L'analyse des spectres ^1H et ^{13}C a permis l'identification des signaux identiques à ceux des composés **Sw264a/Sw264b** précédemment décrits. Il s'agit des signaux suivants :

- Signaux de la prosapogénine (Ténuifoline) c'est à dire le 3- O - β -D-glucopyranosyl-présénégénine
- Signaux de la séquence oligosaccharidique O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O -[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4- O -[(E)-3,4-diméthoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranoside fixé en position 28 de la présénégénine.

On observe des différences majeures entre **Sw21a/Sw21b** et **Sw264a/Sw264b**

- Le déblindage observé en position 3 du rhamnose à δ_H 5.46 (dd, $J = 8.7, 4.0$ Hz)/ δ_C 75.7 suggère une substitution.
- Les signaux caractéristiques d'une fonction acétyle à δ_H 2.00/ δ_C 20.6 et δ_C 171.5 confirment l'acétylation de la position 3 du rhamnose.
- D'autres signaux additionnels ont également été observés et attribués. Il s'agit d'une corrélation HMBC entre δ_H 4.86 (d, $J = 7.4$ Hz, Gal-1) et δ_C 77.1 (Xyl-4) qui indique que le galactose est lié au xylose par une liaison (1 \rightarrow 4). ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 4.86 (d, $J = 7.4$ Hz, Gal-1) et δ_H 4.27 (Xyl-4).

Conclusion

L'ensemble de ces données permet d'établir la structure de **Sw21a/Sw21b** comme étant le 3- O - β -D-glucopyranosyl-présénégénine 28-[O - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -3- O -acétyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O -[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4- O -[(E)-3,4-diméthoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranoside (**Sw21a**) et son isomère Z (Timité et al., 2010b).

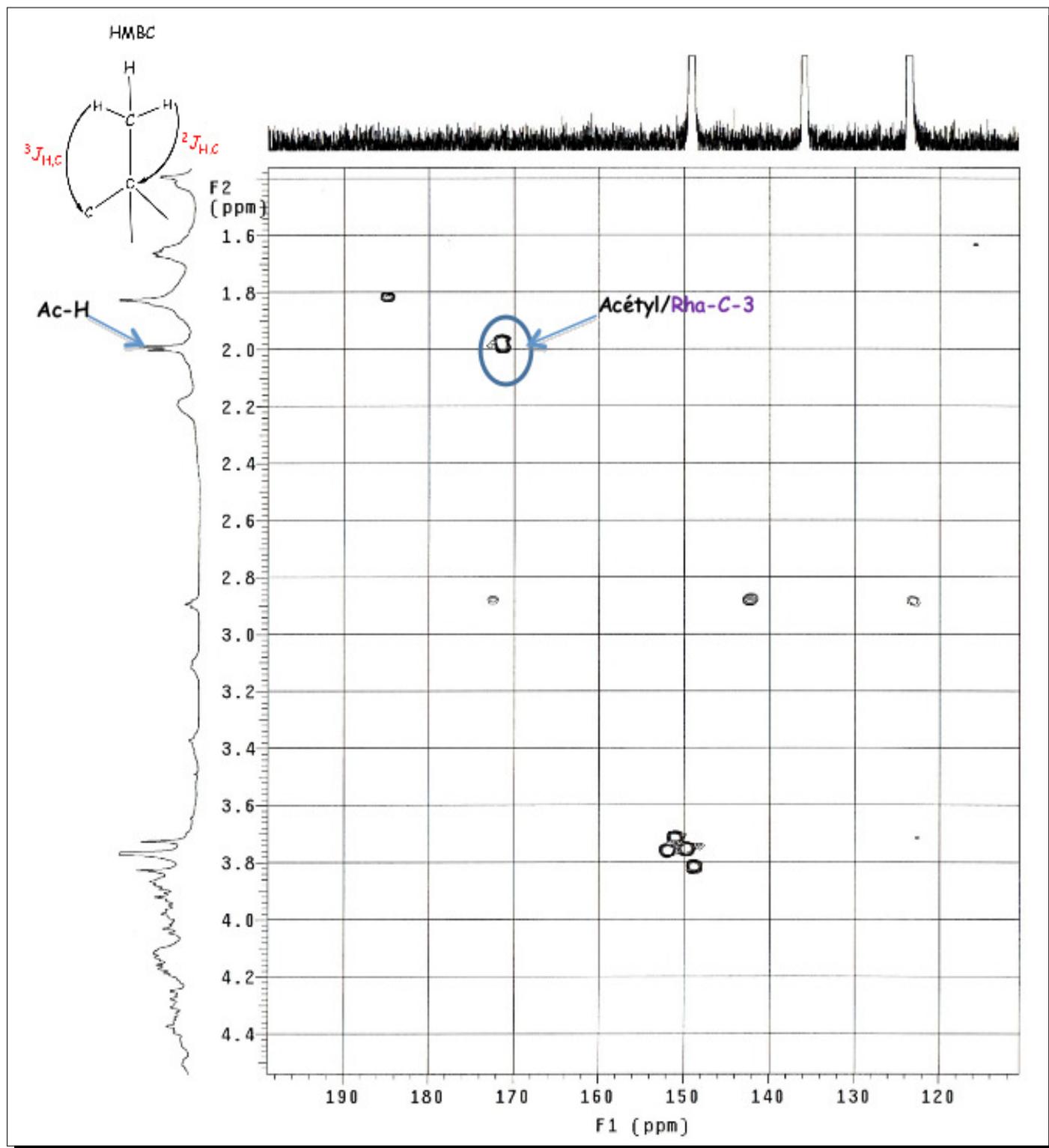


FIGURE 2.28 – Spectre **HMBC** montrant l'acétylation de la position C-3 du rhamnose de la saponine **SW21**

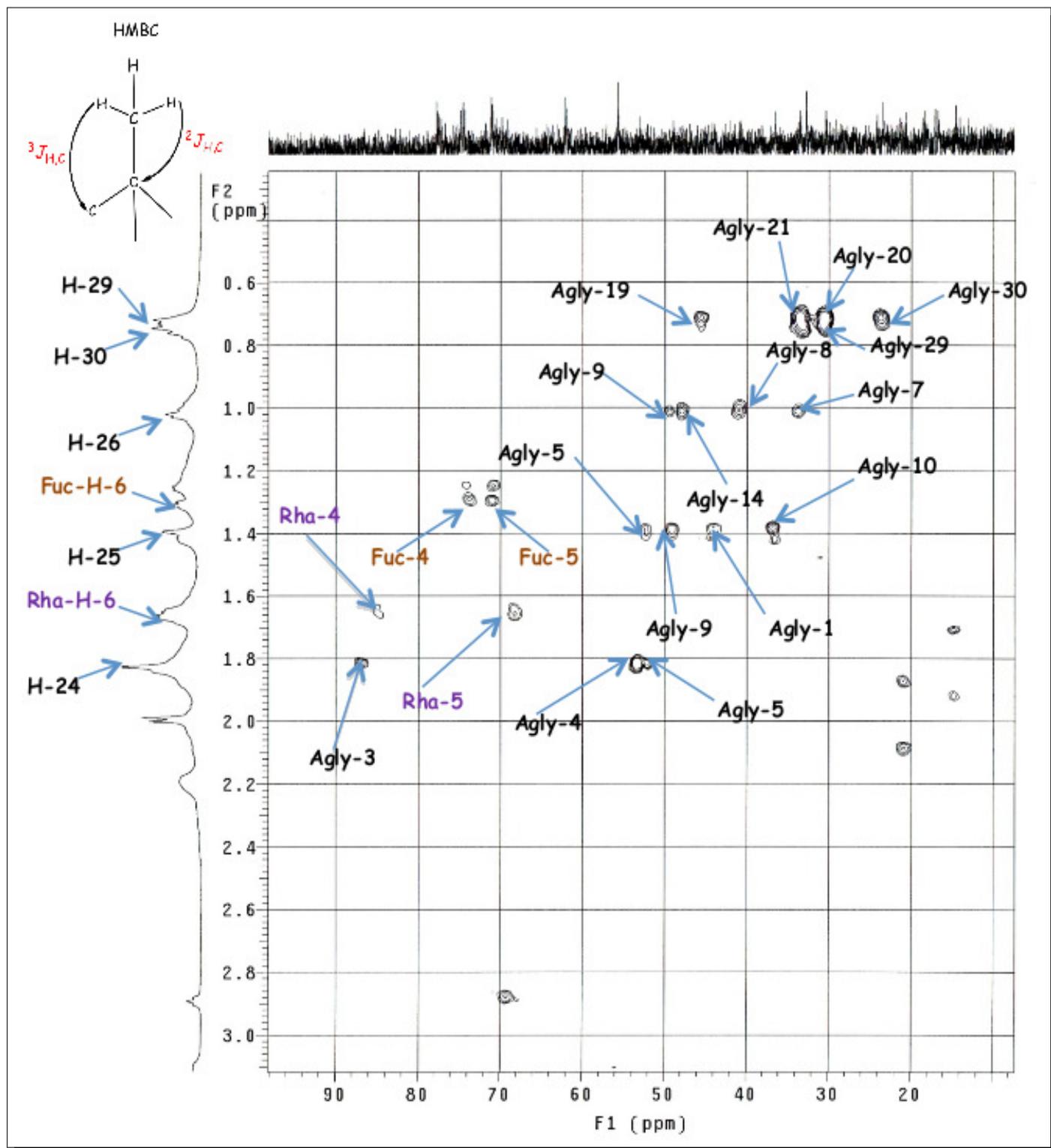


FIGURE 2.29 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine SW21

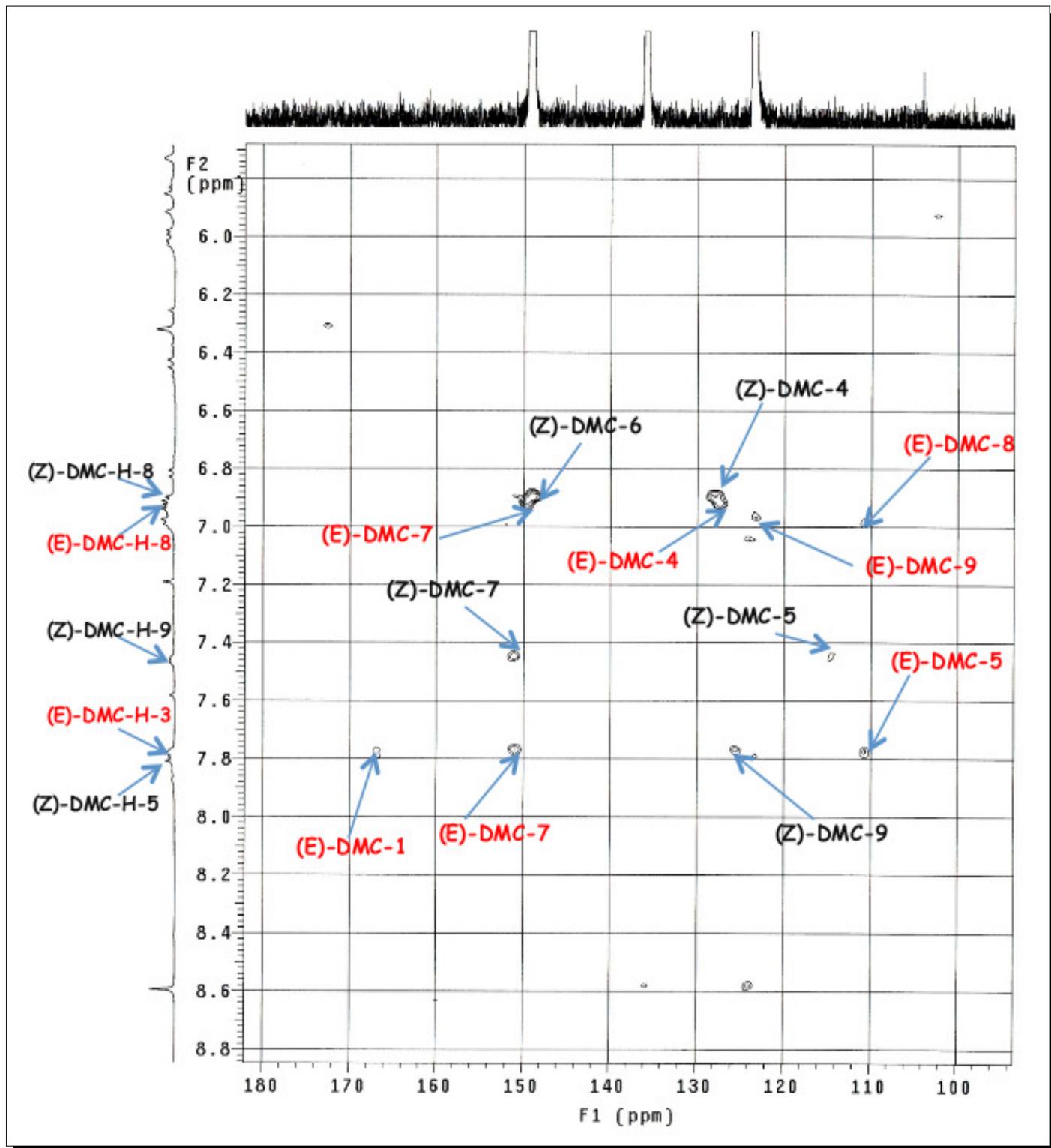


FIGURE 2.30 – Spectre HMBC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW21

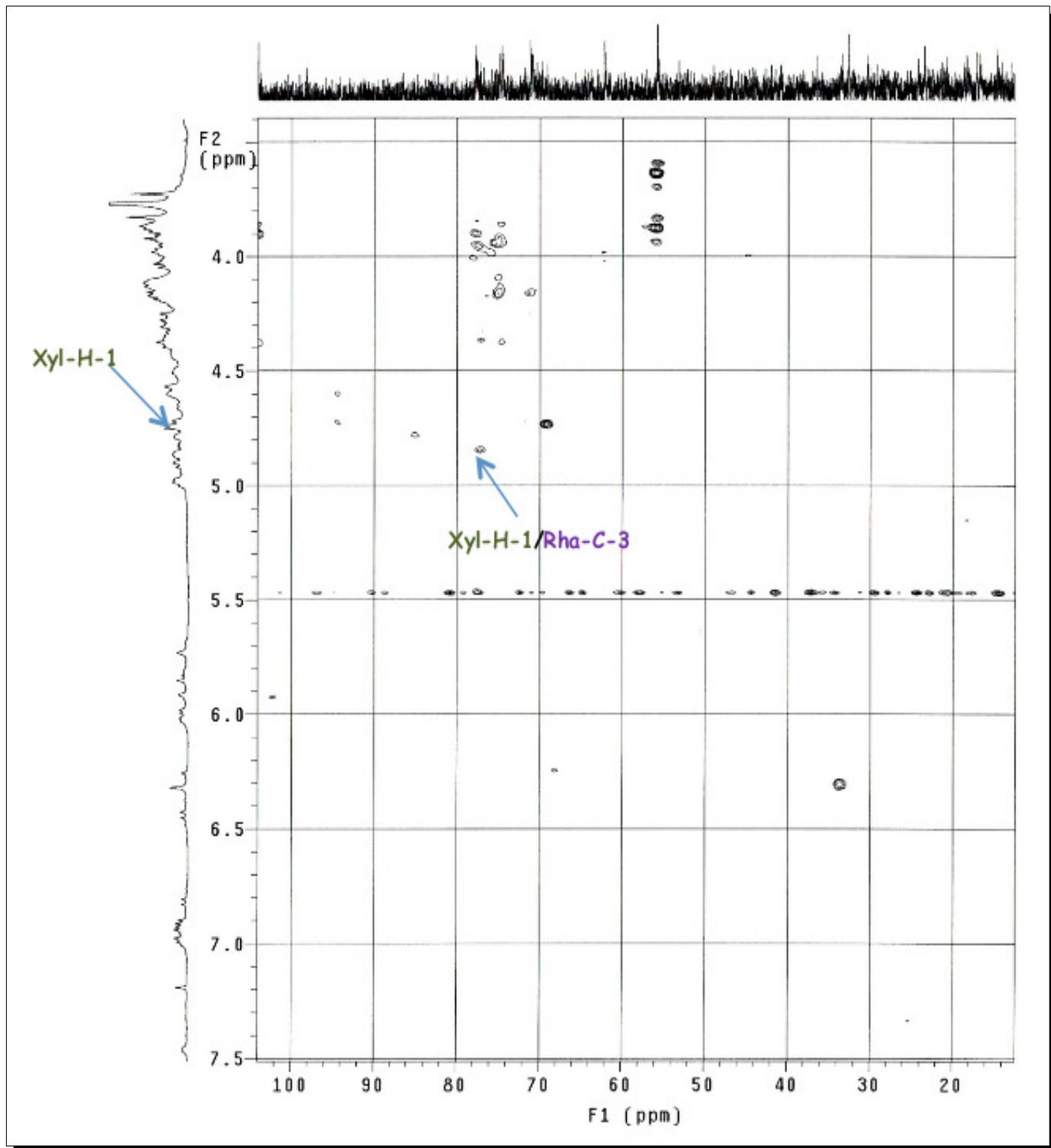


FIGURE 2.31 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine SW21

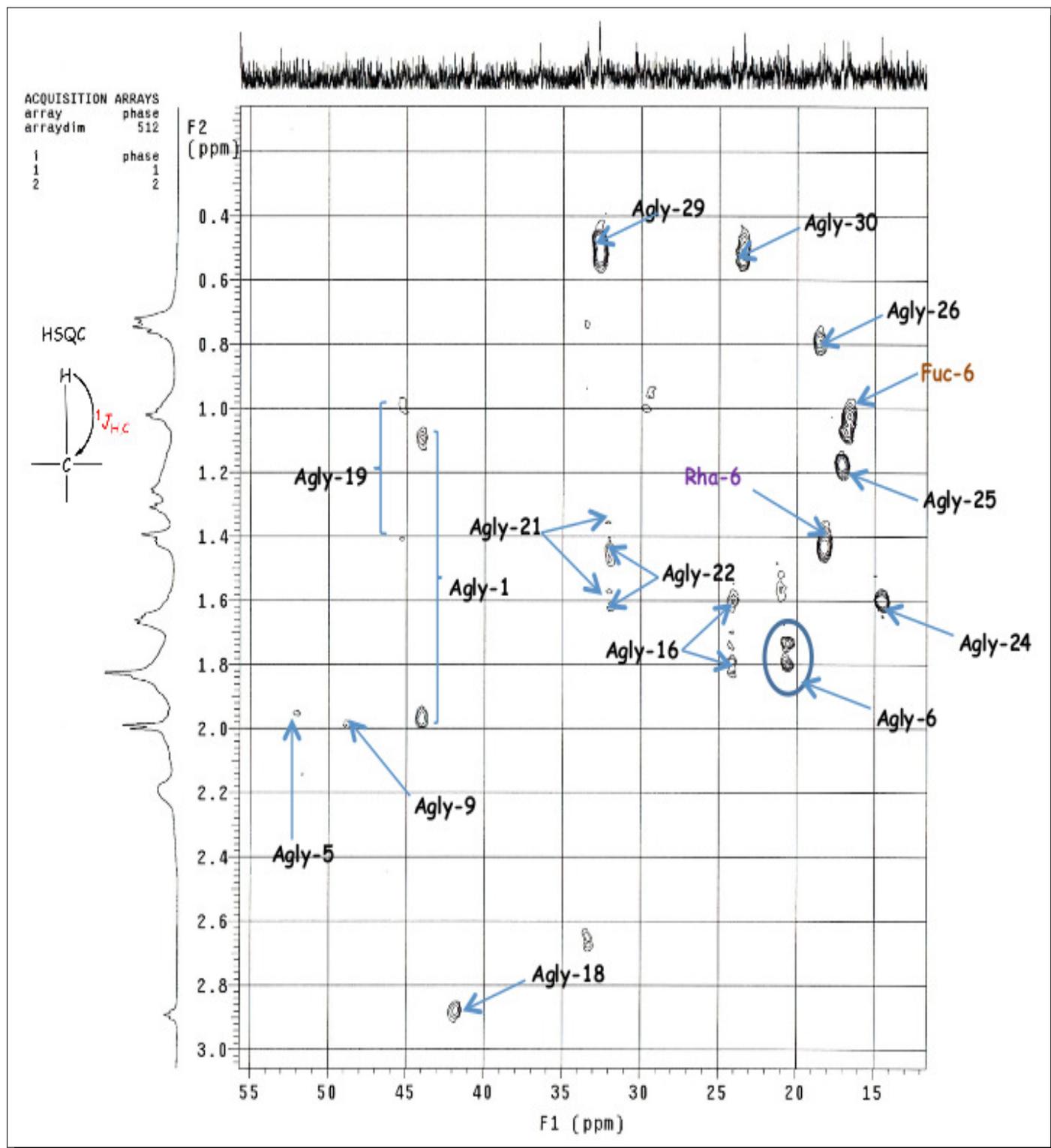


FIGURE 2.32 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW21

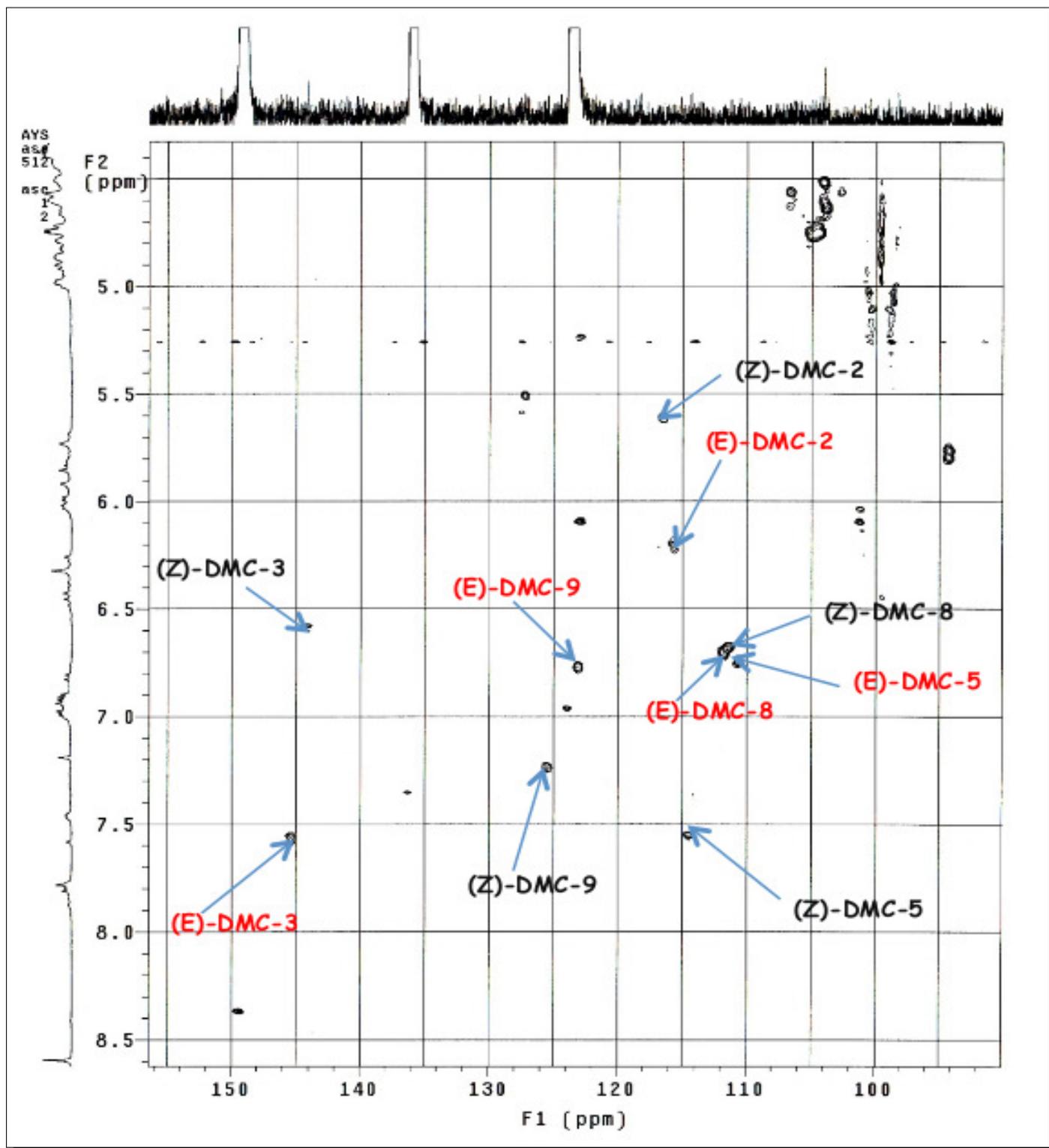


FIGURE 2.33 – Spectre HSQC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW21

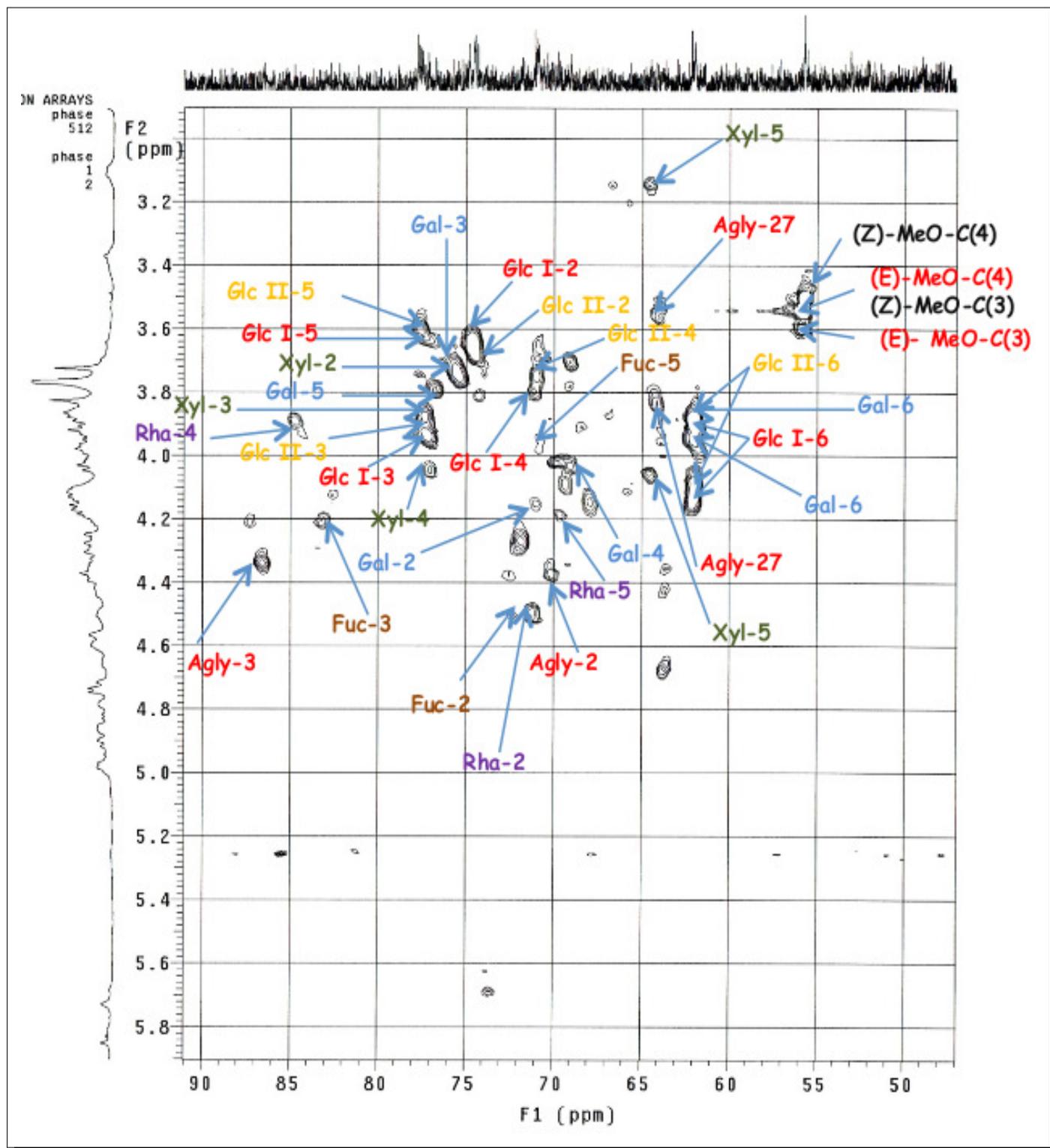


FIGURE 2.34 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW21

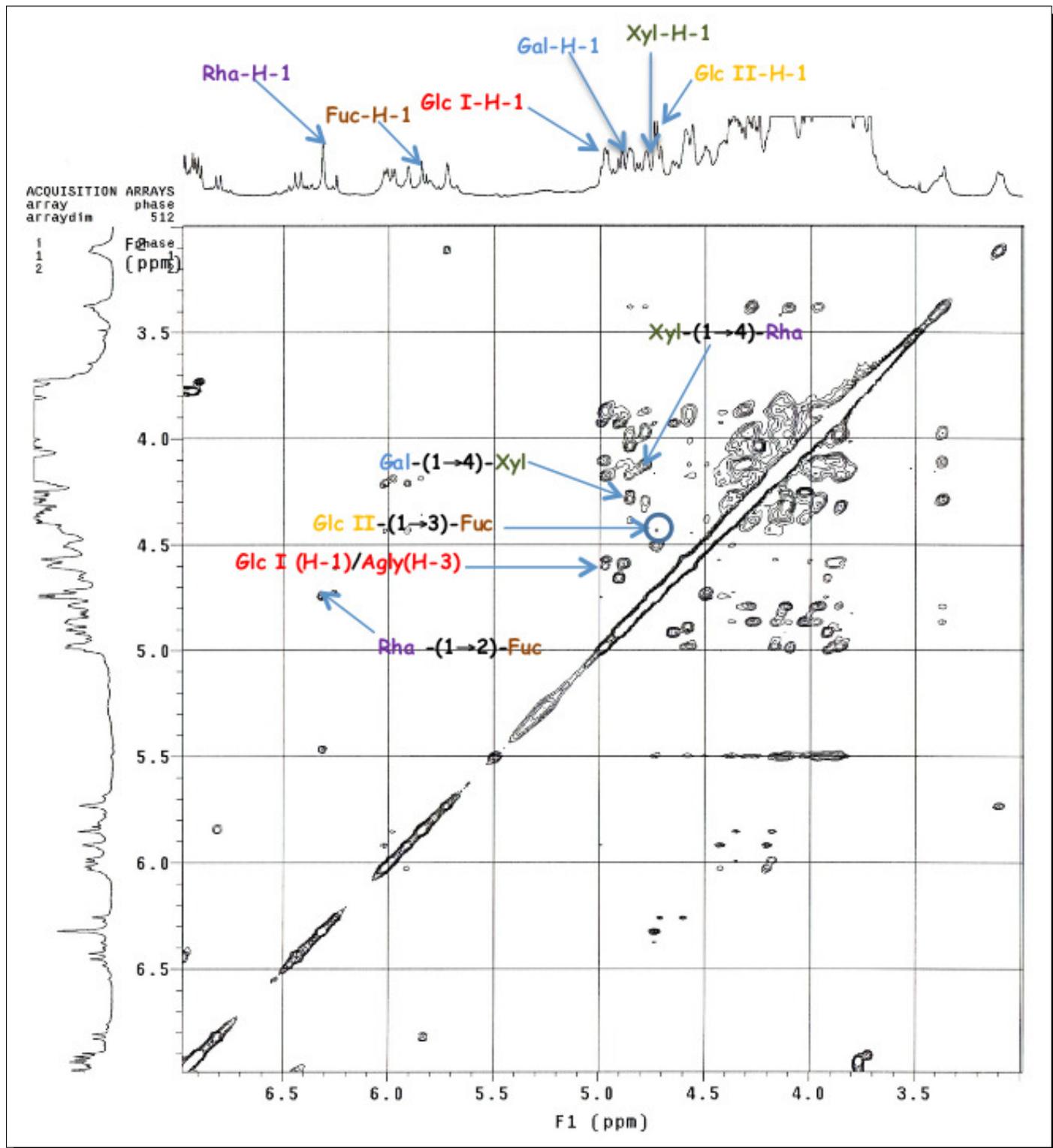


FIGURE 2.35 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW21

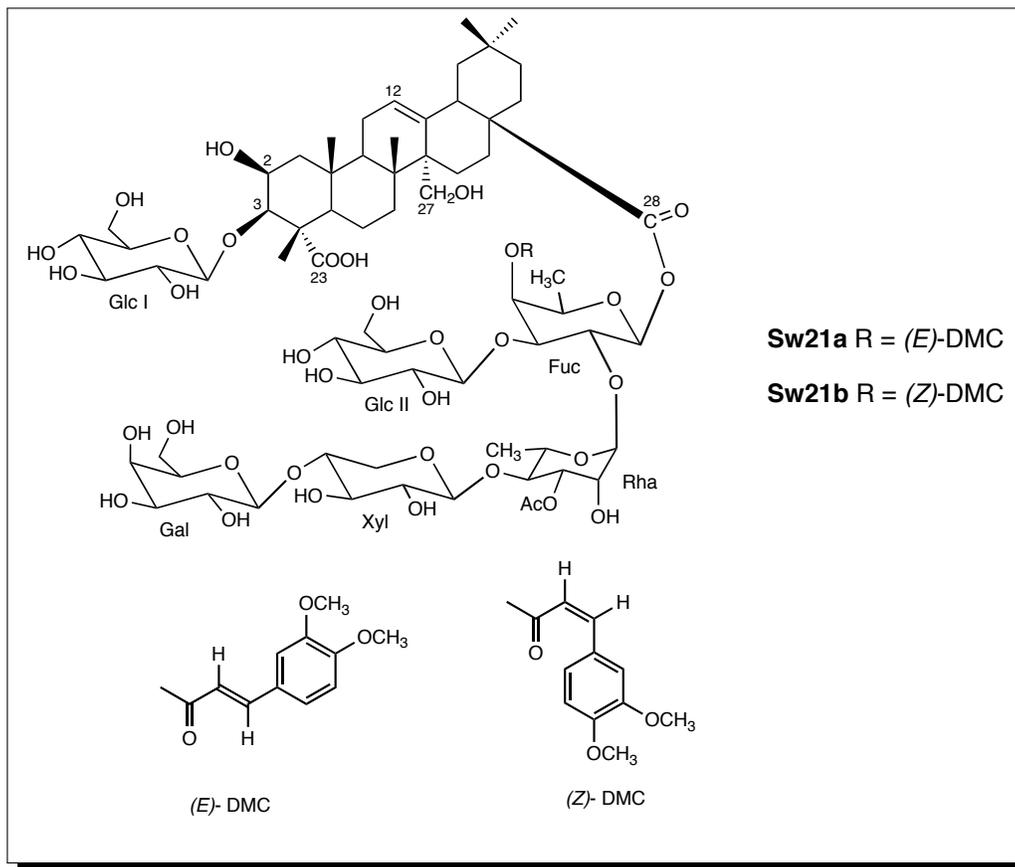


FIGURE 2.36 – Structure du composé **Sw21**

2.2.2.3 Détermination structurale du composé Sw231

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) donne un ion quasi-moléculaire à $m/z = 1265 [M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 1266 uma, en accord avec la formule brute $C_{59} H_{94} O_{29}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 971 [M-H - 162 - 132]^-$ et $825 [M-H - 162 - 132 - 146]^-$ correspondant à la perte successive d'un hexose, d'un pentose et d'un désoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 5 protons anomériques résonnant à δ 6.58 (d, $J = 1.2$ Hz), 5.87 (d, $J = 8.3$ Hz), 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz), 4.79 (d, $J = 7.4$ Hz) et 4.78 (d, $J = 7.4$ Hz), qui corrélient sur le spectre HSQC avec 5 carbones anomériques à δ 101.0, 94.5, 104.8, 106.2 et 102.6, respectivement. Les spectres RMN 1D et 2D ont permis de caractériser

les 5 sucres :

- Un β -glucopyranosyl dont le proton anomère résonne à δ 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz)
- Un β -galactopyranosyl dont le proton anomère résonne à δ 4.78 (d, $J = 7.4$ Hz)
- Un β -xylopyranosyl dont le proton anomère résonne à δ 4.79 (d, $J = 7.4$ Hz)
- Un β -fucopyranosyl dont le proton anomère résonne à δ 5.87 (d, $J = 8.3$ Hz)
- Un α -rhamnopyranosyl dont le proton anomère résonne à δ 6.58 (d, $J = 1.2$ Hz)

La comparaison des spectres RMN 1D et 2D du composé **Sw231** avec les précédentes saponines (**Sw21a/Sw21b** et **Sw21a/Sw21b**), permet de noter que ces composés possèdent des structures très proches à quelques différences près. On retrouve notamment les signaux du marqueur chimiotaxonomique à savoir le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-présénégénine 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopyranoside] (Mitaine-Offer et al., 2005).

Contrairement aux deux premiers composés qui contiennent un fucose dont les positions 1,2,3 et 4 sont substituées, Le spectre HMBC suggère que le composé **Sw231** possède un fucose 1,2-disubstitué. On note la disparition des signaux du groupement méthoxycinnamoyle, ce qui signifie que le fucose est désacylé et cela se traduit par le blindage du proton H-4 du fucose à δ 3.95. Après soustraction des signaux du glucose, fucose, rhamnose et xylose, il reste les signaux d'un galactose terminal. Le déblindage du carbone C-3 du xylose à δ 86.2 suggère la substitution de cette position par le galactose terminal.

Conclusion L'ensemble de ces données nous permet ainsi d'établir la structure de **Sw231** comme étant le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-présénégénine 28-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranoside (Timité et al., 2010b).

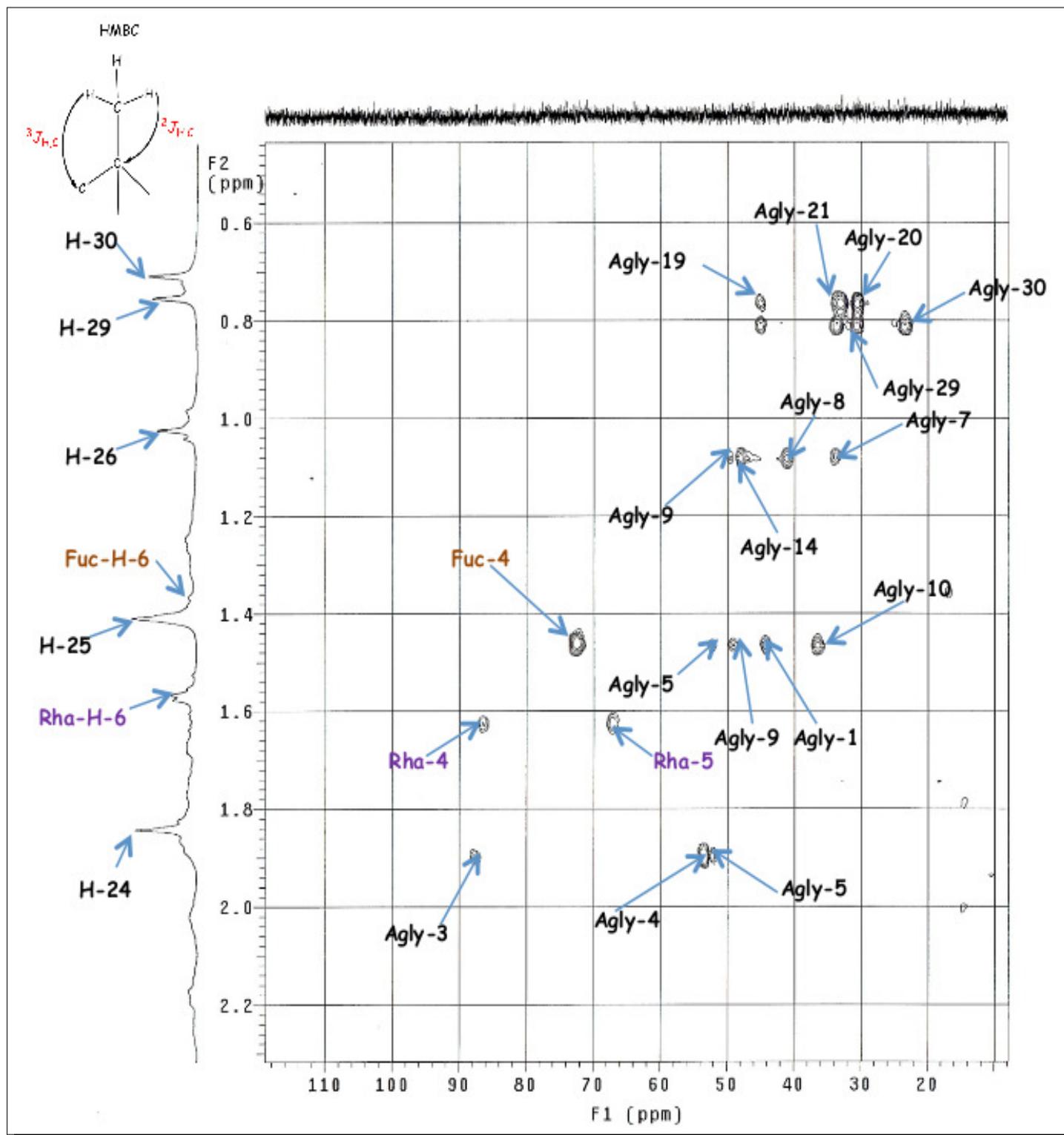


FIGURE 2.37 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **SW231**

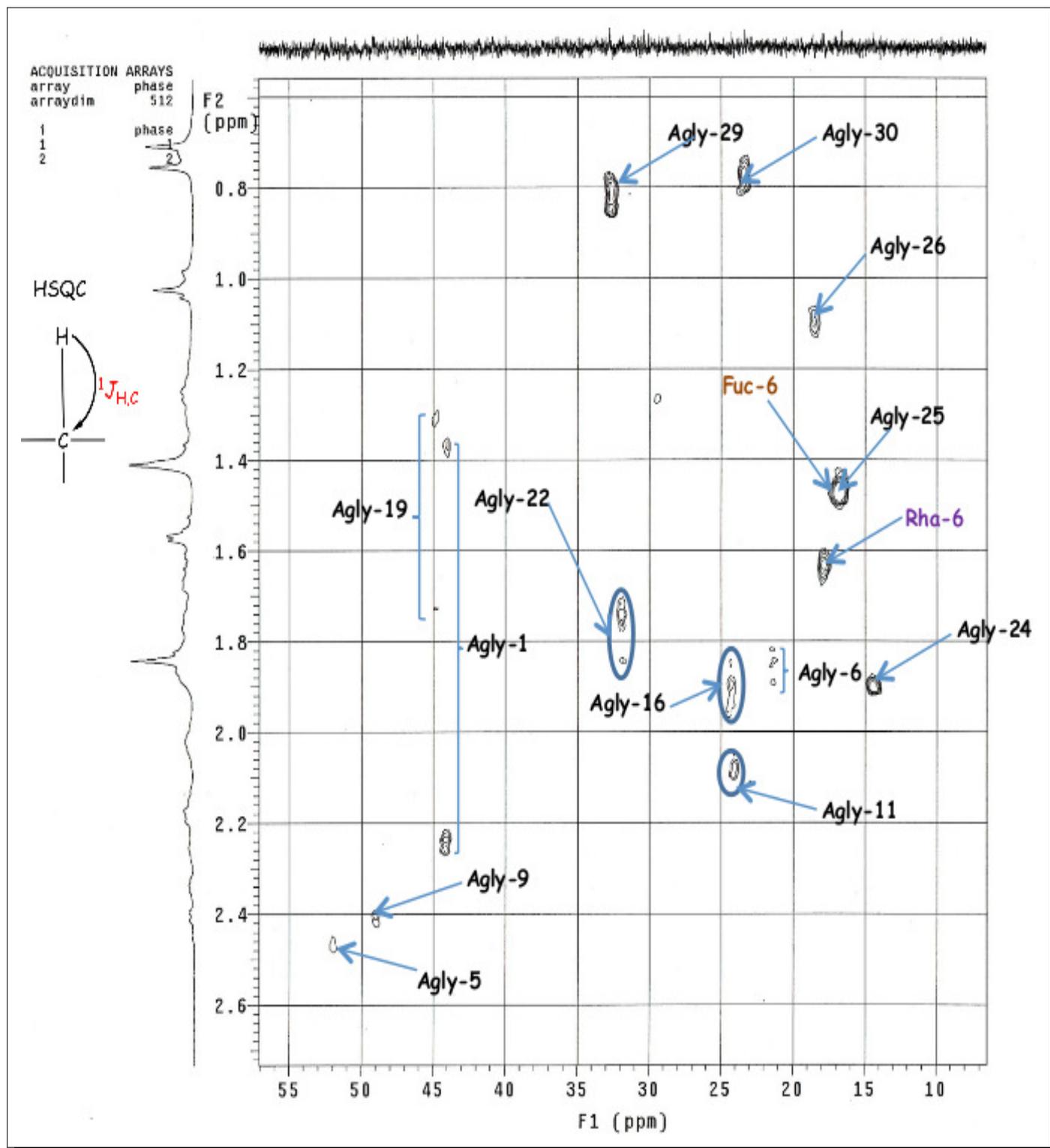


FIGURE 2.38 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW231

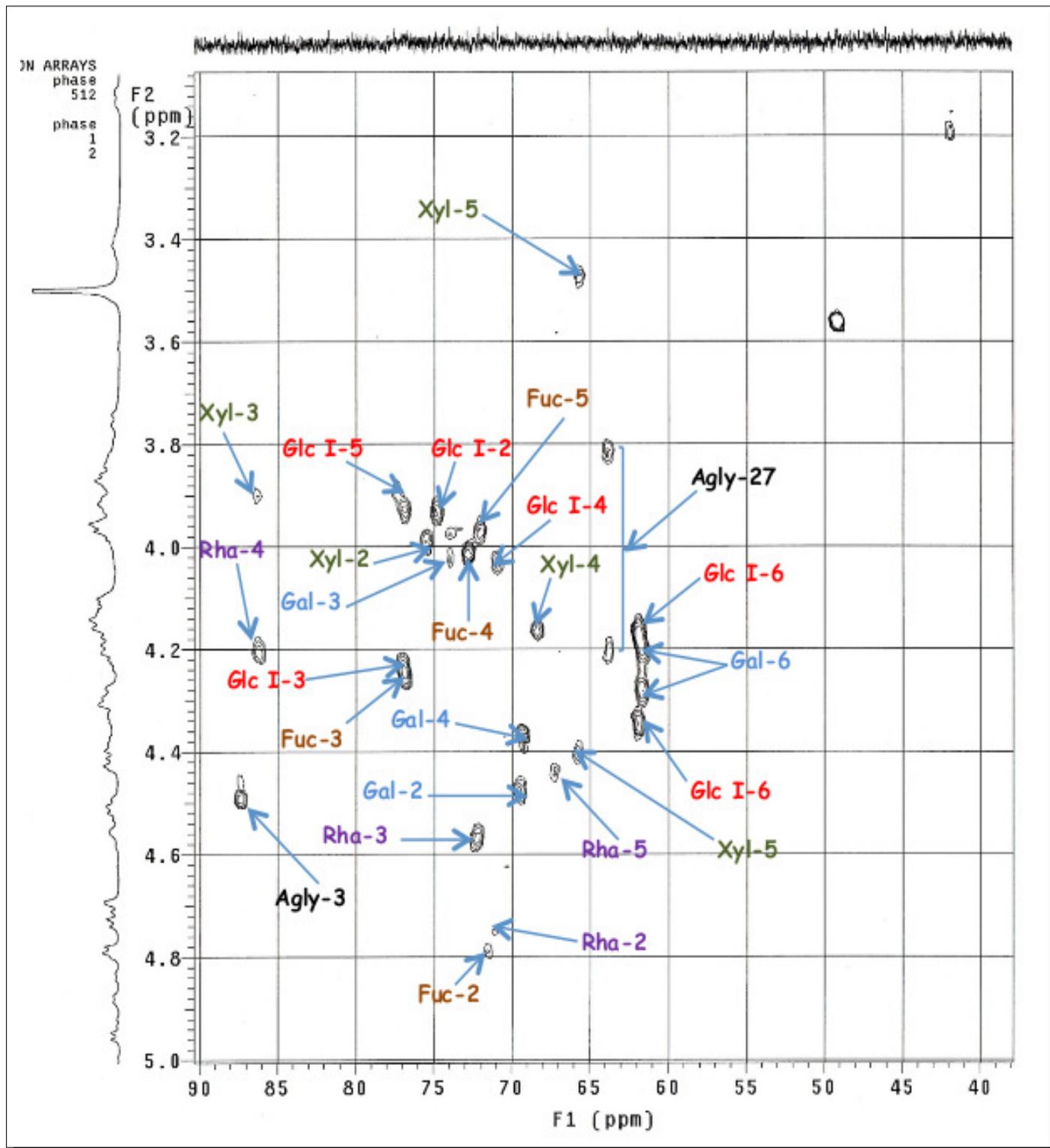


FIGURE 2.39 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW231

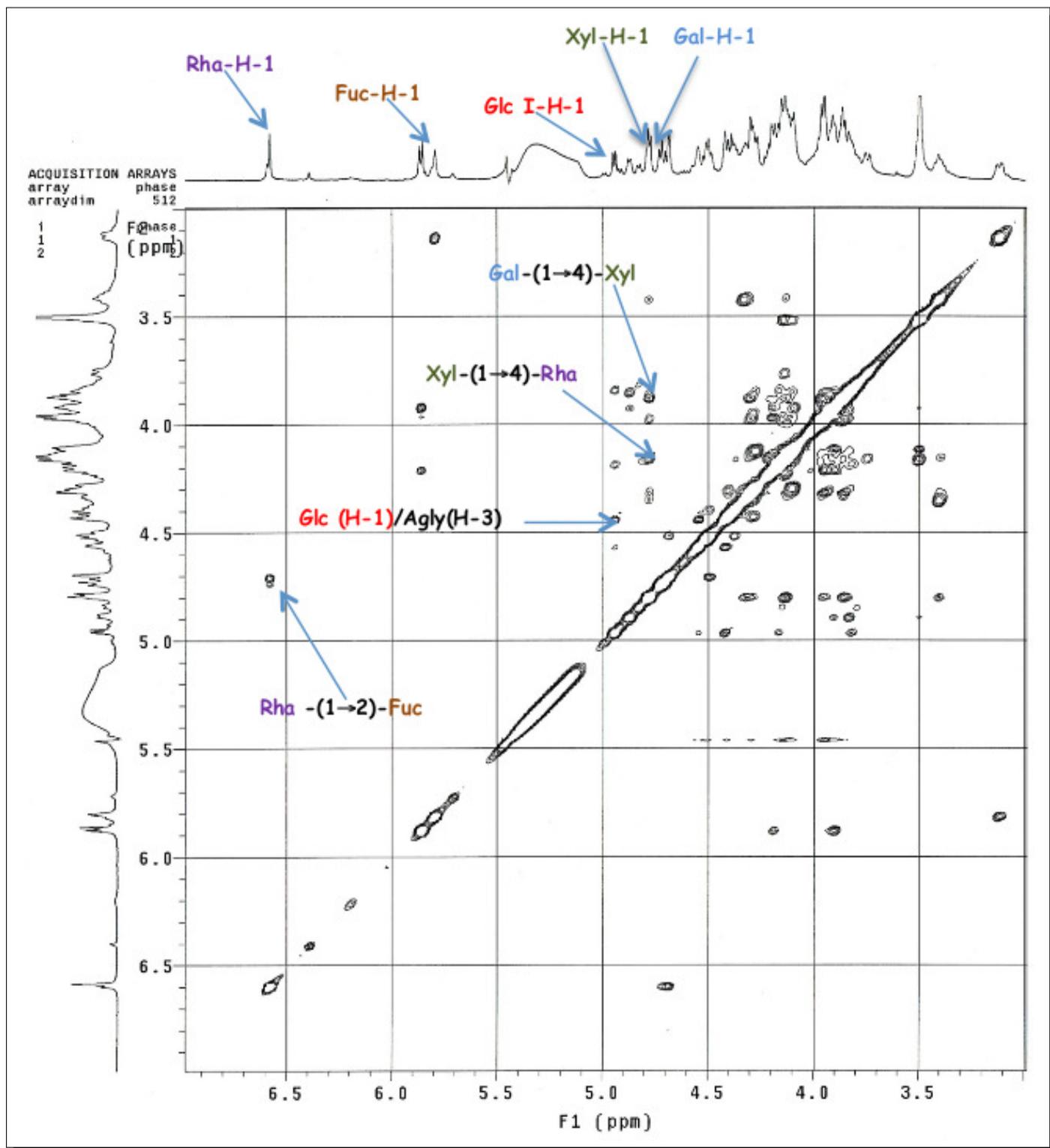
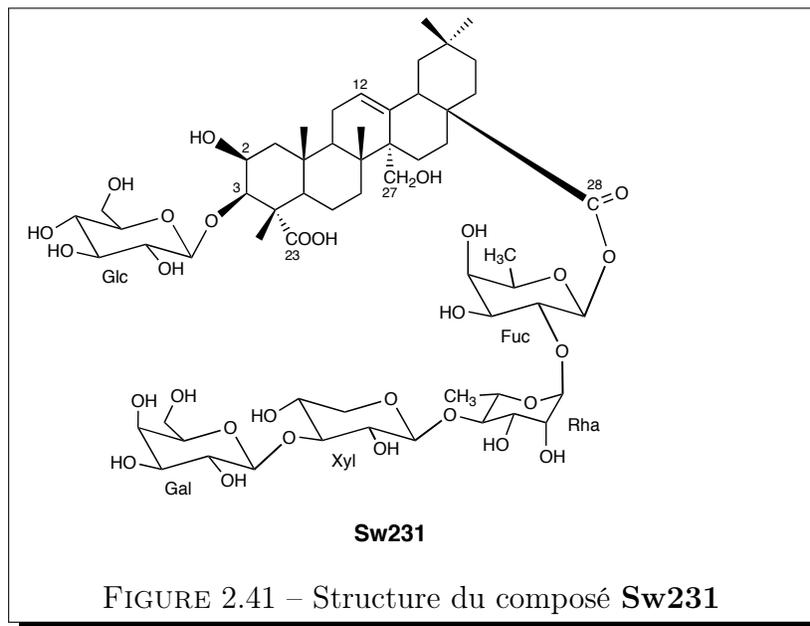


FIGURE 2.40 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW231



2.2.3 Conclusion de l'étude chimique du *Securidaca welwitschii*

L'étude chimique du *Securidaca welwitschii* a conduit à l'isolement et la détermination structurale de 5 saponines triterpéniques, à savoir **Sw264a**, **Sw264b**, **Sw21a**, **Sw21b**, **Sw231**, toutes nouvelles. Au plan chimiotaxonomique :

- Toutes les molécules sont des glycosides de présénégénine. La présénégénine, qui est l'acide (2 β ,3 β ,4 α)-2,3,27-trihydroxyolean-12-ène-23,28-dioïque est la sapogénine la plus fréquemment rencontrée dans la famille des **Polygalaceae** (cf. Tableaux 2.15-2.20).
- 2 paires de ces glycosides de présénégénine, c'est à dire **Sw264a/Sw264b** et **Sw21a/Sw21b** sont acylées par des groupements *E*- et *Z*-3,4-diméthoxycinnamoyle.
- La position 3 de la présénégénine des 5 molécules porte un glucose, ce qui est caractéristique des glycosides de présénégénine. On y rencontre quelquefois le disaccharide β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl.
- On note l'acylation de la position C-4 du fucose des saponines **Sw264a/Sw264b** et **Sw21a/Sw21b** par l'acide méthoxycinnamique . Ce qui est le plus fréquent chez les glycosides de présénégénine.
- Enfin, on retrouve la séquence 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-présénégénine 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranoside], connue comme le marqueur chimiotaxonomique de la famille des **Polygalaceae** (Lacaille-Dubois and Mitaine-Offier,

2005).

Cette étude chimique vient donc confirmer les résultats de la première étude des saponines contenues dans le *Securidaca welwitschii*. En effet, depuis les années 70, Delaude et collaborateurs, ont initié une série d'études phytochimiques intitulées "**Contribution à l'étude des saponines contenues dans les Polygalacées**". L'objectif était de mieux définir la composition chimique des Polygalaceae afin de retenir un caractère qui pouvait être utilisé pour les définir et les classer. Ils ont donc procédé à l'étude phytochimique des *Securidaca longepedunculata* fres. Var *Parvifolia* et le *Polygala acicularis*. OLIV. (Delaude, 1971), *Securidaca welwitschii* Oliv. (Davreux and Delaude, 1971), *Carpolobia glabrescens* Hutch. et Dalz (Delaude and Davreux, 1972a) et *Polygala erioptera* DC. (Delaude and Davreux, 1972b). Ces travaux ont abouti aux conclusions suivantes :

- Les saponines dérivées de l'acide $(2\beta,3\beta,4\alpha)$ -2,3,27-trihydroxyolean-12-ène-23,28-dioïque s'y retrouvent fréquemment.
- L'association **salicylate de méthyle** et saponines dérivant de l'acide $(2\beta,3\beta,4\alpha)$ -2,3,27-trihydroxyolean-12-ène-23,28-dioïque, pourrait constituer un critère de classification des Polygalaceae.

Ces propositions certes prématurées à l'époque vu le nombre limité de cas étudiés, ont été confirmées et renforcées avec le temps. Notre étude vient ainsi consolider les précédentes et contribue à affiner les critères chimiotaxonomiques au sein des Polygalaceae.

Enfin pour des raisons de rendement faible (cf. **Publication 2**), ces molécules n'ont pas fait l'objet d'études pharmacologiques. Toutefois, il est important de noter que plusieurs glycosides de présénégénine ont déjà été testés (cf. Etudes biologiques antérieures) : Il s'agit des activités antiangiogénique (Arai et al., 2011), antipsychotique (Chung et al., 2002), hypolipémiant (Li et al., 2008a), immunoadjuvante (Nagai et al., 2001), cytotoxique (Diome et al., 2007, Elbandy et al., 2002a, Mitaine-Offer et al., 2010), immunomodulatrice (Mitaine-Offer et al., 2003). La nature de l'acide cinnamique estérifiant le fucose serait d'une importance capitale pour l'activité biologique de ces molécules (Mitaine-Offer et al., 2002).

Presenegenin Glycosides from *Securidaca welwitschii*

by **Gaoussou Timité^{a)}**, **Anne-Claire Mitaine-Offier^{a)}**, **Tomofumi Miyamoto^{b)}**, **Chiaki Tanaka^{b)}**,
Thomas Paululat^{c)}, **Clément Delaude^{d)}**, and **Marie-Aleth Lacaille-Dubois^{*a)}**

^{a)} Laboratoire de Pharmacognosie, Unité de Molécules d'Intérêt Biologique, UMIB UPRES-EA 3660,
Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 21079 Dijon Cedex

(phone: +33380393229; fax: +33380393300; e-mail: m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr)

^{b)} Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

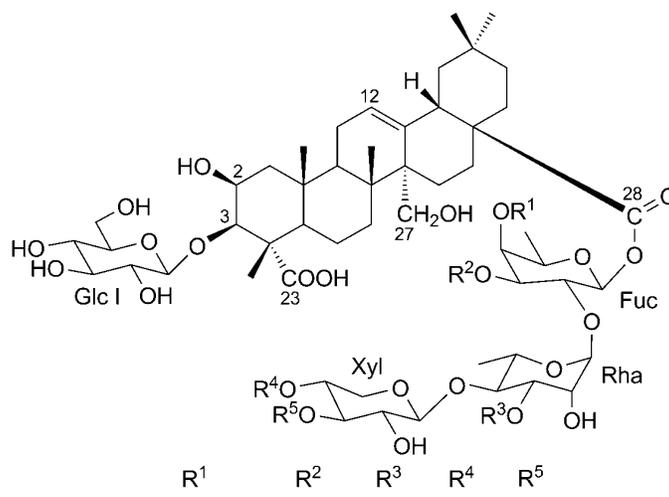
^{c)} Universität Siegen, FB8, OC-II (AK Ihmels), Adolf-Reichwein-Strasse 2, D-57068 Siegen

^{d)} Centre de Recherche Phytochimique, Université de Liège, Institut de Chimie-B6, Sart Tilman,
B-4000-Liège I

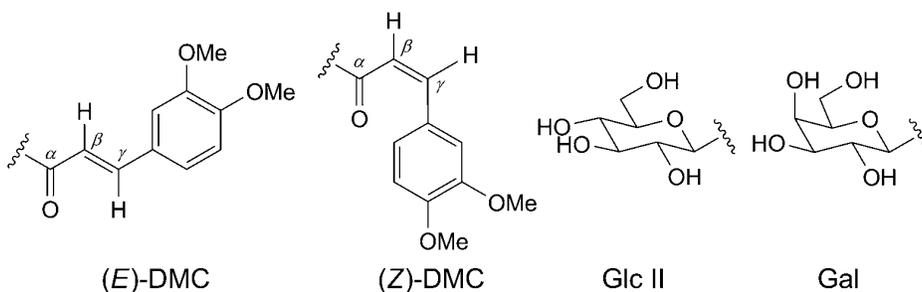
The five new presenegenin glycosides **1–5** were isolated from *Securidaca welwitschii*, together with one known sucrose diester. Compounds **1–4** were obtained as pairs of inseparable (*E*)/(*Z*)-isomers of a 3,4-dimethoxycinnamoyl derivative, *i.e.*, **1/2** and **3/4**. Their structures were elucidated mainly by 2D-NMR techniques and mass spectrometry as 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-{*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranosyl} ester (**1**) and its (*Z*)-isomer **2**, 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-{*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-3-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranosyl} ester (**3**) and its (*Z*)-isomer **4**, and 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl] ester (**5**) (presenegenin = (2 β ,3 β ,4 α)-2,3,27-trihydroxyolean-12-ene-23,28-dioic acid).

Introduction. – The plants of the Polygalaceae family are known to contain saponins [1]. Most of them are acylated by methoxycinnamic acids, and possess a common structural sequence consisting of 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl] ester, which represents a chemotaxonomic marker [2] (presenegenin = (2 β ,3 β ,4 α)-2,3,27-trihydroxyolean-12-ene-23,28-dioic acid). This prompted us to study the genus *Securidaca* in the framework of our study of the saponin constituents of the Polygalaceae family. In a previous contribution, we reported on the isolation and characterization of trimethoxycinnamoyl saponins from *S. longepedunculata* [3]. We have now extended our investigations to another species *S. welwitschii* OLIV. It is a liana (until 25 m high) widely distributed in Guinea, Cameroon, Democratic Republic of Congo, Angola, and Uganda [4]. This plant was reported to contain methyl salicylate and one major saponin deriving from presenegenin. Its sugar part was constituted by glucose, galactose, xylose, arabinose, fucose, and rhamnose [4]. Its use in traditional medicine is rare excepted for eyes affections [4]. In this article, we describe the isolation from the stem barks and the structural elucidation of five new triterpene saponins with presenegenin as aglycon, and one known sucrose diester previously isolated from *S. longepedunculata* [5].

Results and Discussion. – A concentrated BuOH-soluble fraction of the 70% aqueous MeOH extract of the stem barks of *S. welwitschii* was subjected to successive chromatographic methods (vacuum-liquid chromatography and medium-pressure liquid chromatography with normal and reversed-phase (*RP-18*) silica gel). Five triterpene saponins **1–5** were isolated, with **1–4** as two pairs of inseparable (*E*)/(*Z*)-isomers of a 3,4-dimethoxycinnamoyl derivative, *i.e.*, **1/2** and **3/4**, along with the known sucrose ester 3-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl 6-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- α -D-glucopyranoside [5]. Their structures were elucidated mainly by 600 MHz 2D-NMR (^1H , ^1H -COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), and mass spectrometry.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	(<i>E</i>)-DMC	Glc II	H	H	H
2	(<i>Z</i>)-DMC	Glc II	H	H	H
3	(<i>E</i>)-DMC	Glc II	Ac	Gal	H
4	(<i>Z</i>)-DMC	Glc II	Ac	Gal	H
5	H	H	H	H	Gal



For compounds **1–5**, the ^1H - and ^{13}C -NMR signals of the prosapogenin assigned from the 2D-NMR spectra were in good agreement with those of tenuifoline (= 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin) commonly encountered in the Polygalaceae (*Table 1*) [6–8]. The differences between them were located at the oligosaccharidic chain linked to C(28) of the aglycon, which possessed a characteristic shielded signal of an ester function at $\delta(\text{C})$ 176.4–176.8. The monosaccharides obtained by acid hydrolysis of each compound were identified by comparison on TLC with authentic samples as glucose, fucose (= 6-deoxygalactose), xylose, and rhamnose (= 6-deoxymannose) (in the case of **1/2**), and glucose, galactose, fucose, xylose, and rhamnose (in

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR Data (C₃D₅N, 600 MHz) of the Aglycone Part of **1–5**^a. δ in ppm, J in Hz.

	1/2		3/4		5	
	δ(C)	δ(H)	δ(C)	δ(H)	δ(C)	δ(H)
CH ₂ (1)	44.1	1.34, 2.20	44.0	1.3, 2.20	44.0	1.29, 2.17
CH(2)	71.3	4.74	70.1	4.58–4.62 (<i>m</i>)	70.2	4.54–4.58 (<i>m</i>)
CH(3)	86.7	4.59 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.5)	86.4	4.57 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.5)	87.3	4.43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3.0)
C(4)	53.1		53.0		53.5	
CH(5)	52.1	2.21	52.1	2.19	52.0	2.40
CH ₂ (6)	21.0	1.72, 1.85	20.6	1.74, 1.80	21.2	1.74, 1.82
CH ₂ (7)	33.4	^b)	33.5	0.96, 1.16	33.5	^b)
C(8)	40.7		41.0		41.1	
CH(9)	48.9	2.23	48.9	2.22	49.0	2.33
C(10)	36.5		36.5		36.0	
CH ₂ (11)	23.0	^b)	23.0	^b)	23.0	^b), 2.04
CH(12)	127.1	5.72 (<i>t</i> -like)	127.2	5.72 (<i>t</i> -like)	127.4	5.80 (<i>t</i> -like)
C(13)	139.9		139.9		139.8	
C(14)	47.9		47.9		48.0	
CH ₂ (15)	24.2	1.86, 2.04	24.2	1.83, 2.03	24.4	1.77, 1.82
CH ₂ (16)	24.0	1.84, 2.02	24.4	1.84, 2.06	24.2	^b), 2.01
C(17)	46.9		46.9		46.9	
CH(18)	41.4	3.11 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12.9, 3.0)	41.9	3.11 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13.7, 3.0)	41.9	3.12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13.7, 3.0)
CH ₂ (19)	45.1	1.22, 1.64	45.3	1.24, 1.64	44.8	1.23, 1.66
C(20)	30.3		30.3		30.9	
CH ₂ (21)	33.5	^b)	33.4	^b)	33.6	^b)
CH ₂ (22)	31.8	1.70, 1.84	31.9	1.66, 1.85	31.8	1.66, 1.76
C(23)	183.4		184.7		186.0	
Me(24)	14.6	1.84 (<i>s</i>)	14.6	1.82 (<i>s</i>)	14.2	1.84 (<i>s</i>)
Me(25)	17.0	1.40 (<i>s</i>)	17.1	1.41 (<i>s</i>)	16.7	1.41 (<i>s</i>)
Me(26)	18.5	1.00 (<i>s</i>)	18.5	1.02 (<i>s</i>)	18.4	1.01 (<i>s</i>)
CH ₂ (27)	64.0	3.76, 4.08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12.0)	64.0	3.76, 4.06	63.9	3.74 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12.4), 4.14
C(28)	176.4		176.8		176.4	
Me(29)	32.6	0.71 (<i>s</i>)	32.6	0.72 (<i>s</i>)	32.6	0.75 (<i>s</i>)
Me(30)	23.3	0.74 (<i>s</i>)	23.3	0.74 (<i>s</i>)	23.3	0.71 (<i>s</i>)

^a) Assignments were confirmed by COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC experiments; overlapped ¹H-NMR signals are reported without designated multiplicity. ^b) Not determined.

the case of **3/4** and **5**). The absolute configurations of the sugars were determined by GC analysis to be D for glucose, galactose, fucose, and xylose, and L for rhamnose (see *Exper. Part*). In the 1D- and 2D-NMR spectra of each compound, the relatively large ³*J*(1,2) values of the anomeric proton signals of glucose, galactose, fucose, and xylose in their pyranose form (7.3–8.5 Hz), indicated a β-orientation [9] (*Table 2*). The large ¹*J*(H(1),C(1)) values of the rhamnose (165–168 Hz) confirmed that the anomeric proton was equatorial (α-pyranoid anomeric form).

Compounds **1/2** exhibited in the HR-ESI-MS (positive-ion mode) a *pseudo*-molecular-ion peak at *m/z* 1479.6413 ([*M* + Na]⁺), consistent with a molecular formula C₇₀H₁₀₄NaO₃₂. The FAB-MS (negative-ion mode) showed a *quasi*-molecular-ion peak at *m/z* 1455 ([*M* – H][–]), which indicated the molecular mass of 1456. Other fragment-

Table 2. ¹H- and ¹³C-NMR Data (C₅D₅N, 600 MHz) of the Sugar Moieties of **1–5**^a. δ in ppm, J in Hz.

	1/2		3/4		5	
	δ(C)	δ(H)	δ(C)	δ(H)	δ(C)	δ(H)
3-O-Sugar:						
Glc I						
H–C(1)	104.3	5.01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.6)	104.8	4.97 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.6)	104.8	4.95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.8)
H–C(2)	74.9	3.88	74.9	3.87	75.0	3.87
H–C(3)	77.2	4.20 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8.8)	77.2	4.17	76.9	4.17
H–C(4)	71.0	3.99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3)	71.1	3.98	70.9	3.97
H–C(5)	77.7	3.85	77.6	3.83	77.3	3.83
CH ₂ (6)	62.0	4.11, 4.31 (<i>br. d</i> , <i>J</i> = 10.5)	62.0	4.11, 4.31 (<i>br. d</i> , <i>J</i> = 10.5)	61.9	4.10, 4.28 (<i>br. d</i> , <i>J</i> = 10.7)
28-O-Sugars:						
Fuc						
H–C(1)	94.1	6.04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.5)	94.2	6.02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3)	94.5	5.87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3)
H–C(2)	72.1	4.77 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8.8)	71.2	4.73	71.6	4.73
H–C(3)	83.3	4.55 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.9, 3.5)	83.1	4.43	76.9	4.19
H–C(4)	74.0	6.05 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3.5)	73.6	5.91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3.5)	72.7	3.95
H–C(5)	70.5	4.21	71.0	4.21	72.0	3.90
Me(6)	16.5	1.23 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.1)	16.8	1.30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.4)	16.8	1.37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.4)
Rha						
H–C(1)	101.0	6.44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.2)	101.1	6.32 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.1)	101.0	6.58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.2)
H–C(2)	71.3	4.72 (<i>br. s</i>)	71.2	4.72 (<i>br. s</i>)	71.0	4.69 (<i>br. s</i>)
H–C(3)	72.0	4.52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.6, 4.3)	75.7	5.46 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.7, 4.0)	72.1	4.50 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.6, 3.9)
H–C(4)	84.4	4.17	84.8	4.12	86.1	4.14
H–C(5)	68.0	4.42	68.0	4.37	67.2	4.37
Me(6)	18.2	1.68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.1)	18.1	1.66 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.1)	17.9	1.57 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.0)
3-AcO			171.5, 20.6	2.00 (<i>s</i>)		
Xyl						
H–C(1)	106.9	4.85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4)	106.5	4.78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4)	106.2	4.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4)
H–C(2)	75.5	4.00 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8.8)	75.5	3.97	75.5	3.92
H–C(3)	77.8	3.99 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8.3)	77.2	4.10	86.2	3.84
H–C(4)	70.1	4.13	77.1	4.27	68.2	4.10
CH ₂ (5)	66.8	3.38 (<i>t</i> , <i>J</i> = 10.5), 4.09	64.6	3.37 (<i>t</i> , <i>J</i> = 11.4), 4.28	65.7	3.41 (<i>t</i> , <i>J</i> = 11.0), 4.34
Glc II						
H–C(1)	105.2	5.06 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.8)	104.0	4.74 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.3)		
H–C(2)	74.9	3.88	74.6	3.90		
H–C(3)	77.7	4.10	77.2	4.15		
H–C(4)	71.0	3.88	71.0	4.03		
H–C(5)	77.9	3.91	77.4	3.85		
CH ₂ (6)	62.5	4.16, 4.44 (<i>br. d</i> , <i>J</i> = 10.5)	62.1	4.18, 4.38		
Gal						
H–C(1)			103.9	4.86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4)	102.6	4.78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4)
H–C(2)			71.0	4.37	69.5	4.41
H–C(3)			75.5	3.96	74.0	3.96
H–C(4)			69.9	4.26	69.2	4.30
H–C(5)			77.0	4.03	76.9	3.86
CH ₂ (6)			61.7	4.13, 4.20	61.6	4.13, 4.21 (<i>br. d</i> , <i>J</i> = 11.2)

^a) Assignments were confirmed by COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC experiments; overlapped ¹H-NMR signals are reported without designated multiplicity.

ion peaks were observed at m/z 1265 ($[M - H - 190]^-$) and 825 ($[M - H - 190 - 162 - 146 - 132]^-$), which revealed the successive loss of one 3,4-dimethoxycinnamoyl group, one hexosyl, one deoxyhexosyl, and one pentosyl moiety. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum data of **1/2** exhibited five anomeric H-atoms at $\delta(\text{H})$ 6.44 ($d, J = 1.2$ Hz), 6.04 ($d, J = 8.5$ Hz), 5.06 ($d, J = 7.8$ Hz), 5.01 ($d, J = 7.6$ Hz), and 4.85 ($d, J = 7.4$ Hz), which correlated, in the HSQC spectrum, to five anomeric C-atoms at $\delta(\text{C})$ 101.0, 94.1, 105.2, 104.3, and 106.9, respectively. Moreover, Me *ds* at $\delta(\text{H})$ 1.23 ($J = 6.1$ Hz) and 1.68 ($J = 6.1$ Hz), supported the presence of two 6-deoxyhexose sugar units. The ring H-atoms of the monosaccharide residues were assigned starting from the readily identifiable anomeric H-atom by means of the $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$, TOCSY, HSQC, and HMBC experiments (Table 2). Units of two β -glucopyranosyl (Glc I and Glc II), one β -fucopyranosyl (Fuc), one β -xylopyranosyl (Xyl), and one α -rhamnopyranosyl (Rha) were identified. The attachment of a glucopyranosyl residue to C(3) of the aglycone was determined by the HMBC between Glc I H–C(1) ($\delta(\text{H})$ 5.01 ($d, J = 7.6$ Hz)) and C(3) ($\delta(\text{C})$ 86.7) and the NOESY correlation between H–C(3) ($\delta(\text{H})$ 4.59 ($d, J = 2.5$ Hz)) and Glc I H–C(1). After subtraction of the signals of this glucopyranosyl moiety, signals of four sugars moieties of an oligosaccharidic chain linked to the aglycone by an ester linkage remained, establishing the structures of **1/2** as 3,28-bidesmosides. The fucopyranosyl unit linked to the C(28) of the aglycon showed NMR signals of a 1,2,3,4-tetrasubstitution. The downfield shifts observed in the HSQC spectrum for the Fuc H–C(4) and C(4) resonances at $\delta(\text{H})$ 6.05 ($d, J = 3.5$ Hz) and $\delta(\text{C})$ 74.0, respectively, established that the secondary-alcohol function OH–C(4) of Fuc was acylated. The $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ experiment of **1/2** allowed us to identify the (*E*)- and (*Z*)-olefinic H-atoms of a 3,4-dimethoxycinnamoyl moiety, which appeared as two *ds* at $\delta(\text{H})$ 6.48 ($J = 15.9$ Hz) and 7.83 ($J = 15.9$ Hz) for the (*E*)-olefinic H-atoms, and at $\delta(\text{H})$ 5.82 ($J = 13.2$ Hz) and 6.84 ($J = 13.2$ Hz) for the (*Z*)-olefinic H-atoms, respectively (Table 3). The full assignments of the C- and H-atoms of the 3,4-

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR Data ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz) of the 3,4-Dimethoxycinnamoyl Moieties of **1–4**^a. δ in ppm, J in Hz.

	1		2		3		4	
	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$
C(α)	168.0		167.4		167.0		b)	
H–C(β)	115.5	6.48 ($d, J = 15.9$)	116.1	5.82 ($d, J = 13.2$)	115.2	6.43 ($d, J = 15.9$)	116.1	5.85 ($d, J = 13.0$)
H–C(γ)	146.4	7.83 ($d, J = 15.9$)	144.7	6.84 ($d, J = 13.2$)	145.2	7.81 ($d, J = 15.9$)	144.0	6.82 ($d, J = 13.0$)
C(1)	127.7		128.0		127.4		127.9	
H–C(2)	110.6	6.98 (<i>s</i>)	114.4	7.83 (<i>s</i>)	110.6	6.98 (<i>s</i>)	114.5	7.79 (<i>s</i>)
C(3)	148.9		149.7		149.0		149.8	
C(4)	152.0		150.5		151.0		151.0	
H–C(5)	111.8	6.94 ($d, J = 8.1$)	111.5	6.90 ($d, J = 8.1$)	111.8	6.93 ($d, J = 8.1$)	111.5	6.90 ($d, J = 8.1$)
H–C(6)	123.0	6.99 ($d, J = 8.1$)	125.7	7.45 ($d, J = 8.1$)	123.1	7.01 ($d, J = 8.1$)	125.5	7.46 ($d, J = 8.1$)
MeO–C(3)	55.7	3.82 (<i>s</i>)	55.7	3.78 (<i>s</i>)	55.5	3.82 (<i>s</i>)	55.5	3.76 (<i>s</i>)
MeO–C(4)	55.7	3.78 (<i>s</i>)	55.7	3.71 (<i>s</i>)	55.5	3.76 (<i>s</i>)	55.5	3.71 (<i>s</i>)

^a) Assignments were confirmed by COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC experiments. ^b) Not determined.

dimethoxycinnamoyl units obtained by further 2D-NMR investigations were in good agreement with those described in [10][11]. These data indicated that **1/2** is a mixture of (*E*)- and (*Z*)-3,4-dimethoxycinnamoyl-substituted presenegenin glycosides. In the NOESY plot, correlations between Fuc H–C(2) at $\delta(\text{H})$ 4.77 (*t*, $J = 8.8$ Hz) and Rha H–C(1) at $\delta(\text{H})$ 6.44 (*d*, $J = 1.2$ Hz), and between Fuc H–C(3) at $\delta(\text{H})$ 4.55 (*dd*, $J = 8.9, 3.5$ Hz) and Glc II H–C(1) at $\delta(\text{H})$ 5.06 (*d*, $J = 7.8$ Hz), revealed a (1 \rightarrow 2) linkage between Fuc and Rha, and a (1 \rightarrow 3) linkage between Fuc and Glc II. A HMBC cross-peak between Rha H–C(4) at $\delta(\text{H})$ 4.17 and Xyl C(1) at $\delta(\text{C})$ 106.9, and a NOESY correlation between Rha H–C(4) at $\delta(\text{H})$ 4.17 and Xyl H–C(1) at $\delta(\text{H})$ 4.85 (*d*, $J = 7.4$ Hz), indicate a (1 \rightarrow 4) linkage between Rha and Xyl. On the basis of the above results, the structures of **1/2** were elucidated as 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-{*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranosyl} ester (**1**) and its (*Z*)-isomer **2**. This structure is a derivative of the chemotaxonomic marker characterized in the Polygalaceae family as 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl] ester [2].

Compounds **3/4** exhibited in the HR-ESI-MS (positive-ion mode) a *pseudo*-molecular-ion peak at m/z 1683.7049 ($[M + \text{Na}]^+$), consistent with a molecular formula $\text{C}_{78}\text{H}_{116}\text{NaO}_{38}$. The FAB-MS (negative-ion mode) showed a *quasi*-molecular-ion peak at m/z 1659 ($[M - \text{H}]^-$), which indicated the molecular mass of 1660, (162 + 42) mass units higher than that of **1/2**. Other fragment-ion peaks were observed at m/z 1497 ($[M - \text{H} - 162]^-$), 1103 ($[M - \text{H} - 162 - 162 - 190 - 42]^-$), and 795 ($[M - \text{H} - 162 - 162 - 190 - 42 - 162 - 146]^-$), due to the elimination of three hexosyl, and one deoxyhexosyl moiety, one 3,4-dimethoxycinnamoyl group, and one acetyl function. ^1H - and ^{13}C -NMR signals of an oligosaccharide sequence common with **1/2**, *i.e.*, *O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranosyl and its (*Z*) isomer, were found for the oligosaccharide chain linked at C(28) of the prosapogenin tenuifolin in **3/4**. The difference was located at the rhamnopyranosyl moiety in which a deshielded signal at $\delta(\text{H})$ 5.46/ $\delta(\text{C})$ 75.7 suggested a substitution at the Rha-3 position. Characteristic signals of an acetyl group at $\delta(\text{H})$ 2.00 (*s*)/ $\delta(\text{C})$ 20.6 and 171.5 confirmed an acetylation at Rha OH–C(3). Furthermore, additional signals of a terminal galactopyranosyl unit (Gal) were assigned. An HMBC correlation between Gal H–C(1) at $\delta(\text{H})$ 4.86 (*d*, $J = 7.4$ Hz) and Xyl C(4) at $\delta(\text{C})$ 77.1 revealed that Gal was linked to C(4) of Xyl. This was confirmed by a NOESY cross-peak between Gal H–C(1) at $\delta(\text{H})$ 4.86 (*d*, $J = 7.4$ Hz) and Xyl H–C(4) at $\delta(\text{H})$ 4.27. On the basis of spectral evidence, the structures of compounds **3/4** were elucidated as 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-{*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-3-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]- β -D-fucopyranosyl} ester (**3**) and its (*Z*)-isomer **4**.

Compound **5** exhibited in the HR-ESI-MS (positive-ion mode) a *pseudo*-molecular ion peak at m/z 1289.5784 ($[M + \text{Na}]^+$), consistent with a molecular formula of $\text{C}_{59}\text{H}_{94}\text{NaO}_{29}$. The FAB-MS (negative-ion mode) showed a *quasi*-molecular-ion peak at m/z 1265 ($[M - \text{H}]^-$), which indicated the molecular mass of 1266. Two other significant fragment-ion peaks were observed at m/z 971 ($[M - \text{H} - 162 - 132]^-$) and

825 ($[M - H - 162 - 132 - 146]^-$), corresponding to the successive loss of one hexosyl, one pentosyl, and one deoxyhexosyl moiety, respectively. Once again, the structure of **5** was established as a derivative of the chemotaxonomic marker 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-[*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl] ester, with a 1,2-disubstituted fucopyranosyl moiety [11] instead of a 1,2,3,4 substitution as in **1/2** and **3/4** (Table 2). The deacylated fucopyranosyl unit is linked to only one sugar which is Rha. After subtraction of the NMR signals of the Glc, Fuc, Rha, and Xyl, signals of a terminal galactopyranosyl moiety (Gal) remained. The deshielded signal of Xyl C(3) at δ (C) 86.2 suggested substitution of this position by the terminal Gal. The structure of compound **5** was thus established as 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)presenegenin 28-{*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl} ester.

The authors are thankful to the Government of Ivory Coast for financial support.

Experimental Part

General. Vacuum liquid chromatography (VLC): reversed-phase silica gel *RP-18* (75–200 μ m; *SiliCycle Inc.*). Medium-pressure liquid chromatography (MPLC): silica gel *60* (15–40 μ m; *Merck*), reversed-phase silica gel *RP-18* (75–200 μ m; *SiliCycle Inc.*), *Gilson* pump *M 303*; *Büchi* glass column (460 \times 15 mm and 230 \times 15 mm), *Büchi* precolumn (110 \times 15 mm). TLC: silica gel *60 F₂₅₄* (*SiliCycle Inc.*); HP-TLC silica gel *60 F₂₅₄* (*Merck*); solvent system: CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O 60:32:0.5:10 lower phase; spray reagent: *Komarowsky* reagent, 2% 4-hydroxybenzaldehyde in MeOH/50% H₂SO₄ soln. 5:1. Optical rotations: *AA-OR* automatic polarimeter. NMR Spectra: *Varian-Unity-Inova-600* (600 MHz) spectrometer or *Varian-VNMR-S-600* spectrometer. HR-ESI-MS (positive-ion mode): *Q-TOF-1-Micromass* spectrometer. FAB-MS (negative-ion mode, glycerol matrix): *JEOL-SX-102* mass spectrometer; in *m/z*.

Plant Material. The lianous stem barks of *S. welwitschii* OLIV. were collected in Avril 2008 in Mvuazi, Democratic Republic of Congo, by Dr. *Léopold Nsimundele* of the Botanical Garden of Kisantu. The stem barks were conformed to the sample Devred 289, deposited with the National Botanical Garden of Brussels, Belgium. A voucher specimen N° 01,28,2010 is deposited with the herbarium of the laboratory of Pharmacognosy, Burgundy University.

Extraction and Isolation. Dried stem barks of *S. welwitschii* (300 g) were powdered and heated to reflux three times in MeOH/H₂O 7:3 (3 \times 2 l) for 1 h, yielding after evaporation 43 g of crude extract. The MeOH extract (20 g) was dissolved in H₂O (300 ml) and partitioned with H₂O-sat. BuOH (3 \times 200 ml) to give, after evaporation, the BuOH fraction (5.3 g). A 1.4 g aliquot of the BuOH residue was submitted to VLC (reversed-phase silica gel, H₂O (3 \times 200 ml), MeOH/H₂O 1:1 (5 \times 200 ml), and finally MeOH (3 \times 200 ml)). This VLC was done two times and the similar eluates were combined. After evaporation of the solvents, two fractions rich in saponins were obtained: *Fr. 1* (with MeOH/H₂O 1:1; 1.15 g) and *Fr. 2* (with MeOH; 118 mg). *Fr. 1* (400 mg) was submitted to another VLC (SiO₂, CHCl₃/MeOH/H₂O 85:15:2 (*a*), 40:10:1 (*b*), and 60:32:7 (*c*)). The elution with the solvent system (*a*) gave *Frs. 1.1–1.8*. Final purification was carried out with *Fr. 1.7* by MPLC (SiO₂, solvent system (*a*)) yielding 3-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl 6-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- α -D-glucopyranoside (9 mg). *Fr. 2* (118 mg) was then fractionated by MPLC (reversed-phase silica gel, MeOH/H₂O 40 \rightarrow 70%): *Frs. 2.1–2.5*. Compounds **1/2** (3.4 mg) were obtained from *Fr. 2.2*, whereas compounds **3/4** (7 mg) and **5** (4.5 mg) were obtained from *Fr. 2.4* by MPLC (SiO₂, CHCl₃/MeOH/H₂O 13:7:2 lower phase).

Acid Hydrolysis. Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2N aq. CF₃COOH (5 ml) for 3 h at 95°. After extraction with CH₂Cl₂ (3 \times 5 ml), the aq. layer was repeatedly evaporated to dryness with MeOH until neutral, and then analyzed by TLC (SiO₂, CHCl₃/MeOH/H₂O 8:5:1) by comparison with authentic samples. The trimethylsilyl ethers of the thiazolidine derivatives of the sugar residues of each

Publication N°2

2244

HELVETICA CHIMICA ACTA – Vol. 93 (2010)

compound were prepared and analyzed by GC by means of a method described previously [12]. The absolute configurations were determined by comparing the retention times with thiazolidine derivatives prepared in a similar way from standard sugars. The D configuration of glucose, galactose, fucose, and xylose and the L configuration of rhamnose were determined.

(2 β ,3 β ,4 α)-3-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,27-dihydroxyolean-12-ene-23,28-dioic Acid 28-[O- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-deoxy-4-O-[(2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxoprop-2-en-1-yl]- β -D-galactopyranosyl] Ester (**1**) and its (2Z)-Isomer **2**: White amorphous powder. TLC (a): R_f 0.28. ^1H - and ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz): Tables 1–3. FAB-MS (neg.): 1455 ($[M - \text{H}]^-$), 1265 ($[M - \text{H} - 190]^-$), 825 ($[M - \text{H} - 190 - 162 - 146 - 132]^-$). HR-ESI-MS (pos.): 1479.6413 ($[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{70}\text{H}_{104}\text{NaO}_{32}$; calc. 1479.6408).

(2 β ,3 β ,4 α)-3-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,27-dihydroxyolean-12-ene-23,28-dioic Acid 28-[O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(3-O-acetyl-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-deoxy-4-O-[(2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxoprop-2-en-1-yl]- β -D-galactopyranosyl] Ester (**3**) and its (2Z)-Isomer **4**: White amorphous powder. TLC (a): R_f 0.18. ^1H - and ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz): Tables 1–3. FAB-MS (neg.): 1659 ($[M - \text{H}]^-$), 1497 ($[M - \text{H} - 162]^-$), 1103 ($[M - \text{H} - 162 - 162 - 190 - 42]^-$), 795 ($[M - \text{H} - 162 - 162 - 190 - 42 - 162 - 146]^-$). HR-ESI-MS (pos.): 1683.7049 ($[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{78}\text{H}_{116}\text{NaO}_{38}$; calc. 1683.7042).

(2 β ,3 β ,4 α)-3-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,27-dihydroxyolean-12-ene-23,28-dioic Acid 28-[O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-6-deoxy- β -D-galactopyranosyl] Ester (**5**): White amorphous powder. $[\alpha]_D^{25} = -14.0$ ($c = 0.1$ MeOH). TLC (a): R_f 0.13. ^1H - and ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz): Tables 1–3. FAB-MS (neg.): 1265 ($[M - \text{H}]^-$), 971 ($[M - \text{H} - 162 - 132]^-$), 825 ($[M - \text{H} - 162 - 132 - 146]^-$). HR-ESI-MS (pos.): 1289.5784 ($[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{59}\text{H}_{94}\text{NaO}_{25}$; calc. 1289.5778).

REFERENCES

- [1] C. Delaude, *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège* **1992**, *61*, 245.
- [2] M.-A. Lacaille-Dubois, A.-C. Mitaine-Offer, *Phytochem. Rev.* **2005**, *4*, 139.
- [3] A.-C. Mitaine-Offer, N. Pénez, T. Miyamoto, C. Delaude, J.-F. Mirjolet, O. Duchamp, M.-A. Lacaille-Dubois, *Phytochemistry* **2010**, *71*, 90.
- [4] M. Davreux, C. Delaude, *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège* **1971**, *40*, 498.
- [5] N. De Tommasi, S. Piacente, F. De Simone, C. Pizza, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 134.
- [6] A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, I. A. Khan, C. Delaude, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 553.
- [7] R. Teng, Z. Wu, Y. He, D. Wang, C. Yang, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 424.
- [8] D. Zhang, T. Miyase, M. Kuroyanagi, K. Umehara, A. Ueno, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 810.
- [9] Y. Mimaki, A. Yokosuka, M. Hamanaka, C. Sakuma, T. Yamori, Y. Sashida, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1511.
- [10] A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, V. Laurens, C. Delaude, M.-A. Lacaille-Dubois, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2404.
- [11] A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Jolly, C. Delaude, M.-A. Lacaille-Dubois, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2986.
- [12] M. Haddad, T. Miyamoto, V. Laurens, M.-A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 372.

Received February 22, 2010

2.3 Etude phytochimique de *Arenaria montana*

L'étude phytochimique de *Arenaria montana* a permis l'isolement de 3 saponines de structures nouvelles. Nous proposons dans les lignes suivantes les détails du processus d'extraction et d'isolement suivi de la détermination structurale des composés AMA-1, AMR et AMOG5.

2.3.1 Extraction et isolement des composés AMA-1, AMR et AMOG5

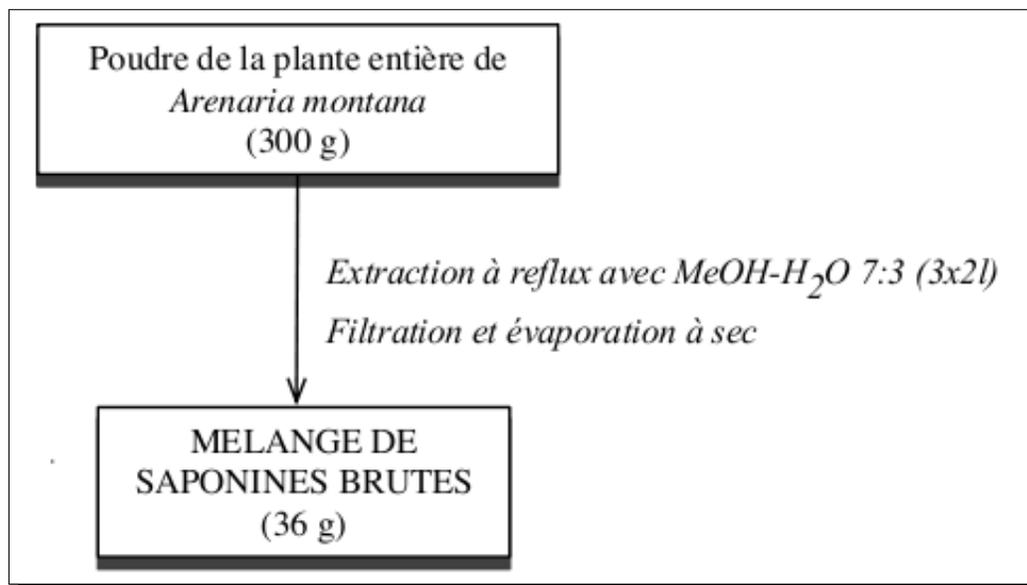


FIGURE 2.42 – Schéma d'extraction des saponines de *Arenaria montana*

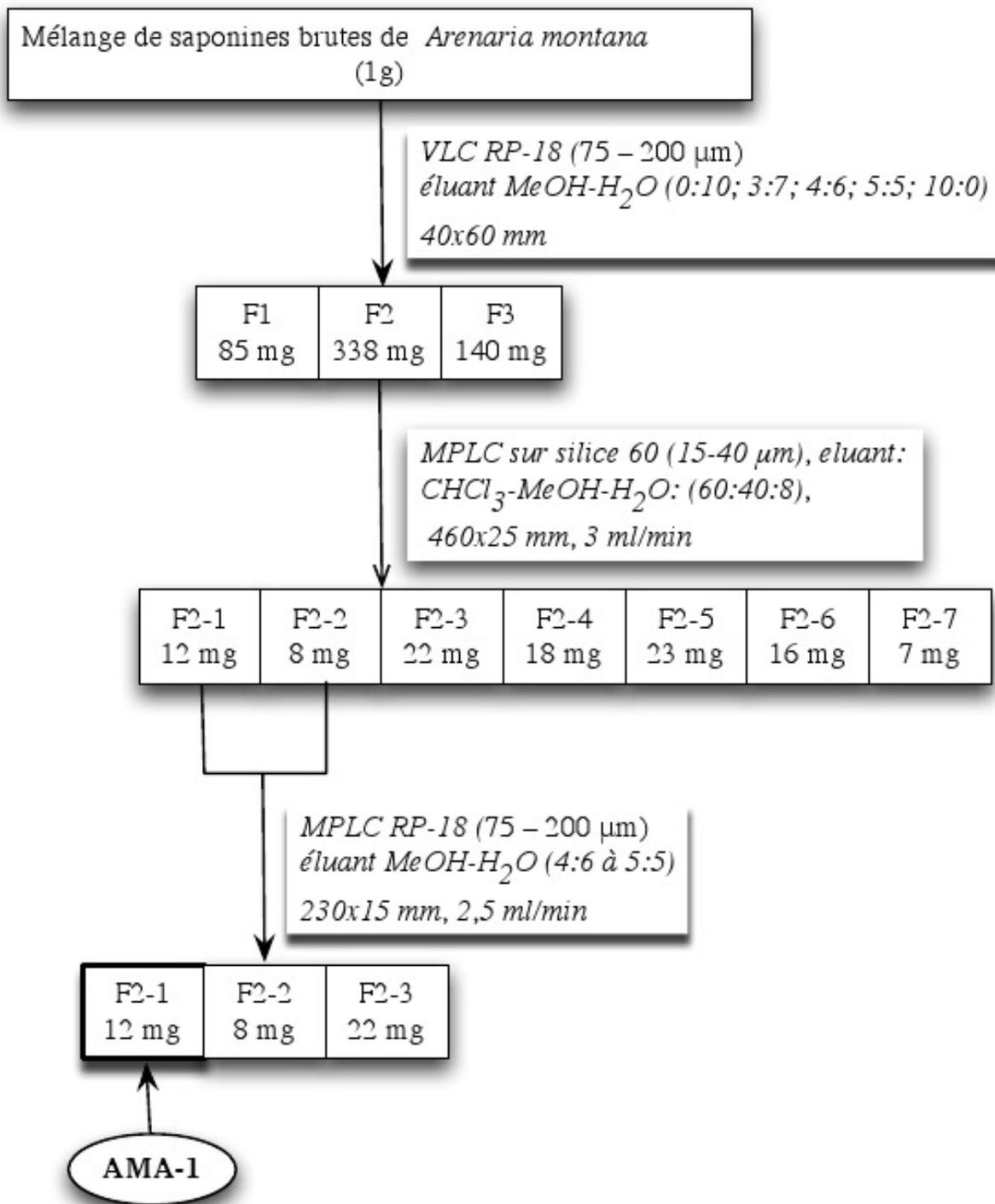


FIGURE 2.43 – Schéma de purification du composé AMA-1

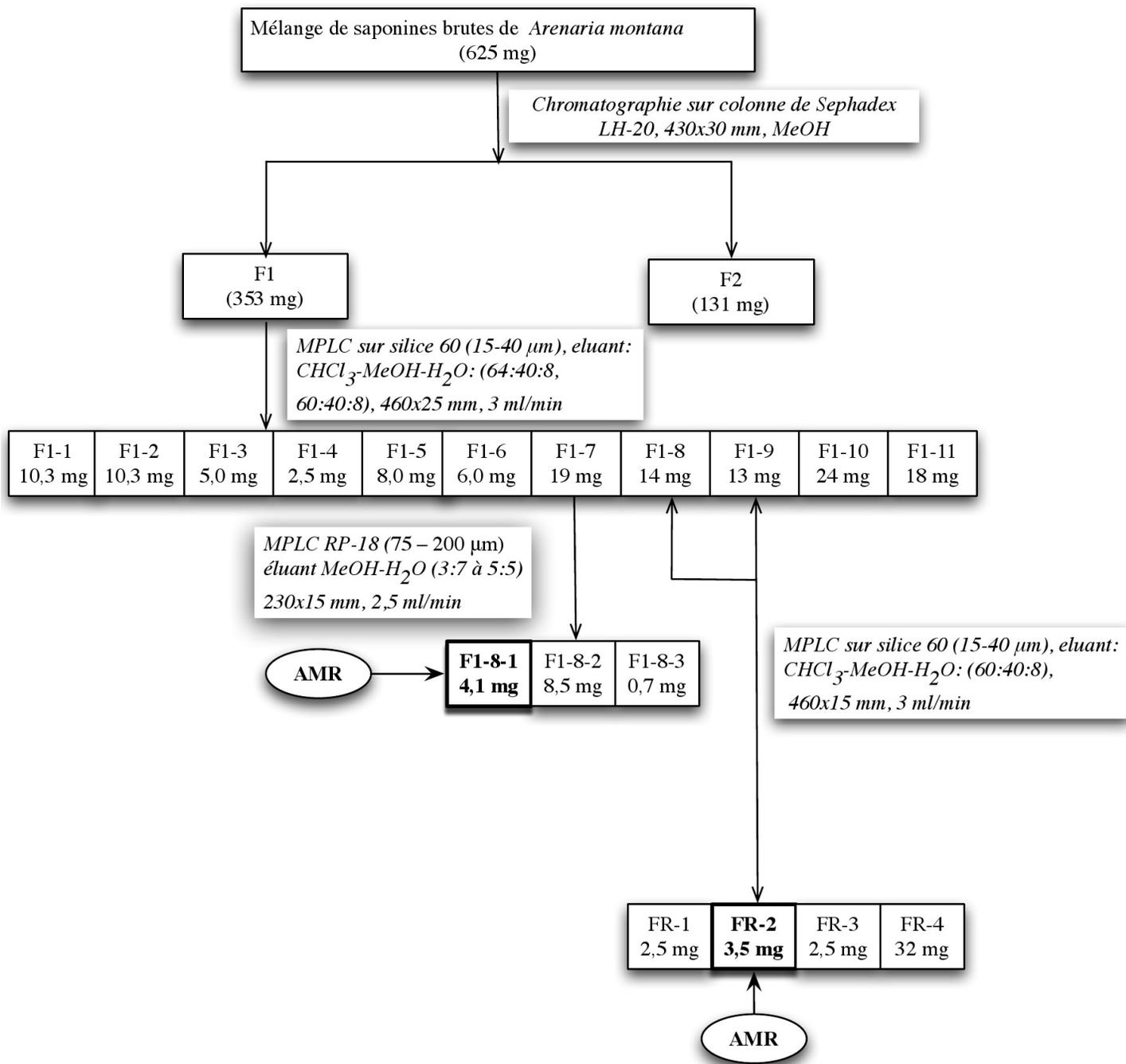


FIGURE 2.44 – Schéma de purification du composé AMR

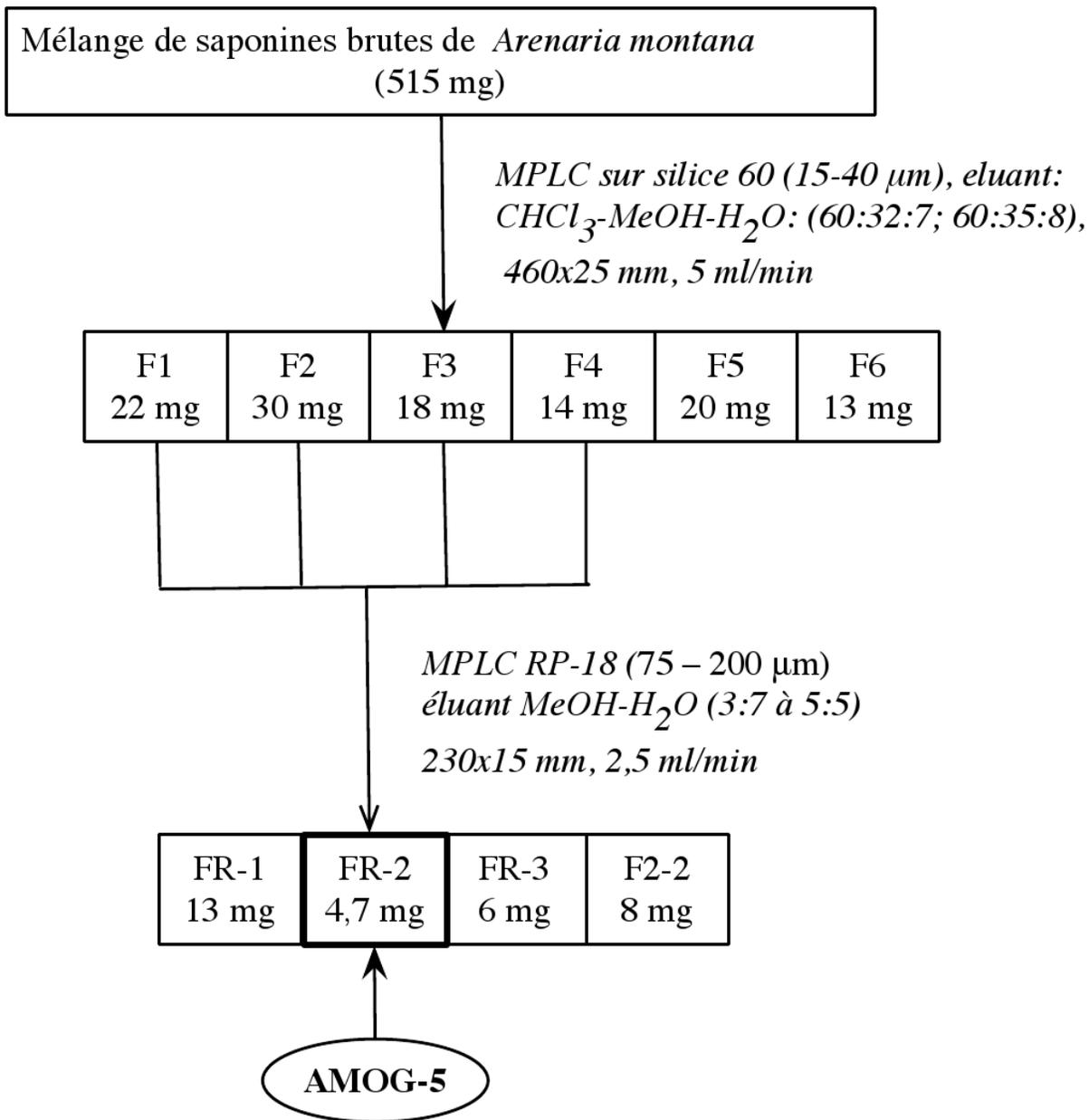


FIGURE 2.45 – Schéma de purification du composé AMOG5

2.3.2 Détermination structurale des composés isolés de *Arenaria montana*

Il faut rappeler que pour la spectroscopie RMN, les tables de déplacements chimiques des composés **AMA-1**, **AMR** et **AMOG5** se trouvent dans la **Publication N°3**

2.3.2.1 Détermination structurale du composé **AMA-1**

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1057 [M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 1058 uma, suggérant une formule brute de $C_{53}H_{86}O_{21}$. Un autre fragment est également observé à $m/z = 925 [(M-H) - 132]^-$, indiquant la perte d'une unité pentosyle.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

Sur le spectre RMN 1H , on note la présence de signaux de 7 singulets résonnant entre δ_H 0.72 et 1.68 ppm correspondant à 7 méthyles tertiaires et d'un proton oléfinique résonnant à δ 5.53 (H-12). L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT nous permet de distinguer dans la zone de l'aglycone 8 carbones quaternaires (C), 6 carbones tertiaires (CH), 9 carbones secondaires (CH_2) et 7 carbones primaires (CH_3). Les deux signaux à δ_C 122.4 et 144.0 ppm correspondent aux carbones de la double liaison $\Delta^{12,13}$. On observe également un signal à δ_C 175.7, correspondant au groupement carbonyle d'une fonction ester. Les signaux de 2 carbones tertiaires déblindés à δ_C 73.4 et 89.1ppm, suggèrent la présence de 2 fonctions alcools.

Tous les protons et carbones ont été attribués après l'analyse des spectres HSQC et HMBC. Les corrélations HMBC entre les protons à δ 0.87 (s, Agly-24) et δ 1.15 (s, Agly-23) et le carbone tertiaire à δ 89.1, indiquent la localisation d'une première fonction alcool en position C-3. Les corrélations COSY entre δ_H 5.16 (Agly-16) et δ_H 1.76, 2.16 (Agly-15) et HMBC entre δ_H 5.16 (Agly-16) et δ_C 41.6 (Agly-14), permettent de localiser une seconde fonction alcool en position C-16 de l'aglycone. Ces données permettent d'identifier la génine comme étant l'acide échinocystique (Gaidi et al., 2000a, Koz et al., 2010).

- Le carbonyle C-28 observé est blindé à δ 175.7, il est donc engagé dans une liaison ester.

- Le carbone C-3 de l'acide échinocystique est déblindé à δ 89.1 par rapport à un C-3 libre, ce qui suggère qu'il est engagé dans une liaison glycosidique.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 4 protons anomériques résonnant à δ 6.33 (d, $J = 1.1$ Hz), 5.60 (d, $J = 1.0$ Hz), 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz), et 4.75 (d, $J = 7.6$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 4 carbones anomériques à δ 92.9, 100.6, 106.0 et 106.0, respectivement.

La présence de signaux de 2 méthyles secondaires sous forme de doublet résonnant à δ_H 1.60 (d, $J = 5.7$ Hz) et 1.62 (d, $J = 5.7$ Hz) caractérisent la présence de deux 6-déoxyhexoses.

A partir des protons anomériques, la nature des 4 systèmes de spins a été déterminée grâce à l'expérience COSY et confirmée par l'expérience TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser :

- Un β -glucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.75 (d, $J = 7.6$ Hz).
- Un β -xylopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz).
- Deux α -rhamnopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 6.33 (d, $J = 1.1$ Hz, Rha I) et 5.60 (d, $J = 1.0$ Hz, Rha II).

Les expériences HMBC et NOESY ont permis d'établir les séquences oligosaccharidiques ainsi que les liaisons avec l'aglycone.

Séquençage osidique en C-3

Les déplacements chimiques des carbones du β -glucopyranosyle indiquent qu'il est terminal. Sa liaison en position 3 de l'aglycone est déduite de la corrélation NOESY entre le proton anomérique δ 4.75 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc-1) et le proton à δ 3.26 (dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, Agly-3).

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des signaux du glucopyranosyle en position 3, il reste ceux des 3 sucres liés en position C-28 de l'aglycone.

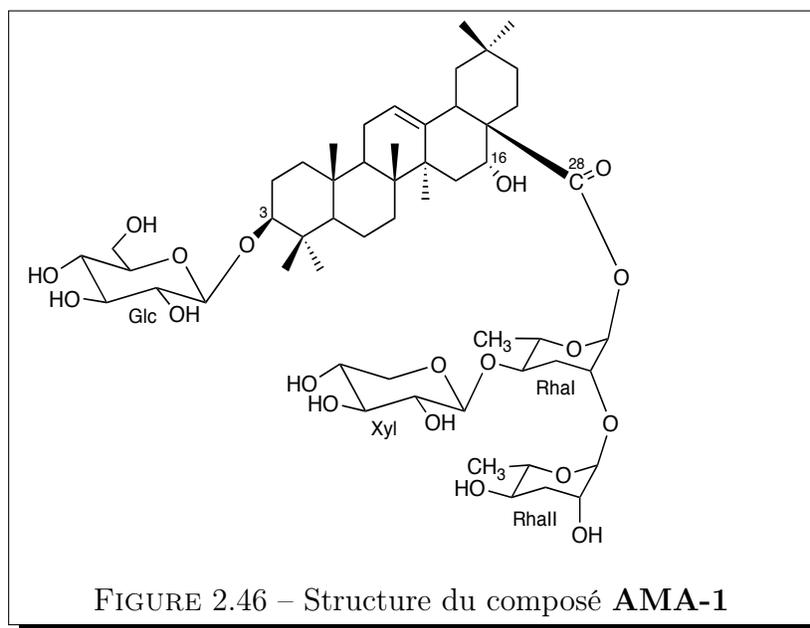
Les corrélations suivantes ont été observées :

- La corrélation HMBC entre le proton à δ 6.33 (d, $J = 1.1$ Hz, Rha I-1) et le carbone à δ 175.7 (Agly-28), prouve la liaison entre le premier rhamnose et l'aglycone.

- Les corrélations HMBC entre le proton à δ 5.60 (d, $J = 1.0$ Hz, Rha II-1) et le carbone à δ 74.9 (Rha I-2), et celles entre δ_H 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz, Xyl-1) et δ_C 82.6 (Rha I-4), montrent que le rhamnose II et le xylose sont liés au rhamnose I par des liaisons (1→2) et (1→4) respectivement. Ceci est confirmé par des corrélations NOESY entre δ_H 5.60 (d, $J = 1.0$ Hz, Rha II-1) et δ_H 4.41 (Rha I-2) et entre δ_H 5.04 (d, $J = 7.8$ Hz, Xyl-1) et δ_H 4.25 (Rha I-4).

Conclusion

Sur la base de tous ces résultats, la structure du composé **AMA-1** a été établie comme étant le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-acide échinocystique 28-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- α -L-rhamnopyranoside (Timité et al., 2011).



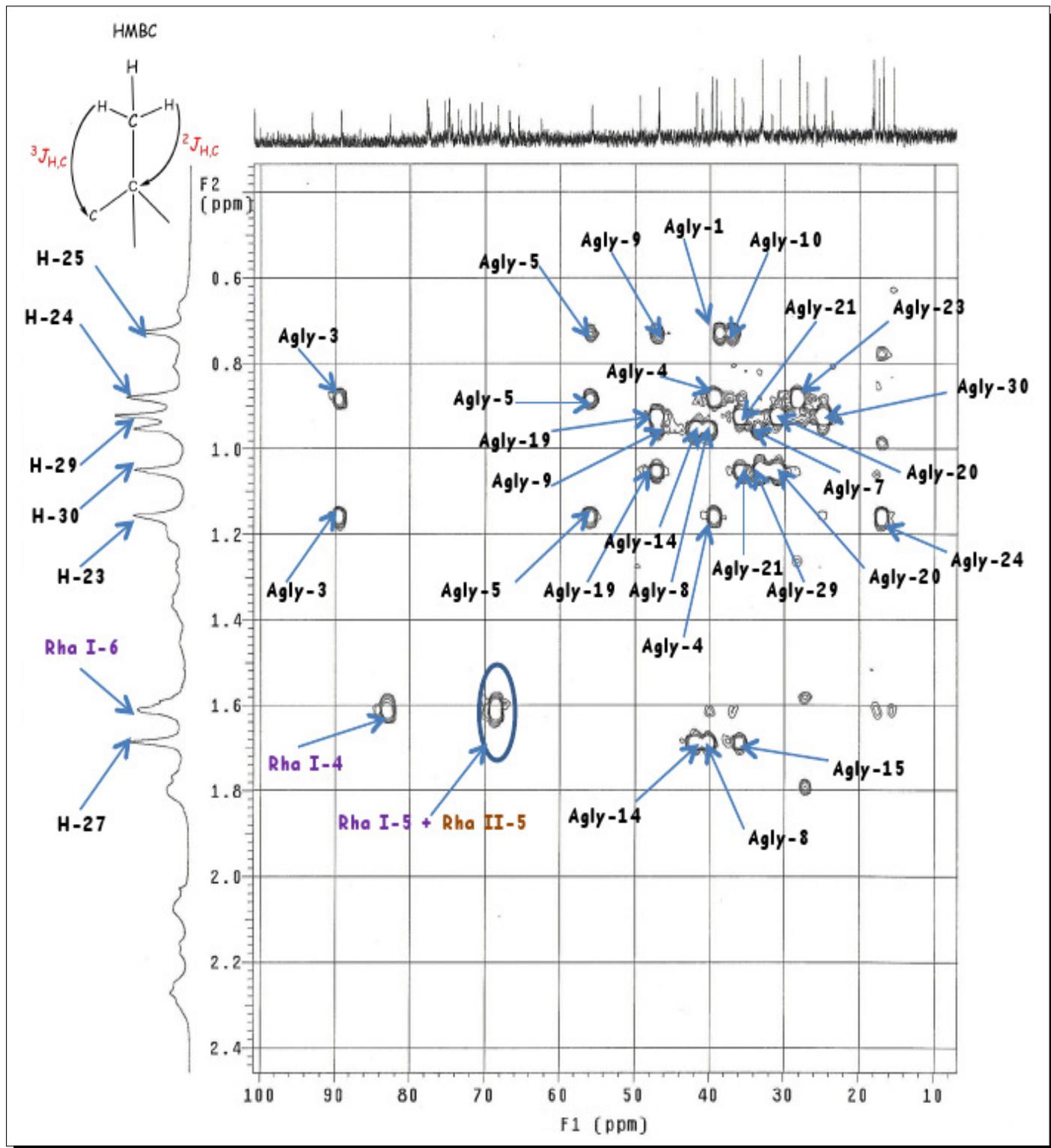


FIGURE 2.47 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **AMA-1**

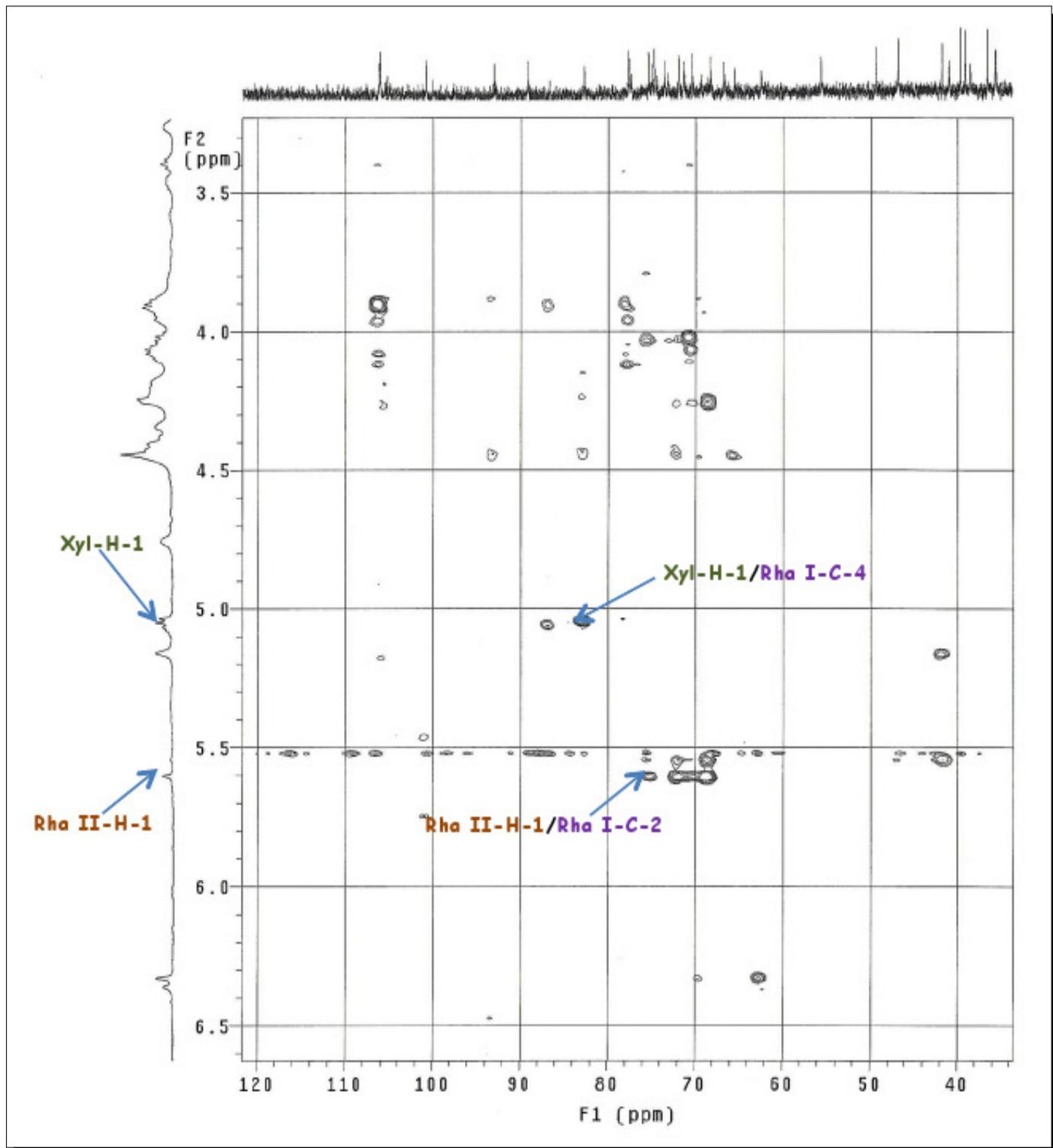


FIGURE 2.48 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine **AMA-1**

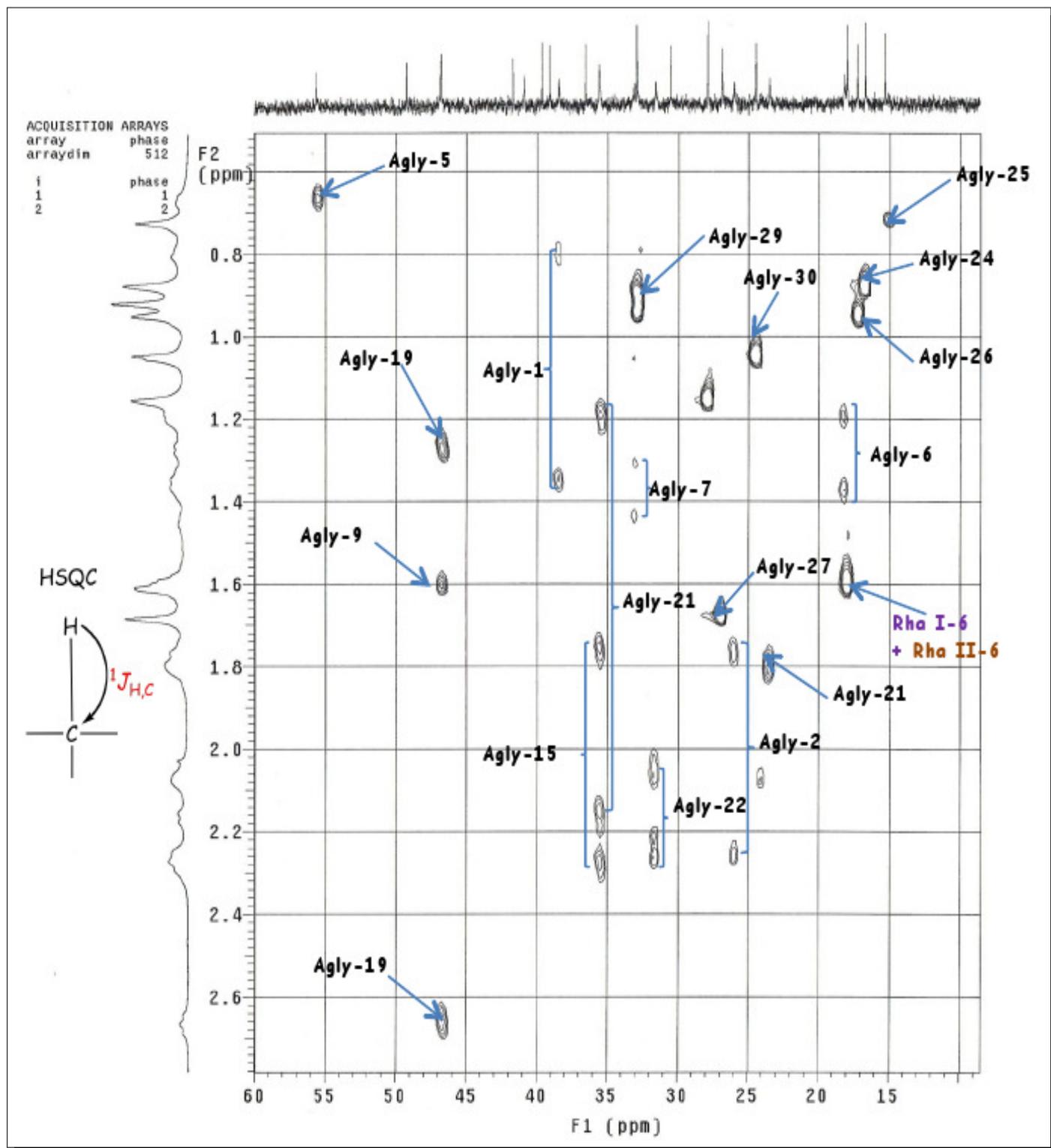


FIGURE 2.49 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMA-1

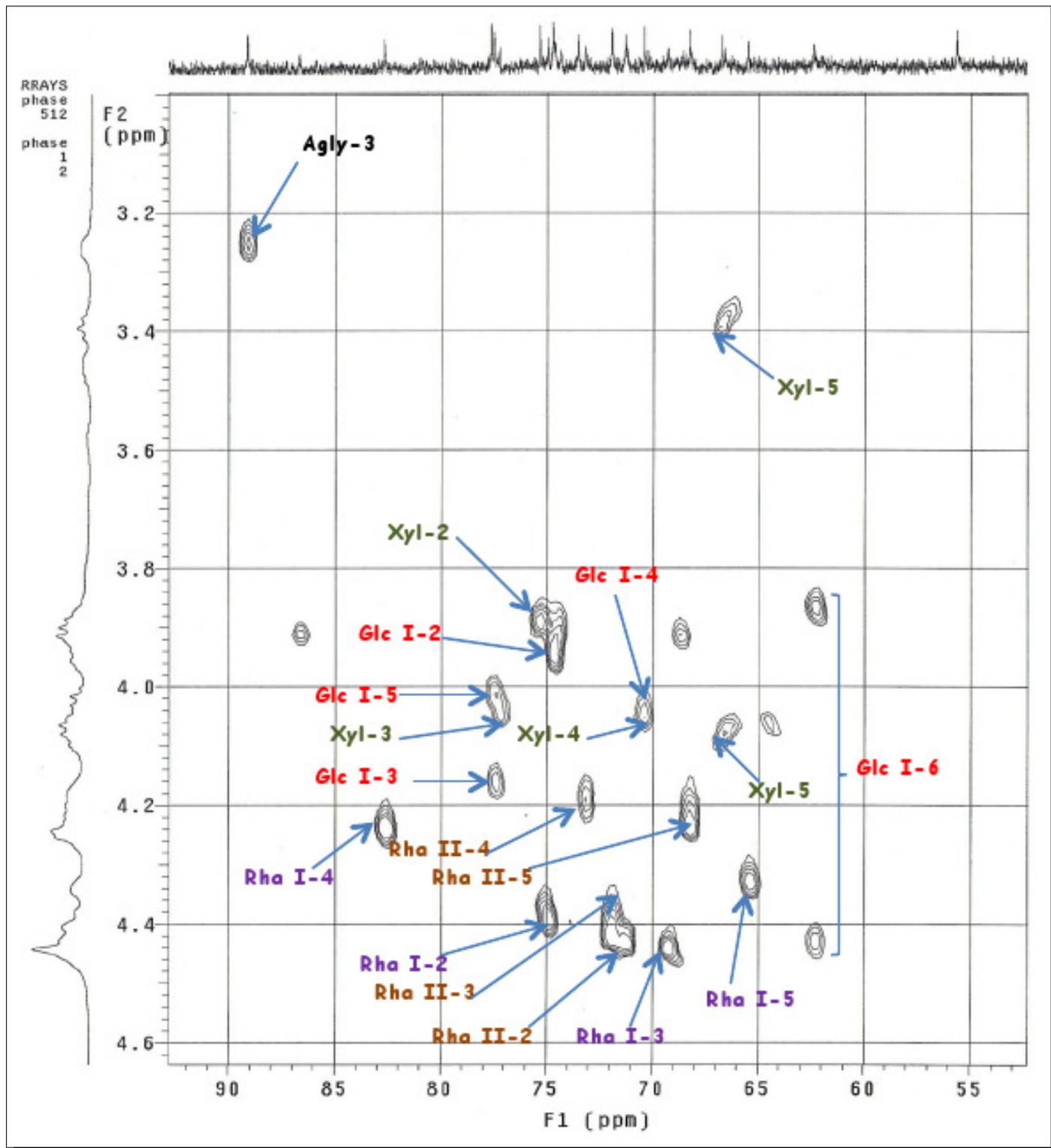


FIGURE 2.50 – Spectre HSQC de la osidique de la saponine AMA-1

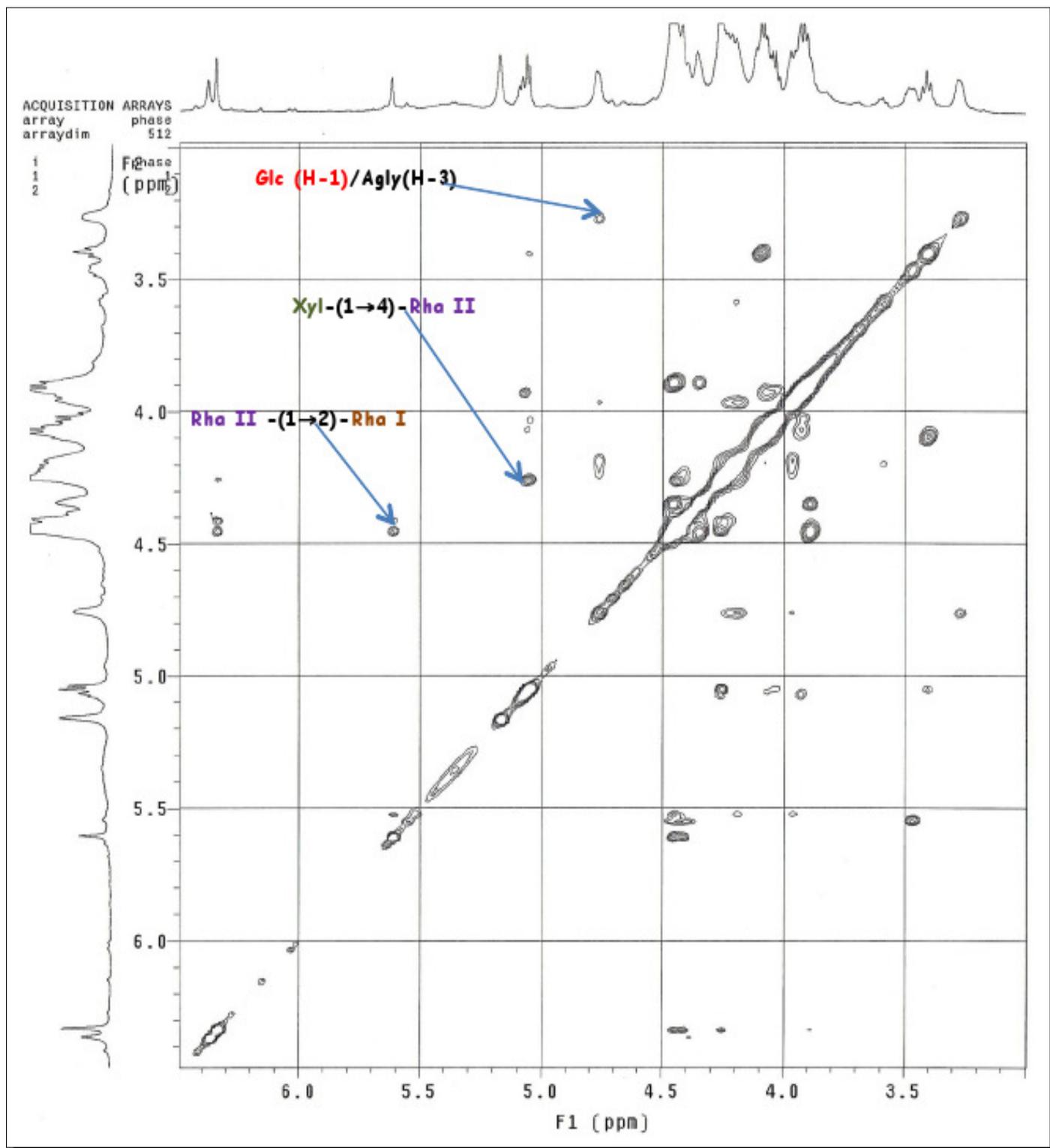


FIGURE 2.51 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMA-1

2.3.2.2 Détermination structurale du composé **AMR**

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1189 [M-H]^-$ est observé, ceci suggère une masse moléculaire de 1190 uma, et une formule brute en $C_{58} H_{94} O_{25}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 1057 [M-H - 132]^-$, $925 [M-H - 132 - 132]^-$ et $779 [M-H - 132 - 132 - 146]^-$, correspondant à l'élimination successive de 2 pentosyles et 1 deoxyhexosyle.

Spectroscopie RMN

Nous retrouvons sur les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé **AMR**, la quasi totalité des signaux de l'aglycone et des sucres du composé **AMA-1**. Des différences sont à noter, notamment au niveau des signaux du xylopyranosyle et la présence d'un sucre supplémentaire. L'aglycone de ce composé est toujours l'acide échinocystique.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

En plus des signaux anomériques des 2 rhamnopyranosyles (Rha I et Rha II), du glucopyranosyle et du xylopyranosyle, résonnant respectivement à $\delta_H 6.35/\delta_C 92.8$, $\delta_H 5.52/\delta_C 100.6$, $\delta_H 4.79/\delta_C 106.0$ et $\delta_H 5.04/\delta_C 105.4$, l'anomère d'un sucre additionnel résonnant à $\delta_H 5.09$ (d, $J = 6.9$ Hz) / $\delta_C 104.7$ apparaît (**Publication N°3**).

Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC de ce sucre additionnel ont permis l'identification d'un α -arabinopyranose. Sur le spectre RMN ^{13}C , le signal déblindé du carbone C-3 du xylose à $\delta 85.7$ par rapport à un xyl-3 libre, ainsi que la corrélation NOESY entre $\delta_H 3.98$ (t, $J = 9.5$ Hz, Xyl-3) et $\delta 5.09$ (d, $J = 6.9$ Hz, Ara-1), montre que l'arabinose est lié au xylose par une liaison (1→3). Ceci est confirmé par les corrélations HMBC entre $\delta_H 5.09$ (d, $J = 6.9$ Hz, Ara-1) et $\delta_C 85.7$ (Xyl-3), et entre $\delta_H 3.98$ (t, $J = 9.5$ Hz, Xyl-3) et $\delta_C 104.7$ (Ara-1).

Conclusion

Sur la base de tous ce qui précède, la structure du composé **AMR** a été établie comme étant le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-acide échinocystique 28-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- α -L-rhamnopyranoside (Timité et al., 2011).

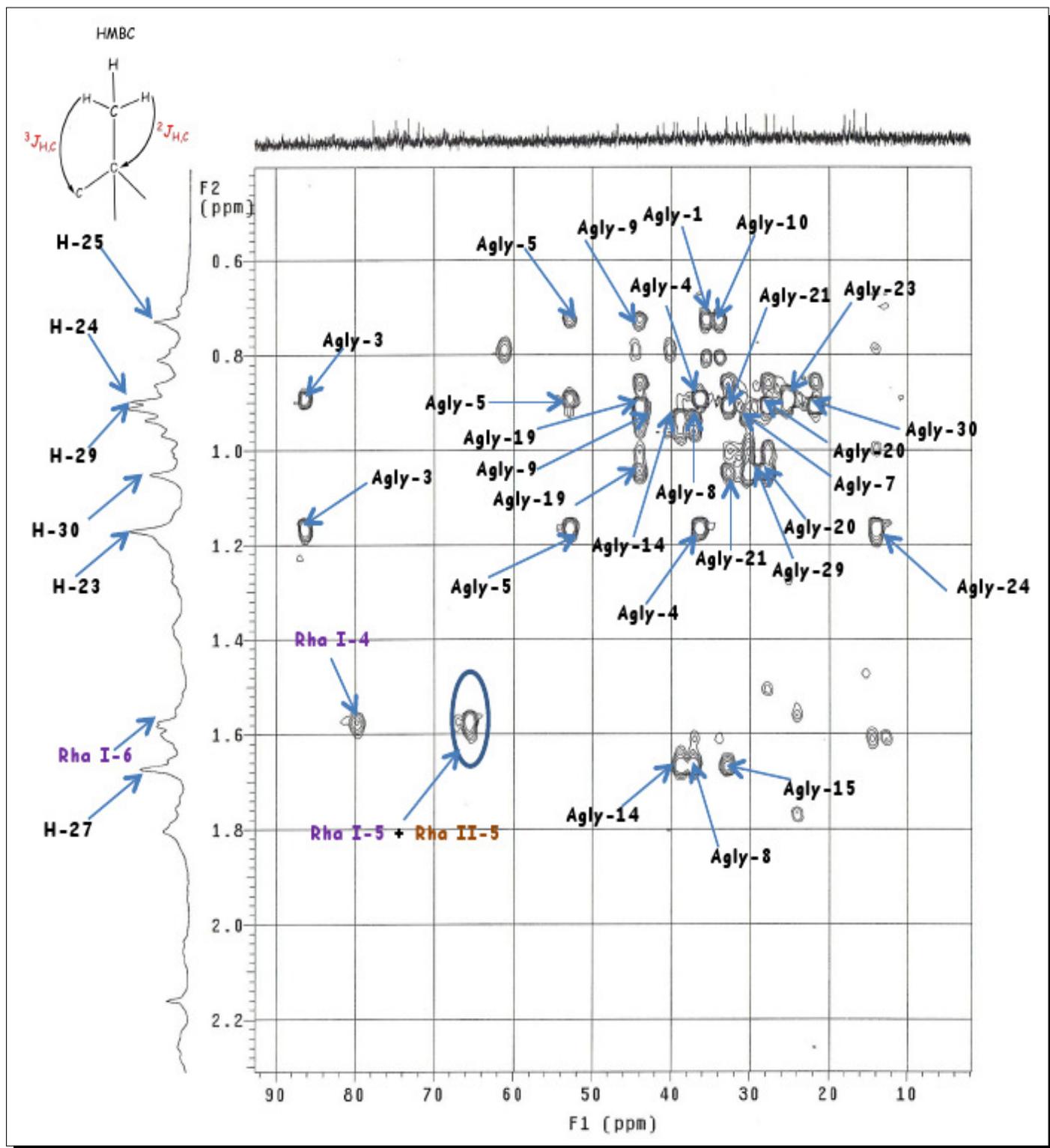


FIGURE 2.52 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine AMR

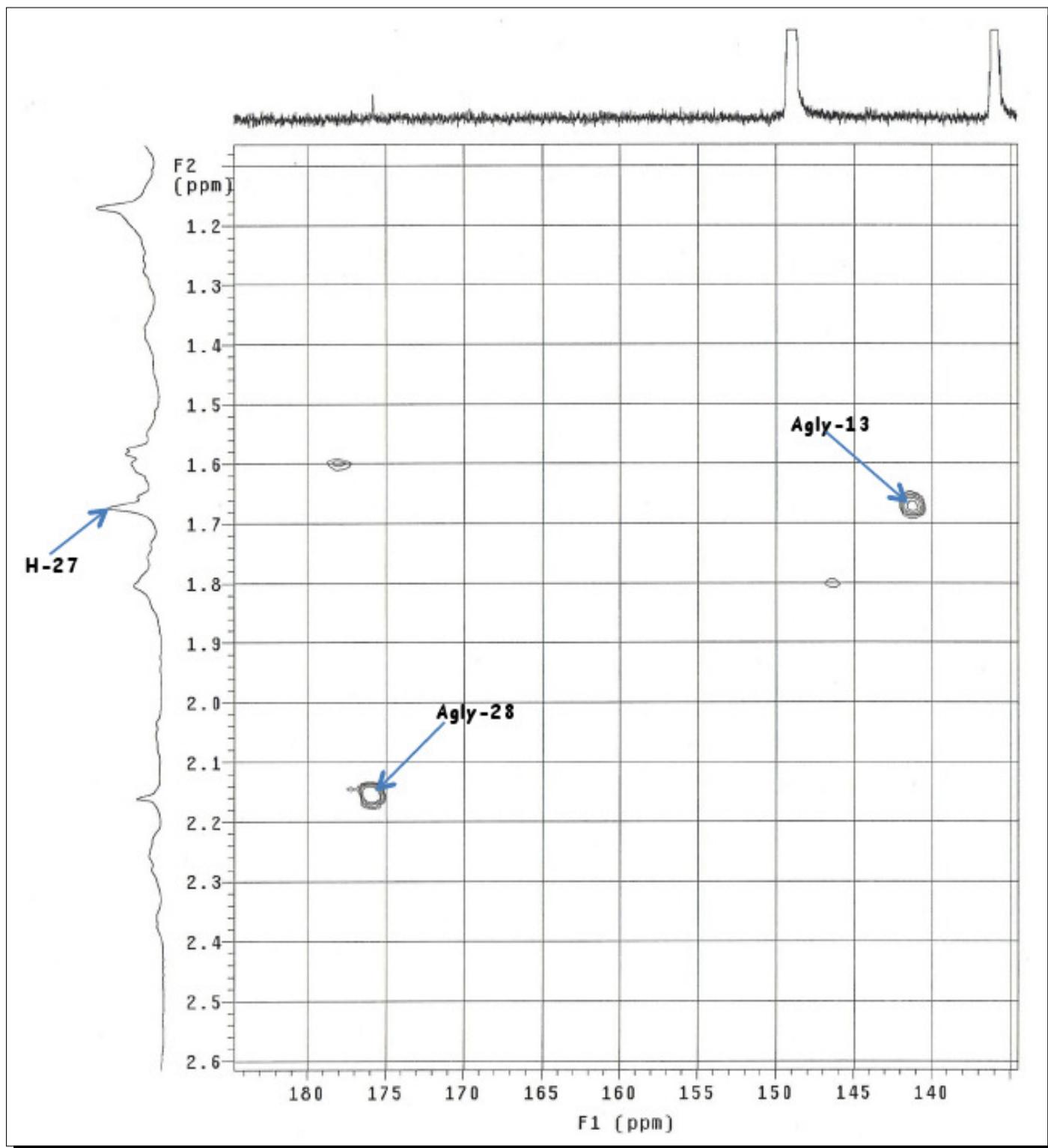


FIGURE 2.53 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **AMR**

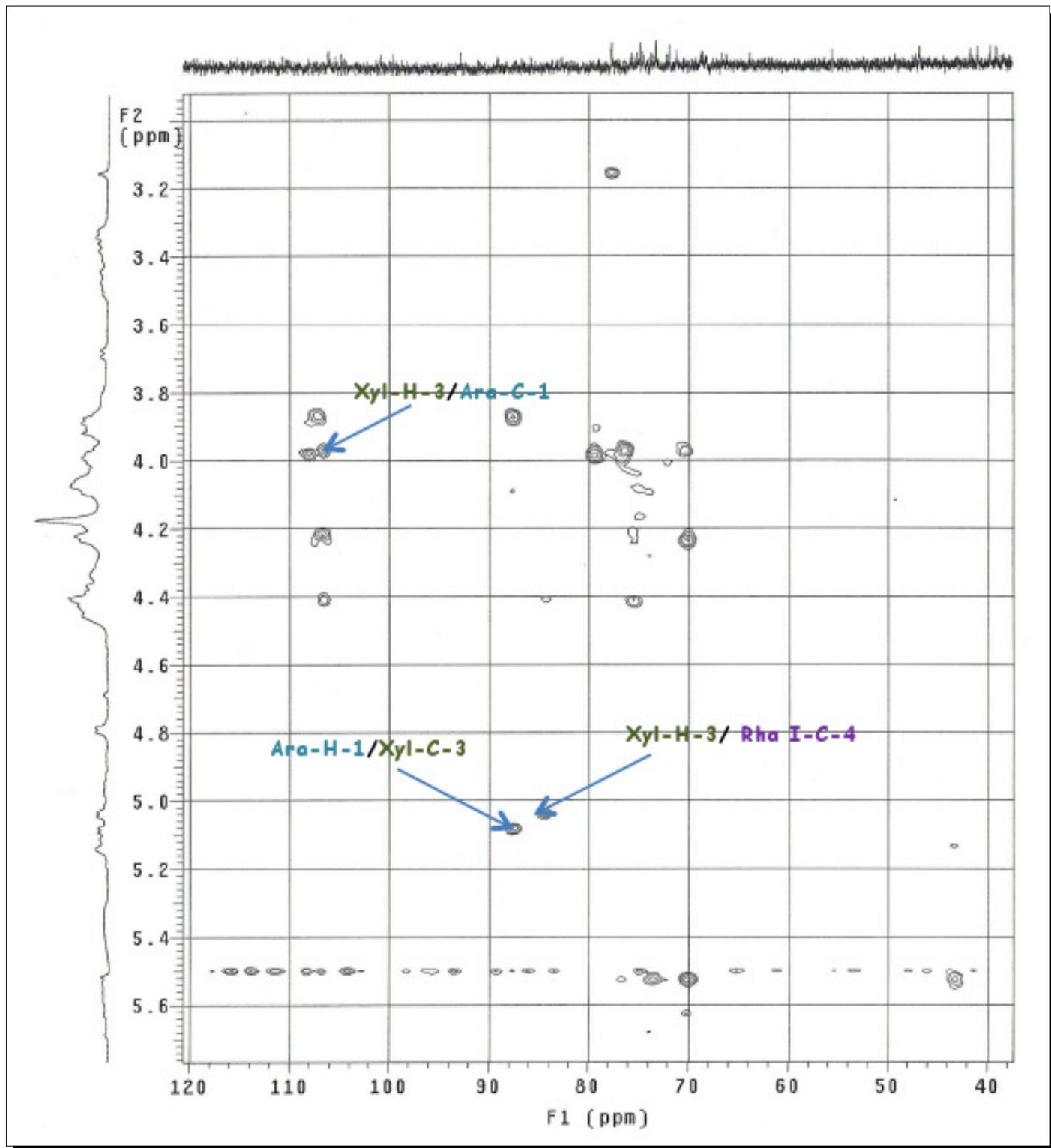


FIGURE 2.54 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine **AMR**

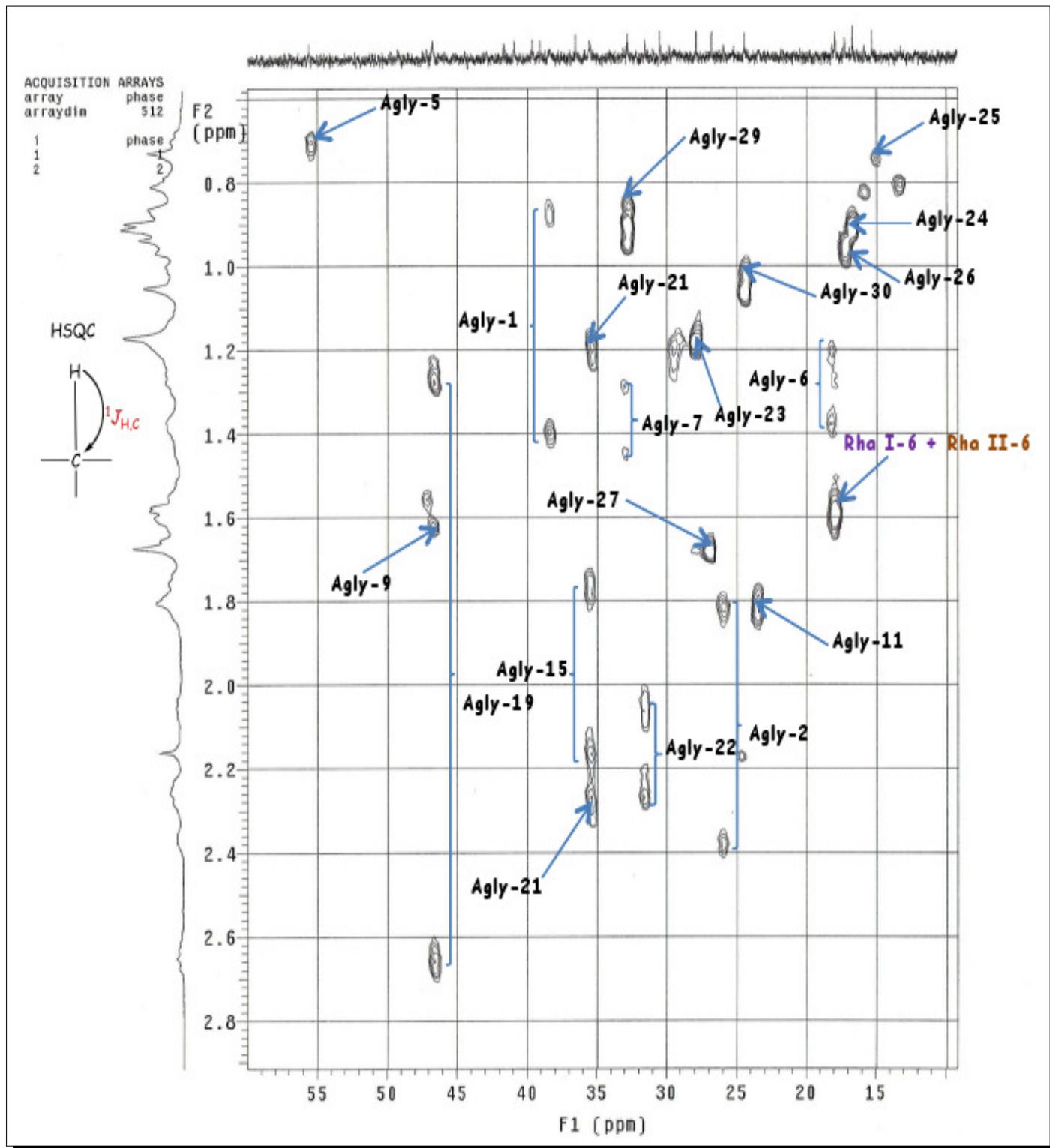


FIGURE 2.55 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMR

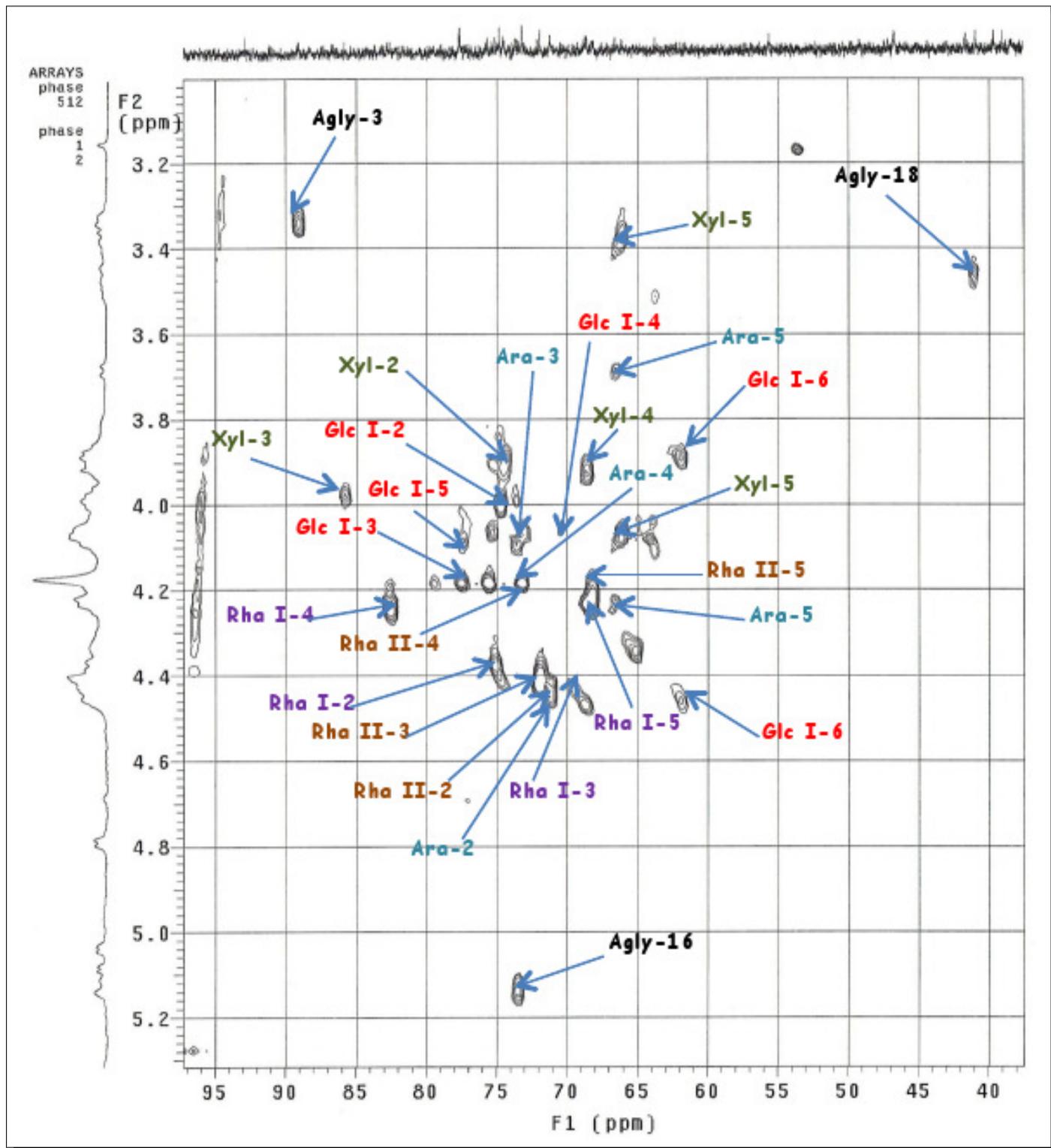


FIGURE 2.56 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine AMR

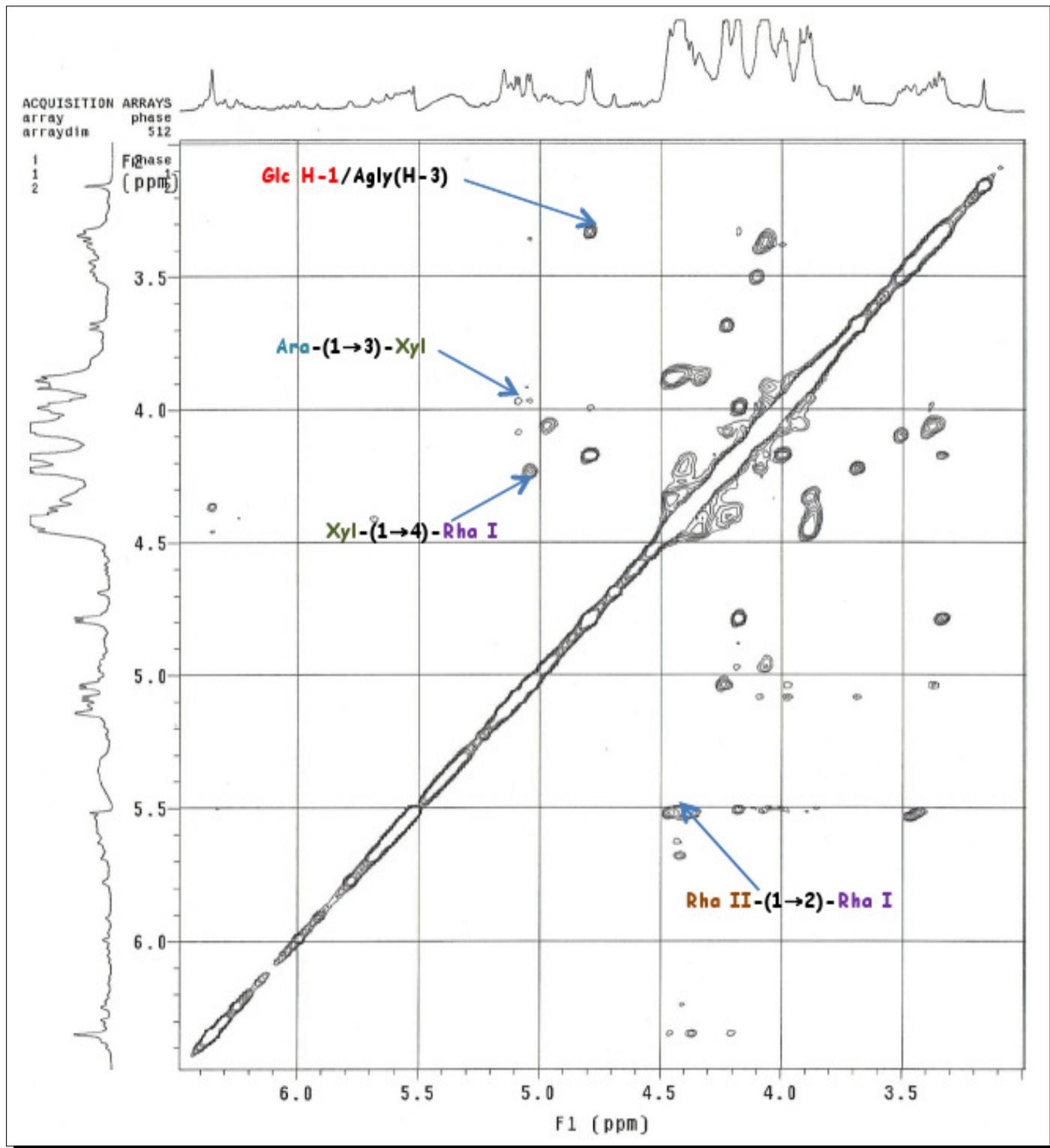
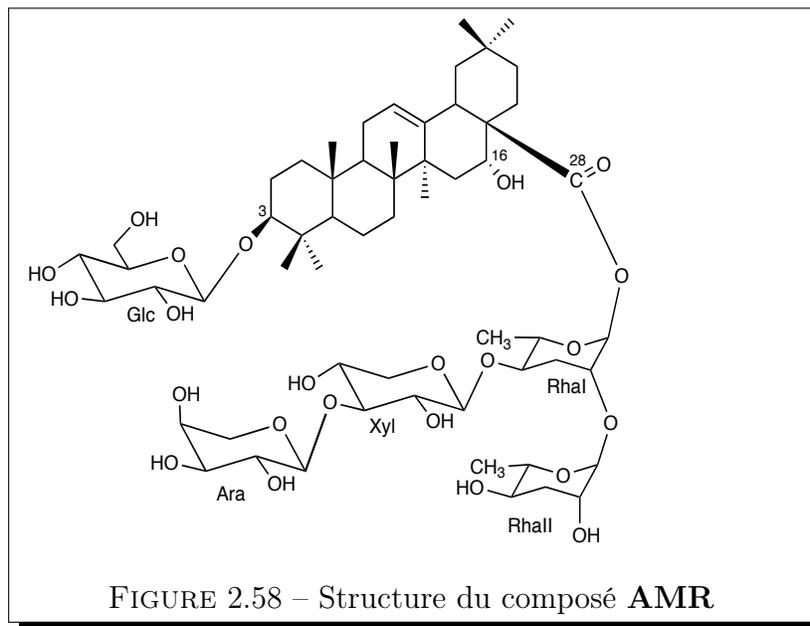


FIGURE 2.57 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMR



2.3.2.3 Détermination structurale du composé AMOG5

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1337 [M-H]^-$ est observé, ceci correspond à une masse moléculaire de 1338 uma, suggérant une formule brute en $C_{63}H_{102}O_{30}$. D'autres fragments importants ont été observés à $m/z = 1205 [M-H - 132]^-$, $1073 [M-H - 132 - 132]^-$ et $795 [M-H - 132 - 132 - 132 - 146]^-$, correspondant à l'élimination successive de 3 pentosyles et d'un déoxyhexosyle.

Spectroscopie RMN

Nature de l'Aglycone

Sur le spectre RMN 1H , on note la présence de signaux de 6 singulets résonnant entre δ_H 0.84 et 1.69 ppm correspondant à 6 méthyles tertiaires angulaires, et d'un proton oléfinique résonnant à δ 5.16 (H-12). L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT permet de distinguer dans la zone de l'aglycone 8 carbones quaternaires (C), 6 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH_2) et 6 carbones primaires (CH_3).

Deux signaux à δ_C 122.6 et 144.0 ppm correspondent aux signaux de carbones éthyléniques. On observe également le signal à δ_C 175.8 d'un groupement carbonyle d'une fonction ester. Les signaux de 3 carbones tertiaires résonnant à δ 63.1, 73.8 et 79.4 ppm, suggèrent la présence de

3 fonctions alcools. En comparant les signaux par rapport à l'acide échinocystique, cet aglycone présente une fonction alcool supplémentaire. La localisation de la troisième fonction alcool en C-23 a été déterminée grâce à la corrélation HMBC entre le proton à δ 0.84 (s, Agly-24) et δ_C 63.9 (Agly-23). La corrélation NOESY entre le proton à δ 3.55 (d, $J = 10.7$ Hz, Agly-23) et celui à δ 1.69 (s, Agly-27) montre son orientation en α .

Grâce à ces résultats, la génine est identifiée à la caulophyllogénine (Li et al., 2010).

- Le carbone C-3 déblindé à δ 79.4 par rapport à celui de la génine libre, suggère qu'il est engagé dans une liaison glycosidique.
- Le carbonyle C-28 observé à δ 175.8 est blindé, donc engagé dans une liaison ester.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 6 protons anomériques résonnant à δ 6.37 (d, $J = 1.0$ Hz), 6.06 (d, $J = 2.6$ Hz), 5.88 (d, $J = 4.0$ Hz), 5.58 (d, $J = 1.1$ Hz), 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz) et 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz) qui corrént sur le spectre HSQC avec 6 carbones anomériques à δ 93.0, 110.7, 111.2, 100.6, 104.7 et 103.9 respectivement.

A partir des protons anomériques, la nature des 6 systèmes de spins a été déterminée grâce à l'expérience COSY et confirmée par l'expérience TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser :

- Un β -glucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz).
- Un β -xylopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz).
- Deux α -rhamnopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 6.37 (d, $J = 1.0$ Hz, Rha I) et 5.58 (d, $J = 1.1$ Hz, Rha II).
- Deux β -apiofuranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 5.88 (d, $J = 4.0$ Hz, Api I) et 6.06 (d, $J = 2.6$ Hz, Api II).

Séquençage osidique en C-3 La corrélation HMBC entre le proton anomérique δ 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz, Glc) et le carbone à δ 79.4 (Agly-3) et la corrélation NOESY entre δ_H 4.99 (d, $J = 7.8$ Hz, Glc) et δ_H 4.21 (Agly-3) montrent que le β -glucopyranosyle est lié en position C-3 de l'aglycone.

Séquençage osidique en C-28

Après soustraction des signaux du glucopyranosyle en position 3, il reste ceux de la chaîne oligosaccharidique composé de 5 sucres, liée en position C-28 de l'aglycone. A la différence des composés **AMA-1** et **AMR**, le rhamnopyranosyle estérifiant la position C-28 de l'aglycone est substitué seulement en position C-2. Ceci est justifié par la corrélation HMBC entre δ_H 5.58 (d, $J = 1.1$ Hz, Rha II) et δ_C 75.3 (Rha I-2) et la corrélation NOESY entre δ_H 4.41 (Rha I-2) et δ_H 5.58 (d, $J = 1.1$ Hz, Rha II).

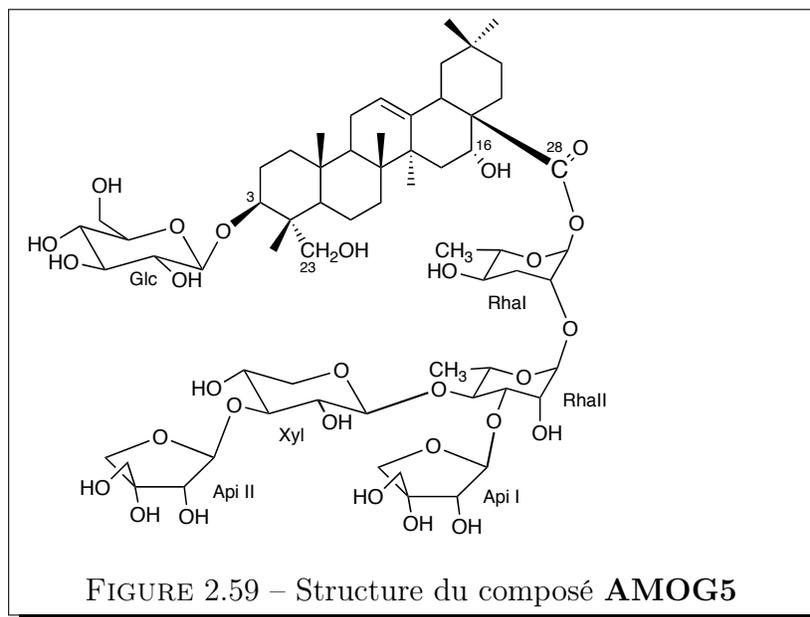
Les corrélations HMBC entre δ_H 4.34 (dd, $J = 9.1, 2.9$ Hz, Rha II-3) et δ_C 111.2 (Api I-1), NOESY entre δ_H 4.34 (dd, $J = 9.1, 2.9$ Hz, Rha II-3) et δ_H 5.88 (d, $J = 4.0$ Hz, Api I-1), montrent que l'apiose I est lié au rhamnose II par une liaison (1→3).

La liaison (1→4) entre le xylose et le rhamnose II est déduite des corrélations HMBC entre δ_H 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz, Xyl-1) et δ_C 77.5 (Rha II-4), entre δ_H 4.40 (Rha II-4) et δ_C 104.7 (Xyl-1) et NOESY entre δ_H 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz, xyl-1) et δ_H 4.40 (Rha II-4).

Enfin les corrélations HMBC entre δ_H 4.01 (Xyl-3) et δ_C 110.7 (Api II-1), entre δ_H 6.06 (d, $J = 2.6$ Hz, Api II-1) et δ_C 84.6 (Xyl-3) et NOESY entre δ_H 6.06 (d, $J = 2.6$ Hz, Api II-1) et δ_H 4.01 (Xyl-3), permettent de déduire une liaison (1→3) entre l'apiose II et le xylose.

Conclusion

La structure du composé **AMOG5** est donc établie comme étant le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-caulophyllogénine 28-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)- [β -D-apiofuranosyl-(1→3)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-rhamnopyranoside (Timité et al., 2011).



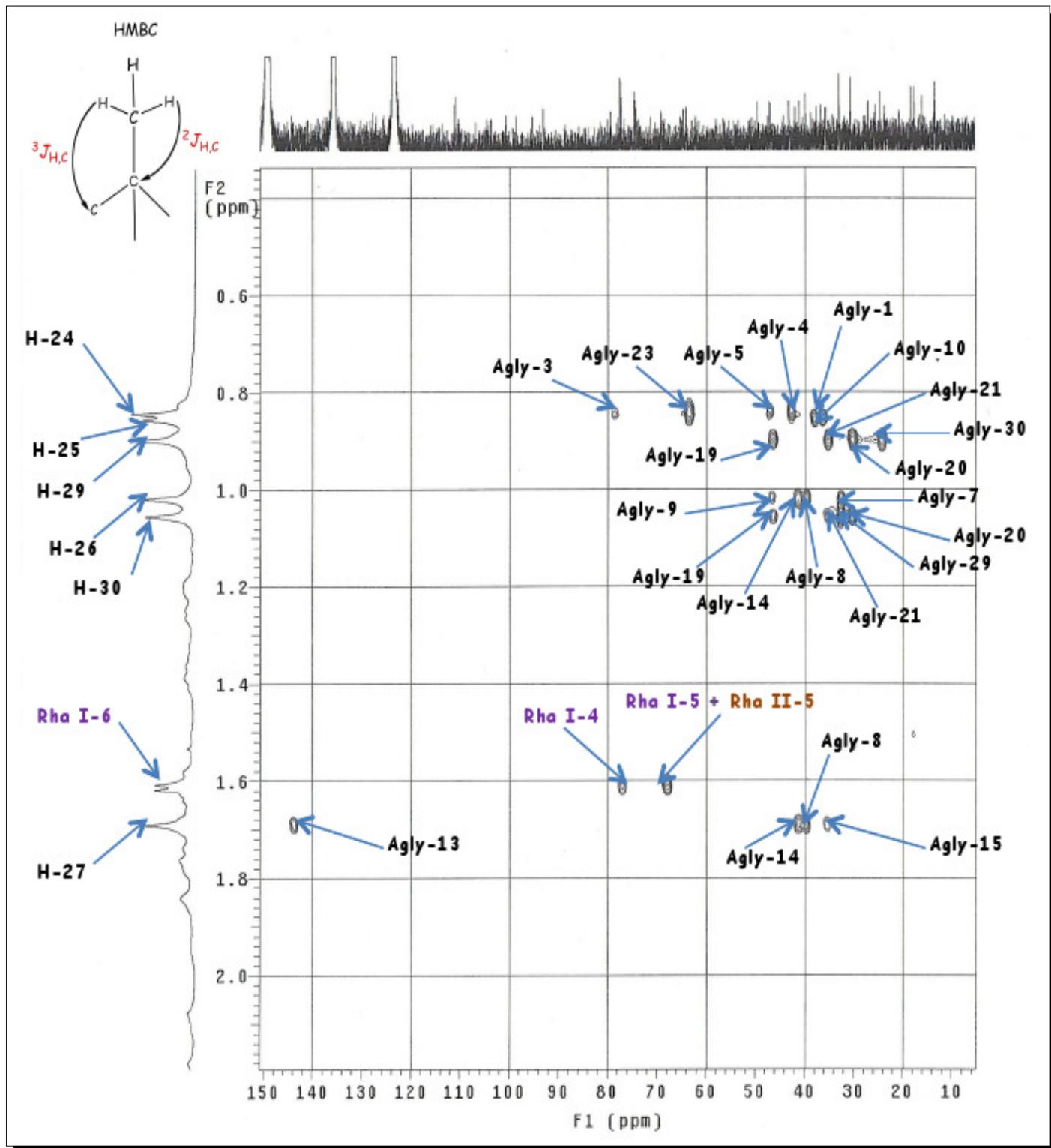


FIGURE 2.60 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **AMOG5**

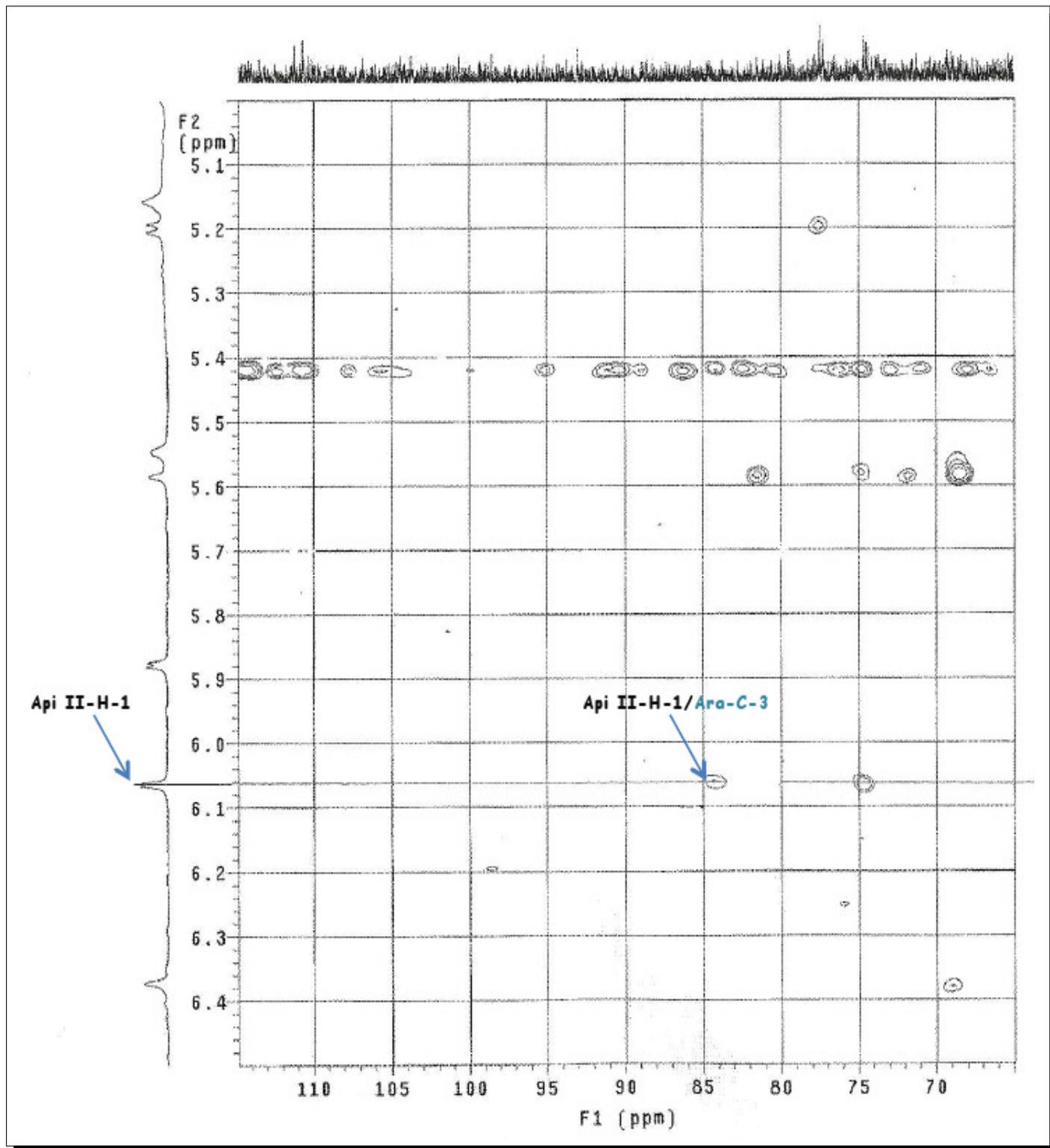


FIGURE 2.61 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine **AMOG5**

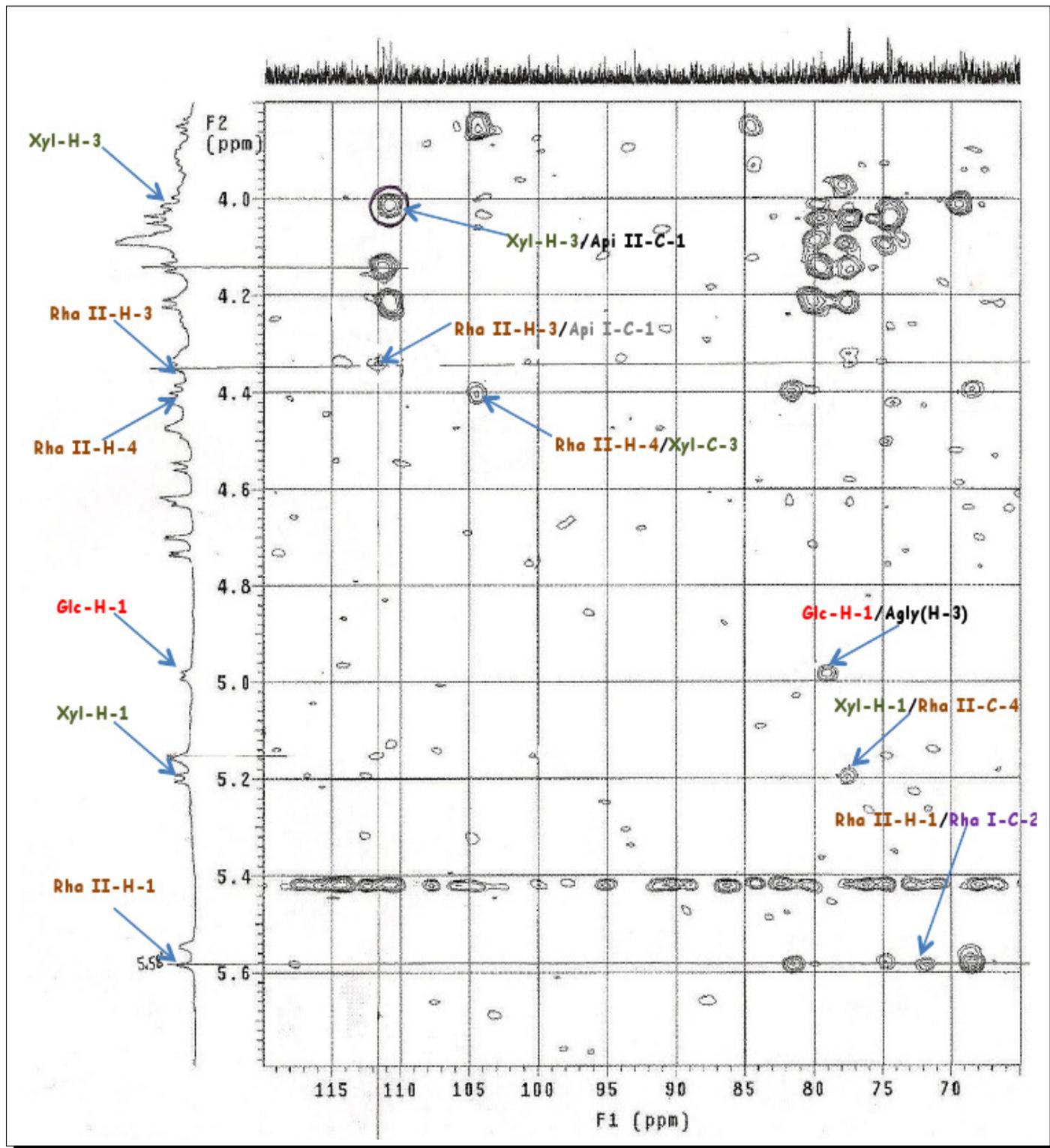


FIGURE 2.62 – Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine AMOG5

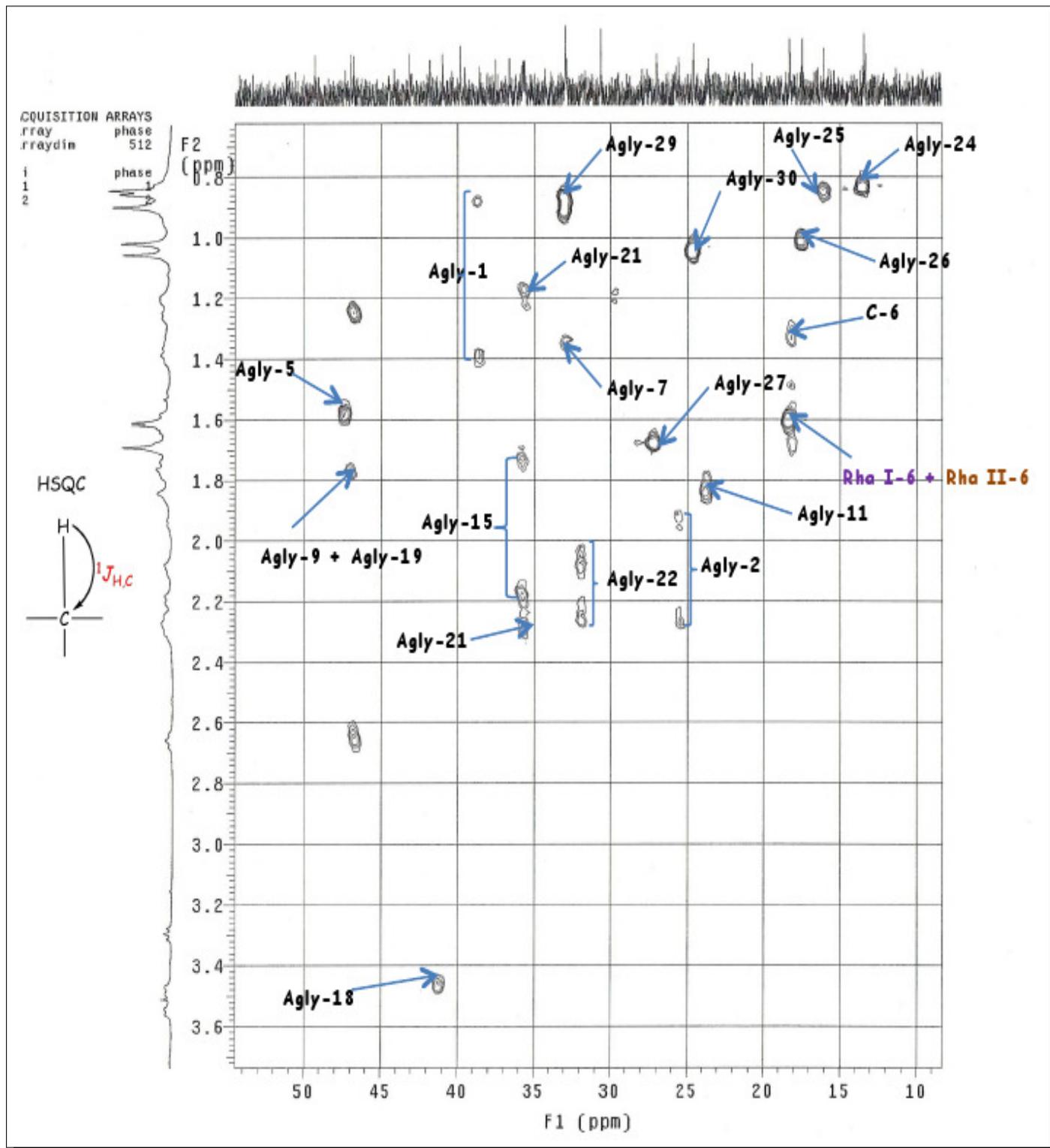


FIGURE 2.63 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMOG5

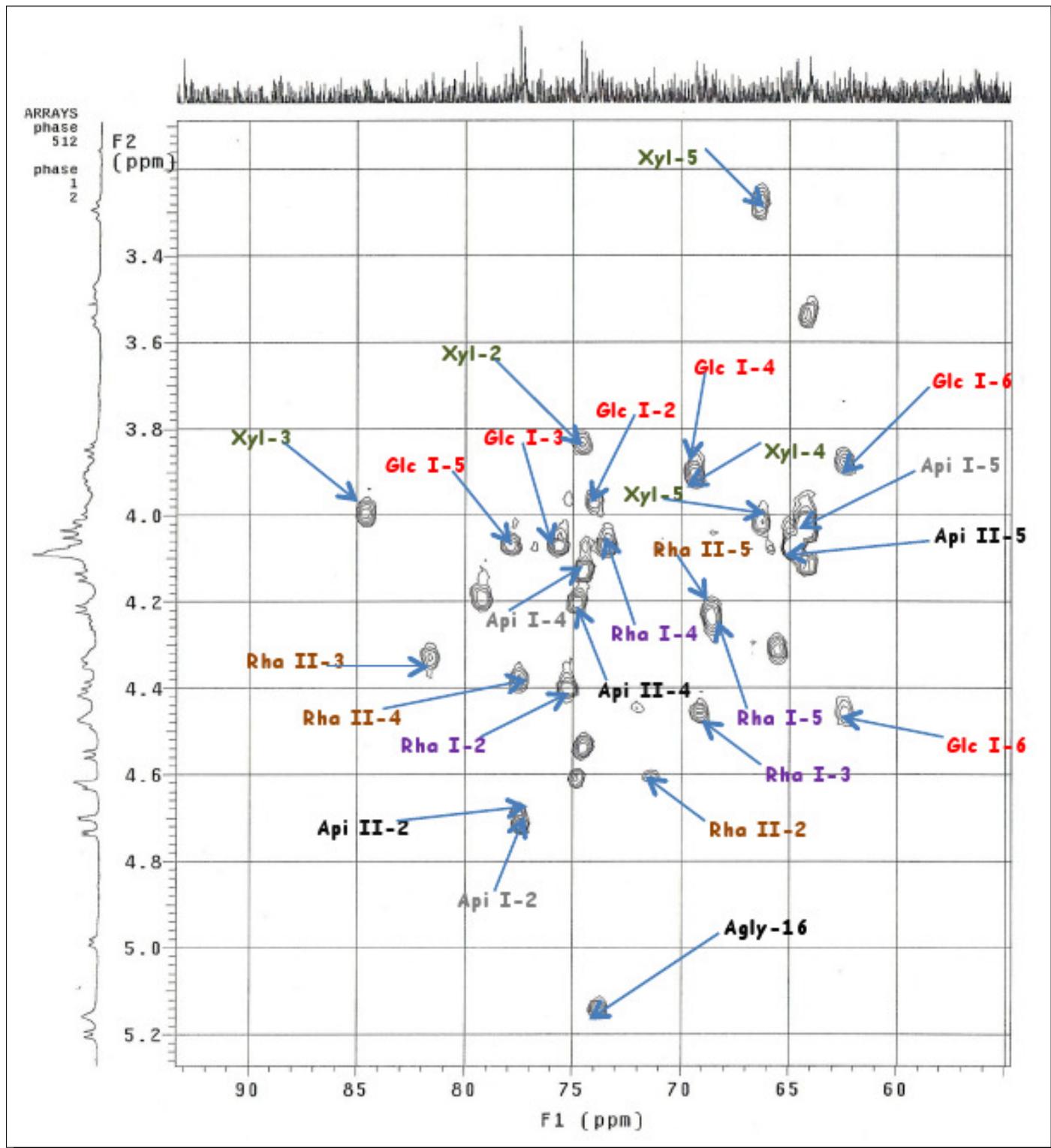


FIGURE 2.64 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine AMOG5

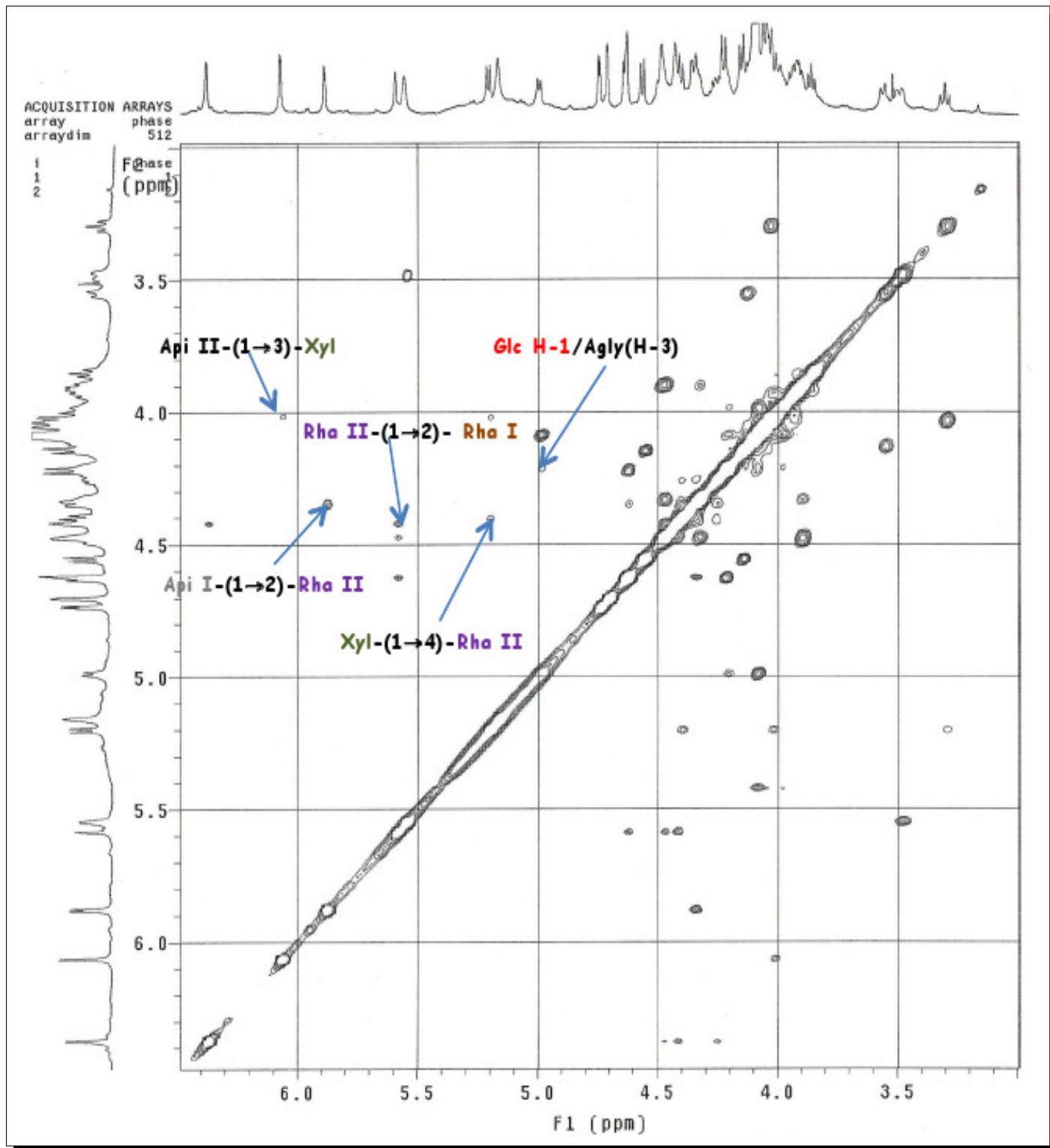


FIGURE 2.65 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMOG5

2.3.3 Conclusion de l'étude chimique du *Arenaria montana*

L'étude phytochimique de *Arenaria montana* a conduit à l'isolement et la détermination structurale de 3 saponines triterpéniques, **AMA-1**, **AMR** et **AMOG-5**, toutes nouvelles. Voici quelques rappels afin de mieux comprendre l'intérêt de cette étude au plan chimiotaxonomique :

- Cette plante appartient à la famille des **Caryophyllaceae** qui est une famille connue comme étant majoritairement riche en glycosides de **gypsogénine**, d'**acide gypsogénique** et d'**acide quillaïque** (cf. Etudes phytochimiques antérieures).
- Le genre *Arenaria* est inexploité pour son contenu en saponines. Sur environ 306 espèces que compte le genre *Arenaria* (Williams, 1898, Zhou, 1996), seulement 3 ont fait, avant notre étude, l'objet d'investigations phytochimiques. La première étude a été réalisée sur l'espèce *Arenaria graminifolia* (Bukharov and Shcherbak, 1973). Elle avait abouti à l'isolement de 2 saponines appelées **arenarioside A** et **B**. L'hydrolyse de ces saponines a révélé qu'ils se composaient de **Galactose**, **glucose**, **xylose**, **rhamnose**, **acide glucuronique** et de **gypsogénine**. Deux décennies plus tard, les espèces *Arenaria filicaulis* (Elgamal et al., 1998, Soliman et al., 1999) et *Arenaria juncea* (Gaidi et al., 2001a, 2005) ont été étudiés. En plus des glycosides de gypsogénines isolés de ces 2 dernières espèces, *Arenaria filicaulis* a aussi permis d'isoler les **Snatzkein C** et **D**, qui sont des glycosides d'**acide 3 β ,20-dihydroxylupan-28-oïque**.

Ainsi notre étude vient conforter les résultats obtenus depuis quelques années au plan chimiotaxonomique dans la famille des Caryophyllaceae avec quelques nouveautés :

- La présence des **Caulophyllogénine** et d'**acide échinocystique**, isolés pour la première fois dans le genre *Arenaria*. Ces saponogénines ont seulement été isolées dans les espèces *Gypsophila oldhamiana* (Luo et al., 2008a) et *Agrostemma gracilis* (Koz et al., 2010) (Caryophyllaceae).
- La présence de 2 unités apiofuranosyle et l'estérification de la position C-28 de l'aglycone par le rhamnose constituent des phénomènes rares en général et dans la famille des Caryophyllaceae en particulier.

Compte tenu de tout ce qui précède :

- On remarque que la composition en aglycone du genre *Arenaria* diffère de celle couramment rencontrée dans les autres genres de la famille des Caryophyllaceae. Notre propos est certes prématuré vu le nombre limité de cas obtenus, mais il devrait servir de base à

de futures recherches.

- Après la détermination de glycosides d'**acide 3 β ,20-dihydroxylupan-28-oïque**, caullophyllogénine et d'acide échinocystique, le genre *Arenaria* serait-il la source d'autres type de saponine ? Il faudrait des investigations sur d'autres espèces de ce genre pour en savoir davantage.

Tout comme les composés issus de l'investigation phytochimique des espèces du genre *Acanthophyllum*, les saponines **AMA-1**, **AMR** et **AMOG5**, ont été testées sur deux lignées de cellules cancéreuses coliques (lignées **HCT 116** et **HT-29**). Cette étude biologique permettra de faire une étude comparative entre les dérivés de la gypsogénine, de l'acide gypsogénique, de la caullophyllogénine et de l'acide échinocystique et permettra d'établir aussi des relations structure-activité (cf. Etude Biologique).



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Unusual oleanane-type saponins from *Arenaria montana*

Gaussou Timité^a, Anne-Claire Mitaine-Offer^a, Tomofumi Miyamoto^b, Chiaki Tanaka^b,
Jean-François Mirjolet^c, Olivier Duchamp^c, Marie-Aleth Lacaille-Dubois^{a,*}

^a Laboratoire de Pharmacognosie, UMB, UPRES-EA 3660, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7, Bd. Jeanne D'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

^c Oncodesign, 20 rue Jean Mazon, BP 27627, 21076 Dijon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2010
Received in revised form 3 January 2011
Available online 1 March 2011

Keywords:

Arenaria montana
Caryophyllaceae
Saponins
Echinocystic acid
Caulophyllogenin

ABSTRACT

Three oleanane-type saponins, 3-O-β-D-glucopyranosylechinocystic acid 28-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-α-L-rhamnopyranosyl ester (**1**), 3-O-β-D-glucopyranosylechinocystic acid 28-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-α-L-rhamnopyranosyl ester (**2**), 3-O-β-D-glucopyranosylcaulophyllogenin 28-O-β-D-apiofuranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-[β-D-apiofuranosyl-(1→3)]-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyl ester (**3**) were isolated from the whole plant of *Arenaria montana*. Their unusual structures for the Caryophyllaceae family were established mainly by 2D NMR techniques and mass spectrometry.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Caryophyllaceae family is a well known family containing 104 genera with more than 2000 species. These plants, mostly herbaceous, are rich in oleanane-type saponins like the genera *Acanthophyllum*, *Arenaria*, *Gypsophila* and *Silene* (Böttger and Melzig, in press). These saponins are mainly glycosides of gypsogenin, gypsogenic acid, and quillaic acid. As the genus *Arenaria* was already described as a source of gypsogenin glycosides (Soliman et al., 1999; Gaidi et al., 2001, 2005), we decided to complete the chemotaxonomic data about cytotoxic saponins from the Caryophyllaceae family, by the phytochemical study of the species *Arenaria montana* L. (Mountain sandwort), an herbaceous plant native to mountainous regions of southwestern Europe. In this paper, we described the isolation by successive chromatographic steps of three new triterpene saponins (**1–3**) from the aqueous methanolic extract of the whole plant. The novelty of their structure was based on the rare linkage between the C-28 position of the aglycon and a rhamnopyranosyl moiety, and on the nature of their aglycon: the unusual echinocystic acid and the caulophyllogenin reported for the first time in the Caryophyllaceae family. Cytotoxicity of compounds **1–3** was evaluated against HCT 116 and HT-29 human colon cancer cells, respectively.

2. Results and discussion

After extraction by MeOH 70% of the whole plant of *A. montana*, the resulting extract was subjected to multiple chromatographic steps over silica gel to yield compounds **1–3** (Fig. 1). The elucidation of their structures was performed mainly by 600 MHz NMR analysis, including 1D and 2D NMR (¹H–¹H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), and mass spectrometry.

Compounds **1–3** were obtained as white amorphous powders. The monosaccharides obtained by acid hydrolysis of each compound were identified by comparison on TLC with authentic samples as glucose, xylose, and rhamnose for **1**, glucose, xylose, arabinose, and rhamnose for **2**, glucose, xylose, apiose, and rhamnose for **3**. The absolute configurations of the sugars were determined to be D for glucose (Glc), xylose (Xyl) and apiose (Api), and L for arabinose (Ara) and rhamnose (Rha), by GC analysis by a method previously describe in Hara et al. (1987). The relatively large ³J_{H-1,H-2} values of the Glc, Xyl, and Ara (6.2–7.8 Hz) in their pyranose form indicated a β anomeric orientation for Glc and Xyl, and an α anomeric orientation for Ara (Mimaki et al., 2004). The multiplicity of the anomeric proton of the Api as a doublet (2.6–4.0) in its furanose form indicated a β anomeric orientation for the Api (Schühly et al., 2000). The large ¹J_{H-1,C-1} values of the Rha (165–168 Hz), confirmed that the anomeric protons were equatorial (α-pyranoid anomeric form).

The HRESIMS of **1** established its molecular formula as C₅₃H₈₆O₂₁. Compound **1** showed in FABMS (negative-ion mode) a quasimolecular ion peak [M–H][–] at m/z 1057 followed by another

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80393229; fax: +33 3 80393300.

E-mail address: m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr (M.-A. Lacaille-Dubois).

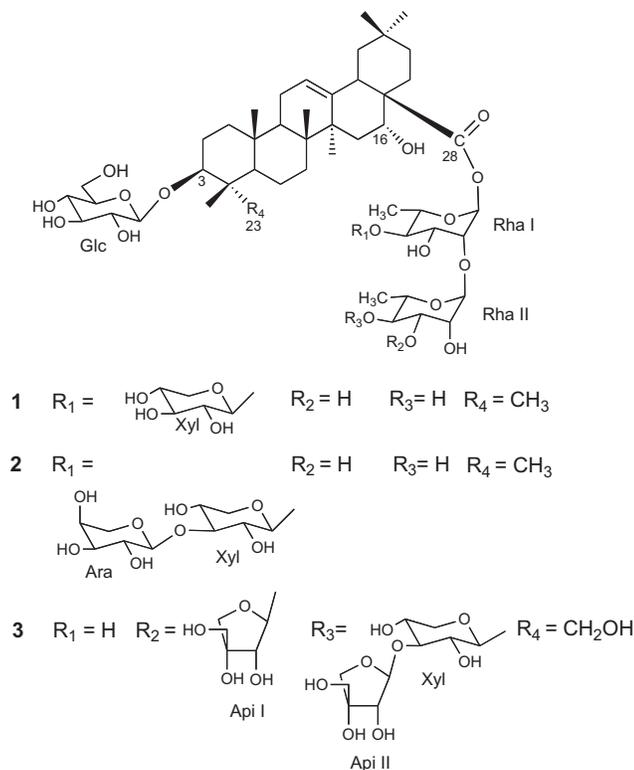


Fig. 1. Structures of compounds 1–3.

fragment ion peak at m/z 925 $[(M-H)-132]^-$, due to the loss of one terminal pentosyl moiety.

The structure of the aglycon (Agly) of **1** was recognized to be the triterpene echinocystic acid by 1H and ^{13}C NMR analysis (Table 1)

Table 1

^{13}C , 1H NMR spectroscopic data of the aglycon moieties of 1–3 in pyridine- d_5 (δ ppm, J in Hz).

	1		2		3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38.4	0.80, 1.35	38.4	0.87, 1.38	38.6	0.89, 1.38
2	25.9	1.79, 2.26	25.9	1.81, 2.36	25.5	1.94, 2.26
3	89.1	3.26 <i>dd</i> 12.0, 4.2	89.1	3.36 <i>dd</i> 11.4, 4.0	79.4	4.21
4	39.0	–	39.5	–	43.0	–
5	55.5	0.70 <i>br d</i> 12.0	55.5	0.69 <i>br d</i> 11.9	47.5	1.59
6	18.1	1.18, 1.36	18.2	1.19, 1.36	18.2	1.34, 1.68
7	33.1	1.31, 1.44	33.0	1.27, 1.43	33.0	1.36, nd
8	39.6	–	39.9	–	39.8	–
9	46.7	1.60	46.6	1.62	46.9	1.78
10	36.5	–	36.5	–	36.5	–
11	23.4	1.80, nd	23.4	1.78, nd	23.5	1.84, nd
12	122.4	5.53 <i>br s</i>	122.3	5.53 <i>br s</i>	122.6	5.54 <i>br s</i>
13	144.0	–	144.2	–	144.0	–
14	41.6	–	41.6	–	41.7	–
15	35.5	1.76, 2.16	35.5	1.78, 2.16	35.5	1.73, 2.17
16	73.4	5.16 <i>br s</i>	73.6	5.14 <i>br s</i>	73.8	5.16 <i>br s</i>
17	49.2	–	49.2	–	49.2	–
18	40.9	3.46 <i>dd</i> 13.7, 3.2	40.8	3.47 <i>dd</i> 12.4, 3.1	40.9	3.47 <i>dd</i> 13.8, 3.1
19	46.7	1.28, 2.66 <i>t</i> 12.9	46.6	1.27, 2.65 <i>t</i> 12.9	46.9	1.78, nd
20	30.4	–	30.4	–	30.5	–
21	35.5	1.19, 2.26	35.5	1.17, 2.26	35.5	1.17, 2.28
22	31.5	2.07, 2.26	31.6	2.03, 2.25	31.9	2.07, 2.26
23	27.8	1.15 <i>s</i>	27.8	1.16 <i>s</i>	63.9	3.55 <i>d</i> 10.7, 4.13
24	16.6	0.87 <i>s</i>	16.6	0.89 <i>s</i>	13.3	0.84 <i>s</i>
25	15.2	0.72 <i>s</i>	15.2	0.72 <i>s</i>	15.9	0.85 <i>s</i>
26	17.1	0.95 <i>s</i>	17.1	0.97 <i>s</i>	17.4	1.01 <i>s</i>
27	26.8	1.68 <i>s</i>	26.7	1.67 <i>s</i>	26.9	1.69 <i>s</i>
28	175.7	–	175.8	–	175.8	–
29	32.8	0.92 <i>s</i>	32.8	0.92 <i>s</i>	32.9	0.89 <i>s</i>
30	24.4	1.04 <i>s</i>	24.4	1.05 <i>s</i>	24.5	1.05 <i>s</i>

Overlapped proton signals are reported without designated multiplicity. Nd: not determined.

using the correlations observed in COSY, NOESY, HSQC and HMQC spectra, and was in full agreement with literature data (Koz et al., 2010). The 1H NMR spectrum of **1** showed signals for seven angular methyl groups as singlets (Table 1), one olefinic proton at δ 5.53 (1H, *br s*), two oxygens bearing methine protons at δ 3.26 (1H, *dd*, $J = 12.0, 4.2$ Hz), and δ 5.16 (1H, *br s*). The HMBC correlations between two angular methyl groups at δ_H 0.87 (3H, *s*, Agly-24) and δ_H 1.15 (3H, *s*, Agly-23), and δ_C 89.1 (Agly-3) confirmed the location of the first secondary alcoholic function at C-3. The COSY correlation between δ_H 5.16 (1H, *br s*, Agly-16) and δ_H 1.76, 2.16 (2H, Agly-15) and the HMBC correlation between δ_H 5.16 (1H, *br s*, Agly-16) and δ_C 41.6 (Agly-14), allowed the location of the second secondary alcoholic function at C-16. The absolute configuration of C-3 and C-16 was determined from a NOESY experiment: cross-peaks at δ_H 3.26 (1H, *dd*, $J = 12.0, 4.2$ Hz, Agly-3)/ δ_H 0.70 (1H, *br d*, $J = 12.0$, Agly-5), and δ_H 5.16 (1H, *br s*, Agly-16)/ δ_H 0.95 (3H, *s*, Agly-26), confirmed the absolute configuration of the echinocystic acid. This genin is encountered only for the second time in the Caryophyllaceae family. The first report of echinocystic acid as aglycon of saponins in this family was in a recent phytochemical study of the species *Agrostemma gracilis* (Koz et al., 2010).

The 1H NMR spectrum of **1** displayed in the sugar region signals of four anomeric protons at δ 6.33 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz), 5.60 (1H, *d*, $J = 1.0$ Hz), 5.04 (1H, *d*, $J = 7.8$ Hz), and 4.75 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz), which gave correlations, in the HSQC spectrum, with four anomeric carbon signals at δ 92.9, 100.6, 106.0 and 106.0, respectively. Complete assignments of the resonances of each sugar were achieved by extensive 2D NMR analyses (COSY, TOCY, HSQC, HMBC) (Table 2). Units of two α -rhamnopyranosyl (Rha-I and Rha-II), one β -xylopyranosyl (Xyl), and one β -glucopyranosyl (Glc) were identified.

A cross-peak observed in the NOESY spectrum at δ_H 4.75 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-1)/ δ_H 3.26 (1H, *dd*, $J = 12.0, 4.2$ Hz, Agly-3), revealed a substitution at C-3 of the aglycon by a glucopyranosyl moiety.

Table 2¹³C, ¹H NMR spectroscopic data of the sugar moieties of **1–3** in pyridine-*d*₅ (δ ppm, *J* in Hz).

	1		2		3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
3-O-Glc-1	106.0	4.75 <i>d</i> 7.6	106.0	4.79 <i>d</i> 7.6	103.9	4.99 <i>d</i> 7.8
2	74.7	3.95 <i>t</i> 9.5	74.7	4.00 <i>t</i> 9.5	73.9	3.98
3	77.5	4.17	77.6	4.18	75.7	4.08
4	70.4	4.06	70.3	4.06	69.4	3.92
5	77.6	4.02	77.6	4.08	77.9	4.08
6	62.4	3.88, 4.44	61.7	3.89, 4.46	62.5	3.88 <i>dd</i> 11.2, 5.2, 4.47 <i>br d</i> 11.2
28-O-Rha-I-1	92.9	6.33 <i>d</i> 1.1	92.8	6.35 <i>d</i> 1.1	93.0	6.37 <i>d</i> 1.0
2	74.9	4.41 <i>br s</i>	75.0	4.40 <i>br s</i>	75.3	4.41 <i>br s</i>
3	69.3	4.46	69.0	4.46	69.2	4.46
4	82.6	4.25	82.5	4.24	73.4	4.09
5	68.2	4.24	68.3	4.24	68.7	4.25 <i>dq</i> 9.5, 6.2
6	17.9	1.62 <i>d</i> 5.7	17.8	1.60 <i>d</i> 5.2	18.6	1.61 <i>d</i> 6.2
Rha-II-1	100.6	5.60 <i>d</i> 1.0	100.6	5.52 <i>d</i> 1.0	100.6	5.58 <i>d</i> 1.1
2	71.3	4.45 <i>br s</i>	71.2	4.44	71.4	4.62 <i>br s</i>
3	71.9	4.43	71.8	4.42	81.6	4.34 <i>dd</i> 9.1, 2.9
4	73.1	4.20 <i>t</i> 9.3	73.2	4.18	77.5	4.40
5	68.2	4.21	68.1	4.20	68.7	4.25 <i>dq</i> 9.5, 6.2
6	17.9	1.60 <i>d</i> 5.7	17.8	1.58 <i>d</i> 5.2	18.6	1.61 <i>d</i> 6.2
Xyl-1	106.0	5.04 <i>d</i> 7.8	105.4	5.04 <i>d</i> 6.2	104.7	5.20 <i>d</i> 7.6
2	75.3	3.91 <i>t</i> 8.6	74.3	3.90	74.5	3.85 <i>t</i> 8.3
3	77.1	4.05	85.7	3.98 <i>t</i> 9.5	84.6	4.01
4	70.4	4.06	68.7	3.93	69.4	3.92
5	66.7	3.41 <i>t</i> 10.0, 4.10	66.2	3.37 <i>t</i> 11.4, 4.06	66.3	3.29 <i>t</i> 10.9, 4.03
Ara-1			104.7	5.09 <i>d</i> 6.9		
2			71.8	4.42	111.2	5.88 <i>d</i> 4.0
3			73.5	4.10	77.4	4.73 <i>d</i> 4.0
4			68.1	4.20	79.4	–
5			66.6	3.68 <i>br d</i> 12.6, 4.23	74.5	4.14 <i>d</i> 9.1, 4.55 <i>d</i> 9.1
Api-I-1					64.1	4.04
2					110.7	6.06 <i>d</i> 2.6
3					77.5	4.70 <i>d</i> 2.6
4					79.9	–
5					74.9	4.22 <i>d</i> 9.0, 4.63 <i>d</i> 9.0
Api-II-1					64.8	4.08

Overlapped proton signals are reported without designated multiplicity.

Moreover, a correlation in the HMBC spectrum between δ_H 6.33 (1H, *d*, *J* = 1.1 Hz, Rha-I-1) and δ_C 175.7 (Agly-28) proved the linkage between the aglycon and a rhamnopyranosyl unit which showed NMR signals of a 1,2,4-trisubstituted Rha-I. To the best of our knowledge and after examination of the literature data, the esterification of the C-28 position by a rhamnopyranosyl moiety is very rare in saponins, and shows the novelty of this structure, as well as the presence of echinocystic acid. In the HMBC spectrum, the correlations between δ_H 5.60 (1H, *d*, *J* = 1.0 Hz, Rha-II-1) and δ_C 74.9 (Rha-I-2), and between δ_H 5.04 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, Xyl-1) and δ_C 82.6 (Rha-I-4), revealed the (1→2) linkage between Rha-II and Rha-I and the (1→4) linkage between Xyl and Rha-I. This was confirmed by the NOESY cross-peaks at δ_H 5.60 (1H, *d*, *J* = 1.0 Hz, Rha-II-1)/ δ_H 4.41 (Rha-I-2), and δ_H 5.04 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, Xyl-1)/ δ_H 4.25 (1H, Rha-I-4).

On the basis of the above results, the structure of **1** was elucidated as 3-O- β -D-glucopyranosylechinocystic acid 28-O- β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- α -L-rhamnopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound **2** established its molecular formula as C₅₈H₉₄O₂₅. Compound **2** showed in FABMS (negative-ion mode) a quasimolecular ion peak [M–H][–] at *m/z* 1189 and other fragment ion peaks were observed at *m/z* 1057 [(M–H)–132][–], 925 [(M–H)–132–132][–], and 779 [(M–H)–132–132–146][–], which revealed the successive elimination of two pentosyl and one deoxyhexosyl moiety.

The ¹H and ¹³C NMR signals of **2** assigned from the 2D NMR spectra, were almost superimposable on those of **1** excepted for the xylopyranosyl moiety and for the presence of an additional arabinopyranosyl moiety (Tables 1 and 2). The NMR data of this xylopyranosyl moiety were in accordance with those of a 1,3-disubstituted xylopyranosyl group. In the ¹³C NMR spectrum, the deshielded signal of the Xyl-3 position at δ_C 85.7 in comparison with a free Xyl-3 position, and a NOESY cross-peak at δ_H 3.98 (1H, *t*, *J* = 9.5 Hz, Xyl-3)/ δ_H 5.09 (1H, *d*, *J* = 6.9 Hz, Ara-1), suggested a (1→3) glycosidic linkage between these two sugars. This was confirmed by a HMBC correlation between δ_H 5.09 (1H, *d*, *J* = 6.9 Hz, Ara-1) and δ_C 85.7 (Xyl-3), and the reverse correlation between δ_H 3.98 (1H, *t*, *J* = 9.5 Hz, Xyl-3) and δ_C 104.7 (Ara-1).

The structure of compound **2** was thus established as 3-O- β -D-glucopyranosylechinocystic acid 28-O- α -L-arabinopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- α -L-rhamnopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound **3** established its molecular formula as C₆₃H₁₀₂O₃₀. Compound **3** showed in FABMS (negative-ion mode) a quasimolecular ion peak [M–H][–] at *m/z* 1337 and other fragment ion peaks were observed at *m/z* 1205 [(M–H)–132][–], 1073 [(M–H)–132–132][–], and 795 [(M–H)–132–132–132–146][–], which revealed the successive elimination of three pentosyl, and one deoxyhexosyl moiety, respectively.

After comparison of the ¹H and ¹³C NMR spectra of echinocystic acid and the genin of **3** (Table 1), one supplementary primary alco-

holic function at δ_{H} 3.55 (1H, *d*, $J = 10.7$ Hz), 4.13 (1H)/ δ_{C} 63.9 remained. The location of this function at the C-23 position was deduced by the HMBC correlation between δ_{H} 0.84 (3H, *s*, Agly-24) and δ_{C} 63.9 (Agly-23). The NOESY cross-peak at δ_{H} 3.55 (1H, *d*, $J = 10.7$ Hz, Agly-H-23)/ δ_{H} 1.69 (3H, *s*, Agly-H-27) proved the α -orientation of this primary alcoholic function. These conclusions established the identification of the genin as the caulophyllogenin (Li et al., 2010), found for the first time in the Caryophyllaceae family. The signal of an ester function at the C-28 position at δ_{C} 175.8, a HMBC cross-peak at δ_{H} 4.99 (1H, *d*, $J = 7.8$ Hz, Glc-1)/ δ_{C} 79.4 (Agly-3), and a NOESY cross-peak at δ_{H} 4.21 (1H, Agly-3)/ δ_{H} 4.99 (1H, *d*, $J = 7.8$ Hz, Glc-1), suggested that compound **3** was a bidesmosidic glycoside. As in compounds **1** and **2**, a 3-*O*-heterosidic linkage with a glucopyranosyl moiety remained, and the C-28 position was esterified by a rhamnopyranosyl moiety but this time, NMR signals of a 1,2-disubstituted Rha-I were found instead of a 1,2,4-trisubstituted Rha-I in the case of **1** and **2** (Table 2). A HMBC cross-peak at δ_{H} 5.58 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz, Rha-II-1)/ δ_{C} 75.3 (Rha-I-2), and a NOESY cross-peak at δ_{H} 4.41 (1H, *br s*, Rha-I-2)/ δ_{H} 5.58 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz, Rha-II-1) confirmed the (1→2) linkage between the two rhamnopyranosyl residues. The HMBC cross-peak at δ_{H} 4.34 (1H, *dd*, $J = 9.1, 2.9$ Hz, Rha-II-3)/ δ_{C} 111.2 (Api-I-1) and the reverse correlations at δ_{H} 4.40 (1H, Rha-II-4)/ δ_{C} 104.7 (Xyl-1) and δ_{H} 5.20 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz, Xyl-1)/ δ_{C} 77.5 (Rha-II-4), indicated the following sequence β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[β -D-apiofuranosyl-(1→3)]- α -L-rhamnopyranosyl. Additional NOESY cross-peaks at δ_{H} 4.34 (1H, *dd*, $J = 9.1, 2.9$ Hz, Rha-II-3)/ δ_{H} 5.88 (1H, *d*, $J = 4.0$ Hz, Api-I-1), and δ_{H} 4.40 (1H, Rha-II-4)/ δ_{H} 5.20 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz, Xyl-1), proved this proposition. The substitution of the xylopyranosyl moiety at the C-3 position by a second apiofuranosyl residue was deduced according to the reverse correlations in the HMBC spectra between δ_{H} 4.01 (1H, Xyl-3)/ δ_{C} 110.7 (Api-II-1) and δ_{H} 6.06 (1H, *d*, $J = 2.6$ Hz, Api-II-1)/ δ_{C} 84.6 (Xyl-3), and the NOESY cross-peak at δ_{H} 4.01 (1H, Xyl-3)/ δ_{H} 6.06 (1H, *d*, $J = 2.6$ Hz, Api-II-1).

These observations were used to assign the structure of **3** as 3-*O*- β -D-glucopyranosylcaulophyllogenin 28-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→4)-[β -D-apiofuranosyl-(1→3)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-rhamnopyranosyl ester. From a chemotaxonomic point of view in the Caryophyllaceae family, the novelty of this structure is the presence of the caulophyllogenin and the two apiofuranosyl moieties, and the esterification of the C-28 position by a rhamnopyranosyl group.

Many saponins of the Caryophyllaceae, belonging to various genera, for example *Acanthophyllum* (Gaidi et al., 2000; Timité et al., 2010) and *Silene* (Gaidi et al., 2002), have been reported to present cytotoxic activities. The most active ones were saponins possessing gypsogenin as aglycon and/or methoxycinnamoyl residue in the oligosaccharidic chain linked at the C-28 position (Gaidi et al., 2000, 2002; Timité et al., 2010). This prompted us to do preliminary tests on the saponins isolated from *A. montana* which are glycosides of echinocystic acid and caulophyllogenin. The cytotoxic activity of compounds **1–3** was determined against two types of human colon cancer cell lines by a colorimetric {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)} assay (Carmichael et al., 1987). Compounds **1** and **2** showed a cytotoxicity comparable to the values of gypsogenin derivatives (Timité et al., 2010) with IC_{50} of 12.4 μM (HCT 116) and 14.3 μM (HT-29) for **1**, and IC_{50} of 11.4 μM (HCT 116) and 9.2 μM (HT-29) for **2**. For compound **3**, which possessed a primary alcoholic function at the C-23 position, instead of a formyl function for gypsogenin and a methyl function for echinocystic acid, the cytotoxic activity was slightly lower with IC_{50} of 15.9 μM (HCT 116) and 19.7 μM (HT-29). The IC_{50} value of the positive control, paclitaxel, was 2.7 and 4.2 nM against HCT 116, and HT-29, respectively.

3. Experimental

3.1. General

Optical rotations were recorded on a AA-OR automatic polarimeter. For 1D and 2D NMR spectra (^1H - ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC), see Mitaine-Offer et al. (2006). HRESIMS (positive-ion mode) was carried out on a Q-TOF 1-micromass spectrometer, and FABMS (negative-ion mode, glycerol matrix) on a JEOL SX 102 mass spectrometer. GC analysis was carried out on a Termostequest gas chromatograph using a DB-1701 capillary column (30 m \times 0.25 mm, i.d.) (J & W Scientific), detection, FID, detector temperature, 250 $^{\circ}\text{C}$, injection temperature, 230 $^{\circ}\text{C}$, initial temperature was maintained at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min and then raised to 270 $^{\circ}\text{C}$ at the rate of 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, carrier gas, He. Analytical TLC were carried out on silica gel plates 60F₂₅₄ (Silicycle) and HPTLC on silica gel 60F₂₅₄ (Merck). The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH-H₂SO₄, 50:1). Isolations were carried out using a column chromatography (CC) on Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) and a medium-pressure liquid chromatographic (MPLC) system [Gilson M 303 pump, Büchi glass column (460 \times 15 mm and 230 \times 15 mm), Büchi precolumn (110 \times 15 mm), silica gel 60 (Merck, 15–40 μm), RP-18 (Silicycle, 75–200 μm)].

3.2. Plant material

The whole plant of *A. montana* L. was collected in May 2008 in Sainte-Croix-Vallée-Française (Lozère, France) and identified by Mr. G. Ducerf, 71110 Briant, France. A voucher specimen (No. 05052008) is deposited in the herbarium of the laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Burgundy, France.

3.3. Extraction and isolation

Dried powdered whole plants of *A. montana* (300 g) were extracted three times under reflux by MeOH-H₂O (7:3, 2 l) for 1 h. This extract was concentrated to dryness (36 g), and 1 g was then submitted to VLC (silicagel RP-18 (75–200 μm), H₂O–MeOH gradient (each eluent 300 ml)) to give five fractions (F1–F5). The fraction F2 (338 mg) eluted with H₂O–MeOH (3:2) was fractionated by successive MPLC (silica gel 60 (15–40 μm), CHCl₃–MeOH–H₂O 15:10:2 and silicagel RP-18 (75–200 μm), H₂O–MeOH gradient) to give **1** (12 mg). To obtain compound **2**, 625 mg of the aqueous methanol extract was submitted to a column chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) to yield two main fractions. The first fraction was purified by successive MPLC (silica gel 60 (15–40 μm), CHCl₃–MeOH–H₂O 8:5:1, 15:10:2 and silicagel RP-18 (75–200 μm), H₂O–MeOH gradient) to give **2** (8 mg). Compound **3** (5 mg) was obtained by successive MPLC (silica gel 60 (15–40 μm), CHCl₃–MeOH–H₂O 60:32:7, 60:35:8 and silicagel RP-18 (75–200 μm), H₂O–MeOH gradient) of 515 mg of the aqueous methanol extract.

3.4. Acid hydrolysis and GC analysis

Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2 N aq. CF₃COOH (5 mL) for 3 h at 95 $^{\circ}\text{C}$. After extraction with CH₂Cl₂ (3 \times 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. The trimethylsilyl thiazolidine derivatives of the sugar residue of each compound were prepared and 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). The following sugars were

detected: D-glucose, D-xylose, and L-rhamnose for **1**, D-glucose, D-xylose, L-arabinose, and L-rhamnose for **2**, and D-glucose, D-xylose, D-apiose, and L-rhamnose for **3**.

3.5. MTT cytotoxicity assay

The bioassay was carried out according to the method described in Carmichael et al. (1987), with two human colorectal cancer cell lines, HCT 116 and HT-29, provided by the Oncodesign society, Dijon, France. Paclitaxel was used as a positive control, and exhibited IC₅₀ values of 2.7 and 4.2 nM against HCT 116 and HT-29, respectively.

3.6. Compound 1

A white amorphous powder; $[\alpha]_D -21.2$ ($c = 0.25$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3500–3400, 2926, 1750, 1640 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) and ¹³C NMR (150 MHz, pyridine-*d*₅), see Tables 1 and 2; HRESIMS: m/z 1081.5565 [M+Na]⁺ (calc. for C₅₃H₈₆O₂₁ + Na 1081.5559); negative FABMS: m/z 1057 [M-H]⁻, 925 [(M-H)-132]⁻.

3.7. Compound 2

A white amorphous powder; $[\alpha]_D -17.3$ ($c = 0.25$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3500–3400, 2928, 1745, 1630 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) and ¹³C NMR (150 MHz, pyridine-*d*₅), see Tables 1 and 2; HRESIMS: m/z 1213.5998 [M+Na]⁺ (calc. for C₅₈H₉₄O₂₅ + Na 1213.5982); negative FABMS: m/z 1189 [M-H]⁻, 1057 [(M-H)-132]⁻, 925 [(M-H)-132-132]⁻, 779 [(M-H)-132-132-146]⁻.

3.8. Compound 3

A white amorphous powder; $[\alpha]_D -12.6$ ($c = 0.25$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3500–3400, 2930, 1750, 1635 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) and ¹³C NMR (150 MHz, pyridine-*d*₅), see

Tables 1 and 2; HRESIMS: m/z 1361.6365 [M+Na]⁺ (calc. for C₆₃H₁₀₂O₃₀ + Na 1361.6354); negative FABMS: m/z 1337 [M-H]⁻, 1205 [(M-H)-132]⁻, 1073 [(M-H)-132-132]⁻, 795 [(M-H)-132-132-132-146]⁻.

References

- Böttger, S., Melzig, M.F., in press. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochem. Lett.*
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936–942.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.-A., 2000. Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *J. Nat. Prod.* 63, 1497–1502.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Lacaille-Dubois, M.-A., 2001. Junceosides A–C, new triterpene saponins from *Arenaria juncea*. *J. Nat. Prod.* 64, 1533–1537.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.-A., 2002. New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation. *J. Nat. Prod.* 65, 1568–1572.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Lacaille-Dubois, M.-A., 2005. An unusual new sulfated triterpene saponin from *Arenaria juncea*. *Die Pharm.* 60, 635–637.
- 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.
- Koz, O., Bedir, E., Masullo, M., Alankus-Calikan, O., Piacente, S., 2010. Triterpene glycosides from *Agrostemma gracilis*. *Phytochemistry* 71, 663–668.
- Li, G., Zhang, Y., Yang, B., Xia, Y., Zhang, Y., Lü, S., Kuang, H., 2010. Leiyemudanosides A–C, three new bidesmosidic triterpenoid saponins from the roots of *Caulophyllum robustum*. *Fitoterapia* 81, 200–204.
- Mimakí, 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.
- Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Semmar, N., Jay, M., Lacaille-Dubois, M.-A., 2006. A new oleanane glycoside from the roots of *Astragalus caprinus*. *Magn. Reson. Chem.* 44, 713–716.
- Schühly, W., Heilmann, J., Calis, I., Sticher, O., 2000. Novel triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. *Helv. Chim. Acta* 83, 1509–1516.
- Soliman, H.S.M., Elgamal, M.H.A., Simon, A., Toth, G., Horvath, G., Duddeck, H., 1999. A new gypsogenin saponin from *Arenaria filicaulis*. *J. Nat. Prod.* 62, 885–888.
- Timité, G., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Ramezani, M., Rustaiyan, A., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Lacaille-Dubois, M.-A., 2010. Structure elucidation of new oleanane-type glycosides from three species of *Acanthophyllum*. *Magn. Reson. Chem.* 48, 370–374.

2.4 Etude phytochimique de *Allium schoenoprasum* L.

2.4.1 Extraction et isolement des composés des composés isolés de *Allium schoenoprasum* L.

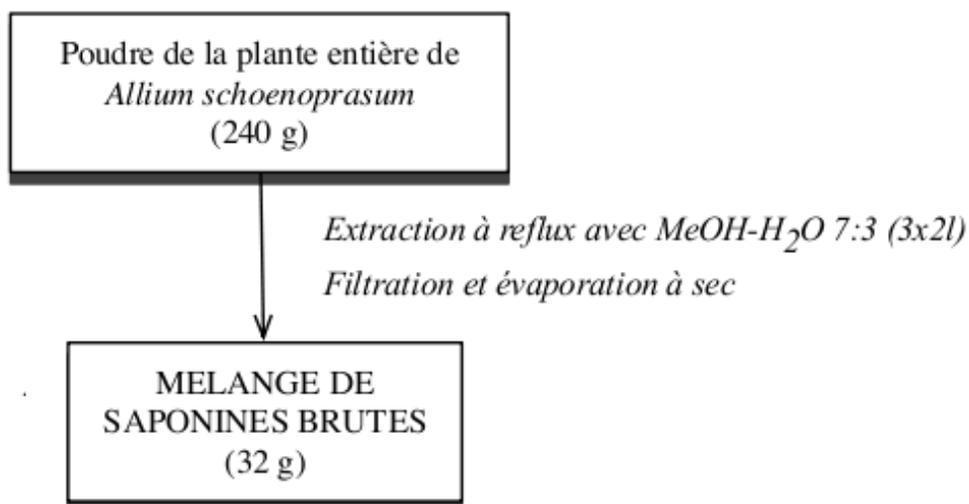


FIGURE 2.66 – Schéma d'extraction des saponines de *Allium schoenoprasum*

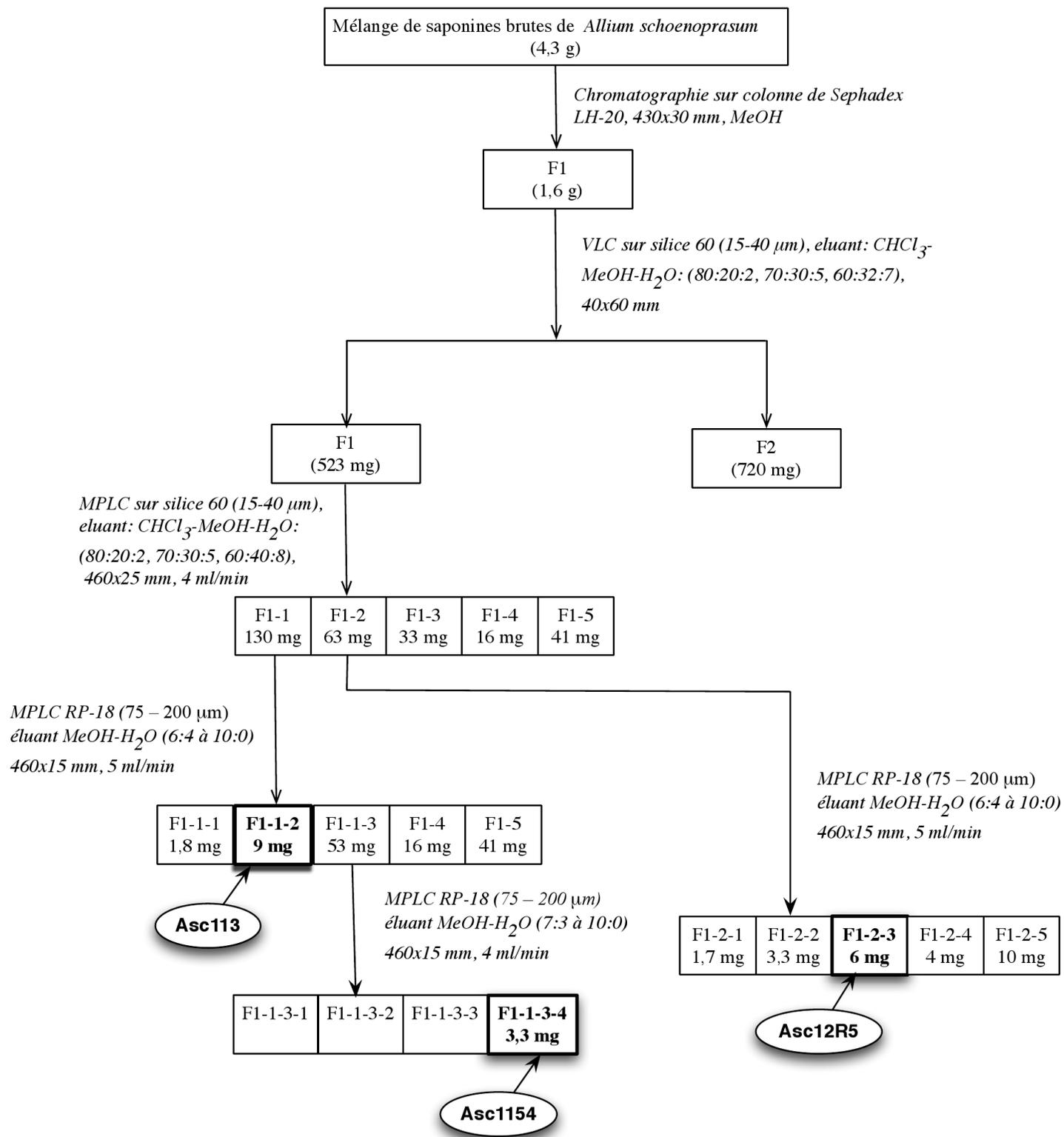


FIGURE 2.67 – Purification des composés Asc113, Asc1154 et Asc12R5

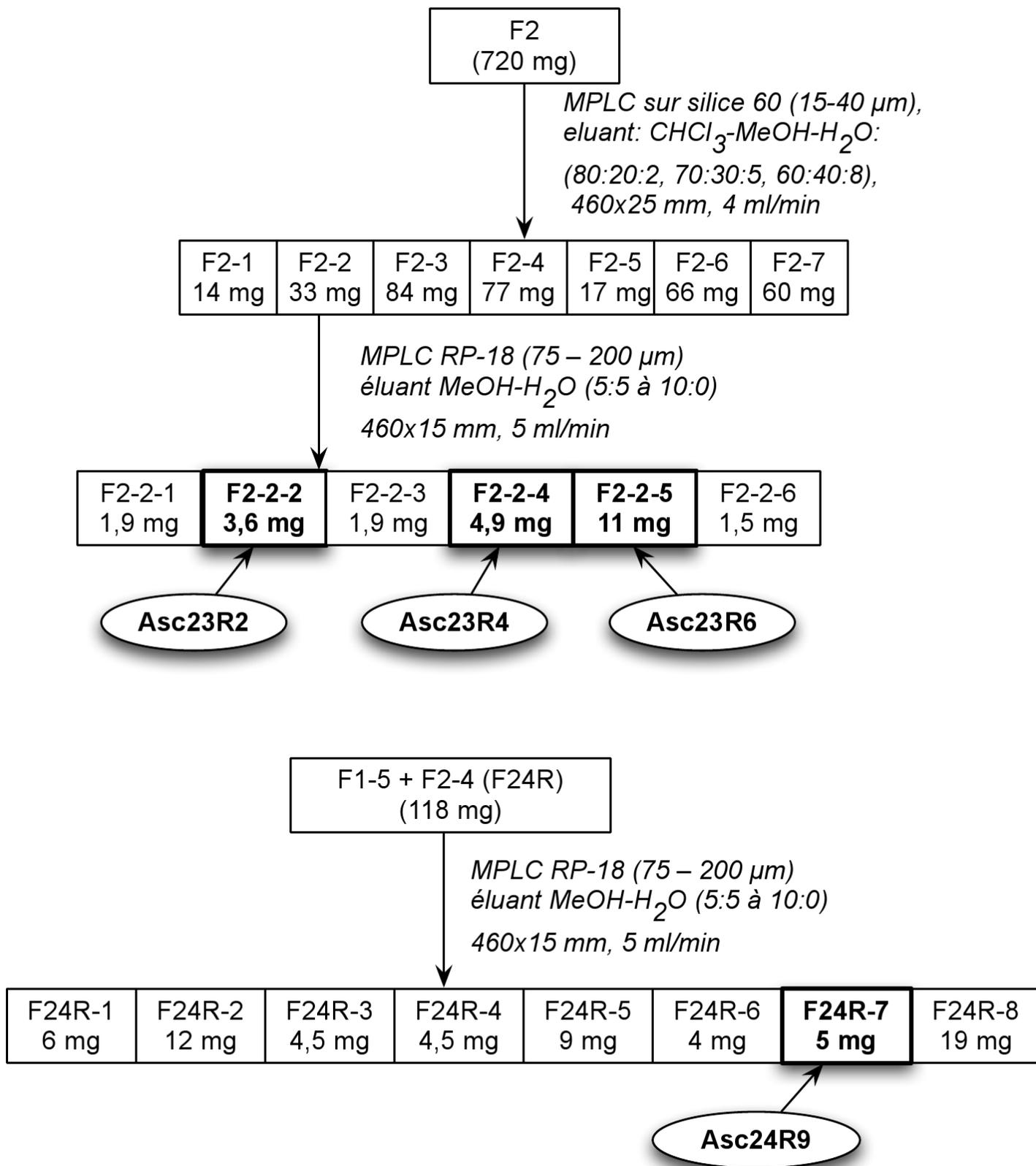


FIGURE 2.68 – Purification des composés Asc23R2, Asc23R4, Asc23R6 et Asc24R9

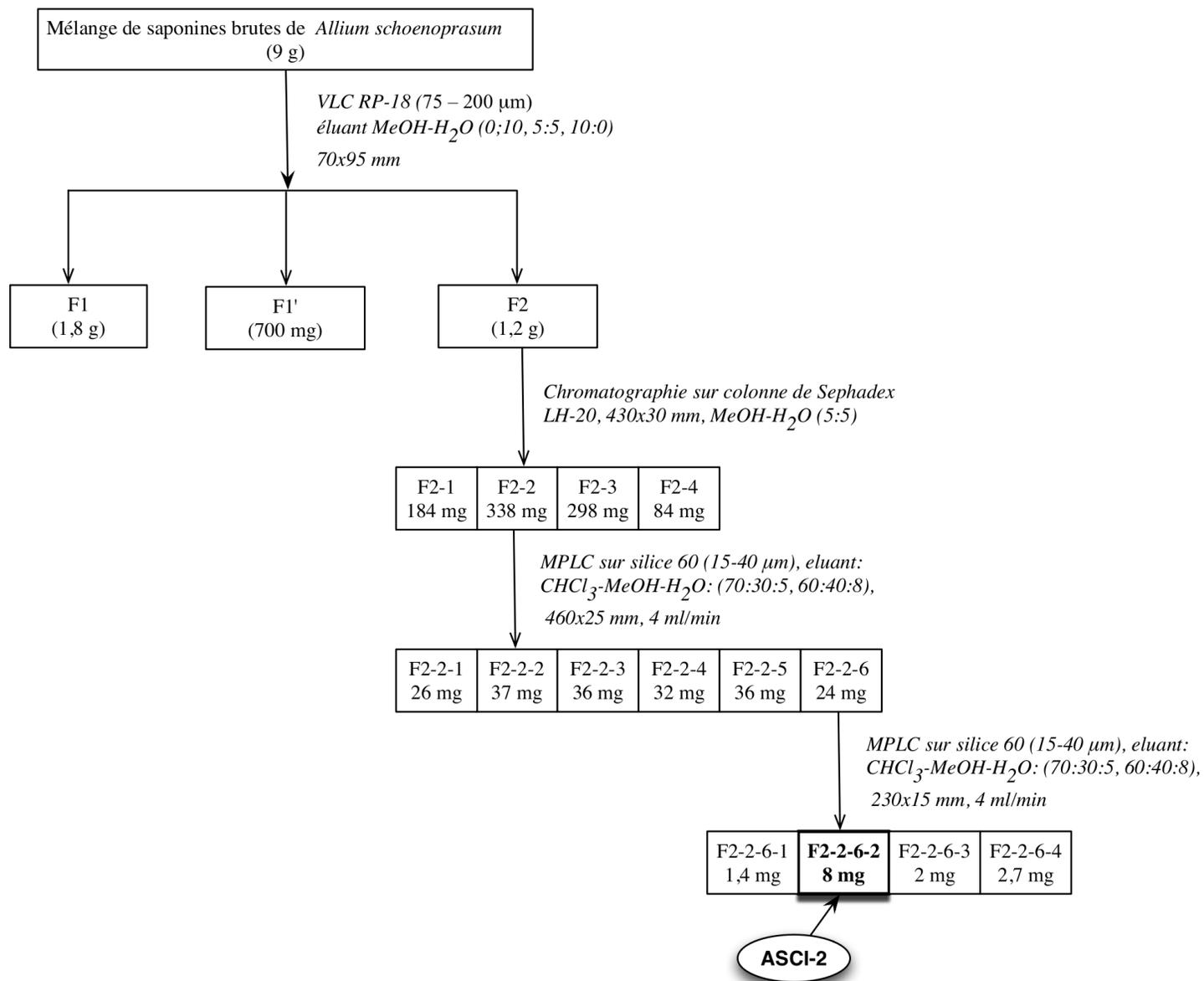


FIGURE 2.69 – Purification du composé Asci-2

2.4.2 Détermination structurale des composés isolés de *Allium schoenoprasum*

2.4.2.1 Détermination structurale du composé ASC12R5a/b

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en source FAB (mode négatif) donne un ion quasi moléculaire à $m/z = 753$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, soit une masse moléculaire de 754 uma, suggérant une formule brute de $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_{14}$.

Un ion-fragment observé à $m/z = 591 [M-H - 162]^-$ correspond à la perte d'un hexose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées dans les spectres HSQC et HMBC des molécules **ASC 12R5a/b**.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on note la présence de la paire de signaux de carbones quaternaires résonnant à δ 109.0 et 109.4 ppm caractéristique du carbone C-22 d'un stéroïde spirostanique, inclus dans un cycle F sous la forme 22(*R*)25(*R*) et 22(*R*)25(*S*) (Agrawal, 2003). Nous sommes donc en présence d'un mélange inséparable de 2 isomères .

Sur le spectre RMN 1H , on observe :

- 4 méthyles dont 2 angulaires résonnant à δ_H 0.96 et 0.90 ppm, communs aux deux formes *R* et *S*, et 2 méthyles secondaires résonnant à δ_H 0.82 et 0.61 ppm, attribués aux formes *R* et *S* respectivement.
- 1 proton oléfinique résonnant à δ 5.27 ppm (H-6).

L'analyse des deux spectres RMN ^{13}C et DEPT nous permet de distinguer :

- Dans la zone de l'aglycone, 4 carbones quaternaires (C), 10 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH₂) et 3 méthyles (CH₃).
- 6 signaux caractéristiques de la forme 22(*R*),25(*R*) qui sont les suivantes : δ_C 109.0 (C-22), 31.2 (C-23), 28.4 (C-24), 29.8 (C-25), 66.5 (C-26), 16.7 (C-27) et 6 autres signaux caractéristiques de la forme 22(*R*),25(*S*) à δ_C 109.4 (C-22), 26.9 (C-23), 25.4 (C-24), 26.7 (C-25), 64.7 (C-26), 15.7 (C-27).
- 2 signaux de carbones oléfiniques à δ 121.3 et 140.4 ppm correspondant à la double liaison $\Delta^{5,6}$ caractéristique d'un squelette Δ^5 -spirostène.

La comparaison des déplacements chimiques de cet aglycone avec ceux de la diosgénine (Kougan et al., 2010, Nakano et al., 1989) a permis de noter les différences suivantes :

- Disparition du signal du méthyle Me (21) de l'aglycone.
- Apparition de signaux de deux carbones hydroxylés résonnant à δ 62.8 et 78.9 ppm portant les protons à δ 4.00/4.03 ppm et δ 3.54 ppm respectivement.

Les corrélations HMBC entre les protons δ 2.31 (H-17), 2.34 (H-20) et le carbone à δ 62.8 d'une

part, et entre les protons δ 0.96 (H₃-18), 2.31 (H-17), 1.49 (H-11) et le carbone à δ 78.9 ppm d'autre part, ont permis de déduire que les carbones à δ 62.8 et à δ 78.9 ppm correspondent respectivement au position C-21 et C-12 de l'aglycone.

La configuration des carbones C-12 et C-20 a été déterminée par l'exploitation du spectre NOESY. Ainsi les corrélations NOESY entre les protons δ 0.92 (H-9 α), 1.03 (H-14 α) et δ 3.54 (H-12), confirment une orientation α -axiale du proton H-12. La corrélation NOESY entre les protons δ 4.03 (H₂-21) et δ 2.31 (H-17 α), traduit une orientation α du groupe CH₂OH en C-20 (configuration *S*). Enfin la corrélation COSY observée entre les protons δ 3.78 (H-3) et δ 2.53 (H-4 β) ainsi que le carbone déblindé à δ 77.8 (C-3), confirment la localisation classique en C-3 d'une fonction alcool secondaire engagée dans une liaison glycosidique. La multiplicité du proton H-4 à δ 2.53 (*t*, $J = 11.7$ Hz) sous forme de triplet, suggère un couplage axial-axial, donc une orientation α -axiale du proton H-3, ce qui signifie une orientation β -équatoriale de l'hydroxyle en C-3.

L'analyse complète des spectres RMN 2D des cycles A à F de l'aglycone a permis de le caractériser comme étant le (20*S*,25*R*)-spirost-5-ène-3 β ,12 β ,21-triol et son isomère (25*S*) correspondant à une nouvelle sapogénine.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ¹H la présence de 2 protons anomériques résonnant à δ 6.04 (*s*) et 4.79 (*d*, $J = 7.8$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 2 carbones anomériques à δ 101.5 et 99.6 respectivement.

La présence d'un méthyle secondaire résonnant sous forme de doublet à δ_H 1.63 (*d*, $J = 6.1$ Hz) évoque la présence d'un 6-déoxyhexose.

A partir des protons anomériques, la nature des deux systèmes de spins a été déterminée grâce à l'expérience COSY et confirmée par l'expérience TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser :

- Un β -galactopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.79 (*d*, $J = 7.8$ Hz).
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.04 (*s*).

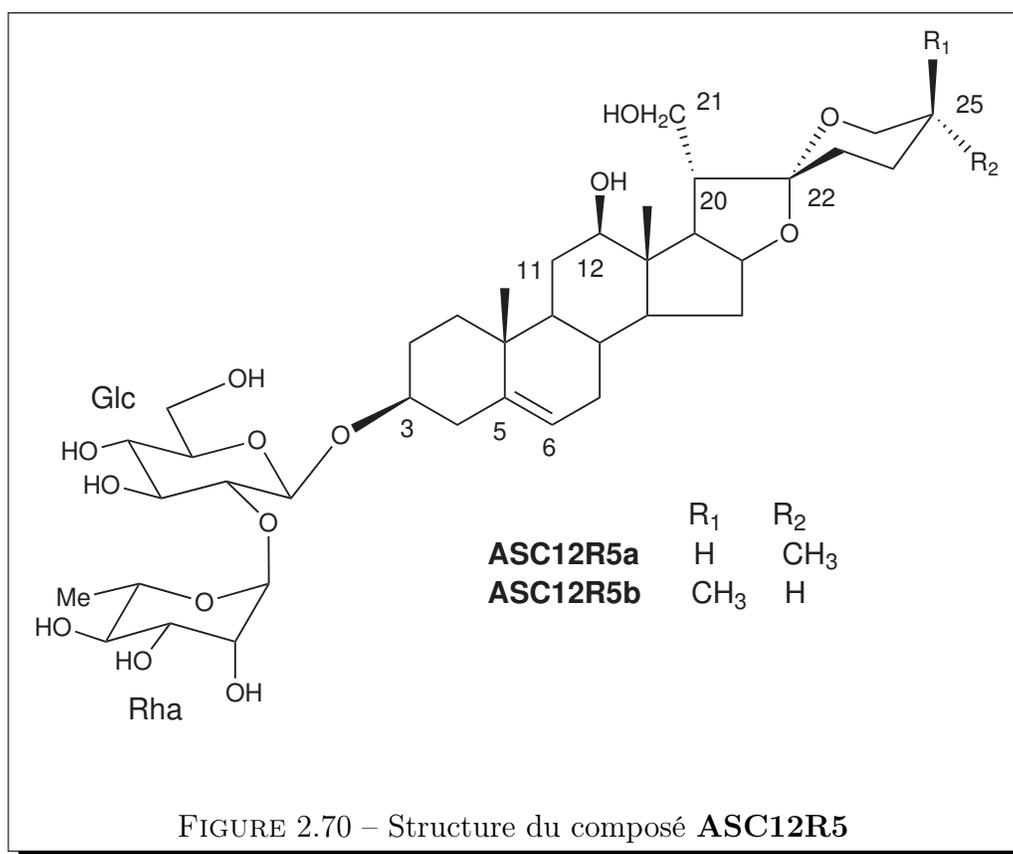
Les expériences HMBC et NOESY ont permis d'établir la séquence du disaccharide et sa liaison avec l'aglycone. Ainsi on observe les corrélations suivantes :

- HMBC entre le proton anomérique à δ 6.04 (*s*, Rha-1) et le carbone à δ 78.0 (Gal-2)

- montre que le rhamnose est lié au galactose par une liaison (1→2), ce qui est confirmé par la corrélation NOESY entre δ_H 6.04 (*s*, Rha-1) et δ_H 4.03 (*d*, $J = 7.8$ Hz, Gal-2).
- La présence d'un signal déblindé à δ_C 77.8 (Agly-3) suggère que position 3 de l'aglycone est substituée.
 - HMBC entre le proton à δ 4.79 (*d*, $J = 7.8$ Hz) (GlcI-1) et le carbone C-3 de l'aglycone à δ 77.8 ainsi que la corrélation NOESY entre δ_H 4.79 (*d*, $J = 7.8$ Hz, Glc-1) et δ_H 3.80 (Agly H-3) montrent que le disaccharide est attaché en position 3 de l'aglycone.

Conclusion

Sur la base de tout ce qui précède, la structure des saponines **ASC12R5a/ASC12R5b** a été établie comme étant le **(20*S*, 25(*R*))-spirost-5-ène-3 β ,12 β ,21-triol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-galactopyranoside** et son isomère **25(*S*)**.



TAB. 2.4 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC12R5** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone					Sucres		
	<i>25S</i>	<i>25R</i>	<i>25S</i>	<i>25R</i>			
	δ_C		δ_H		3-O-Glc	δ_C	δ_H
1	36.9		0.83; 1.57		1	99.6	4.79(<i>d</i> , <i>J</i> =7.8)
2	29.5		1.67, 2.00		2	78.0	4.03
3	77.8		4.03		3	78.3	4.13
4	38.3		2.53, 2.65		4	70.9	3.96
5	140.4		–		5	77.2	3.80
6	121.3		5.27		6	61.8	4.13, 4.35
7	31.6		1.40, 1.83		Rha		
8	30.4		1.40		1	101.5	6.04 (<i>s</i>)
9	49.2		0.92		2	71.4	4.67
10	36.6		–		3	71.8	4.43
11	28.8		1.49, 1.77		4	73.0	4.22
12	78.9		3.54		5	69.0	4.72
13	45.9		–		6	17.9	1.63
14	54.7		1.03				
15	31.5		1.52, 2.06				
16	81.7		4.58				
17	59.6		2.31				
18	10.5		0.96				
19	18.8		0.90				
20	50.3	49.7	2.31	2.34			
21	62.8	62.8	4.00, 4.03	4.00, 4.03			
22	109.4	109.0	–	–			
23	31.9	31.2	1.65, 1.67	1.34, 1.48			
24	25.4	28.4	1.27, 2.03	1.45, nd			
25	26.7	29.8	1.52	1.44			
26	64.7	66.5	3.25, 3.96	3.38, 3.45			
27	15.7	16.7	0.82	0.61			

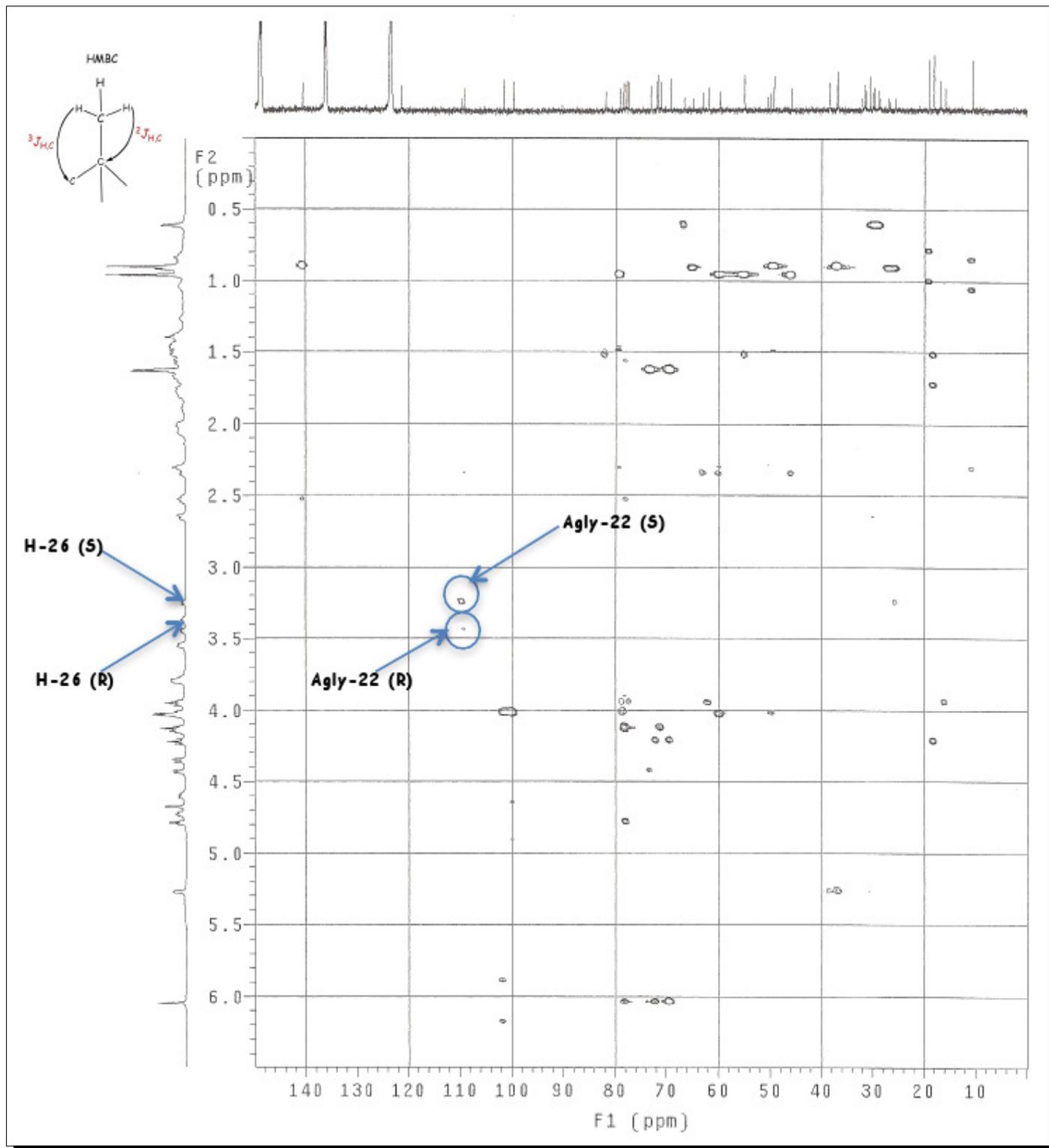


FIGURE 2.71 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC12R5**

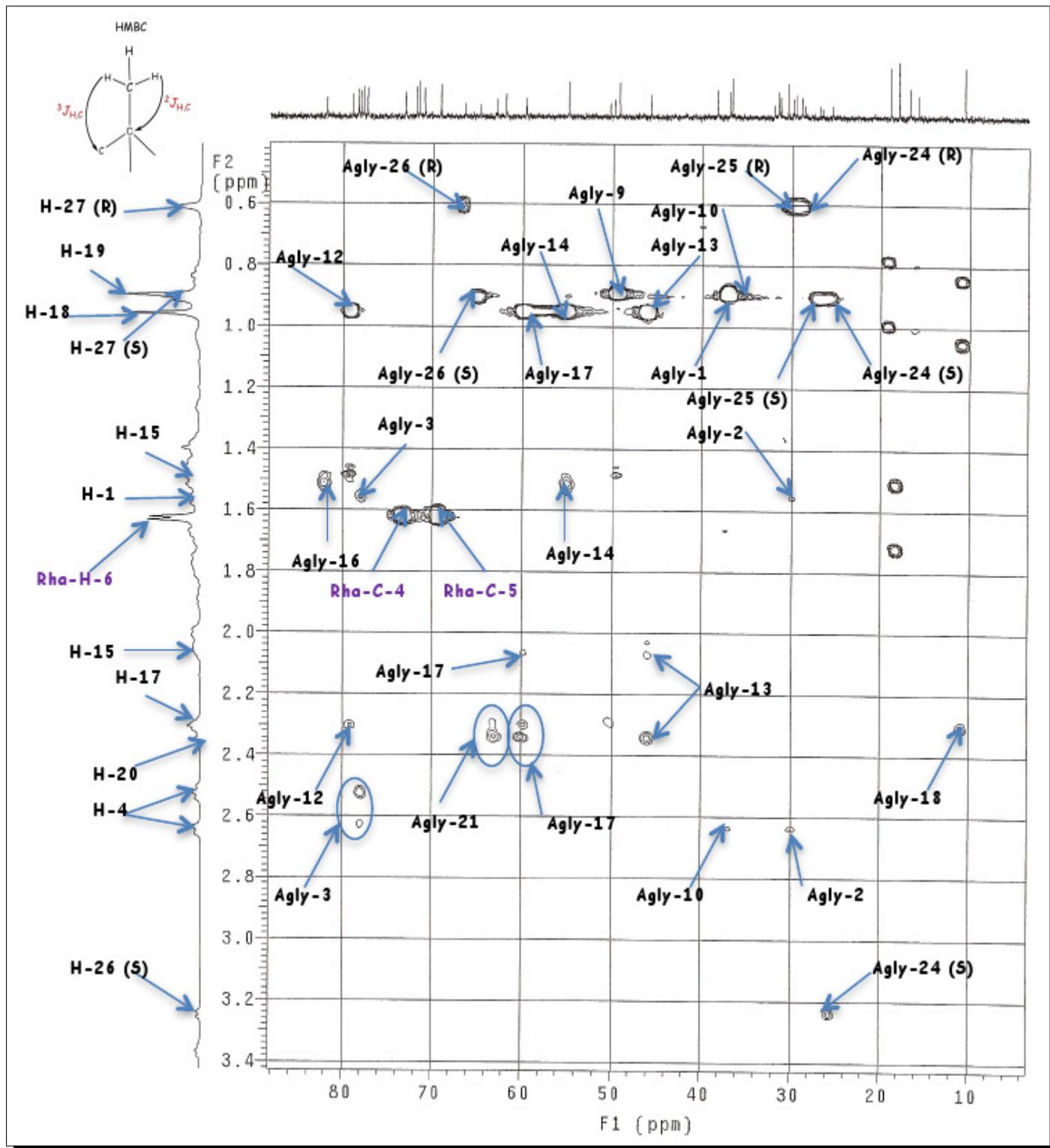


FIGURE 2.72 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC12R5

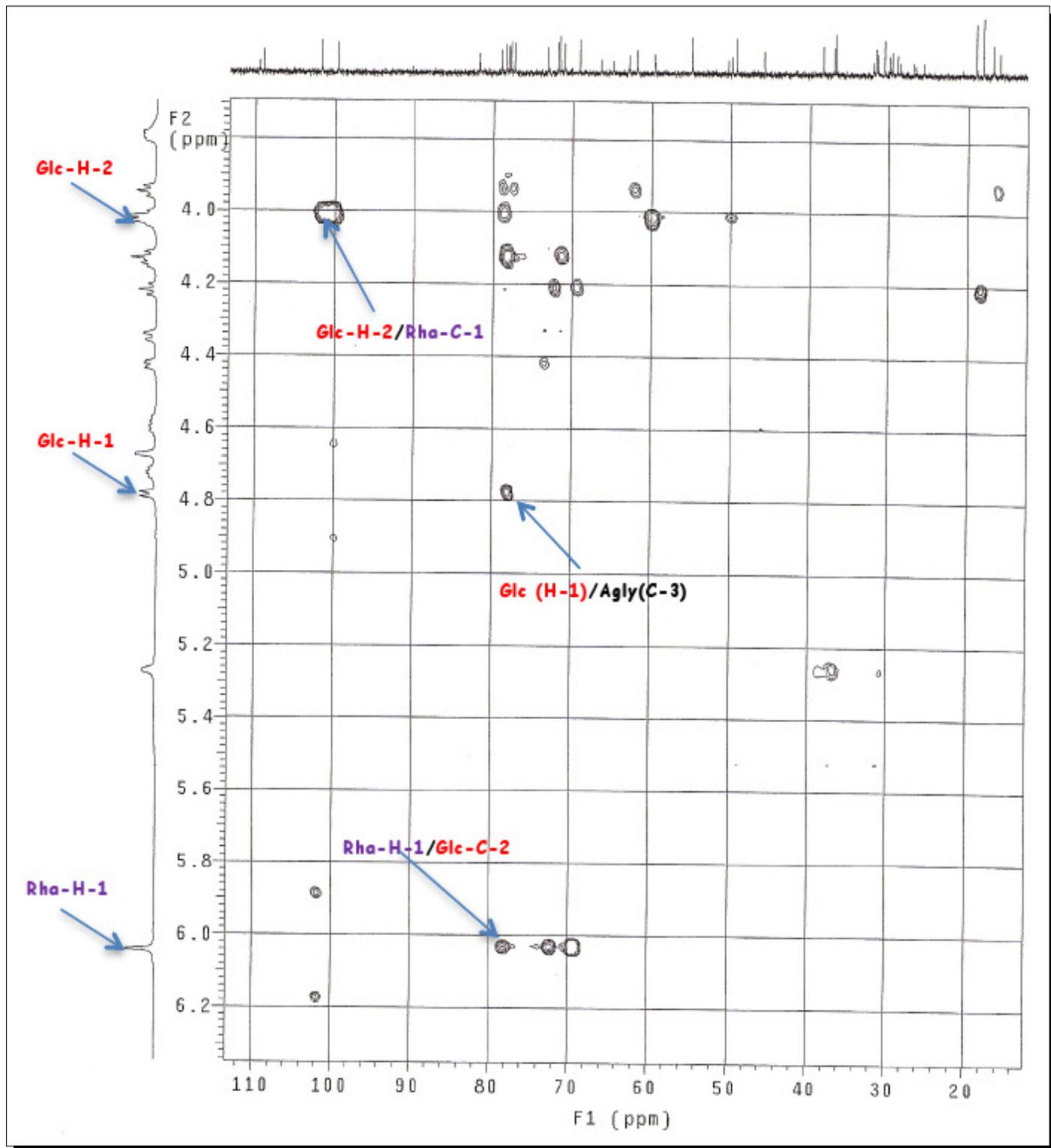


FIGURE 2.73 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine **ASC12R5**

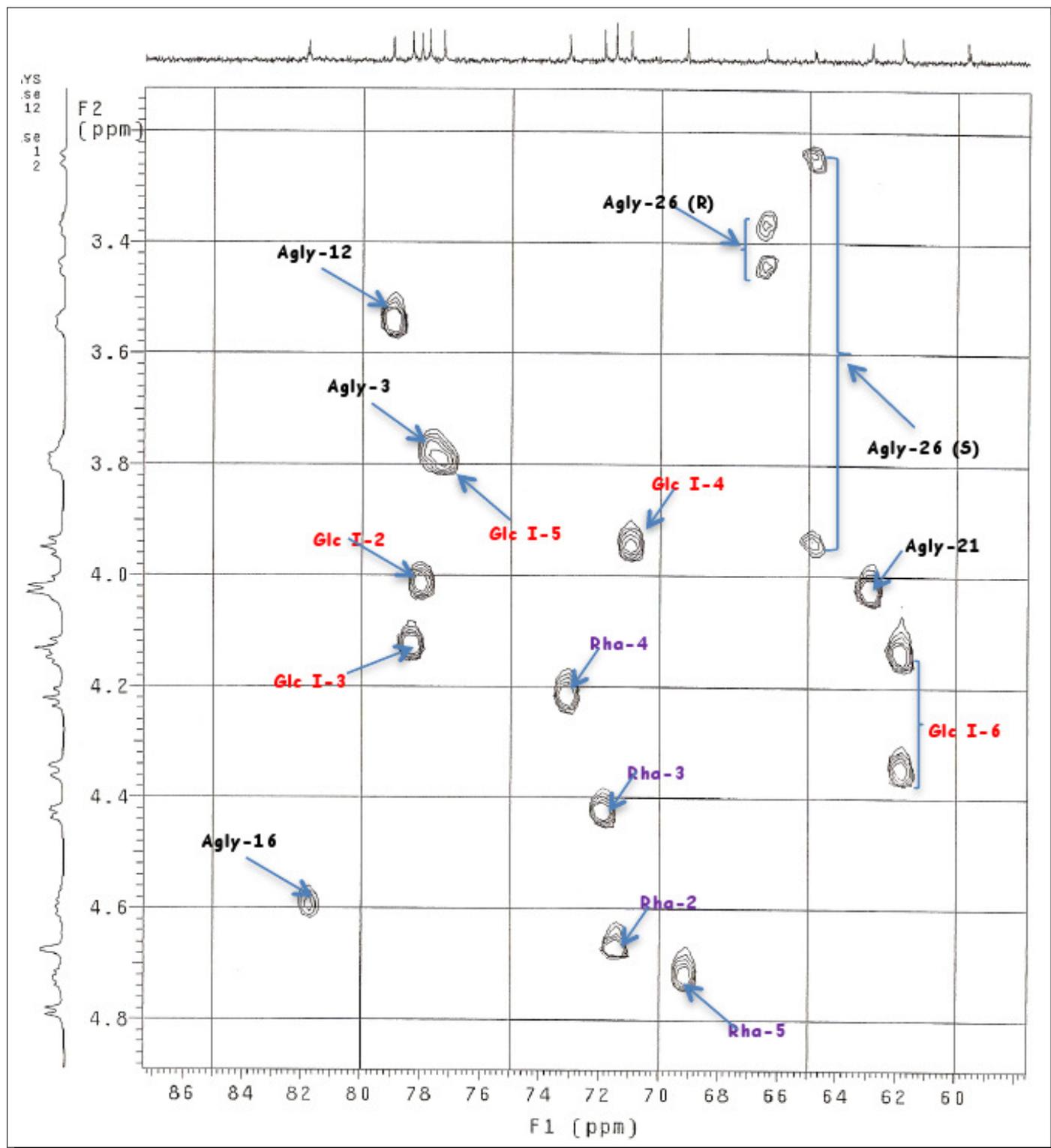


FIGURE 2.74 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC12R5

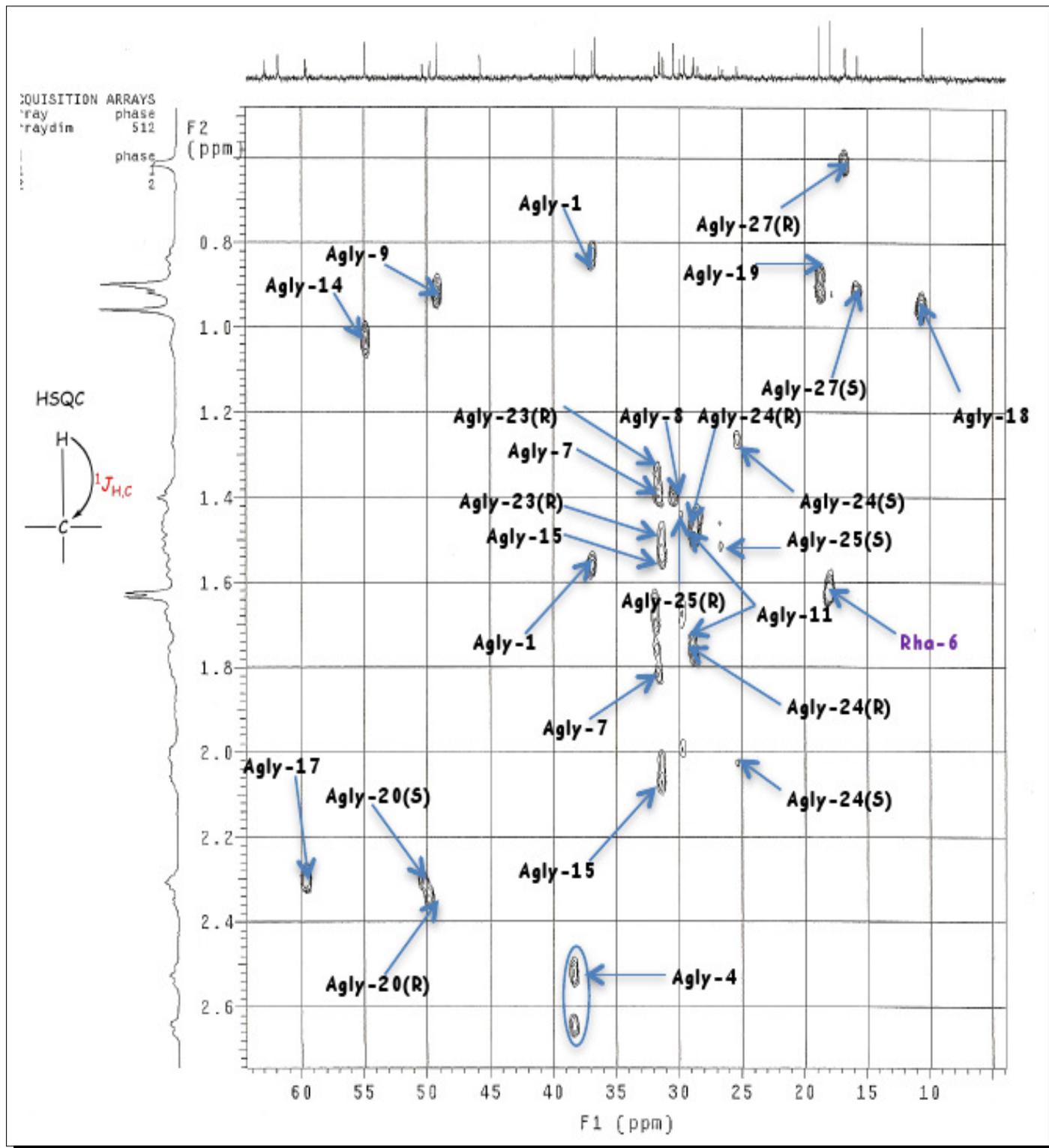


FIGURE 2.75 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC12R5

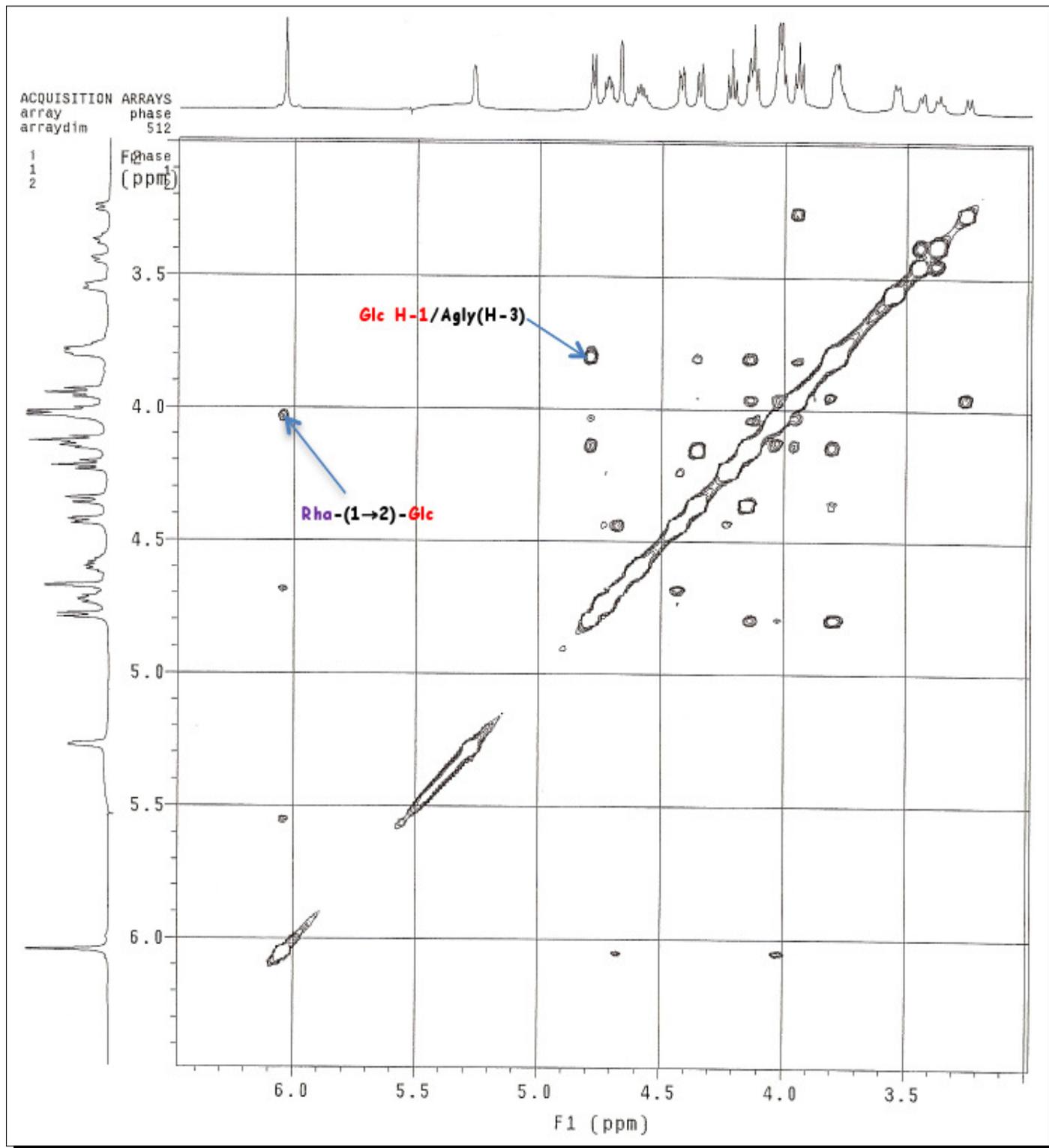


FIGURE 2.76 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine **ASC12R5**

2.4.2.2 Détermination structurale du composé ASC23R2a/b

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 753$ $[M-H]^-$ est observé, soit une masse moléculaire égale à 754 uma, suggérant une formule brute de $C_{39}H_{62}O_{14}$. Un ion-fragment observé à $m/z = 607$ $[M-H - 146]^-$ correspond à la perte d'un désoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

L'analyse comparative des spectres RMN 1D et 2D des composés **ASC 23R2a/b** et **ASC 12R5a/b**, concernant la zone de l'aglycone montre que les déplacements chimiques sont presque superposables. La différence majeure est la disparition sur les deux spectres RMN ^{13}C et DEPT du signal du carbone tertiaire hydroxylé à δ 78.9 (Agly C-12) et l'apparition d'un signal d'un carbone tertiaire hydroxylé à δ 67.6 ppm, qui corrèle sur le spectre HSQC avec le proton à δ 4.20 ppm.

Une analyse approfondie des spectres HMBC et NOESY du composé **ASC 23R2a/b** donne les corrélations suivantes :

- HMBC entre les protons à δ 1.25 (Agly H-9), 1.60/2.53 (Agly H-12) et le carbone à δ 67.6 ppm montrent que ce carbone correspond à la position C-11 de l'aglycone. La valeur du déplacement chimique à δ_C 67.6 ppm est déblindée par rapport à celle du carbone secondaire à 28.8 ppm, ce qui montre que ce carbone est hydroxylé. Tout ceci est confirmé par les corrélations COSY entre les protons à δ 1.25 (Agly H-9), 1.58 (Agly H-12) et le proton à δ 4.19 ppm porté par le carbone à δ 67.6 (C-11).
- NOESY entre les protons δ 1.25 ($H_3-19\beta$), δ 0.90 ($H_3-18\beta$) et δ 4.19 (H-11) prouvent l'orientation α de l'hydroxyle en C-11.

L'analyse complète des spectres RMN 2D des cycles A à F de l'aglycone a permis de le caractériser comme étant le (20*S*, 25*R*) spirost-5-ène-3 β ,11 α ,21 β -triol, correspondant à une nouvelle sapogénine.

TAB. 2.5 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC23R2** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone					Sucres		
	<i>25S</i>	<i>25R</i>	<i>25S</i>	<i>25R</i>			
	δ_C		δ_H		3-O-Glc	δ_C	δ_H
1	39.3		1.32; 1.98		1	99.8	4.87 (<i>d</i> , $J=7.3$)
2	31.9		1.94, 2.06		2	78.0	4.11
3	78.0		3.89		3	78.8	4.20
4	39.2		2.73, 3.10		4	71.2	4.05
5	141.4		–		5	77.6	3.81
6	121.2		5.36		6	62.0	4.22, 4.36
7	31.9		1.50, 1.81		Rha		
8	32.0		1.87		1	101.7	6.18 (<i>s</i>)
9	56.3		1.25		2	72.2	4.54
10	38.7		–		3	71.9	4.73
11	67.6		4.19		4	73.4	4.27
12	50.4		1.58, 2.53		5	69.5	4.86
13	41.1		–		6	18.2	1.65
14	55.8		1.21				
15	32.1		1.44, 2.01				
16	81.8		4.55				
17	59.1		2.13				
18	17.0		0.90				
19	18.8		1.25				
20	50.7	50.1	2.28	2.34			
21	62.1	62.1	3.91, 4.07	3.91, 4.07			
22	109.4	109.2	–	–			
23	27.3	30.0	nd, nd	2.05, nd			
24	25.7	28.7	1.27, 2.08	2.06, nd			
25	27.1	30.1	1.53	1.50			
26	64.9	66.5	3.29, 4.00	3.44, 3.49			
27	16.0	16.9	1.00	0.61			

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de :

- 2 protons anomériques résonnant à δ 6.17 (*s*) et 4.87 (*d*, $J = 7.3$ Hz) qui corrént sur le spectre HSQC avec 2 carbones anomériques à δ 101.7 et 99.8 respectivement.
- 1 méthyle secondaire sous forme de doublet dont les protons résonnent à δ_H 1.66 (*d*, $J = 5.9$ Hz) caractérisant la présence d'un 6-déoxyhexose.

A partir des protons anomériques, les spectres RMN ont permis de caractériser :

- Un β -glucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.87 (*d*, $J = 7.3$ Hz).

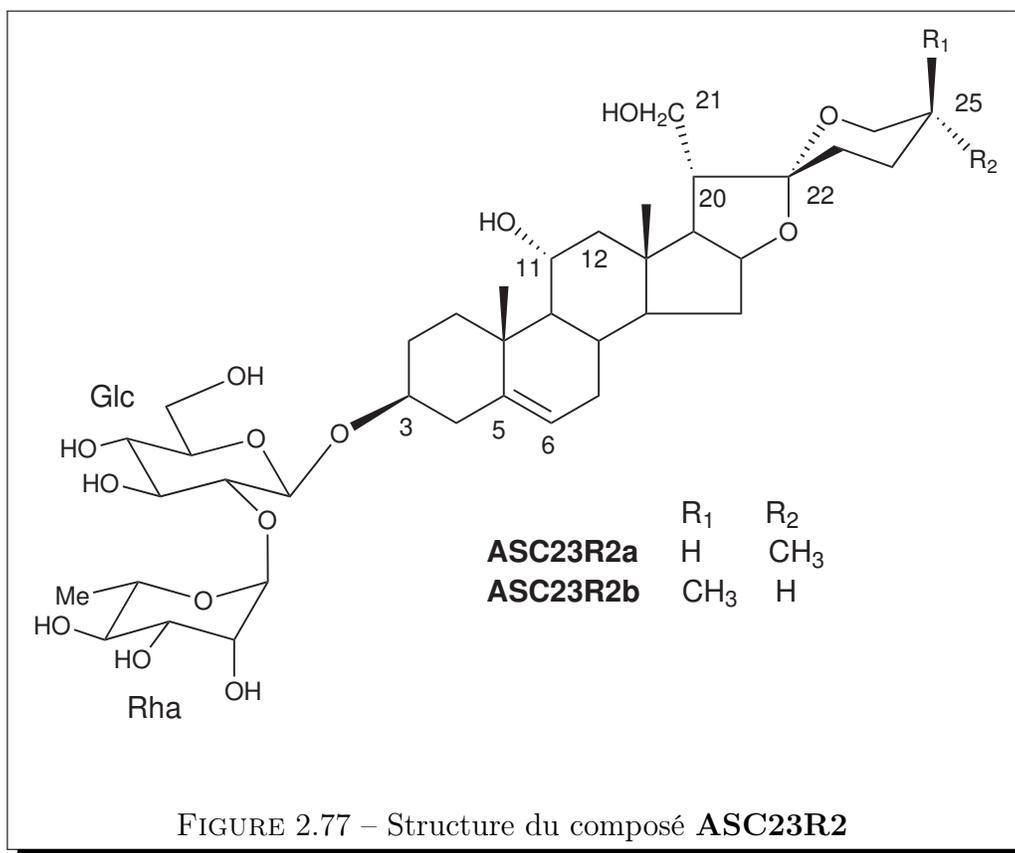
– Un β -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.17 (s).

L'analyse comparative des spectres RMN 1D et 2D des composés **ASC 23R2a/b** et **ASC 12R5a/b**, concernant la zone des sucres montre que les déplacements chimiques sont entièrement superposables.

Les corrélations HMBC entre δ_H 4.87 (d, $J = 7.3$ Hz, Gal-1) et δ_C 78.1 (Agly C-3) et NOESY entre δ_H 4.87 (d, $J = 7.3$ Hz, Gal-1) et δ_H 3.89 (Agly H-3) montre que le disaccharide est attaché en position 3 de l'aglycone.

Conclusion

La structure des saponines **ASC23R2a/ASC23R2b** a été établie comme étant le (**20S**, **25R**) spirost-5-ène-3 β ,11 α ,21-triol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside et son isomère (25*S*).



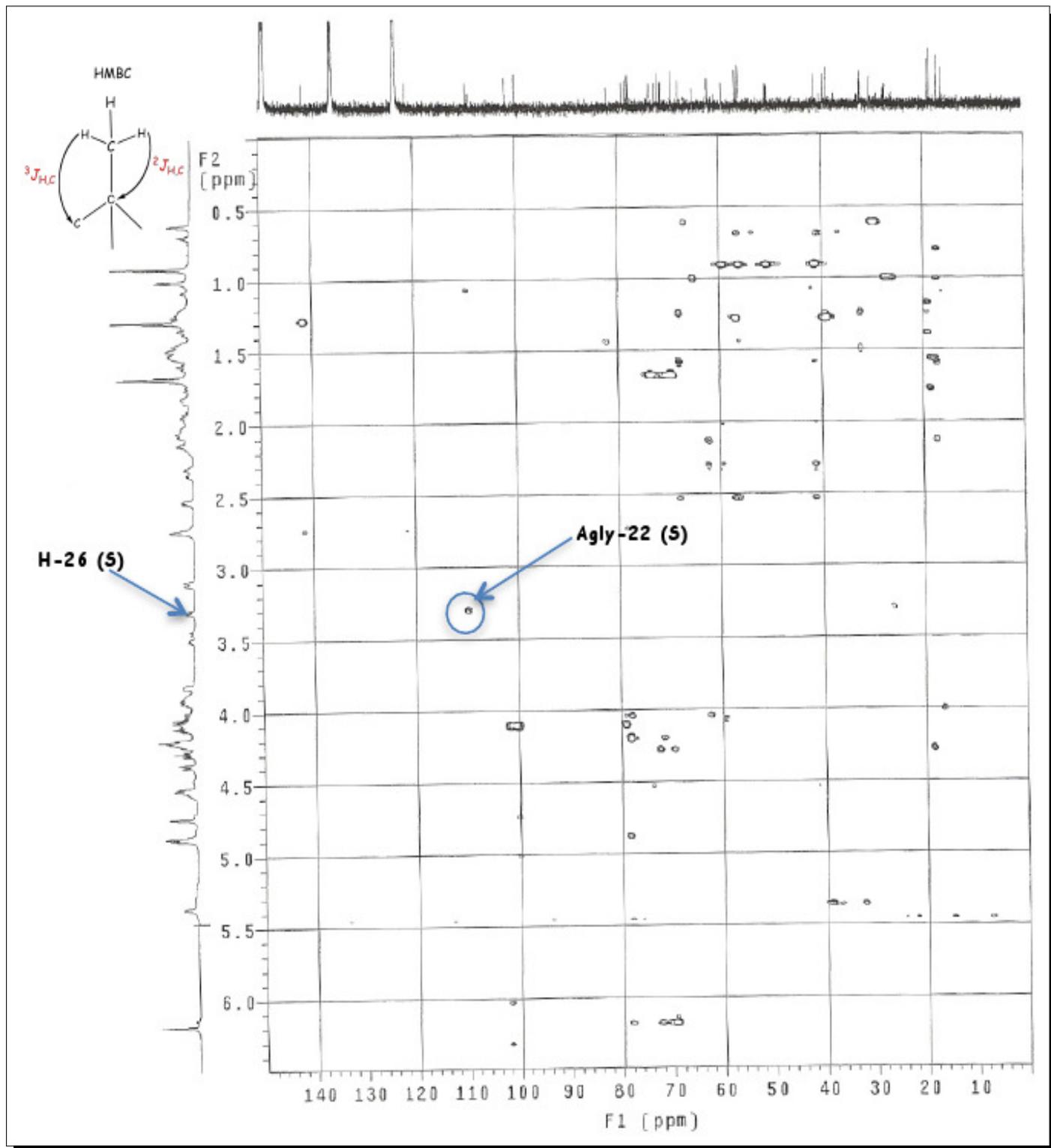


FIGURE 2.78 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC23R2**

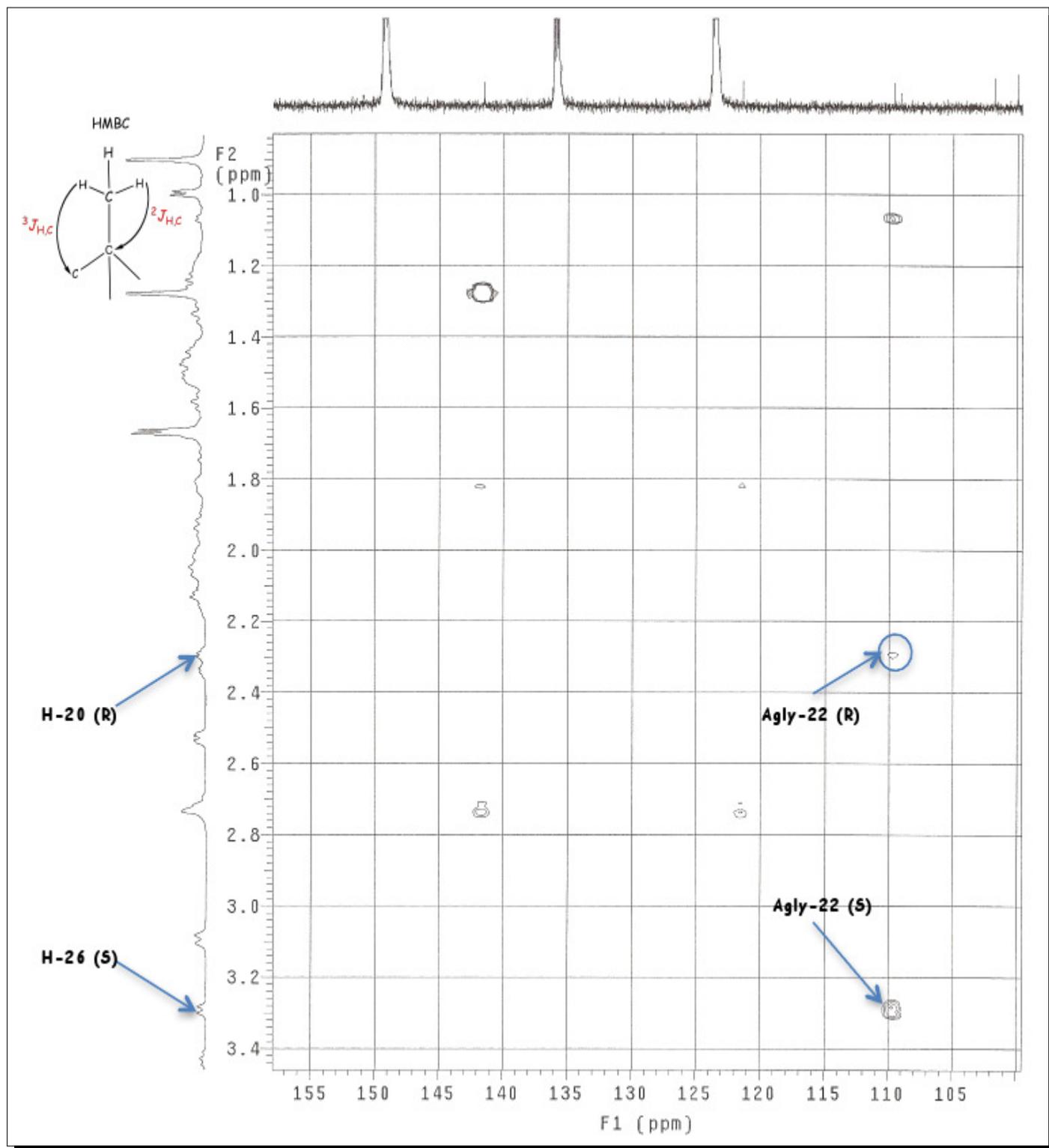


FIGURE 2.79 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC23R2**

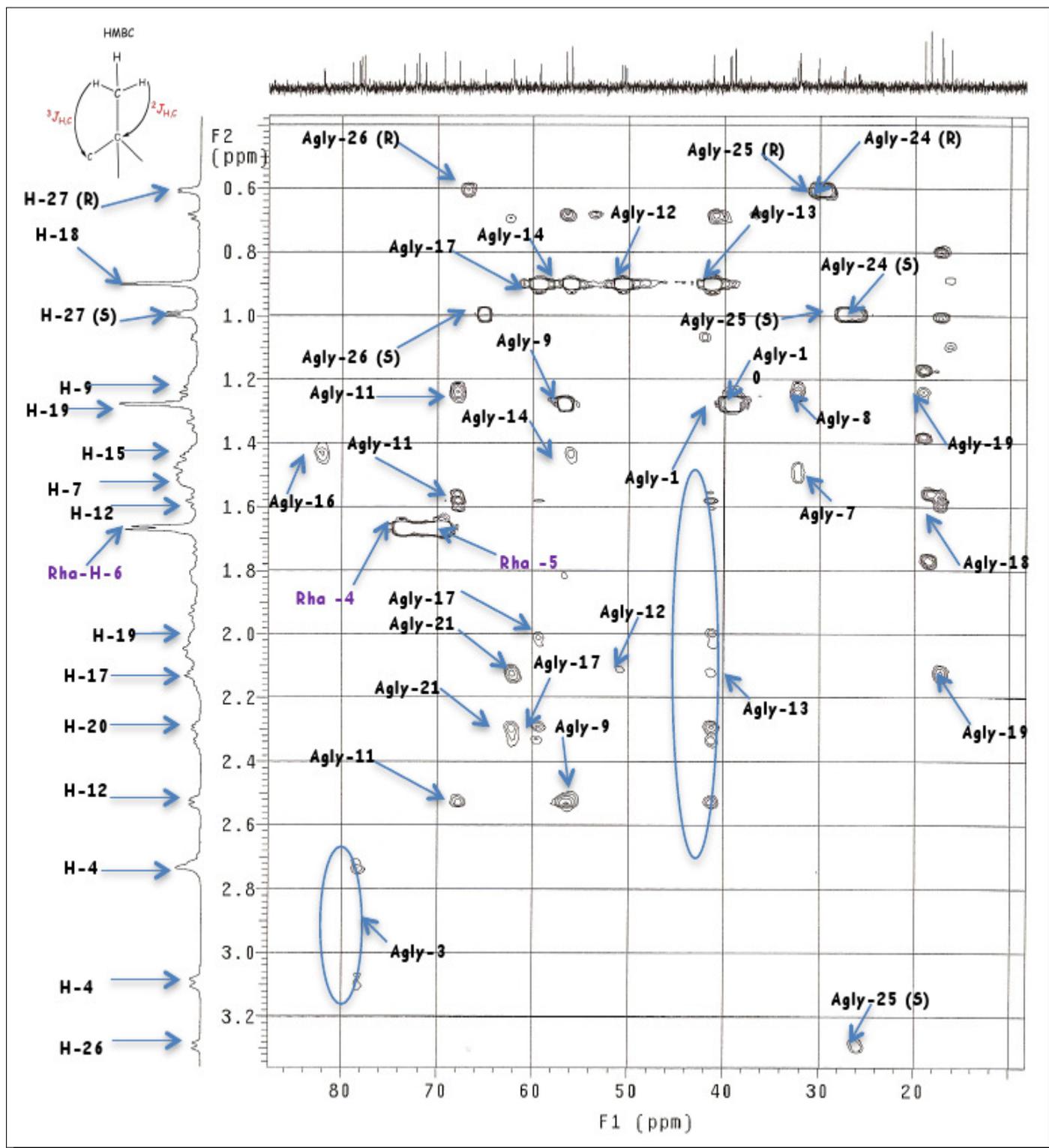


FIGURE 2.80 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2

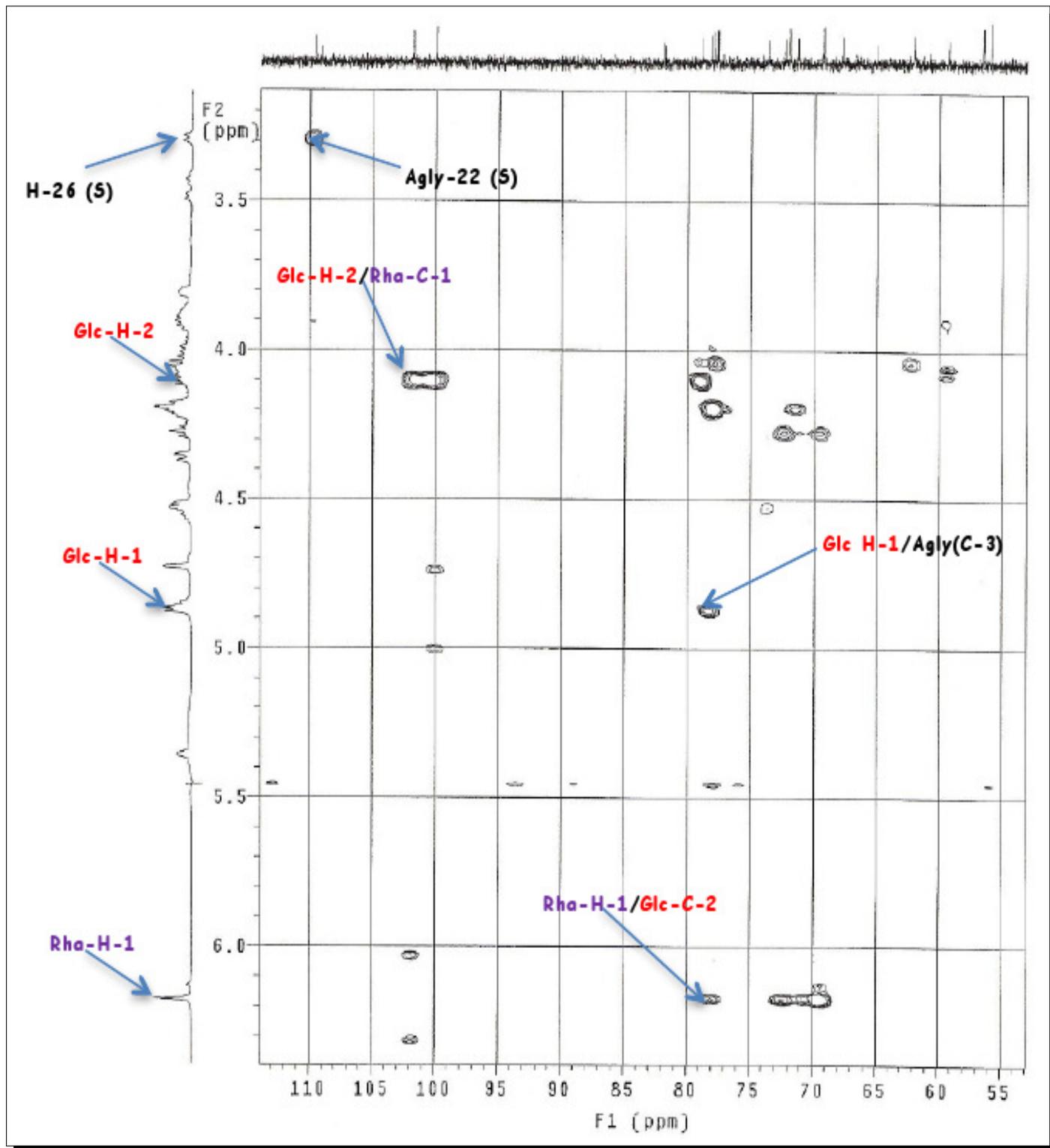


FIGURE 2.81 – Spectre **HMBC** de la partie osidique de la saponine **ASC23R2**

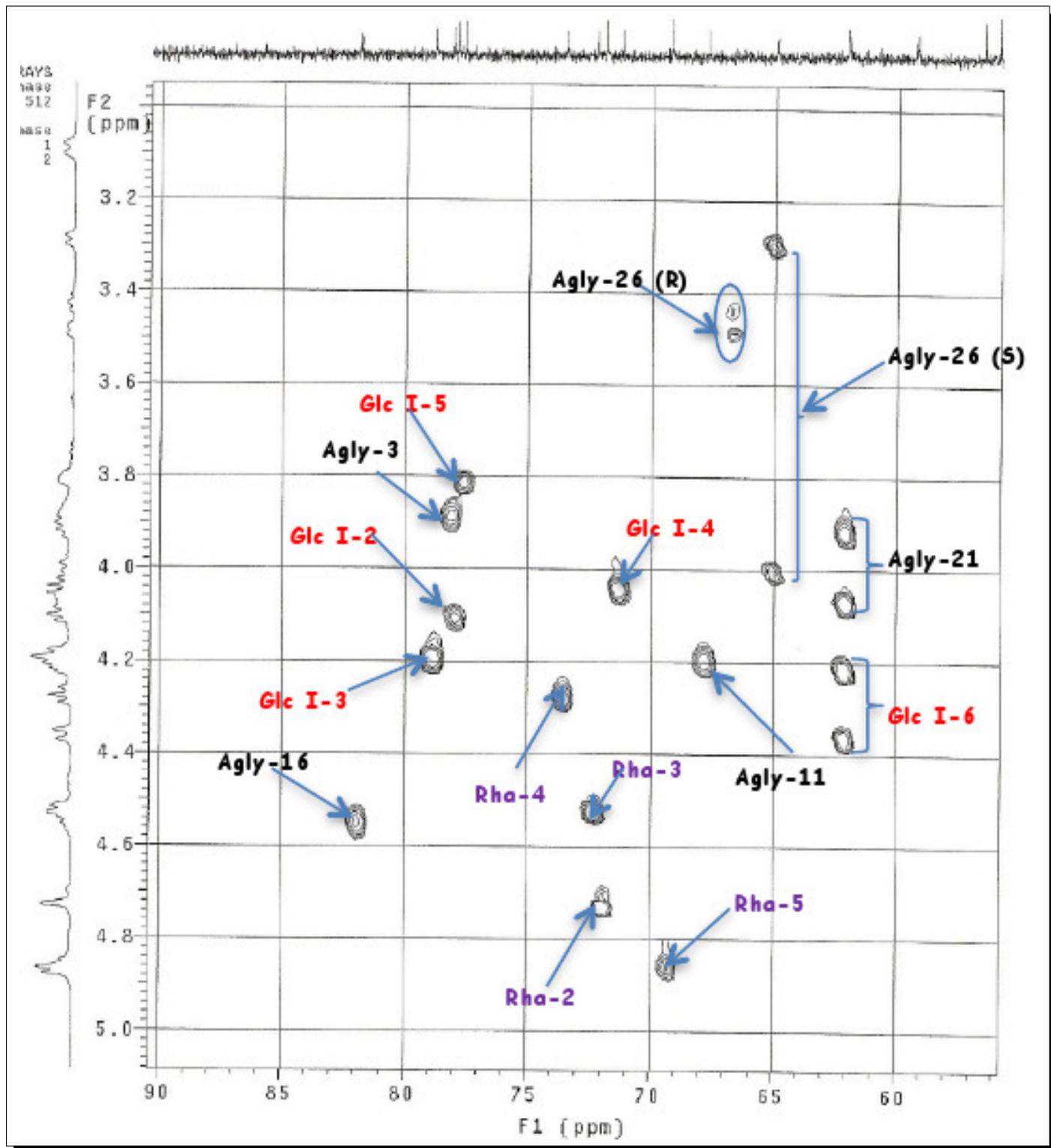


FIGURE 2.82 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC23R2

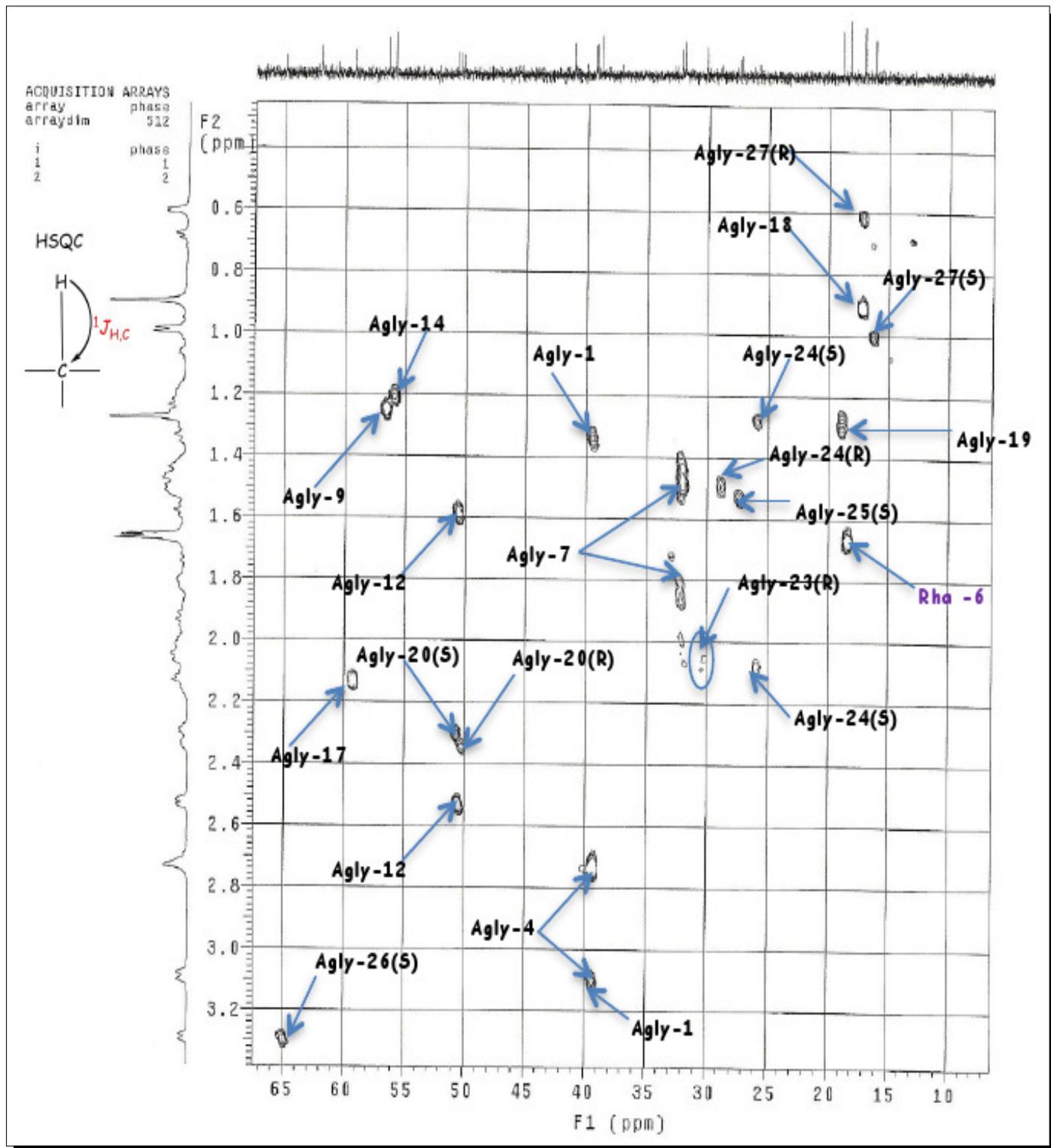


FIGURE 2.83 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2

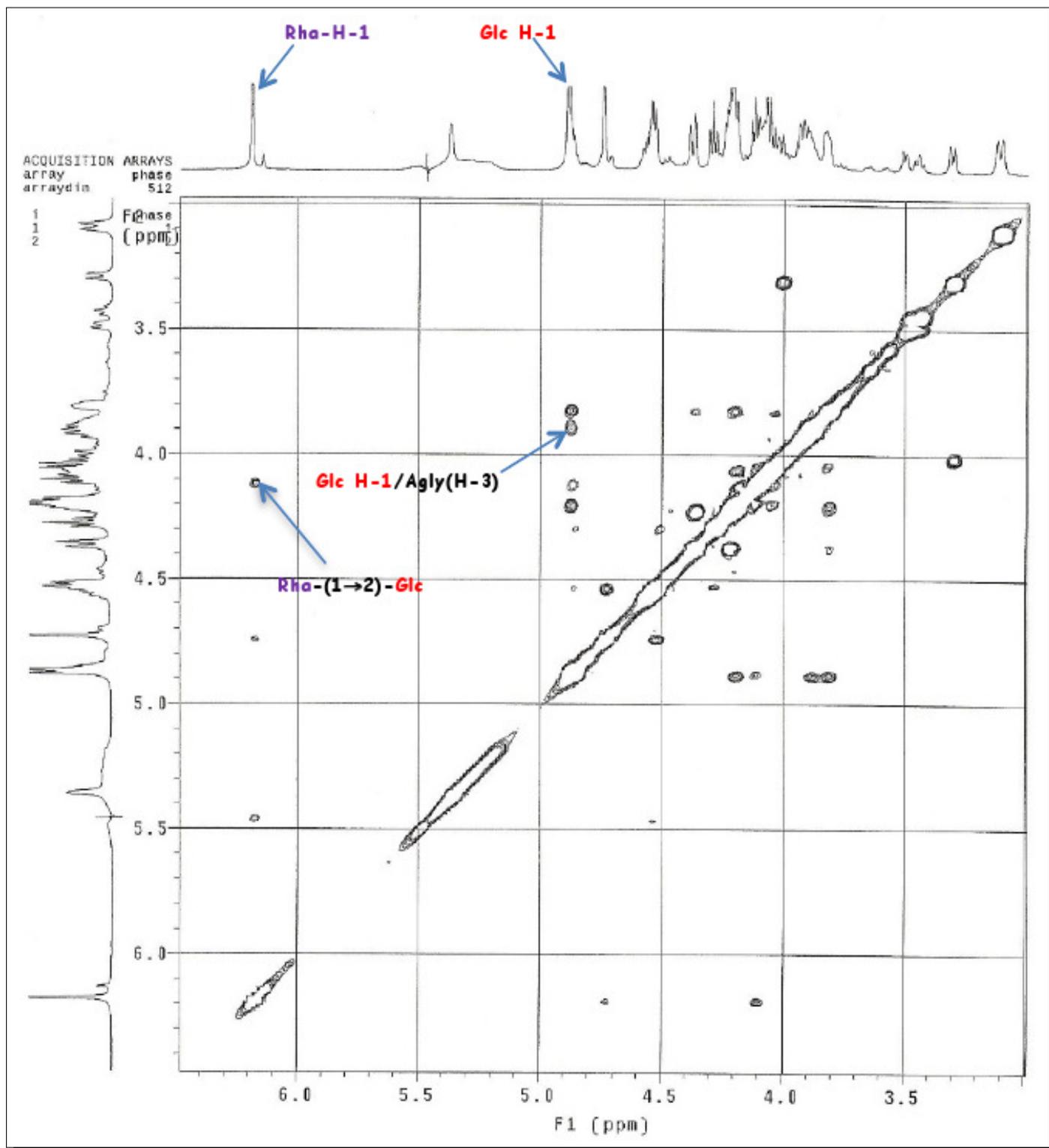


FIGURE 2.84 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC23R2

2.4.2.3 Détermination structurale du composé ASC24R9

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 917 [M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 918 uma, suggérant une formule brute de $C_{45} H_{74} O_{19}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 755 [M-H - 162]^-$ et $593 [M-H - 162 - 162]^-$, correspondant à la successive perte de deux hexoses.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées dans les spectres HSQC et HMBC de la molécule **ASC 25R9**.

Sur le spectre RMN 1H , on observe : Quatre méthyles dont deux angulaires sous forme de singulet résonnant à δ_H 1.19 (3H, s) et δ_H 0.82 (3H, s) et deux méthyles secondaires sous forme de doublet résonnant à δ_H 1.14 (*d*, $J = 6.6$ Hz) et δ_H 0.68 (*d*, $J = 5.2$ Hz).

L'analyse des deux spectres RMN ^{13}C et DEPT nous permet de distinguer dans la zone de l'aglycone, 4 carbones primaires (CH_3), 10 carbones secondaires (CH_2), 10 carbones tertiaires (CH) et 3 carbones quaternaires (C).

Tous les protons et carbones de l'aglycone ont été attribués par l'analyse des spectres HSQC et HMBC. Ainsi on retrouve les 6 signaux de carbones à δ_C 109.5 (C-22), 31.2 (C-23), 28.8 (C-24), 30.1 (C-25), 66.5 (C-26), 16.9 (C-27), caractéristiques du cycle F d'un squelette spirostane sous sa forme (22*R*,25*R*). Ces données sont en accord avec la littérature (Agrawal, 2005, Morzycki et al., 2005) concernant l'orientation équatoriale du méthyle 27 (27 α -méthyle) donc une configuration 25*R*.

Les corrélations NOESY H-9/H-14, H-14/H-16, H-16/H-17 et H-17/H₃-21 α sont classiques et permettent de conforter la stéréochimie de l'aglycone (Dong et al., 2001, Fattorusso et al., 2002a). On observe également les corrélations NOESY H-5/H-1ax, H-5/H-9 et H-5/H-14 suggérant une orientation α du proton H-5.

On observe le signal d'un carbone hydroxylé à δ 70.6 portant un proton à δ 3.95.

Les corrélations COSY et TOCSY entre les protons δ 1.17 /2.08 (H-12ax/ H-12eq) et δ 3.95

suggèrent que le carbone à δ 70.6 correspond à la position C-11 de l'aglycone. La stéréochimie du carbone secondaire hydroxylé (C-11) est déterminée grâce au spectre NOESY :

Les corrélations NOESY entre les protons δ 1.19 ($H_{3-19\beta}$), δ 0.82 ($H_{3-18\beta}$) et δ 3.95 (H-11), révèlent une orientation β du proton H-11, soit une orientation α de l'hydroxyle en C-11 de l'aglycone. Ces résultats permettent d'établir l'aglycone comme étant le **(25*R*)-5 α -spirostane-3 β ,11 α -diol**

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 3 protons anomériques résonnant à δ 5.09 (d , $J = 7.6$ Hz), 5.02 (d , $J = 7.8$ Hz) et 4.95 (d , $J = 7.3$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 3 carbones anomériques à δ 106.1, 104.4 et 101.9 respectivement.

Les déplacements chimiques des protons et carbones ont permis de caractériser :

- Deux β -glucopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 5.09 (d , $J = 7.6$ Hz) et à δ 5.02 (d , $J = 7.8$ Hz).
- Un β -galactopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.95 (d , $J = 7.3$ Hz)

La corrélation HMBC observée entre le proton à δ 5.09 (d , $J = 7.6$ Hz, Glc-I-1) et le carbone à δ 84.9 (Gal-3) ainsi que la corrélation NOESY entre δ 5.09 (d , $J = 7.6$ Hz, Glc-I-1) et δ 4.03 (Gal-3), prouvent que le glucose I est lié au galactose par une liaison (1 \rightarrow 3).

D'autre part, la corrélation HMBC observée entre le proton à δ 5.02 (d , $J = 7.8$ Hz, Glc-II-1) et le carbone à δ 80.2 (Gal-3) ainsi que la corrélation NOESY entre δ 5.02 (d , $J = 7.8$ Hz, Glc-II-1) et δ 4.50 (Gal-4) montrent que le glucose II est lié au galactose par une liaison (1 \rightarrow 4).

Enfin la corrélation HMBC entre le proton à δ 4.95 (d , $J = 7.3$ Hz, Gal-1) et le carbone à δ 78.2 (Agly-3) prouve que le trisaccharide est attaché en position 3 de l'aglycone.

Conclusion

La structure de la saponine **ASC 24R9** a été établie comme étant le **(25*R*)-5 α -spirostane-3 β ,11 α -diol 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopyranoside.**

TAB. 2.6 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC24R9** dans la pyridine- d_5 .

	Aglycone		Sucres		
	δ_C	δ_H	3-O-Gal	δ_C	δ_H
1	38.6	0.88, 1.51	1	101.9	4.94(<i>d</i> , <i>J</i> =7.3)
2	31.7	1.78, 2.08	2	72.7	4.41
3	78.2	3.78	3	84.9	4.04
4	39.9	1.11, 1.69	4	80.2	4.51
5	54.2	0.64	5	75.0	4.11
6	31.8	1.45, 2.07	6	62.5	4.06, 4.56
7	32.3	2.05, 2.26	Glc I		
8	30.2	2.17	1	106.1	5.09 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.6)
9	47.5	1.06	2	76.0	4.00
10	36.1	–	3	76.8	4.09
11	70.6	5.96	4	70.1	4.11
12	40.3	1.18, 2.06	5	78.2	3.78
13	40.3	–	6	62.5	4.31, 4.53
14	56.0	1.14	Glc II		
15	31.9	1.47, 2.08	1	104.4	5.02 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.8)
16	81.0	4.56	2	74.8	4.03
17	62.5	1.85	3	77.5	4.21
18	16.3	0.83	4	71.2	3.93
19	15.6	1.19	5	78.0	4.04
20	41.6	1.94	6	60.5	4.22, 4.66
21	14.6	1.12			
22	109.5	–			
23	28.8	1.52, nd			
24	29.8	1.78, 2.08			
25	30.1	1.57			
26	66.5	3.47, 3.60			
27	16.9	0.68			

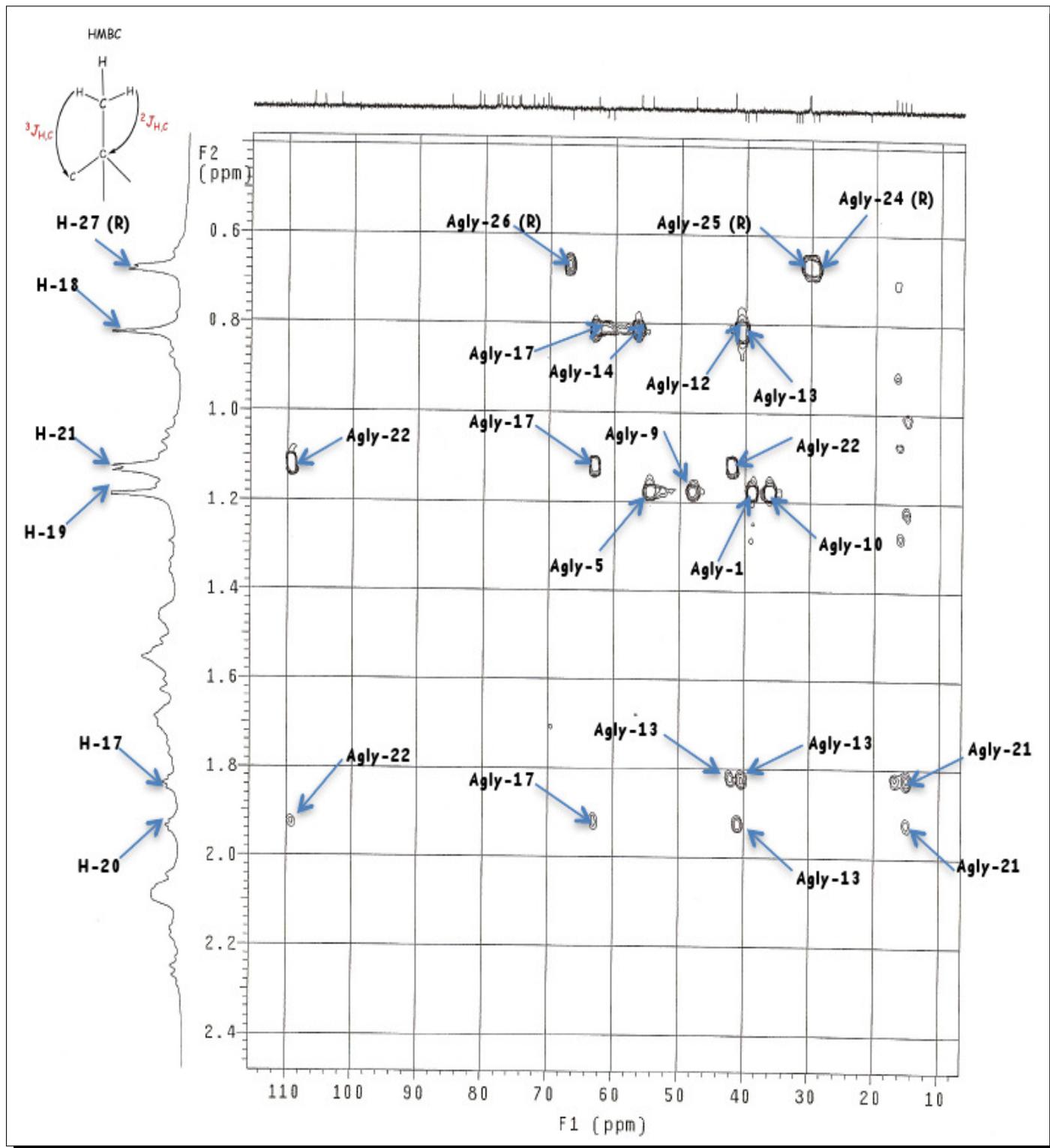


FIGURE 2.85 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC24R9

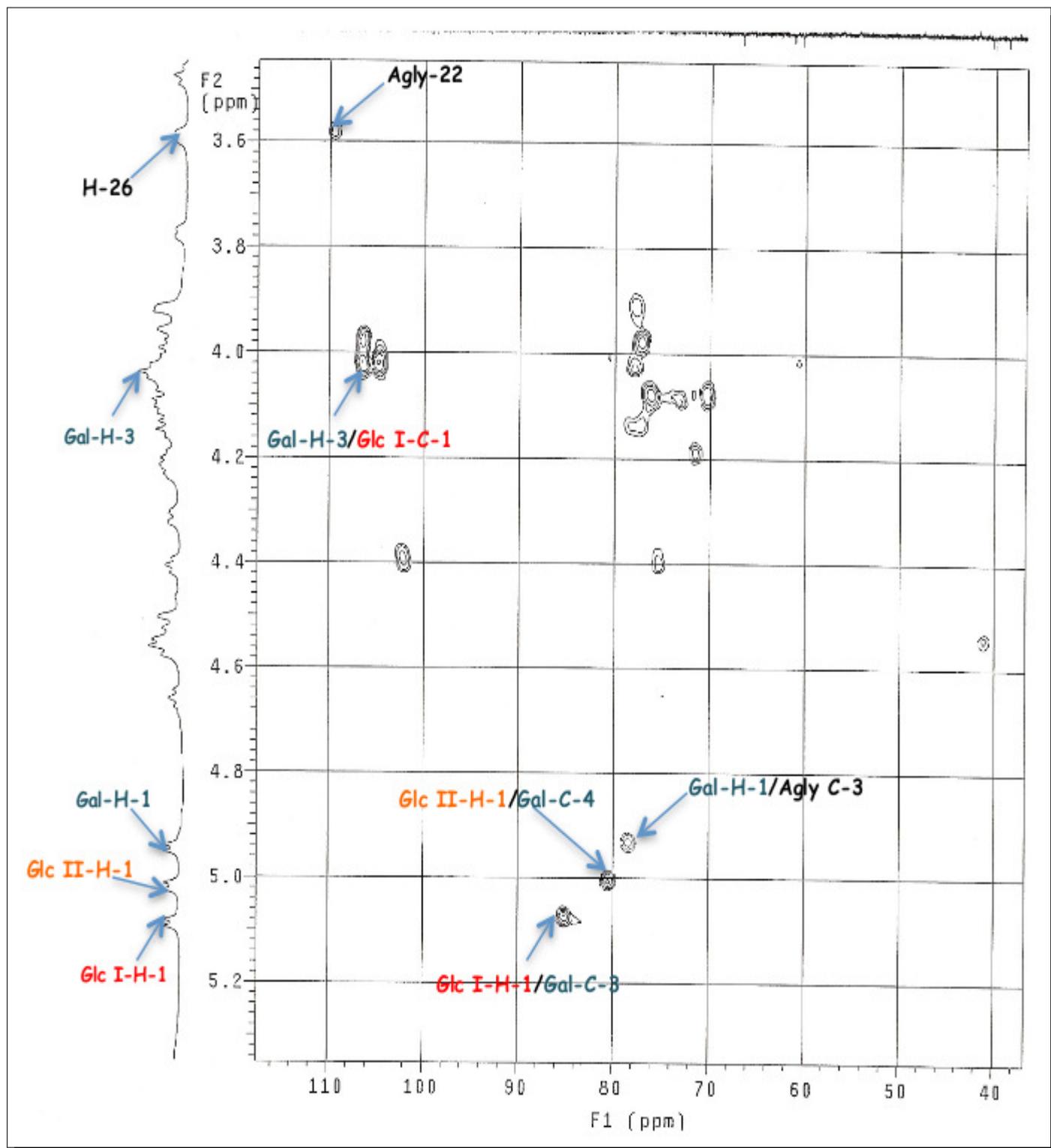


FIGURE 2.86 – Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC24R9

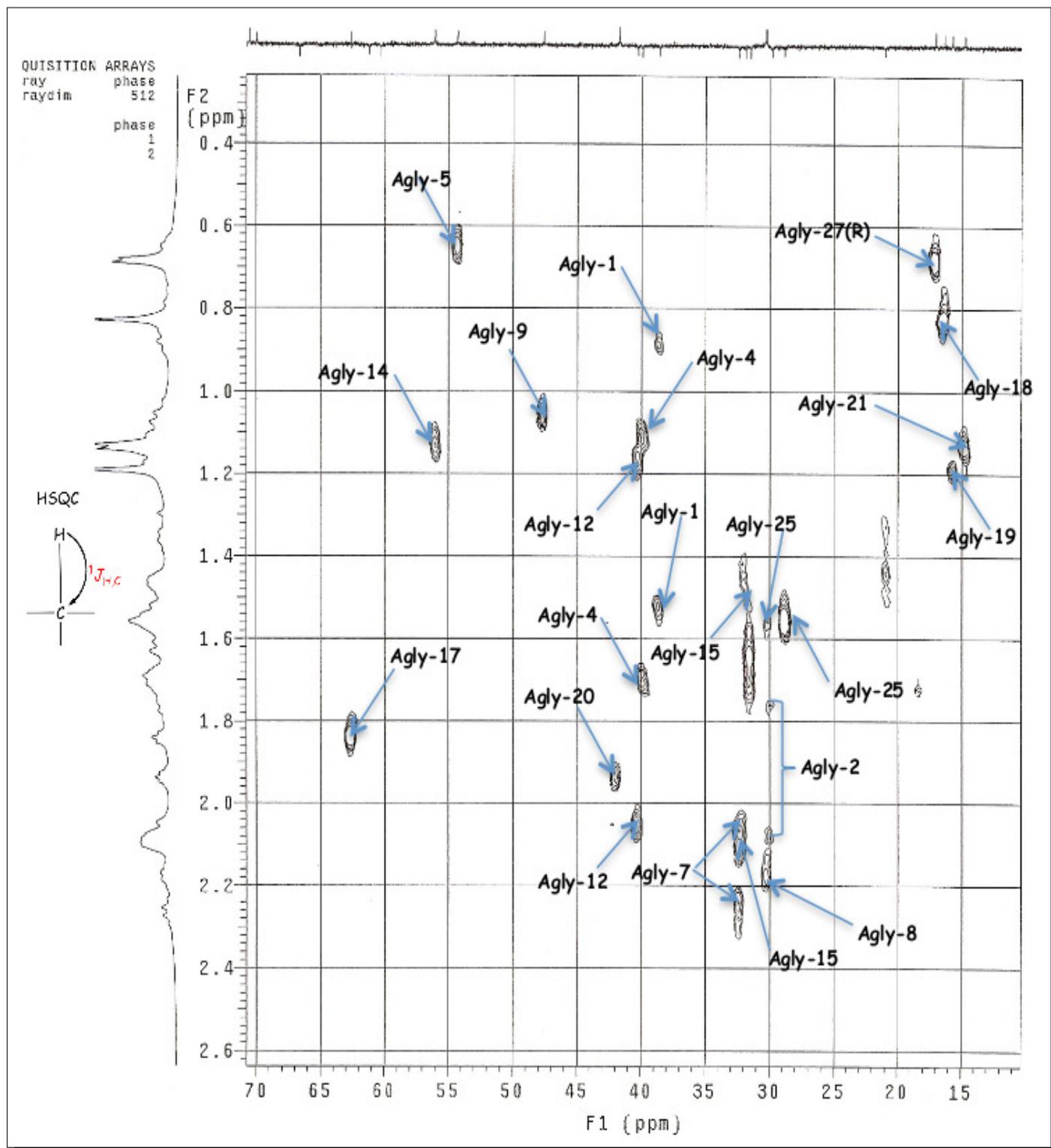


FIGURE 2.87 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC24R9

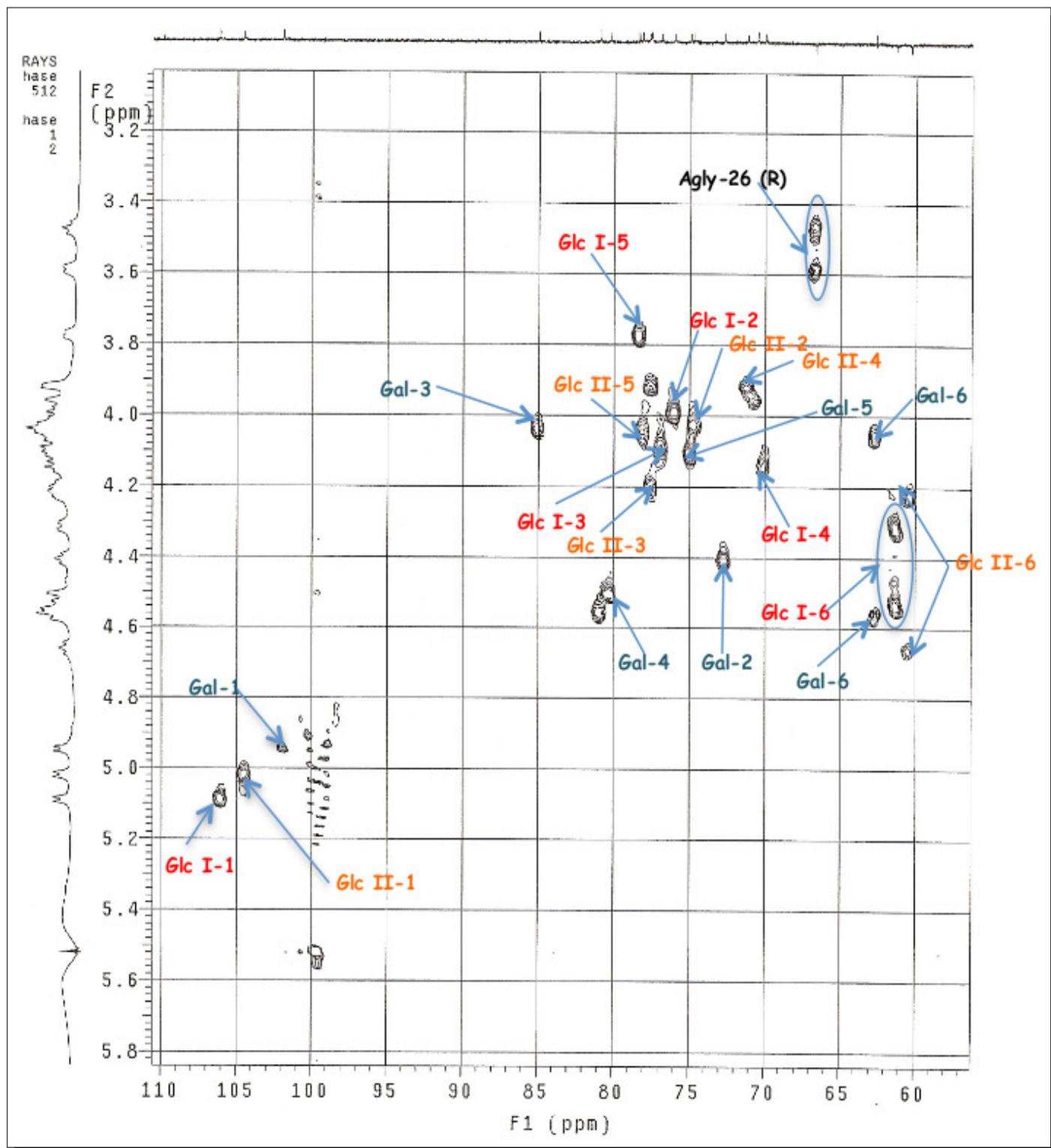


FIGURE 2.88 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC24R9

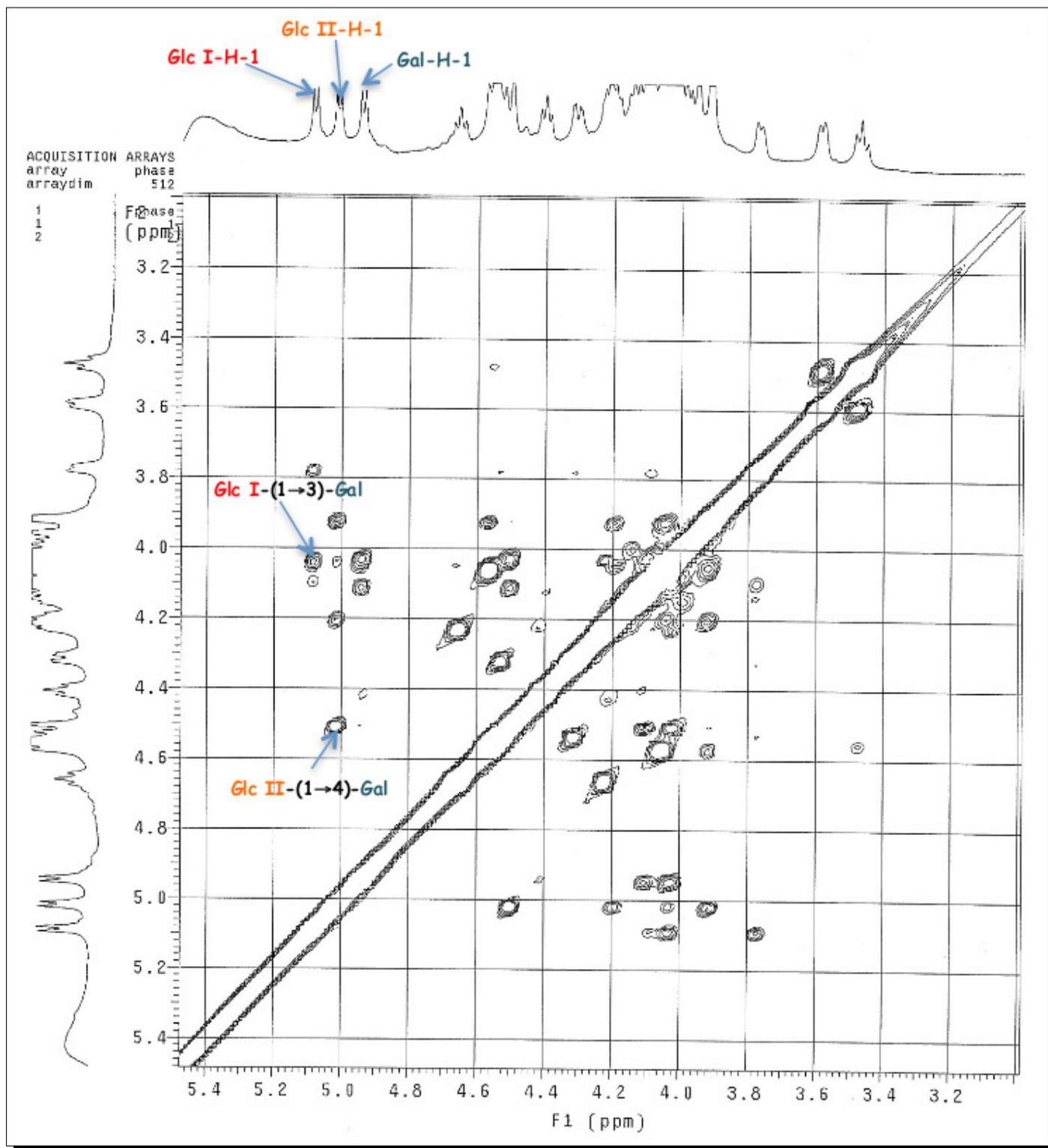
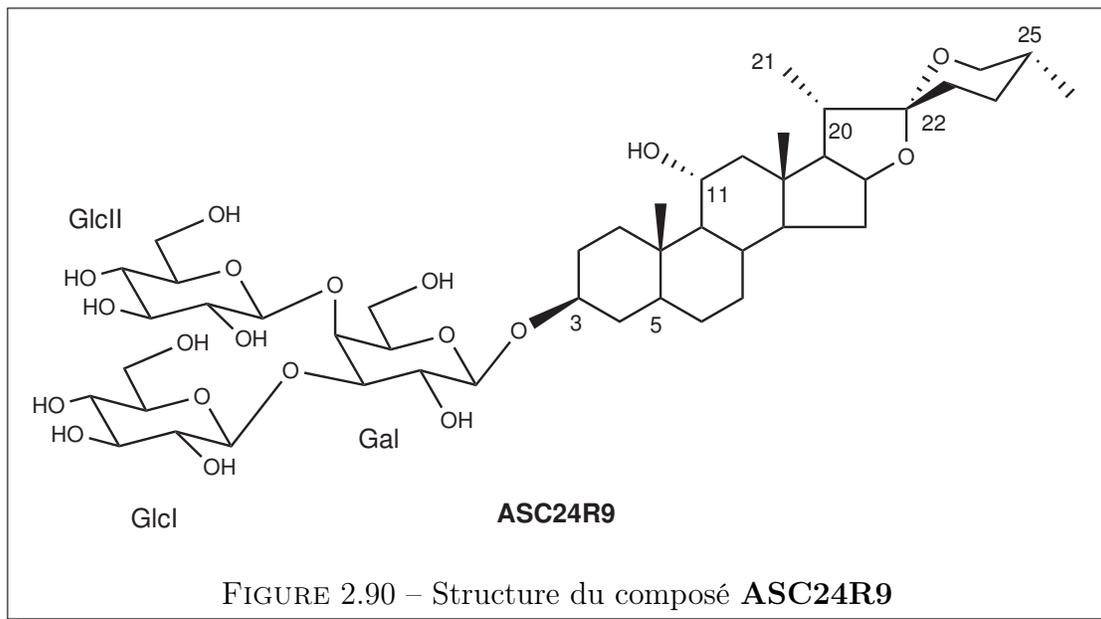


FIGURE 2.89 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC24R9



2.4.2.4 Détermination structurale du composé ASC23R4a/b

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 899 [M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 900 uma, suggérant une formule brute de $C_{45}H_{72}O_{18}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à $m/z = 737 [M-H - 162]^-$ et $591 [M-H - 162 - 146]^-$, correspondant à la perte successive d'un hexose et d'un 6-déoxyhexose respectivement.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

Sur les spectres RMN 1H et ^{13}C on observe des signaux typiques d'un aglycone de type (22*R*,25*R*)-5 α -spirostan-3 β -ol- à δ_C 109.2 (C-22), 31.3 (C-23), 28.8 (C-24), 30.1 (C-25), 66.6 (C-26), 16.9 (C-27), et ceux de son isomère (25*S*) à δ_C 109.4 (C-22), 27.2 (C-23), 25.7 (C-24), 27.3 (C-25), 65.0 (C-26), 16.1 (C-27). On observe également un signal d'une fonction cétone à δ 210.6. Les corrélations HMBC entre les protons à δ 2.31 (H-4), δ 2.10 (H-5), δ 2.01 (H-7) et δ 210.6, prouvent que la fonction cétone se trouve en position C-6 de l'aglycone. Tous les protons et carbones de l'aglycone ont été attribués par l'analyse des spectres HSQC et HMBC. En accord avec les données de la littérature (Kuroda et al., 1995), cet aglycone a été identifié

comme étant le (20*S*,22*R*,25*R*)-3 β -hydroxy-5 α -spirostane-6-one (laxogénine), et son isomère 25*S*.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 3 protons anomériques résonnant à δ 6.02 (*s*), 5.00 (*d*, $J = 7.8$ Hz) et 4.82 (*d*, $J = 6.9$ Hz) qui corrént sur le spectre HSQC avec 3 carbones anomériques à δ 101.6, 104.4 et 99.0 respectivement.

À partir des protons anomériques, la nature des trois systèmes de spins a été déterminée grâce à l'expérience COSY et confirmée par l'expérience TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser :

- Deux β -glucopyranosyles dont les protons anomères résonne à δ 4.82 (*d*, $J = 6.2$ Hz, Glc-I) et à δ 5.00 (*d*, $J = 7.8$ Hz, Glc-II).
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.02 (*s*)

La corrélation HMBC observée entre le proton à δ 6.02 (*s*, Rha-1) et le carbone à δ 77.9 (Glc-I-2) ainsi que la corrélation NOESY entre δ_H 6.02 (*s*, Rha-1) et δ_H 4.06 (Glc-I-2) montrent que le rhamnose est lié au glucose I par une liaison (1 \rightarrow 2). D'autre part, la corrélation HMBC observée entre le proton à δ 5.00 (*d*, $J = 7.8$ Hz, Glc-II-1) et le carbone à δ 81.1 (Glc-I-4) ainsi que la corrélation NOESY entre δ_H 5.00 (*d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-II-1) et δ_H 4.06 (Glc-I-4), prouvent que le glucose est lié au galactose par une liaison (1 \rightarrow 4).

Enfin la corrélation NOESY entre le proton à δ 4.82 (*d*, $J = 6.9$ Hz, Glc-I-1) et le celui à δ 3.89 (Agly H-3) montre que le trisaccharide est attaché en position 3 de l'aglycone.

Conclusion

La structure de la saponine **ASC23R4** a donc été établie comme étant le **laxogénine 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)] - β -D-glucopyranoside**, et son isomère (25*S*).

TAB. 2.7 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC23R4** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone					Sucres		
	<i>25S</i>	<i>25R</i>	<i>25S</i>	<i>25R</i>			
	δ_C		δ_H		3-O-Glc	δ_C	δ_H
1	36.3		1.01 ; 1.50		1	99.0	4.82(<i>d</i> , <i>J</i> =6.9)
2	28.9		1.67, 2.01		2	77.9	4.06
3	76.4		3.89		3	76.9	4.07
4	26.2		1.80, 2.31		4	81.1	4.06
5	56.0		2.10		5	75.9	3.78
6	210.6		–		6	61.2	4.27, 4.48
7	46.3		2.01, 2.27		Rha		
8	37.1		1.77		1	101.6	6.02 (<i>s</i>)
9	53.2		1.10		2	71.8	4.62
10	40.7		–		3	72.2	4.50
11	21.2		1.15, 1.42		4	73.4	4.25
12	39.2		1.07, 1.63		5	69.2	4.74
13	40.7		–		6	18.2	1.65
14	56.0		1.23		Glc		
15	31.4		1.32, 1.89		1	104.4	5.00 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.8)
16	80.6		4.48		2	74.5	3.94
17	62.2		1.78		3	77.4	4.16
18	16.1		0.69		4	70.8	4.08
19	12.8		0.67		5	77.8	3.91
20	41.6	41.8	1.88	1.83	6	61.6	4.14, 4.35
21	14.6		1.07				
22	109.4	109.2	–	–			
23	27.2	31.3	1.54, nd	1.32, nd			
24	25.8	28.7	1.34, 2.06	1.49, nd			
25	27.3	30.1	1.52	1.51			
26	65.0	66.6	3.32, 3.97	3.40, 3.53			
27	16.1	16.9	0.98	0.62			

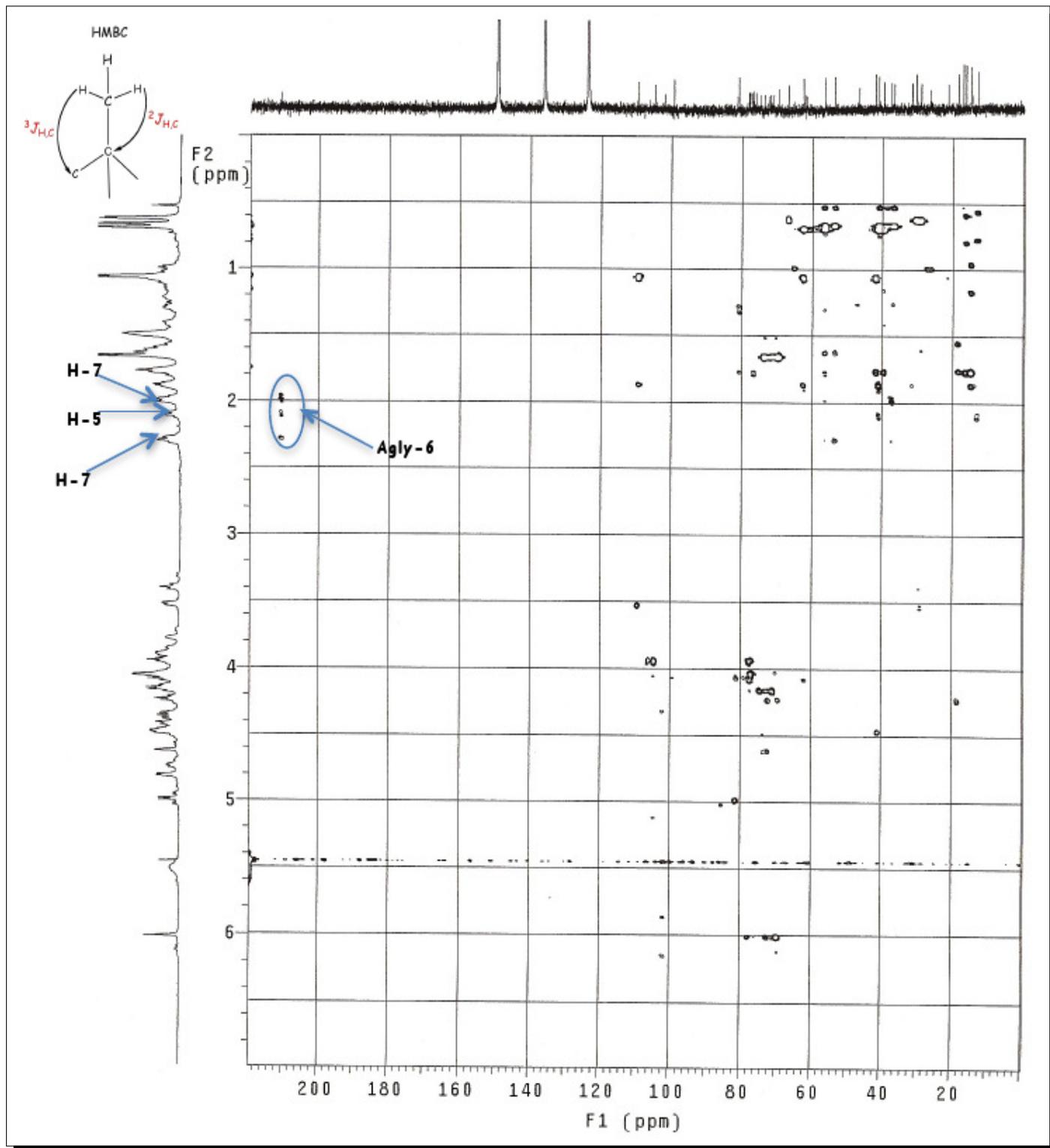


FIGURE 2.91 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC23R4**

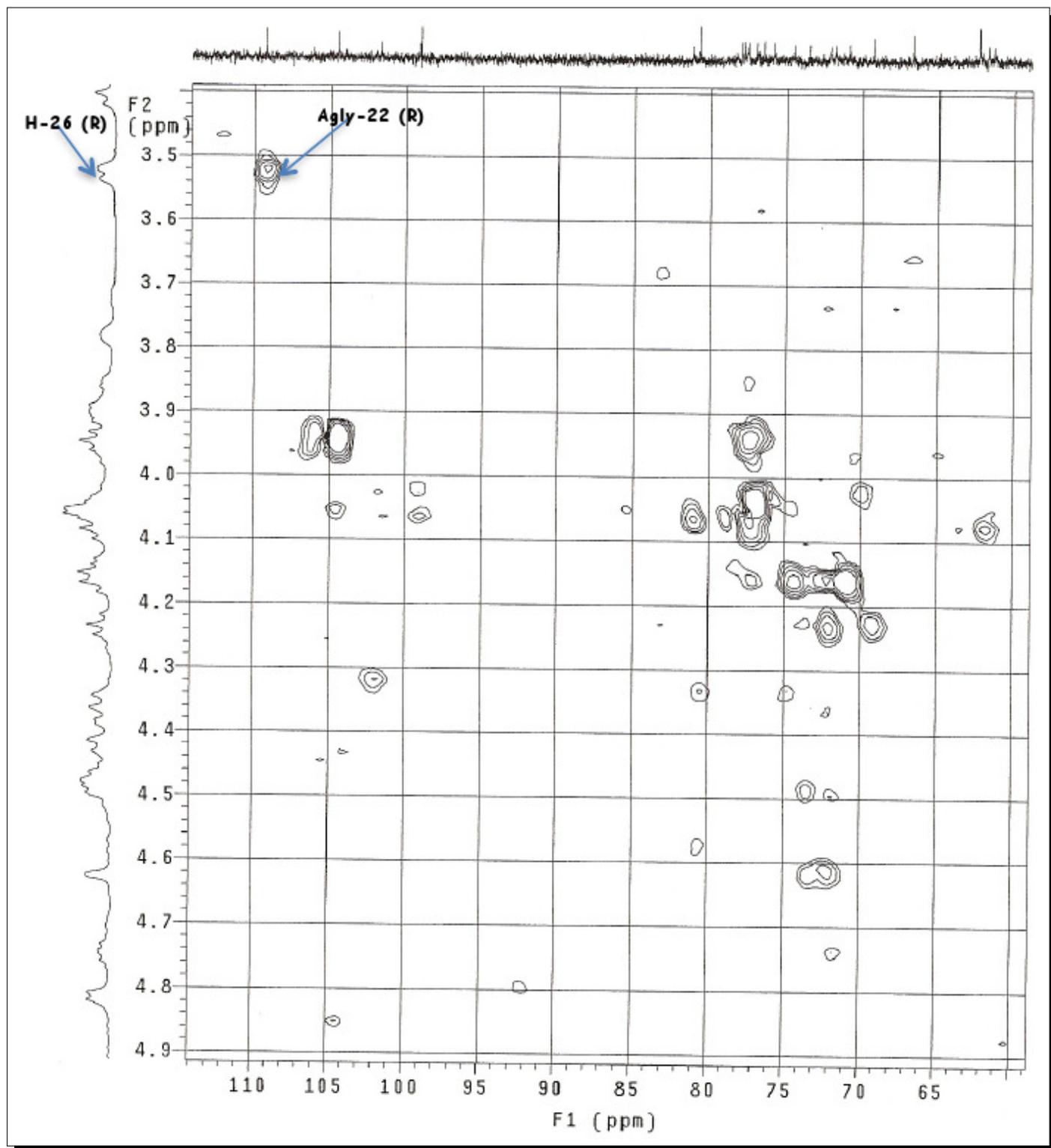


FIGURE 2.92 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC23R4**

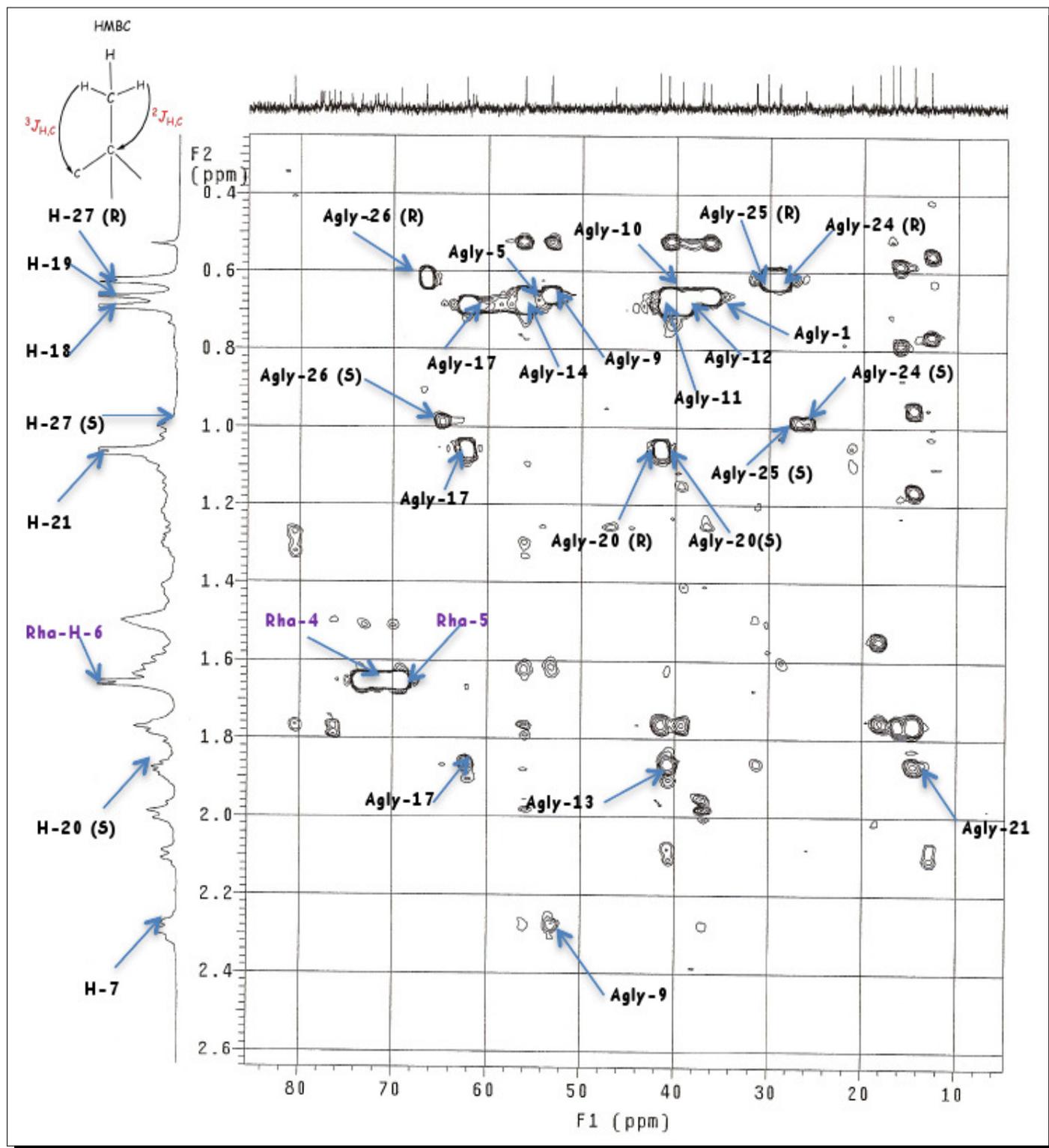


FIGURE 2.93 – Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4

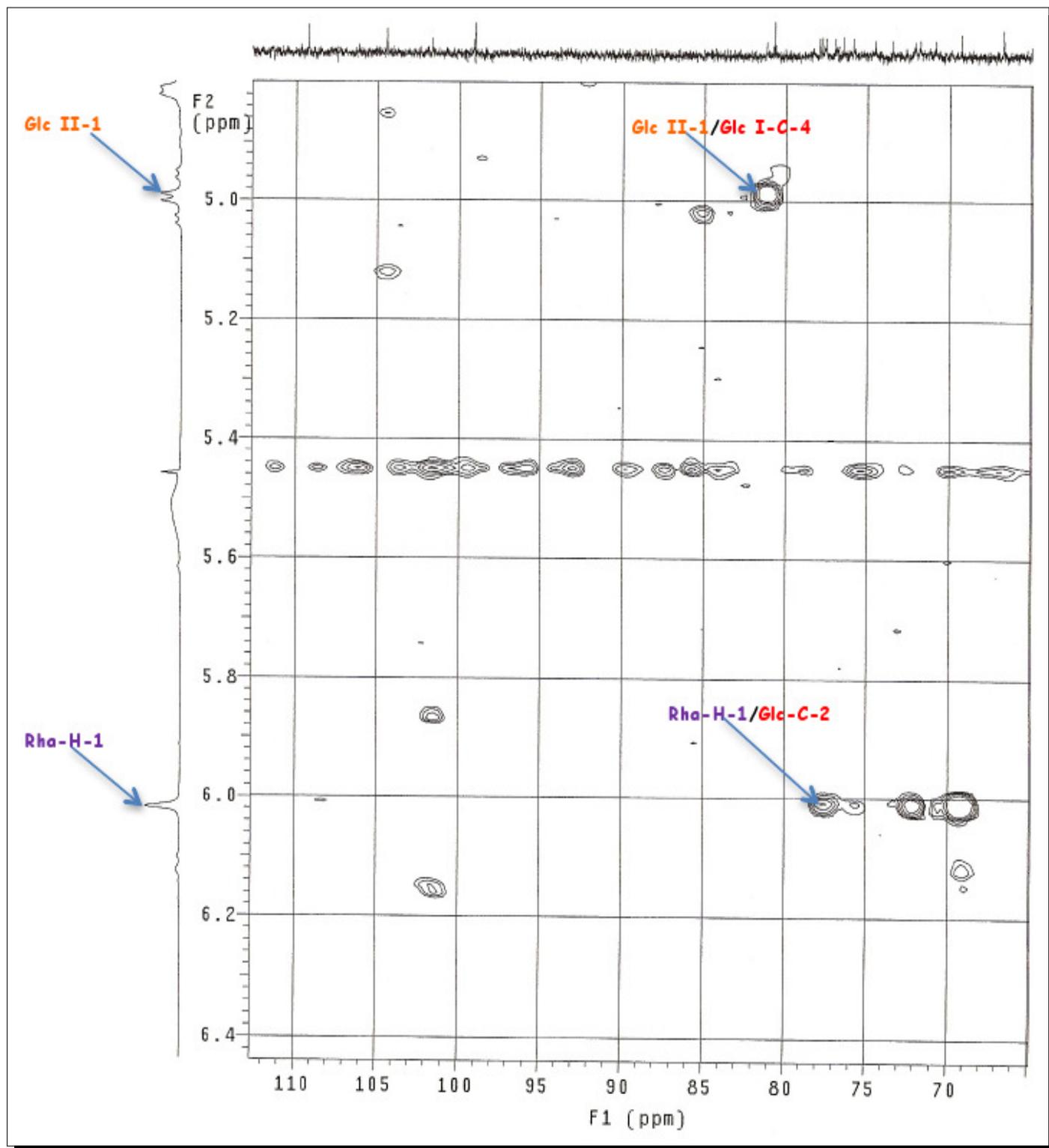


FIGURE 2.94 – Spectre **HMBC** de la partie aglycone de la saponine **ASC23R4**

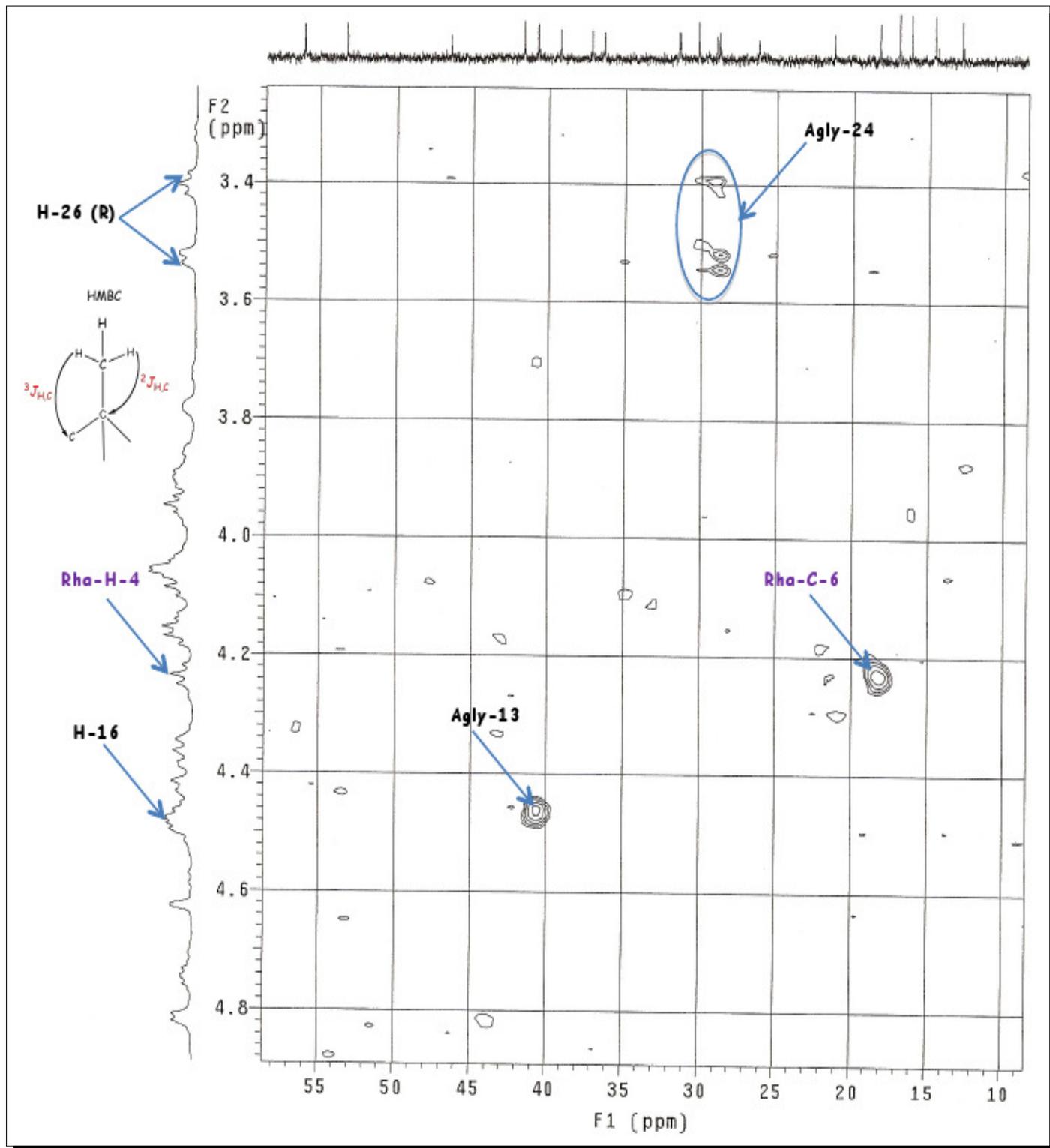


FIGURE 2.95 – Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC23R4

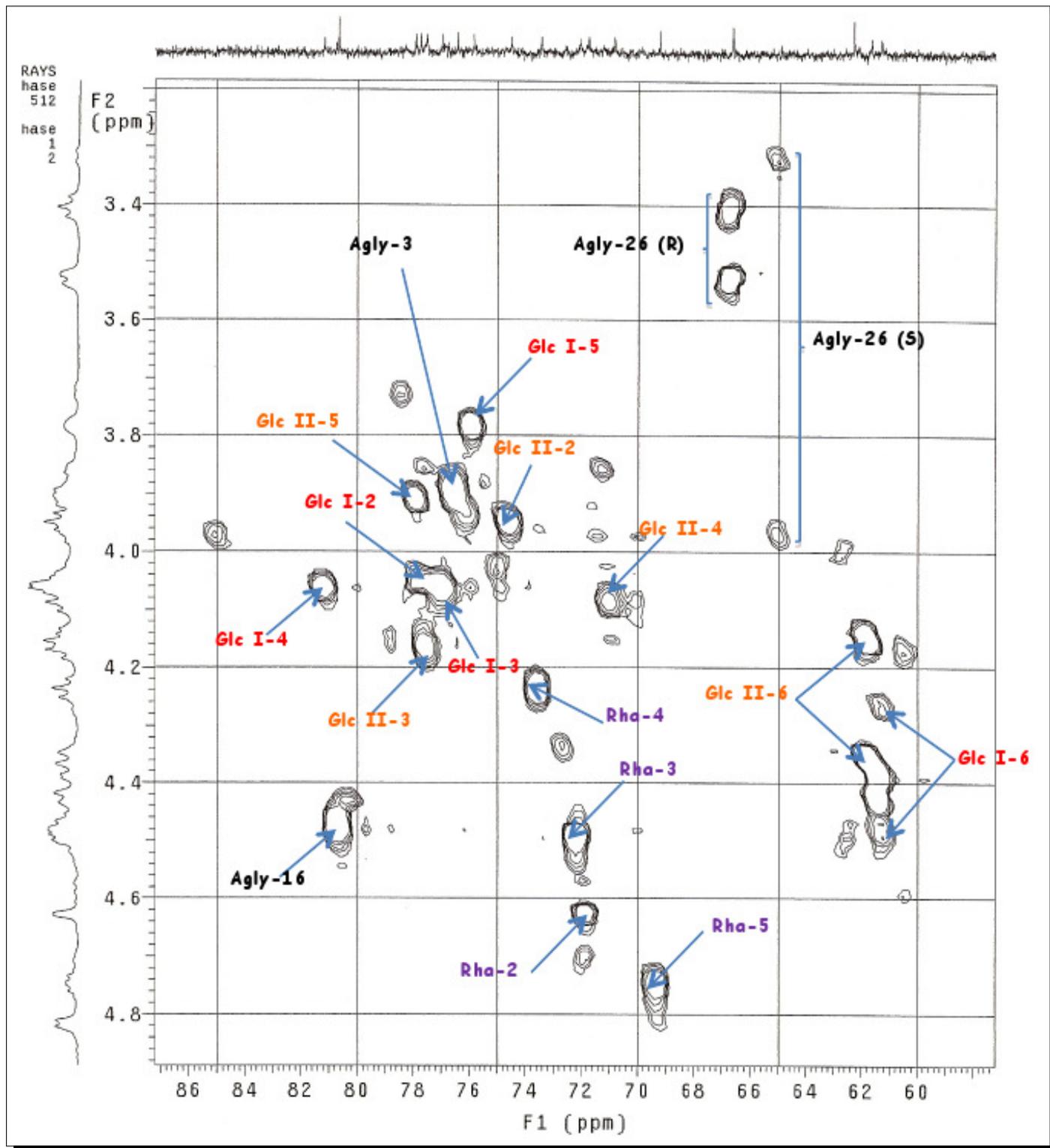


FIGURE 2.96 – Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC23R4

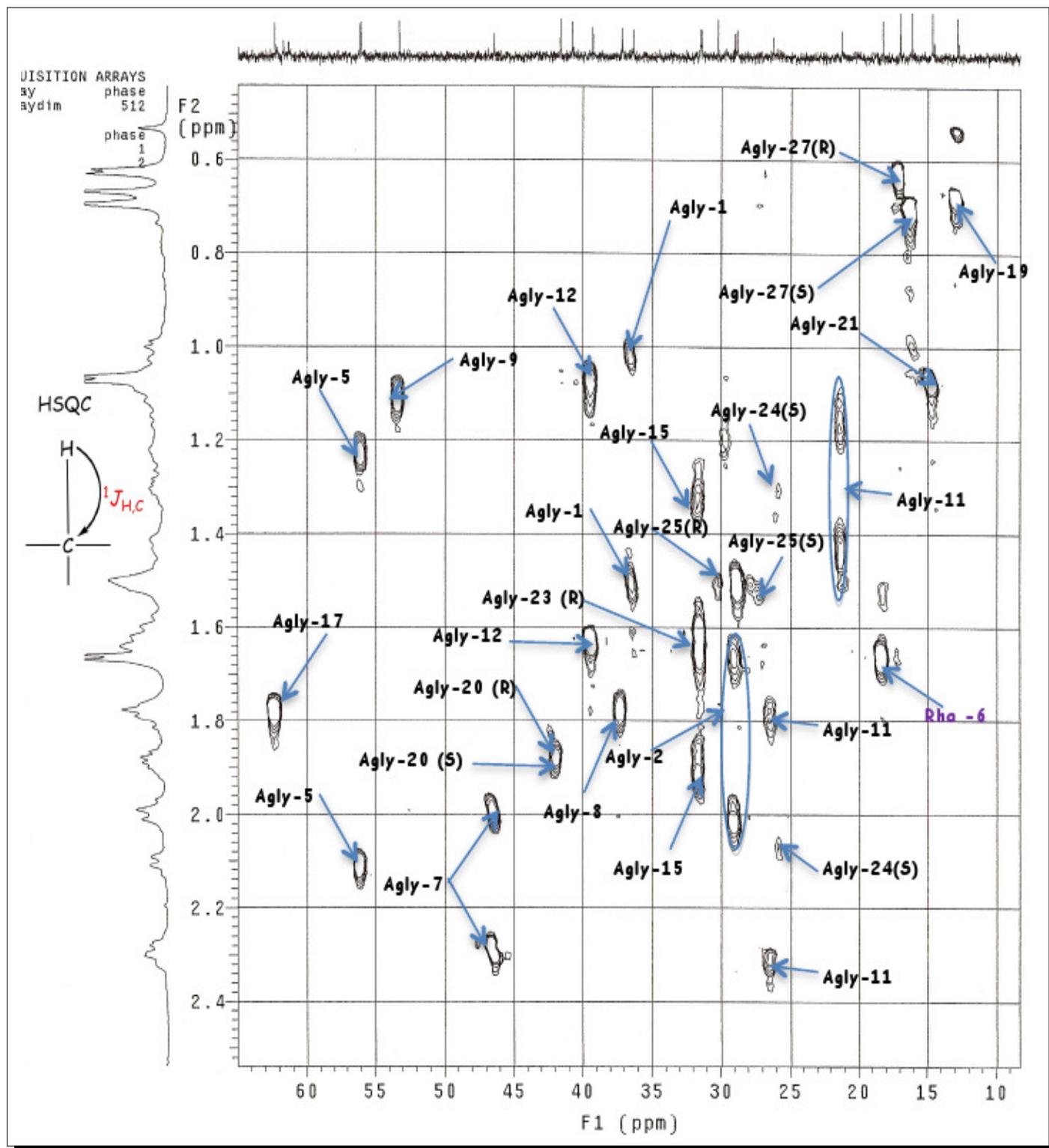


FIGURE 2.97 – Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4

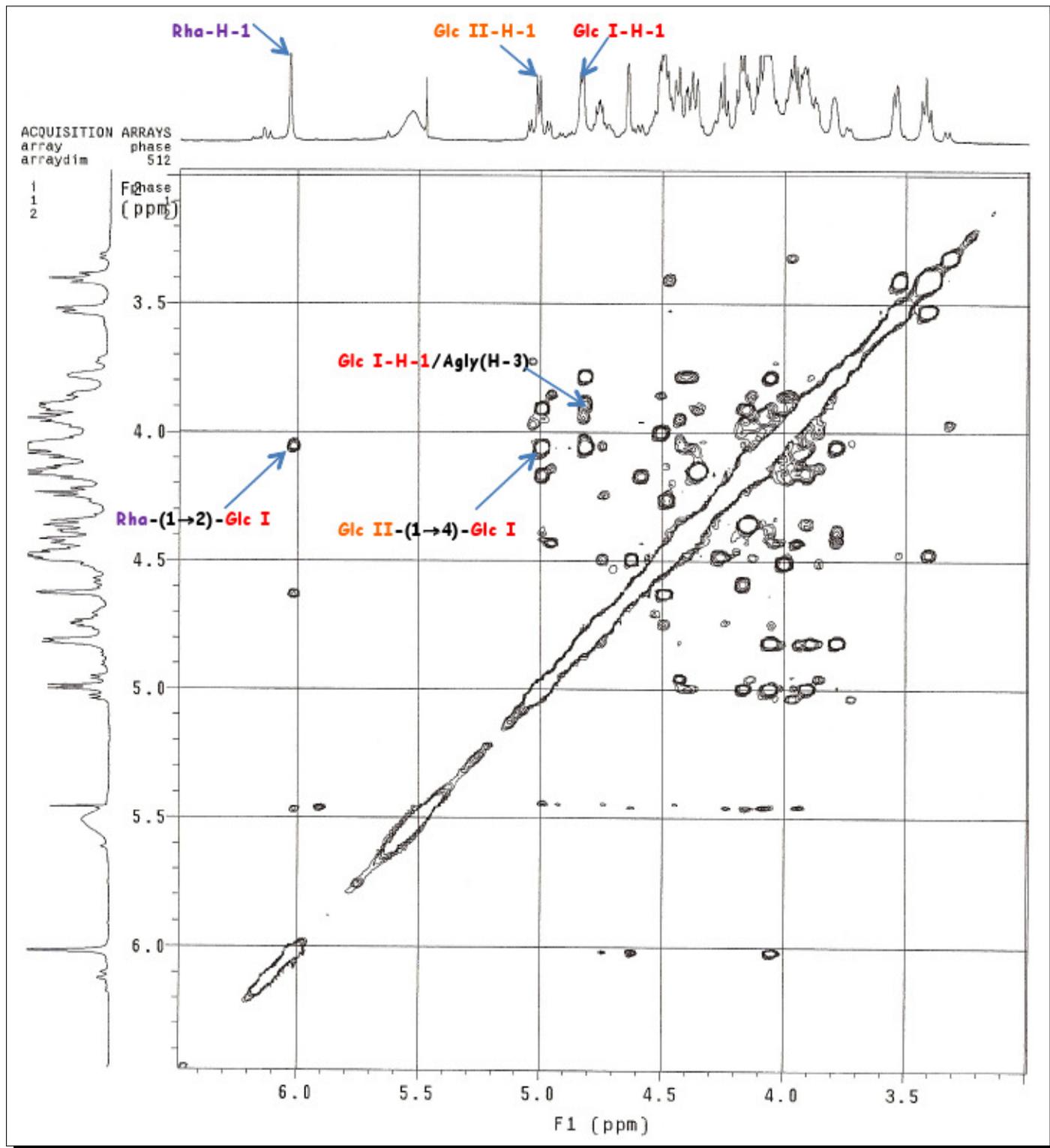
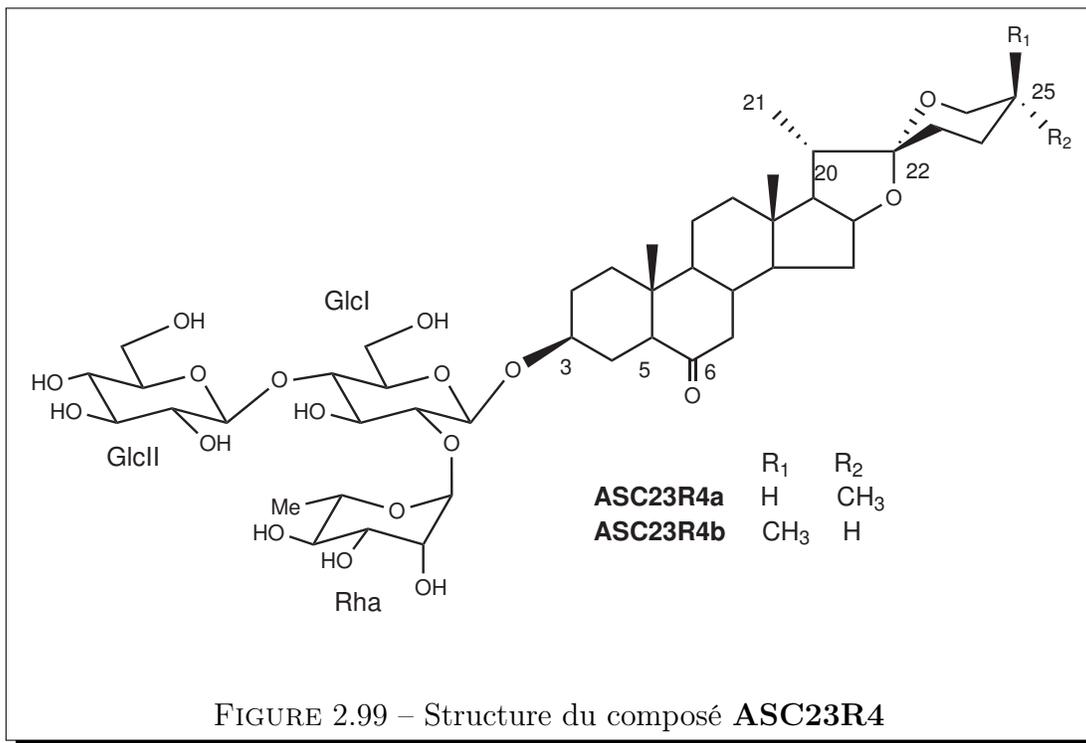


FIGURE 2.98 – Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC23R4



2.4.2.5 Détermination structurale du composé ASC113

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 737 [M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire égale à 738 uma, suggérant une formule brute de $C_{39}H_{62}O_{13}$, soit 162 uma de moins que le composé ASC23R4. L'ion-fragment observé à $m/z = 591 [M-H-146]^-$ correspondant à la perte d'un 6-déoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

L'analyse comparative des spectres RMN 1H et ^{13}C de ASC113 permet de constater que la zone correspondant à l'aglycone est intégralement identique à celle de l'isomère (25*R*) du composé ASC23R4. Nous déduisons que l'aglycone de ASC113 est également la laxogénine.

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 2 protons anomériques résonnant à δ 6.07 (s) et 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz) qui corrélient sur le spectre HSQC avec 2 carbones anomériques à δ 101.7 et 99.1 respectivement.

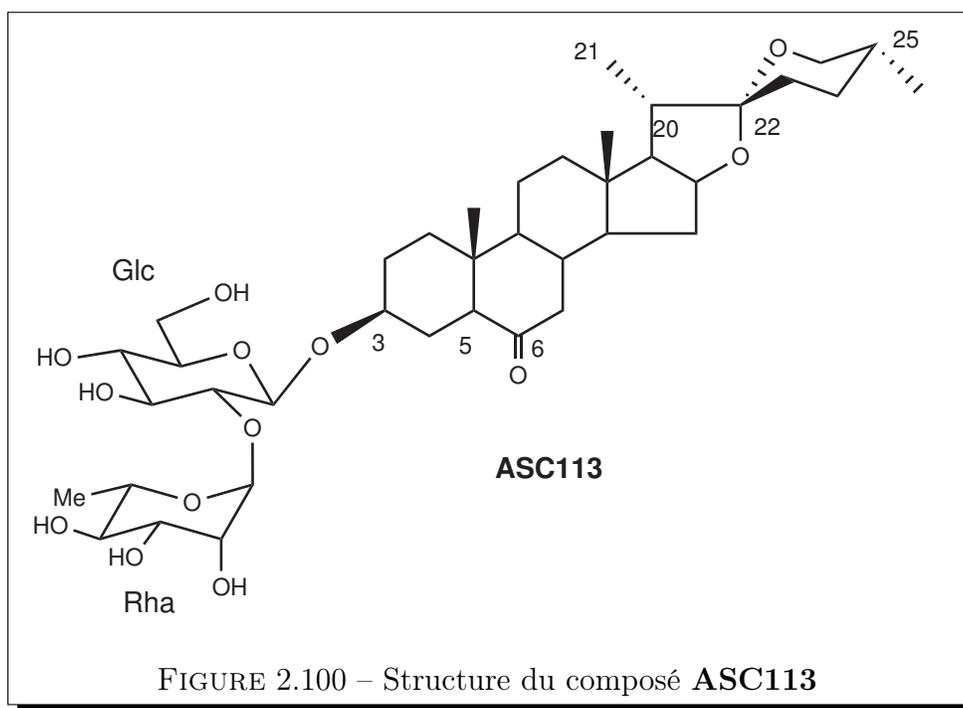
A partir des protons anomériques, la nature des 2 sucres a été déterminée grâce aux spectres de RMN 1D et 2D :

- Un β -glucopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz, Glc)
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.07 (s, Rha)

La comparaison des spectres du composé ASC113 et ceux du composé ASC23R4 permet de noter qu'ils ont quasiment le même séquençage glycosidique en C-3, hormis la disparition des signaux du glucose terminal. Ceci est confirmé par le déplacement chimique du carbone C-4 du glucose à δ 71.3 qui est libre par rapport à celui du composé ASC 23R4 déblindé à δ 81.1 ppm.

Conclusion

L'ensemble de ces données permet d'établir la structure de ASC113 comme étant le laxogénine 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranoside, composé naturel déjà décrit dans la littérature (Abbas, 2001).



TAB. 2.8 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC113** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone			Sucres		
	δ_C	δ_H	3-O-Glc	δ_C	δ_H
1	36.2	1.03, 1.50	1	99.1	4.84(<i>d</i> , <i>J</i> =7.6)
2	28.9	1.67, 2.04	2	78.2	4.06
3	76.1	3.95	3	78.5	4.11
4	26.1	1.79, 2.32	4	71.3	3.93
5	55.9	2.11	5	77.5	3.84
6	211.0	–	6	62.1	4.17, 4.47
7	46.4	2.01, 2.27	Rha		
8	37.1	1.77	1	101.7	6.07(<i>s</i>)
9	53.1	1.11	2	71.7	4.67
10	40.7	–	3	71.9	4.50
11	21.4	1.12, 1.41	4	73.3	4.22
12	39.2	1.08, 1.63	5	78.2	4.76
13	40.7	–	6	18.1	1.64
14	55.9	1.24			
15	31.5	1.34, 1.93			
16	80.6	4.48			
17	62.1	1.78			
18	16.0	0.68			
19	12.7	0.66			
20	41.5	1.88			
21	14.5	1.06			
22	109.2	–			
23	31.3	1.58, 1.87			
24	29.6	1.50, nd			
25	30.0	1.49			
26	66.5	3.39, 3.53			
27	16.9	0.62			

2.4.2.6 Détermination structurale du composé ASC1154

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 721$ $[\text{M-H}]^-$, soit une masse moléculaire égale à 722 uma, suggérant une formule brute en $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_{12}$. Un ion-fragment observé à $m/z = 575$ $[\text{M-H-146}]^-$ correspond à la perte d'un 6-déoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

Sur le spectre RMN ^1H , on observe des signaux typiques des méthyles d'un squelette stéroïdique :

- Quatre méthyles dont deux angulaires sous forme de singulet dont les protons résonnent respectivement à δ_H 0.76 (s) et δ_H 0.96 (s) et deux méthyles secondaires sous forme de doublet résonnant à δ_H 0.64 (*d*, $J = 4.0$ Hz) et δ_H 1.08 (*d*, $J = 6.6$ Hz) ppm.
- Un proton oléfinique résonnant à δ_H 5.28 ppm (H-6)

L'analyse des deux spectres RMN ^{13}C et DEPT nous permet de distinguer dans la zone de l'aglycone, 4 carbones primaires (CH₃), 10 carbones secondaires (CH₂), 9 carbones tertiaires (CH) et 4 carbones quaternaires (C). Deux signaux à δC 121.4 et 140.5 ppm correspondent aux signaux des carbones éthyléniques de la double liaison $\Delta^{5,6}$ caractéristique d'un squelette Δ^5 -spirostène.

Tous les protons et carbones de l'aglycone ont été attribués par l'analyse des spectres HSQC et HMBC.

En accord avec les données de la littérature, cet aglycone a été identifié comme étant la diosgénine (Kougan et al., 2010, Nakano et al., 1989).

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

L'étude du spectre RMN ^1H permet de distinguer dans la zone des sucres 2 signaux attribuables aux protons anomériques dont le premier sous forme de doublet résonne à δ 4.90 (*d*, $J = 7.6$ Hz) et le second sous forme de singulet large à δ 6.19 (s). Ces protons corrént sur le spectre HSQC avec 2 carbones anomériques à δ 99.9 et 101.7 respectivement. Ceci évoque le disaccharide classique $\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-glucoopyranoside}$,

Séquençage en C-3

La corrélation HMBC entre le proton anomérique à δ 4.90 (*d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-1) et le carbone à 77.7 (Agly-3), ainsi que le NOESY entre δ_H 4.90 (*d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-1) et δ_H 3.85 (Agly-3) montrent que le galactose est lié en position 3 de l'aglycone par un liaison *O*-glycosidique.

La corrélation HMBC observée entre le proton à δ 6.19 (s, Rha-1) et le carbone à δ 77.8 (Glc-2) ainsi que la corrélation NOESY entre δ_H 6.02 (s, Rha-1) et δ_H 4.12 (Glc-2) montrent

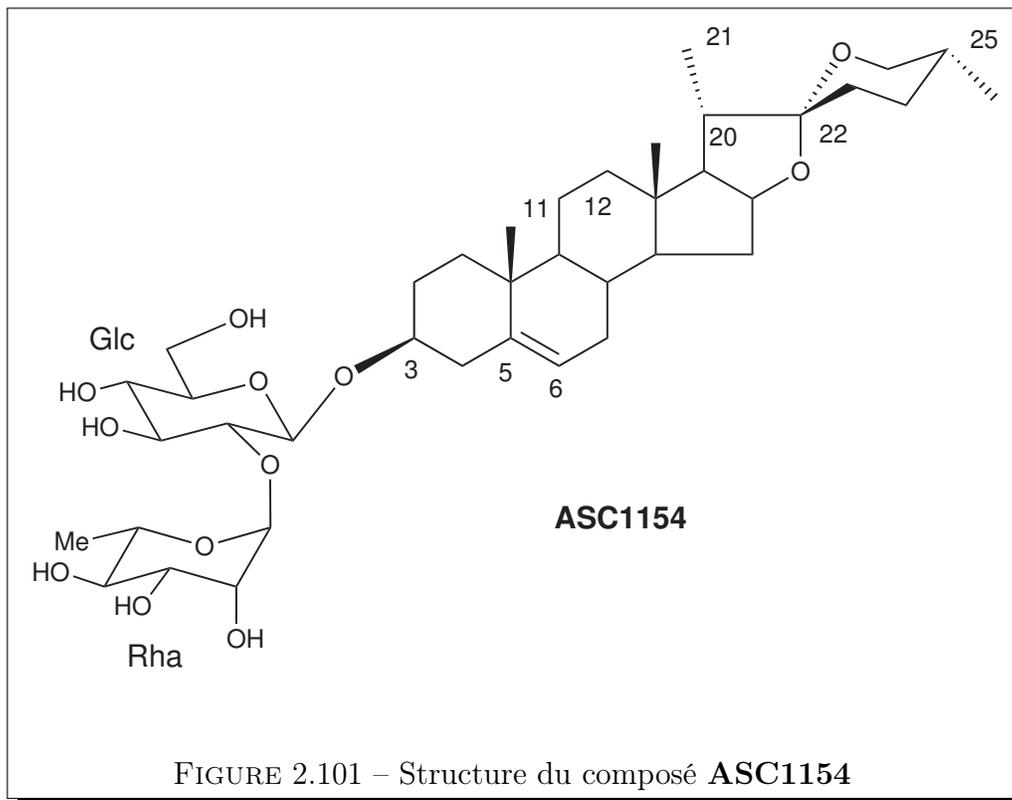
que le rhamnose est lié au galactose par une liaison (1→2).

Conclusion

L'ensemble de ces données a permis d'élucider la saponine ASC1154 comme étant la diosgénine 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside, composé naturel précédemment isolé, il s'agit de la **Prosapogénine A de la Dioscine** (Han et al., 1999).

TAB. 2.9 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC1154** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone			Sucres		
	δ_C	δ_H	3-O-Glc	δ_C	δ_H
1	37.2	0.90, 1.66	1	99.9	4.89(<i>d</i> , <i>J</i> =7.6)
2	29.8	1.84, 2.10	2	77.8	4.12
3	77.7	3.85	3	78.8	4.21
4	38.6	2.63, 2.72	4	71.3	4.03
5	140.5	–	5	77.7	3.85
6	121.4	5.28	6	62.1	4.23, 4.42
7	32.0	1.40, 2.00	Rha		
8	31.4	1.44	1	101.7	6.19(<i>s</i>)
9	49.9	0.82	2	71.9	4.73
10	36.8	–	3	72.2	4.52
11	20.7	1.36, nd	4	73.5	4.28
12	39.5	1.04, 1.63	5	69.2	4.85
13	40.1	–	6	18.2	1.67
14	56.3	1.02			
15	31.8	1.39, 1.83			
16	80.9	4.51			
17	62.4	1.76			
18	16.0	0.76			
19	19.1	0.96			
20	41.6	1.90			
21	14.7	1.08			
22	109.2	–			
23	31.4	1.41, nd			
24	28.8	1.52, nd			
25	30.2	1.52, nd			
26	66.6	3.43, 3.54			
27	17.0	0.64			



2.4.2.7 Détermination structurale du composé ASC23R6

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 883 [M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 884 uma, suggérant une formule brute en $C_{45}H_{72}O_{17}$. Un ion-fragment observé à $m/z = 721 [M-H-162]^-$ correspond à la perte d'un hexose. Comparé au composé ASC1154, on note un gain de masse de 162 uma, 721 étant le pic d'ion pseudo-moléculaire de ASC1154.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

L'analyse des spectres RMN de ASC23R6 permet de constater que la zone de l'aglycone est intégralement identique à celle du composé ASC1154. En accord avec les données de la littérature, il s'agit de la diosgénine (Kougan et al., 2010, Nakano et al., 1989).

TAB. 2.10 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASC23R6** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone			Sucres		
	δ_C	δ_H	3-O-Glc I	δ_C	δ_H
1	37.2	0.90, 1.66	1	99.6	4.83(<i>d</i> , <i>J</i> =7.3)
1	37.1	0.91, 1.66	2	77.0	4.09
2	31.7	1.76, 1.96	3	77.2	4.07
3	78.0	3.78	4	81.1	4.09
4	38.5	2.61, 2.68	5	75.7	3.78
5	140.4	–	6	61.1	4.35, 4.40
6	121.5	5.27	Rha		
7	31.7	1.38, 1.80	1	101.4	6.06(<i>s</i>)
8	31.4	1.64	2	71.7	4.64
9	49.9	0.81	3	72.1	4.47
10	36.3	–	4	73.3	4.25
11	20.7	1.31, 1.37	5	69.1	4.79
12	39.5	1.04, 1.63	6	18.2	1.67
13	40.1	–	Glc II		
14	56.2	1.01	1	104.4	5.01(<i>d</i> , <i>J</i> =7.6)
15	31.8	1.40, 1.78	2	74.4	3.94
16	80.8	4.48	3	77.2	4.17
17	62.3	1.76	4	70.7	4.08
18	16.0	0.75	5	77.8	3.91
19	19.1	0.96	6	61.5	4.17, 4.35
20	41.6	1.91			
21	14.6	1.08			
22	109.2	–			
23	31.3	1.44, 1.61			
24	29.6	1.51, 1.55			
25	30.2	1.51			
26	66.6	3.43, 3.54			
27	16.9	0.64			

Détermination de la nature des sucres et liaison avec l'aglycone

Nous observons sur le spectre RMN ^1H la présence de 3 protons anomériques résonnant à δ 6.05 (*s*), 5.01(*d*, *J* = 7.6 Hz) et 4.83 (*d*, *J* = 7.3 Hz), qui donnent des corrélations dans le spectre HSQC avec 3 carbones anomériques à δ 101.4, 104.4 et 99.6 respectivement.

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

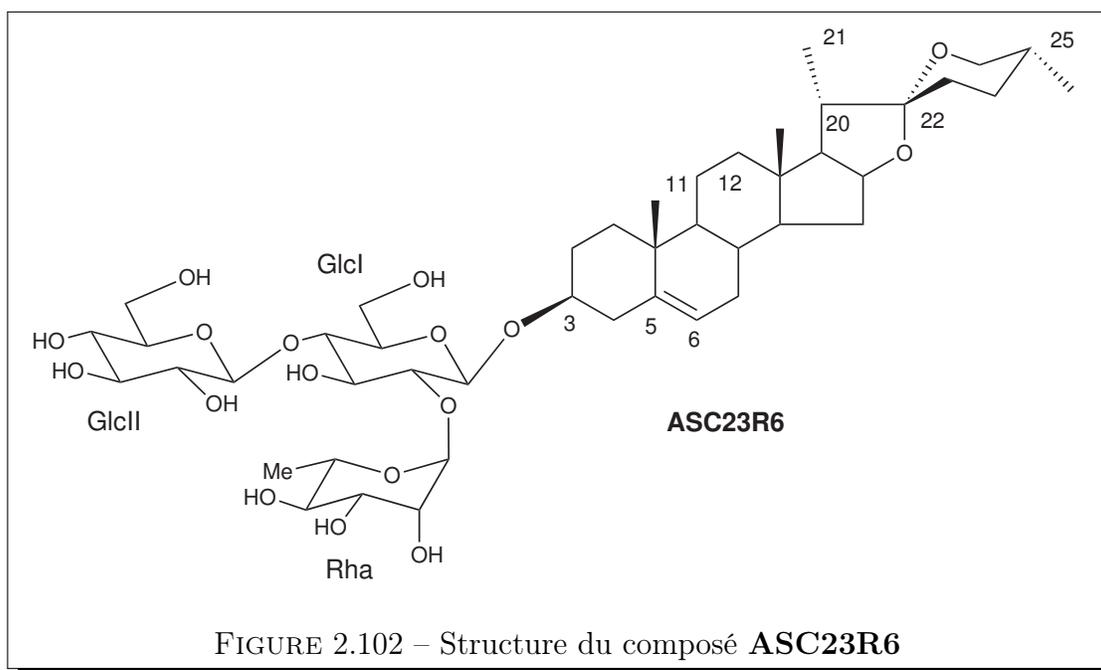
- Deux β -glucopyranosyles en partant des protons anomères à δ 4.83 (*d*, *J* = 7.3 Hz, Glc-I) et δ 5.01(*d*, *J* = 7.6 Hz, Glc-II)
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.05 (*s*, Rha).

La comparaison des spectres du composé ASC23R6 à ceux du composé ASC1154 permet de noter que ces deux composés sont quasi-identiques entre eux à une différence près : la présence d'un glucose supplémentaire Glc-II.

La corrélation HMBC entre le proton anomérique δ 5.01 (*d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-II-1) et le carbone à δ 81.1 (Glc-I-4) montre que le glucose II est lié au glucose I par une liaison (1→4).

Conclusion

L'ensemble de ces données nous permet ainsi d'identifier ASC23R6 comme étant la diosgénine 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- β -D-glucopyranoside, composé naturel déjà isolé auparavant (Han et al., 1999, Ohtsuki et al., 2006).



2.4.2.8 Détermination structurale du composé ASCi-2

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en source FAB, enregistré en mode négatif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1063 [M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 1064 uma, suggérant une formule brute en $C_{51}H_{84}O_{23}$. Des ion-fragments observés à $m/z = 901 [M-H-162]^-$, 755 $[M-H-162 - 146]^-$ et 593 $[M-H -162 - 146 - 162]^-$, correspond à la perte de deux hexoses et d'un 6-déoxyhexose.

Spectroscopie RMN

Nature de l'aglycone

La détermination de l'aglycone a été réalisée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C et en particulier des corrélations observées dans les spectres HSQC et HMBC.

Sur le spectre RMN 1H , on observe dans la zone de l'aglycone :

- 4 méthyles dont 2 angulaires dont les protons résonnent à δ_H 0.81 (s) et 0.96 (s) et 2 méthyles secondaires sous forme de doublets résonnant à δ_H 0.92 (*d*, $J = 6.6$ Hz) et 1.26 (*d*, $J = 6.9$ Hz).
- Un proton oléfinique résonnant à δ 5.26 ppm (H-6).

L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT nous permet de distinguer dans la zone de l'aglycone, 4 carbones quaternaires(C), 9 carbones tertiaires (CH), 10 carbones secondaires (CH₂) et 4 méthyles (CH₃). De plus le carbone quaternaire hémiacétalique résonnant à 110.5 ppm, traduit la présence d'un squelette furostane (Corea et al., 2003). Enfin les signaux à δ_C 121.5 et 140.4 ppm correspondent à ceux des carbones éthyléniques de la double liaison $\Delta^{5,6}$, caractéristique d'un squelette Δ^5 -furostène.

L'analyse complète des spectres RMN 1D et 2D de l'aglycone et la comparaison des déplacements chimiques avec ceux de la littérature (Akhov et al., 1999, Munafo et al., 2010, Staerk et al., 2006) ont permis de l'identifier comme étant le (25R) furost-5-ène-3 β ,22 α ,26-triol.

Nature des sucres

Nous observons sur le spectre RMN 1H la présence de 4 protons anomériques résonnant à δ 6.07 (s) et 5.02 (*d*, $J = 8.1$ Hz), 4.83 (*d*, $J = 7.3$ Hz) et 4.71 (*d*, $J = 7.6$ Hz), qui corrént sur le spectre HSQC avec 4 carbones anomériques à δ 101.5, 104.4, 99.6 et 104.2 respectivement.

La présence d'un méthyle secondaire résonnant sous forme de doublet à δ 1.67 (d , $J = 5.9$ Hz) caractérisant la présence d'un 6-déoxyhexose.

A partir des protons anomériques, la nature des 4 systèmes de spins a été déterminée grâce à l'expérience COSY et confirmée par l'expérience TOCSY. Les déplacements chimiques des protons et carbones attribués à l'aide des expériences HSQC et HMBC ont permis de caractériser :

- Trois β -glucopyranosyles dont les protons anomères résonnent à δ 4.83 (d , $J = 7.3$ Hz, Glc-I), 5.02 (d , $J = 8.1$ Hz, Glc-II) et 4.71 (d , $J = 7.6$ Hz, Glc-III).
- Un α -rhamnopyranosyle dont le proton anomère résonne à δ 6.07 (s, Rha).

Séquençage en C-3

Les spectres HMBC et NOESY ont permis d'établir le séquençage osidique en C-3 de l'aglycone. Ainsi on observe les corrélations suivantes :

- La corrélation HMBC entre le proton anomérique δ 4.83 (d , $J = 7.3$ Hz, Glc-I-1) et le carbone à δ 78.0 (Agly-3), ainsi que le NOESY entre δ_H 4.83 (d , $J = 7.3$ Hz, Glc-I-1) et δ_H 3.78 (Agly-3), montrent que le glucose I est lié en position 3 de l'aglycone.
- Les corrélations HMBC entre le proton anomérique δ 6.07 (s, Rha-1) et le carbone à δ 77.3 (Glc-I-2) et NOESY entre 6.07 (s, Rha-1) et δ_H 4.08 (Glc-I-2), indiquent que le rhamnose est lié au glucose I par une liaison (1 \rightarrow 2).
- Enfin la corrélation HMBC entre le proton anomérique δ 5.02 (d , $J = 8.1$ Hz, Glc-II-1) et le carbone à δ 81.1 (Glc-I-4), prouve que le glucose II est lié au glucose I par une liaison (1 \rightarrow 4). Ceci est confirmé par la NOESY entre δ_H 5.02 (d , $J = 8.1$ Hz, Glc-II-1) et δ_H 4.11 (Glc-I-4).

Séquençage en C-26

La corrélation HMBC entre le proton anomérique δ 4.71 (d , $J = 7.6$ Hz, Glc-III-1) et le carbone à δ 75.0 (Agly-26), montre que le glucose III est lié en position C-26 de l'aglycone.

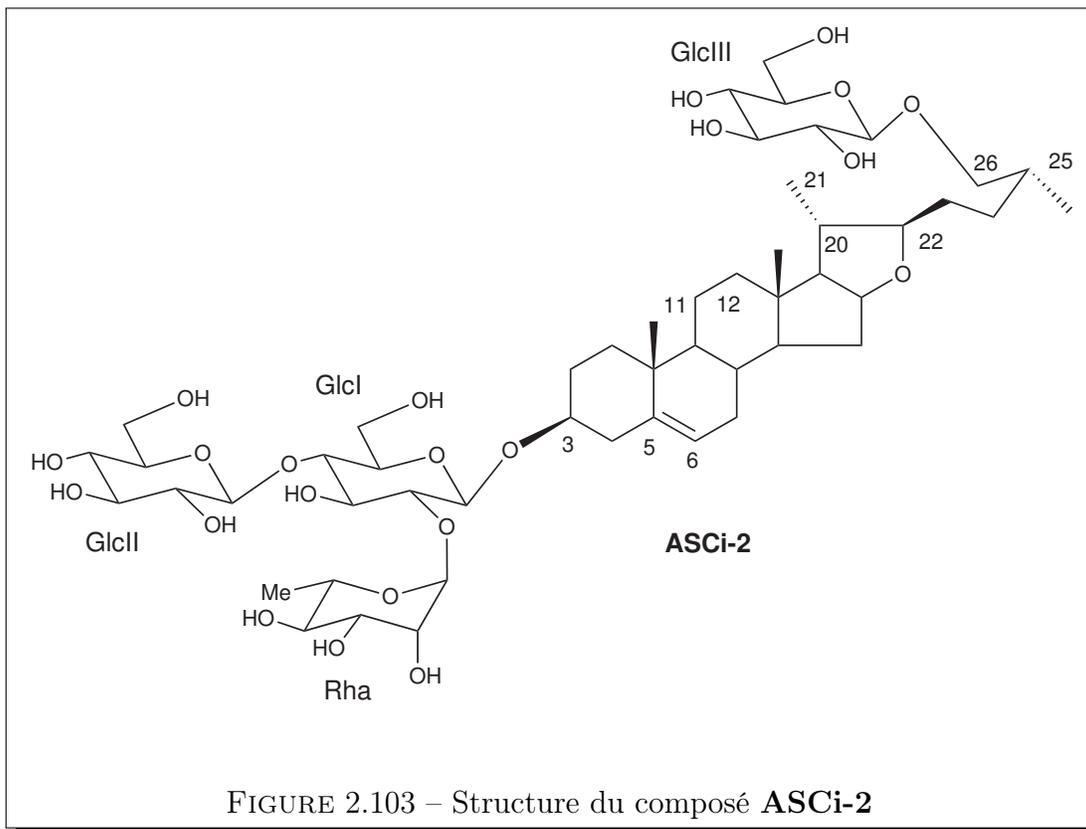
Conclusion

La structure de la saponine ASCi-2 a donc été établie comme étant le (25*R*) furost-5-ène-3 β ,22 α ,26-triol 26-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside, composé naturel dénommé deltoside précédemment décrit dans la

littérature (Agrawal et al., 1985).

TAB. 2.11 – Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé **ASci-2** dans la pyridine- d_5 .

Aglycone			Sucres		
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	37.2	0.90, 1.66	1	99.6	4.83(<i>d</i> , <i>J</i> =7.3)
1	37.1	0.90, 1.65	2	77.0	4.11
2	29.8	1.78, 2.08	3	77.3	4.08
3	78.0	3.78	4	81.1	4.11
4	38.5	2.60, 2.68	5	75.8	3.78
5	140.4	–	6	61.1	4.35, 4.43
6	121.5	5.26	Rha		
7	32.0	1.38, 1.78	1	101.5	6.07(<i>s</i>)
8	31.3	1.46	2	71.7	4.64
9	50.0	0.80	3	72.1	4.47
10	36.7	–	4	73.4	4.26
11	20.7	1.37, 1.40	5	69.2	4.79
12	39.5	1.04, 1.66	6	18.2	1.67
13	40.5	–	Glc II		
14	56.2	0.97	1	104.4	5.02(<i>d</i> , <i>J</i> =8.1)
15	31.9	1.40, 1.89	2	74.5	3.95
16	80.8	4.89	3	77.5	4.17
17	63.2	1.88	4	70.7	4.11
18	16.1	0.81	5	77.8	3.91
19	17.0	0.96	6	61.1	4.18, 4.35
20	40.4	2.18	26-O-Glc III		
21	16.0	1.26	1	104.2	4.71(<i>d</i> , <i>J</i> =7.6)
22	110.5	–	2	74.5	3.92
23	37.2	1.67	3	77.8	4.18
24	27.9	1.60, 2.00	4	71.1	4.07
25	33.8	1.87	5	77.3	4.08
26	75.0	3.55, 3.87	6	62.2	4.23, 4.43
27	17.0	0.92			



2.5 Conclusion de l'étude chimique de *Allium schoenoprasum*

L'étude chimique de *Allium schoenoprasum* a conduit à l'isolement et la détermination structurale de 11 saponines. Il s'agit des composés **ASC12R5a/b**, **ASC23R2a/b**, **ASC24R9**, **ASC23R4a/b**, **ASC113**, **ASC1154**, **ASC23R6** et **ASCi-2**.

Les composés **ASC12R5a/b**, **ASC23R2a/b** et **ASC23R4a/b** sont des mélanges inséparables d'isomères *25R* (a) et *25S* (b). Les 10 premiers composés cités sont tous de type spirostanique tandis que le composé **ASCi-2** est de type furostanique. Sept sont de structures nouvelles (**ASC12R5a/b**, **ASC23R2a/b**, **ASC24R9**, **ASC23R4a/b**).

Au plan chimiotaxonomique, ces résultats sont conformes à ceux de la littérature, les **Al-*liaceae*** étant connues comme source de saponines stéroïdiques (cf. 2.1-2.7).

Une analyse comparative permet de constater que l'originalité des molécules nouvelles est plus liée à leurs aglycones qu'à leurs chaînes oligosaccharides respectives. Les molécules isolées

possèdent des aglycones classiques ou diversement fonctionnalisés, à des degrés d'oxydation différents (groupements hydroxyles ou cétone).

On constate l'effet inverse pour les saponines triterpéniques. L'originalité des 10 saponines triterpéniques nouvelles est plus le fait des chaînes oligosaccharidiques et des différentes substitutions au niveau des sucres que de l'aglycone. L'**acide gypsogénique**, la **gypsogénine**, l'**acide échinocystique**, la **caulophyllogénine** et la **présénégénine** sont en effet des aglycones classiques très connus. .

Les saponines stéroïdiques étant reconnues comme très actives au plan biologique, nous avons testé leur cytotoxicité sur les lignées cellulaires cancéreuses coliques **HT-29** et **HCT 116** (cf. Etude Biologique).

Troisième partie

TRAVAUX BIOLOGIQUES

MATÉRIELS ET MÉTHODES APPLIQUÉS À L'ÉTUDE BIOLOGIQUE

1.1 Activité cytotoxique

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en collaboration avec l'équipe des Docteurs Jean-François Mirjolet et Olivier Duchamp de l'entreprise Oncodesign Biotechnology. Cette dernière a pour vocation de découvrir de nouvelles thérapies anticancéreuses efficaces. Deux lignées cancéreuses coliques humaines (HT-29 et HCT 116) ont été utilisées pour ces tests.

1.1.1 Test au MTT

Pour évaluer les effets cytotoxiques des saponines isolées, nous avons utilisé la technique au MTT qui permet de mesurer la viabilité cellulaire (Carmichael et al., 1987).

L'essai colorimétrique au MTT est une opération relativement simple. Le MTT ou 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide est un colorant jaune de type tétrazolium qui est réduit par les enzymes mitochondriales (la succinate déshydrogénase notamment) en cristaux de formazan coloré en bleu. Seules les cellules dont les mitochondries sont viables vont donner cette réaction ; en conséquence, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle au degré d'intégrité des mitochondries. Il s'agit d'un test utile pour détecter des composés cytotoxiques en général ainsi que les agents ayant les mitochondries pour cible spécifique (Stellman, 2000).

1.1.2 Protocole

Le protocole du test au MTT est le suivant (Carmichael et al., 1987) :

- Les deux lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été incubées dans des plaques de 96 puits avant le traitement avec la substance dont on souhaite mesurer l'effet sur la croissance cellulaire. En général, les cellules doivent êtreensemencées à des densités comprises entre 5000 et 10000 cellules par puits, car ils pourront atteindre des densités de population optimales dans les 48 à 72 heures.
- Les saponines à tester sont ensuite distribuées dans les puits selon des dilutions croissantes et laissées au contact des cellules. Deux expériences ont été réalisées pour chaque dilution. Chacune de ces dernières a été testée sur 4 puits distincts (en quadruplicat). Le volume final du milieu de culture devrait être de 0,1mL, ainsi il peut contenir jusqu'à 10% de sérum de veau foetal (SVF).
- 10 μ L de MTT sont ajoutés dans chaque puits et mélanger en tapotant doucement sur le côté du plateau ou agiter brièvement sur un agitateur orbital.
- L'ensemble est incubé à 37°C pendant 4 heures. Pour de fortes densités cellulaires (> 100.000 cellules par puits), le temps d'incubation peut être réduit à 2 heures.
- 200 μ L de DMSO est ajouté dans chaque puits pour dissoudre le formazan (précipité) par aspiration et refoulement à plusieurs reprises.
- Les densités optiques (DO) sont ensuite mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde d'essai de 570 nm et une longueur d'onde de référence de 630 nm. Le nombre de cellules viables est proportionnel à l'ampleur de la production de formazan.

Pour obtenir l'inhibition de croissance imputable aux molécules testées, les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non traitées selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = [1 - (\text{DO}_{570-630} \text{ cellules traitées} / \text{DO}_{570-630} \text{ cellules contrôles})] \times 100$$

On obtient de cette façon une valeur d'IC₅₀ pour chaque expérience. L'activité cytotoxique de chaque saponine est représentée par cette valeur qui est la concentration à laquelle 50% de la croissance cellulaire est inhibée. Les valeurs d'IC₅₀ contenues dans les tableaux 3.2, 3.3 et 3.4 sont les moyennes des 2 valeurs d'IC₅₀ issues des 2 expériences réalisées. Il faut noter que le coefficient de variation est compris entre 5 et 10%.

TRAVAUX BIOLOGIQUES ANTÉRIEURS

2.1 Généralités

De nombreuses revues scientifiques ont résumé différents aspects liés aux saponines, la biosynthèse (Haralampidis et al., 2002, Kalinowska et al., 2005), la distribution (Henry, 2005, Vincken et al., 2007), les structures (Sahu et al., 2008, Vincken et al., 2007), les activités biologiques et pharmacologiques (Sparg et al., 2004, Sun et al., 2009a, Wang et al., 2007c, Yang et al., 2006), les méthodes employées pour leur analyse (Oleszek and Bialy, 2006, Sahu et al., 2008) et la synthèse chimique de saponines (Gauthier et al., 2009b, Yu and Sun, 2009, Yu et al., 2007).

La cytotoxicité et la chimio-prévention par les saponines triterpéniques ont spécifiquement été traitées dans un certain nombre de revues (Bachran et al., 2008, Fuchs et al., 2009, Kerwin, 2004, Kim, 2008, Konoshima, 1996, Lacaille-Dubois, 2005, Rao and Sung, 1995, Shibata, 2001). Les saponines stéroïdiques ont également été abordées dans plusieurs revues, c'est le cas de l'activité biologique de la diosgénine qui contribue à la chimioprévention et au contrôle du cancer (Raju and Mehta, 2009). La cytotoxicité de la dioscine a largement été traitée dans une revue sur les saponines stéroïdiques bioactives du genre *Dioscorea* (Sautour et al., 2007).

2.1.1 Saponines triterpéniques bioactives : exemple des Caryophyllaceae et Polygalaceae

2.1.1.1 Activités cytotoxique et immunomodulatrice

Les saponines, de façon générale, ont montré une aptitude à contrôler des cellules malignes, à en inhiber la croissance ou à en déclencher l'apoptose grâce à des mécanismes divers et complexes. Les études en sont principalement au stade *in vitro*, et il est sûr que ces molécules sont porteuses d'espoir et le sujet mérite d'être approfondi par des études complémentaires. Les exemples suivants illustrent bien ce rôle important des saponines.

Des saponines triterpéniques isolées de *Acanthophyllum squarrosum* ont montré un rôle immunomodulateur *in vitro* (Lacaille-Dubois et al., 1993) et lymphoprolifératif sur cellules leucémiques humaines (Gaidi et al., 2000b). On peut également citer les saponines isolées de *Silene jensseensis* et de *S. fortunei* qui augmentent de façon significative la phagocytose des granulocytes *in vitro* (Lacaille-Dubois et al., 1997, 1999a). D'autres saponines isolées de *Silene fortunei* induisent la prolifération de cellules tumorales de Jurkat à faible concentration et une inhibition donc induction d'apoptose à forte concentration (Gaidi et al., 2002b).

Les securidioses A et B isolés de *Securidaca inappendiculata* ont montré une activité cytotoxique et avec induction d'apoptose sur des macrophages stimulés au préalable par un facteur de croissance (M-CSF/CSF-1). La présence de diméthylcinnamoyle dans la structure de ces saponines ainsi que le facteur de croissance sont indispensables pour cette activité. Ces chercheurs considèrent ces composés comme un espoir à la découverte de nouveaux médicaments pour le traitement des maladies inflammatoires (Kuroda et al., 2001, Yui et al., 2003, 2001).

L'activité cytotoxique contre la lignée cellulaire HT-29 du cancer du côlon par deux saponines isolées de *Muraltia heisteria* a été démontré. Cependant ces molécules ne présente aucun effet de potencialisation du cisplatine (Elbandy et al., 2002a)

Les jensseensosides A, B et jensseensosides C, D isolés respectivement de *Silène jensseensis* et *S. fortunei*, ont montré une activité potentialisatrice de la cytotoxicité du cisplatine. Ces saponines à acide quillaïque contiennent de l'acide (Z /E) *p*-méthoxycinnamoyle lié en position 4 du fucose (Gaidi et al., 2002b). Cet effet a également été observé chez les agrostemmasaponines isolées de *Agrostemma githago* qui amplifient la cytotoxicité de l'agrostine (protéine toxique). L'effet serait dû à l'amélioration de la pénétration membranaire de cette protéine par les saponines (Hebestreit and Melzig, 2003). D'autres travaux sur les saponines de *Agrostemma githago* montrent que leur combinaison avec les toxines chimères pourraient constituer une alternative pour cibler efficacement les cellules tumorales (Melzig et al., 2005).

Saponinum album, mélange de saponines isolé de *Gypsophila paniculata* renforçait par un facteur de 1000 la cytotoxicité d'une toxine chimère (constitué d'une saporine et du facteur de

croissance épidermique humain) contre des cellules embryonnaires de souris (NIH-3T3 et HER 14) et de 20000 la cytotoxicité d'une la toxine chimère (SA2E) contre la lignée d'adénocarcinome mammaire (TSA) à faible concentration (Bachran et al., 2009, 2006). Ce même rôle de renforcement de la cytotoxicité a été observés par plusieurs autres travaux (Hebestreit et al., 2006, Weng et al., 2009a,b,c, 2008a,b).

Des saponines extraites de la racine de *Polygala senega* L., ont été évaluées pour leur activité immunologique comme adjuvants des vaccins chez des modèles de souris. Les saponines de *P. senega*, isolées et utilisées en tant qu'adjuvants vaccaniques, ont produit une augmentation préférentielle du niveau des anticorps spécifiques de la sous-classe d'IgG_{2a} après l'immunisation avec l'antigène de l'albumine d'oeuf (Estrada et al., 2000, Katselis et al., 2007). Il en est de même pour les Onjisaponines isolées de *Polygala tenuifolia* Willdenow qui ont montré un pouvoir immunoadjuvant par inoculation intranasale avec le vaccin contre la grippe et des vaccins contre la diphtérie, la coqueluche et le tétanos (Nagai et al., 2001). Tout ceci corrobore les travaux de Soltysik (Soltysik et al., 1995), qui a noté l'important rôle immunoadjuvant des saponines.

2.1.1.2 Autres activités

2.1.1.2.1 Activité hémolytique

Les saponines ont le pouvoir de rompre la membrane érythrocytaire. La propriété hémolytique est généralement justifiée par l'interaction entre les saponines et les stérols de la membrane érythrocytaire. Ce qui conduit à l'éclatement de la membrane provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité suivi de la perte de l'hémoglobine.

Les travaux de Tabassi et al 2007 montrent que les saponines isolés de *Acanthophyllum squarrosom* (Caryophyllaceae) provoquent la diminution de la tension superficielle de l'eau d'environ 50 dynes/cm et induit l'hémolyse complète des globules rouges humains à une concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabassi et al., 2006).

Katselis et collaborateurs montrent que la saponines PS 4 isolée de *Polygala senega* (Polygalaceae) présente une forte activité hémolytique (32 HU /mg) (HU = unité hémolytique). Ils ont également montré qu'il n'existait pas de corrélation entre l'activité hémolytique et immunoadjuvante (Katselis et al., 2007).

2.1.1.2.2 Effet hypolipémiant et le transport intestinal

Les effets des saponines de *Gypsophila* sur la disponibilité du fer et du zinc ainsi que la

concentration plasmatique du cholestérol ont été constaté(Gee et al., 1989, Southon et al., 1988a,b). Si ces auteurs suggèrent que la consommation de saponines devrait être encouragée en raison de leur capacité à diminuer le cholestérol sanguin, ils indiquent que les effets possibles sur le métabolisme du fer doivent être approfondis.

Une étude a montré que la reinioside C, saponine isolée de *Polygala aureocauda* réduit le profil lipidique du sérum et des cellules du foie chez des souris hyperlipidémiques. L'oxydation des LDL est une étape déterminante pour la poursuite du processus d'athérogenèse (Wu et al., 1998). Le reinioside C bloque non seulement l'influx de l'ion Ca^{2+} , ce qui est similaire à l'action du vérapamil mais aussi la libération du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique induite par la LDLox. Ces résultats démontrent que le Reinioside C a un effet hypolipémiant (Li et al., 2008a).

2.1.1.2.3 Effet sur la membrane

Des saponines de *Gypsophila* facilitent la libération intracellulaire de l'ion potassium K^+ ainsi que la lactase déshydrogénase, ce qui montre leur rôle dans la déstabilisation de la membrane plasmique (Wassler et al., 1987, 1990).

2.1.1.2.4 Effet sur la contraction utérine

L'induction de la contraction utérine du rat par la vaccaroid A (vaccaroside A), saponine isolée de *Vaccaria segetalis* a été prouvé (Morita et al., 1997).

2.1.1.2.5 Activités anti-inflammatoire

Les barbatosides A et B isolés de la partie aérienne de *Dianthus barbatus* présentent les activités analgésique et anti-inflamatoire (Cordell et al., 1977). L'activité anti-inflammatoire a également été prouvé par d'autres travaux sur des saponines isolées de *Polygala japonica* (Wang et al., 2008a, 2006, 2007a).

2.1.1.2.6 Activités anti-diabétique et anti-obésité

Les saponines isolées de *Gypsophila oldhamiana* ont montré une forte activité inhibitrice ($IC_{50} = 15 \mu M$) sur l' α -glucosidase et sur la glycogène phosphorylase (Luo et al., 2008a,b). Trois saponines également isolées de la même plante réduisent l'activité de la lipase pancréatique de 50 à 99 % à 1 mg/ml (Zheng et al., 2007) et cette inhibition réduit l'absorption des graisses alimentaires.

Deux glycosides triterpéniques (senegins II et III) isolés à partir des rhizomes de *polygala senega* var. *latifolia*, ont été testés pour leur activité hypoglycémiant chez des modèles de souris obèses et diabétiques (diabète non insulino-dépendant). Ces composés réduisent considérablement la glycémie des souris 4 h après administration par voie intrapéritonéale (Kako et al., 1996, 1997). Ces résultats indiquent que ces saponines pourraient être de bons candidats à la lutte contre le diabète et l'obésité.

2.1.1.2.7 Activités anxiolytique et sédative/hypnotique

Les Polygalasaponines isolées de *Polygala tenuifolia* Willdenow ont montré des activités anxiolytique et sédative/hypnotique évidentes chez les souris. Ce résultat explique l'utilisation des racines de cette plante comme un anxiolytique et sédatif-hypnotique dans la médecine traditionnelle (Yao et al., 2010).

2.1.1.2.8 Activité anti-diarrhéique et anti-ulcérogène

L'action anti-diarrhéique et anti-ulcérogène de l'extrait méthanolique des feuilles de *Carpobrotia lutea* impliquerait les saponines, les tannins et les flavonoïdes. Le mécanisme non encore élucidé se ferait par inhibition des récepteurs du système cholinergique et α_2 -adrénergique (Nwafor and Bassey, 2007).

2.1.1.2.9 Activité antipsychotique

L'inhibition partielle de l'hyperactivité induite par la cocaïne chez le rat *in vivo* par des saponines isolées de *Polygala tenuifolia* a été montrée (Chung et al., 2002). Ceci montre que la Polygalasaponine pourrait bloquer la fixation des dopamines et sérotonines à leurs récepteurs au niveau du système nerveux central. Ceci pourrait suggérer leur rôle d'agent antipsychotique.

2.1.1.2.10 Effet sur la maladie d'Alzheimer

L'impact des Onjisaponines A-B, E-G sur la maladie d'Alzheimer est pressenti par certains travaux. Ces saponines isolées de *Polygala tenuifolia* Wild ont une activité remarquable sur le système nerveux central. Ils intensifient la sécrétion du facteur de croissance nerveuse (NGF) chez le rat et l'induction de l'expression de l'acétylcholine transférase qui est une enzyme dont le rôle est de transformer la choline et l'acétylcholine A en acétylcholine (Yabe et al., 2003).

2.1.2 Saponines stéroïdiques bioactives : exemple du genre *Allium*

Les espèces de *Allium* telles que l'ail (*Allium sativum* L.), l'oignon (*A. cepa* L.), le poireau (*A. porrum* L.), et l'échalote (*A. ascalonicum* Hort.) sont des légumes connus, cultivés et consommés partout à travers le monde. Ces plantes sont aussi connues pour leur richesse en saponines stéroïdiques, ainsi que des composés organo-soufrés (Hostettmann and Marston, 1995, Kravets et al., 1990, Mahato et al., 1982). Elles sont utiles pour le traitement ou la prévention d'un certain nombre de maladies comme le cancer, les maladies coronariennes, l'obésité, l'hypercholestérolémie, le diabète de type 2, l'hypertension, la cataracte et des troubles du tractus gastro-intestinal (douleurs coliques, les coliques venteuses et la dyspepsie) (on Diet Nutrition and Prevention, 1996, Organization, 1990, Willett, 1999). Ces saponines stéroïdiques sont responsables de plusieurs autres propriétés biologiques et pharmacologiques très intéressantes comme les activités antifongiques, antibactériennes, anti-inflammatoires et hypocholestérolémiques (Lacaille-Dubois et Wagner 1996).

2.1.2.1 Activités cytotoxique et immunomodulatrice

Les yayoïdines A-C et aginoside isolées de *Allium ampeloprasum* L. nommé Yayoi N°1, ont montré une activité cytotoxique modérée sur modèle de leucémie murine (P388) avec $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g/mL}$ (Sata et al., 1998). Les propriétés cytostatiques de saponines isolées de *Allium karataviense* L sur lignées cellulaires de la leucémie promyélocytaire humaine HL-60 ont été rapportées avec un IC_{50} de $2,4 \mu\text{g/mL}$ (Mimaki et al., 1999b). Sur cette même lignée cellulaire le Tuberoside M isolé de *Allium tuberosum* Rottl. donne une valeur de $IC_{50} = 6,8 \mu\text{g/mL}$ (Sang et al., 2002). C'est également le cas d'une saponine isolée de *Allium jesdianum* qui montre un effet cytotoxique considérable avec $IC_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$ sur cellules de leucémie promyélocytaire humaine HL-60 (Mimaki et al., 1999a). Trois saponines isolées de *Allium porum* ont donné des valeurs de cytotoxicité appréciables ($1,9-5,8 \mu\text{g/mL}$) sur deux lignées cellulaires différentes J-774 (macrophages murins) et WEHI-164 (fibrosarcome murin) (Fattorusso et al., 2000). Le mélange de saponines (1a et 1b) isolées de *Allium ursinum* L. a montré une activité cytotoxique à $2 \mu\text{g/mL}$ sur deux lignées cellulaires cancéreuses différentes à savoir la lignée B16 du mélanome et la lignée cellulaire de sarcome XC (Sobolewska et al., 2006). Les macrostemonosides O, P, Q et R isolés de *Allium macrostemon* Bunge, ont été testés pour leur activité cytotoxique sur

plusieurs lignées cellulaires cancéreuses y compris les celle des tumeurs solides comme HepG2, MCF-7, NCI-H460, SF-268 et R-HepG2. Les IC_{50} de 8.71, 8.15 et 11.74 μM obtenues pour la lignée SF-268 montrent bien leur potentiel pour le traitement de certains cancers (Chen et al., 2007). Dans une autre étude réalisée sur deux autres saponines isolées de la même plante, Chen et collaborateurs expliquent que les doubles liaisons $C_{25}-C_{27}$ pour la molécule 1, $C_{20}-C_{22}$ pour la molécule 2 ainsi que les hydroxyles C-12 contribuent à la cytotoxicité sélective sur les lignées SF-268 and NCI-H460 respectivement (Chen et al., 2009). Des saponines isolées de *Allium leucanthum* ont permis d'obtenir des valeurs de IC_{50} variant de 3.7 à 5.8 μM et de 5.6 à 8.2 μM sur les lignées cellulaires de cancer du poumon (A549) et du colon (DLD-1) respectivement (Mskhiladze et al., 2008). Les saponines 5a/5b (aginoside/turoside A) et 6a/6b isolées de *Allium nigrum* ont présenté d'intéressantes activités cytotoxiques envers deux lignées cellulaires du cancer du colon humain (HT-29 et HCT 116). Le mélange 5a/5b présente la plus forte cytotoxicité avec des valeurs de IC_{50} de 1,09 et 1,59 μM contre les HT-29 et HCT respectivement. Tandis que le mélange 6a/6b donne les valeurs 3,45 et 2,82 μM contre les HT-29 et HCT 116 respectivement (Jabrane et al., 2011).

2.1.2.2 Autres activités

2.1.2.2.1 Inhibition de l'AMPc Phosphodiesterase et Na^+/K^+ ATPase

Des saponines isolées de *Allium chinense* présentent le double effet d'inhiber l'AMPc Phosphodiesterase et Na^+/K^+ ATPase (Kuroda et al., 1995). En effet les potentialités antidépressives des inhibiteurs de phosphodiesterase (PDE) de l'AMP cyclique ont depuis, suscité l'intérêt de nombreux chercheurs et motivé de multiples études. L'inhibition du Na^+/K^+ ATPase a un effet inotrope positif comme le font certains glycosides cardiotoniques (ouabaine, digoxine) : cela augmente la force de contraction du myocarde en insuffisance cardiaque mais aussi du cœur normal.

2.1.2.2.2 Effet sur le métabolisme des phospholipides

Le métabolisme des phospholipides est une étape très importante pour la promotion de la transformation des cellules (Semba and Inui, 1990). la promotion consiste en une multiplication des cellules initiées jusqu'à l'apparition d'une cellule cancéreuse, cellule mère de la tumeur. Le promoteur le plus étudié a été l'huile de croton, et notamment un de ces composants le 12-O-tétra-décanoyl-phorbol 13 acétate (ou TPA) qui stimule la prolifération cellulaire par

l'activation rapide de la protéine kinase C (PKC), suivie de la dégradation progressive de la kinase (Kolb and Davis, 2004). Des saponines isolées de *Allium macleanii* ont une action inhibitrice sur le TPA impliqué dans le métabolisme des phospholipides dans les cellules de Hela. Ces composés peuvent donc constituer une bonne piste dans la recherche d'agents antitumoraux (Inoue et al., 1995).

2.1.2.2.3 Activité antifongique

L'antibiogramme ou test de diffusion de disque en gélose a prouvé les propriétés antifongiques des Yayoisonines A-C et aginoside isolés de *Allium ampeloprasum* L à la concentration de 10 µg/disque sur des souches de *Mortierella ramanniana* (Sata et al., 1998). Quatre saponines isolées de *Allium porrum* L. ont été testé pour leur activité antifongique sur le champignon *Fusarium culmorum*. Les doses efficaces (DE₅₀) entraînant 50% de l'effet maximum se situent entre 30-35 µg/mL (Carotenuto et al., 1999). Les minutosides A, B et C de *Allium minutiflorum* ont donné des activités antifongiques intéressantes sur des agents pathogènes du sol (*Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani*, *P. ultimum* et *Rhizoctonia solani*) et des pathogènes véhiculés par l'air (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* et *A. porri*) (Barile et al., 2007).

2.1.2.2.4 Activité antispasmodique

Deux saponines isolées des bulbes d'oignon rouge, *Allium cepa* L. Var. Tropea (tropeoside A et B) ont montré une activité antispasmodique sur l'iléon du cochon. un tel effet pourrait expliquer l'usage traditionnel de l'oignon dans le traitement des troubles du tractus gastro-intestinal (Corea et al., 2005). Une étude similaire menée par Barile et collaborateurs a permis d'établir une relation structure- activité entre les saponines isolées de *Allium hirtifolium* et *Allium elburzense* et leur activité antispasmodique (Barile et al., 2005).

2.1.2.2.5 Les anti-agrégants plaquettaires

Les anti-agrégants plaquettaires sont des outils majeurs de la prise en charge des syndromes coronariens aigus. Des tests pharmacologiques préliminaires ont montré que le macrostemonoside G isolé de *Allium macrostemon* inhibe *in vitro* à IC₅₀ = 0,871mM l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (Peng et al., 1995).

2.1.2.2.6 Effet Hypocholestérolémiant

Des extraits d'ail ayant des saponines comme composés majoritaires ont été testés pour leur effet hypocholestérolémiant. Les auteurs suggèrent que les saponines de type spirostane seraient responsables de la baisse du niveau de cholestérol plasmatique (Matsuura, 2001).

TAB. 2.1 – Saponines stéroïdiques actives du genre *Allium* (Lanzotti, 2005)

Espèces	Furostane	Spirostane	Cholestane	Activités	Références
<i>A. ampeloprasum</i>	X	X		AF	(Morita et al., 1988)
		X		AF, C	(Sata et al., 1998)
	X	X		C	(Morita et al., 1988)
<i>A. cepa</i>	X			AS	
<i>A. chinense</i>		X		cAMP PI	(Kuroda et al., 1995)
<i>A. jesdianum</i>		X	X	C	(Mimaki et al., 1999a)
<i>A. karataviense</i>	X	X		C	(Mimaki et al., 1999b)
<i>A. macleanii</i>		X	X	AT	(Inoue et al., 1995)
<i>A. macrostemon</i>	X	X		AP	
<i>A. nutans</i>				AT	
		X		AF	(Carotenuto et al., 1999)
	X	X		C	(Fattorusso et al., 2000)
<i>A. sativum</i>		X		CS, AP	(Peng and Yao, 1996)
	X	X		HC	(Matsuura, 2001)
<i>A. senescens</i>		X		AT	(Inoue et al., 1995)
<i>A. tuberosum</i>	X	X	X	AT	

AF = antifongique, C = cytotoxique, AS = antispasmodique, cAMP PI = inhibition d'AMPc Phosphodiesterase, AT = antitumorale, AP = anti-agrégants plaquettaires, CS = coagulation sanguine, HC = Hypocholestérolémiant

2.2 Relation structure-cytotoxicité des saponines

2.2.1 Généralité

Plusieurs études montrent que les activités biologiques des saponines sont fortement influencées aussi bien par l'aglycone que par les chaînes de sucres. La plupart des données sur la relation structure-activité proviennent des études sur l'activité hémolytique des saponines. Certaines caractéristiques structurales tant au niveau des saponines triterpéniques que stéroïdiques semblent être indispensables à leur efficacité hémolytique. Cependant, il est impossible de généraliser le principe de corrélation entre structure et activité.

Dans le cas des triterpéniques par exemple, les acylations sont capitales pour l'activité hémolytique (Chwalek et al., 2004, Melzig et al., 2001), pour les saponines stéroïdiques, plusieurs travaux montrent que les furostanes sont en général inactifs. Dans tous les cas la nature des sucres influence l'activité hémolytique des deux types de saponines. Il faut indiquer que pour les mêmes chaînes de sucres, l'activité hémolytique n'est pas similaire avec des aglycones différents, ce qui montre bien l'importance de l'aglycone.

L'hémolyse est l'une des caractéristiques biologiques principales des saponines. Cette activité serait principalement le résultat de l'interaction entre les saponines et le cholestérol membranaire, ce qui provoquerait la déstabilisation de la membrane (Francis et al., 2002a, Melzig et al., 2001). Ce mécanisme est valable pour l'activité cytotoxique, qui quant à elle se ferait par plusieurs modes d'action, à savoir l'apoptose et la mort cellulaire non apoptotique.

Des études sur des saponines stéroïdiques montrent qu'il n'y a pas toujours une corrélation entre activité hémolytique et cytotoxique à cause des mécanismes d'action différents (Wang et al., 2007c). On observe tout de même que des saponines à forte activité hémolytique sont fortement cytotoxiques, et celles à activité toxique modérée sont moyennement hémolytiques. En même temps, plusieurs glycosides avec des activités cytotoxiques identiques ou similaires ont des activités hémolytiques différentes, et vis versa. En somme la relation entre activité hémolytique et cytotoxique n'est pas clairement établie, il n'est donc pas possible de faire une extrapolation entre ces deux activités.

De nombreux travaux ont été menés sur l'activité cytotoxique des saponines. Il est remarquable de voir que la plupart des travaux sont largement dédiés à la détermination structurale, suivie des résultats de cytotoxicité sur des lignées cellulaires. Néanmoins quelques données sont disponibles sur les relations structure-activité cytotoxiques.

2.2.1.1 Cas des triterpénoïdes

Une étude récente sur la relation structure-activité cytotoxique des saponines triterpéniques a été menée par Gauthier et al. Ces auteurs ont utilisé un panel de 35 composés dont 31 semi-synthétiques repartis en 5 groupes, les triterpénoïdes (l'acide bétulinique (**1**), la bétuline (**2**), hédéragénine (**3**), l'acide oléanolique (**4**)) les lupanes monodesmosides (**5**, **6**, **8-16**), les lupanes bidesmosides (**17-22**), les saponines type oléanane (**7**, **23-27**) et enfin les saponines type lupane contenant α -L-arabinopyranose (**28-35**).

Ces composés ont été testés pour leur cytotoxicité sur trois lignées cellulaires humaines à savoir le carcinome du poumon (**A549**), adénocarcinome colorectal (**DLD-1**) et les fibroblastes de peau normale (**WS1**). Les résultats montrent que les saponines de type lupane ne présentait pas d'activité hémolytique ni de perméabilisation cellulaire jusqu'à la concentration de 100 μM quelle que soit la nature du sucre attaché. Alors que les saponines de type oléanane comme la β -hédérine et hederacolchiside A1 provoque la mort des cellules par perméabilisation de la membrane cellulaire, les saponines de type lupane procéderaient par un autre mécanisme qui pourrait être l'induction de l'apoptose. Enfin, les résultats indiquent que les saponines de type lupane portant le groupement α -L-rhamnopyranose en position C-3 représentent des agents antitumoraux prometteurs, car dépourvues de toxicité liée à l'hémolyse (Gauthier et al., 2009a). D'autres travaux traitent des relations entre les structures des saponines de type ursane et oléanane et leurs activités antidiabétique ; anti-inflammatoire ; antimicrobienne ; antitumorale ; antivirale ; gastroprotectrice, hépatoprotectrice (Sun et al., 2006). Ces auteurs ont relevé l'importance capitale de la fonction hydroxyle, des groupements cinnamoyles, coumaroyloxy, l'acide bétulinique et les osamines dans l'activité anticancéreuse. Ceci corrobore les conclusions des travaux de Gaidi et al, selon lesquelles les jénisseensosides A, B, C, et D comportant les groupements acides (*Z/E*)-*p*-méthoxycinnamoyle augmentent l'accumulation et la cytotoxicité d'un agent anticancéreux, le cisplatine. En revanche en absence de ce groupement les saponines n'ont pas d'effet significatif (Gaidi et al., 2002b)

2.2.1.1.1 Cas des saponines stéroïdiques

Un excellent travail réalisé par Wang et al présente la relation entre la structure et l'activité cytotoxique d'un panel de 63 saponines stéroïdiques synthétiques. Les résultats de ces travaux montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité hémolytique et cytotoxique des saponines stéroïdiques et qu'elles se déroulent à travers des mécanismes différents. Ces auteurs encouragent le développement de saponines stéroïdiques comme agents antitumoraux car étant globalement dépourvus des effets néfastes de l'hémolyse (Wang et al., 2007c). Il en est de même pour les travaux de Mimaki et al en 2001. Ces derniers auteurs ont examiné l'activité cytotoxique des saponines isolées essentiellement de plantes de la famille des Liliaceae sur la lignée cellulaire de la leucémie promyélocytaire humaine (HL-60) (Mimaki et al., 2001).

Le tableau 2.2 suivant résume quelques données sur la relation structure-activité cytotoxique.

TAB. 2.2 – Relations structure-activité cytotoxique des saponines (Podolak et al., 2010)

Caractéristique structurale	Amélioration de l'activité	Références
Aglycone triterpénique	Oleanane > lupane	(Bang et al., 2005)
	Oleanane>hopane	(Hamed et al., 2005)
	Lupane>germanicane	(Thibeault et al., 2007)
	Acide oléanolique>hédéragénine in vitro	(Bang et al., 2005, Gauthier et al., 2009a)
	hédéragénine>Acide oléanolique in vivo	(Bang et al., 2005)
	Betulinic acid>betulin	(Thibeault et al., 2007)
Aglycone type Oléanane	Carboxyle C-28 libre	(Bang et al., 2005, Chwalek et al., 2006)
	C-21 et C-22 acylées	(Yu et al., 2009, Zhang and Li, 2007)
Aglycone type Oléanane acylé en C-21, C-22	Me C-24 > OMe C-24	(Chan et al., 2008)
	Hydroxyle C-16 libre	(Yu et al., 2009)
Aglycone type 13,28-epoxyoléanane	CHO/Me en C-30>COOH/OMe en C-30	(Tian et al., 2009)
	Hydroxyle C-16 libre	(Chang et al., 2007)
Acide acacique	Oligosaccharide en C-28	(Cao et al., 2007)
	Hydroxyle C-16 libre	(Cao et al., 2007)
	Monoterpene quinovopyranosyl en C-21	(Cao et al., 2007, Noté et al., 2009)
Saponines type oléanane, ursane et lupane	Monodesmosides > bidesmosides	(Bang et al., 2005, Calabria et al., 2008, Gauthier et al., 2009a)
Saponines à acide acacique	Bidesmosides>monodesmosides	(Cao et al., 2007, Zou et al., 2006)
Saponines type oléanane	α -L-Arap en C-3	(Chang et al., 2007, Jung et al., 2004)
	α -L-Rhap(1→2)- α -L-Arap en C-3	(Bang et al., 2005, Chwalek et al., 2006, Gauthier et al., 2009a)
	trisaccharide en C-3>disaccharide en C-3	(Bang et al., 2005)
Saponines type lupane	α -L-Rhap en C-3	(Gauthier et al., 2009a)
Saponines à bétuline	α -D-Manp en C-3	(Thibeault et al., 2007)
	Monomannosides>bimannosides	(Cmoch et al., 2008)
Saponines à diosgényle	α -L-Rhap-(1→2)- β -D-Glcp en C-3	(Mimaki et al., 2001)
	Allongement de la chaîne de sucre	(Yan et al., 2009)
Saponines à diosgénine et pennogénine	Rhap terminal lié au C-2 du Glcp interne	(Zhao et al., 2009)

2.3 Mécanisme d'action des saponines

Les saponines sont des agents anticancéreux potentiels, elles agissent par différents mécanismes d'action. Leurs effets cytotoxiques peuvent se faire soit à travers un processus de mort cellulaire physiologique appelé apoptose ou par un processus de mort non apoptotique. Il existe

également plusieurs autres processus, bien connus qui conduisent aussi au même effet de mort cellulaire. Ces derniers processus impliquent divers mécanismes d'action, comme l'autophagie, diminution de la production du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules, le désassemblage du cytosquelette etc. Les mécanismes d'action cytotoxique les plus importants sont résumés dans le tableau suivant :

TAB. 2.3 – Mécanismes d'action cytotoxique des saponines (Podolak et al., 2010)

Voie intrinsèque de l'apoptose	
Mécanismes d'action	Références
Libération du cytochrome <i>c</i> Dépolymérisation de la membrane mitochondriale Augmentation de l'expression du facteur de transcription GADD153/CHOP Activation des caspases 3 et 9 Clivage du PARP-1 Activation de la cascade MAPK Diminution du p-STAT-3 Régulation négative de l'expression du Bcl-2, c-myc et de la survivine Régulation négative de l'expression du VEGF Stimulation du p-53 inhibition du NF- κ B Dépolymérisation du JAKs Activation de la protéine phosphatase-1 Perturbation de l'homéostasie du Ca ²⁺ intracellulaire	(Haridas et al., 2009, Hernández et al., 2004, Jin et al., 2009, Li et al., 2008b, Liu et al., 2005a, Sun et al., 2009b, Wang et al., 2008b, Xu et al., 2009, Zhang et al., 2008)
Voie extrinsèque de l'apoptose	
Amélioration de la fixation de la molécule Fas avec son ligand (Fas ligand)	(Hsu et al., 2004)
Arrêt du cycle cellulaire	
Régulation négative du CDK6 et de la cycline D1, D3 Régulation positive du p27 ^{kip} Inhibition du CDK2	(Ellington et al., 2005, Liu et al., 2005a, Raju and Mehta, 2009, Srinivasan et al., 2009, Sun et al., 2009b)
L'autophagie	
Augmentation de la chaîne 3 des protéines associées aux microtubules MAP (microtubule-associated proteins) Augmentation du nombre de vacuoles autophagiques regulation du AMPK-TSC2 Diminution de l'ATP cellulaire Activation de l'AMPK	(Ellington et al., 2005, Xu et al., 2007)

TAB. 2.4 – Mécanismes d'action cytotoxique des saponines (suite)

Inhibition de l'angiogénèse	
Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales Activation de l'AMPK	(Tian et al., 2005, Wang et al., 2008b)
désintégration du cytosquelette	
Démontage des microtubules Inhibition de la polymérisation de tubulines interruption des filaments d'actine Diminution de l'ATP intracellulaire Changements morphologiques des noyaux	(Einbond et al., 2008, Galanty et al., 2008, Gnoula et al., 2008, Li et al., 2008b, Ma et al., 2008b)
Inhibition des métastases	
Inhibition de la motilité et migration cellulaire Inhibition de l'adhérence cellulaire Régulation négative des MMP-2 et MMP-9 Régulation positive du TIMP-2	(Galanty et al., 2008, Man et al., 2009, Tian et al., 2005)
Inhibition de l'angiogénèse	
Augmentation de l'expression de thrombospondine-1 Diminution de l'expression des protéines kinases C Activation des ERK (Extracellular signal-regulated kinases) Activation du p38 MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinases)	(Tian et al., 2005, Wang et al., 2008b)

2.4 Cytotoxicité du complexe saponine-toxine

L'application combinée des saponines avec d'autres composés antitumoraux peut augmenter l'activité cytotoxique de ces derniers. Ceci ouvre la voie vers la recherche de nouveaux traitements contre le cancer. Une des premières expériences a été fait par Hebestreit (Hebestreit et Melzig 2003) sur les saponines de *Agrostemma githago*.

Les agrostemmasaponines ont considérablement augmenté la cytotoxicité de l'agrostine qui est une protéine toxique. Cet effet serait dû à l'amélioration de la pénétration de l'agrostine à travers la membrane cellulaire, lorsqu'elle est appliquée en présence des agrostemmasaponines. Certains travaux menés ces dernières années, ont permis d'exploiter davantage cette option prometteuse dans le traitement des tumeurs.

Bachran et al ont analysé l'influence de 7 saponines sur le renforcement de la cytotoxicité d'une toxine chimérique composée de saporine et du facteur de croissance épidermique humain.

Le test a porté sur des cellules embryonnaires de souris (NIH-3T3 et HER14 transfectées avec des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain). Deux quillajasaponines ont amélioré la cytotoxicité de la toxine chimérique de 1000 fois. Cette constatation est conforme aux observations de Melzig et al (2005) qui ont étudié l'amélioration de l'agrostine par un certain nombre de saponines différents. Les auteurs ont aussi relevé l'importance du groupement formyle en C-4 (Bachran et al., 2006). L'importance de ce groupement formyle a également été rapportée par Soltysik et al. (1995), qui a suggéré qu'il pourrait être nécessaire pour la fonction adjuvante de saponines. Cependant, ces conclusions doivent être confirmées par plusieurs autres études de relation structure-activité cytotoxique.

En 2009, les mêmes auteurs décrivent l'effet combiné de saponinum album avec la toxine chimère (SA2E) contre des cellules d'adénocarcinome mammaire murin (TSA), transfectées avec l'EGFR (récepteur épidermique de facteur de croissance épidermique). Ces auteurs ont pu observer une amélioration de l'ordre de 20 000 fois la cytotoxicité des SA2E avec des concentrations faibles de l'album saponinum (Bachran et al., 2009).

TRAVAUX BIOLOGIQUES PERSONNELS

Ce chapitre présente les résultats des tests cytotoxiques de quelques molécules que nous avons isolées. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'entreprise Oncodesign de Dijon. Ils ont porté sur deux lignées cellulaires cancéreuses coliques à savoir les lignées HT-29 et HCT 116. Avant de présenter nos résultats et leurs interprétations, un rappel sur le cancer du côlon, son importance épidémiologique s'impose.

3.1 Le Cancer du Côlon

3.1.1 Rappel sur l'anatomie du gros intestin

Le gros intestin commence au niveau de la valvule iléo-caecale , il fait donc suite à l'intestin grêle, et forme un cadre autour de lui (figure). La longueur du gros intestin varie de 1,5 m à 1,8 m. Son diamètre varie de 3cm à 8 cm (Sy Nguyen, 2008).

3.1.1.1 Les éléments constitutifs (Sy Nguyen, 2008)

Le gros intestin est formé de plusieurs portions qui, de son origine à sa terminaison, sont les suivants :

- **Le caecum** : ce cul-de-sac arrondi est la partie initiale la plus large du gros intestin (son diamètre atteint 9 cm). Il est situé dans la fosse iliaque droite.
- **Le côlon ascendant (colon ascendens)** : Il fait suite au caecum et remonte à droite jusqu'en dessous du foie, où il forme l'angle colique droit (ou angle hépatique). Fixé à la paroi postérieure de l'abdomen, il est recouvert en avant par le péritoine.

- **Le côlon transverse (colon transversum)** : Il va de l'angle colique droit à l'angle colique gauche selon un trajet transversal légèrement oblique, en arrière et à gauche. Au niveau du pôle inférieur de la rate. Il se coude selon un angle appelé «angle colique gauche» ou «angle splénique».
- **Le côlon descendant (colon descendens)** : Il commence à l'angle colique gauche. Celui-ci est fixé au diaphragme par le ligament phrénocolique ; il forme une plicature qui peut faire obstacle au passage du contenu intestinal. Le côlon descendant est fixé à la paroi postérieure de l'abdomen. Il est recouvert par les anses de l'intestin grêle.
- **Le côlon sigmoïde (colon sigmoideum)** : Il fait suite au côlon descendant, et se situe dans la fosse iliaque gauche. Il pénètre dans le petit bassin en formant une boucle qui évoque un S, et possède un mésocôlon sigmoïde.
- **Le rectum** : Il appartient lui aussi au petit bassin. Il correspond à la partie terminale du tube digestif. Il prolonge le côlon sigmoïde, débute au niveau de la 3e vertèbre sacrée et se termine à l'anus. Sa longueur est d'environ 15 cm. Il est composé d'une partie supérieure qui fait immédiatement suite au côlon sigmoïde ; cette portion, l'ampoule rectale, est dilatée et contenue dans la cavité pelvienne. La partie sous-jacente, le canal anal, est rétrécie, elle traverse le périnée jusqu'à l'orifice de l'anus. À sa partie supérieure, le rectum est encore recouvert en avant par le péritoine, puis il devient extrapéritonéal.

Le faible rôle que tient le côlon dans la digestion proprement dite, en a fait un organe peu étudié jusqu'à récemment. Toutefois, le développement des études sur le cancer colorectal et les maladies inflammatoires coliques a entraîné une étude plus importante de la physiologie et de la physiopathologie du côlon.

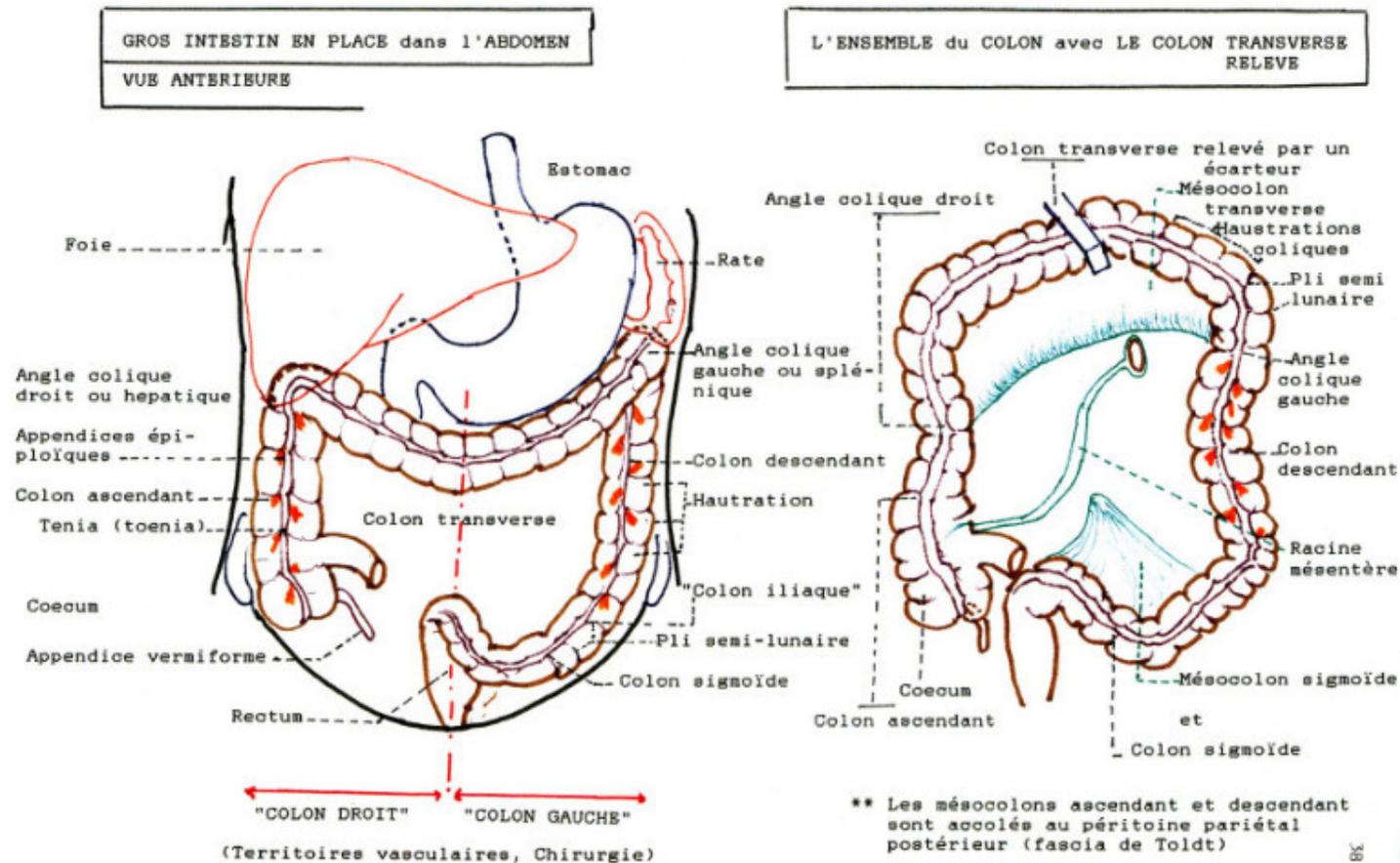


FIGURE 3.1 – Schéma du gros intestin

Source=http://www.univ-brest.fr/S_Commune/Biblio/ANATOMIE/Web_anat/Tube_digestif/Gros_intestin/Transverse_releve.htm

3.1.2 Incidence et mortalité par cancer colorectal

3.1.2.1 Introduction

Le cancer colorectal est un réel problème de santé publique. En France, comme chaque année, les nouvelles données d'incidence et de mortalité sont publiées pour l'année 2011 par les Hospices civils de Lyon, l'INCa (Institut National du Cancer), le réseau des registres du cancer Francim et le CépiDc-inserm (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

3.1.2.2 Projection 2011 de l'incidence

Les chiffres les plus récents indiquent qu'avec environ 40 500 nouveaux cas estimés en 2011 dont 53% survenant chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe, tous sexes confondus, au

troisième rang des cancers les plus fréquents après le cancer de la prostate (71 000 nouveaux cas) et le cancer du sein (53 000) (cf. Tableau 3.1). Chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe au troisième rang des cancers incidents masculins avec 21 500 nouveaux cas estimés en 2011 loin derrière le cancer de la prostate (71 000) et le cancer du poumon (27 500). Il représente 10,4% de l'ensemble des cancers incidents masculins. Chez la femme, il se situe au deuxième rang (19 000 cas) derrière le cancer du sein (53 000). Il représente 12,0% de l'ensemble des cancers incidents féminins (La situation du cancer en France en 2011 (La situation du cancer en France en 2011 : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/7708-la-situation-du-cancer-en-france-en-2011))

3.1.2.3 Projections 2011 de la mortalité

Avec environ 17 500 décès estimés en 2011 (dont 53% chez l'homme), le cancer du côlon-rectum se situe, tous sexes confondus, au deuxième rang des décès par cancer derrière le cancer du poumon (29 100 décès) et devant le cancer du sein (11 500 décès). Il représente ainsi 12% de l'ensemble des décès par cancer (La situation du cancer en France en 2011 : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/7708-la-situation-du-cancer-en-france-en-2011).

TAB. 3.1 – Classement des cancers par incidence et décès, tous sexes confondus, en France, 2011

Localisation	Incidence			Mortalité		
	Effectif(*)	Part (%)	Rang	Effectif	Part (%)	Rang
Prostate	71000	19,4	1	8700	5,9	4
Sein	53000	14,6	2	11500	7,8	3
Côlon-rectum	40500	11,1	3	17500	11,9	3
Poumon	39500	10,8	4	29100	19,7	1
Lèvre, cavité orale, pharynx	10700	2,9	8	3270	2,2	11
Lymphome malin non hodgkinien	11700	3,2	5	3670	2,5	8
Vessie	10980	3,0	7	4670	3,2	5
Rein	11080	3,0	6	3840	2,6	7
Pancréas	9040	2,5	10	nd	-	-
Thyroïde	6600	1,8	13	370	0,3	20
Mélanome de la peau	9780	2,7	9	1621	1,1	16
Foie	8230	2,3	11	nd	-	-
Corps de l'utérus	6800	1,9	12	2080	1,4	15
Estomac	6440	1,8	14	4430	3,0	6
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	5930	1,6	15	3050	2,1	14
Système nerveux central	4770	1,3	16	3390	2,3	10
Ovaire	4620	1,3	17	3150	2,1	13
Œsophage	4280	1,2	18	3440	2,3	9
Leucémie aiguë	3780	1,0	20	3220	2,2	12
Leucémie lymphoïde chronique	3790	1,0	19	1060	0,7	17
Larynx	3230	0,9	21	960	0,7	19
Col de l'utérus	2810	0,8	22	1000	0,7	18
Testicule	2320	0,6	23	90	0,1	22
Maladie de Hodgkin	1840	0,5	24	290	0,2	21
Tous cancers	365500	100	-	147500	100	-

(*) : Effectif total arrondi, **Source** : Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011 (Hospices civils de Lyon, InVs, INCa, Francim, Inserm).
 Traitement : INCa 2011

Source : (La situation du cancer en France en 2011 : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/7708-la-situation-du-cancer-en-france-en-2011)

Au regard de l'importance accordée au cancer colorectal, plus de 30000 tests pour l'accès aux thérapies ciblées du cancer colorectal ont été réalisés en 2009-2010 et 15000 tests pour le cancer du poumon en 2010. Un financement de 7,5 millions d'euros alloué en 2010 pour soutenir l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire (4,5 millions sur crédits d'Assurance maladie, 3 millions sur budget INCa (Source : Plan cancer 2009-2013 http://www.elysee.fr/president/root/bank_objects/2e_rapport_Plan_cancer_decembre_2010.pdf).

Ainsi, comme on l'a vu dans le sous-chapitre « Travaux biologiques antérieurs », les saponines, ont donné des résultats cytotoxiques satisfaisants sur plusieurs lignées cancéreuses notamment les lignées cancéreuses coliques. C'est pourquoi dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons aux effets de quelques saponines que nous avons purifié vis-à-vis du cancer colorectal.

3.2 Résultats et interprétations des tests cytotoxiques

3.2.1 Introduction

Dans le but de pouvoir comparer l'activité cytotoxique de tous les composés testés, les tableaux suivants présentent les résultats pour le test au MTT. Ce test permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires. Les valeurs d'IC₅₀ données équivalent à la moyenne d'activité sur les deux lignées cellulaires cancéreuses coliques (HT-29 et HCT 116).

3.2.2 Résultats et interprétations des activités cytotoxiques

3.2.2.1 Etude cytotoxique des saponines de *Acanthophyllum* et *Arenaria montana* (Caryophyllaceae)

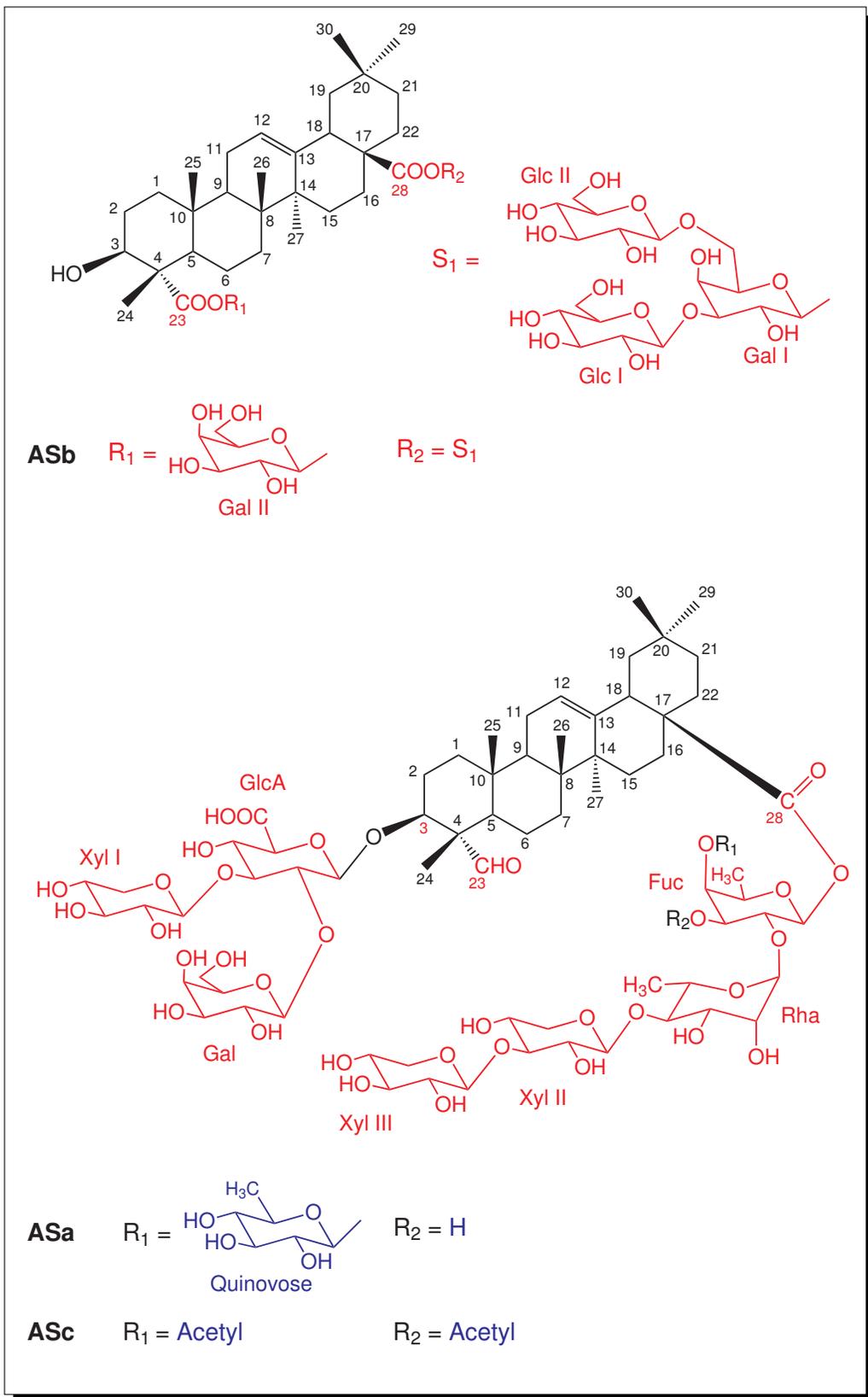


FIGURE 3.2 – Structure des composés ASa, ASb et ASc

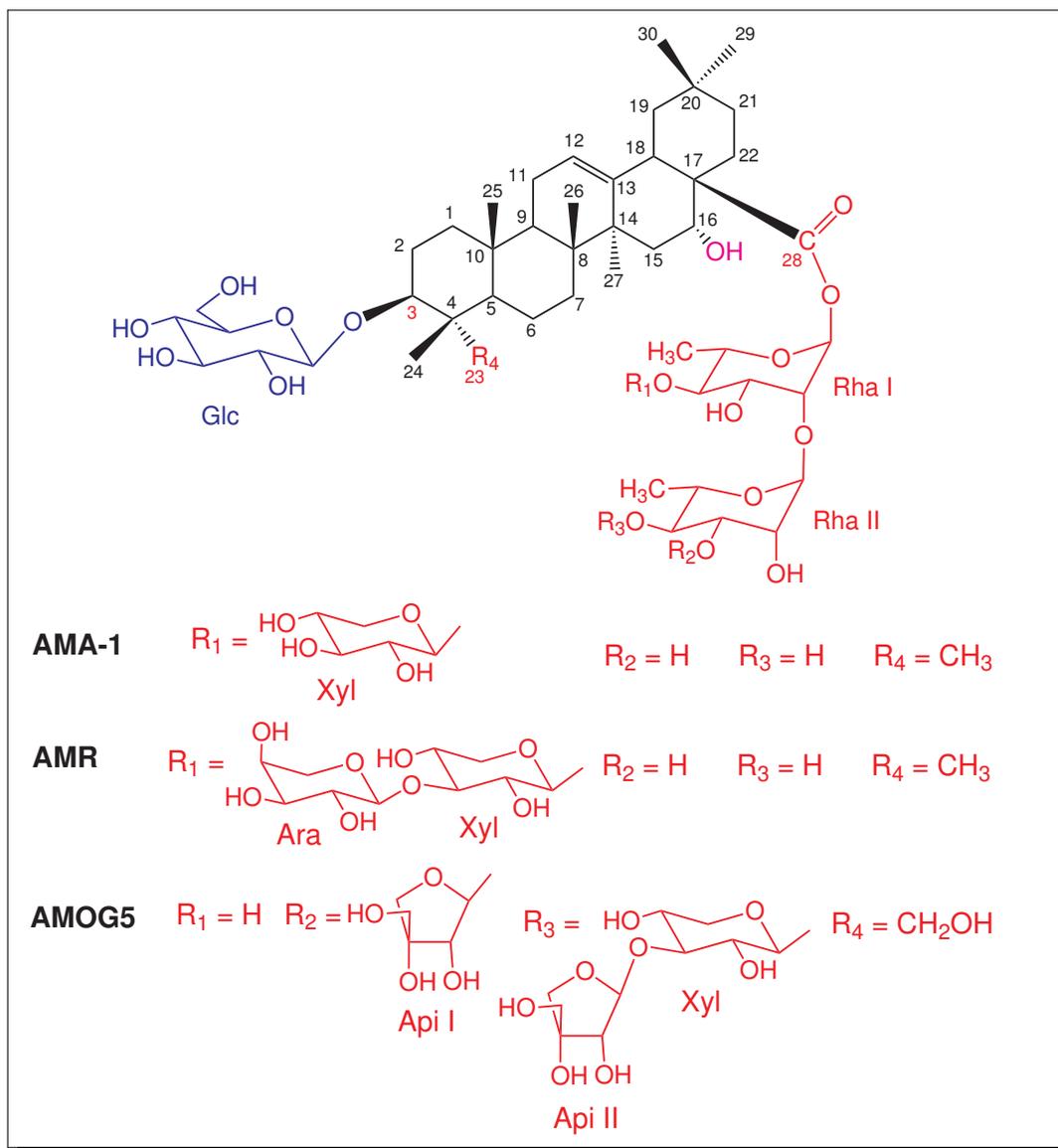


FIGURE 3.3 – Structure des composés **AMA-1**, **AMR** et **AMOG5**

TAB. 3.2 – Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de *Acanthophyllum*

Composés	IC ₅₀ (μM) Lignées cellulaires	
	HT-29	HCT 116
ASa (SAPO 50)	12.0	6.5
ASb (1)	17.1	15.0
ASc (Glanduloside C)	11.9	4.8
Le paclitaxel (Témoin positif) donne des valeurs de IC ₅₀ de 3.6 nM et 1.1 nM sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement.		

TAB. 3.3 – Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de *Arenaria montana*

Composés	IC ₅₀ (μM) Lignées cellulaires	
	HT-29	HCT 116
AMA-1	14.3	12.4
AMR	9.2	11.4
AMOG5	19.7	15.9
Le paclitaxel (Témoin positif) donne des valeurs de IC ₅₀ de 4.2 nM et 2.7 nM sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement.		

3.2.2.2 Interprétation des résultats

Dans le but de réaliser une étude structure-activité, quelques saponines isolées ont été évalués *in vitro* pour leur activité cytotoxique. Les saponines triterpéniques sont fréquemment rencontrées dans la nature et considérées comme substances responsables des propriétés biologiques de plusieurs espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle.

Ainsi le choix des molécules isolées des 3 espèces de *Acanthophyllum*, s'est basé sur la structure de leur aglycone. Il s'agit de l'**acide gypsogénique** pour **ASb** et la **gypsogénine** pour **ASa** et **ASc**. La fonction hydroxyle en position C-3 de l'aglycone de **ASb** est libre tandis qu'elle est substituée par une chaîne trisaccharidique pour les composés **ASa** et **ASc**. Ces deux dernières saponines ont des structures très proches et des cytotoxicités comparables (IC₅₀ = 12.0 μM et 6.5 μM pour **ASa** puis 11.9 μM et 4.8 μM pour **ASc** respectivement sur les lignées HT-29 et HCT 116). Elles exercent les plus fortes cytotoxicités sur les deux lignées cellulaires cancéreuses comparées à celles de **ASb** (IC₅₀ = 17.1 μM sur HT-29 et 15.0 μM sur HCT 116).

Toutefois, ce sont des cytotoxicités modérées comparées au témoin positif (Paclitaxel, $IC_{50} = 3.6$ nM sur HT-29 et 1.1 nM sur HCT 116).

En somme, la présence du groupement formyle (**CHO**) en C-23 et/ou la substitution par une chaîne osidique de la position C-3 de la gypsogénine sont essentielles pour conférer un meilleur pouvoir cytotoxique (Timité et al., 2010a). Toutefois, des études supplémentaires sur un plus large éventail de structures seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

Comme les glycosides de gypsogénine et de l'acide gypsogénine isolés des 3 espèces de *Acanthophyllum*, la cytotoxicité des composés **AMA-1**, **AMR** et **AMOG5** isolés d'*Arenaria montana* est étudiée. Au plan structural, les composés AMA-1 et AMR sont très proches, ce sont des glycosides d'acide échinocystique se caractérisant par un groupe Méthyle en C-23. Les composés AMA-1 et AMR ont des cytotoxicités ($IC_{50} = 14.3$ μ M et 12.4 μ M pour AMA-1 puis 9.2 μ M et 11.4 μ M pour AMR respectivement sur les lignées HT-29 et HCT 116) comparables à celles des dérivés de la gypsogénine (Timité et al., 2010a). Le composé AMOG5 est un dérivé de la caulophyllogénine, c'est-à-dire possédant une fonction alcool primaire en C-23 de l'aglycone. Contrairement aux dérivés de la gypsogénine et à ceux de l'acide échinocystique, le composé AMOG5 présente une activité cytotoxique légèrement plus faible avec des $IC_{50} = 19.7$ μ M (HT-29) et 15.9 μ M (HCT 116).

3.2.2.3 Conclusion

Cette étude a mis en valeur le potentiel cytotoxique de ces molécules naturelles. Elle a également permis d'établir quelques corrélations entre les différentes structures et les activités cytotoxiques. Ainsi on note que :

- Les meilleures activités sont obtenues avec les dérivés de la gypsogénine. Ces dérivés sont toutefois plus efficaces sur la lignée HCT 116 ($IC_{50} = 6.5$ μ M pour ASa et 4.8 μ M pour ASc) comparé à la lignée HT-29 ($IC_{50} = 12.0$ μ M pour ASa et 11.9 μ M pour ASc). Cette tendance peut être généralisée aux autres composés testés.
- Les dérivés de l'acide échinocystique suivent avec des activités encore plus modérées ($IC_{50} = 14.3$ μ M et 12.4 μ M pour AMA-1 puis 9.2 μ M et 11.4 μ M pour AMR sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement).
- Enfin les dérivés de l'acide gypsogénique et de la caulophyllogénine donnent des activités cytotoxiques comparables et plus faibles ($IC_{50} = 17.1$ μ M et 15.0 μ M pour ASb puis 19.7

μM et $15.9 \mu\text{M}$ pour AMOG5 sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement).

Il ressort de ces analyses que les éléments suivants sont déterminants pour l'efficacité de l'activité cytotoxique :

- la nature de la fonction présente en position C-23
- La substitution en position C-3 par une chaîne oligosaccharidique

Cette étude révèle également la sensibilité relative de la lignée cellulaire HCT 116 comparée à celle de la lignée HT-29 à l'égard de ces saponines triterpéniques

Afin de corroborer ces conclusions, des tests doivent être réalisés sur plusieurs autres composés de structure similaire.

Il serait également intéressant de faire des tests sur un plus large éventail de dérivés notamment de l'acide quillaique, de la présénégénine, bayogénine, acide médicagénique, polygalagénine afin de comparer l'**influence de ces aglycones** sur la cytotoxicité.

On pourrait également mettre en évidence l'impact de **la nature des sucres** constituant les chaînes oligosaccharidiques. Des études montrent que la présence d'un rhamnose dans la chaîne oligosaccharide fixée en C-3 améliore l'activité cytotoxique (Cham and Daunter, 1990, Chang et al., 1998), tandis qu'il semblerait que la présence de β -D-glucopyranosyl en C-3 ou en C-28 est au détriment de l'action cytotoxique des saponines de type lupane. Il serait donc intéressant de réaliser des tests dans ce sens pour les saponines isolées dans les familles étudiées dans cette thèse.

Des travaux ont mis en évidence une séquence osidique particulière, α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside, qui induit une forte activité cytotoxique lorsqu'elle est branchée en position 3 d'une génine triterpénique (Barthomeuf et al., 2002, Gauthier et al., 2006). Ceci montre l'importance des chaînes oligosaccharidiques dans l'activité cytotoxique. Enfin Chwelek et ses collaborateurs ont montré qu'en plus de la nature de l'aglycone, des sucres et des chaînes oligosacchariques, il est important de noter l'importance du type de liaison à un sucre donné. Ainsi pour un α -L-rhamnose, ces auteurs montrent que la cytotoxicité des molécules s'améliore dans le sens suivant : (1 \rightarrow 2) > (1 \rightarrow 3) > (1 \rightarrow 4) tandis que pour le β -D-xylose on a (1 \rightarrow 2) > (1 \rightarrow 4) > (1 \rightarrow 3), ce qui confirme encore l'importance de la séquence α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (Chwelek et al., 2006). Ce sont donc autant d'aspects qui pourront à l'avenir enrichir notre connaissance sur les relations structure-activités des saponines triterpéniques et d'envisager éventuellement des études sur les mécanismes d'action de celles-ci.

3.2.2.4 Etude cytotoxique des saponines de *Allium schoenoprasum* (Alliaceae)

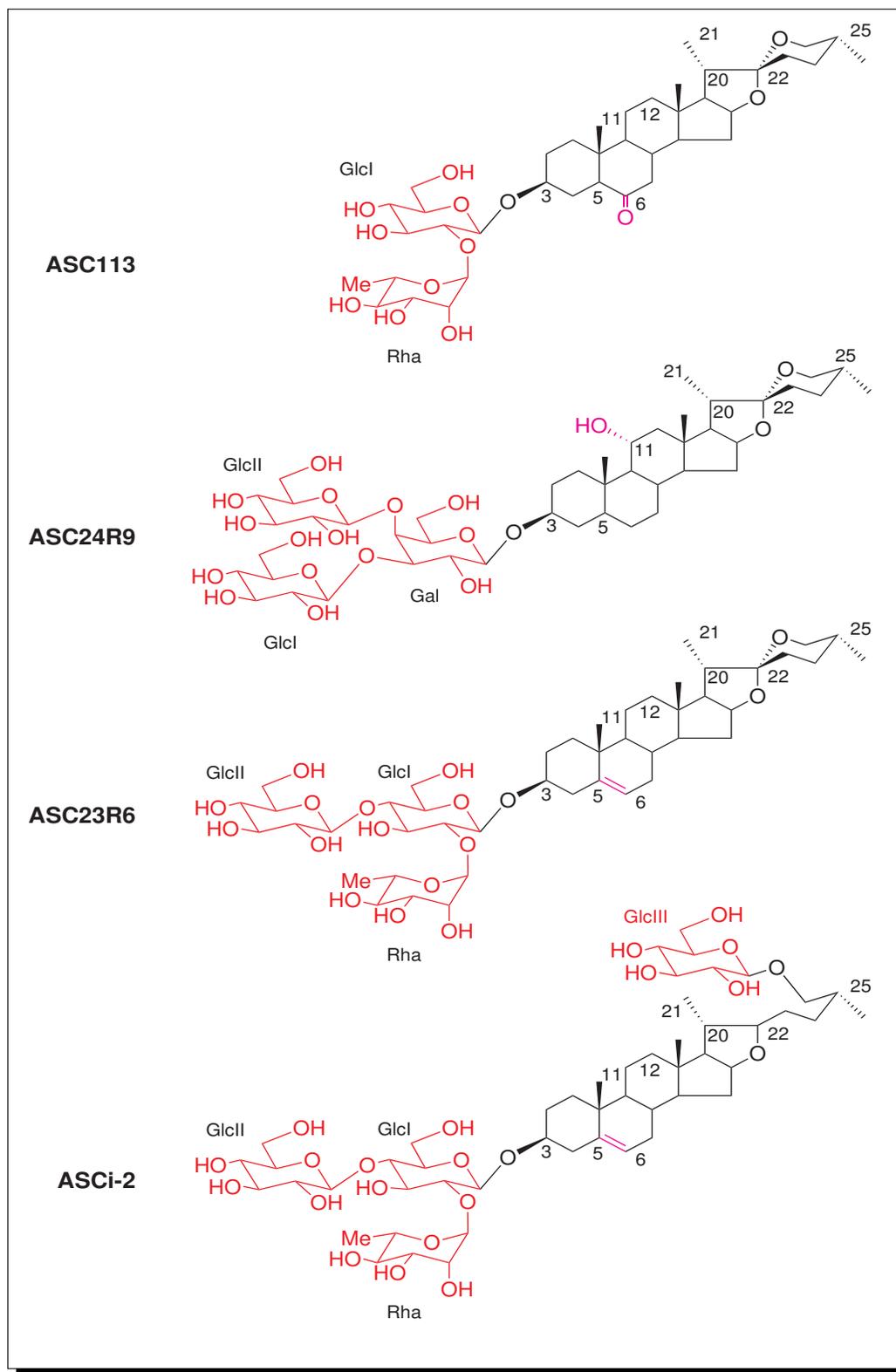


FIGURE 3.4 – Structure des composés ASC113, ASC24R9, ASC23R6 et ASCi-2

TAB. 3.4 – Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de *Allium schoenoprasum*

Composés	IC ₅₀ (μM) Lignées cellulaires	
	HT-29	HCT 116
ASC113	> 100	> 100
ASC24R9	8.64	8.45
ASC23R6	0.75	0.40
ASCI-2	1.56	1.58
Le paclitaxel (Témoin positif) donne des valeurs de IC ₅₀ de 2.06 nM et 2.75 nM sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement.		

3.2.2.5 Interprétation des résultats

Sur le plan structural, les composés **ASC113**, **ASC24R9** et **ASC23R6** sont des dérivés spirostaniques, tandis que le composé **ASCI-2** est un dérivé furostanique.

Plusieurs études démontrent que l'activité hémolytique des saponines stéroïdiques est fortement dépendante de leurs structures, c'est-à-dire la longueur des chaînes de sucres, le type de liaison interglycosidique, la nature des substituants des sucres, ainsi que ceux de l'aglycone (Wang et al., 2007c). Ainsi pour notre analyse, les éléments essentiels de comparaison sont les suivants :

- la présence de fonction alcool ou cétone sur l'aglycone
- la présence de la double liaison $\Delta^{5,6}$
- le nombre de sucres constituant les chaînes oligosaccharidiques
- La nature des sucres

Les 3 saponines, dont la génine est de type spirostane, portent les chaînes oligosaccharidiques exclusivement sur la position C-3 de leurs aglycones respectifs. Le composé ASC113 à la différence des 2 autres présente une fonction cétone en position C-6 de son aglycone. Sa chaîne osidique est un disaccharide constitué d'un rhamnose lié à un glucose par une liaison (1→2). Quant au composé ASC24R9, il possède une fonction alcool en position C-11 de l'aglycone avec une absence de double liaison $\Delta^{5,6}$. Sa chaîne osidique est un trisaccharide constitué de 2 molécules de glucose liées à une molécule de galactose par des liaisons (1→2) et (1→4) respectivement. Enfin la molécule ASC23R6, présente une double liaison $\Delta^{5,6}$ au niveau de son aglycone. Sa chaîne osidique est également un trisaccharide, mais à la différence de celle de la molécule ASC24R9, elle est constituée d'un rhamnose et d'un glucose, tous deux liés à un

autre glucose par des liaisons (1→2) et (1→4) respectivement. À la suite de cette comparaison structurale et à la lumière des activités cytotoxiques (cf. Tableau 3.4), l'efficacité de ces molécules s'établit comme suit : ASC23R6 > ASC24R9 > ASC115. Que signifient ces résultats en matière de relations structure-activité ?

Plusieurs études montrent qu'au niveau des saponines stéroïdiques, l'aglycone a une influence considérable sur l'activité biologique. Ainsi la comparaison de l'activité apoptotique de la diosgénine (présence de liaison $\Delta^{5,6}$) par rapport à la smilagénine et la tigogénine (isomères 5β et 5α respectivement et sans liaison $\Delta^{5,6}$) a été réalisé sur des cellules d'ostéosarcome humaines. La diosgénine a induit une apoptose 5,6 fois meilleures par rapport au contrôle, alors que smilagénine et tigogénine ont montré une faible activité apoptotique (Trouillas et al., 2005).

En plus de ce qui précède, une étude de relation structure-activité a été menée par Mimaki et al. en 2001. Il en résulte que les dérivés α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside de diosgénine sont plus cytotoxiques que ceux ayant le rhamnose en position C-3 et C-4 du glucose. Dans cette même étude il est montré que l'introduction d'un groupe hydroxyle en position C-17 de la diosgénine, réduit légèrement la cytotoxicité tandis que son introduction en position C-27 diminue considérablement cette activité (Mimaki et al., 2001).

Ces résultats ont été en partie confirmés par une étude portant sur la substitution du rhamnose par différents sucres. Cette étude montre que le dérivé α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside est le plus cytotoxique. Les glycosides contenant un autre sucre à la place du rhamnose étaient en général moins cytotoxiques dans cette étude (Hernandez et al., 2008).

Toutes ces données bibliographiques nous permettent de comprendre la meilleure activité cytotoxique du composé ASC23R6 ($IC_{50} = 0.75 \mu M$ et $0.40 \mu M$ sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement) par rapport au composé ASC24R9 ($IC_{50} = 8.64 \mu M$ et $8.45 \mu M$ sur les lignées HT-29 et HCT 116 respectivement). Elle permet de confirmer l'influence de l'aglycone, de la chaîne osidique et de la nature des sucres sur l'activité cytotoxique de cette classe de composé. Le composé ASC113 est inactif sur les deux lignées cellulaires ($IC_{50} > 100 \mu M$). On ne dispose pas de données précises concernant l'impact d'une fonction cétone sur l'activité cytotoxique des saponines en général et sur celles des saponines stéroïdiques en particulier. Mais au regard du composé ASC23R6, on peut penser qu'en plus du départ d'un glucose dans la chaîne osidique, l'oxydation de la double liaison $\Delta^{5,6}$ supprimerait l'activité cytotoxique du composé ASC 113. Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs autres tests seront nécessaires sur un panel de saponines (Synthétisées ou non) présentant une fonction cétone à différentes

positions de l'aglycone.

Enfin nous avons le composé ASCi-2 qui est un dérivé furostanique. Cette molécule donne une activité cytotoxique intéressante sur les deux lignées cellulaires ($IC_{50} = 1.56 \mu\text{M}$ sur les lignées HT-29 et $1.58 \mu\text{M}$ sur HCT 116). Comparée à la molécule ASC23R6, cette activité cytotoxique est légèrement plus faible. Ces deux molécules ayant la même séquence osidique en C-3 de leurs aglycones respectifs, on peut aisément comprendre que la différence d'activité est liée à la nature des aglycones et de leurs substituants.

3.2.2.6 Conclusion

Cette étude a permis de confirmer le pouvoir cytotoxique des saponines stéroïdiques avec des valeurs de IC_{50} atteignant $0.40 \mu\text{M}$ sur les cellules cancéreuses coliques HCT 116 et $0.75 \mu\text{M}$ sur la lignée cancéreuse HT-29. Cette étude montre aussi qu'il est difficile d'établir un ordre d'importance entre l'activité cytotoxique des spirostanes par rapport aux furostanes. Le composé ASCi-2 (furostane) étant moins cytotoxique que ASC23R6 (spirostane) et plus cytotoxique que les composés ASC24R9 et ASC113 (tous deux des spirostanes), confirme que l'activité cytotoxique des saponines stéroïdiques est essentiellement dépendante d'un ensemble de facteurs structuraux comprenant :

- Site de fixation des hydroxyles (Yu et al., 2001)
- Le nombre d'hydroxyles sur l'aglycone (Wang et al., 2007b)
- La présence ou non de double liaison (Trouillas et al., 2005)
- Le type de liaison interglycosidique (Chwalek et al., 2006)
- La lipophilicité des sucres (Mimaki et al., 2001)
- Le nombre de sucres (Wang et al., 2007b)
- Le type des séquences osidiques (Bang et al., 2008)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons présenté dans cette thèse les résultats des travaux phytochimiques réalisés sur six espèces appartenant à trois familles végétales différentes. Il s'agit de *Acanthophyllum elatius*, *A. lilacinum*, *A. sordidum* et *Arenaria montana* (**Caryophyllaceae**), l'espèce *Securidaca welwitschii* (**Polygalaceae**) et enfin *Allium schoenoprasum* (**Alliaceae**). Ces choix ont été motivés par le fait que ces familles de plantes sont connues pour leur richesse en saponines, composés complexes dont les activités pharmacologiques, notamment dans le domaine de la cancérologie a été démontrées.

L'étude phytochimique a ainsi permis de mettre en évidence, par différentes techniques chromatographiques (**CCM, Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie Flash, Chromatographie Liquide à Moyenne Pression**) et spectroscopiques (**Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse**), 24 composés naturels, dont 17 nouveaux et 7 connus. Il faut préciser que les molécules isolées des familles de Caryophyllaceae et Polygalaceae sont toutes des saponines triterpéniques alors que celles isolées des Alliaceae sont des saponines stéroïdiques. Ces composés se répartissent comme suit :

Famille des Caryophyllaceae :

- De *Acanthophyllum elatius*, *A. lilacinum*, *A. sordidum*, 5 saponines triterpéniques ont été isolées, dont 2 nouvelles et 3 connues. Pour *Arenaria montana*, 3 saponines triterpéniques de structure nouvelle ont été identifiées.

Famille des Polygalaceae :

- De *Securidaca welwitschii*, parmi les 5 nouvelles saponines triterpéniques isolées, 4 sont sous forme de paires de dérivées d'isomères inséparables de *E*- et *Z*-3,4-diméthoxycinnamoyle.

Famille des Alliaceae :

- De *Allium schoenoprasum*, 11 molécules stéroïdiques ont été isolées. 7 de ces molécules ont été reconnues comme nouvelles. Les trois premières paires sont des isomères inséparables (**R/S**), alors que les 4 autres molécules restantes ont déjà été décrites dans la littérature.

Les résultats de l'étude phytochimique sont en accord avec les travaux antérieurs réalisés dans les différentes familles (cf. **Travaux phytochimiques antérieurs**). Le cas spécifique de *Arenaria montana* a enrichi davantage l'aspect chimiotaxonomique de cette étude grâce à la présence inhabituelle chez les Caryophyllaceae de façon générale et en particulier dans le genre *Arenaria* de sapogénine comme la **caulophyllogénine** et de l'**acide échinocystique**.

Des tests biologiques préliminaires ont été réalisés sur 10 des 24 molécules isolées. Le choix des molécules testées a été fait sur la base de leur diversité structurale, notamment la nature des aglycones et des sucres, le type de liaison interglycosidique et le type de la séquence osidique. Ce choix a été influencé par les faibles rendements de purification, c'est pour cette raison qu'aucun test n'a pu être effectué sur les molécules isolées de *Securidaca welwitschii*.

Les saponines triterpéniques, et stéroïdiques ont été testées en vue d'évaluer leurs activités cytotoxiques sur deux lignées cellulaires cancéreuses coliques (**HT-29** et **HCT 116**).

Nos résultats montrent que 9 composés sur les 10 testés, possèdent des activités cytotoxiques significatives sur les deux lignées cellulaires cancéreuses. Les saponines triterpéniques présentent globalement des activités modérées sur les deux lignées, par rapport aux saponines stéroïdiques, qui ont montré les meilleures activités cytotoxiques. Ces activités sont certes satisfaisantes, mais elles demeurent faibles par rapport à la molécule de référence, le Paclitaxel.

En définitive, cette étude a permis d'en savoir davantage sur la phytochimie des Caryophyllaceae, Polygalaceae et Alliaceae, en contribuant à l'enrichissement de la base de données des saponines. Elle a en outre démontré l'importance de ces familles comme source de nouveaux produits naturels et de composés aux activités biologiques et pharmacologiques prometteuses. Nous pouvons donc dire que les objectifs de notre projet de thèse ont été atteints :

- Isolement et détermination structurale de 24 saponines dont 14 nouvelles.
- Confirmation de plusieurs marqueurs chimiotaxonomiques.
- Evaluation de l'activité cytotoxique de 10 molécules isolées.
- Etablissement de relations structures/activités cytotoxiques.

Ce travail ouvre toutefois de nouvelles perspectives :

Les trois familles étudiées au cours de cette thèse demeurent partiellement inexploitées. Il faudrait donc poursuivre le travail d'investigation phytochimique de ces plantes afin d'enrichir les données bibliographiques nécessaires à la chimiotaxonomie.

Les résultats de ce projet concernant les relations entre la structure moléculaire et l'activité cytotoxique ont amené beaucoup d'interrogations :

Les saponines triterpéniques :

- Quel est l'impact de la fonction chimique présente en position C-23 des glycosides triterpéniques? Il serait donc intéressant de réaliser des opérations de modification structurale par hémisynthèse pour obtenir une gamme plus large de composés ayant

des fonctions différentes en C-23. Ceci permettra de voir l'impact d'une modification au niveau de cette position.

- Quelle est l'influence de la substitution ou non de la position C-3 de ces aglycones sur l'activité cytotoxique? Notre étude montre que la substitution de cette position est au bénéfice de l'activité cytotoxique. Cependant, le nombre limité de résultats ne permet pas de généraliser ce constat. Il serait donc important de le confirmer ou non par d'autres études similaires.
- On pourrait enfin mettre en évidence l'influence de la nature de certains sucres. Des études montrent que le rhamnose et le glucose ont des effets opposés sur l'activité anticancéreuse lorsqu'ils sont fixés en position C-3 ou C-28. Le premier améliorerait l'activité cytotoxique des saponines de type lupane, tandis que le second serait réducteur de cette activité (Cham and Daunter, 1990, Chang et al., 1998), qu'en est-il pour les saponines de type oléane?

Les saponines stéroïdiques :

- L'étude des relations structure/activité des saponines de *Allium schoenoprasum* laisse en suspens l'impact de la fonction cétone sur l'activité cytotoxique. Notre étude montre que la présence d'une fonction cétone en C-6 de l'aglycone serait responsable de la perte de l'activité cytotoxique. Cette conclusion peut-elle être généralisée? D'autres tests impliquant cette fonction seront nécessaires pour répondre à cette interrogation.
- La question du rapport d'efficacité saponine spirostannique/saponine furostannique mérite d'être traitée en profondeur. Malgré le fait que les saponines spirostanniques sont réputées plus cytotoxiques que les furostanniques, il s'avère qu'il est impossible de généraliser cette affirmation. Cette question mérite de futures investigations.

Une dernière interrogation :

- Nous constatons de façon générale une sensibilité relative des cellules de la lignée HCT 116 comparée à celles de la lignée HT-29. Comment peut-on justifier ce constat? Le mécanisme d'action des saponines pourrait être étudié par les techniques courantes de biologie moléculaire.
- De plus, il existe plus d'une dizaine d'autres lignées cellulaires coliques comme par exemple les lignées **CACO-2, LS174T, VACO5, SW48, LS411, LS174T, LOVO, HCA7, LS180, HRA19, SCKO-1, PCJW, COLO320DM** (Wheeler et al., 1999).

Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité cytotoxique sur certaines de ces cellules.

Pour conclure, il serait également utile d'élargir le champs d'action des molécules isolées en choisissant d'autres domaines pharmacologiques à évaluer comme par exemple l'**Immunologie** ou la **Bactériologie**.

Références bibliographiques

- Abbas, F. (2001). Steroidal saponins from *Solanum unguiculatum* (A.) Rich. *Sci. Pharm.*, 69(2) :219–234.
- Agrawal, P. K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10) :3307–3330.
- Agrawal, P. K. (2003). 25*R*/25*S* stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. *Magn Reson Chem*, 41(11) :965–968.
- Agrawal, P. K. (2004). Spectral Assignments and Reference Data. *Magn. Reson. Chem.*, 42 :990–993.
- Agrawal, P. K. (2005). Determining ring-F configuration in spirostane-type steroidal sapogenins by 1H NMR. *Indian J. Chem.*, 44B :1092–1094.
- Agrawal, P. K., Jain, D. C., Gupta, R. K., and Thakur, R. S. (1985). Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponin. *Phytochemistry*, 24(11) :2479–2496.
- Agrawal, P. K. and Pathak, A. K. (1996). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Approaches for the Determination of Interglycosidic Linkage and Sequence in Oligosaccharides. *Phytochem Anal*, 7(3) :113–130.
- Ahmed, W. S., Mohamed, M. A., El-Dib, R. A., and Hamed, M. M. (2009). New triterpene saponins from *Duranta repens* Linn. and their cytotoxic activity. *Molecules*, 14(5) :1952–1965.

- Akhov, L. S., Musienko, M. M., Piacente, S., Pizza, C., and Oleszek, W. (1999). Structure of steroidal saponins from underground parts of *Allium nutans* L. *J Agric Food Chem*, 47(8) :3193–3196.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R., and Cheadle, J. P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G :C->T :A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, 30(2) :227–232.
- APG (1998). An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 85(4) :531–553.
- APGII (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.*, 141(4) :399–436.
- APGIII (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.*, 161(2) :105–121.
- Arai, M., Hayashi, A., Sobou, M., Ishida, S., Kawachi, T., Kotoku, N., and Kobayashi, M. (2011). Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. *J Nat Med*, 65(1) :149–156.
- Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D., and Fuchs, H. (2008). Saponins in tumor therapy. *Mini Rev Med Chem*, 8(6) :575–584.
- Bachran, C., Durkop, H., Sutherland, M., Bachran, D., Muller, C., Weng, A., Melzig, M. F., and Fuchs, H. (2009). Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by *Saponinum album* in a synergistic way. *J Immunother*, 32(7) :713–725.
- Bachran, C., Sutherland, M., Heisler, I., Hebestreit, P., Melzig, M. F., and Fuchs, H. (2006). The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(4) :412–420.
- Bai, H., Zhong, Y., Xie, Y.-Y., Wang, Y.-S., Liu, L., Zhou, L., Wang, J., Mu, Y.-L., and Zuo, C.-X. (2007). A major triterpenoid saponin from *Gypsophila oldhamiana*. *Chem Biodivers*, 4(5) :955–960.

- Bang, S.-C., Lee, J.-H., Song, G.-Y., Kim, D.-H., Yoon, M.-Y., and Ahn, B.-Z. (2005). Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 53(11) :1451–1454.
- Bang, S.-C., Seo, H.-H., Shin, H.-R., Lee, K.-C., Hoang, L. T. A., and Jung, S.-H. (2008). A convenient preparation of a disaccharide motif and its role in the cytotoxicity of the triterpenoid saponin, alpha-hederin. *Arch Pharm Res*, 31(5) :555–561.
- Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Sajjadi, S. E., Scala, F., and Lanzotti, V. (2007). Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, 68(5) :596–603.
- Barile, E., Capasso, R., Izzo, A. A., Lanzotti, V., Sajjadi, S. E., and Zolfaghari, B. (2005). Structure-activity relationships for saponins from *Allium hirtifolium* and *Allium elburzense* and their antispasmodic activity. *Planta Med*, 71(11) :1010–1018.
- Barile, E., Zolfaghari, B., Sajjadi, S. E., and Lanzotti, V. (2004). Saponins of *Allium elburzense*. *J Nat Prod*, 67(12) :2037–2042.
- Barthomeuf, C., Debiton, E., Mshvildadze, V., Kemertelidze, E., and Balansard, G. (2002). In vitro activity of hederacolchisid A1 compared with other saponins from *Hedera colchica* against proliferation of human carcinoma and melanoma cells. *Planta Med*, 68(8) :672–675.
- Bax, A. and Davis, D. G. (1985). MLEV-17 based two-dimensional homonuclear magnetisation transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 65 :355–360.
- Behnke, H. D. (1976). Ultrastructure of sieve-element plastids in Caryophyllales (Centrospermae), evidence for the delimitation and classification of the order. *Pl. Syst. Evol.*, 126 :31–54.
- Bock, B. (2005). Base de données nomenclaturale de la flore de France. *Tela Botanica*, BDNFF v4.02.
- Bonnier, G. (1990). *La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier : France, Suisse, Belgique et pays voisins*. 3e éd. Paris, I.N.R.A ed.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*. Édition Tec & Doc, Édition médicales internationales, 4e édition.

- Bukharov, V. and Shcherbak, S. (1973). Triterpene glycosides from *Arenaria graminifolia*. *Chem. Nat. Compd.*, 9 :123.
- Calabria, L. M., Piacente, S., Kapusta, I., Dharmawardhane, S. F., Segarra, F. M., Pessiki, P. J., and Mabry, T. J. (2008). Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry*, 69(4) :961–972.
- Cao, S., Norris, A., Miller, J. S., Ratovoson, F., Razafitsalama, J., Andriantsiferana, R., Rasamison, V. E., TenDyke, K., Suh, T., and Kingston, D. G. I. (2007). Cytotoxic triterpenoid saponins of *Albizia gummifera* from the Madagascar rain forest. *J Nat Prod*, 70(3) :361–366.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47(4) :936–942.
- Carotenuto, A., Fattorusso, E., Lanzotti, V., and Magno, S. (1999). Spirostanol saponins of *Allium porrum* L. *Phytochemistry*, 51(8) :1077–1082.
- Cham, B. E. and Daunter, B. (1990). Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. *Cancer Lett*, 55(3) :221–225.
- Chan, P.-K., Zhao, M., Che, C.-T., and Mak, E. (2008). Cytotoxic acylated triterpene saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia*. *J Nat Prod*, 71(7) :1247–1250.
- Chang, L. C., Tsai, T. R., Wang, J. J., Lin, C. N., and Kuo, K. W. (1998). The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 242(1) :21–25.
- Chang, X., Li, W., Jia, Z., Satou, T., Fushiya, S., and Koike, K. (2007). Biologically active triterpenoid saponins from *Ardisia japonica*. *J Nat Prod*, 70(2) :179–187.
- Charrouf, Z., Nait-M'bark, A., Guillaume, D., Leroy, Y., and Kol, O. (1996). *Saponins used in Food and Agriculture*, pages 241–245. Waller, G.R and Yamasaki, K., Plenum Press : New York.

- Chase, M. W., Soltis, D. E., Ohnstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R., Hills, H. G., Qui, Y., Krron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Paliner, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K., Wimpee, C. F., Smith, J. E., Furrder, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q., Plunkett, G. M., Soltis, R. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Leam, G. H., jr, S. G., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S., and Albert, V. A. (1993). Phylogenetics of seed plants : An analysis of the nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 80 :528–580.
- Chen, H., Wang, G., Wang, N., Yang, M., Wang, Z., Wang, X., and Yao, X. (2007). New furostanol saponins from the bulbs of *Allium macrostemon* Bunge and their cytotoxic activity. *Pharmazie*, 62(7) :544–548.
- Chen, H.-F., Wang, G.-H., Q.Luo, Wang, N.-L., , and Yao, X.-S. (2009). Two New Steroidal Saponins from *Allium macrostemon* Bunge and Their Cytotoxicity on Different Cancer Cell Lines. *molecules*, 14(6) :2246–2253.
- Chen, H.-F., Wang, N.-L., Sun, H.-L., Yang, B.-F., and Yao, X.-S. (2006). Novel furostanol saponins from the bulbs of *Allium macrostemon* B. and their bioactivity on [Ca²⁺]_i increase induced by KCl. *J Asian Nat Prod Res*, 8(1-2) :21–28.
- Chen, Q., Luo, J.-G., and Kong, L.-Y. (2010). Triterpenoid saponins from *Gypsophila altissima* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 58(3) :412–414.
- Chung, D. C. (2000). The genetic basis of colorectal cancer : insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*, 119(3) :854–865.
- Chung, I.-W., Moore, N. A., Oh, W.-K., O'Neill, M. F., Ahn, J.-S., Park, J.-B., K, U. G., and Kim, Y. S. (2002). Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(1-2) :191–195.
- Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Ple, K., and Voutquenne-Nazabadioko, L. (2006). Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides : haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochim Biophys Acta*, 1760(9) :1418–1427.

- Chwalek, M., Plé, K., and Voutquenne-Nazabadioko, L. (2004). Synthesis and hemolytic activity of some hederagenin diglycosides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 52(8) :965–971.
- Cmoch, P., Pakulski, Z., Swaczynová, J., and Strnad, M. (2008). Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr Res*, 343(6) :995–1003.
- Cordell, G. A., Lyon, R. L., Fong, H. H., Benoit, P. S., and Farnsworth, N. R. (1977). Biological and phytochemical investigations of *Dianthus barbatus* cv. "China Doll" (Caryophyllaceae). *Lloydia*, 40(4) :361–363.
- Corea, G., Fattorusso, E., and Lanzotti, V. (2003). Saponins and flavonoids of *Allium triquetrum*. *J Nat Prod*, 66(11) :1405–1411.
- Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Capasso, R., and Izzo, A. A. (2005). Antispasmodic saponins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. var. Tropea. *J Agric Food Chem*, 53(4) :935–940.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- Davreux, M. and Delaude, C. (1971). Contribution à l'étude des saponines contenues dans les Polygalacées. Identification de la saponine extraite du *Securidaca welwitschii* OLIV. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 40(9-10) :498–501.
- de Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2005). *Spectrométrie de masse Cours et exercices corrigés*. Dunod, Paris, 3 edition.
- Delaude, C. (1971). Etude comparative des saponines extraites de deux Polygalacées Africaines le «*securidaca longepedunculata*» Fres. Var. parvifolia et le *Polygala acicularis*. OLIV. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 40(5-8) :397–405.
- Delaude, C. and Davreux, M. (1972a). Contribution à l'étude chimique des saponines des Polygalaceae. Identification de la saponine extraite de *Carpolobia glabrescens* Hutch. et Dalz. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 41(9-10) :573–575.

- Delaude, C. and Davreux, M. (1972b). Contribution à l'étude chimique des saponines des Polygalacées. Identification de la saponine extraite de *Polygala erioptera* DC. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 41(9-10) :575–578.
- Delay, C., Gavin, J. A., Aumelas, A., Bonnet, P. A., and Roumestand, C. (1997). Isolation and structure elucidation of a highly haemolytic saponin from the Merck saponin extract using high-field gradient-enhanced NMR techniques. *Carbohydr Res*, 302(1-2) :67–78.
- Desbène, S., Hanquet, B., Shoyama, Y., Wagner, H., and Lacaille-Dubois, M. A. (1999). Biologically active triterpene saponins from callus tissue of *Polygala amarella*. *J Nat Prod*, 62(6) :923–926.
- Diome, C., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Delaude, C., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2007). Saponins from the roots of *Nylandtia spinosa*. *J Nat Prod*, 70(10) :1680–1682.
- Dong, M., Feng, X.-Z., Wang, B.-X., Wu, L.-J., and Ikejima, T. (2001). Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron*, 57 :501–506.
- Downie, S.-R. and Palmer, J.-D. (1994a). A chloroplast DNA phylogeny of the Caryophyllales based on structural and inverted repeat restriction site variation. *Syst. Bot.*, 19 :236–252.
- Einbond, L. S., Wen-Cai, Y., He, K., Wu, H.-A., Cruz, E., Roller, M., and Kronenberg, F. (2008). Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 15(6-7) :504–511.
- Elbandy, M., Miyamoto, T., Chauffert, B., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2002a). Novel acylated triterpene glycosides from *Muraltia heisteria*. *J Nat Prod*, 65(2) :193–197.
- Elbandy, M., Miyamoto, T., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2002b). Five New Medicagenic Acid Saponins from *Muraltia ononidifolia*. *Helv. Chim. Acta*, 85(9) :2721–2728.
- Elbandy, M., Miyamoto, T., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). Acylated preatroxigenin glycosides from *Atroxima congolana*. *J Nat Prod*, 66(9) :1154–1158.
- Elbandy, M., Miyamoto, T., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2004). New Acylated Presenegenin Saponins from Two Species of *Muraltia*. *Helv. Chim. Acta*, 87(2) :340–348.

- Elbandy, M., Miyamoto, T., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2007). Sulfated lupane triterpene derivatives and a flavone C-glycoside from *Gypsophila repens*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55(5) :808–811.
- Elbary, A. A. and Nour, S. A. (1979). Correlation between the spermicidal activity and the haemolytic index of certain plant saponins. *Pharmazie*, 34(9) :560–561.
- Elgamal, M. H., Soliman, H. S., Elmunajjed, D. T., Tóth, G., Simon, A., and Duddeck, H. (1998). Two triterpene saponins from *arenaria filicaulis*. *Phytochemistry*, 49(1) :189–193.
- Elgamal, M. H. A., Soliman, H. S., Karawya, M. S., Mikhova, B., and Duddeck, H. (1995). Isolation of triterpene saponins from *Gypsophila capillaris*. *Phytochemistry*, 38(6) :1481–1485.
- Elgamal, M. H. A., Solimana, H. S. M., Karawya, M. S., and Duddeck, H. (1994). Isolation of Two Triterpene Saponins from *Gypsophila capillaris* (Forssk.). *Nat. Prod. Res.*, 4(3) :217–222.
- Ellington, A. A., Berhow, M., and Singletary, K. W. (2005). Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins. *Carcinogenesis*, 26(1) :159–167.
- Estrada, A., Katselis, G. S., Laarveld, B., and Barl, B. (2000). Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23(1) :27–43.
- Fattorusso, E., Iorizzi, M., Lanzotti, V., and Taglialatela-Scafati, O. (2002a). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agric Food Chem*, 50(20) :5686–5690.
- Fattorusso, E., Iorizzi, M., Lanzotti, V., and Taglialatela-Scafati, O. (2002b). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agric Food Chem*, 50(20) :5686–5690.
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., Taglialatela-Scafati, O., Rosa, M. D., and Ianaro, A. (2000). Cytotoxic saponins from bulbs of *Allium porrum* L. *J Agric Food Chem*, 48(8) :3455–3462.
- Fearnhead, N. S., J. L. Wilding, J., and Bodmer, W. F. (2002). Genetics of colorectal cancer : hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*, 64 :27–43.

- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5) :759–767.
- Feng, B., Hu, W., Ma, B.-P., Wang, Y.-Z., Huang, H.-Z., Wang, S.-Q., and Qian, X.-H. (2007). Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *curvularia lunata*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(6) :1329–1338.
- Fiore, C., Eisenhut, M., Ragazzi, E., Zanchin, G., and Armanini, D. (2005). A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. *J Ethnopharmacol*, 99(3) :317–324.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2002a). The biological action of saponins in animal systems : a review. *Br J Nutr*, 88(6) :587–605.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2002b). The biological action of saponins in animal systems : a review. *Br J Nutr*, 88(6) :587–605.
- Frechet, D., Christ, B., du Sorbier, B. M., Fischer, H., and Vuilhorgne, M. (1991). Four triterpenoid saponins from dried roots of *Gypsophila* species. *Phytochemistry*, 30(3) :927–931.
- Fu, H., Koike, K., Li, W., Nikaido, T., Lin, W., and Guo, D. (2005). Silenorubicosides A-D, triterpenoid saponins from *Silene rubicunda*. *J Nat Prod*, 68(5) :754–758.
- Fuchs, H., Bachran, D., Panjideh, H., Schellmann, N., Weng, A., Melzig, M. F., Sutherland, M., and Bachran, C. (2009). Saponins as Tool for Improved Targeted Tumor Therapies. *Curr Drug Targets*, 10(2) :140–151.
- Gaidi, G., Correia, M., Chauffert, B., Beltramo, J.-L., Wagner, H., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2002a). Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Planta Med*, 68(1) :70–72.
- Gaidi, G., Marouf, A., Hanquet, B., Bauer, R., Correia, M., Chauffert, B., and Lacaille-Dubois, M. A. (2000a). A new major triterpene saponin from the roots of *Cucurbita foetidissima*. *J Nat Prod*, 63(1) :122–124.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., and Lacaille-Dubois, M. A. (2001a). Junceosides A-C, new triterpene saponins from *Arenaria juncea*. *J Nat Prod*, 64(12) :1533–1537.

- Gaidi, G., Miyamoto, T., and Lacaille-Dubois, M. A. (2005). An unusual new sulfated triterpene saponin from *Arenaria juncea*. *Pharmazie*, 60(8) :635–637.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Laurens, V., and Lacaille-Dubois, M. A. (2002b). New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation. *J Nat Prod*, 65(11) :1568–1572.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., M, R., and Lacaille-Dubois, M. A. (2004). Glandulosides A-D, triterpene saponins from *Acanthophyllum glandulosum*. *J Nat Prod*, 67(7) :1114–1118.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., and Lacaille-Dubois, M. A. (2001b). Three new acylated triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *J Nat Prod*, 64(7) :920–924.
- Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., Laurens, V., and Lacaille-Dubois, M. A. (2000b). Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *J Nat Prod*, 63(11) :1497–1502.
- gal, M. L. and Jeanguiot, N. (2010). *Comprendre une situation clinique par l'anatomie-physiologie - Du processus physiopathologique á la prise en charge du patient*, chapter 3, page 293. Estem.
- Galanty, A., Michalik, M., Sedek, L., and Podolak, I. (2008). The influence of LTS-4, a saponoside from *Lysimachia thyrsoflora* L., on human skin fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Mol Biol Lett*, 13(4) :585–598.
- Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V., and Pichette, A. (2009a). Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem*, 17(5) :2002–2008.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P., and Pichette, A. (2006). Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem*, 14(19) :6713–6725.
- Gauthier, C., Legault, J., and Pichette, A. (2009b). Recent progress in the synthesis of naturally occurring triterpenoid saponins. *Mini-Rev Org Chem*, 6(4) :321–344.

- Gee, J. M., Price, K. R., Ridout, C. L., Johnson, I. T., and Fenwick, G. R. (1989). Effects of some purified saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Toxicol In Vitro*, 3(2) :85–90.
- Ghaffari, S. M. (2004). Cytotaxonomy of some species of *Acanthophyllum* (Caryophyllaceae) from Iran. *Biologia, Bratislava*, 59(1) :53–60.
- Glensk, M., Wray, V., Nimtz, M., and Schopke, T. (1999). Silenosides A-C, triterpenoid saponins from *Silene vulgaris*. *J Nat Prod*, 62(5) :717–721.
- Gnoula, C., Mégalizzi, V., Nève, N. D., Sauvage, S., Ribaucour, F., Guissou, P., Duez, P., Dubois, J., Ingrassia, L., Lefranc, F., Kiss, R., and Mijatovic, T. (2008). Balanitin-6 and -7 : diosgenyl saponins isolated from *Balanites aegyptiaca* Del. display significant anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 32(1) :5–15.
- Günther, H. (1996). *La Spectroscopie de RMN : Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie*. Paris : Masson.
- Haddad, M., Khan, I. A., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2002). Two new prosapogenins from *Albizia adianthifolia*. *Pharmazie*, 57(10) :705–708.
- Haddad, M., Miyamoto, T., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). New Acylated Saponins from *Polygala myrtifolia*. *Helv. Chim. Acta*, 86(9) :3055–3065.
- Haddad, M., Miyamoto, T., Ramezani, M., , and Lacaille-Dubois, M.-A. (2004). New Triterpene Saponins from *Acanthophyllum pachystegium*. *Helv. Chim. Acta*, 87(1) :73–81.
- Hamed, A. I., Piacente, S., Autore, G., Marzocco, S., Pizza, C., and Oleszek, W. (2005). Anti-proliferative hopane and oleanane glycosides from the roots of *Glinus lotoides*. *Planta Med*, 71(6) :554–560.
- Han, X. W., Yu, H., Liu, X. M., Bao, X., Yu, B., Li, C., and Hui, Y. Z. (1999). Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of diosgenyl saponins. *Magn Reson Chem*, 37(2) :140–144.
- Hara, S., Okabe, H., and 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(2) :501–506.

- Haralampidis, K., Trojanowska, M., and Osbourn, A. E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 75 :31–49.
- Haridas, V., Nishimura, G., Xu, Z.-X., Connolly, F., Hanausek, M., Walaszek, Z., Zoltaszek, R., and Gutterman, J. U. (2009). Avicin D : a protein reactive plant isoprenoid dephosphorylates Stat 3 by regulating both kinase and phosphatase activities. *PLoS One*, 4(5) :e5578.
- Hebestreit, P. and Melzig, M. F. (2003). Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var. *githago*. *Planta Med*, 69(10) :921–925.
- Hebestreit, P., Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., and Melzig, M. F. (2006). Enhancement of cytotoxicity of lectins by *Saponinum album*. *Toxicon*, 47(3) :330–335.
- Heisler, I., Sutherland, M., Bachran, C., Hebestreit, P., Schnitger, A., Melzig, M. F., and Fuchs, H. (2005). Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells. *J Control Release*, 106(1-2) :123–137.
- Henry, M. (2005). Saponins and phylogeny : Example of the "gypsogenin group" saponins. *Phytochem. Rev.*, 4(2-3) :89–94.
- Hernandez, J. C., Leon, F., Brouard, I., Torres, F., Rubio, S., Quintana, J., Estevez, F., and Bermejo, J. (2008). Synthesis of novel spirostanic saponins and their cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem*, 16(4) :2063–2076.
- Hernández, J. C., León, F., Quintana, J., Estévez, F., and Bermejo, J. (2004). Icogenin, a new cytotoxic steroidal saponin isolated from *Dracaena draco*. *Bioorg Med Chem*, 12(16) :4423–4429.
- Hirschegger, P., Jakse, J., Trontelj, P., and Bohanec, B. (2010). Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium* : Alliaceae). *Mol Phylogenet Evol*, 54(2) :488–497.
- Hostettmann, K. and Marston, A. (1995). *Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products)*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Hostettmann, K., Marston, M., and Hostettmann, M. (1997). *Preparative Chromatography Techniques : Applications in Natural Product Isolation*, volume 53. Springer Verlag, Berlin, 2 edition.

- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L., Weng, T.-C., Yen, M.-H., Chiang, L.-C., and Lin, C.-C. (2004). The antiproliferative activity of saponin-enriched fraction from *Bupleurum Kaoui* is through Fas-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol Pharm Bull*, 27(7) :1112–1115.
- Hu, K. and Yao, X. (2003). The cytotoxicity of methyl protoneograccillin (nsc-698793) and gracillin (nsc-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytother Res*, 17(6) :620–626.
- Huang, H.-C., Liaw, C.-C., Zhang, L.-J., Ho, H.-U., Kuo, L.-M. Y., Shen, Y.-C., and Kuo, Y.-H. (2008). Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry*, 69(7) :1597–1603.
- Ikedo, T., Tsumagari, H., and Nohara, T. (2000). Steroidal oligoglycosides from the seeds of *Allium tuberosum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48(3) :362–365.
- Inoue, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nishino, A., Satomi, Y., and Nishino, H. (1995). Steroidal glycosides from *Allium macleanii* and *A. senescens*, and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry*, 40(2) :521–525.
- Ismailov, A. I. and Aliev, A. M. (1976). Determination of the steroid saponins in the onion (*Allium albiflorus*) that grows in Azerbaijan. *Farmatsiia*, 25(2) :17–20.
- Jabrane, A., Jannet, H. B., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Harzallah-Skhiri, F., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2011). Spirostane and cholestane glycosides from the bulbs of *Allium nigrum* L. *Food Chem.*, 125(2) :447–455.
- Jia, Z., Koike, K., Kudo, M., Li, H., and Nikaido, T. (1998a). Triterpenoid saponins and saponinogens from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*, 48(3) :529–536.
- Jia, Z., Koike, K., and Nikaido, T. (1998b). Major triterpenoid saponins from *saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.*, 61(11) :1368–1373.
- Jia, Z., Koike, K., and Nikaido, T. (1999). Saponarioside C, the first alpha-D-galactose containing triterpenoid saponin, and five related compounds from *Saponaria officinalis*. *J Nat Prod*, 62(3) :449–453.

- Jia, Z., Koike, K., Sahu, N. P., and Nikaido, T. (2002). *Triterpenoid saponins from Caryophyllaceae family*, volume 26, chapter 1, pages 3–61. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam.
- Jin, J.-O., Shastina, V. V., Shin, S.-W., Xu, Q., Park, J.-I., Rasskazov, V. A., Avilov, S. A., Fedorov, S. N., Stonik, V. A., and Kwak, J.-Y. (2009). Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. *FEBS Lett*, 583(4) :697–702.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., and Stevens, P. (2002). *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*. De Boeck Université s.a, 1 edition.
- Jung, H.-J., Lee, C. O., Lee, K.-T., Choi, J., and Park, H.-J. (2004). Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol Pharm Bull*, 27(5) :744–747.
- Kako, M., Miura, T., Nishiyama, Y., Ichimaru, M., Moriyasu, M., and Kato, A. (1996). Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Polygala senega* in normal and diabetic mice and its main component, the triterpenoid glycoside senegin-II. *Planta Med*, 62(5) :440–443.
- Kako, M., Miura, T., Nishiyama, Y., Ichimaru, M., Moriyasu, M., and Kato, A. (1997). Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *J Nat Prod*, 60(6) :604–605.
- Kalinowska, M., Zimowski, J., Paczkowski, C., and Wojciechowski, Z. A. (2005). The Formation of Sugar Chains in Triterpenoid Saponins and Glycoalkaloids. *Phytochem. Rev.*, 4(2-3) :237–257.
- Katselis, G. S., Estrada, A., Gorecki, D. K. J., and Barl, B. (2007). Adjuvant activities of saponins from the root of *Polygala senega* L. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(11) :1184–1194.
- Kerwin, S. M. (2004). Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 4(3) :263–272.
- Kim, J. (2008). Protective effects of Asian dietary items on cancers - soy and ginseng. *Asian Pac J Cancer Prev*, 9(4) :543–548.
- Koike, K., Jia, Z., and Nikaido, T. (1998). Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*, 47(7) :1343–1349.

- Koike, K., Jia, Z., and Nikaido, T. (1999). New triterpenoid saponins and sapogenins from *Saponaria officinalis*. *J Nat Prod*, 62(12) :1655–1659.
- Koike, K., Li, H., Jia, Z., Muraoka, H., Fukui, S., Inoue, M., and Ohmoto, T. (1994). Triterpenoid saponins from *Dianthus chinensis*. *Tetrahedron*, 50(45) :12811–12820.
- Kolb, T. M. and Davis, M. A. (2004). The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) provokes a prolonged morphologic response and ERK activation in Tsc2-null renal tumor cells. *Toxicol Sci*, 81(1) :233–242.
- Konoshima, T. (1996). Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemoprevention by saponins. *Adv Exp Med Biol*, 404 :87–100.
- Kougan, G. B., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Sondengam, B. L., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2010). Steroidal saponins from two species of dracaena. *J Nat Prod*, 73(7) :1266–1270.
- Koz, O., Bedir, E., Masullo, M., Alankus-Caliskan, O., and Piacente, S. (2010). Triterpene glycosides from *Agrostemma gracilis*. *Phytochemistry*, 71(5-6) :663–668.
- Kravets, S. D., Vollerner, Y. S., Gorovits, M. B., and Abubakirov, N. K. (1990). Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium*. *Chem. Nat. Compd*, 26(4) :359–373.
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Kameyama, A., Sashida, Y., and Nikaido, T. (1995). Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺/K⁺ ATPase. *Phytochemistry*, 40(4) :1071–1076.
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitahara, M., Yamazaki, M., and Yui, S. (2001). Securiosides A and B, novel acylated triterpene bisdesmosides with selective cytotoxic activity against M-CSF-stimulated macrophages. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(3) :371–374.
- Lacaille-Dubois, M.-A. (2005). *Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity : Recent developments*, pages 209–246. *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-Ur-Rahman (Ed.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou, Z. C., and Wagner, H. (1995). Acylated triterpene saponins from *Silene jennisseensis*. *Phytochemistry*, 40(2) :509–514.

- Lacaille-Dubois, M.-A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou, Z. C., and Wagner, H. (1997). Jennisseensosides C and D, biologically active acylated triterpene saponins from *Silene jennisseensis*. *Phytochemistry*, 45(5) :985–990.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou, Z. C., and Wagner, H. (1999a). A new biologically active acylated triterpene saponin from *Silene fortunei*. *J Nat Prod*, 62(1) :133–136.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou, Z. C., and Wagner, H. (1999b). A new biologically active acylated triterpene saponin from *silene fortunei*. *J Nat Prod*, 62(2) :404.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Hanquet, B., Rustaiyan, A., and Wagner, H. (1993). Squarroside A, a biologically active triterpene saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Phytochemistry*, 34(2) :489–495.
- Lacaille-Dubois, M.-A. and Mitaine-Offer, A.-C. (2005). Triterpene saponins from Polygalaceae. *Phytochem. Rev.*, 4(2-3) :139–149.
- Lanzotti, V. (2005). Bioactive Saponins from Allium and Aster Plants. *Phytochem Rev*, 4(2-3) :95–110.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A*, 1112(1-2) :3–22.
- Larhsini, M., Marston, A., and Hostettmann, K. (2003). Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*. *Fitoterapia*, 74(3) :237–241.
- Lassaux, A. and Mynard, A. (2007). Aperçu de la recherche sur les substances naturelles à Singapour.
- Lavaud, C., Voutquenne, L., Massiot, G., le Men-Olivier, L., Das, B. C., Laprèvote, O., Serani, L., Delaude, C., and Becchi, M. (1998). Saponins from the stem bark of *Filicium decipiens*. *Phytochemistry*, 47(3) :441–449.
- Li, G., Zhang, Y., Yang, B., Xia, Y., Zhang, Y., Lu, S., and Kuang, H. (2010). Leiyemudanosides A-C, three new bidesmosidic triterpenoid saponins from the roots of *Caulophyllum robustum*. *Fitoterapia*, 81(3) :200–204.

- Li, H., Wang, Q.-J., Zhu, D.-N., and Yang, Y. (2008a). Reinoside C, a triterpene saponin of *Polygala aureocauda* Dunn, exerts hypolipidemic effect on hyperlipidemic mice. *Phytother Res*, 22(2) :159–164.
- Li, H.-Y., Koike, K., Ohmoto, T., and Ikeda, K. (1993). Dianchinosides A and B, Two New Saponins from *Dianthus chinensis*. *J Nat Prod*, 56(7) :1065–1070.
- Li, J., Jiang, Y., and Tu, P.-F. (2006). New acylated triterpene saponins from *Polygala tenuifolia* willd. *J Asian Nat Prod Res*, 8(6) :499–503.
- Li, M., Wei, S.-Y., Xua, B., Guo, W., Liu, D.-L., Cui, J.-R., and Yao, X.-S. (2008b). Proapoptotic and microtubule-disassembly effects of ardisiacrispin (A+B), triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* on human hepatoma Bel-7402 cells. *J Asian Nat Prod Res*, 10(10) :729–736.
- Lievre, A. and Laurent-Puig, P. (2004). [Colorectal carcinogenesis : update]. *Rev Prat*, 54(2) :143–150.
- Liu, M.-J., Wang, Z., Ju, Y., Wong, R. N.-S., and Wu, Q.-Y. (2005a). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 55(1) :79–90.
- Liu, M.-J., Yue, P. Y.-K., Wang, Z., and Wong, R. N.-S. (2005b). Methyl protodioscin induces G₂/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Lett*, 224(2) :229–241.
- Liu, R., Ma, S., Yu, S., Pei, Y., Zhang, S., Chen, X., and Zhang, J. (2009). Cytotoxic oleanane triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *J Nat Prod*, 72(4) :632–639.
- Liu, Z., Li, D., Owen, N. L., Grant, D. M., Cates, R. G., and Jia, Z. (1995). Triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *J Nat Prod*, 58(10) :1632–1635.
- Luo, J.-G., Kong, L.-Y., Takaya, Y., and Niwa, M. (2006). Two new monodesmosidic triterpene saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 54(8) :1200–1202.
- Luo, J.-G., Liu, J., and Kong, L.-Y. (2008a). New pentacyclic triterpenes from *Gypsophila oldhamiana* and their biological evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. *Chem Biodivers*, 5(5) :751–757.

- Luo, J.-G., Ma, L., and Kong, L.-Y. (2008b). New triterpenoid saponins with strong alpha-glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. *Bioorg Med Chem*, 16(6) :2912–2920.
- Ma, C.-H., Fan, M.-S., Lin, L.-P., Tang, W.-D., Lou, L.-G., Ding, J., and Huang, C.-G. (2008a). Cytotoxic triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *J Asian Nat Prod Res*, 10(1-2) :177–184.
- Ma, L., Gu, Y.-C., Luo, J.-G., Wang, J.-S., Huang, X.-F., and Kong, L.-Y. (2009). Triterpenoid saponins from *Dianthus versicolor*. *J Nat Prod*, 72(4) :640–644.
- Ma, R., Song, G., You, W., Yu, L., Su, W., Liao, M., Zhang, Y., Huang, L., Zhang, X., and Yu, T. (2008b). Anti-microtubule activity of tubeimoside I and its colchicine binding site of tubulin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 64(4) :559–568.
- Mahato, S. B., Ganguly, A. N., and Sahu, N. P. (1982). Steroid saponins. *Phytochemistry*, 21(5) :959–978.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., and Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81(7) :703–714.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Yan, L., Ma, C., Liu, C., and Huang, L. (2009). Antitumor and antimetastatic activities of *Rhizoma Paridis* saponins. *Steroids*, 74(13-14) :1051–1056.
- Massiot, G. and Lavaud, C. (1995). *Structural Elucidation of Saponins*, volume 15, pages 187–224. In : Atta-Ur-Rahman (Ed.) *Structure and Chemistry (Part 3) : Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier : Amsterdam.
- Matsuura, H. (2001). Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *J Nutr*, 131(3s) :1000S–1005S.
- Melzig, M. F., Bader, G., and Loose, R. (2001). Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Med*, 67(1) :43–48.
- Melzig, M. F., Hebestreit, P., Gaidi, G., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2005). Structure-activity-relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin. *Planta Med*, 71(11) :1088–1090.

- Mimaki, Y., Kawashima, K., Kanmoto, T., and Sashida, Y. (1993). Steroidal glycosides from *Allium albopilosum* and *A. ostrowskianum*. *Phytochemistry*, 34(3) :799–805.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T., and Sashida, Y. (1999a). Steroidal glycosides from the bulbs of *Allium jesdianum*. *J Nat Prod*, 62(1) :194–197.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T., and Sashida, Y. (1999b). Steroidal saponins from the bulbs of *Allium karataviense*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 47(6) :738–743.
- Mimaki, Y., Yokosuka, A., Kuroda, M., and Sashida, Y. (2001). Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol Pharm Bull*, 24(11) :1286–1289.
- Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Delaude, V. L. C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). New Acylated Triterpene Saponins from *Polygala arenaria*. *Helv. Chim. Acta*, 86(7) :2404–2413.
- Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Jolly, C., C. Delaude, M.-A., and Lacaille-Dubois (2005). Triterpene Saponins from Four Species of the Polygalaceae Family. *Helv. Chim. Acta*, 88(11) :2986–2995.
- Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Khan, I. A., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2002). Three new triterpene saponins from two species of *Carpolobia*. *J Nat Prod*, 65(4) :553–557.
- Mitaine-Offer, A.-C., Penez, N., Miyamoto, T., Delaude, C., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2010). Acylated triterpene saponins from the roots of *Securidaca longepedunculata*. *Phytochemistry*, 71(1) :90–94.
- Miyase, T., Saitoh, H., Shiokawa, K., and Ueno, A. (1995). Six new presenegenin glycosides, reinosides A–F, from *Polygala reinii* root. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 43(3) :466–472.
- Moretti, C. and Aubertin, C. (2007). *Les marchés de la biodiversité*. IRD.
- Morita, H., Yun, Y. S., Takeya, K., Itokawa, H., Yamada, K., and Shiota, O. (1997). Vaccaroid A, a new triterpenoid saponin with contractility of rat uterine from *Vaccaria segetalis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7(8) :1095–1096.

- Morita, T., Ushiroguchi, T., Hayashi, N., Matsuura, H., Itakura, Y., and Fuwa, T. (1988). Steroidal saponins from elephant garlic, bulbs of *Allium ampeloprasum* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36(9) :3480–3486.
- Morzycki, J. W., Paradowska, K., DfÖbrowska-Balcerzak, K., Jastrzebska, I., Siergiejczyk, L., and Wawer, I. (2005). ¹³C NMR study of spirostanes and furostanes in solution and solid state. *J. Mol. Struct.*, 744–747 :447–455.
- Motsei, M. L., Lindsey, K. L., van Staden, J., and Jager, A. K. (2003). Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*, 86(2-3) :235–241.
- Mskhiladze, L., Legault, J., Lavoie, S., Mshvildadze, V., Kuchukhidze, J., Elias, R., and Pichette, A. (2008). Cytotoxic steroidal saponins from the flowers of *Allium leucanthum*. *Molecules*, 13(12) :2925–2934.
- Munafo, J. P., Ramanathan, A., Jimenez, L. S., and Gianfagna, T. J. (2010). Isolation and structural determination of steroidal glycosides from the bulbs of easter lily (*lilium longiflorum* thunb.). *J Agric Food Chem*, 58(15) :8806–8813.
- Nagai, T., Suzuki, Y., Kiyohara, H., Susa, E., Kato, T., Nagamine, T., Hagiwara, Y., Tamura, S., Yabe, T., Aizawa, C., and Yamada, H. (2001). Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and diphtheria-pertussis-tetanus vaccines. *Vaccine*, 19(32) :4824–4834.
- Nakano, K., Murakimi, K., Takaishi, Y., Tomimatsu, T., and Nohara, T. (1989). Studies on the Constituents of *Heloniopsis orientalis* (THUNB.) C. TANAKA. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(1) :116–118.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*.
- Noté, O. P., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Pegnyemb, D. E., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2009). Cytotoxic acacic acid glycosides from the roots of *Albizia coriaria*. *J Nat Prod*, 72(10) :1725–1730.

- Nwafor, P. A. and Bassey, A. I. L. (2007). Evaluation of anti-diarrhoeal and anti-ulcerogenic potential of ethanol extract of *Carpolobia lutea* leaves in rodents. *J Ethnopharmacol*, 111(3) :619–624.
- of USSR, F. (1936). *Centrospermeae*. B. K. Shishin, ed. Translated from USSRian. Moskva-Leningrad : Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR.
- Ohtsuki, T., Sato, M., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Kawahara, N., Goda, Y., and Ishibashi, M. (2006). Steroidal saponins from *calamus insignis*, and their cell growth and cell cycle inhibitory activities. *Bioorg Med Chem*, 14(3) :659–665.
- Oleszek, W. and Bialy, Z. (2006). Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002-2005). *J. Chromatogr., A*, 1112(1-2) :78–91.
- on Diet Nutrition, T. A. C. S. . A. C. and Prevention, C. (1996). Guidelines on diet, nutrition, and cancer prevention : reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin*, 46(6) :325–341.
- Organization, W. H. (1990). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 797 :1–204.
- Park, S.-Y., Yook, C.-S., and Nohara, T. (2005). New oleanene glycosides from the leaves of *Acanthopanax japonicus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 53(9) :1147–1151.
- Peltomaki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, 21(6) :1174–1179.
- Peng, J., Yao, X., Kobayashi, H., and Ma, C. (1995). Novel furostanol glycosides from *Allium macrostemon*. *Planta Med.*, 61(1) :58–61.
- Peng, J. P. and Yao, X. S. (1996). 19 new steroidal saponins from *Allium* plants : isolation, structural elucidation and effect on blood coagulability. *Adv Exp Med Biol*, 404 :511–526.
- Peng, J. P., Yao, X. S., Tezuka, Y., and Kikuchi, T. (1996). Furostanol glycosides from bulbs of *Allium chinense*. *Phytochemistry*, 41(1) :283–285.
- Podolak, I., Galanty, A., and Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents : a review. *Phytochem Rev*, 9(3) :425–474.

- Putieva, Z. M., Mzhel'skaya, L. G., Gorovits, T. T., Kondratenko, E. S., and Abubakirov, N. K. (1975). Triterpene glycosides of *Acanthophyllum gypsophiloides* IV. The structure of acanthophyllosides B and C. *Chem. Nat. Compd.*, 11(6) :756–761.
- Raju, J. and Mehta, R. (2009). Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr Cancer*, 61(1) :27–35.
- Rao, A. V. and Sung, M. K. (1995). Saponins as anticarcinogens. *J Nutr*, 125(3 Suppl) :717S–724S.
- Rechinger, K. H., Melzheimer, V., Möschl, W., and Schiman-Czeika, H. (1988). *Caryophyllaceae II*. Flora Iranica. Flora des iranischen hochlandes und der umrahmenden Gebirge. Graz (Austria) : Akademische Druck ; Verlagsanstalt.
- Rettig, J.-H., Wilson, H.-D., and Manhart, J.-R. (1992). Phylogeny of the Caryophyllales : Gene sequence data. *Taxon*, 41 :201–209.
- Rodman, J.-E. (1990). Centrospermeae revisited, part 1. *Ta*, 39 :383–393.
- Rougier, P., Mitry, E., Dominguez, S., and Taieb, J. (2005). *Les cancers digestifs*, page 381. Springer Editions.
- Runyoro, D. K. B., Matee, M. I. N., Ngassapa, O. D., Joseph, C. C., and Mbwambo, Z. H. (2006a). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC Complement Altern Med*, 6 :11.
- Runyoro, D. K. B., Ngassapa, O. D., Matee, M. I. N., Joseph, C. C., and Moshi, M. J. (2006b). Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of Candida infections. *J Ethnopharmacol*, 106(2) :158–165.
- Sahu, N. P., Banerjee, S., Mondal, N. B., and Mandal, D. (2008). Steroidal saponins. *Fortschr Chem Org Naturst*, 89 :45–141.
- Sakuma, S. and Shoji, J. (1981). Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. I. Isolation of Saponins and the Structures of Onjisaponins G and F. *Chem Pharm Bull*, 29(9) :2431–2441.

- Sakuma, S. and Shoji, J. (1982). Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. II. On the Structures of Onjisaponins A, B and E. *Chem Pharm Bull*, 30(3) :810–821.
- Sang, S., Lao, A., Wang, H., and Chen, Z. (1999). Two new spirostanol saponins from *Allium tuberosum*. *J Nat Prod*, 62(7) :1028–1029.
- Sang, S., Mao, S., Lao, A., Chen, Z., and Ho, C. T. (2001). Four new steroidal saponins from the seeds of *Allium tuberosum*. *J Agric Food Chem*, 49(3) :1475–1478.
- Sang, S.-M., n. Lao, A., Leng, Y., Gu, Z.-P., l. Chen, Z., Uzawa, J., and Fujimoto, Y. (2000). Segetoside F a new triterpenoid saponin with inhibition of luteal cell from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Tetrahedron Lett.*, 41(48) :9205–9207.
- Sang, S.-M., Zou, M. L., Zhang, X. W., Lao, A. N., and Chen, Z. L. (2002). Tuberoside M, a new cytotoxic spirostanol saponin from the seeds of *Allium tuberosum*. *J Asian Nat Prod Res*, 4(1) :69–72.
- Sashida, Y., Kawashima, K., and Mimaki, Y. (1991). Novel Polyhydroxylated Steroidal Saponins from *Allium giganteum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(3) :698–703.
- Sata, N., Matsunaga, S., Fusetani, N., Nishikawa, H., Takamura, S., and Saito, T. (1998). New antifungal and cytotoxic steroidal saponins from the bulbs of an elephant garlic mutant. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(10) :1904–1911.
- Sautour, M., Mitaine-Offer, A.-C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2007). The Dioscorea genus : a review of bioactive steroid saponins. *J Nat Med*, 61(2) :91–101.
- Schöpke, T. (2000). *Non-NMR methods for structure elucidation of saponins*, chapter 10, pages 96–106. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. W. Oleszek, A. Marston., Ed. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.
- Semba, M. and Inui, N. (1990). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-enhanced transformation in vitro by inhibitors of phospholipid metabolism. *Toxicol Lett*, 51(1) :1–6.
- Shibata, S. (2001). Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci*, 16 Suppl :S28–S37.

- Sieber, O., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R. K. S., Bisgaard, M.-L., Orntoft, T. F., Aaltonen, L. A., Hodgson, S. V., Thomas, H. J. W., and Tomlinson, I. P. M. (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*, 348(9) :791–799.
- Siepmann, C., Bader, G., Hiller, K., Wray, V., Domke, T., and Nimtz, M. (1998). New saponins from the seeds of *Agrostemma githago* var. *githago*. *Planta Med*, 64(2) :159–164.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., and Kiemle, D. J. (2007). *Identification spectrométrique de composés organiques*. De Boeck & Larcier s.a, 2 edition.
- Siu, F.-M., Ma, D.-L., Cheung, Y.-W., Lok, C.-N., Yan, K., Yang, Z., Yang, M., Xu, S., Ko, B. C.-B., He, Q.-Y., and Che, C.-M. (2008). Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (Polyphyllin D) : induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways. *Proteomics*, 8(15) :3105–3117.
- Sobolewska, D., Janeczko, Z., Kisiel, W., Podolak, I., Galanty, A., and Trojanowska, D. (2006). Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm*, 63(3) :219–223.
- Soliman, H. S. M., Elgamal, M. H. A., Simon, A., Toth, G., Horvath, G., and Duddeck, H. (1999). A new gypsogenin saponin from *Arenaria filicaulis*. *J Nat Prod*, 62(6) :885–888.
- Soltysik, S., Wu, J. Y., Recchia, J., Wheeler, D. A., Newman, M. J., Coughlin, R. T., and Kensil, C. R. (1995). Structure/function studies of QS-21 adjuvant : assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine*, 13(15) :1403–1410.
- Southon, S., Johnson, I. T., Gee, J. M., and Price, K. R. (1988a). The effect of Gypsophila saponins in the diet on mineral status and plasma cholesterol concentration in the rat. *Br J Nutr*, 59(1) :49–55.
- Southon, S., Wright, A. J., Price, K. R., Fairweather-Tait, S. J., and Fenwick, G. R. (1988b). The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *Br J Nutr*, 59(3) :389–396.
- Sparg, S. G., Light, M. E., and van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*, 94(2-3) :219–243.

- Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., G.Venguswamy, Kyprianou, N., and Damodaran, C. (2009). Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 125(4) :961–967.
- Staerk, D., Chapagain, B. P., Lindin, T., Wiesman, Z., and Jaroszewski, J. W. (2006). Structural analysis of complex saponins of *Balanites aegyptiaca* by 800 MHz ¹H NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem*, 44(10) :923–928.
- Stellman, J. M. (2000). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*, volume I, chapter 33, page 33.51. Bureau international du Travail.
- Stevenson, P. C., Dayarathna, T. K., Belmain, S. R., and Veitch, N. C. (2009). Bisdesmosidic saponins from *Securidaca longepedunculata* roots : evaluation of deterrency and toxicity to Coleopteran storage pests. *J Agric Food Chem*, 57(19) :8860–8867.
- Sun, H., Fang, W.-S., Wang, W.-Z., and Hu, C. (2006). Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type triterpenoids. *Bot Stud*, 47(4) :339–368.
- Sun, H.-X., Xie, Y., and Ye, Y.-P. (2009a). Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27(12) :1787–1796.
- Sun, Y., Cai, T.-T., Zhou, X.-B., and Xu, Q. (2009b). Saikosaponin a inhibits the proliferation and activation of T cells through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 9(7-8) :978–983.
- Sy Nguyen, R. B. (2008). *Manuel d’anatomie et de physiologie*, chapter 3, pages 45–46. LA-MARRE, 4^e edition.
- Tabassi, S. A. S., Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Moghimipour, E., and Mohajeri, S. A. (2006). Isolation, characterization and study of enhancing effects on nasal absorption of insulin in rat of the total saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Curr Drug Deliv*, 3(4) :399–404.
- Tabopda, T. K., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Duchamp, J.-F. M. O., Ngadjui, B. T., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2011a). Acylated Triterpene Saponins from *Atractoxima liberica* Stapf. *He*, 94(11) :2066–2076.

- Tabopda, T. K., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Ngadjui, B. T., Duchamp, J.-F. M. O., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2011b). Three New Medicagenic Acid Saponins from *Polygala micrantha*. *Helv. Chim. Acta*, 94(5) :914–922.
- Tan, N.-H., Zhao, S.-X., Zhou, J., and Chen, C.-X. (1995). Structure of rubicunoside A. *Huaxue Xuebao*, 53(10) :1024–1033.
- Teng, R., Wu, Z., He, Y., Wang, D., and Yang, C. (2002). Revised structures of Arillatanosides A, B, C from *Polygala arillata*. *Magn. Reson. Chem.*, 40(6) :424–429.
- Teuscher, E., Anton, R., and Lostein, A. (2005). *Plantes aromatiques Épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. TEC ET DOC, médicales internationales edition.
- Thibeault, D., Gauthier, C., Legault, J., Bouchard, J., Dufour, P., and Pichette, A. (2007). Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3beta-O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg Med Chem*, 15(18) :6144–6157.
- Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L., and Ding, J. (2005). PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 4(8) :874–882.
- Tian, Y., Tang, H.-F., Qiu, F., Wang, X.-J., Chen, X.-L., and Wen, A.-D. (2009). Triterpenoid saponins from *Ardisia pusilla* and their cytotoxic activity. *Planta Med*, 75(1) :70–75.
- Timité, G., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Ramezani, M., Rustaiyan, A., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2010a). Structure elucidation of new oleanane-type glycosides from three species of *Acanthophyllum*. *Magn Reson Chem*, 48(5) :370–374.
- Timité, G., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2011). Unusual oleanane-type saponins from *Arenaria montana*. *Phytochemistry*, 72(6) :503–507.
- Timité, G., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Delaude, C., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2010b). Presenegenin Glycosides from *Securidaca welwitschii*. *Helv. Chim. Acta*, 93(11) :2237–2244.

- Tommasi, N. D., Piacente, S., Gacs-Baitz, E., Simone, F. D., Pizza, C., and Aquino, R. (1998). Triterpenoid saponins from *Spergularia ramosa*. *J Nat Prod*, 61(3) :323–327.
- Trouillas, P., Corbière, C., Liagre, B., Duroux, J.-L., and Beneytout, J.-L. (2005). Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells : a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem*, 13(4) :1141–1149.
- Tundis, R., Bonesi, M., Deguin, B., Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tillequin, F., and Menichini, F. (2009). Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit) (Apiaceae). *Bioorg Med Chem*, 17(13) :4542–4547.
- Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., and Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3) :275–297.
- Wang, H., Gao, J., Kou, J., Zhu, D., and Yu, B. (2008a). Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine*, 15(5) :321–326.
- Wang, H., Gao, J., Zhu, D., and Yu, B. (2006). Two new triterpenoid saponins isolated from *Polygala japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 54(12) :1739–1742.
- Wang, H., Gao, J., Zhu, D., and Yu, B. (2007a). Quality evaluation of *Polygala japonica* through simultaneous determination of six bioactive triterpenoid saponins by HPLC-ELSD. *J Pharm Biomed Anal*, 43(4) :1552–1556.
- Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E. R., Hill, D. L., Wang, H., and Zhang, R. (2007b). In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59(5) :589–601.
- Wang, X.-H., Xu, B., Liu, J.-T., and Cui, J.-R. (2008b). Effect of beta-escin sodium on endothelial cells proliferation, migration and apoptosis. *Vascul Pharmacol*, 49(4-6) :158–165.
- Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M., and Yu, B. (2007c). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorg Med Chem*, 15(7) :2528–2532.

- Wassler, M., Jonasson, I., Persson, R., and Fries, E. (1987). Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes. Release of secretory proteins. *Biochem J*, 247(2) :407–415.
- Wassler, M., Westman, J., and Fries, E. (1990). Permeabilization of hepatocytes by a saponin and the effects of dextran. *Eur J Cell Biol*, 51(2) :252–258.
- Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Krause, E., Stephanowitz, H., and Melzig, M. F. (2009a). Enhancement of saporin cytotoxicity by *Gypsophila saponins*—more than stimulation of endocytosis. *Chem Biol Interact*, 181(3) :424–429.
- Weng, A., Bachran, D., Gorick, C., Bachran, C., Fuchs, H., and Melzig, M. F. (2009b). A simple method for isolation of *Gypsophila saponins* for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy. *Planta Med*, 75(13) :1421–1422.
- Weng, A., Gorick, C., and Melzig, M. F. (2009c). Enhancement of toxicity of saporin-based toxins by *Gypsophila saponins*—kinetic of the saponin. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234(8) :961–966.
- Weng, A., Jenett-Siems, K., Gorick, C., and Melzig, M. F. (2008a). Enhancement of cytotoxicity of ribosome-inactivating-protein type I by *Saponinum album* is not based on stimulation of phagocytosis. *J Pharm Pharmacol*, 60(7) :925–930.
- Weng, A., Melzig, M. F., Bachran, C., and Fuchs, H. (2008b). Enhancement of saporin toxicity against U937 cells by *Gypsophila saponins*. *J Immunotoxicol*, 5(3) :287–292.
- Wheeler, J. M., Beck, N. E., Kim, H. C., Tomlinson, I. P., Mortensen, N. J., and Bodmer, W. F. (1999). Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines : the predominant role of hmlh1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18) :10296–10301.
- Willett, W. C. (1999). Goals for nutrition in the year 2000. *CA Cancer J Clin*, 49(6) :331–352.
- Williams, F. (1898). A Revision of the genus *Arenaria*, Linn. *J. Linn. Soci. Bot.*, 33(232–233) :326–437.
- Wu, Y. J., Hong, C. Y., Lin, S. J., Wu, P., and Shiao, M. S. (1998). Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble

- antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(3) :481–486.
- Xu, T.-H., Lv, G., Xu, Y.-J., Xie, S.-X., Zhao, H.-F., Han, D., Si, Y.-S., Li, Y., Niu, J.-Z., and Xu, D.-M. (2008). A new glycoside from *Polygala tenuifolia* Willd. *Chinese Chemical Letters*, 19(7) :817–820.
- Xu, Y., Chiu, J.-F., He, Q.-Y., and Chen, F. (2009). Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways. *J Proteome Res*, 8(3) :1585–1593.
- Xu, Z.-X., Liang, J., Haridas, V., Gaikwad, A., Connolly, F. P., Mills, G. B., and Gutterman, J. U. (2007). A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase. *Cell Death Differ*, 14(11) :1948–1957.
- Yabe, T., Tuchida, H., Kiyohara, H., Takeda, T., and Yamada, H. (2003). Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-yoei-to. *Phytomedicine*, 10(2-3) :106–114.
- Yan, L. L., Zhang, Y. J., Gao, W. Y., Man, S. L., and Wang, Y. (2009). In vitro and in vivo anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Exp Oncol*, 31(1) :27–32.
- Yang, C.-R., Zhang, Y., Jacob, M. R., Khan, S. I., Zhang, Y.-J., and Li, X.-C. (2006). Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(5) :1710–1714.
- Yao, Y., Jia, M., Wu, J.-G., Zhang, H., Sun, L.-N., Chen, W.-S., and Rahman, K. (2010). Anxiolytic and sedative-hypnotic activities of polygalasaponins from *Polygala tenuifolia* in mice. *Pharm Biol*, 48(7) :801–807.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueno, T., Kadoya, M., Matsuda, H., Yamahara, J., and Murakami, N. (1995a). Bioactive Saponins and Glycosides. I. Senegae Radix. (1) : E-Senegasaponins a and b and Z-Senegasaponins a and b, Their Inhibitory Effect on Alcohol Absorption and Hypoglycemic Activity. *Chem Pharm Bull*, 43 :2115–2122.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueno, T., Kadoya, M., Matsuda, H., Yamahara, J., and Murakami, N. (1995b). E-senegasaponins A and B, Z-senegasaponins A and B, Z-senegin II

- and III, new type inhibitors of ethanol absorption in rats from *senegae radix*, the roots of *Polygala senega* L. var *latifolia* Torrey et Gray. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 43(2) :350–352.
- Yu, B. and Sun, J. (2009). Current Synthesis of Triterpene Saponins. *Chem. Asian J.*, 4(5) :642–654.
- Yu, B., Zhang, Y., and Tang, P. (2007). Carbohydrate Chemistry in the Total Synthesis of Saponins. *Eur. J. Org. Chem.*, 2007(31) :5145–5161.
- Yu, L., Yang, J.-Z., Chen, X.-G., Shi, J.-G., and Zhang, D.-M. (2009). Cytotoxic triterpenoid glycosides from the roots of *Gordonia chrysandra*. *J Nat Prod*, 72(5) :866–870.
- Yu, T. X., Ma, R. D., and Yu, L. J. (2001). Structure-activity relationship of tubeimosides in anti-inflammatory, antitumor, and antitumor-promoting effects. *Acta Pharmacol Sin*, 22(5) :463–468.
- Yuan, L., Ji, T.-F., Li, C.-J., Wang, A.-G., Yang, J.-B., and Su, Y.-L. (2009). Two new steroidal saponins from the seeds of *Allium cepa* L. *J Asian Nat Prod Res*, 11(3) :213–218.
- Yui, S., Kudo, T., Hodono, K., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., and Yamazaki, M. (2003). Characterization of the growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of a triterpene saponin, securioside B against BAC1.2F5 macrophages. *Mediators Inflamm*, 12(3) :157–166.
- Yui, S., Ubukata, K., Hodono, K., Kitahara, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., and Yamazaki, M. (2001). Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *Int Immunopharmacol*, 1(11) :1989–2000.
- Zhang, C., Li, B., Gaikwad, A. S., Haridas, V., Xu, Z., Gutterman, J. U., and Duvic, M. (2008). Avicin D selectively induces apoptosis and downregulates p-STAT-3, bcl-2, and survivin in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol*, 128(11) :2728–2735.
- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Noguchi, H. (1996a). Nine new triterpene saponins, polygalasaponins XXXIII–XLI from the roots of *Polygala fallax* Hemsl. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 44(11) :2092–2099.
- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Noguchi, H. (1998a). Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, 47(1) :45–52.

- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Noguchi, H. (1998b). Polygalasaponins XLII-XLVI from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, 47(3) :459–466.
- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Ueno, A. (1995a). Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. I. Structures of polygalasaponins I-X. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 43(1) :115–120.
- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Ueno, A. (1995b). Studies on the constituents of *Polygala japonica* HOUTT. II. Structures of polygalasaponins XI-XIX. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 43(6) :966–970.
- Zhang, D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., and Ueno, A. (1996b). Studies on the Constituents of *Polygala japonica* HOUTT. III. Structures of Polygalasaponins XX-XXVII. *Chem Pharm Bull*, 44(1) :173–179.
- Zhang, Z. and Li, S. (2007). Cytotoxic triterpenoid saponins from the fruits of *Aesculus pavia* L. *Phytochemistry*, 68(15) :2075–2086.
- Zhao, Y., Kang, L.-P., Liu, Y.-X., Liang, Y.-G., Tan, D.-W., Yu, Z.-Y., Cong, Y.-W., and Ma, B.-P. (2009). Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities. *Planta Med*, 75(4) :356–363.
- Zheng, Q., Li, W., Han, L., and Koike, K. (2007). Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(4) :646–650.
- Zhou, L. (1996). On the geographical distribution of *Arenaria* L. *Acta Phytotax. Sini.*, 34(3) :229–241.
- Zou, K., Zhao, Y.-Y., and Zhang, R.-Y. (2006). A cytotoxic saponin from *Albizia julibrissin*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 54(8) :1211–1212.
- Zou, Z. M., Yu, D. Q., and Cong, P. Z. (2001). A steroidal saponin from the seeds of *Allium tuberosum*. *Phytochemistry*, 57(8) :1219–1222.

Liste des tableaux

2.1	Saponines à spirostane	27
2.2	Saponines à spirostane (2)	28
2.3	Saponines à spirostane (3)	29
2.4	Saponines à Furostane (1)	30
2.5	Saponines à Furostane (2)	31
2.6	Saponines à Furostane (3)	32
2.7	Saponines à Cholestane	33
2.8	Saponines à gypsogénine	35
2.9	Saponines à gypsogénine	36
2.10	Saponines à acide gypsogénique	37
2.11	Saponines à acide gypsogénique	38
2.12	Saponines à acide quillaïque	39
2.13	Saponines à acide quillaïque (suite)	40
2.14	Saponines à acide 16 α -hydroxygypsogénique	41
2.15	Saponines à présénégénine (1)	43
2.16	Saponines à présénégénine (2)	44
2.17	Saponines à présénégénine (3)	45
2.18	Saponines à présénégénine (4)	46
2.19	Saponines à présénégénine (5)	47
2.20	Saponines à présénégénine (6)	48
2.21	Saponines bayogénine 1	49
2.22	Saponines à bayogénine 2	50

2.23	Saponines à acide médicagénique	51
2.24	Saponines à polygalagénine	52
1.1	Les sources d'ions	59
1.2	Informations apportées par les spectres de RMN 2D	65
2.1	Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé ASa dans la pyridine- d_5	71
2.2	Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé AL 66-74 dans la pyridine- d_5	89
2.3	Déplacements chimiques RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de l' aglycone et des sucres du composé ASc dans la pyridine- d_5	91
2.4	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC12R5 dans la pyridine- d_5	182
2.5	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC23R2 dans la pyridine- d_5	190
2.6	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC24R9 dans la pyridine- d_5	201
2.7	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC23R4 dans la pyridine- d_5	209
2.8	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC113 dans la pyridine- d_5	220
2.9	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC1154 dans la pyridine- d_5	222
2.10	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASC23R6 dans la pyridine- d_5	224
2.11	Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C de l'aglycone et des sucres du composé ASCi-2 dans la pyridine- d_5	228
2.1	Saponines stéroïdiques actives du genre <i>Allium</i> (Lanzotti, 2005)	242
2.2	Relations structure-activité cytotoxique des saponines (Podolak et al., 2010)	245
2.3	Mécanismes d'action cytotoxique des saponines (Podolak et al., 2010)	246
2.4	Mécanismes d'action cytotoxique des saponines (suite)	247

3.1	Classement des cancers par incidence et décès, tous sexes confondus, en France, 2011	253
3.2	Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de <i>Acantho- phyllum</i>	257
3.3	Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de <i>Arenaria montana</i>	257
3.4	Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de <i>Allium schoenoprasum</i>	261

Liste des figures

1.1	Caryophyllaceae (Judd et al., 2002)	8
1.2	<i>Acanthophyllum sordidum</i> (Rechinger et al., 1988)	10
1.3	<i>Acanthophyllum lilacinum</i> (Rechinger et al., 1988)	11
1.4	<i>Acanthophyllum elatius</i> (Rechinger et al., 1988)	12
1.5	<i>Arenaria montana</i>	13
1.6	Polygalaceae (Judd et al., 2002)	15
1.7	<i>Securidaca welwitschii</i>	16
1.8	<i>Allium schoenoprasum</i>	19
2.1	Exemples de génines triterpéniques	24
2.2	Exemples de génines stéroïdiques	25
2.3	Les différents sucres constitutifs des saponines	26
2.4	Les différents acides organiques rencontrés dans les saponines	26
2.5	Aglycones isolés des Caryophyllaceae	34
2.6	Gypsogénine	35
2.7	Acide gypsogénique	37
2.8	Acide quillaique	39
2.9	Acide 16 α -hydroxygypsogénique	41
2.10	Présénégénine	42
2.11	Bayogénine	49
2.12	Acide médicagénique	50
2.13	Polygalagénine	52

1.1	Exemples d'hydrolyse chimique	58
1.2	62
1.3	62
1.4	63
1.5	Exemples de corrélations HSQC et HMBC	64
2.1	Schéma d'extraction des saponines des racines de <i>Acanthophyllum sor-</i> <i>didum</i>	67
2.2	Schéma de purification du composé ASa	68
2.3	Schéma de purification du composé ASb	68
2.4	Schéma de purification du composé ASc	69
2.5	Structure du composé ASa	74
2.6	Spectre COSY de la partie osidique de la saponine ASb	77
2.7	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASb	78
2.8	Spectre HMBC de la partie 2 aglycone de la saponine ASb	79
2.9	Spectre HSQC de la partie osidique (anomères) de la saponine ASb	80
2.10	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASb	81
2.11	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASb	82
2.12	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASb	83
2.13	Spectre TOCSY de la partie osidique de la saponine ASb	84
2.14	Structure du composé Asb	85
2.15	Structure du composé AE 62-66	86
2.16	Structure du composé AL 66-74	90
2.17	Structure du composé ASc	92
2.18	Schéma d'extraction des saponines de <i>Securidaca welwitschii</i>	99
2.19	Purification des composés Sw21, Sw231 et Sw64	100
2.20	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine SW264	107
2.21	Spectre HMBC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW264	108
2.22	Spectre HMBC de la partie acide diméthoxycinnamique/osidique de la saponine SW264	109
2.23	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW264	110
2.24	Spectre HSQC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW264	111

2.25	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW264	112
2.26	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW264	113
2.27	Structure du composé Sw264	114
2.28	Spectre HMBC montrant l'acétylation de la position C-3 du rhamnose de la saponine SW21	116
2.29	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine SW21	117
2.30	Spectre HMBC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW21	118
2.31	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine SW21	119
2.32	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW21	120
2.33	Spectre HSQC de la partie acide diméthoxycinnamique de la saponine SW21	121
2.34	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW21	122
2.35	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW21	123
2.36	Structure du composé Sw21	124
2.37	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine SW231	126
2.38	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine SW231	127
2.39	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine SW231	128
2.40	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine SW231	129
2.41	Structure du composé Sw231	130
2.42	Schéma d'extraction des saponines de <i>Arenaria montana</i>	140
2.43	Schéma de purification du composé AMA-1	141
2.44	Schéma de purification du composé AMR	142
2.45	Schéma de purification du composé AMOG5	143
2.46	Structure du composé AMA-1	146
2.47	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine AMA-1	147
2.48	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine AMA-1	148
2.49	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMA-1	149
2.50	Spectre HSQC de la osidique de la saponine AMA-1	150
2.51	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMA-1	151
2.52	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine AMR	153
2.53	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine AMR	154
2.54	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine AMR	155
2.55	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMR	156

2.56	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine AMR	157
2.57	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMR	158
2.58	Structure du composé AMR	159
2.59	Structure du composé AMOG5	161
2.60	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine AMOG5	162
2.61	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine AMOG5	163
2.62	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine AMOG5	164
2.63	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine AMOG5	165
2.64	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine AMOG5	166
2.65	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine AMOG5	167
2.66	Schéma d'extraction des saponines de <i>Allium schoenoprasum</i>	175
2.67	Purification des composés Asc113, Asc1154 et Asc12R5	176
2.68	Purification des composés Asc23R2, Asc23R4, Asc23R6 et Asc24R9 .	177
2.69	Purification du composé Asc-i-2	178
2.70	Structure du composé ASC12R5	181
2.71	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC12R5	183
2.72	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC12R5	184
2.73	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC12R5	185
2.74	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC12R5	186
2.75	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC12R5	187
2.76	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC12R5	188
2.77	Structure du composé ASC23R2	191
2.78	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2	192
2.79	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2	193
2.80	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2	194
2.81	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC23R2	195
2.82	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC23R2	196
2.83	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC23R2	197
2.84	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC23R2	198
2.85	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC24R9	202
2.86	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC24R9	203
2.87	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC24R9	204

2.88	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC24R9	205
2.89	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC24R9	206
2.90	Structure du composé ASC24R9	207
2.91	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4	210
2.92	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4	211
2.93	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4	212
2.94	Spectre HMBC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4	213
2.95	Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine ASC23R4	214
2.96	Spectre HSQC de la partie osidique de la saponine ASC23R4	215
2.97	Spectre HSQC de la partie aglycone de la saponine ASC23R4	216
2.98	Spectre NOESY de la partie osidique de la saponine ASC23R4	217
2.99	Structure du composé ASC23R4	218
2.100	Structure du composé ASC113	219
2.101	Structure du composé ASC1154	223
2.102	Structure du composé ASC23R6	225
2.103	Structure du composé ASCi-2	229
3.1	Schéma du gros intestin	251
3.2	Structure des composés ASa, ASb et ASc	255
3.3	Structure des composés AMA-1, AMR et AMOG5	256
3.4	Structure des composés ASC113, ASC24R9, ASC23R6 et ASCi-2	260